



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0109668
(43) 공개일자 2023년07월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/47 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/4705 (2013.01)
A61P 1/16 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7019853
- (22) 출원일자(국제) 2021년11월16일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년06월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/059564
- (87) 국제공개번호 WO 2022/104280
국제공개일자 2022년05월19일
- (30) 우선권주장
63/114,457 2020년11월16일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
서로젠 오퍼레이팅, 인크.
미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코
오이스터 포인트 블러바드 171 스위트 400
- (72) 발명자
리, 양
미국 94040 캘리포니아 마운틴 뷰 케스타 드라이브
1142
장, 쟁지안
미국 94706 캘리포니아 알바니 솔라노 애비뉴 703
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이상남

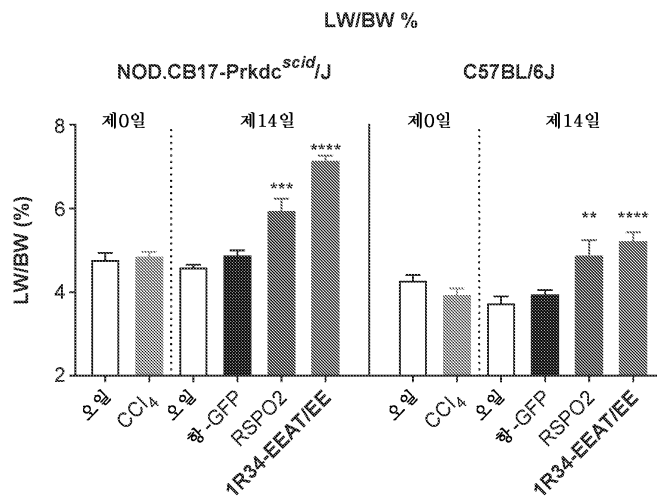
전체 청구항 수 : 총 51 항

(54) 발명의 명칭 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자 및 그의 용도

(57) 요약

본 개시내용은 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자, 및 이들 분자를 사용하여 간 조직에서 Wnt 신호전달을 증가시키고 간 질환 및 장애를 치료하는 관련 방법을 제공한다.

대표도 - 도32



(52) CPC특허분류

C07K 16/2851 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

브레즈스키, 랜달 제이.

미국 94501 캘리포니아 알라메다 코트 스트리트
1125

프레스타, 레오나드

미국 941098 캘리포니아 샌프란시스코 고프 스트리트
1900 아파트먼트 #206

로페즈, 토마스

미국 94305 캘리포니아 팔로 알토 컬리지 애비뉴
314 아파트먼트 4

첸, 후이

미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 리도 라인 918

바리벌트, 헬렌

미국 94062 캘리포니아 레드우드 시티 배인 플레이스
816

예, 웬-첸

미국 94003 캘리포니아 벨몬트 벨몬트 우즈 웨이
2920

투, 쉹지앙

미국 94404 캘리포니아 포스터 시티 마젤란 라인
832

(30) 우선권주장

63/182,106 2021년04월30일 미국(US)

63/248,157 2021년09월24일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

징크 및 Ring 핑거 3 (ZNR3) 및 Ring 핑거 단백질 43 (RNF43)으로부터 선택된 하나 이상의 막횡단 E3 유비퀴틴 리가제와 특이적으로 결합하는 제1 도메인, 및 아시알로당단백질 수용체 1 (ASGR1)과 특이적으로 결합하는 제2 도메인을 포함하며, 여기서:

- (a) 제1 도메인은 변형된 R-스폰딘 폴리펩티드, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하고;
- (b) 제2 도메인은 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 서열; 및 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 서열을 포함하는 변형된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 것인

간-특이적 Wnt ("윙리스(Wingless)-관련 통합 부위" 또는 "윙리스 및 Int-1" 또는 "윙리스-Int") 신호 증강 분자, 또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 2

제1항에 있어서, R-스폰딘 폴리펩티드, 또는 그의 단편 또는 변이체가 푸린 도메인 1 서열, 및 임의로, 야생형 또는 돌연변이된 푸린 도메인 2 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하며, 여기서 R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체는 완전한 길이의 야생형 R-스폰딘 폴리펩티드와 비교 시 류신-풍부 반복부-함유 G-단백질 커플링된 수용체 4-6 (LGR4-6)에 대한 감소된 결합을 갖는 것인 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체가 인간 R-스폰딘 2의 아미노산 105 및 109에 상응하는 위치에서의 아미노산 치환을 포함하는 것인 분자.

청구항 4

제3항에 있어서, 아미노산 치환이 하기인 분자:

- (a) F105R, F105A 또는 F105E; 및
- (b) F109A 또는 F109E.

청구항 5

제4항에 있어서, 2개의 아미노산 치환이 하기인 분자:

- (a) F105R 및 F109A;
- (b) F105A 및 F109A;
- (c) F105E 및 F109A; 또는
- (d) F105E 및 F109E.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 서열의 조합이 하기로부터 선택되는 것인 분자:

- (a) 각각 SYAMS (서열식별번호: 34), AISGSGGSTYYEDSVKG (서열식별번호: 35), DFSSRRWYLEY (서열식별번호: 36), QGESLRSYYAS (서열식별번호: 37), YGKSNRPS (서열식별번호: 38), 및 CTSLERIGYLSYV (서열식별번호: 39);
- (b) 각각 SYAMS (서열식별번호: 34), AISGSGGSTYYEDSVKG (서열식별번호: 35), DFSSRRWYLEY (서열식별번호: 36), QGESLRSYYAS (서열식별번호: 37), YGKANRPS (서열식별번호: 40), 및 CTSLERIGYLSYV (서열식별번호: 39);

또는

(c) 각각 RISENIYSNLA (서열식별번호: 41), AAINLAE (서열식별번호: 42), QHFWGTPFT (서열식별번호: 43), AYGIN (서열식별번호: 44), EIFPRSDSTFYNEKFKG (서열식별번호: 45), 및 KGREYGTSHYFDY (서열식별번호: 46).

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 도메인이 항체 경쇄 폴리펩티드 및 항체 중쇄 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 제1 도메인은 임의로 링커 모이어티를 통해 항체 중쇄 폴리펩티드의 N-말단과 융합되는 것인 분자.

청구항 8

제7항에 있어서, 링커 모이어티가 펩티딜 링커 서열인 분자.

청구항 9

제8항에 있어서, 링커 서열이 글리신, 아스파라긴, 세린, 트레오닌 및 알라닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함하는 것인 분자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드 및 2개의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 각각의 융합 폴리펩티드는 링커 모이어티, 임의로 펩티딜 링커 서열을 통해 항체 중쇄 폴리펩티드의 N-말단과 융합된 변형된 R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하며, 여기서 2개의 융합 폴리펩티드는 서로 연결되고, 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드의 상이한 중쇄 폴리펩티드에 각각 연결되는 것인 분자.

청구항 11

제10항에 있어서,

(i) 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드가 서열식별번호: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 18, 19, 21, 23, 25, 또는 27 중 어느 하나 내의 가변 영역 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 가변 영역 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함하고/거나;

(ii) 2개의 항체 중쇄 폴리펩티드가 서열식별번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 33, 또는 51 중 어느 하나 내의 가변 영역 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 가변 영역 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함하는 것인

분자.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 2개의 융합 폴리펩티드가 각각 서열식별번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 33, 또는 51 중 어느 하나와 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함하는 것인 분자.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드가 서열식별번호: 7과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함하고, 2개의 융합 폴리펩티드가 각각 서열식별번호: 8과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함하는 것인 분자.

청구항 14

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드가 서열식별번호: 25와 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함하고, 2개의 융합 폴리펩티드가 각각 서열식별번호: 26과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함하는 것인 분자.

청구항 15

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체 경쇄 폴리펩티드 또는 융합 폴리펩티드, 또는 서열식별번호: 1-33 또는 51 중 어느 하나와 적어도 95% 동일성을 갖는 폴리펩티드, 또는 그의 가변 영역을 코딩하는 핵산 서열.

청구항 16

제15항에 있어서, 핵산 서열이 DNA 또는 mRNA인 핵산 서열.

청구항 17

제16항의 핵산 서열을 포함하는 벡터.

청구항 18

제17항에 있어서, 벡터가 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 서열을 포함하는 발현 벡터인 벡터.

청구항 19

제17항에 있어서, 벡터가 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 서열을 포함하는 바이러스인 벡터.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 21

폴리펩티드가 발현 벡터에 의해 발현되는 조건 하에 제20항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 제10항 내지 제14항 중 어느 한 항의 항체 경쇄 폴리펩티드 또는 융합 폴리펩티드를 생산하는 공정.

청구항 22

제21항에 있어서, 생산된 융합 폴리펩티드를 분리하는 단계를 추가로 포함하는 공정.

청구항 23

하기를 포함하는 제약 조성물:

- a) 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 분자, 제15항 또는 제16항의 핵산 서열, 제17항 내지 제19항 중 어느 한 항의 벡터, 또는 제20항의 숙주 세포; 및
- b) 제약상 허용되는 희석제, 아주반트 또는 담체.

청구항 24

간 조직에서 Wnt ("윙리스-관련 통합 부위" 또는 "윙리스 및 Int-1" 또는 "윙리스-Int") 신호전달을 증가시키는 방법으로서, 간 조직을 하기와 접촉시키는 것을 포함하며:

- a) 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 분자;
- b) 제15항 또는 제16항의 핵산 서열;
- c) 제17항 내지 제19항 중 어느 한 항의 벡터;
- d) 제20항의 숙주 세포; 또는
- e) 제23항의 제약 조성물,

여기서 분자는 간 조직과 결합하고 간 조직에서 징크 및 Ring 핑거 3 (ZNR3) 및 Ring 핑거 단백질 43 (RNF43) 으로부터 선택된 하나 이상의 막횡단 E3 유비퀴틴 리가제의 세포내이입을 격리 또는 증가시키는 것인 방법.

청구항 25

간 질환 또는 간 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 하기의 유효량을 투여하는 것을 포함하는,

상기 대상체에서 간 질환 또는 간 장애를 치료 또는 예방하는 방법으로서, 여기서 간 질환 또는 간 장애는 감소된 Wnt ("윙리스-관련 통합 부위" 또는 "윙리스 및 Int-1" 또는 "윙리스-Int") 신호전달과 연관되거나 또는 증가된 Wnt 신호전달로부터 이익을 얻을 것인 방법:

- a) 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 분자;
- b) 제15항 또는 제16항의 핵산 서열;
- c) 제17항 내지 제19항 중 어느 한 항의 벡터;
- d) 제20항의 숙주 세포; 또는
- e) 제23항의 제약 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 대상체에게 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 분자의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 대상체에게 제15항 또는 제16항의 핵산 서열의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 28

제25항에 있어서, 대상체에게 제17항 내지 제19항 중 어느 한 항의 벡터의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 29

제25항에 있어서, 대상체에게 제20항의 숙주 세포의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 30

제25항에 있어서, 대상체에게 제23항의 제약 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 31

제25항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 간 질환 또는 간 장애가 모든 원인의 급성 간부전, 약물-유발 급성 간부전, 급만성 간부전 (ACLF), 간의 급성 대상부전, 간경변증으로 인한 복수, 간경변증이 있는 환자의 저나트륨혈증, 간신장 증후군-급성 신장 손상 (HRS-AKI), 간성 뇌병증, 알콜성 간 질환, 모든 원인의 만성 간부전, 비대상성 간부전, 말기 대상성 간부전, 간경변증, 모든 원인의 간 섬유증, 문맥 고혈압, 모든 원인의 만성 간 기능부전, 말기 간 질환 (ESLD), 비알콜성 지방간염 (NASH), 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD) (지방간), 알콜성 간염, 급성 알콜성 간염 (AAH), 만성 알콜성 간염, 만성 폭음 알콜-유발 간 손상, 알콜성 간 질환 (ALD) (알콜-관련 간 질환 (ARLD)으로 불리기도 함), C형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HCV), B형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HBV), 기타 바이러스성 간염 (예를 들어, A형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HAV) 및 D형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HDV)), 원발성 담즙성 간경변증, 자가면역성 간염, 간 수술, 간 손상, 정맥-폐쇄성 질환 (VOD), 굴혈관 폐쇄 증후군 (SOS), 원발성 담즙성 담관염 (PBC), 원발성 경화성 담관염 (PSC), 간 이식, 간 수술 및 이식에서의 "과소 이식편" 증후군, 선천성 간 질환 및 장애, APAP (아세트아미노펜) 과다복용으로 인한 간부전, 및 유전 질환, 퇴행, 노화, 약물 또는 손상으로 인한 임의의 다른 간 질환 또는 장애로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 간 질환 또는 간 장애가 급성 알콜성 간염, 급성 간부전, 급만성 간부전 (ACLF), 간의 급성 대상부전, 간경변증으로 인한 복수, 간경변증이 있는 환자의 저나트륨혈증, 간신장 증후군-급성 신장 손상 (HRS-AKI), 간성 뇌병증 또는 간경변증으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 33

제25항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 분자, 핵산, 벡터, 숙주 세포, 또는 제약 조성물이 비경구적으로,

간 세포, 근육내로, 또는 국부적으로 간에, 임의로 정맥내로 투여되는 것인 방법.

청구항 34

제25항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 포유동물, 임의로 인간인 방법.

청구항 35

간 세포, 간 조직 또는 간 오가노이드를 하기와 접촉시키는 것을 포함하는, 간 세포, 간 조직 또는 간 오가노이드를 생성, 배양 또는 유지하는 방법:

- a) 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 분자;
- b) 제15항 또는 제16항의 핵산 서열;
- c) 제17항 내지 제19항 중 어느 한 항의 벡터;
- d) 제20항의 숙주 세포; 또는
- e) 제23항의 제약 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 공여자로부터 수득된 간 조직을, 임의로 간 조직을 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 분자를 포함하는 조성물로 생체외에서 관류함으로써 접촉시키는 것을 포함하는, 생체외에서 간 조직의 생육력을 유지하기 위한 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 공여자 간 조직을 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 분자를 포함하는 조성물과 생체내에서 접촉시키는 것을 포함하는, 간 조직의 생육력을 유지하기 위한 방법.

청구항 38

제35항에 있어서, 간 오가노이드 배양물을, 임의로 간 오가노이드 배양물을 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항의 분자를 포함하는 배지에서 배양함으로써 접촉시키는 것을 포함하는, 간 오가노이드 배양물을 생성 또는 유지하기 위한 방법.

청구항 39

서열식별번호: 1-28, 33, 또는 51 중 어느 하나와 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드로서, 임의로 여기서 폴리펩티드는 하기 CDR의 세트 중 하나를 포함하는 것인 폴리펩티드:

- (a) SYAMS (서열식별번호: 34), AISGSGGSTYYEDSVKG (서열식별번호: 35), 및 DFSSRRWYLEY (서열식별번호: 36);
- (b) QGESLRSYYAS (서열식별번호: 37), YGKSNRPS (서열식별번호: 38), 및 CTSLERIGYLSYV (서열식별번호: 39);
- (c) QGESLRSYYAS (서열식별번호: 37), YGKANRPS (서열식별번호: 40), 및 CTSLERIGYLSYV (서열식별번호: 39);
- (d) RISENIYSNLA (서열식별번호: 41), AAINLAE (서열식별번호: 42), 및 QHFWGTPFT (서열식별번호: 43); 또는
- (e) AYGIN (서열식별번호: 44), EIFPRSDSTFYNEKFKG (서열식별번호: 45), 및 KGREYGTSHYFDY (서열식별번호: 46).

청구항 40

제39항에 있어서, 폴리펩티드가 링커 모이어티, 임의로 펩티딜 링커 서열을 통해 항체 중쇄 폴리펩티드의 N-말단과 융합된 변형된 R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하는 융합 단백질이며, 여기서 R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체는 인간 R-스폰딘 2의 아미노산 105 및 109에 상응하는 위치에서의 2개의 아미노산 치환을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 41

제40항에 있어서, 2개의 아미노산 치환이 하기인 폴리펩티드:

- (a) F105R, F105A 또는 F105E; 및
- (b) F109A 또는 F109E.

청구항 42

제41항에 있어서, 2개의 아미노산 치환이 하기인 폴리펩티드:

- (a) F105R 및 F109A;
- (b) F105A 및 F109A;
- (c) F105E 및 F109A; 또는
- (d) F105E 및 F109E.

청구항 43

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 중쇄 폴리펩티드가 하기로부터 선택된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 서열의 조합을 포함하는 것인 폴리펩티드:

- (a) 각각 SYAMS (서열식별번호: 34), AISGSGGSTYYEDSVKG (서열식별번호: 35), DFSSRRWYLEY (서열식별번호: 36); 또는
- (b) 각각 RISENIYSNLA (서열식별번호: 41), AAINLAE (서열식별번호: 42), QHFWGTPFT (서열식별번호: 43).

청구항 44

제39항에 있어서, 폴리펩티드가 변형된 항체 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 45

제44항에 있어서, 변형된 항체 경쇄 폴리펩티드가 하기로부터 선택된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 서열의 조합을 포함하는 것인 폴리펩티드:

- (a) 각각 QGESLRSYYAS (서열식별번호: 37), YGKSNRPS (서열식별번호: 38), 및 CTSLERIGYLSYV (서열식별번호: 39);
- (b) 각각 QGESLRSYYAS (서열식별번호: 38), YGKANRPS (서열식별번호: 40), 및 CTSLERIGYLSYV (서열식별번호: 39); 또는
- (c) 각각 AYGIN (서열식별번호: 44), EIFPRSDSTFYNEKFKG (서열식별번호: 45), 및 KGREYGTSHYFDY (서열식별번호: 46).

청구항 46

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 분자가 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자로부터 선택되는 것인, 분자, 핵산 서열, 벡터, 숙주 세포, 공정, 제약 조성물 또는 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 분자가 EEST-EE인, 분자, 핵산 서열, 벡터, 숙주 세포, 공정, 제약 조성물 또는 방법.

청구항 48

제46항에 있어서, 분자가 EEST-RA인, 분자, 핵산 서열, 벡터, 숙주 세포, 공정, 제약 조성물 또는 방법.

청구항 49

제46항에 있어서, 분자가 EEAT-EE인, 분자, 핵산 서열, 벡터, 숙주 세포, 공정, 제약 조성물 또는 방법.

청구항 50

제46항에 있어서, 분자가 8M24 EASE-EE인, 분자, 핵산 서열, 벡터, 숙주 세포, 공정, 제약 조성물 또는 방법.

청구항 51

제46항에 있어서, 분자가 8M24 EASE-RA인, 분자, 핵산 서열, 벡터, 숙주 세포, 공정, 제약 조성물 또는 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 2020년 11월 16일에 출원된 미국 가출원 번호 63/114,457, 2021년 4월 30일에 출원된 미국 가출원 번호 63/182,106, 및 2021년 9월 24일에 출원된 미국 가출원 번호 63/248,157을 우선권 주장하며, 이들 가출원 각각은 모든 목적을 위해 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **서열 목록에 관한 진술**

[0004] 본 출원과 연관된 서열 목록은 종이 사본 대신 텍스트 포맷으로 제공되며, 본 명세서에 참조로 포함된다. 서열 목록을 함유하는 텍스트 파일의 명칭은 SRZN_019_03WO_ST25.txt이다. 이러한 텍스트 파일은 100 KB이고, 2021년 11월 11일에 생성되었으며 EFS-Web을 통해 전자적으로 제출되고 있다.

[0005] **발명의 분야**

[0006] 본 개시내용은 E3 유비퀴틴 리가제, ZNRF3 또는 RNF43과 결합하는 도메인, 및 간-특이적 세포 표면 수용체 결합 도메인을 포함하는 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자, 예를 들어 융합 단백질 뿐만 아니라 E3 리가제, ZNRF3/RNF43의 간-특이적 내재화 또는 격리를 매개하므로, Wnt 수용체를 안정화시키고 Wnt 신호전달을 간-특이적 방식으로 증강시키며, 다양한 질환 및 장애를 치료 및 예방하기 위해 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 사용하는 관련 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] Wnt ("윙리스(Wingless)-관련 통합 부위", "윙리스 및 Int-1" 또는 "윙리스-Int") 리간드와 그의 신호는 뼈, 간, 피부, 위, 장, 신장, 중추 신경계, 유선, 구강 점막, 미뢰, 난소, 달팽이관 및 기타 여러 조직을 포함한 많은 필수 기관 및 조직의 발달, 항상성 및 재생을 제어하는데 중요한 역할을 한다 (예를 들어, 문헌 [Clevers, Loh, and Nusse, 2014; 346:1248012]에 의해 검토됨). Wnt 신호전달 경로의 조절은 퇴행성 질환 및 조직 손상을 치료할 가능성이 있다. 이러한 목표를 달성하기 위해, 원치 않는 효과를 피하기 위해 간-특이적 또는 세포 유형-특이적 방식으로 Wnt 신호전달 활성을 조정하는 전략을 개발하는 것이 바람직하다. 치료제로서 Wnt 신호전달을 조정하기 위한 과제 중 하나는 다수의 Wnt 리간드와 Wnt 수용체인 프리즐드(Frizzled) 1-10 (Fzd1-10)이 존재하며, 많은 조직이 다수의 중복 Fzds를 발현한다는 것이다. 표준 Wnt 신호는 또한 Fzds 외에도 다양한 조직에서 광범위하게 발현되는 공동 수용체로서 저밀도 지단백질 (LDL) 수용체 관련 단백질 5 (LRP5) 또는 저밀도 지단백질 (LDL) 수용체 관련 단백질 6 (LRP6)을 수반한다.
- [0008] R-스폰딘 1-4는 Wnt 신호를 증폭시키는 리간드 계열이다. R-스폰딘 각각은 한쪽 끝에 징크 및 Ring 핑거 3 (ZNRF3) 또는 Ring 핑거 단백질 43 (RNF43)을 함유하고 다른 쪽 끝에 류신-풍부 반복부-함유 G-단백질 커플링된 수용체 4-6 (LGR4-6)을 함유하는 수용체 복합체를 통해 작동한다 (예를 들어, 문헌 [Knight and Hankenson 2014, Matrix Biology; 37: 157-161]에 의해 검토됨). R-스폰딘은 부가의 작용 메커니즘을 통해서도 작동할 수 있다. ZNRF3 및 RNF43은 분해를 위해 Wnt 수용체 (Fzd1-10 및 LRP5 또는 LRP6)를 특이적으로 표적으로 하는 2개의 막-결합 E3 리가제이다. R-스폰딘이 ZNRF3/RNF43 및 LGR4-6과 결합하면 삼원 복합체의 클리어런스 또는 격리가 발생하여 Wnt 수용체로부터 E3 리가제를 제거하고 Wnt 수용체를 안정화시켜, Wnt 신호가 증강된다. 각각의 R-스폰딘은 2개의 푸린 도메인 (1 및 2)을 함유하며, 푸린 도메인 1은 ZNRF3/RNF43과 결합하고 푸린 도메인 2는 LGR4-6과 결합한다. 푸린 도메인 1 및 2를 함유하는 R-스폰딘의 단편은 Wnt 신호전달을 증폭시키기에는 충분하다. R-스폰딘 효과는 Wnt 신호에 따라 달라지지만, LGR4-6 및 ZNRF3/RNF43 둘 다는 다양한 조직에서 널리 발현되기 때문에 R-스폰딘의 효과는 조직 특이적이지 않다.
- [0009] 특이적 질환 및 장애의 치료 및 예방을 위한 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자에 대한 필요성이 관련 기술분야에

분명히 존재한다. 본 발명은 간-특이적 방식으로 Wnt 활성을 증가시키는데 유용한 조성물 및 방법을 제공함으로써 이러한 필요성을 해결한다.

발명의 내용

- [0010] 본 발명은 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자 및 그의 용도, 예를 들어 표적 조직에서 Wnt 신호전달을 증가시키고 증가된 Wnt 신호전달로부터 이익을 얻을 것인 질환 및 병태를 치료하는데 있어서의 그의 용도에 관한 것이다. 특정한 실시양태에서, 조직은 간이다.
- [0011] 한 실시양태에서, 본 발명은 ZNRF3 및 RNF43으로부터 선택된 하나 이상의 막횡단 E3 유비퀴틴 리가제와 특이적으로 결합하는 제1 도메인 및 간-특이적 세포 표면 분자와 특이적으로 결합하는 제2 도메인을 포함하는, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공하며, 여기서 상기 분자는 조직에서 Wnt 신호전달을 증가시킨다. 특정 실시양태에서, 제2 도메인은 간-특이적 세포 표면 분자와 특이적으로 결합하고 간 또는 간 세포에서 Wnt 신호전달을 증가시킨다. 다양한 실시양태에서, 제1 도메인 및 제2 도메인 중 하나 또는 둘 다는 폴리펩티드, 항체, 소분자, 자연 리간드, 비-자연 리간드, 또는 그의 변이체이다.
- [0012] Wnt 신호 증강 분자의 특정한 실시양태에서, 제1 도메인은 제1 폴리펩티드 서열을 포함하고/거나 제2 도메인은 제2 폴리펩티드 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 분자는 제1 폴리펩티드 서열 및 제2 폴리펩티드 서열을 포함하는 융합 단백질을 포함한다.
- [0013] 특정 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 서열은 R-스폰딘 서열 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 특정한 실시양태에서, R-스폰딘은 R-스폰딘-1, R-스폰딘-2, R-스폰딘-3 또는 R-스폰딘-4, 예를 들어 인간 R-스폰딘-1-4이다. 특정 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 서열은 R-스폰딘 푸린 도메인 1 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 서열은 야생형 R-스폰딘 유래 서열 또는 변형된 서열이다. 또한, 제1 폴리펩티드 서열은 상응하는 천연 완전한 길이의 R-스폰딘과 비교 시 LGR4-6에 대한 결합이 증가하거나, 유사하거나 또는 감소될 수 있다. 일부 실시양태에서, R-스폰딘 또는 R-스폰딘 푸린 도메인 1은 서열식별번호 (SEQ ID NO): 29-32 또는 47-50에 존재하는 R-스폰딘 또는 R-스폰딘 푸린 1 도메인 중 임의의 것과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 동일성을 갖는다. 특정 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 ZNRF3 및/또는 RNF43과 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다. 특정한 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 a) 본원에 제시된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 서열; 및/또는 b) 본원에 제시된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 변이체이며, 여기서 상기 변이체는 상기 CDR 서열 내에 8개 미만의 아미노산 치환을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 나노바디, 본원에 제시된 VH 또는 VL 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다.
- [0014] 특정 실시양태에서, 제2 폴리펩티드 서열은 폴리펩티드, 항체 또는 그의 단편 또는 변이체, 또는 그의 리간드 또는 단편 또는 변이체이다. 특정 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 ASGR1 및/또는 ASGR2와 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다. 특정한 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 a) 본원에 제시된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 서열; 및/또는 b) 본원에 제시된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 변이체이며, 여기서 상기 변이체는 상기 CDR 서열 내에 8개 미만의 아미노산 치환을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 나노바디, 본원에 제시된 VH 또는 VL 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다.
- [0015] 본원에 개시된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 특정 예시적 실시양태에서: 조직은 간 조직이고, 세포 표면 수용체는 아시알로당단백질 수용체 1 (ASGR1), 아시알로당단백질 수용체 2 (ASGR2), 트랜스페린 수용체 2 (TFR2) 또는 용질 운반체 패밀리 10 구성원 1 (SLC10A1)이다.
- [0016] 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 특정한 실시양태에서, 제1 도메인 및 제2 도메인은 링커 모이어티에 의해 연결된다. 특정 실시양태에서, 링커 모이어티는 펩티딜 링커 서열이다. 특정한 실시양태에서, 펩티딜 링커 서열은 글리신, 아스파라긴, 세린, 트레오닌 및 알라닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함한다.
- [0017] 특정한 실시양태에서, 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 단일 폴리펩티드, 예를 들어 제1 도메인 및 제2 도메인을 포함하는 융합 단백질로 이루어진다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 각각 제1 도메인 및 제2 도메인을 포함하는 2개 이상의 융합 단백질을 포함하는 2개 이상의 폴리펩

티드, 예컨대 이량체 또는 다량체를 포함하며, 여기서 2개 이상의 폴리펩티드는, 예를 들어, 링커 모이어티를 통해 또는 2개 이상의 폴리펩티드 각각 내의 아미노산 잔기 간의 결합, 예를 들어 시스테인 잔기 간의 분자간 디설피드 결합을 통해 연결된다. 특정한 실시양태에서, 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 2개 이상의 폴리펩티드 서열을 포함한다. 예를 들어, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 제1 도메인 또는 제2 도메인을 구성하는 항체 중쇄 및 경쇄 (또는 그의 항원-결합 단편)를 포함할 수 있으며, 여기서 다른 도메인 (즉, 제2 도메인 또는 제1 도메인)은 융합 단백질로서 (예를 들어, 직접적으로 또는 펩티드 링커를 통해) 또는 링커 모이어티를 통해 항체 중쇄 또는 경쇄에 연결된다. 특정한 실시양태에서, 다른 도메인은 중쇄의 N-말단, 중쇄의 C-말단, 경쇄의 N-말단, 또는 경쇄의 C-말단에 연결된다. 이러한 구조는 부착된 IgG 스캐폴드 또는 포맷으로서 본원에 지칭될 수 있다.

[0018] 관련 실시양태에서, 본 개시내용은 징크 및 Ring 핑거 3 (ZNR3) 및 Ring 핑거 단백질 43 (RNF43)으로부터 선택된 하나 이상의 막횡단 E3 유비퀴틴 리가제와 특이적으로 결합하는 제1 도메인, 및 아시알로당단백질 수용체 1 (ASGR1)과 특이적으로 결합하는 제2 도메인을 포함하는 간-특이적 Wnt ("윙리스-관련 통합 부위" 또는 "윙리스 및 Int-1" 또는 "윙리스-Int") 신호 증강 분자, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공하며, 여기서: (a) 제1 도메인은 변형된 R-스폰딘 폴리펩티드, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하고; (b) 제2 도메인은 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 서열; 및 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 서열을 포함하는 변형된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, R-스폰딘 폴리펩티드, 또는 그의 단편 또는 변이체는 푸린 도메인 1 서열 및 임의로, 야생형 또는 돌연변이된 푸린 도메인 2 서열 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하며, 여기서 R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체는 완전한 길이의 야생형 R-스폰딘 폴리펩티드와 비교 시 류신-풍부 반복부-함유 G-단백질 커플링된 수용체 4-6 (LGR4-6)에 대한 감소된 결합을 갖는다. 특정 실시양태에서, R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체는 인간 R-스폰딘 2의 아미노산 105 및 109에 상응하는 위치에서의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 아미노산 치환은 (a) F105R, F105A 또는 F105E; 및 (b) F109A 또는 F109E이다. 특정한 실시양태에서, 2개의 아미노산 치환은 (a) F105R 및 F109A; (b) F105A 및 F109A; (c) F105E 및 F109A; 또는 (d) F105E 및 F109E이다. 특정한 실시양태에서, CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 서열의 조합은 하기로부터 선택된다: (a) 각각 SYAMS (서열식별번호: 34), AISGSGGSTYYEDSVKG (서열식별번호: 35), DFSSRRWYLEY (서열식별번호: 36), QGESLRSYYAS (서열식별번호: 37), YGKSNRPS (서열식별번호: 38), 및 CTSLERIGYLSYV (서열식별번호: 39); (b) 각각 SYAMS (서열식별번호: 34), AISGSGGSTYYEDSVKG (서열식별번호: 35), DFSSRRWYLEY (서열식별번호: 36), QGESLRSYYAS (서열식별번호: 37), YGKANRPS (서열식별번호: 40), 및 CTSLERIGYLSYV (서열식별번호: 39); 또는 (c) 각각 RISENIYSNLA (서열식별번호: 41), AAINLAE (서열식별번호: 42), QHFWGTPFT (서열식별번호: 43), AYGIN (서열식별번호: 44), EIFPRSDSTFYNEKFKG (서열식별번호: 45), 및 KGREYGTSHYFDY (서열식별번호: 46). 특정 실시양태에서, 제2 도메인은 항체 경쇄 폴리펩티드 및 항체 중쇄 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 제1 도메인은 임의로 링커 모이어티를 통해 항체 중쇄 폴리펩티드의 N-말단과 융합된다. 특정한 실시양태에서, 링커 모이어티는 펩티드 링커 서열이다. 특정 실시양태에서, 링커 서열은 글리신, 아스파라긴, 세린, 트레오닌 및 알라닌으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드 및 2개의 융합 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 각각의 융합 폴리펩티드는 링커 모이어티, 임의로 펩티드 링커 서열을 통해 항체 중쇄 폴리펩티드의 N-말단과 융합된 변형된 R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하며, 여기서 2개의 융합 폴리펩티드는 서로 연결되고, 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드는 융합 폴리펩티드의 상이한 중쇄 폴리펩티드에 각각 연결된다. 특정한 실시양태에서, 분자는 (i) 서열식별번호: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 18, 19, 21, 23, 25, 또는 27 중 어느 하나 내의 가변 영역 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 가변 영역 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함하는 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드; 및/또는 (ii) 서열식별번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 33, 또는 51 중 어느 하나 내의 가변 영역 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 가변 영역 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함하는 2개의 항체 중쇄 폴리펩티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 2개의 융합 폴리펩티드는 각각 서열식별번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 33, 또는 51 중 어느 하나와 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 7과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함하고, 2개의 융합 폴리펩티드는 각각 서열식별번호: 8과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 25와 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함하고, 2개의 융합 폴리펩티드는 각각 서열식별번호: 26과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함한다.

[0019] 또 다른 관련 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 1-28, 33, 또는 51 중 어느 하나와 적어도 95% 동일

성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 제공하며, 임의로 여기서 폴리펩티드는 하기 CDR의 세트 중 하나를 포함한다: (a) SYAMS (서열식별번호: 34), AISGSGGSTYYEDSVKG (서열식별번호: 35), 및 DFSSRRWYLEY (서열식별번호: 36); (b) QGESLRSYYAS (서열식별번호: 37), YGKSNRPS (서열식별번호: 38), 및 CTSLERIGYLSYV (서열식별번호: 39); (c) QGESLRSYYAS (서열식별번호: 37), YGKANRPS (서열식별번호: 40), 및 CTSLERIGYLSYV (서열식별번호: 39); (d) RISENIYSNLA (서열식별번호: 41), AAINLAE (서열식별번호: 42), 및 QHFWGTPFT (서열식별번호: 43); 또는 (e) AYGIN (서열식별번호: 44), EIFPRSDSTFYNEKFKG (서열식별번호: 45), 및 KGREYGTSHYFDY (서열식별번호: 46). 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 링커 모이어티, 임의로 펩티딜 링커 서열을 통해 항체 중쇄 폴리펩티드의 N-말단과 융합된 변형된 R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하는 융합 단백질이며, 여기서 R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체는 인간 R-스폰딘 2의 아미노산 105 및 109에 상응하는 위치에서의 2개의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 2개의 아미노산 치환은 (a) F105R, F105A 또는 F105E; 및 (b) F109A 또는 F109E이다. 특정 실시양태에서, 2개의 아미노산 치환은 (a) F105R 및 F109A; (b) F105A 및 F109A; (c) F105E 및 F109A; 또는 (d) F105E 및 F109E이다. 특정 실시양태에서, 항체 중쇄 폴리펩티드는 하기로부터 선택된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 서열의 조합을 포함한다: (a) 각각 SYAMS (서열식별번호: 34), AISGSGGSTYYEDSVKG (서열식별번호: 35), DFSSRRWYLEY (서열식별번호: 36); 또는 (b) 각각 RISENIYSNLA (서열식별번호: 41), AAINLAE (서열식별번호: 42), QHFWGTPFT (서열식별번호: 43). 특정한 실시양태에서, 폴리펩티드는 변형된 항체 경쇄 폴리펩티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 변형된 항체 경쇄 폴리펩티드는 하기로부터 선택된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 서열의 조합을 포함한다: (a) 각각 QGESLRSYYAS (서열식별번호: 37), YGKSNRPS (서열식별번호: 38), 및 CTSLERIGYLSYV (서열식별번호: 39); (b) 각각 QGESLRSYYAS (서열식별번호: 37), YGKANRPS (서열식별번호: 40), 및 CTSLERIGYLSYV (서열식별번호: 39); 또는 (c) AYGIN (서열식별번호: 44), EIFPRSDSTFYNEKFKG (서열식별번호: 45), 및 KGREYGTSHYFDY (서열식별번호: 46).

- [0020] 또 다른 관련 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 폴리펩티드 중 임의의 것, 예컨대 본원에 개시된 항체 경쇄 폴리펩티드 또는 융합 폴리펩티드, 또는 서열식별번호: 1-33 또는 51 중 어느 하나와 적어도 95% 동일성을 갖는 폴리펩티드, 또는 그의 가변 영역을 코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 특정한 실시양태에서, 핵산 서열은 DNA 또는 mRNA이다.
- [0021] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 특정 실시양태에서, 벡터는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 서열을 포함하는 발현 벡터이다. 특정 실시양태에서, 벡터는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터 서열을 포함하는 바이러스이다.
- [0022] 관련 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 추가의 관련 실시양태에서, 본 개시내용은 폴리펩티드가 발현 벡터에 의해 발현되는 조건 하에 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 본원에 개시된 항체 경쇄 폴리펩티드 또는 융합 폴리펩티드를 생산하는 공정을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 생산된 융합 폴리펩티드를 단리하는 단계를 포함한다.
- [0023] 관련 실시양태에서, 본 개시내용은 a) 본원에 개시된 분자, 본원에 개시된 핵산 서열, 본원에 개시된 벡터, 또는 본원에 개시된 숙주 세포; 및 b) 제약상 허용되는 희석제, 아주반트 또는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0024] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자, 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 제약상 허용되는 희석제, 아주반트 또는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0025] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 및 제약상 허용되는 희석제, 아주반트 또는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 특정한 실시양태에서, 핵산 서열은 DNA 또는 mRNA, 임의로 변형된 mRNA를 포함한다.
- [0026] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터, 및 제약상 허용되는 희석제, 아주반트 또는 담체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 특정한 실시양태에서, 벡터는 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하며, 이는 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 발현을 구동시킨다. 특정 실시양태에서, 벡터는 발현 벡터 또는 바이러스 벡터이다.
- [0027] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 간 조직을 a) 본원에 개시된 Wnt 신호 증강 분자; b) 본원에 개시된 핵산; c) 본원에 개시된 벡터; d) 본원에 개시된 숙주 세포; 또는 e) 본원에 개시된 제약 조성물과 접촉시키는

것을 포함하는, 간 조직에서 Wnt ("윙리스-관련 통합 부위" 또는 "윙리스 및 Int-1" 또는 "윙리스-Int") 신호전달을 증가시키는 방법을 제공하며, 여기서 분자는 간 조직과 결합하고 간 조직에서 징크 및 Ring 핑거 3 (ZNR3) 및 Ring 핑거 단백질 43 (RNF43)으로부터 선택된 하나 이상의 막횡단 E3 유비퀴틴 리가제의 세포내이입을 격리 또는 증가시킨다.

[0028] 관련 실시양태에서, 본 개시내용은 간 질환 또는 간 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 a) 본원에 개시된 분자; b) 본원에 개시된 핵산; c) 본원에 개시된 벡터; d) 본원에 개시된 숙주 세포; 또는 e) 개시된 제약 조성물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 간 질환 또는 간 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 여기서 간 질환 또는 간 장애는 감소된 Wnt ("윙리스-관련 통합 부위" 또는 "윙리스 및 Int-1" 또는 "윙리스-Int") 신호전달과 연관되거나 또는 증가된 Wnt 신호전달로부터 이익을 얻을 것이다. 특정한 실시양태에서, 간 질환 또는 간 장애는 모든 원인의 급성 간부전, 약물-유발 급성 간부전, 급만성 간부전 (ACLF), 간의 급성 대상부전, 간경변증으로 인한 복수, 간경변증이 있는 환자의 저나트륨혈증, 간신장 증후군-급성 신장 손상 (HRS-AKI), 간성 뇌병증, 알콜성 간 질환, 모든 원인의 만성 간부전, 비대상성 간부전, 말기 대상성 간부전, 간경변증, 모든 원인의 간 섬유증, 문맥 고혈압, 모든 원인의 만성 간 기능부전, 말기 간 질환 (ESLD), 비알콜성 지방간염 (NASH), 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD) (지방간), 알콜성 간염, 급성 알콜성 간염 (AAH) 또는 중증 알콜성 간염, 만성 알콜성 간염, 알콜성 간 질환 (ALD) (알콜-관련 간 질환 (ARLD)으로 불리기도 함), C형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HCV), B형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HBV), 기타 바이러스성 간염 (예를 들어, A형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HAV) 및 D형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HDV)), 원발성 담즙성 간경변증, 자가면역성 간염, 간 수술, 간 손상, 정맥-폐쇄성 질환 (VOD), 굴혈관 폐쇄 증후군 (SOS), 원발성 담즙성 담관염 (PBC), 원발성 경화성 담관염 (PSC), 간 이식, 간 수술 및 이식에서의 "과소 이식편" 증후군, 선천성 간 질환 및 장애, APAP (아세트아미노펜) 과다복용으로 인한 간부전, 아세트아미노펜-유발 간 손상, 및 유전 질환, 퇴행, 노화, 약물 또는 손상으로 인한 임의의 다른 간 질환 또는 장애로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0029] 특정 실시양태에서, 간 질환 또는 간 장애는 급성 알콜성 간염, 급성 간부전 (아세트아미노펜 (APAP) 과다복용으로 인한 급성 간부전 (ALF)을 포함하나 이에 제한되지는 않음), 급만성 간부전 (ACLF), 간의 급성 대상부전, 간경변증으로 인한 복수, 간경변증이 있는 환자의 저나트륨혈증, 간신장 증후군-급성 신장 손상 (HRS-AKI), 간성 뇌병증 또는 간경변증으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 간 질환은 알콜성 간염, 예를 들어, 급성 알콜성 간염 또는 중증 알콜성 간염이다. 특정한 실시양태에서, 상기 분자, 핵산, 벡터, 숙주 세포, 또는 제약 조성물은 비경구적으로, 경구적으로, 근육내로, 또는 국부적으로 간에 투여된다. 특정한 실시양태에서, 대상체는 포유동물, 임의로 인간이다.

[0030] 관련 실시양태에서, 본 개시내용은 간 세포, 간 조직 또는 간 오가노이드를 a) 본원에 개시된 분자; b) 본원에 개시된 핵산; c) 본원에 개시된 벡터; d) 본원에 개시된 숙주 세포; 또는 e) 본원에 개시된 제약 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, 간 세포, 간 조직 또는 간 오가노이드를 생성, 배양 또는 유지하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 공여자로부터 획득된 간 조직을, 임의로 간 조직을 상기 분자를 포함하는 조성물로 생체외에서 관류함으로써 접촉시키는 것을 포함하는, 생체외에서 간 조직의 생육력을 유지하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 공여자 간 조직을 상기 분자를 포함하는 조성물과 생체내에서 접촉시키는 것을 포함하는, 간 조직의 생육력을 유지하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 간 오가노이드 배양물을, 임의로 간 오가노이드 배양물을 상기 분자를 포함하는 배지에서 배양함으로써 접촉시키는 것을 포함하는, 간 오가노이드 배양물을 생성 또는 유지하기 위한 것이다.

[0031] 추가 실시양태에서, 본 발명은 표적 조직을 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자와 접촉시키는 것을 포함하는, 상기 표적 조직에서 Wnt 신호전달을 증가시키는 방법을 제공하며, 여기서 제2 도메인은 표적 조직 상의 세포-특이적 표면 분자와 특이적으로 결합하고, 또한 여기서 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 표적 조직과 결합하고 표적 조직에서 ZNR3 및 RNF43으로부터 선택된 하나 이상의 막횡단 E3 유비퀴틴 리가제의 세포내이입을 격리 또는 증가시킨다.

[0032] 특정한 실시양태에서, 표적 조직 또는 세포는 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터, 예를 들어 발현 벡터 또는 바이러스 벡터와 접촉된다.

[0033] 또 다른 관련 실시양태에서, 본 발명은 특정 질환 또는 병태의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는 제약 조성물의 유효량을, 단독으로 또는 Wnt, Norrin 또는 Wnt 활성화/모방 분자와 조합하여 제공하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 상기 질환 또는

병태를 치료 또는 예방하는 방법을 포함하며, 여기서 질환 또는 상태는 감소된 Wnt 신호전달과 연관되거나 또는 증가된 Wnt 신호전달로부터 이익을 얻을 것이다. 특정한 실시양태에서, 상기 방법은 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 핵산 서열 (예를 들어, DNA 또는 mRNA)을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 또는 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 (예를 들어, 발현 벡터 또는 바이러스 벡터)를 포함하는 제약 조성물을 사용하여 수행된다.

[0034] 본원에 기재된 치료 방법 중 임의의 것의 특정한 실시양태에서, 질환 또는 장애는 모든 원인의 급성 간부전, 약물-유발 급성 간부전, 급만성 간부전 (ACLF), 간의 급성 대상부전, 간경변증으로 인한 복수, 간경변증이 있는 환자의 저나트륨혈증, 간신장 증후군-급성 신장 손상 (HRS-AKI), 간성 뇌병증, 알콜성 간 질환, 모든 원인의 만성 간부전, 비대상성 간부전, 말기 대상성 간부전, 간경변증, 모든 원인의 간 섬유증, 문맥 고혈압, 모든 원인의 만성 간 기능부전, 말기 간 질환 (ESLD), 비알콜성 지방간염 (NASH), 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD) (지방간), 알콜성 간염, 급성 알콜성 간염 (AAH), 만성 알콜성 간염, 알콜성 간 질환 (ALD) (알콜-관련 간 질환 (ARLD)으로 불리기도 함), C형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HCV), B형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HBV), 기타 바이러스성 간염 (예를 들어, A형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HAV) 및 D형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HDV)), 원발성 담즙성 간경변증, 자가면역성 간염, 간 수술, 간 손상, 정맥-폐쇄성 질환 (VOD), 굴혈관 폐쇄 증후군 (SOS), 원발성 담즙성 담관염 (PBC), 원발성 경화성 담관염 (PSC), 간 이식, 간 수술 및 이식에서의 "과소 이식편" 증후군, 선천성 간 질환 및 장애, APAP (아세트아미노펜) 과다복용으로 인한 간부전, 및 유전 질환, 퇴행, 노화, 약물 또는 손상으로 인한 임의의 다른 간 질환 또는 장애로 이루어진 군으로부터 선택된 조직의 간 질환 또는 장애이다. 특정 실시양태에서, 간 질환은 알콜성 간염, 예를 들어, 급성 알콜성 간염 또는 중증 알콜성 간염이다. 본원에 기재된 치료 또는 예방 방법 중 임의의 것의 특정한 실시양태에서, 제약 조성물은 전신적으로, 비경구적으로, 경구적으로, 근육내로, 국부적으로 또는 국소적으로 제공된다. 특정한 실시양태에서, 대상체는 포유동물, 임의로 인간이다.

[0035] 특정한 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 본원에 개시된 아미노산 서열, 예를 들어 서열식별번호: 1-28, 33, 또는 51과 적어도 90% 동일성을 갖는 아미노산 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체, 예를 들어 상기 서열의 가변 도메인을 포함하는, 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역, 또는 중쇄 또는 경쇄를 포함한다

도면의 간단한 설명

[0036] 본 개시내용의 특징은 첨부된 청구범위에 구체적으로 제시되어 있다. 본 발명의 특징 및 장점에 대한 더 나은 이해는 본 발명의 원리가 활용되는 예시적인 실시양태를 제시하는 하기 상세한 설명, 및 첨부된 도면을 참조함으로써 취득될 것이다.

도 1은 초기 αASGR1-RSPO2 Wnt 신호전달 인핸서 분자에 대한 경쇄 가변 도메인 서열 및 융합 폴리펩티드 중쇄 가변 도메인-RSPO2 서열을 제시한다. CDR에는 밑줄 표시되어 있고 탈아미드화 또는 이성질체화 위험은 볼드체로 표시되어 있다. 위험을 제거하기 위해 만들어진 다양한 아미노산 대체가 각각의 위치에 대해 제시된다.

도 2는 CDR H2 내의 D62 위치에서의 다양한 아미노산 치환을 갖는 초기 αASGR1-RSPO2 Wnt 신호전달 인핸서 분자의 변이체의 SEC 프로파일 그래프를 제공한다.

도 3은 CDR L1 내의 D25 위치에서의 다양한 아미노산 치환을 갖는 초기 αASGR1-RSPO2 Wnt 신호전달 인핸서 분자의 변이체의 SEC 프로파일 그래프를 제공한다.

도 4는 CDR L2 내의 N51 위치에서의 다양한 아미노산 치환을 갖는 초기 αASGR1-RSPO2 Wnt 신호전달 인핸서 분자의 변이체의 SEC 프로파일 그래프를 제공한다.

도 5는 CDR L3 내의 N88 위치에서의 다양한 아미노산 치환을 갖는 초기 αASGR1-RSPO2 Wnt 신호전달 인핸서 분자의 변이체의 SEC 프로파일 그래프를 제공한다.

도 6은 비환원 (좌측 패널) 또는 환원 (우측 패널) 조건 하에서 초기 αASGR1-RSPO2 Wnt 신호전달 인핸서 분자와 비교 시, 표시된 점 돌연변이를 포함하는 Wnt 신호전달 인핸서 분자의 발현 및 폴딩의 SDS-PAGE 겔 분석을 제시한다.

도 7은 초기 αASGR1-RSPO2 Wnt 신호전달 인핸서 분자와 비교 시, 표시된 점 돌연변이의 조합을 포함하는 Wnt 신호전달 인핸서 분자의 발현 및 폴딩의 SDS-PAGE 겔 분석을 제시한다 (좌측 패널: 레인 1 = 마커, 레인 2-8 = 각각 EESY, EEAL, EEAЕ, EEAH, EEAT, EEAY, EEAR, 비환원, 및 레인 9-15 = 각각 EESY, EEAL, EEAЕ, EEAH,

EEAT, EEAY, EEAR, 환원; 우측 패널: 라인 1 = 마커, 라인 2-9 = EESN, EEAN, EESL, EESE, EESH, EEST, EESR, EESK).

도 8은 초기 α ASGR1-RSPO2 Wnt 신호전달 인핸서 분자 (야생형)와 비교 시, 표시된 점 돌연변이의 조합을 포함하는 Wnt 신호전달 인핸서 분자에 대한 표시된 검정의 결과를 요약한 표이다.

도 9는 초기 α ASGR1-RSPO2 Wnt 신호전달 인핸서 분자 (야생형)와 비교 시, 표시된 점 돌연변이의 조합을 포함하는 Wnt 신호전달 인핸서 분자에 대한 ASGR1 결합 검정 결과를 요약한 표이다.

도 10은 Huh-7 (좌측 패널) 및 Hek-203 (우측 패널) 세포에서 표시된 점 돌연변이의 조합을 포함하는 Wnt 신호전달 인핸서 분자의 STF 검정 결과를 제시하는 그래프를 제공한다.

도 11은 비히클 또는 표시된 Wnt 신호전달 인핸서 분자로 처리된 동물에서 Axin2/ActB 발현을 나타내는 그래프를 제공한다. 데이터는 리마달로 매일 처리된 손상된 동물에 대한 값이 있는 경우 (좌측 패널) 또는 없는 경우 (우측 패널)로 표시된다.

도 12는 항-bgal, 항-GFP-mutRSPO, EEST-EE Wnt 신호전달 인핸서 분자 (1R34-EEST-EE) 또는 Rspo2로 처리된 (각각의 조직에 대해 좌측에서 우측으로) 동물로부터 단리된 다양한 조직에서 Axin2의 증가된 발현을 제시하는 그래프이다.

도 13은 표시된 시간 동안 α GFP-IgG, α ASGR1-RSPO2-EEST-EE 또는 α ASGR1-RSPO2-EEST-RA Wnt 신호전달 인핸서 분자로 처리된 (좌측에서 우측으로) 동물에서 표시된 Wnt 표적 유전자의 간에서의 증가된 발현을 나타내는 그래프를 제공한다.

도 14a는 표시된 시점에서 α GFP-IgG, α ASGR1-RSPO2-EEST-EE 또는 α ASGR1-RSPO2-EEST-RA로 처리된 (좌측에서 우측으로) 동물의 간에서의 증식 마커 Ki67의 증가된 발현을 제시한다.

도 14b는 표시된 투여량의 α ASGR1-RSPO2-EEST-EE 또는 대조군으로 처리된 동물의 간에서의 증식 마커 Ki67의 증가된 발현을 제시한다.

도 15는 3, 10, 30, 100 mg/kg으로 IV 투여 또는 10 또는 30 mg/kg으로 i.p. 투여한 후 마우스에서 EEST-EE Wnt 신호 증강 분자의 약동학적 프로파일을 제공한다.

도 16은 간 섬유증의 만성 티오아세트아미드-유발 마우스 모델 및 시험된 다양한 Wnt 신호 증강 분자의 다이어그램이다.

도 17a-17c는 표시된 양의 Wnt 신호 증강 분자, EEST-EE 또는 EEST-RA의 투여 후 INR (도 17a), Axin2 (도 17b) 및 CYP2e1 mRNA (도 17c)를 제시한다.

도 18은 TAA의 존재 또는 부재 하에 대조군 (항-bgal), EEST-EE 또는 Rspo2로 처리된 동물의 간에서의 Ki67의 발현을 제시한다.

도 19는 표시된 양의 Wnt 신호 증강 분자, EEST-EE 또는 EEST-RA의 투여 후 INR (좌측), Axin2 (중간) 및 CYP2e1 mRNA (우측)를 제시한다.

도 20은 CC₁의 존재 또는 부재 하에 대조군 (항-bgal), EEAT-EE (α ASGR1-RSPO2-EEAT-EE 또는 1R34-EEAT/EE) 또는 Rspo2로 처리된 동물의 간에서의 Ki67의 발현을 제시한다.

도 21은 대조군 또는 α ASGR1-RSPO2-EEST-EE로 처리된 동물의 간에서의 증식 마커 Ki67의 발현을 제시하는 그래프이다.

도 22는 대조군 또는 α ASGR1-RSPO2-EEST-EE로 처리된 동물의 소장에서의 증식 마커 Ki67의 발현을 제시하는 그래프이다.

도 23은 CC₁로 처리한 후 대조군 (항-GFP), Rspo2, 또는 α ASGR1-RSPO2-EEAT-EE로 처리된 동물에서의 섬유증 영역을 제시하는 그래프이다.

도 24는 비히클, EEST-RA, EEST-EE, 8M24-EASE-RA 또는 8M24-EASE-EE로 처리한 후 ALP의 발현을 제시하는 그래프이다.

도 25는 8M24 항체 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인, 및 그의 다양한 인간화 버전의 서열을 제공한다.

도 26a는 8M24 항체의 VH 및 VL 도메인의 서열을 제공한다. CDR에는 밑줄 표시되어 있으며, 변형된 아미노산은 볼드체로 표시된다.

도 26b는 8M24 CDR 내의 각각의 표시된 위치에서 이루어진 다양한 아미노산 치환을 제시한다.

도 27은 N57에서 표시된 점 돌연변이를 포함하는 8M24 Wnt 신호전달 인헨서 분자의 STF 검정 결과를 제시하는 그래프이다.

도 28은 표시된 점 돌연변이의 조합을 포함하는 다양한 8M24 Wnt 신호전달 인헨서 분자의 특징을 요약한 표이다.

도 29는 다양한 투여량에서 초기 8M24-RA Wnt 신호 증강 분자 또는 EEST-EE IgG2 포맷 Wnt 신호 증강 분자 (1R34-EEST/EE IgG2)로 처리된 동물에서의 *Axin2*, *Ccnd* 및 *Ki67* 발현을 제시하는 그래프를 제공한다.

도 30은 다양한 투여량에서 8M24-EASE-RA Wnt 신호 증강 분자 또는 EEST-EE IgG2 포맷 Wnt 신호 증강 분자 (1R34-EEST/EE IgG2)로 처리된 동물에서의 *Axin2*, *Ccnd* 및 *Ki67* 발현을 제시하는 그래프를 제공한다.

도 31은 마우스에서 EEST-RA (1R34-EEST/RA), EEST-EE (1R34-EEST/EE), 8M24-EASE-RA, 또는 8M24-EASE-EE Wnt 신호 증강 분자의 약동학적 프로파일을 제공한다.

도 32는 종료 시 간 대 체중 비율의 백분율을 제시한다. 통계 분석: 일원 ANOVA 분석 (그래프패드 프리즘), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, 오차 막대: SEM을 수반한 평균.

도 33a-b는 시험 항목 투여 시작 후 제7일 및 제14일에서의 혈청 ALP (도 33a) 및 알부민 (도 33b)을 제시한다.

도 34는 qPCR에 의해 측정된 바와 같은 *Axin2*, *Ccnd1* 및 *Mki67* 유전자에 대한 간 RNA의 발현 분석을 제시한다.

도 35는 CC14 처리 후 SZN-043.v2, RSP02, 항-GFP로 처리된 마우스로부터의 간 절편, 또는 올리브 오일만 주입된 마우스로부터의 대조군 절편의 면역형광 염색을 제시한다. 증식 마커, 항-Ki67 핵 항원 (녹색), 간세포-특이적 마커, 항-HNF4 α (적색) 및 DAPI (청색)로의 염색.

도 36a-b는 피코르-시리우스 적색 염색 (도 36a)에 이어 이미지 J를 사용한 정량화 (도 36b)에 의해 측정된 섬유증 면적 백분율을 제시한다.

도 37a는 HuASGR1-CBD:8M24 복합체의 전체 구조를 제시한다. HuASGR1-CBD의 분자 표면은 밝은 회색 투명 표면으로 제시된다. 8M24의 중쇄와 경쇄는 각각 더 어둡고 더 밝은 흑색 음영으로 제시된다. 3개의 구조적 칼슘 이온이 어두운 구체로 제시된다.

도 37b는 중쇄의 CDR 루프 H1, H2, H3, 경쇄의 L1, L2 및 L3이 표시된 위치를 갖는 HuASGR1-CBD:8M24 인터페이스의 확대도를 제시한다.

도 38은 4개의 모든 인간 R-스폰딘 단백질 [Rspo1 (서열식별번호: 47); Rspo2 (서열식별번호: 48); Rspo3 (서열식별번호: 49); 및 Rspo4 (서열식별번호: 50)]의 정렬을 제시하며, 푸린 도메인 1 (Fu1) 및 2 (Fu2)가 각각 밝은 음영 및 어두운 음영으로 제시된다. Fu1 도메인은 일반적으로 서열식별번호: 47의 아미노산 잔기 약 38-94에 상응하고; 서열식별번호: 48의 아미노산 잔기 약 37-93에 상응하며; 서열식별번호: 49의 아미노산 잔기 약 39-95에 상응하고; 서열식별번호: 50의 아미노산 잔기 약 32-88에 상응한다. Fu2 도메인은 일반적으로 서열식별번호: 47의 아미노산 잔기 약 97-144에 상응하고; 서열식별번호: 48의 아미노산 잔기 약 96-143에 상응하며; 서열식별번호: 49의 아미노산 잔기 약 98-144에 상응하고; 서열식별번호: 50의 아미노산 잔기 약 91-137에 상응한다.

도 39a-c는 초기 α ASGR1-RSP02 Wnt 신호전달 인헨서 분자 (NG 또는 "야생형")와 비교 시 표시된 점 돌연변이의 조합을 포함하는 다양한 Wnt 신호 증강 분자의 결합을 제시한다. 도 39a는 도 39b 및 39c의 데이터로부터의 동역학적 맞춤 파라미터를 제시하는 표이다. ForteBIO 데이터 분석 소프트웨어의 2가 분석물 모델을 사용하여 데이터를 맞추었다. 도 39b-39c는 옥텟(Octet) Red96e를 사용하여 스트랩타비딘 센서에서 포획된 비오틴화된 ASGR1을 사용하여 결합에 대해 시험된 다양한 Wnt 신호 증강 분자의 연속 희석물로부터의 데이터를 제공한다.

도 40a-40d는 Huh-7 (도 40a 및 40c) 및 Hek-293 (도 40b 및 40d) 세포에서 돌연변이의 다양한 조합의 STF 활성을 제시한다.

도 41은 표시된 아미노산 치환의 조합을 갖는 구축물의 안정성을 제시한다.

도 42는 표시된 아미노산 치환의 조합을 갖는 구축물의 STF 활성을 제시한다.

도 43은 표시된 시간에 αGFP-IgG, Nac 또는 αASGR1-RSPO2-EEAT-EE Wnt 신호전달 인핸서 분자로 처리된 (좌측에서 우측으로) 동물의 APAP-손상된 간 또는 손상되지 않은 동물의 간에서의 표시된 Wnt 표적 유전자 및 시토크롬 P450 (CYP) 대사 효소의 발현 수준을 제시하는 그래프를 제공한다.

도 44는 아세트아미노펜-유발 간 손상 후 표시된 작용제로 처리된 간의 간세포에서의 Ki67 및 HNF4a 발현을 제시하는 현미경 사진을 제공한다.

도 45는 아세트아미노펜-유발 간 손상 후 표시된 작용제로 처리된 간의 간세포에서의 Ki67 및 CYP2F2 발현을 제시하는 현미경 사진을 제공한다.

도 46은 표시된 바와 같이 처리된 간의 조직학을 제시하는 현미경 사진을 제공한다. 항-GFP 또는 Nac 처리 후 괴사 영역이 표시된다.

도 47은 표시된 시간에 αGFP-IgG, Nac 또는 αASGR1-RSPO2-EEAT-EE Wnt 신호전달 인핸서 분자로 처리된 (좌측에서 우측으로) APAP-손상된 간 또는 손상되지 않은 동물의 간에서의 ALT, AAST, ALP 및 AMMN 수준을 제시하는 그래프를 제공한다.

도 48은 만성 폭음 에탄올-유발 간 손상 동물 모델에서 간 기능 및 조직 복구에 대한 1R34-EEEST-EE의 효과 연구의 다이어그램이다.

도 49는 처리 후 제0일, 제3일 또는 제7일에 표시된 Wnt 표적 유전자의 발현을 제시하는 그래프를 제공한다. 제0일에, 좌측에서 우측으로의 막대는 짝 급식 및 EtOH에 상응하고, 제3일 및 제3일과 제7일에 좌측에서 우측으로의 막대는 항-GFP 또는 1R43-EEEST-EE를 사용한 처리에 상응한다.

도 50은 처리 후 제0일, 제3일 또는 제7일에 표시된 간 증식 마커의 발현을 제시하는 그래프를 제공한다. 제0일에, 좌측에서 우측으로의 막대는 짝 급식 및 EtOH에 상응하고, 제3일 및 제3일과 제7일에 좌측에서 우측으로의 막대는 항-GFP 또는 1R43-EEEST-EE를 사용한 처리에 상응한다.

도 51은 Ki67 또는 HNF4A의 면역형광 염색을 제시하는 현미경 사진을 제공한다.

도 52는 처리 후 제0일, 제3일 또는 제7일에 표시된 분자의 발현을 제시하는 그래프를 제공한다. 제0일에, 좌측에서 우측으로의 막대는 짝 급식 및 EtOH에 상응하고, 제3일 및 제3일과 제7일에 좌측에서 우측으로의 막대는 항-GFP 또는 1R43-EEEST-EE를 사용한 처리에 상응한다.

도 53은 처리 후 제0일, 제3일 또는 제7일에 Lect2 및 안지오팀닌의 발현을 제시하는 그래프를 제공한다. 제0일에, 좌측에서 우측으로의 막대는 짝 급식 및 EtOH에 상응하고, 제3일 및 제3일과 제7일에 좌측에서 우측으로의 막대는 항-GFP 또는 1R43-EEEST-EE를 사용한 처리에 상응한다.

도 54는 처리 후 제0일, 제3일 또는 제7일에 염증성 마커, 인터류킨 IL1b 및 IL6의 발현을 제시하는 그래프를 제공한다. 제0일에, 좌측에서 우측으로의 막대는 짝 급식 및 EtOH에 상응하고, 제3일 및 제3일과 제7일에 좌측에서 우측으로의 막대는 항-GFP 또는 1R43-EEEST-EE를 사용한 처리에 상응한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 본 개시내용은 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 제공하며, 특정 실시양태에서 이러한 분자는 1) 간-특이적 세포 표면 수용체와 선택적으로 결합하고/거나; 2) 표적화된 간 조직 또는 세포에서 ZNRF3/RNF43의 내재화 또는 격리를 매개하고/거나; 3) 간-특이적 방식으로 Wnt 신호전달을 증강시킨다. 특정 실시양태에서, 분자는 융합 단백질이다. 특정 실시양태에서, 분자는 부가의 부착된 결합 도메인을 갖는 항체이다. 또한 간 조직 또는 간 세포에서 Wnt 신호전달을 증강, 즉 증가시키기 위해, 예를 들어 간 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위해 본원에 개시된 분자 및 조성물 중 임의의 것을 사용하기 위한 제약 조성물 및 방법이 제공된다. 본 발명의 이들 및 다른 목적, 이점 및 특징은 하기에 보다 충분히 기재된 바와 같이 조성물 및 방법의 세부 사항을 관독할 때 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백해질 것이다.

[0038] 정의

[0039] 본원에 사용된 바와 같은 "벡터"는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 또는 폴리뉴클레오티드와 연합하고 세포로의 폴리뉴클레오티드의 전달을 매개하는데 사용될 수 있는 거대분자 또는 거대분자의 연합을 지칭한다. 예시적인

백터는, 예를 들어, 플라스미드, 바이러스 백터, 리포솜 및 기타 유전자 전달 비히클을 포함한다.

[0040] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드, 또는 그의 유사체를 포함한, 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 에컨대 메틸화된 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있고, 비-뉴클레오티드 성분에 의해 차단될 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 중합체의 어셈블리 전 또는 후에 부여될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 폴리뉴클레오티드는 이중 가닥 및 단일 가닥 분자를 상호교환가능하게 지칭한다. 달리 명시되거나 요구되지 않는 한, 폴리뉴클레오티드인 본원에 기재된 본 발명의 임의의 실시양태는 이중 가닥 형태 및 이중 가닥 형태를 구성하는 것으로 공지되거나 예측된 2개의 상보적인 단일 가닥 형태 각각을 둘 다 포괄한다.

[0041] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 (관심 서열)는 또 다른 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 (참조 서열)과 특정 퍼센트의 "서열 동일성"을 가지며, 이는 정렬될 때, 염기 또는 아미노산의 백분율이 두 서열을 비교할 때 동일하다는 것을 의미한다. 관련 기술분야에서 이해되는 바와 같이, 서열 동일성은 서열이 비교 창 (예를 들어, 서열 각각의 명시된 영역)에 걸쳐 최대 상응도를 위해 정렬될 때 수득된 동일성 백분율을 지칭하며, 이는 유사한 서열에 적용될 때 대부분의 경우 동일한 정렬을 생성할 것으로 예상되는 디폴트 파라미터를 사용하여 본원에 기재된 알고리즘 중 임의의 것에 의해 계산될 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 동일성은 참조 서열의 전체 길이로 걸쳐 계산된다. 따라서, 관심 서열은 이러한 관심 서열이 참조 서열에 정렬될 때, 관심 서열 내의 잔기의 적어도 x% (반올림됨)가 참조 서열 내의 상응하는 잔기에 정확히 매치되도록 정렬되는 경우, 참조 서열과 "적어도 x% 동일성을 공유"한다. 비교 창에 걸친 상응도를 최대화하기 위해 관심 서열 및/또는 참조 서열에 갭이 도입될 수 있다.

[0042] 서열 유사성 (즉, 동일성)은 수많은 상이한 방식으로 결정될 수 있다. 서열 동일성을 결정하기 위해, 서열은 국립 생명공학 정보 센터 (NCBI)를 통해, 예를 들어 ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/의 월드와이드 웹을 통해 공개적으로 이용가능한 BLAST (예를 들어, 문헌 [Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 및 Altschul et al. (1997) Nucleic acids Res. 25: 3389-3402] 각각에 기재되어 있는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘), 에컨대 BLASTP 또는 BLASTN를 포함한 방법 및 컴퓨터 프로그램을 사용하여 정렬될 수 있다. 예를 들어, 디폴트 파라미터를 사용하여 NCBI ftp 사이트로부터 검색할 수 있는, 2개의 서열을 블래스팅하기 위한 독립 실행형 실행 파일 BLAST 엔진 프로그램 (bl2seq)을 사용함으로써 서열 동일성을 결정할 수 있다 (Tatusova and Madden, FEMS Microbiol Lett. 1999, 174, 247-250). 또 다른 정렬 알고리즘은 옥스포드 몰레큘라 그룹, 인크.(Oxford Molecular Group, Inc.)의 전액 출자 자회사인 제네틱스 컴퓨팅 그룹 (GCG) (Genetics Computing Group; 미국 위스콘신주 매디슨) 패키지로 이용가능한 FASTA이다. 다른 정렬 기술은 문헌 [Methods in Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, Calif., USA]에 기재되어 있다. 특히 흥미로운 것은 서열 내에 갭을 허용하는 정렬 프로그램이다. 스미스-워터맨(Smith-Waterman)은 서열 정렬에서 갭을 허용하는 알고리즘 유형 중 하나이다. 문헌 [Meth. Mol. Biol. 70: 173-187 (1997)]을 참조한다. 또한, 니드만 앤 운슈(Needleman and Wunsch) 정렬 방법을 사용하는 GAP 프로그램을 활용하여 서열을 정렬할 수 있다. 문헌 [J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)]을 참조한다. 흥미로운 것은 서열 동일성을 결정하기 위해 스미스 앤 워터맨 (문헌 [Advances in Applied Mathematics 2: 482-489 (1981)]의 로컬 상동성 알고리즘을 사용하는 BestFit 프로그램이다. 갭 생성 페널티는 일반적으로 1 내지 5, 통상적으로 2 내지 4 범위이고 많은 실시양태에서 3일 것이다. 갭 확장 페널티는 일반적으로 약 0.01 내지 0.20의 범위이며 많은 경우에 0.10일 것이다. 프로그램은 비교를 위해 입력된 서열에 의해 결정된 디폴트 파라미터를 갖는다. 서열 동일성은 프로그램에 의해 결정된 디폴트 파라미터를 사용하여 결정될 수 있다. 이러한 프로그램은 또한 제네틱스 컴퓨팅 그룹 (GCG) 패키지 (미국 위스콘신주 매디슨)로부터 이용가능하다. 흥미로운 또 다른 프로그램은 FastDB 알고리즘이다. FastDB는 문헌 [Current Methods in Sequence Comparison and Analysis, Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp. 127-149, 1988, Alan R. Liss, Inc.]에 기재되어 있다. 서열 동일성 퍼센트는 하기 파라미터를 기반으로 FastDB에 의해 계산된다: 미스매치 페널티: 1.00; 갭 페널티: 1.00; 갭 크기 페널티: 0.33; 및 연결 페널티: 30.0. 또 다른 관심 프로그램은 uniprot.org로부터의 CLUSTAL이며 <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>에서 이용가능하다. 달리 표시되지 않는 한, 서열 동일성은 디폴트 파라미터와 함께 BLAST 알고리즘 (예를 들어, bl2seq)을 사용하여 결정된다.

[0043] 폴리뉴클레오티드에 적용된 바와 같은 "제조함"은 폴리뉴클레오티드가 클로닝, 제한 또는 라이게이션 단계, 및 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오티드와 뚜렷이 구별되는 구축물을 생성하는 기타 절차의 다양한 조합의 산물이 라는 것을 의미한다.

- [0044] "제어 요소" 또는 "제어 서열"은 폴리뉴클레오티드의 복제, 증폭, 전사, 스플라이싱, 번역 또는 분해를 포함한 폴리뉴클레오티드의 기능적 조절에 기여하는 분자의 상호작용에 관여하는 뉴클레오티드 서열이다. 조절은 프로세스의 빈도, 속도 또는 특이성에 영향을 미칠 수 있으며 본질적으로 증강 또는 억제될 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 제어 요소는, 예를 들어, 전사 조절 서열, 예컨대 프로모터 및 인핸서를 포함한다. 프로모터는 특정 조건 하에서 RNA 폴리머라제와 결합할 수 있고 통상적으로 프로모터로부터의 하류 (3' 방향)에 위치한 코딩 영역의 전사를 개시할 수 있는 DNA 영역이다.
- [0045] "작동적으로 연결된" 또는 "작동가능하게 연결된"은 유전적 요소의 병치를 지칭하며, 여기서 요소는 예상되는 방식으로 작동하도록 허용하는 관계에 있다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 개시를 돕는다면 이러한 프로모터는 코딩 영역에 작동적으로 연결된 것이다. 이러한 기능적 관계가 유지되는 한 프로모터와 코딩 영역 사이에 개입 잔기가 있을 수 있다.
- [0046] "발현 벡터"는 관심 유전자 산물을 코딩하는 영역을 포함하는 벡터이며, 의도된 표적 세포에서 유전자 산물의 발현에 영향을 미치기 위해 사용된다. 발현 벡터는 또한 표적에서 유전자 산물의 발현을 용이하게 하기 위해 코딩 영역에 작동적으로 연결된 제어 요소를 포함한다. 제어 요소와 이들이 발현을 위해 작동가능하게 연결되어 있는 유전자 또는 유전자들의 조합은 종종 "발현 카세트"로서 지칭되며, 이들 중 다수는 관련 기술분야에 공지되어 있고 이용가능하거나 또는 관련 기술분야에서 이용가능한 성분들로부터 용이하게 구축될 수 있다.
- [0047] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산 중합체를 지칭한다. 상기 용어는 또한 예를 들어, 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 인산화 또는 표지화 성분과의 접합을 포함하도록 변형된 아미노산 중합체를 포괄한다.
- [0048] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "항체"는 항원 에피토프와 특이적으로 결합하기 위해 필요한 가변 영역 서열을 포함하는 단리된 또는 재조합 결합체를 의미한다. 따라서, 항체는 원하는 생물학적 활성, 예를 들어 특이적 표적 항원과 결합하는 것을 나타내는 임의의 형태의 항체 또는 그의 단편이다. 따라서, 이는 가장 넓은 의미로 사용되며 모노클로날 항체 (완전한 길이의 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 나노바디, 디아바디, 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 scFv, Fab 및 Fab₂를 포함하나 이에 제한되지는 않는 항체 단편을 구체적으로 포함한다.
- [0049] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부분, 예를 들어 무손상 항체의 항원-결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체 (예를 들어, 문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)]); 단일쇄 항체 분자 (예를 들어, scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 항체의 파파인 소화는 각각 단일 항원-결합 부위를 갖는 "Fab" 단편이라고 하는 2개의 동일한 항원-결합 단편, 및 쉽게 결정화할 수 있는 능력을 반영하는 명칭인 잔류 "Fc" 단편을 생산한다. 펩신 처리는 2개의 항원 조합 부위를 갖고 여전히 항원을 가교 연결할 수 있는 F(ab')₂ 단편을 산출한다.
- [0050] "포함하는"은 나열된 요소가, 예를 들어, 조성물, 방법, 키트 등에 필요하지만, 예를 들어, 조성물, 방법, 키트 등을 형성하기 위해 다른 요소가 청구범위 내에 포함될 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 프로모터에 작동가능하게 연결된 치료용 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 "포함하는" 발현 카세트는 유전자 및 프로모터 이외에 다른 요소, 예를 들어, 폴리아데닐화 서열, 인핸서 요소, 다른 유전자, 링커 도메인 등을 포함할 수 있는 발현 카세트이다.
- [0051] "로 본질적으로 이루어지는"은, 예를 들어, 기재된 조성물, 방법, 키트 등의 범위를, 예를 들어, 조성물, 방법, 키트 등의 기본 및 신규 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 명시된 물질 또는 단계로 제한하는 것을 의미한다. 예를 들어, 프로모터 및 폴리아데닐화 서열에 작동가능하게 연결된 치료용 폴리펩티드를 코딩하는 유전자로 "본질적으로 이루어진" 발현 카세트는 유전자의 전사 또는 번역에 실질적으로 영향을 미치지 않는 한, 부가의 서열, 예를 들어 링커 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 나열된 서열로 "본질적으로 이루어진" 변이체, 또는 돌연변이체, 폴리펩티드 단편은 나열된 서열의 아미노산 서열과, 그로부터 유래된 완전한 길이의 나이브 폴리펩티드를 기반으로 하는 서열의 경계에서 약 10개의 아미노산 잔기, 예를 들어, 나열된 결합 아미노산 잔기보다 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2개 또는 1개 더 적은 잔기, 또는 나열된 결합 아미노산 잔기보다 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 또는 10개 더 많은 잔기를 플러스 또는 마이너스로 갖는다.
- [0052] "로 이루어지는"은 청구범위에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계, 또는 성분을 조성물, 방법, 또는 키트로부터 배제하는 것을 의미한다. 예를 들어, 나열된 서열로 "이루어진" 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 도메인은 나열된

서열만을 함유한다.

- [0053] 본원에 사용된 바와 같은 "발현 벡터"는 관심 유전자 산물을 코딩하고 의도된 표적 세포에서 유전자 산물의 발현에 영향을 미치는데 사용되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 예를 들어, 본원에서 논의되거나 또는 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 플라스미드, 미니서클, 바이러스 벡터, 리포솜 등을 포괄한다. 발현 벡터는 또한 표적 내의 유전자 산물의 발현을 용이하게 하기 위해 코딩 영역에 작동적으로 연결된 제어 요소를 포함한다. 제어 요소, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, UTR, miRNA 표적화 서열 등, 및 이들이 발현을 위해 작동가능하게 연결되는 유전자 또는 유전자들의 조합은 때때로 "발현 카세트"로서 지칭된다. 이러한 많은 제어 요소는 관련 기술분야에 공지되어 있고 이용가능하거나 또는 관련 기술분야에서 이용가능한 성분들로부터 용이하게 구축될 수 있다.
- [0054] 본원에 사용된 바와 같은 "프로모터"는 RNA 폴리머라제의 결합을 지시하여 RNA 합성을 촉진하는 DNA 서열, 즉 전사를 지시하기에 충분한 최소 서열을 포괄한다. 프로모터 및 상응하는 단백질 또는 폴리펩티드 발현은 광범위한 세포, 조직 및 종에서 강하게 활성적이라는 것을 의미하는 유비쿼터스일 수 있거나, 또는 세포 유형 특이적, 간-특이적, 또는 종 특이적일 수 있다. 프로모터는 지속적으로 활성적이라는 것을 의미하는 "구성적"이거나, 또는 프로모터가 생물학적 또는 비생물학적 인자의 존재 또는 부재에 의해 활성화 또는 불활성화될 수 있다는 것을 의미하는 "유도성"일 수 있다. 또한 프로모터 서열과 인접하거나 또는 인접하지 않을 수 있는 인핸서 서열이 본 발명의 핵산 구축물 또는 벡터에 포함된다. 인핸서 서열은 프로모터 의존성 유전자 발현에 영향을 미치며 천연 유전자의 5' 또는 3' 영역에 위치할 수 있다.
- [0055] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "천연" 또는 "야생형"은 야생형 세포, 조직, 기관 또는 유기체에 존재하는 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 유전자 또는 유전자 산물, 예를 들어 RNA 또는 단백질을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "변이체"는 참조 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열, 예를 들어 천연 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 돌연변이체, 즉 참조 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열과 100% 미만의 서열 동일성을 갖는 것을 지칭한다. 달리 말하면, 변이체는 참조 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들어 천연 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열에 비해 적어도 하나의 아미노산 차이 (예를 들어, 아미노산 치환, 아미노산 삽입, 아미노산 결실)를 포함한다. 예를 들어, 변이체는 완전한 길이의 천연 폴리뉴클레오티드 서열과 50% 이상, 60% 이상, 또는 70% 이상의 서열 동일성, 예를 들어 완전한 길이의 천연 폴리뉴클레오티드 서열과 75% 또는 80% 이상의 동일성, 예컨대 85%, 90% 또는 95% 이상, 예를 들어 98% 또는 99% 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 또 다른 예로서, 변이체는 완전한 길이의 천연 폴리펩티드 서열과 70% 이상의 서열 동일성, 예를 들어, 완전한 길이의 천연 폴리펩티드 서열과 75% 또는 80% 이상, 예컨대 85%, 90% 또는 95% 이상, 예를 들어 98% 또는 99% 동일성을 갖는 폴리펩티드일 수 있다. 변이체는 또한 참조, 예를 들어 천연 서열의 단편과 70% 이상의 서열 동일성, 예를 들어, 천연 서열과 75% 또는 80% 이상의 동일성, 예컨대 85%, 90% 또는 95% 이상, 예를 들어, 98% 또는 99% 동일성을 공유하는 참조, 예를 들어 천연 서열의 변이체 단편을 포함할 수 있다.
- [0056] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "생물학적 활성" 및 "생물학적으로 활성인"은 세포 내의 특정한 생물학적 요소에 기인하는 활성을 지칭한다. 예를 들어, R-스폰딘, 또는 그의 단편 또는 변이체의 "생물학적 활성"은 Wnt 신호를 증강시킬 수 있는 능력을 지칭한다. 또 다른 예로서, 폴리펩티드 또는 그의 기능적 단편 또는 변이체의 생물학적 활성은, 예를 들어, 결합, 효소적 활성 등의 천연 기능을 수행할 수 있는 폴리펩티드 또는 그의 기능적 단편 또는 변이체의 능력을 지칭한다. 세 번째 예로서, 유전자 조절 요소, 예를 들어 프로모터, 인핸서, 코작 (Kozak) 서열 등의 생물학적 활성은, 그에 작동가능하게 연결되는 유전자의 발현을 조절, 즉 그의 번역을 각각 촉진, 증강 또는 활성화시킬 수 있는 조절 요소 또는 그의 기능적 단편 또는 변이체의 능력을 지칭한다.
- [0057] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "투여하는" 또는 "도입하는" 또는 "제공하는"은 조성물을 세포, 대상체의 세포, 조직 및/또는 기관, 또는 대상체에게 전달하는 것을 지칭한다. 이러한 투여 또는 도입은 생체내에서, 시험관내에서 또는 생체외에서 일어날 수 있다.
- [0058] 용어 "치료", "치료하는" 등은 일반적으로 원하는 약리학 및/또는 생리학 효과를 획득하는 것을 의미하기 위해 본원에 사용된다. 그러한 효과는 질환 또는 그의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방하는 관점에서 예방적일 수 있고, 예를 들어, 질환 또는 그의 증상이 대상체에서 발생할 가능성을 감소시키고/거나, 질환 및/또는 이러한 질환에 기인하는 부작용에 대한 부분적 또는 완전한 치유의 관점에서 치료적일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "치료"는 포유동물에서의 질환의 임의의 치료를 포괄하고, (a) 질환을 억제하는 것, 즉 질환의 발생을 부분적으로 또는 완전히 정지시키는 것; 또는 (b) 질환을 완화시키는 것, 즉 질환의 퇴행을 유발하는 것을 포함한다. 치료제는 질환 또는 손상의 발병 전, 도중 또는 후에 투여될 수 있다. 치료가 환자의 바람직하지

많은 임상 증상을 안정화 또는 감소시키는, 진행중인 질환의 치료가 특히 중요하다. 이러한 치료는 병에 걸린 조직에서의 기능이 완전히 상실되기 전에 수행하는 것이 바람직하다. 대상 요법은 바람직하게 질환의 증상 단계 동안, 및 일부 경우에 질환의 증상 단계 후에 투여될 것이다.

- [0059] 용어 "개체", "숙주", "대상체" 및 "환자"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되며, 유인원 및 인간을 포함한 인간 및 비-인간 영장류; 포유류 스포츠 동물 (예를 들어, 말); 포유류 농장 동물 (예를 들어, 양, 염소 등); 포유류 애완동물 (개, 고양이 등); 및 설치류 (예를 들어, 마우스, 래트 등)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 포유동물을 지칭한다.
- [0060] 본 발명의 다양한 조성물 및 방법은 하기에 기재되어 있다. 특정한 조성물 및 방법이 본원에 예시되어 있지만, 다수의 대안적인 조성물 및 방법 중 임의의 것이 본 발명을 실시하는데 적용가능하고 사용하기에 적합한 것으로 이해된다. 또한 본 발명의 발현 구축물 및 방법의 평가는 관련 기술분야의 표준 절차를 사용하여 수행될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0061] 본 발명의 실시는 달리 나타내지 않는 한, 관련 기술분야의 통상의 기술자의 범위 내에 있는 세포 생물학, 분자 생물학 (재조합 기술 포함), 미생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기술을 이용할 것이다. 이러한 기술은 문헌 ["Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology" (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds.); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., eds., 1994); and "Current Protocols in Immunology" (J. E. Coligan et al., eds., 1991)]에 충분히 설명되어 있으며, 이들 각각은 본원에 명백히 참조로 포함되어 있다.
- [0062] 본 발명의 여러 측면이 예시를 위한 예시적인 적용을 참조하여 하기에서 설명된다. 본 발명의 완전한 이해를 제공하기 위해 다수의 구체적 세부사항, 관계 및 방법이 제시된다는 것을 이해해야 한다. 그러나 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명이 하나 이상의 구체적 세부 사항 없이 또는 다른 방법으로 실시될 수 있음을 쉽게 인식할 것이다. 일부 행위는 다른 행위 또는 사건과 상이한 순서로 및/또는 동시에 일어날 수 있으므로, 본 발명은 행위 또는 사건의 예시된 순서에 의해 제한되지 않는다. 더욱이, 본 발명에 따른 방법론을 구현하기 위해 예시된 행위 또는 사건 모두가 요구되는 것은 아니다.
- [0063] 본원에 사용된 용어는 단지 특정한 실시양태를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 제한하려는 의도가 아니다. 본원에 사용된 바와 같은 단수 형태는 문맥상 명백하게 달리 나타내지 않는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도된다. 더욱이, 용어 "포함하는", "포함한다", "갖는", "갖는다", "함께" 또는 그의 변형어가 상세한 설명 및/또는 청구범위에서 사용되는 한, 이러한 용어는 용어 "포함하는"과 유사한 방식으로 포괄하는 것으로 의도된다.
- [0064] 용어 "약" 또는 "대략"은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정된 바와 같은 특정한 값에 대해 허용가능한 오차 범위 내를 의미하며, 이는 부분적으로 값이 측정 또는 결정되는 방법, 즉 측정 시스템의 한계에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, "약"은 주어진 값의 최대 20%, 최대 10%, 최대 5%, 또는 최대 1%의 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 프로세스와 관련하여, 상기 용어는 값의 10배 이내, 예를 들어 5배 이내 또는 2배 이내를 의미할 수 있다. 특정한 값이 본 출원 및 청구범위에 기재되어 있는 경우, 달리 명시되지 않는 한 용어 "약"은 특정한 값에 대한 허용가능한 오차 범위 내를 의미하는 것으로 가정되어야 한다.
- [0065] 본원에 언급된 모든 간행물은 이러한 간행물이 인용된 것과 연계해서 방법 및/또는 재료를 개시하고 설명하기 위해 본원에 참조로 포함된다. 본 개시내용은 모순이 있는 범위까지 포함된 간행물의 임의의 개시내용을 대체하는 것으로 이해된다.
- [0066] 본 청구범위는 임의의 임의적 요소를 배제하도록 작성될 수 있음에 추가로 주목한다. 이와 같이, 이러한 진술은 청구항 요소의 나열 또는 "부정적" 제한의 사용과 연계해서 "오직", "단지" 등과 같은 배타적 용어 사용에 대한 선행 근거 역할을 하기 위한 것이다.
- [0067] 달리 표시되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 적용되는 바와 동일한 의미를 가지며, 본 발명의 실시는 미생물학 및 재조합 DNA 기술의 통상적인 기술을 이용할 것이며, 이는 관련 기술분야의 통상의 기술자의 지식 범위 내에 있다.

[0068] 서열

[0069] 하기 표 (표 A)는 대표적인 서열 및 연관된 서열 식별자 번호의 목록이다. CDR에는 일반 글꼴로 밑줄 표시되어 있다. 각각의 중쇄 및 경쇄 서열에 대해, CDR은 연속적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3이다. 링커 서열은 굵은 일반 글꼴로 제시되고 RSP02 서열은 이탤릭체로 표시된다. 따라서, 중쇄 및 경쇄 서열, 및 그의 가변 도메인은 제공된 서열에 기초하여 용이하게 결정될 수 있다. 중쇄 불변 도메인은 회색 음영으로 표시된다. 특정한 실시양태에서, 서열은 표시된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자 내에 존재하는 폴리펩티드 서열이다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 예를 들어 항체 포맷으로, 2개의 중쇄 융합 단백질 서열 및 2개의 경쇄 서열을 포함하며, 여기서 2개의 중쇄 융합 단백질 서열은 서로 결합되고 2개의 경쇄 서열 각각은 상이한 중쇄 융합 단백질 서열과 결합된다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 예를 들어 항체 포맷으로, 이들 서열 중 임의의 것 내에 존재하는 CDR을 포함하는 2개의 중쇄 융합 단백질 서열 및 이들 서열 중 임의의 것 내에 존재하는 2개의 경쇄 서열을 포함하며, 여기서 2개의 중쇄 융합 단백질 서열은 서로 결합되고 2개의 경쇄 서열 각각은 상이한 중쇄 융합 단백질 서열과 결합된다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 예를 들어 항체 포맷으로, 이들 서열 중 임의의 것 내에 존재하는 CDR을 각각 포함하는 2개의 중쇄 융합 단백질 서열, 및 이들 서열 중 임의의 것 내에 존재하는 CDR을 각각 포함하는 2개의 경쇄 서열을 포함하며, 여기서 2개의 중쇄 융합 단백질 서열은 서로 결합되고 2개의 경쇄 서열 각각은 상이한 중쇄 융합 단백질 서열과 결합된다. 특정한 실시양태에서, 2개의 중쇄 융합 단백질 서열 각각 및/또는 2개의 경쇄 서열 각각은 개시된 서열 중 임의의 것과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 가지며, 특정한 실시양태에서, 아미노산 변형, 예를 들어 삽입, 결실 또는 치환은 CDR 내에 존재하지 않는다. 특정한 실시양태에서, 아미노산 변형은 (a) F105R, F105A 또는 F105E; 및/또는 (b) F109A 또는 F109E 중 어느 것에서도 발생하지 않는다.

[0070] 표 A. 대표적인 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자, 1R34-DDNN/RA, 8M24-v1, 1R34-EEST/EE, 1R34-EEST/RA, 1R34-EEAT/EE, 8M24 인간화 1, 8M24 인간화 2, 8M24-EASE-RA, 8M24-EASE-EE, 1R34-DDNN/RA의 서열, 이는 항체 포맷, 예를 들어, 양측 대칭, 이중특이적 분자로, 2개의 표시된 경쇄 서열과 2개의 표시된 중쇄 융합 서열을 포함하며; (a) 2개의 Rspo2 도메인과 융합된 IgG를 포함하거나 이로 이루어지며, 여기서 (i) 하나의 (1) Rspo2 도메인은 IgG의 각각의 중쇄와 융합되고, (ii) IgG의 각각의 아암은 간-특이적 세포 표면 수용체 결합 도메인 (예를 들어, ASGR1)과 결합하고, (b) 여기서 이러한 IgG 아암의 결합은 하류 신호전달을 활성화시킨다.

SEQ ID NO:	설명	서열
1	1R34-DDNN/RA 경쇄 (인간 람다 2 경쇄)	SSELTQDPAVSVALGQTVRITC Q GD S LR S Y A SWY Q Q K PG QAPVLVIY G K N N R P S GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED EADYYC N S L E R I G Y L S Y V F G G G T K L T V L G Q P K A A P S V T L F PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTT P S K Q S N N K Y A A S S L S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E GSTVEKTVAPTECS
2	RSPO2와 융합된 1R34-DDNN/RA 중쇄 (인간 IgG1_N297G; 불변 도메인은 회색 음영 표시됨)	<i>NPICKGCLSCSKDNGCSRCQQKLFFLRREGMROYGECLHS PSGYYGHRAPDMNRCARCRIENCDSCRSKDACTKCKVGFYL HRGRCFDECPDGFAPLEETMECVEGGGSGGSGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGSGSTYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKDFSSRRWYLEYWQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFEPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTPSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLVLHQDWLN GKEYKCVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTPP VLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK</i>
3	8M24-v1 경쇄 가변 도메인	DIQMTQSPSSLSASV G D R V T I T C R I S E N I Y S N L A W Y Q Q K P G KAPKLLI Y A A I N L A D G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S L Q P E D F ATYYC Q H F W G T P F T F G Q G T K L E I K
4	RSPO2와 융합된 8M24-v1 중쇄 가변 도메인	<i>NPICKGCLSCSKDNGCSRCQQKLFFLRREGMROYGECLHS PSGYYGHRAPDMNRCARCRIENCDSCRSKDACTKCKVGFYL HRGRCFDECPDGFAPLEETMECVEGGGSGGSGGGS EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGINWVRQ APGQGLEWMGEIFPRSDNTFYAOKFOGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYCARKGRDYGTSHYFDYWGQGTT VTVSS</i>
5	8M24-v1 경쇄	DIQMTQSPSSLSASV G D R V T I T C R I S E N I Y S N L A W Y Q Q K P G KAPKLLI Y A A I N L A D G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S L Q P E D F ATYYC Q H F W G T P F T F G Q G T K L E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L KSGTAS V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q L S S P V T K S F N R G E C
6	RSPO2와 융합된 8M24-v1 중쇄 (불변 도메인은	<i>NPICKGCLSCSKDNGCSRCQQKLFFLRREGMROYGECLHS PSGYYGHRAPDMNRCARCRIENCDSCRSKDACTKCKVGFYL HRGRCFDECPDGFAPLEETMECVEGGGSGGSGGGS EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGINWVRQ APGQGLEWMGEIFPRSDNTFYAOKFOGRVTITADKSTSTA</i>

[0071]

	회색 음영 표시됨)	YMELSSLRSEDTAVYYCARKGRDYGTSHYFDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKLSLSLSPGK
7	1R34- EEST/EE 경쇄	SSELTQDPAVSVVALGQTVRITC QGES LSR SY ASWYQKPG QAPVLVIY GKSNRPS GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED ADYY CTSLERIGYLSYV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS <hr/> SHRSYSCQVTHEGS TVEKTVAPTECS
8	RSPO2와 융합된 1R34- EEST/EE 중쇄	<i>NPICKGCLSCSKDNGCSRCQOKLFFFLRREGMRQYGECLHSC</i> <i>PSGYGHRAPDMNRCARCRIENCDSCESKDECTKCKVGFYL</i> <i>HRGRCFDECPDGFAPLEETMECVEGGGGSGGGGSGGGG</i> EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGGSGSTYY AESV KGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKDFSSRRWYLEYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH HNH YTQKLSLSLSPGK
9	1R34- EEST/RA 경쇄	SSELTQDPAVSVVALGQTVRITC QGES LSR SY ASWYQKPG QAPVLVIY GKSNRPS GIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED ADYY CTSLERIGYLSYV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPP SSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVE TTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS <hr/> SHRSYSCQVTHEGS TVEKTVAPTECS
10	RSPO2와 융합된 1R34- EEST/RA 중쇄	<i>NPICKGCLSCSKDNGCSRCQOKLFFFLRREGMRQYGECLHSC</i> <i>PSGYGHRAPDMNRCARCRIENCDSCRSKDACTKCKVGFYL</i> <i>HRGRCFDECPDGFAPLEETMECVEGGGGSGGGGSGGGG</i> EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLEWVSAISGGSGSTYY AESV KGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKDFSSRRWYLEYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PP

[0072]

		VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNH YTQKSLSLSPGK
11	1R34- EEAT/EE 경쇄	SSELTQDPAVSV ALGQTVRITCQGESLRSYYASWYQQKPG QAPVLVIYGKANRPSGIPDRFSGSSSNTASLTITGAQAED EADYYCTSLERIGYLSYVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLF PPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAG VETTTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHE GSTVEKTVAPTECS
12	RSPO2와 융합된 1R34- EEAT/EE 중쇄	NPICKGCLSCSKDNGCSRCQOKLFFFLRREGMROYGECLHSC PSGYGHRAPDMNRCARCIENCDSCEKDECTKCKVGFYL HRGRCFDECPDGFAPLEETMECVEGGGGSGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PKGGLWVSAISGSGGSTYYAESVKGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKDFSSRRWYLEYWGQGLTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNH YTQKSLSLSPGK
13	8M24 항쇄 중쇄 가변 도메인	QVQLQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYGINWVKQ RTGQGLEWIGEIFPRSDNTFYNEKFKGKATLTADKSTTAY MELRSLTSEDSAVYFCARKGRDYGTSHYFDYWGQGTTLT VSS
14	8M24 항쇄 경쇄 가변 도메인	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRISENIYSNLAWYQQKQG KSPHLLVYAAINLADGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLQSEDF GSYYCQHFHWGTPFTFGGQTKLEIK
15	8M24 항쇄 중쇄 가변 도메인 (인간화 1)	EVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGINWVRQ APGQGLEWMGEIFPRSDNTFYAQKFQGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARKGRDYGTSHYFDYWGQGT TVSS
16	8M24 항쇄 중쇄 가변 도메인 (인간화 2)	EVQLVQSGAEVKKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGINWVRQ APGQGLEWIGEIFPRSDNTFYAQKFQGRATLTADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARKGRDYGTSHYFDYWGQGT TVSS
17	8M24 항쇄 경쇄 가변 도메인 (인간화 1)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRISENIYSNLAWYQQKPG KAPKLLIYAAINLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQHFHWGTPFTFGGQTKLEIK
18	8M24 항쇄 경쇄 가변 도메인 (인간화 2)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRISENIYSNLAWYQQKPG KAPKLLVYAAINLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF GTYCQHFHWGTPFTFGGQTKLEIK
19	8M24-EASE-	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRISENIYSNLAWYQQKPG

[0073]

	RA 경쇄 가변 도메인	KAPKLLIYAAINLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQHFWGTPFTFGQGTKLEIK
20	RSPO2와 융합된 8M24- EASE-RA 중쇄 가변 도메인	NPICKGCLSCSKDNGCSRCQOKLFFFLRREGMRQYGECLHSC PSGYGHRAPDMNRCARCRIENCDSR SKD ACTKCKVGFYL HRGRCFDECPDGFAPLEETMEC VE GGGGSGGGSGGGGS EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTAYGINWVRQ APGQGLEWMGEIFPRSDSTFYAQKFOGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARKGREYGTSHYFDYWGQGTTV TVSS
21	8M24-EASE- EE 경쇄	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRISENIYSNLAWYQQKPG KAPKLLIYAAINLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQHFWGTPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
22	RSPO2와 융합된 8M24- EASE-EE 중쇄	NPICKGCLSCSKDNGCSRCQOKLFFFLRREGMRQYGECLHSC PSGYGHRAPDMNRCARCRIENCDS ESKDE CTKCKVGFYL HRGRCFDECPDGFAPLEETMEC VE GGGGSGGGSGGGGS EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFTAYGINWVRQ APGQGLEWMGEIFPRSDSTFYAQKFOGRVTITADKSTSTA YMELSSLRSEDTAVYYCARKGREYGTSHYFDYWGQGTTV TVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP PVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHN HYTQKLSLSLSPGK
23	1R34- DDNN/RA 경쇄 가변 도메인	SSELTQDPAVSVLGGQTVRITCQGD SLR SYASWYQQKPG QAPVLVIYGN NR PSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAED EADYYCNSLERIGYLSYVFGGGTKLTVL
24	RSPO2와 융합된 1R34- DDNN/RA 중쇄 가변 도메인	NPICKGCLSCSKDNGCSRCQOKLFFFLRREGMRQYGECLHSC PSGYGHRAPDMNRCARCRIENCDSR SKD ACTKCKVGFYLH RGRCFDECPDGFAPLEETMEC VE GGGGSGSGSGGGGSEV QLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPG KGLEWVSAISGGG STYY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAK DFSSRR WYLEYWGQGLTVTVSS
25	8M24-EASE 경쇄 (인간 카파 경쇄)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRISENIYSNLAWYQQKPG KAPKLLIYAAINLAEGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQHFWGTPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSSTLSSTLTLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC
26	RSPO2와	NPICKGCLSCSKDNGCSRCQOKLFFFLRREGMRQYGECLHSC

[0074]

	융합된 8M24-EASE 중쇄 (인간 IgG1_N297G)	PSGYYGHRAPDMNRCARCRIENCDS CSKDA CTKCKVGFYL HRGRCFDECPDGFAPLEETME CV EGGGGSGGGGSGGGGS EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV S CKASGYTFT AYGIN WVRQ APGQGLEWMGEIFPRSDSTFYAQK F QGRVTITADKSTSTA Y M ELSSLRSEDTAVYYC ARKGREY GTSHYFDYWGQGT V TVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TV PSSSLGT QTYICNVNHKPSNTK VDK KVEPK SCDKTHTCPPCP AP ELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VT CVVV DVSHEDPEV KFN WYVDGVEVHNA TKPREEQYG STYRVV SVLTVLHQDWL NGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKG QPREPQVY TLPPSR EEMTK NQVSLTCLVKGF YPSDIA VEWESNGQPENNY KTTP PVLDS DGSFFLYSKLTV DKSRW QQGNVFSCSVMHEALHN HY TQKSLSLSPGK
27	1R34-EEST/EE 경쇄 가변 도메인	SSELTQDP AVSVALGQTVRITCQGES LR SY ASWY Q QKPG QAPV LVIYGKSNRPS GIPDR FS SSSGNTAS L TITGA Q A E DE ADY YCTSLERIGYLSYV FGGG T KLTVL
28	RSPO2와 융합된 1R34-EEST/EE 중쇄 가변 영역	NPICKGCL SCSKDNGCSRCQ KLFFFLRREG MRQYGECLH PSGYYGHRAPDMNRCARCRIENCDS CSKDE CTKCKVGFYL HRGRCFDECPDGFAPLEETME CV EGGGGSGGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLS CAASG FTFSSYAMS WVRQA PGK GLEWVSAISGSG STYY AESVKGR FTISRDN SKNTLY LQMN SLRAEDTAVYYCAKDF SSRRWY LEYWGQ GLTVV SS
29	변형된 R-스폰던-2	NPICKGCL SCSKDNGCSRCQ KLFFFLRREG MRQYGECLH SCPSGYYGHRAPDMNRCARCRIENCDS CSKDA CTKCKV GFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETME CV
30	변형된 R-스폰던-2	NPICKGCL SCSKDNGCSRCQ KLFFFLRREG MRQYGECLH SCPSGYYGHRAPDMNRCARCRIENCDS CSKDA CTKCKV GFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETME CV
31	변형된 R-스폰던-2	NPICKGCL SCSKDNGCSRCQ KLFFFLRREG MRQYGECLH SCPSGYYGHRAPDMNRCARCRIENCDS CSKDA CTKCKV GFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETME CV
32	변형된 R-스폰던-2	NPICKGCL SCSKDNGCSRCQ KLFFFLRREG MRQYGECLH SCPSGYYGHRAPDMNRCARCRIENCDS CSKDE CTKCKV GFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETME CV
33	1R34-DDNN/RA 중쇄	EVQLLESGGGLVQ PGGSLRLS CAASG FTFSSYAMS WVRQA PGK GLEWVSAISGSG STYY ADSVKGR FTISRDN SKNTLY LQMN SLRAEDTAVYYCAKDF SSRRWY LEYWGQ GLTVV SSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPV TV SWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TV PSSSLGT QT YICNVNHKPSNTK VDK KVEPK SCDKTHTCPPCP AP ELL GG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VT CVVV DVSHEDPEV KFNW YYVDGVEVHNA TKPREEQYG STYRVV SVLTVLHQDWLN GKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKG QPREPQVY TLPPSR E EMTK NQVSLTCLVKGF YPSDIA VEWESNGQPENNY KTTP VLDSD DGSFFLYSKLTV DKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNH YTQK SLSLSPGK
34	1R34-	SYAMS

[0075]

	EEST/EE CDRH1	
35	1R34- EEST/EE CDRH2	AISGSGGSTYYEDSVKG
36	1R34- EEST/EE CDRH3	DFSSRRWYLEY
37	1R34- EEST/EE CDRL1	QGESLRSYYAS
38	1R34- EEST/EE CDRL2	YGKSNRPS
39	1R34- EEST/EE CDRL3	CTSLERIGYLSYV
40	1R34- EEAT/EE CDRL2	YGKANRPS
41	8M24-EASE CDRL1	RISENIYSNLA
42	8M24-EASE CDRL2	AAINLAE
43	8M24-EASE CDRL3	QHFWGTPFT
44	8M24-EASE CDRH1	AYGIN
45	8M24-EASE CDRH2	<u>EIFPRSDSTFYAQKFQG</u>
46	8M24-EASE CDRH3	KGREYGTSHYFDY
47	Rspo1	MRLGLCVVALVLSWTHLTISSRGIKGGKRQRRISAEGSQAC AKGCELCSEVNGCLKCSPKLFILLERNDIRQVGVCLPSCPP GYFDARNPDMNKCIKCKIEHCEACFSHNFTCKCKEGLYLH KGRCYPACPEGSSAANGTMECSSPAQCEMSEWSPWGPCS KKQQLCGFRRGSEERTRRVLHAPVGDHAACSDTKETRRC TVRRVPCPEGQKRRKGGQGRRENANRNLARKEKEAGAG SRRRKGGQQQQQGTVGPLTSAGPA
48	Rspo2	MQFRLFSFALIILNCMDYSHCQGNRWRRSKRASVVSNPIC KGCLSCSKDNGCSRCQKLFLLRREGMRQYGECLHSCPS GYYGHRAPDMNRCARCRIENCDFSKDFCTKCKVGFYL HRGRCFDECPDGFAPLEETMECEVEGCEVGHWSEWGCSR NNRTCGFKWGLETRTRQIVKPKVKDTILCPTIAESRRCKM TMRHCPGGKRTPKAKEKRNKKKKRKLIERAQEQHSVFLA TDRANQ
49	Rspo3	MHLRLISWLFILNFMEYIGSQNASRGRQRMMHPNVSQG CQGGCATCSDYNGCLSCKPRLFFALERIGMKQIGVCLSSCP SGYYGTRYPDINKCTKCKADCDCFNKNFCTKCKSGFYLH

[0076]

		LGKCLDNCPEGLEANNHTMECVSIVHCEVSEWNPWSPCT KKGKTCGFKRGTETRVREIIQHPSAKGNLCPPTNETRKTCTV QRKKCCQKGERGKKGREKRKKPNKGESKEAIPDSKSLESS KEIPEQRENKQQQKRRKVQDKQKSVSVSTVH
50	Rspo4	MRAPLCLLLLVAHAVDMLALNRRRKKQVGTGLGNCNCGCI ICSEENGCSSTCQQLFLFIRREGIRQYGKCLHDCPPGYFGIR GQEVNRCCKCGATCESCFSDFCIRCKRQFYLYK GKCLPT CPPGTLAHQNTRECQGECELGPGWGWSPCTHNGKTCGSA WGLESRVREAGRAGHEEAATCQVLSERKCPHQPCGER SPGQKKGRRKDRRPRKDRKLDRLDVRPRQPLQP
51	RSPO2와 융합된 8M24- EASE-RA 중쇄	NPICKGCLSCSKDNGCSRQOKLFFFLRREGMROYGECLHSC PSGYGHRAPDMNRCARCRIENCDSR SKDAC TKCKVGFYL HRGRCFDECPDGFAPLEETMECV EGGGGSGGGGSGGGG EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTAYGINWVRQ APGQGLEWMGEIFPRSDSTFYAQKFQGRVTITADKSTSTA YMESSLRSEDTAVYYCARKGREYGTSHYFDYWGGQTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPPEPVYTLPPSR EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP PVLDSGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHN HYTQKLSLSLSPGK
52	HuASGR1- CBD_P07306_ 154-291	HHHHHHHHGSGSGLNDIFEAQKIEWHESGSGCPVNWVEH ERSCYWFSRSGKAWADADNYCRLEDAHLVVVTSWEEQK FVQHHIGPVNTWMGLHDQNGPWKVVWDGTDYETGFKNW RPEQPDDWYGHGLGGGEDCAHFTDDGRWNDDVCQRPYR WVCETELDKASQEPPLL
53	8M24L1 경쇄	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRISENIYSNLAWYQQKPG KAPKLLIYAAINLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF ATYYCQHFHWGTPFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
54	8M24H1 중쇄	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYGINWVRQ APGQGLEWMGEIFPRSDNTFYAQKFQGRVTITADKSTSTA YMESSLRSEDTAVYYCARKGRDYGTSHYFDYWGGQTT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCGSGSGHHHHHHH

[0077]

[0078]

특정한 실시양태에서, 서열은 표 A에 제시된 폴리펩티드 중 임의의 것의 하나 이상 또는 그의 변이체를 포함하는 표시된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자 내에 존재하는 폴리펩티드 서열, 또는 그의 임의의 조합이다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 예를 들어 항체 포맷으로, 2개의 중쇄 융합 단백질 서열 및 2개의 경쇄 서열을 포함하며, 여기서 2개의 중쇄 융합 단백질 서열은 서로 결합되고 2개의 경쇄 서열 각각은 상이한 중쇄 융합 단백질 서열과 결합된다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 예를 들어 항체 포맷으로, 이들 서열 중 임의의 것 내에 존재하는 CDR을 포함하는 2개의 중쇄 융합 단백질 서열 및 이들 서열 중 임의의 것 내에 존재하는 2개의 경쇄 서열을 포함하며, 여기서 2개의 중쇄 융합 단백질 서열은 서로 결합되고 2개의 경쇄 서열 각각은 상이한 중쇄 융합 단백질 서열과 결합된다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 예를 들어 항체 포맷으로, 이들 서열 중 임의의 것 내에 존재하는 CDR을 각각 포함하는 2개의 중쇄 융합 단백질 서열 및 이들 서열 중 임의의 것 내에 존재하는 CDR을 각각 포함하는 2개의 경쇄 서열을 포함하며, 여기서 2개의 중쇄 융합 단백질 서열은 서로 결합되고 2개의 경쇄 서열 각각은 상이한 중쇄 융합 단백질 서열과 결합된다. 특정한 실시양태에서, 2개의 중쇄 융합 단백질 서열 각각 및/또는 2개의 경쇄 서열 각각은 개시된 서열 중 임의의 것의 변이체이고, 개시된 서열 중 임의의 것과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 가지며, 특정한 실시양태에서, 임의의 아미노산 변형, 예를 들어 삽입, 결실 또는 치환은 CDR 내에 존재하지 않는다. 특정한 실시양태에서, 아미노산 변형은 (a) F105R, F105A 또는 F105E; 및/또는 (b) F109A 또는 F109E 중 어느 것에서도 발생하지 않는다. 특정한 실시양태에서, 중쇄의 변이체는 N297G를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 변이체에 존재하는 RPOS2 서열은 F105R 및 F109A 치환을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 변이체에 존재하는 RPOS2 서열은 F105E 및 F109E 치환을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 분자는 하기 구축물: EEST/EE, EEST/RA, EEAT/EE, EESN/RA, EEAN/RA, 8M24-EAASE-ORA, 또는 8M24-EASE-EE 중 임의의 것에 대해 모체 또는 야생형과 비교 시 아미노산 치환을 포함한다.

[0079]

간-특이적 Wnt 신호 증강 분자

[0080] 특정 측면에서, 본 개시내용은 간-특이적 방식으로 Wnt 활성을 증강시킬 수 있는 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 제공한다. 특정 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 하나 이상의 ZNRF3 및/또는 RNF43 리가제와 결합하는 제1 도메인, 및 간 조직 및/또는 간 세포와 결합하는 제2 도메인을 포함하는 이중기능적 분자이다. 제1 도메인 및 제2 도메인 각각은 리가제 복합체 또는 표적화된 조직 또는 세포와 각각 결합할 수 있는 임의의 모이어티일 수 있다. 예를 들어, 제1 도메인 및 제2 도메인 각각은 폴리펩티드 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 항체와 상이한 펩티드 또는 폴리펩티드), 소분자, 및 자연 리간드 또는 그의 변이체, 단편 또는 유도체로부터 선택된 모이어티일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 자연 리간드는 폴리펩티드, 소분자, 이온, 아미노산, 지질 또는 당 분자이다. 제1 도메인과 제2 도메인은 서로 동일한 유형의 모이어티일 수 있거나, 또는 상이한 유형의 모이어티일 수 있다. 특정 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 간-특이적 세포 표면 수용체와 결합한다. 특정한 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는, 예를 들어, 음성 대조군과 비교 시, 간 조직 또는 간 세포에서 Wnt 신호전달을 적어도 50%, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 40배, 또는 적어도 50배만큼 증가 또는 증강시킨다.

[0081] 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 상이한 포맷을 가질 수 있다. 특정한 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 ZNRF3/RNF43과 결합하는 제1 폴리펩티드 서열 및 간 조직 또는 간 세포와 결합하는 제2 폴리펩티드 서열을 포함하는 융합 단백질이다. 특정 실시양태에서, 2개의 폴리펩티드 서열은 직접적으로 또는 링커를 통해 융합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 2개 이상의 폴리펩티드, 예컨대 각각 제1 도메인 및 제2 도메인을 포함하는 2개 이상의 융합 단백질을 포함하는 이량체 또는 다량체를 포함하며, 여기서 2개 이상의 폴리펩티드는, 예를 들어, 링커 모이어티 또는 2개 이상의 폴리펩티드 각각에서 아미노산 잔기 간의 결합, 예를 들어 시스테인 잔기 간의 분자간 디설피드 결합을 통해 연결된다.

[0082] 특정한 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 제1 도메인 또는 제2 도메인을 구성하는 항체 중쇄 및 경쇄 (또는 그의 항원-결합 단편)를 포함하는 항체이며, 여기서 다른 도메인 (즉, 제2 도메인 또는 제1 도메인)은 융합 단백질로서 또는 링커 모이어티를 통해 항체 중쇄 또는 경쇄에 연결된다. 특정한 실시양태에서, 다른 도메인은 중쇄의 N-말단, 중쇄의 C-말단, 경쇄의 N-말단, 또는 경쇄의 C-말단에 연결된다. 이러한 구조는 부착된 IgG 스캐폴드로서 본원에 지칭될 수 있다. 예를 들어, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 간-특이적 세포 표면 수용체와 결합하는 항체일 수 있으며, 여기서 ZNRF3/RNF43과 결합하는 결합 도메인은 조직-특이적 또는 세포-특이적 수용체와 결합하는 항체의 중쇄 또는 경쇄와 융합되거나 이에 부착될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 ASGR1 또는 ASGR2와 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이며, 여기서 ZNRF3/RNF43과 결합하는 결합 도메인은 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 중쇄 또는 경쇄와 융합되거나 이에 부착된다. 특정한 실시양태에서, ZNRF3/RNF43과 결합하는 결합 도메인은 Rspo 폴리펩티드로부터 유래되고, 일부 실시양태에서, 이는 Fu1 및 Fu2 도메인을 포함하며, 여기서 Fu1 및 Fu2 도메인은 임의로 본원에 개시된 것들 중 임의의 것, 예를 들어 F105R, F105E, F109A 또는 F109E를 포함한 하나 이상의 아미노산 변형을 포함한다.

[0083] 특정 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 ZNRF3/RNF43과 결합하는 제1 도메인 ("작용 모듈") 및 예를 들어, 높은 친화도로 간-특이적 수용체와 결합하는 제2 도메인 ("표적화 모듈")을 포함한다. 특정 실시양태에서, 이들 2개의 도메인 각각은 실질적으로 감소된 활성을 갖거나 자체적으로 Wnt 신호를 증강시키는데 불활성이다. 그러나, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자가 간-특이적 수용체를 발현하는 간 조직 또는 세포와 맞물리게 될 때, E3 리가제 ZNRF3/RNF43은 간-특이적 수용체와 삼원 복합체로 동원되어, 수용체-매개 세포내이입을 통해 세포 표면으로부터 격리 및/또는 제거되도록 한다. 최종 결과는 간-특이적 방식으로 Wnt 신호를 증강시키는 것이다.

[0084] 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 ZNRF3/RNF43 E3 리가제에 대한 결합체이고, R-스폰딘, 예를 들어 인간 R-스폰딘-1-4를 포함하나 이에 제한되지는 않는 R-스폰딘-1-4를 기반으로 설계될 수 있다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 R-스폰딘, 예를 들어, 야생형 R-스폰딘-1-4, 임의로 인간 R-스폰딘-1-4, 또는 그의 변이체 또는 단편이다. 특정한 실시양태에서, 이는 상응하는 야생형 R-스폰딘-1-4 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 R-스폰딘-1-4 중 임의의 것의 변이체이다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 ZNRF3/RNF43과 결합하는 R-스폰딘, 예를 들어 R-스폰딘 1-4 중 임의의 것의 푸린 도메인 1을 포함하거나 이로 이루어진다. ZNRF3/RNF43과 특이적으로 결합할 수 있는 항체와 상이한 푸린 도메인 1 (더 이상 LGR4-6과 결합하지 않거나 LGR4-6에 대한 결합이 감소된 돌연변이된 푸린 도메인 2를 갖는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않음) 또는 조작된 항체 또는 임의의 다른 유도체 또는 임의의 조작된 폴리펩티드의

확장된 버전이 또한 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 R-스폰딘의 하나 이상의 푸린 도메인 1을 포함한다. 특정 실시양태에서, 이것은 R-스폰딘의 푸린 도메인 2를 포함하지 않거나, 또는 R-스폰딘의 변형된 또는 변이체 푸린 도메인 2, 예를 들어 야생형 푸린 도메인 2과 비교 시 감소된 활성을 갖는 푸린 도메인 2를 포함한다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 R-스폰딘의 푸린 도메인 1을 포함하나 푸린 도메인 2는 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 2개 이상의 푸린 도메인 1 또는 푸린 도메인 1의 다량체를 포함한다. 작용 도메인은 R-스폰딘의 하나 이상의 야생형 푸린 도메인 1을 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 작용 모듈은 야생형 푸린 도메인 1과 비교 시, 증가된 활성, 예를 들어 ZNRF3/RNF43에 대한 결합을 갖는 R-스폰딘의 변형된 또는 변이체 푸린 도메인 1을 포함한다. ZNRF3/RNF43에 대한 증가된 결합을 갖는 변이체는, 예를 들어, R-스폰딘 푸린 도메인 1의 변이체를 포함하는 파지 또는 효모 디스플레이 라이브러리를 스크리닝함으로써 확인될 수 있다. R-스폰딘 푸린 도메인 1과 관련이 없지만 ZNRF3/RNF43과 결합하는 펩티드 또는 폴리펩티드가 또한 스크리닝을 통해 확인될 수 있다. 작용 모듈은 부가의 모이어티 또는 폴리펩티드 서열, 예를 들어 작용 모듈 또는 그것이 존재하는 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 구조를 안정화시키기 위한 부가의 아미노산 잔기를 추가로 포함할 수 있다.

[0085] R-스폰딘은 Wnt 신호를 증폭할 수 있다. R-스폰딘의 최소 기능적 단위는 ZNRF3/RNF43 E3 리가제와 결합하는 푸린 도메인 1 및 LGR4-6과 결합하는 푸린 도메인 2의 2개의 푸린 도메인으로 구성되어, R-스폰딘, LGR 및 E3 리가제의 삼원 복합체를 함께 가져온다. 그 결과 전체 복합체가 내재화되고 파괴 표적으로부터 ZNRF3/RNF43이 제거된다. 푸린 도메인 1만으로는 완전한 기능을 수행할 수 없지만, ZNRF3 및 RNF43 둘 다와 결합할 수 있다.

[0086] 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 작용 모듈은 ZNRF3/RNF43 리가제와 결합할 수 있는 임의의 기능적 모이어티, 예를 들어 폴리펩티드 또는 유기 화합물질일 수 있지만 이에 제한되지는 않는다. 특정한 실시양태에서, 작용 모듈, 예를 들어 단독으로 또는 표적화 모듈과 함께 R-스폰딘의 푸린 도메인 1을 포함하는 폴리펩티드는 비-표적 조직에서 실질적으로 불활성이어서 잠재적인 오프-타겟 효과를 최소화한다. 작용 모듈은 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자와 관련하여 표적화 모듈과 융합되거나 결합되며, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자가 간-특이적 수용체를 발현하는 표적 조직과 맞물리게 될 때, E3 리가제 ZNRF3/RNF43은 간-특이적 수용체와 삼원 복합체로 동원되어, 세포 표면에 재배치되고, 세포 표면으로부터 격리 및/또는 제거된다.

[0087] 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 R-스폰딘 폴리펩티드 (예를 들어, R-스폰딘 1-4 중 임의의 것)의 단편 또는 변이체, 또는 그의 기능적 단편 또는 변이체를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 작용 모듈은 야생형 R-스폰딘의 단편을 포함하고, 다른 실시양태에서, 작용 모듈은 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 R-스폰딘의 단편을 포함한다. R-스폰딘은 포유동물 종을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 동물 종으로부터의 R-스폰딘, 예컨대 인간 R-스폰딘을 포함한, 관련 기술분야에 공지된 임의의 R-스폰딘 또는 그의 상동체일 수 있다. R-스폰딘은 확인되고 기재되었으며, 그의 폴리펩티드 및 코딩 폴리뉴클레오티드 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있고 이용가능하다. 특정한 실시양태에서, R-스폰딘 폴리펩티드는 인간 R-스폰딘 또는 다른 척추동물 또는 비-척추동물에서 발견되는 상동체, 예를 들어 마우스 R-스폰딘이다. 인간 R-스폰딘 1, 인간 R-스폰딘 2, 인간 R-스폰딘 3 및 인간 R-스폰딘 4의 아미노산 서열, 및 그의 푸린 도메인 1이 도 38 및 서열식별번호: 47-50에 각각 제공된다. 그들의 동족체 및 변이체는 일반 데이터베이스 검색, 예컨대 <https://www.dot.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>로부터 이용가능하다. 본 발명은 이들 또는 다른 R-스폰딘 중 임의의 것의 단편 및 변이체를 포함하거나 이들로 이루어진 작용 모듈을 포함한다 (그러나 이에 제한되지는 않음). 다양한 실시양태에서, R-스폰딘 폴리펩티드 및 그의 단편 중 임의의 것의 변이체는 야생형 R-스폰딘 폴리펩티드와 비교 시 하나 이상의 아미노산 변형, 예를 들어 결실, 부가 또는 치환을 포함한다. 변형(들)은 푸린 도메인 1 및/또는 푸린 도메인 2를 포함하나 이에 제한되지는 않는 R-스폰딘 또는 그의 단편의 변이체의 임의의 영역에 존재할 수 있다. 푸린 도메인 1 또는 푸린 도메인 2 외부의 아미노산 변형은, 그 결과로 생성된 변이체가 야생형 R-스폰딘 또는 그의 단편과 비교 시 감소된 LGR4-6 결합 활성을 갖도록 그 결과로 생성된 변이체를 변경시킬 수 있는 것으로 이해된다.

[0088] 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 R-스폰딘 서열, 예를 들어 완전한 길이 또는 야생형 R-스폰딘-1, -2, -3 또는 -4, 임의로 인간 R-스폰딘-1, -2, -3, 또는 -4, 또는 그의 변이체 또는 단편을 포함하거나 이로 이루어진다. 특정한 실시양태에서, 이는 상응하는 야생형 R-스폰딘-1-4 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 R-스폰딘-1-4 중 임의의 것의 변이체이다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 본원에 개시된 것들 중 임의의 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 완전한 길이의 R-스폰딘 (예를 들어, R-스폰딘-1-4 중 임의의 것)을 포함하거나 이로 이루어진다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 야생형 또는 변형된 R-스폰딘 (예를 들어, R-스폰딘-1-4 중 임의의

것)의 단편을 포함하거나 이로 이루어진다. 특정한 실시양태에서, 단편은 ZNRF3 및/또는 RNF43과 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 R-스폰딘 단백질의 푸린 도메인 1, 또는 R-스폰딘 단백질의 단편 또는 변이체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 R-스폰딘 단백질 (예를 들어, R-스폰딘-1-4)의 하나 이상 (예를 들어, 1, 2 또는 3개 이상)의 푸린 도메인 1, 또는 R-스폰딘 푸린 도메인 1과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 R-스폰딘 푸린 1 도메인 또는 그의 변이체 또는 단편 및 R-스폰딘 푸린 2 도메인 또는 그의 변이체 또는 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 ZNRF3/RNF43과 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 작용 모듈은 ZNRF3 또는 RNF43과 특이적으로 결합한다.

[0089] 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 R-스폰딘, 예를 들어, 인간 R-스폰딘 1 또는 인간 R-스폰딘 2의 하나 이상의 푸린 도메인 1, 또는 그의 변이체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 R-스폰딘의 하나 이상의 푸린 도메인 1을 포함하나, R-스폰딘의 푸린 도메인 2를 포함하지는 않는다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 R-스폰딘의 하나 이상의 푸린 도메인 1을 포함하고, 이는 R-스폰딘의 변형된 또는 변이체 푸린 도메인 2, 예를 들어 야생형 푸린 도메인 2와 비교 시 감소된 활성을 갖는 푸린 도메인 2를 포함한다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 R-스폰딘의 변형된 또는 변이체 푸린 도메인 2, 예를 들어 야생형 푸린 도메인 2와 비교 시 감소된 활성을 갖는 푸린 도메인 2를 갖는 R-스폰딘 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 2개 이상의 푸린 도메인 1 또는 그의 변이체, 또는 푸린 도메인 1 또는 그의 변이체의 다량체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은, 예를 들어, 인간 R-스폰딘 2의 K58, H76, S77, R86 및/또는 N91에 상응하는 아미노산 잔기에서 하나 이상의 점 돌연변이를 포함하는 변이체 R-스폰딘 푸린 1 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은, 예를 들어, 인간 R-스폰딘 2의 F105, F109 및/또는 K121에 상응하는 아미노산 잔기에서 하나 이상의 점 돌연변이를 포함하는 변이체 R-스폰딘 푸린 2 도메인을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 작용 모듈은 야생형 푸린 도메인 1과 비교 시 증가된 활성, 예를 들어 ZNRF3/RNF43에 대한 결합을 갖는 R-스폰딘의 변형된 또는 변이체 푸린 도메인 1을 포함한다. 작용 모듈은 부가의 모이머티 또는 폴리펩티드 서열, 예를 들어 작용 모듈 또는 그것이 존재하는 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 구조를 안정화시키기 위한 부가의 아미노산 잔기를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 R-스폰딘에 대한 명백한/강력한 서열 상동성이 없지만 ZNRF3/RNF43에 대한 R-스폰딘의 결합 친화도와 비슷하거나 그보다 더 높은 ZNRF3/RNF43에 대한 결합 친화도를 갖는 펩티드 또는 폴리펩티드를 포함한다.

[0090] 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 R-스폰딘 폴리펩티드 (예를 들어, 인간 R-스폰딘)의 푸린 도메인 1, 또는 그의 기능적 단편 또는 변이체, 및 R-스폰딘 폴리펩티드 (예를 들어, 인간 R-스폰딘)의 변형된 또는 변이체 푸린 도메인 2를 포함하며, 여기서 변형된 푸린 도메인 2는 상응하는 야생형 푸린 도메인 2와 비교 시 LGR4-6에 대해 감소된 결합 친화도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 푸린 도메인 2는, 예를 들어, 인간 R-스폰딘 2의 F105 및/또는 F109에 상응하는 아미노산 잔기에서 하나 이상의 점 돌연변이를 포함한다. 통상의 기술자는 아미노산 서열을 인간 R-스폰딘 2와 비교함으로써 다른 R-스폰딘 폴리펩티드 내의 상응하는 아미노산 잔기를 쉽게 결정할 수 있다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈은 푸린 도메인 1 또는 그의 변이체 및 푸린 도메인 2 또는 그의 변이체를 포함하며, 여기서 푸린 도메인 1 및/또는 푸린 도메인 2는 하나 이상의 점 돌연변이를 포함한다. 작용 모듈 내의 하나 이상의 점 돌연변이 (상응하는 야생형 R-스폰딘 서열과 비교 시)는, 예를 들어, 아미노산 잔기 K58, H76, S77, R86, N91, F105, F109 또는 K121 및 LGR4-6에 대한 결합 친화도를 감소시키기 위해 변형될 수 있는 다른 잔기를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 푸린 도메인 1 및/또는 푸린 도메인 2 내의 임의의 아미노산 잔기에서 발생할 수 있다. 기능적 활성에 중요한 인간 R-스폰딘 1의 푸린 도메인 1 및 푸린 도메인 2의 영역이 확인되었으며, 이는 E3 리가제와 결합하는데 중요한 보존된 친수성 잔기 S48, N51, R66, R70 및 Q71, 및 덜 보존된 소수성 잔기인 L46, L54, I62 및 L64를 포함한다. 또한, 인간 R-스폰딘 1 푸린 도메인 1에서, 아미노산 잔기 K59, S78, D85, R87, N88 및 N92는 LGR5와 친수성 상호작용 표면을 형성하고, FSHNF 아미노산 서열은 소수성 표면에 중요한 루프로서 확인되었다. 특정한 실시양태에서, R-스폰딘 푸린 도메인 1 및/또는 푸린 도메인 2를 포함하는 작용 모듈은 이들 영역, 표면 또는 아미노산 잔기 중 임의의 것 내에 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0091] 특정한 실시양태에서, R-스폰딘 푸린 도메인 1 및/또는 푸린 도메인 2를 포함하는 작용 모듈은 이들 영역, 표면 또는 아미노산 잔기를 넘어 하나 이상의 돌연변이 또는 다른 변형을 포함할 수 있으며, 이는 결합 표면의 구조 및/또는 안정성에 영향을 미침으로써 LGR4-6 결합을 간접적으로 손상시킨다.

[0092] 특정 실시양태에서, R-스폰딘 푸린 도메인 1 및/또는 푸린 도메인 2를 포함하는 작용 모듈은 수반되는 본 실시

예에 기재된 것들 중 임의의 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 임의의 아미노산 잔기에서 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 작용 모듈은 아미노산 잔기 F105 및/또는 F109에서의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 푸린 도메인 2를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 작용 모듈은 푸린 1 도메인 및 아미노산 잔기 F105 및/또는 F109에서의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 푸린 도메인 2를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 작용 모듈은 변형된 푸린 1 도메인 및 변형된 푸린 2 도메인을 포함하며, 여기서 특정 실시양태에서, 변형된 푸린 1 도메인은 아미노산 R65, R69 및/또는 Q70에서의 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하고, 변형된 푸린 도메인은 아미노산 F105 및/또는 F109에서의 하나 이상의 아미노산 변형을 포함한다. 특정 실시양태에서, 변형된 R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체는 인간 R-스폰딘 2의 아미노산 F105 및 F109에 상응하는 위치에서의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서 2개의 아미노산 치환은 (a) F105R, F105A 또는 F105E; 및 (b) F109A 또는 F109E를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 2개의 아미노산 치환은 (a) F105R 및 F109A; (b) F105A 및 F109A; (c) F105E 및 F109A; 또는 (d) F105E 및 F109E이다. 특정 실시양태에서, 변형된 R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체는 서열식별번호: 29-32 중 임의의 것과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다. 특정 실시양태에서, 변형된 R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체는 서열식별번호: 29-32 중 임의의 것과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 가지며, 하기 아미노산 치환의 조합 중 하나를 포함한다: (a) F105R 및 F109A; (b) F105A 및 F109A; (c) F105E 및 F109A; 또는 (d) F105E 및 F109E. 특정한 실시양태에서, 변형된 푸린 도메인 2는, 예를 들어, 완전한 길이의 R-스폰딘 단백질의 맥락에서, 상응하는 야생형 푸린 도메인 2의 결합의 80% 미만, 50% 미만, 20% 미만 또는 10% 미만인 LGR4-6에 대한 결합 친화도를 갖는다.

[0093] 특정한 실시양태에서, 작용 모듈은 R-스폰딘 폴리펩티드 (예를 들어, 인간 R-스폰딘)의 푸린 도메인 1, 또는 그의 기능적 단편 또는 변이체, 및 R-스폰딘 폴리펩티드 (예를 들어, 인간 R-스폰딘)의 비변형된 푸린 도메인 2를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 상응하는 야생형 푸린 도메인 2와 비교 시 LGR4-6에 대한 감소된 결합 친화도를 갖는 변형된 푸린 도메인 2는 조직 표적화의 특이성을 증가시키는데 더 바람직하지만, 특정한 실시양태에서, 표적화 모듈과 조합된 비변형된 푸린 도메인 2는 표적화 모듈 없이 야생형 R-스폰딘에 비해 조직 표적화를 개선시키고 특정 상황에서 유용성을 갖는다.

[0094] 특정한 실시양태에서, 작용 모듈은, 예를 들어, R-스폰딘-1, -2, -3, -4, 임의로 인간 R-스폰딘-1, -2, -3 또는 -4 중 임의의 것으로부터의 야생형 또는 변형된 R-스폰딘 푸린 도메인 1을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 작용 모듈은, 예를 들어, R-스폰딘-1, -2, -3, -4, 임의로 인간 R-스폰딘-1, -2, -3 또는 -4 중 임의의 것으로부터의 R-스폰딘 푸린 1 도메인 및 야생형 또는 변형된 R-스폰딘 푸린 2 도메인을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 작용 모듈은, 예를 들어, R-스폰딘-1, -2, -3, -4, 임의로 인간 R-스폰딘-1, -2, -3 또는 -4 중 임의의 것으로부터의 제1 R-스폰딘 푸린 1 도메인 및 제2 야생형 또는 변형된 R-스폰딘 푸린 1 도메인을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 변형된 푸린 도메인 2는, 예를 들어, 완전한 길이의 R-스폰딘 단백질의 맥락에서, 상응하는 야생형 푸린 도메인 2의 결합의 80% 미만, 50% 미만, 20% 미만, 또는 10% 미만인 LGR4-6에 대한 결합 친화도 또는 비슷한 LGR4-6에 대한 결합 친화도를 갖는다.

[0095] 특정한 실시양태에서, 작용 모듈은 ZNRF3 및/또는 RNF43과 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 작용 모듈은 인간 RNF43 (hRNF43, NCBI 참조 서열 XP_011523257.1, 잔기 44-198) 또는 인간 ZNRF3 (hZNRF3; NCBI 참조 서열 NP_001193927.1, 잔기 56-219)과 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 작용 모듈은 나노바디, VH 또는 VL 서열, 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다.

[0096] 특정한 실시양태에서, 표적화 모듈은 간-특이적 표면 분자, 예를 들어 간-특이적 표면 수용체와 특이적으로 결합하며, 또한 예를 들어 자연 리간드, 항체 또는 합성 화학물질일 수 있다. 특정한 실시양태에서, 간-특이적 표면 분자는 간 기관, 간 조직 및/또는 간 세포에서 우선적으로 발현된다. 특정한 실시양태에서, 간-특이적 표면 분자는 하나 이상의 다른 비-표적화된 기관, 조직 또는 세포 유형과 비교 시 간 조직 또는 간 세포에서 증가된 또는 증강된 발현을 갖는다. 특정한 실시양태에서, 간-특이적 표면 분자는 각각 하나 이상의 다른 기관, 조직 또는 세포 유형과 비교 시 간 기관, 간 조직 또는 간 세포의 표면에서 우선적으로 발현된다. 예를 들어, 특정한 실시양태에서, 세포 표면 수용체는 1개 이상, 5개 이상, 다른 모든 기관, 조직 또는 세포, 또는 다른 모든 기관, 조직 또는 세포의 평균 각각에서 발현되는 것보다 간 기관, 조직 또는 세포에서 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 40배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 500배 또는 적어도 1000배 더 높은 수준으로 발현되는 경우 간-특이적 또는 간-특이적 세포 표면 분자로 간주된다. 특정한 실시양태

에서, 간-특이적 또는 간-특이적 세포 표면 분자는 세포 표면 막 내에 위치한 영역 및 표적화 모듈과 결합할 수 있는 세포의 영역을 포함하는 세포 표면 수용체, 예를 들어 폴리펩티드 수용체이다. 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 방법은 간 조직 또는 간 조직을 포함한 조직의 서브세트 상에서만 발견되는 세포 표면 분자를 특이적으로 표적화함으로써, 또는 전부, 대부분 또는 상당수의 다른 조직과 비교 시 간 조직 상에서 더 높은 발현 수준을 갖는, 예를 들어 적어도 2개, 적어도 5개, 적어도 10개 또는 적어도 20개의 다른 조직 상에서보다 간 조직 상에서 더 높은 발현 수준을 갖는 세포 표면 분자를 특이적으로 표적화함으로써 실시될 수 있다.

[0097] 간-특이적 세포 표면 수용체는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 간-특이적 표면 수용체의 예는 ASGR1, ASGR2, TFR2 및 SLC10A1을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 간 전달을 위한 부가의 수용체는 예를 들어 문헌 [Yan et al., *Tumor Biology*, 2015; 36:55-67]에 기재되어 있다.

[0098] 특정 실시양태에서, 표적화 모듈은 ASGR1 및/또는 ASGR2와 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 표적화 모듈은 a) 본원에 제시된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 서열; 및/또는 b) 본원에 제시된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는 상기 CDR 서열 내에 8개 미만 (예를 들어, 7개 미만, 6개 미만, 5개 미만, 4개 미만, 3개 미만 또는 2개 미만)의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 표적화 모듈은 서열식별번호: 34, 35 및 36의 CDR을 포함하는 항체 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 37, 38 및 39의 CDR을 포함하는 항체 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 표적화 모듈은 서열식별번호: 34, 35 및 36의 CDR을 포함하는 항체 중쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 37, 40 및 39의 CDR을 포함하는 항체 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 표적화 모듈은 서열식별번호: 41, 42 및 43의 CDR을 포함하는 항체 경쇄 가변 도메인 및 서열식별번호: 44, 45 및 46의 CDR을 포함하는 항체 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0099] 본원에 사용된 바와 같은, 세포 표면 분자는 하나 이상의 다른 세포 또는 조직 유형, 또는 임의의 다른 세포 또는 조직 유형과 비교 시 더 많은 양의 분자가 간 세포 또는 간 조직에 존재하는 경우 간-특이적이라고 한다. 특정 실시양태에서, 더 많은 양은 하나 이상의 다른 세포 또는 조직 유형, 또는 임의의 다른 세포 또는 조직 유형에서의 양과 비교 시 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 50배, 또는 적어도 100배이다. 예를 들어, 특정한 실시양태에서, 세포 표면 수용체는 1개 이상, 5개 이상, 다른 모든 기관, 조직 또는 세포, 또는 다른 모든 기관, 조직 또는 세포의 평균 각각에서 발견되는 것보다 표적 기관, 조직 또는 세포에서 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 40배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 500배, 또는 적어도 1000배 더 높은 수준으로 발견되는 경우 간-특이적 또는 세포-특이적 세포 표면 분자로 간주된다. 특정 실시양태에서, 간-특이적 또는 세포-특이적 세포 표면 분자는 세포 표면 막 내에 위치한 영역 및 표적화 모듈과 결합할 수 있는 세포의 영역을 포함하는 세포 표면 수용체, 예를 들어 폴리펩티드 수용체이다.

[0100] 특정한 실시양태에서, 표적화 모듈은 간-특이적 표면 분자와 결합한다. 각각의 간-특이적 표면 분자와 결합하는 표적화 모듈은 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 펩티드, 조직- 또는 세포-특이적 수용체의 자연 리간드, 또는 그의 유도체, 및 합성 소분자 동일 수 있지만 이에 제한되지는 않는다.

[0101] 특정 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 특이적 간 세포 유형, 예를 들어 표적 조직과 연합된 특이적 세포 유형과 결합한다. 예를 들어, 간 조직에서, 표적화 모듈은 간세포, 전구체 및 간세포의 줄기 세포, 담도 세포 및/또는 내피 또는 다른 혈관 세포와 결합할 수 있다.

[0102] 아시알로당단백질 수용체 (ASGPR)는 ASGR1 및 ASGR2로 구성된다 (예를 들어, 문헌 [Stockert, Morell and Ashwell, 1991, *Targeted Diagnostics and Therapy* 4: 41-64]에 의해 검토됨). 이러한 수용체는 노출된 말단 갈락토스 또는 N-아세틸갈락토사민 잔기로 당단백질의 세포내이입 및 리소솜 분해를 매개함으로써 혈청 당단백질 항상성에 중요한 역할을 하는 막형단 단백질이다. 따라서, ASGPR의 자연 및 합성 리간드는 갈락토실화된 콜린에스테라제, 갈락토스 (Gal) 및 N-아세틸갈락토사민 (GalNAc), GalNAc 함유 분자, 예컨대 GalNAc-종결 당단백질, 및 모노-, 올리고- 또는 폴리-사카라이드 함유 분자 또는 나노입자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다 (예를 들어 문헌 [D'Souza and Devarajan 2015, *Journal of Controlled Release*, 203:126-139]에 의해 검토됨).

[0103] 다양한 실시양태에서, 간-특이적 표면 분자는 간-특이적 세포 표면 수용체이다. 간의 경우, 이는 ASGR1 및 ASGR2를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정한 실시양태에서, 표적화 모듈은 인간 ASGR1 (hASGR1; NCBI 참조 서열 NP_001662.1, 잔기 62-291), 인간 ASGR2 (hASGR2; NCBI 참조 서열 NP_550436.1, 잔기 66-292), 시노물구스 ASGR1 (cynoASGR1, 서열 ID XP_005582755.1, 잔기 62-291), 또는 시노물구스 ASGR2 (cynoASGR2)와 결합한

다.

[0104] 특정 실시양태에서, 표적화 모듈은 본원에 제시된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 서열; 및/또는 본원에 제시된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는 상기 CDR 서열 내에 8개 미만의 아미노산 치환을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 본원에 개시된, 예를 들어 서열식별번호: 1-24 또는 29 중 어느 하나에 개시된 서열과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 경쇄 가변 영역, 나노바디, 또는 scFv 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 표적화 모듈은 서열식별번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 33, 또는 51 중 어느 하나에 묘사된 가변 중쇄 도메인과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 가변 중쇄 영역을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 표적화 모듈은 서열식별번호: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 18, 19, 21, 23, 25, 또는 27 중 어느 하나에 묘사된 가변 경쇄 도메인과 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 가변 경쇄 영역을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 표적화 모듈은 서열식별번호: 2, 6, 8, 10, 12, 22, 26, 33, 또는 51 중 어느 하나에 묘사된 중쇄와 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 중쇄를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 표적화 모듈은 서열식별번호: 1, 5, 7, 9, 11, 21, 또는 25 중 어느 하나에 묘사된 경쇄와 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 경쇄를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 경쇄 및/또는 중쇄의 불변 영역은 IgG1 또는 IgG2이다.

[0105] 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 융합 단백질, 예를 들어 작용 도메인과 융합된 표적화 도메인의 항체 중쇄 또는 경쇄를 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질의 2개 영역 (예를 들어, 표적화 도메인 영역 및 작용 도메인)은 링커 모이어티를 통해 융합된다. 특정 실시양태에서, 링커는 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산으로 구성된다. 특정한 실시양태에서, 링커는 길이로 1개 내지 최대 약 40개의 아미노산 잔기, 1개 내지 최대 약 20개의 아미노산 잔기, 또는 1개 내지 약 10개의 아미노산 잔기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 링커 내의 아미노산 잔기는 20개의 표준 아미노산으로부터의 것이고, 특정 실시양태에서는 시스테인, 글리신, 알라닌, 프롤린, 아스파라긴, 글루타민 및/또는 세린으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 링커는 하나 이상의 비-자연 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드 링커는 입체적으로 방해되지 않는 대부분의 아미노산, 예컨대 펩티드 결합에 의해 연결된 글리신, 세린 및 알라닌으로 구성된다. 특정 링커는 폴리글리신, 폴리세린 및 폴리알라닌, 또는 이들 중 임의의 것의 조합을 포함한다. 일부 예시적인 펩티드 링커는 폴리(Gly)1-8, 특히 (Gly)3, (Gly)4 (서열식별번호: 55), (Gly)5 (서열식별번호: 56), 및 (Gly)7 (서열식별번호: 57) 뿐만 아니라 폴리(Gly)4 Ser (서열식별번호: 58), 폴리(Gly-Ala)2-4 및 폴리(Ala)1-8이다. 펩티드 링커의 다른 구체적인 예는 (Gly)5Lys (서열식별번호: 59) 및 (Gly)5LysArg (서열식별번호: 60)를 포함한다. 상기 명명법을 설명하기 위해, 예를 들어 (Gly)3Lys(Gly)4는 Gly-Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly (서열식별번호: 61)를 의미한다. Gly와 Ala의 다른 조합이 또한 유용하다. 부가적으로, 펩티드 링커는 또한 비-펩티드 세그먼트, 예컨대 화학식 --CH2--CH2--CH2--CH2--CH2--CH2--의 6 탄소 지방족 분자를 포함할 수 있다. 펩티드 링커는 본원에 기재된 바와 같은 유도체를 형성하기 위해 변경될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 링커는 서열식별번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 20, 22, 24, 26, 또는 28 중 임의의 것에서 확인된 것들 중 임의의 것이다.

[0106] 예시적인 비-펩티드 링커는, 예를 들어, 알킬 링커, 예컨대 --NH--(CH2)_s--C(O)-- (여기서, s=2-20)를 포함한다. 이들 알킬 링커는 임의의 비-입체적 방해 기, 예컨대 저급 알킬 (예를 들어, C1-C6), 저급 아실, 할로젠 (예를 들어, Cl, Br), CN, NH₂, 페닐 등에 의해 추가로 치환될 수 있다. 본 발명의 물질 조성물의 비-펩티드 부분, 예컨대 비-펩티드 링커 또는 비-펩티드 반감기 연장 모이어티는 통상적인 유기 화학 반응에 의해 합성될 수 있다. 결합 도메인 연결에 사용되는 화학 기는 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 카르바메이트; 아미드 (아민 + 카르복실산); 에스테르 (알콜 + 카르복실산), 티오에테르 (할로알칸 + 술폰히드릴; 말레이미드 + 술폰히드릴), 쉬프 염기 (아민 + 알데히드), 우레아 (아민 + 이소시아네이트), 티오우레아 (아민 + 이소티오시아네이트), 술폰아미드 (아민 + 술폰닐 클로라이드), 디술폰; 히드라존, 지질 등을 포함한다.

[0107] 도메인 간의 연결은 선형 또는 분지형, 통상적으로 선형일 수 있는 스페이서, 예를 들어, 알킬 스페이서를 포함할 수 있고, 하나 이상의 불포화 결합을 포함할 수 있으며; 통상적으로 1개 내지 약 300개의 탄소 원자; 보다 통상적으로 약 1개 내지 25개의 탄소 원자를 가지며; 이는 약 3개 내지 12개의 탄소 원자일 수 있다. 이러한 유형의 스페이서는 또한 아민, 에테르, 포스포디에스테르 등을 포함한 작용기 또는 헤테로원자를 포함할 수 있다. 특이적 관심 구조는 (CH₂CH₂O)_n (여기서, n은 1 내지 약 12이다); (CH₂CH₂NH)_n (여기서, n은 1 내지 약 12이다); [(CH₂)_n(C=O)NH(CH₂)_m]_z, (여기서, n 및 m은 1 내지 약 6이고, z는 1 내지 약 10이다);

$[(CH_2)_nOPO_3(CH_2)_m]_z$ (여기서, n 및 m은 1 내지 약 6이고, z는 1 내지 약 10이다)를 포함한다. 그러한 링커는 선형 또는 분지형일 수 있는 폴리에틸렌 글리콜을 포함할 수 있다.

[0108] 특정한 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자, 또는 그의 제약상 허용되는 염은 징크 및 Ring 핑거 3 (ZNR3) 및 Ring 핑거 단백질 43 (RNF43)으로부터 선택된 하나 이상의 막횡단 E3 유비퀴틴 리가제와 특이적으로 결합하는 제1 도메인, 및 아시알로당단백질 수용체 1 (ASGR1) 및/또는 아시알로당단백질 수용체 2 (ASGR2)와 특이적으로 결합하는 제2 도메인을 포함하며, 여기서 (a) 제1 도메인은 Rspo 서열 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하고/거나; (b) 제2 도메인은 (i) 본원에 제시된 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 서열; 및/또는 (ii) 본원에 제시된 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 서열을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 또는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는 상기 CDR 서열 내에 8개 미만의 아미노산 치환을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 이는 서열식별번호: 1-29 중 임의의 것과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열식별번호: 1-46 또는 51 중 임의의 것에서 확인된 CDR 서열, 또는 본원에 개시된 임의의 다른 서열을 포함한다.

[0109] 특정한 세포 표면 폴리펩티드 또는 수용체와 "특이적으로 결합"하거나 또는 그에 "특이적"인 작용 모듈 또는 표적화 모듈, 예를 들어 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프와 실질적으로 결합하지 않고 특정한 폴리펩티드 또는 수용체와 결합하는 것이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 작용 모듈 및 표적화 모듈은 약 4°C, 25°C, 37°C 또는 42°C의 온도에서 측정할 때, 1000 nM 이하, 100 nM 이하, 10 nM 이하, 1 nM 이하, 0.5 nM 이하, 0.1 nM 이하, 0.01 nM 이하, 0.005 nM 이하, 0.001 nM 이하, 또는 0.0005 nM 이하의 해리 상수 (K_d)로 각각 ZNR3/RNF43 또는 간-특이적 세포 표면 분자 (예를 들어, 수용체)와 특이적으로 결합한다. 결합제, 예를 들어 항체의 친화도는 통상적인 기술, 예를 들어 문헌 [Scatchard et al. (Ann. N. Y. Acad. Sci. USA 51:660 (1949))]에 기재된 것들, ELISA 검정, 생물층 간섭계 (BLI) 검정 및 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 검정을 사용하여 쉽게 결정될 수 있다. 항원, 그의 세포 또는 조직에 대한 항체의 결합 특성은 일반적으로, 예를 들어, 면역형광 기반 검정, 예컨대 면역 조직 화학 (IHC) 및/또는 형광 활성화 세포 분류 (FACS)를 포함한 면역검출 방법을 사용하여 결정 및 평가될 수 있다.

[0110] 특정 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 작용 모듈 및/또는 표적화 모듈은 폴리펩티드인 반면, 다른 실시양태에서 간-특이적 Wnt 신호전달 분자의 작용 모듈 및/또는 표적화 모듈은 작은 유기 분자이다. 특정 실시양태에서, 작용 모듈 및 표적화 모듈은 둘 다 폴리펩티드, 예를 들어 항체 또는 그의 항원 결합 단편이다. 특정 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 작용 모듈 및 표적화 모듈은 서로 공유 결합된다. 특정 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 작용 모듈 및 표적화 모듈은 서로 비-공유 결합된다. 특정 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 작용 모듈 및 표적화 모듈은 동일한 융합 단백질 내에 존재한다. 다른 실시양태에서, 작용 모듈은 제1 결합 도메인을 추가로 포함하는 제1 폴리펩티드 내에 존재하고, 표적화 모듈은 제2 결합 도메인을 추가로 포함하는 제2 폴리펩티드 내에 존재하며, 여기서 제1 및 제2 결합 도메인은 서로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 결합 도메인은 동일하거나 그의 변이체, 예컨대 예를 들어, Fc 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 결합 도메인은 서로 상이하다. 특정한 실시양태에서, 본 발명은 참조 분자의 기능적 단편 또는 변이체를 포함하여 본원에 기재된 표적화 모듈 또는 작용 모듈 중 임의의 것의 단편 또는 변이체의 사용을 포함한다.

[0111] 특정 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자 (예를 들어, 융합 단백질)는 R_1 -L- R_2 및 R_2 -L- R_1 로부터 선택된 화학식을 가지며, 여기서 R_1 은 ZNR3/RNF43과 결합하는 작용 모듈이고, R_2 는 간-특이적 세포 표면 수용체와 결합하는 표적화 모듈이고, L은 링커이고, 여기서 L은 부재하거나 존재할 수 있다. 각각의 R_1 및 R_2 는 각각 본원에 기재된 다양한 작용 모듈 및 표적화 모듈 중 임의의 것일 수 있다. 각각의 R_1 및 R_2 는 각각 하나 이상의 E3 리가제 (ZNR3 또는 RNF43), 또는 표적화된 조직 또는 세포와 결합할 수 있는 임의의 모이어티일 수 있다. 예를 들어, 각각의 R_1 및 R_2 는 폴리펩티드 (예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합 단편 또는 항체와 상이한 펩티드 또는 폴리펩티드), 소분자, 및 자연 리간드 또는 그의 변이체, 단편 또는 유도체로부터 선택된 모이어티일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 자연 리간드는 폴리펩티드, 소분자, 이온, 아미노산, 지질 또는 당 분자이다. 작용 모듈 및 표적화 모듈 (즉, R_1 및 R_2)은 서로 동일한 유형의 모이어티일 수 있거나, 또는 상이한 유형의 모이어티일 수 있다. 특정한 실시양태에서, R_2 는 항체 또는 그의 항원-결합 단편이

고, 특정 실시양태에서 R₂는 Fc 단백질 또는 그의 유사체를 포함한다.

- [0112] 특정 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 단일 분자 (예를 들어, 폴리펩티드)를 포함하는 반면, 다른 실시양태에서 Wnt 신호 증강 융합 분자는 서로 결합된, 예를 들어, 서로 비-공유적으로 결합된 2개 이상의 분자 (예를 들어, 폴리펩티드)를 포함한다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 융합체는 각각 화학식 R₃-L₁ 및 R₄-L₂를 갖는 2개의 분자를 포함하며, 여기서 R₃은 작용 모듈이고, R₄는 표적화 모듈이며, 또한 여기서 L₁ 및 L₂ 기는, 예를 들어, 이량체를 형성하기 위해 서로 결합한다. 다양한 실시양태에서, L₁ 및 L₂ 기는 서로 동일하거나 서로 상이하다. L₁ 또는 L₂ 기의 한 가지 예는 Fc 서열, 예를 들어 뮤린 Fc2b 또는 인간 Fc1이며, 이들 각각은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 각각의 R₃ 및 R₄는 각각 본원에 기재된 다양한 작용 모듈 및 표적화 모듈 중 임의의 것일 수 있다. 각각의 R₃ 및 R₄는 각각 하나 이상의 E3 리가제 (ZNR3 및/또는 RNF43), 또는 표적화된 조직 또는 세포와 결합할 수 있는 임의의 모이어티일 수 있다.
- [0113] 특정한 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 하나 이상의 E3 리가제 (ZNR3 및/또는 RNF43)와 결합하는 항체 또는 그의 결합 단편을 포함하며, 여기서 항체 중쇄 및/또는 항체 경쇄는 표적화된 조직 또는 세포와 결합하는 부착된 결합 도메인을 포함한다.
- [0114] 특정한 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 표적화된 조직 또는 세포와 결합하는 항체 또는 그의 하나 이상의 결합 단편을 포함하며, 여기서 항체 중쇄 및/또는 항체 경쇄는 하나 이상의 E3 리가제 (ZNR3 및/또는 RNF43)와 결합하는 부착된 결합 도메인을 포함한다. 부착된 결합 도메인은, 예를 들어, 중쇄 또는 경쇄 융합 단백질로서 항체의 N-말단 또는 C-말단과 직접 융합될 수 있거나, 또는 링커 모이어티를 통해 중쇄 또는 경쇄에, 예를 들어 중쇄 또는 경쇄의 N-말단, C-말단, 또는 내부 아미노산에 부착될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체는 IgG, 예를 들어 IgG1 또는 IgG2이다. 특정 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 2개의 항체 경쇄 및 2개의 항체 중쇄를 포함한 4개의 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 하나 이상의 항체 중쇄 및/또는 항체 경쇄는 하나 이상의 E3 리가제 (ZNR3 및/또는 RNF43)와 결합하는 부착된 결합 도메인, 예컨대 본원에 개시된 Rspo2 변이체를 추가로 포함한다. 특정한 실시양태에서, 부착된 결합 도메인은 링커, 예컨대 본원에 개시된 임의의 것을 통해 항체 중쇄 및/또는 경쇄 (또는 그의 결합 단편) 중 하나 또는 둘 다에 연결된다. 특정 실시양태에서, 2개의 항체 중쇄는 하나 이상의 디설피드 결합을 통해 연결되고, 각각의 항체 경쇄는 하나 이상의 디설피드 결합을 통해 상이한 항체 중쇄에 연결된다. 특정한 실시양태에서, 항체-유사 Wnt 신호 증강 분자 내의 각각의 경쇄는 동일하다. 특정한 실시양태에서, 항체-유사 Wnt 신호 증강 분자 내의 각각의 중쇄는 동일하다. 특정한 실시양태에서, 항체-유사 Wnt 신호 증강 분자 내의 각각의 경쇄는 상이하다. 특정한 실시양태에서, 항체-유사 Wnt 신호 증강 분자 내의 각각의 중쇄는 상이하다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 각각 상이한 간-특이적 세포 표면 분자와 결합하는 2개의 상이한 경쇄 및/또는 2개의 상이한 중쇄를 포함한다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 각각 상이한 E3 리가제와 결합하는 2개의 상이한 경쇄 및/또는 2개의 상이한 중쇄를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 결합 도메인은 중쇄 또는 경쇄에 부착된다. 특정한 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 간-특이적 세포 표면 분자, 예를 들어 ASGR1 또는 ASGR2와 특이적으로 결합하는 항체의 2개의 항체 경쇄 및 2개의 항체 중쇄를 포함하며, 여기서 하나 이상의 E3 리가제 (ZNR3 및/또는 RNF43)와 결합하는 결합 도메인은 2개의 항체 중쇄의 N-말단에 부착된다. 특정한 실시양태에서, 하나 이상의 E3 리가제와 결합하는 결합 도메인은 Rspo 또는 그의 단편 또는 변이체이다. 특정 실시양태에서, Rspo는 서열식별번호: 29-32 또는 서열식별번호: 47-50 중 어느 하나, 또는 그의 단편과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는다. 특정한 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 표 A에 개시된 2개의 중쇄 융합 단백질 및 2개의 경쇄 융합 단백질을 포함하며, 예를 들어 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 1R34-DDNN/RA, 8M24-v1, 1R34-EEST/EE, 1R34-EEST/RA, 1R34-EEAT/EE, 8M24 인간화 1, 8M24 인간화 2, 8M24-EASE-RA, 8M24-EASE-EE, 또는 1R34-DDNN/RA이다.
- [0115] 특정 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자, 또는 그의 제약상 허용되는 염은 징크 및 Ring 핑거 3 (ZNR3) 및 Ring 핑거 단백질 43 (RNF43)으로부터 선택되는 하나 이상의 막횡단 E3 유비퀴틴 리가제와 특이적으로 결합하는 제1 도메인, 및 아시알로당단백질 수용체 1 (ASGR1)과 특이적으로 결합하는 제2 도메인을 포함하며, 여기서;
- [0116] (a) 제1 도메인은 변형된 R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하고;
- [0117] (b) 제2 도메인은 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 서열; 및 CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 서열을 포함하는 변형된 항체 또는

그의 항원-결합 단편을 포함한다.

[0118] 특정한 실시양태에서, 제2 도메인은 2개의 변형된 항체 경쇄 및 2개의 변형된 항체 중쇄를 포함하며, 여기서 제 1 도메인은 각각의 항체 중쇄의 N-말단에 부착된다. 따라서, 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 ASGR1과 결합하는 항체로부터 유래된 2개의 변형된 항체 경쇄 및 2개의 융합 단백질을 포함하며, 각각의 융합 단백질은 임의로 링커 모이어티를 통해 그의 N-말단과 융합된 R-스폰딘 폴리펩티드 (또는 그의 단편)와 함께 ASGR1과 결합하는 항체로부터 유래된 변형된 항체 중쇄를 포함한다. 특정한 실시양태에서, R-스폰딘 폴리펩티드는 변형된 R-스폰딘 폴리펩티드, 예를 들어 야생형 인간 Rspo-2와 비교 시 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 변형된 Rspo-2 폴리펩티드이다.

[0119] 특정 실시양태에서, 변형된 R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체는 인간 R-스폰딘 2의 아미노산 F105 및 F109에 상응하는 위치에서의 아미노산 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서 2개의 아미노산 치환은 (a) F105R, F105A 또는 F105E; 및 (b) F109A 또는 F109E를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 2개의 아미노산 치환은 (a) F105R 및 F109A; (b) F105A 및 F109A; (c) F105E 및 F109A; 또는 (d) F105E 및 F109E이다. 특정 실시양태에서, 변형된 R-스폰딘 폴리펩티드 또는 그의 단편 또는 변이체는 하기 중 임의의 것과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%의 서열 동일성을 갖는다:

NPICKGCLSCSKDNGCSRCQQLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYYGHRAPDMNR

CARCRIENCDSCSKDACTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECVE

(서열식별번호: 29);

NPICKGCLSCSKDNGCSRCQQLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYYGHRAPDMNR

CARCRIENCDSASKDACTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECVE

(서열식별번호: 30);

NPICKGCLSCSKDNGCSRCQQLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYYGHRAPDMNR

CARCRIENCDSCSKDACTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECVE

(서열식별번호: 31); 또는

NPICKGCLSCSKDNGCSRCQQLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYYGHRAPDMNR

CARCRIENCDSCSKDECTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECVE

(서열식별번호: 32).

[0120]

[0121] 특정한 실시양태에서, ASGR1과 결합하는 항체로부터 유래된 변형된 항체 중쇄는 본원에 개시된 것들 중 임의의 것을 포함한다, 링커 모이어티를 통해 변형된 R-스폰딘 폴리펩티드와 융합된다. 특정한 실시양태에서, 링커 모이어티는 하기 서열: GGGGSGGGGSGGGGS (서열식별번호: 62)을 포함하거나 갖는 펩티딜 링커이다.

[0122] 특정한 실시양태에서, 변형된 중쇄 가변 영역은 서열식별번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 33, 또는 51 중 어느 하나와 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 변형된 경쇄 가변 영역은 서열식별번호: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 17, 18, 19, 21, 23, 25, 또는 27 중 어느 하나와 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 아미노산 변형, 예를 들어 삽입, 결실 또는 치환은 CDR 내에 존재하지 않는다. 특정한 실시양태에서, 아미노산 변형은 (a) F105R, F105A 또는 F105E; 및/또는 (b) F109A 또는 F109E 중 어느 것에서도 발생하지 않는다.

[0123] 특정한 실시양태에서, 변형된 중쇄는 서열식별번호: 2, 6, 8, 10, 12, 22, 26, 또는 33 중 어느 하나와 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 중쇄 서열 또는 중쇄 가변 도메인 서열 (예를 들어, RSP02 및 링커 서열 부재)을 포함하는 그의 단편을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 변형된 경쇄는 서열식별번호: 1, 5, 7, 9, 11, 21, 또는 25 중 어느 하나와 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 아미노산 변형, 예를 들어 삽입, 결실 또는 치환은 CDR 내에 존재하지 않는다. 특정한 실시양태에서, 아미노산 변형은 (a) F105R, F105A 또는 F105E; 및/또는 (b) F109A 또는 F109E 중 어느 것에서도 발생하지 않는다. 특정한 실시양태에서, 중쇄의 변이체는 N297G를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 변이체에 존재하는 RPOS2 서열은 F105R 및 F109A 치환을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 변이체에 존재하는 RPOS2 서열은 F105E 및 F109E 치환을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 분자는 하기 구축물: EEST/EE, EEST/RA, EEAT/EE, EESN/RA, EEAN/RA, 8M24-EAASE-RA, 또는 8M24-EASE-EE 중 임의의 것에 대한 모체 또는 야생형과 비교 시 아미노산 치환을 포함한다.

[0124] 특정한 실시양태에서, 2개의 융합 폴리펩티드는 각각 서열식별번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 20,

22, 24, 26, 28, 33, 또는 51 중 어느 하나와 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.

[0125] 특정 실시양태에서, 변형된 중쇄 및 변형된 경쇄 서열은 하기 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하는 항-ASGR1 항체로부터 유래되거나 또는 하기 중쇄 및 경쇄 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일성을 갖는다 (CDR에 밑줄 표시되어 제시됨).

[0126] 경쇄:

SSELTQDPAVSVVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGI
PDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSLERIGYLSYVFGGGTKLTVLGQPKA
APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN
NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (서열식별번호: 1); 및

[0127]

[0128] 중쇄:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAIISGSGG
STYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFSSRRWYLEYWG
QGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHFTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
THTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(서열식별번호: 33).

[0130] 특정한 실시양태에서, 경쇄는 D25, N51, 및 N88로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서의 아미노산 치환을 포함한다 (상기에 볼드체로 표시됨). 특정한 실시양태에서, 3개의 위치 모두가 치환된다. 특정한 실시양태에서, D25는 E로 치환된다. 특정한 실시양태에서, N51은 S 또는 A로 치환된다. 특정한 실시양태에서, N88은 T로 치환된다. 한 실시양태에서, D25는 E로 치환되고, N51은 S로 치환되고, N88은 T로 치환된다 (EST). 한 실시양태에서, D25는 E로 치환되고, N51은 A로 치환되고, N88은 T로 치환된다 (EAT). 특정한 실시양태에서, 본원에 개시된 Wnt 신호 증강 분자 중 임의의 것은 서열식별번호: 1의 가변 도메인과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 임의로 상기 개시된 치환 중 임의의 것을 포함하여 D25, N51 및 N88로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서의 아미노산 치환을 추가로 포함한다.

[0131] 특정한 실시양태에서, 중쇄는 D62에서의 아미노산 치환을 포함한다 (상기에 볼드체로 표시됨). 특정한 실시양태에서, D62는 E로 치환된다 (E). 특정한 실시양태에서, 본원에 개시된 Wnt 신호 증강 분자 중 임의의 것은 서열식별번호: 33의 가변 도메인과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하며, 임의로 상기 개시된 치환 중 임의의 것을 포함하여, D62에서의 아미노산 치환을 추가로 포함한다.

[0132] 특정한 실시양태에서, 분자의 변형된 항체 부분 (또는 그의 가변 도메인)은 하기 아미노산 치환의 조합을 포함한다: (a) 중쇄에서, D62가 E로 치환되는 것; 및 (b) 경쇄에서, D25가 E로 치환되고, N51이 S로 치환되고, N88이 T로 치환되는 것 (EEST). 특정한 실시양태에서, 분자의 변형된 항체 부분 (또는 그의 가변 도메인)은 하기 아미노산 치환의 조합을 포함한다: (a) 중쇄에서, D62가 E로 치환되는 것; 및 (b) 경쇄에서, D25가 E로 치환되고, N51이 A로 치환되고, N88이 T로 치환되는 것 (EEAT).

[0133] 따라서, 특정 실시양태에서, 분자의 변형된 항-ASGR1 항체 부분은 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 서열의 하기 조합 중 임의의 것을 포함한다:

[0134] (a) 각각 SYAMS (서열식별번호: 34), AISGSGGSTYYEDSVKG (서열식별번호: 35), DFSSRRWYLEY (서열식별번호: 36), QGESLRSYYAS (서열식별번호: 37), YGKSNRPS (서열식별번호: 38), 및 CTSLERIGYLSYV (서열식별번호: 39); 또는

[0135] (b) 각각 SYAMS (서열식별번호: 34), AISGSGGSTYYEDSVKG (서열식별번호: 35), DFSSRRWYLEY (서열식별번호: 36), QGESLRSYYAS (서열식별번호: 37), YGKANRPS (서열식별번호: 40), 및 CTSLERIGYLSYV (서열식별번호: 39).

[0136] 특정 실시양태에서, 분자의 변형된 항-ASGR1 항체 부분은 모 서열의 맥락에서 CDR의 이들 조합 중 임의의 것을

포함하는 VH 및 VL 도메인, 또는 이러한 VH 및 VL 도메인과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 본원에 개시된 변이체 중 임의의 것은 그들의 CDR 서열 내에 임의의 부가의 아미노산 변형을 포함하지 않는다 (본원에 기재된 것들 이외의 것).

[0137] 특정한 실시양태에서, 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 1, 5, 7, 9, 11, 21, 25 중 어느 하나와 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함한다.

[0138] 특정 실시양태에서, 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 1과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열 또는 그의 가변 영역을 포함하고, 2개의 융합 폴리펩티드는 각각 서열식별번호: 2와 적어도 95% 동일성을 갖는 서열 또는 그의 가변 영역을 포함한다.

[0139] 특정 실시양태에서, 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 7과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열 또는 그의 가변 영역을 포함하고, 2개의 융합 폴리펩티드는 각각 서열식별번호: 8과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열 또는 그의 가변 영역을 포함한다.

[0140] 특정 실시양태에서, 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 7과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열 또는 그의 가변 영역을 포함하고, 2개의 융합 폴리펩티드는 각각 서열식별번호: 10과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열 또는 그의 가변 영역을 포함한다.

[0141] 특정 실시양태에서, 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드는 서열식별번호: 11과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열 또는 그의 가변 영역을 포함하고, 2개의 융합 폴리펩티드는 각각 서열식별번호: 12와 적어도 95% 동일성을 갖는 서열 또는 그의 가변 영역을 포함한다.

[0142] 특정한 실시양태에서, 2개의 융합 폴리펩티드는 각각 서열식별번호: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 22, 24, 26, 28, 33, 또는 51 중 어느 하나와 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함한다.

[0143] 특정 실시양태에서, 변형된 중쇄 및 변형된 경쇄 서열은 하기 중쇄 및 경쇄 서열을 포함하는 8M24 항-ASGR1 항체로부터 유래되거나, 또는 하기 중쇄 및 경쇄 서열과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일성을 갖는다 (CDR에 밑줄 표시되어 제시됨):

[0144] 경쇄:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRISENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAAILADGV
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQHF~~WGTP~~FTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTL
SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열식별번호: 5)

[0145]

[0146] 중쇄:

EVQLVQSGAEVKKPKGSSVKVSCKASGYTFTNYGINWVRQAPGQGLEWMGEIFPRSD
N~~TFYAQK~~FQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARKGRDYGTSHYFDYW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD
KTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(서열식별번호: 51).

[0147]

[0148] 특정한 실시양태에서, 경쇄는 아미노산 위치 D56에서의 아미노산 치환을 포함한다 (상기에 볼드체로 표시됨). 특정 실시양태에서, D56은 E, S 또는 A로 치환된다. 특정한 실시양태에서, D56은 E로 치환된다 (E). 특정한 실시양태에서, 본원에 개시된 Wnt 신호 증강 분자 중 임의의 것은 서열식별번호: 5의 가변 도메인과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하며, 임의로 상기 개시된 치환 중 임의의 것을 포함하여, D56에서의 아미노산 치환을 추가로 포함한다.

[0149] 특정한 실시양태에서, 중쇄는 N31, N57 또는 D102로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서의 아미노산 치

환을 포함한다 (상기에 볼드체로 표시됨). 특정한 실시양태에서, 3개 위치 모두가 치환된다. 특정 실시양태에서, N31은 A 또는 Q로 치환된다. 특정 실시양태에서, N57은 S, A 또는 N으로 치환된다. 특정 실시양태에서, D102는 E, S 또는 A로 치환된다. 한 실시양태에서, N31은 A로 치환되고, N57은 S로 치환되고, D102는 E로 치환된다 (ASE). 특정한 실시양태에서, N31은 A로 치환되고, N57은 S로 치환되고, D102는 E로 치환되고, D110은 치환되지 않는다 (ASED). 특정한 실시양태에서, 본원에 개시된 Wnt 신호 증강 분자 중 임의의 것은 서열식별번호: 20, 22, 또는 51 중 어느 하나의 가변 도메인과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하고, 임의로 상기 개시된 치환 중 임의의 것을 포함하여, N31, N57, 또는 D102로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 위치에서의 아미노산 치환을 추가로 포함한다.

[0150] 특정한 실시양태에서, 분자의 변형된 항체 부분은 하기 아미노산 치환의 조합을 포함한다: (a) 경쇄에서, D56이 E로 치환되는 것; 및 (b) 중쇄에서, N31이 A로 치환되고, N57이 S로 치환되고, D102가 E로 치환되고, D110이 치환되지 않는 것 (EASE).

[0151] 따라서, 특정 실시양태에서, 분자의 변형된 항-ASGR1 항체 부분은 CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 서열의 하기 조합을 포함한다:

[0152] (c) 각각 RISENIYSNLA (서열식별번호: 41), AAINLAE (서열식별번호: 42), QHFWGTPFT (서열식별번호: 43), AYGIN (서열식별번호: 44), EIFPRSDSTFYNEKFKG (서열식별번호: 45), 및 KGREYGTSHYFDY (서열식별번호: 46).

[0153] 특정 실시양태에서, 분자의 변형된 항-ASGR1 항체 부분은 모 서열의 맥락에서 CDR의 이들 조합 중 임의의 것을 포함하는 VH 및 VL 도메인, 또는 VH 또는 VL 도메인과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 그의 변이체를 포함한다. 특정한 실시양태에서, 변이체는 그들의 CDR 서열에 임의의 부가의 아미노산 변형을 포함하지 않는다 (본원에 기재된 것들 이외의 것).

[0154] 특정 실시양태에서, 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드 또는 그의 가변 도메인은 서열식별번호: 3, 5, 14, 17, 18, 19, 21, 또는 25 중 어느 하나와 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 2개의 융합 폴리펩티드, 또는 항체 중쇄 폴리펩티드 또는 그의 가변 도메인은 각각 서열식별번호: 4, 6, 13, 15, 16, 20, 22, 또는 26 중 어느 하나와 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 2개의 항체 경쇄 폴리펩티드는 각각 서열식별번호: 25와 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함하고, 2개의 융합 폴리펩티드는 각각 서열식별번호: 26과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열, 또는 그의 가변 영역을 포함한다.

[0155] 특정 실시양태에서, 경쇄 폴리펩티드는 하기 서열을 포함하며:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRISENIYSNLAWYQQKPKGKAPKLLIYAAINLAEGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQHFWGTPFTFGQGKLEIK (서열식별번호:

25),

[0156]

[0157] 여기서 CDR 서열에는 밑줄 표시되어 있으며; 특정 실시양태에서, 중쇄 융합 폴리펩티드는 하기 서열을 포함한다:

*NPICKGCLSCSKDNGCSRCQOKLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAPDMNRCAR
CRIENCDSR**SKDA**CTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECV**EGGGGSGGGG**
**SGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTAYGINWVRQAPGQGLEWM
GEIFPRSDSTFYAOKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARK**GREYGT**
SHYFDYWGQGTTVTSS (서열식별번호: 26),***

[0158]

[0159] 여기서 Rspo2 도메인은 이탤릭체이고, 링커는 볼드체로 표시되어 있고, CDR 서열에는 밑줄 표시되어 있다. 관련 실시양태에서, 볼드체로 표시된 R 및 A는 E 및 E로 대체된다.

[0160] Wnt 신호 증강 분자는 작용 모듈과 표적화 모듈의 다양한 조합을 포함할 수 있는 것으로 이해된다. 따라서, 변이체 항-ASGR1 항체 서열 중 임의의 것 (또는 그의 단편)은 본원에 개시된 임의의 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 다른 작용 모듈과 조합될 수 있다.

[0161] 본 개시내용은 본원에 개시된 경쇄 또는 융합 폴리펩티드 중 임의의 것을 포함하는 폴리펩티드, 및 본원에 개시된 경쇄 또는 융합 폴리펩티드 중 임의의 것과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 폴리펩티드 뿐만 아니라 그의 기능적 또는 결합 단편,

예를 들어, VH 또는 VL 도메인을 추가로 제공한다. 통상의 기술자는 서열 표에 제공된 정보를 기초로 하고 이들 서열을 본원에 개시된 다른 것과 비교함으로써 본원에 개시된 폴리펩티드 중 임의의 것의 경쇄 영역을 쉽게 결정할 수 있다.

[0162] 특정 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자 (예를 들어, 융합 단백질)는 융합 단백질과 접촉된 간 조직 또는 간 세포에서 Wnt 신호전달을 증가시킨다. 특정한 실시양태에서, 간 조직 또는 간 세포에서의 Wnt 신호전달은 적어도 50%, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 또는 적어도 10배만큼 증가된다.

[0163] 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 관련 기술분야에 공지되고 이용가능한 유기 합성 및 분자 생물학의 표준 방법에 의해 생산될 수 있다. 예를 들어, 간-특이적 Wnt 신호 증강 융합 단백질은 표적화 모듈 (예를 들어, ASGR1 또는 ASGR2와 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편)을 작용 모듈 (예를 들어, 아미노산 잔기 N37-R95에 상응하는 인간 R-스폰딘 2 푸린 도메인 1 단독, 또는 인간 R-스폰딘 2 푸린 도메인 1에 이어 푸린 도메인 2, 여기서 LGR 단백질과의 푸린 도메인 2 상호작용은 점 돌연변이, 예를 들어, F105A 및 F109A에 의해 단독으로 또는 조합하여 제거되거나 손상된다)과 융합함으로써 생성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 표적화 모듈과 작용 모듈은 링커, 예를 들어 글리신-세린 링커에 의해 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 N-말단에 위치한 어느 하나의 도메인과 융합된다. 특정 실시양태에서, 표적화 모듈과 작용 모듈은 단백질 링커 (예를 들어, 알부민)에 의해 융합된다. 표적화 모듈을 작용 모듈과 "융합"시키는 부가의 방식은, 예를 들어, "놓-인-홀" 또는 류신 지퍼 매개 이량체화를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 표적화 모듈, 작용 모듈 (및 임의로, 링커)을 코딩하는 DNA 서열은 원하는 융합 단백질을 코딩하도록 유전적으로 조작될 수 있다.

[0164] 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자 및 그의 도메인 (예를 들어, 융합 분자, 항체 중쇄 및 경쇄)의 경우, 융합 단백질의 상이한 부분을 코딩하는 DNA 서열은 표준 분자 클로닝 기술을 사용하여 박테리아 또는 진핵 발현 벡터 내로 삽입되고, 적절한 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 발현된 단백질은 단백질 과학에서의 표준 기술, 예컨대 친화도, 이온 교환 및 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 균질하게 정제될 수 있다. 본 개시내용은 또한, 본원에 기재된 작용 모듈, 표적화 모듈, 또는 융합 단백질과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 폴리펩티드 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하여, 본원에 기재된 폴리펩티드 작용 모듈, 표적화 모듈, 및 융합 단백질 중 임의의 것의 기능적 단편 및 변이체를 포함한다. 이러한 변이체는 본원에 개시된 서열 중 임의의 것과 비교 시 하나 이상의 아미노산 변형, 예를 들어 하나 이상의 아미노산 결실, 삽입 또는 치환을 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 융합 단백질의 기능적 단편 및 변이체는 이들이 유래된 간-특이적 Wnt 신호 증강 융합 단백질과 비교 시 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 100% 이상의 Wnt 신호 증강 활성을 갖는다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드 작용 모듈의 기능적 단편 및 변이체는 이들이 유래된 작용 모듈과 비교 시 (전체 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 맥락에서 측정될 때) 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 100% 이상의 Wnt 신호 증강 활성을 갖는다. 특정 실시양태에서, 표적화 모듈의 기능적 단편 및 변이체는 이들이 유래된 표적화 모듈과 비교 시 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 100% 이상의 결합 활성을 갖는다.

[0165] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 하나 이상의 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자 또는 그의 성분, 예를 들어, 그의 단백질, 융합 단백질 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 핵산 서열, 및 발현 벡터를 포함한, 이들 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터, 및 이들 벡터를 포함하는 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 또는 핵산 서열은 DNA 또는 RNA이다. 특정한 실시양태에서, RNA는 메신저 RNA (mRNA)이다. 특정 실시양태에서, RNA는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 변형된 mRNA이다. 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 변형된 mRNA는 안정성 증가, 더 높은 발현 수준 및 감소된 면역원성을 포함하여, 비변형된 mRNA에 비해 이점을 갖는 것으로 기재되었다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 변형된 mRNA의 비-제한적 예는, 예를 들어, PCT 특허 출원 공개 번호 WO2011/130624, WO2012/138453, WO2013052523, WO2013151666, WO2013/071047, WO2013/078199, WO2012045075, WO2014081507, WO2014093924, WO2014164253, 미국 특허 번호: US 8,278,036 (슈도우리딘을 포함하는 변형된 mRNA를 기재함), US 8,691,966 (슈도우리딘 및/또는 N1-메틸슈도우리딘을 포함하는 변형된 mRNA를 기재함), US 8,835,108 (5-메틸시티딘을 포함하는 변형된 mRNA를 기재함), US 8,748,089 (슈도우리딘 또는 1-메틸슈도우리딘을 포함하는 변형된 mRNA를 기재함)에 기재되어 있다. 특정한 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 폴리펩티드를 코딩하는 변형된 mRNA 서열은 비변형된 A, G, U 또는 C 리보뉴클레오티드와 비교 시 적어도 하나의 변형을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 적어도 하나의 변형된 뉴클

레오시드는 N1-메틸슈도우리딘 및/또는 5-메틸시티딘을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 변형된 mRNA는 5' 말단 캡 서열, 이어서 간-특이적 Wnt 신호 증강 폴리펩티드를 코딩하는 서열, 이어서 3' 테일링 서열, 예컨대 폴리A 또는 폴리A-G 서열을 포함한다.

[0166] 특정한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 벡터, 예를 들어, 발현 벡터이고, 발현 벡터는 프로모터 서열, 예를 들어 세포에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 구동하는 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된, 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 융합 분자 (예를 들어, 융합 단백질 또는 부착된 항체의 하나 또는 둘 다의쇄)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어 간-특이적 Wnt 신호 증강 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 또는 RNA 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스이다. 특정한 실시양태에서, 발현 카세트는 5' 및/또는 3' 세포 또는 바이러스 UTR 또는 그의 유도체를 포함한다.

[0167] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드와 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 폴리뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하여, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드의 기능적 단편 및 변이체를 포함한다. 이러한 변이체는 본원에 개시된 서열 중 임의의 것과 비교 시 하나 이상의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 변형, 예를 들어 하나 이상의 뉴클레오티드 결실, 삽입 또는 치환을 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 숙주 세포에서 코딩된 폴리펩티드의 발현을 증강시키기 위해 코돈-최적화된다. 특정한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 변이체는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드를 포함한다.

[0168] 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자, 예를 들어 융합 단백질, 또는 그의 일부분 또는 도메인을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포는 숙주 세포, 예컨대 예를 들어, 간-특이적 Wnt 신호 증강 융합 단백질을 생산하기 위해 사용될 수 있는 HEK293 세포이다. 대상 조성물을 제조하는데 있어서, 예를 들어 포유동물 세포 (예를 들어, 293 세포), 곤충 세포 (예를 들어, SF9 세포), 미생물 및 효모를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 숙주 세포가 이용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포는 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 폴리펩티드로 치료된 대상체에 대해 이종 또는 자가이다. 특정한 실시양태에서, 세포는 대상체로부터 수득되었고, 본원에 기재된 바이러스 벡터로 형질 도입되었다. 특정한 실시양태에서, 형질도입된 세포는 치료를 위해 대상체에게 전달된다.

[0169] 본 개시내용은 또한 하나 이상의 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자 (예를 들어, 융합 단백질 또는 항체-기반 구축물), 또는 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자 또는 그의 일부분을 코딩하는 서열을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.

[0170] Wnt 신호전달은 관련 기술분야에 공지되고 이용가능한 기술 및 검정을 사용하여 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호전달에서의 증가는 표적 조직 또는 세포 유형에 상응하는 세포주를 사용하여 결정된다. 특정한 실시양태에서, 세포주는 Wnt 신호-반응성 프로모터의 제어 하에 마커 유전자 (예를 들어, 루시페라제 유전자)를 갖는 리포터 플라스미드를 함유한다. Wnt3a, Wnt3a 조건부 배지, Wnt3a의 재조합 공급원, 또는 Wnt 모방 효능계에 반응하는 세포의 증강된 리포터 활성은 음성 대조군으로서 푸린 도메인 1 단독 (또는 F105A 및/또는 F109A 점 돌연변이를 수반한, 푸린 도메인 2와 함께) 또는 양성 대조군으로서 기능적 R-스폰딘 (완전한 길이 또는 푸린 도메인 1 및 2)을 부가함으로써 결정될 수 있다. 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자에 반응하는 리포터 활성은 또한 리포터 세포주를 조직 특이적 Wnt 신호 증강 분자와 접촉시킴으로써 결정될 수 있다. 음성 대조군은 리포터 활성에 대해 실질적으로, 상당히 또는 완전히 음성일 수 있으며, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자 및 양성 대조군은 리포터 활성에서의 증가에 따라 Wnt 신호전달 반응의 증가를 나타내야 한다. 부가의 대조군은 항-ASGR1 항체 단독 (음성), 항-GFP 항체가 항-ASGR1 항체 대신 사용되는 융합 단백질 (음성), 및 무손상 푸린 도메인 1-푸린 도메인 2 단백질 (양성)을 포함할 수 있다. 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 조직 특이성은 표적화된 것이 아닌 세포 유형 또는 조직에서 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 사용한 처리에 대한 반응으로 리포터 활성을 유사하게 측정함으로써 결정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 리포터 활성은 비-표적화된 조직과 비교 시 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자에 의해 결합된 표적화된 조직에서 더 높으며, 예를 들어, 적어도 50%, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 또는 적어도 10배 더 높다.

[0171] 특정한 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 폴리펩티드는 본원에 기재된 작용 모듈과 표적화 모듈 중 임의의 것의 임의의 조합을 포함한다, 작용 모듈과 표적화 모듈의 임의의 조합을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 이들은 링커, 예를 들어, 알부민 (예를 들어, 인간 혈청 알부민), 펩티딜 링커, 또는 비-펩티딜 링커에 의해 연결되며, 여기서 표적화 및 작용 모듈은 링커의 N- 및 C-말단 상에 있으며, 예를 들어, Fc 또는 알부민, 펩티딜 링

커, 또는 비-펩티딜 링커이다.

[0172] 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 또한 관련 기술분야에 공지된 바와 같이 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), Fc, 알부민 등과 같은 모이어티에 연결되어 생체내 안정성을 증강시킬 수 있다.

[0173] 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 한 가지 예는 Wnt 신호전달을 증강시킬 수 있는 능력이 감소된 R-스폰딘 (예를 들어, 인간 R-스폰딘 2)의 변이체 또는 단편을 포함하는 작용 모듈 및 ASGR1, ASGR2, TFR2 또는 SLC10A1과 특이적으로 결합하는 표적화 모듈을 포함하는 Wnt 신호 증강 폴리펩티드이며, 여기서 조직 특이적 Wnt 신호 증강 폴리펩티드는 간 조직에서의 Wnt 신호전달을 증가시키고 간 조직의 질환 또는 병태를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0174] 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 예시적이고 비-제한적인 예는 침부된 실시예 및 서열에 기재된 것들을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는, 예를 들어, 부착된 IgG 또는 항체 포맷으로 본원에 개시된 2개 이상의 폴리펩티드 서열을 포함한다. 본원에 개시된 폴리펩티드는 본원에 제시된 서열 중 임의의 것과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열 및 그의 단편 및 변이체를 포함하거나 이로 이루어진 폴리펩티드를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정한 실시양태에서, 폴리펩티드는 본원에 제시된 서열 중 임의의 것 내에 존재하는 작용 모듈 또는 표적화 모듈, 및 그의 단편 및 변이체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 작용 모듈 및/또는 표적화 모듈로서의 활성을 갖는다.

[0175] 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드의 예시적이고 비-제한적인 예는 상기 기재된 것들을 포함하여, 본원에 기재된 폴리펩티드, 변이체 및 단편 중 임의의 것을 코딩하는 임의의 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 기능적 도메인 및/또는 표적화 모듈로서의 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩한다.

[0176] **제약 조성물**

[0177] 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자 또는 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및 하나 이상의 제약상 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물이 또한 개시된다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나, 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하며, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자이다.

[0178] 추가 실시양태에서, 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자 또는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 하나 이상의 제약상 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물이 또한 개시된다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 mRNA, 예를 들어 변형된 mRNA이다. 특정한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 5' 캡 서열 및/또는 3' 테일링 서열, 예를 들어 폴리A 테일을 추가로 포함하는 변형된 mRNA이다. 다른 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 코딩 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트이다.

[0179] 추가 실시양태에서, 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자 또는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터 및 하나 이상의 제약상 허용되는 희석제, 담체, 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물이 또한 개시된다.

[0180] 본 발명은 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자 또는 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 코딩하는 핵산에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 포함하는 세포 및 하나 이상의 제약상 허용되는 희석제, 담체, 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 추가로 고려한다. 특정한 실시양태에서, 세포는 이종 세포이거나 또는 치료될 대상체로부터 획득된 자가 세포이다. 특정한 실시양태에서, 세포는 줄기 세포, 예를 들어 지방-유래 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포이다.

[0181] 대상 분자는 일반적으로 안전하고 무독성이며 바람직하고, 포유동물, 예를 들어 인간 또는 영장류 사용에 허용되는 부형제를 포함하는 제형을 제조하는데 유용한 제약상 허용되는 담체, 희석제 및 시약과 조합될 수 있다. 그러한 부형제는 고체, 액체, 반고체, 또는 에어로졸 조성물의 경우 기체일 수 있다. 그러한 담체 또는 희석제의 예는 물, 식염수, 링거액, 텍스트로스 용액 및 5% 인간 혈청 알부민을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 보조 활성 화합물이 또한 제형에 혼입될 수 있다. 제형에 사용되는 용액 또는 현탁액은 멸균 희석제, 예컨대 주사용 수, 식염수, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 기타 합성 용매; 항박테리아 화합물, 예컨대 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 아황산수소나트륨; 킬레이트 화합물, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA); 완충제, 예컨대 아세트이트, 시트레이트 또는 인산염; 응집을 방지하기 위한 세정제, 예컨대 트윈(Tween) 20; 및 강장성 조절을 위한 화합물, 예컨대 염화나트륨 또는

텍스트로스를 포함할 수 있다. pH는 산 또는 염기, 예컨대 염산 또는 수산화나트륨으로 조정할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 제약 조성물은 무균이다.

- [0182] 제약 조성물은 멸균 수용액 또는 분산액, 및 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 추가로 포함할 수 있다. 정맥내 투여를 위해 적합한 담체는 생리 식염수, 정균수 또는 인산염 완충 식염수 (PBS)를 포함한다. 일부 경우에, 조성물은 무균 상태이고 주사기 사용이 용이하게 가능할 수 있는 유동적 상태를 가져야 한다. 특정 실시양태에서, 이는 제조 및 저장 조건 하에서 안정적이고 미생물, 예컨대 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대항하여 보존된다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액상 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적당한 유동성은, 예를 들어, 코팅제, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 내부 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 야기될 수 있다.
- [0183] 멸균 용액은 필요에 따라 상기 열거된 성분들 중 하나 또는 그의 조합과 함께 적절한 용매에 필요한 양의 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 혼입한 다음, 여과 멸균시킴으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터의 필요한 기타 성분을 함유하는 멸균 비히클에 활성 화합물을 혼입함으로써 제조된다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 사전에 멸균-여과된 그의 용액으로부터 임의의 부가의 원하는 성분을 더한 활성 성분의 분말을 생성하는 동결 건조 및 진공 건조이다.
- [0184] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 용합 단백질이 신체로부터 급속히 제거되는 것을 방지하게 될 담체와 함께 제조되며, 예컨대 체내 이식물 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함한 제어 방출 제형으로 제조된다. 생분해성의 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르소에스테르 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 재료는 또한 상업적으로 수득될 수 있다. 리포솜 현탁액은 또한 제약상 허용되는 담체로서 사용될 수 있다. 이들은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0185] 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 제약 조성물을 제형화하는 것이 유리할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 투여 단위 형태는 치료될 대상체에 대한 단일 투여량으로서 적합한 물리적으로 별개의 단위를 지칭하며; 각각의 단위는 필요한 제약 담체와 연합하여 원하는 치료 효과를 초래하도록 계산된 활성 화합물의 미리 결정된 양을 함유한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 사양은 활성 화합물의 고유한 특징 및 달성될 특정한 치료 효과, 및 개체의 치료를 위해 그러한 활성 화합물을 배합하는 기술분야에 내재된 한계 사항에 의해 지시되고 이에 직접적으로 의존한다.
- [0186] 제약 조성물은 투여 지침서와 함께, 용기, 팩 또는 분배기, 예를 들어 주사기, 예를 들어 미리 채워진 주사기에 포함될 수 있다.
- [0187] 본 발명의 제약 조성물은 임의의 제약상 허용되는 염, 에스테르, 또는 이러한 에스테르의 염, 또는 인간을 포함하는 동물에게 투여 시 생물학적으로 활성인 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 (직접 또는 간접적으로) 제공할 수 있는 임의의 다른 화합물을 포괄한다.
- [0188] 본 발명은 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 제약상 허용되는 염을 포함한다. 용어 "제약상 허용되는 염"은 본 발명의 화합물의 생리학상 및 제약상 허용되는 염, 즉 모 화합물의 원하는 생물학적 활성을 유지하고 이에 바람직하지 않은 독성 효과를 부여하지 않는 염을 지칭한다. 다양한 제약상 허용되는 염이 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 또한 예를 들어 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences", 17th edition, Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, USA, 1985 (및 그의 최신판), the "Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology", 3rd edition, James Swarbrick (Ed.), Informa Healthcare USA (Inc.), NY, USA, 2007, and J. Pharm. Sci. 66: 2 (1977)]에 기재되어 있다. 또한, 적합한 염에 대한 고찰을 위해, 문헌 ["Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, 2002)]을 참조한다.
- [0189] 제약상 허용되는 염기 부가 염은 금속 또는 아민, 예컨대 알칼리 금속 및 알칼리 토금속 또는 유기 아민과 함께 형성된다. 양이온으로서 사용된 금속은 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등을 포함한다. 아민은 N-N'-디벤질에

틸렌디아민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 디시클로헥실아민, 에틸렌디아민, N-메틸글루카민 및 프로카인을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Berge et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharma Sci., 1977, 66, 119] 참조). 상기 산성 화합물의 염기 부가 염은 유리 산 형태를 충분한 양의 원하는 염기와 접촉시켜 통상적인 방식으로 염을 생산함으로써 제조된다. 유리 산 형태는 염 형태를 산과 접촉시키고 통상적인 방식으로 유리 산을 단리함으로써 재생될 수 있다. 유리 산 형태는 특정 물리적 특성, 예컨대 극성 용매 중의 용해도에 있어서 각각의 염 형태와 다소 상이하지만, 그 외에는 염이 본 발명의 목적을 위해 각각의 유리 산과 동등하다.

[0190] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 제약 조성물은 제약상 허용되는 담체, 희석제 및/또는 부형제, 예를 들어 식염수, 인산염 완충 식염수, 인산염 및 아미노산, 중합체, 폴리올, 당, 완충제, 보존제 및 기타 단백질과 혼합하여, 본원에 기재된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 치료상 유효량을 포함한다. 예시적인 아미노산, 중합체 및 당 등은 옥틸페녹시 폴리에톡시 에탄올 화합물, 폴리에틸렌 글리콜 모노스테아레이트 화합물, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 수크로스, 프룩토스, 텍스트로스, 말토스, 글루코스, 만니톨, 텍스트란, 소르비톨, 이노시톨, 갈락티톨, 크실리톨, 락토스, 트레할로스, 소 또는 인간 혈청 알부민, 시트레이트, 아세테이트, 링거액 및 한스 용액, 시스템인, 아르기닌, 카르니틴, 알라닌, 글리신, 리신, 발린, 류신, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌 및 글리콜이다. 바람직하게, 이러한 제형은 4°C에서 적어도 6개월 동안 안정적이다.

[0191] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 제약 조성물은 완충제, 예컨대 인산염 완충 식염수 (PBS) 또는 인산나트륨/황산나트륨, 트리스 완충제, 글리신 완충제, 멸균수 및 통상의 기술자에게 공지된 기타 완충제, 예컨대 문헌 [Good et al. (1966) Biochemistry 5:467]에 기재된 것들을 포함한다. 완충제의 pH는 6.5 내지 7.75, 바람직하게 7 내지 7.5, 가장 바람직하게 7.2 내지 7.4의 범위 내일 수 있다.

[0192] **Wnt 활성 또는 Wnt 수용체 세포 표면 발현을 증가시키는 방법**

[0193] 융합 단백질과 관련하여 본원에 예시된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 간 조직 또는 간 세포에서 Wnt 신호전달을 증가시키는데 사용될 수 있다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호전달은 표준 Wnt 신호전달이다. 따라서, 일부 측면에서, 본 발명은 간 조직 또는 세포를 본원에 개시된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 간 조직 또는 간 세포에서 Wnt 신호전달을 증가시키거나 증강시키는 방법을 제공하며, 여기서 상기 분자는 조직- 또는 세포-특이적 방식으로 표적 조직 또는 세포 상의 세포 표면 수용체와 결합하는 표적화 모듈을 포함한다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나, 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하며, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다. 일부 실시양태에서, 접촉은 시험관내에서, 생체외에서 또는 생체내에서 발생하며, 예를 들어 대상 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자가 대상체에게 투여되거나 제공된다. 특정한 실시양태에서, 세포는 배양된 세포이고, 접촉은 시험관내에서 발생한다.

[0194] 관련 측면에서, 본 발명은 표적 조직 또는 세포를 본원에 개시된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 간 조직 또는 세포에서 Wnt 신호전달을 증가시키는 방법을 제공하며, 여기서 상기 분자는 조직- 또는 세포-특이적 방식으로 표적 조직 또는 세포 상의 세포 표면 수용체와 결합하는 표적화 모듈을 포함한다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나, 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하며, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자이다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 mRNA, 예를 들어 변형된 mRNA이다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 5' 캡 서열 및/또는 3' 테일링 서열, 예를 들어, 폴리A 테일을 추가로 포함하는 변형된 mRNA이다. 다른 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 코딩 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함하는 발현 카세트이다.

[0195] 관련 측면에서, 본 발명은 표적 조직 또는 세포를 본 발명의 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 벡터의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 간 조직 또는 세포에서 Wnt 신호전달을 증가시키는 방법을 제공하며, 여기서 상기 분자는 간-특이적 방식으로 간 조직 또는 세포 상의 세포 표면 수용체와 결합하는 표적화 모듈을 포함한다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나, 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하며, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자이다. 특정

한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다. 특정 실시양태에서, 벡터는 발현 벡터이고, 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다.

[0196] 관련 측면에서, 본 발명은 표적 조직을 본 발명의 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 세포의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 간 조직 또는 세포에서 Wnt 신호전달을 증가시키는 방법을 제공하며, 여기서 상기 분자는 간-특이적 방식으로 간 조직 또는 세포 상의 세포 표면 수용체와 결합하는 표적화 모듈을 포함한다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나, 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하며, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자이다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다. 특정한 실시양태에서, 세포는 이종 세포이거나 또는 치료될 대상체로부터 획득된 자가 세포이다. 특정 실시양태에서, 세포는 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 발현 카세트를 포함하는 벡터로 형질도입되었다. 특정한 실시양태에서, 세포는 줄기 세포, 예를 들어 지방-유래 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포이다.

[0197] Wnt 신호전달을 증가시키기 위해 본원에 기재된 방법 중 임의의 것은 또한 표적화된 세포, 예를 들어 간 조직 세포의 표면 상의 프리즐드 (Fz) 수용체의 수를 증가시키는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 표적화된 세포의 표면의 Fz 수용체의 수는 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 2배, 적어도 5배, 또는 적어도 10배만큼 증가된다. 특정한 실시양태에서, Fz 수용체는 인간 프리즐드 단백질 Fz1, Fz2, Fz3, Fz4, Fz5, Fz6, Fz7, Fz8, Fz9, 및 Fz10 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들어, 본 개시내용은 간 세포를 본원에 개시된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 간 세포의 표면 상의 Fz 수용체를 증가시키는 방법을 제공하며, 여기서 상기 분자는 간-특이적 방식으로 간 조직 또는 세포 상의 세포 표면 수용체와 결합하는 표적화 모듈을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 표적화 모듈은 ASGR1 또는 ASGR2와 결합한다. 특정 실시양태에서, 표적화 모듈은 본원에 개시된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나, 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하며, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자이다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다. 일부 실시양태에서, 접촉은 시험관내에서, 생체외에서 또는 생체내에서 발생하며, 예를 들어 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자가 대상체에게 투여되거나 제공된다. 특정한 실시양태에서, 세포는 배양된 세포이고, 접촉은 시험관내에서 발생한다. 특정 실시양태에서, 간 세포 또는 조직은 초기에 Wnt 신호 증강 분자와 직접적으로 접촉되는 반면, 다른 관련 실시양태에서는, 간 조직 또는 세포가 초기에 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 발현 벡터와 접촉되며, 그로 인해 세포는 폴리뉴클레오티드를 취하고 Wnt 신호 증강 분자를 발현한다.

[0198] Wnt 신호전달을 증가시키기 위한 본원에 기재된 방법 중 임의의 것은 또한 간 조직 또는 간 세포에서 Ki-67을 증가시키는데 사용될 수 있다.

[0199] **질환 및 장애를 치료하는 방법**

[0200] 융합 단백질과 관련하여 본원에 예시된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는, 예를 들어, 표적화된 간 세포, 조직 또는 기관에서 Wnt 신호전달을 증가시킴으로써 질환, 장애 또는 병태를 치료하는데 사용될 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 본 발명은 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체를 본 개시내용의 조성물의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 질환 또는 병태, 예를 들어, 감소된 Wnt 신호전달과 연관되거나, 또는 증가된 Wnt 신호전달이 치료 이익을 제공할 것인 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 특정한 실시양태에서, 조성물은 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자, 예를 들어 소분자 또는 폴리펩티드; 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 DNA 또는 mRNA, 임의로 변형된 mRNA; 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 벡터, 예를 들어 발현 벡터 또는 바이러스 벡터; 또는 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 세포, 예를 들어, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 발현 벡터 또는 바이러스 벡터로 형질도입된 세포 중 임의의 것을 포함하는 제약 조성물이다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나, 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하며, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자이다. 특

정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다. 특정한 실시양태에서, 질환 또는 병태는 병리학적 질환 또는 장애, 또는 손상, 예를 들어 상처로 인한 손상이다. 특정 실시양태에서, 상처는 또 다른 치료적 처치의 결과일 수 있다. 특정 실시양태에서, 질환 또는 병태는 손상된 조직 복구, 치유 또는 재생을 포함하거나, 또는 증가된 조직 복구, 치유 또는 재생으로부터 이익을 얻을 것이다. 일부 실시양태에서, 접촉은 생체내에서 발생하며, 즉 대상 조성물이 대상체에게 투여된다.

[0201] 관련 측면에서, 본 발명은 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에게 본 발명의 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 유효량을 포함하는 제약 조성물을 투여하거나 상기 대상체와 접촉시키는 것을 포함하는, 질환 또는 병태, 예를 들어, 감소된 Wnt 신호전달과 연관되거나, 또는 증가된 Wnt 신호전달이 치료 이익을 제공할 것인 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 분자는 조직- 또는 세포-특이적 방식으로 표적 조직 또는 세포 상의 세포 표면 수용체와 결합하는 표적화 모듈을 포함한다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나, 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하며, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자이다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다.

[0202] 관련 측면에서, 본 발명은 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체에게 본 발명의 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드의 유효량을 포함하는 제약 조성물을 투여하거나 상기 대상체와 접촉시키는 것을 포함하는, 질환 또는 병태, 예를 들어, 감소된 Wnt 신호전달과 연관되거나, 또는 증가된 Wnt 신호전달이 치료 이익을 제공할 것인 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 분자는 조직- 또는 세포-특이적 방식으로 표적 조직 또는 세포 상의 세포 표면 수용체와 결합하는 표적화 모듈을 포함한다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나, 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하며, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자이다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다.

[0203] 관련 측면에서, 본 발명은 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체를 본 발명의 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 하나 이상의 벡터의 유효량을 포함하는 제약 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, 질환 또는 병태, 예를 들어, 감소된 Wnt 신호전달과 연관되거나, 또는 증가된 Wnt 신호전달이 치료 이익을 제공할 것인 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 분자는 조직- 또는 세포-특이적 방식으로 표적 조직 또는 세포 상의 세포 표면 수용체와 결합하는 표적화 모듈을 포함한다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나, 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하며, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자이다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다.

[0204] 관련 측면에서, 본 발명은 질환 또는 병태의 치료를 필요로 하는 대상체를 본 발명의 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자를 코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 포함하는 세포의 유효량을 포함하는 제약 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, 질환 또는 병태, 예를 들어, 감소된 Wnt 신호전달과 연관되거나, 또는 증가된 Wnt 신호전달이 치료 이익을 제공할 것인 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 분자는 조직- 또는 세포-특이적 방식으로 표적 조직 또는 세포 상의 세포 표면 수용체와 결합하는 표적화 모듈을 포함한다. 특정한 실시양태에서, 세포는 줄기 세포, 예를 들어 지방-유래 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포이다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나, 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하며, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자이다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다.

[0205] Wnt 신호전달은 줄기 세포의 발달 프로세스 및 유지에 중요한 역할을 한다. Wnt 신호의 재활성화는 손상 및 질환 후 대부분의 조직의 재생 및 복구와 연관이 있다. 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 간 손상 및 질환에 대한 반응으로 치유 및 조직 복구의 이익을 제공할 수 있다. 간 조직 손상 및 손실의 원인은 노화, 퇴행, 유전적 병태, 감염 및 염증, 외상성 손상, 독소/대사-유발 독성, 또는 기타 병리학적 병태를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. Wnt 신호 및 Wnt 신호의 인헨서는 성체 조직 상주 줄기 세포를 활성화시키는 것으로 나타났다. 일부

실시양태에서, 본 발명의 화합물은 병에 걸리거나 손상된 간 조직을 치료하는데 사용하기 위해, 간 조직 재생에 사용하기 위해, 및 간 세포 성장 및 증식에 사용하기 위해, 및/또는 간 조직 조작에 사용하기 위해 투여된다.

[0206] Wnt 경로의 돌연변이와 연관된 인간 질환은 질환의 치료 및 예방에서 Wnt 신호의 증강에 대한 강력한 증거를 제공한다. 전임상 생체내 및 시험관내 연구는 많은 질환 상태에서 Wnt 신호의 관여에 대한 부가의 증거를 제공하고 다양한 인간 질환에서 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 활용을 추가로 지원한다. 예를 들어, 본 발명의 조성물은 또한 간 세포의 증강된 재생, 예를 들어 간 재생, 간경변증의 치료, 간 이식의 증강, 급성 간부전의 치료, 간염 (A형, B형 또는 C형) 바이러스 감염을 동반하거나 항바이러스 약물 요법 후의 만성 간 질환, 알콜성 간염, 예를 들어, 급성 또는 중증 알콜성 간염을 포함한 알콜성 간 질환, 지방증 또는 지방간염을 동반한 비-알콜성 간 질환 등의 치료에 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 재생 간 조직 또는 세포 성장이 요망되는 병태를 포함하나 이에 제한되지는 않는 질환 및 장애를 치료할 수 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은, 예를 들어, 급만성 간부전 (ACLF), 간의 급성 대상부전, 간경변증으로 인한 복수, 간경변증이 있는 환자의 저나트륨혈증, 간신장 증후군-급성 신장 손상 (HRS-AKI), 또는 간성 뇌병증을 치료하기 위해 사용된다. 특정한 실시양태에서, 조성물은 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하는 Wnt 신호 증강 분자, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자를 포함한다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 알콜성 간염, 예를 들어, 급성 알콜성 간염 또는 중증 알콜성 간염을 치료하는데 사용되며, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이고, 특정한 실시양태에서 Wnt 신호 증강 분자는 정맥내로 투여된다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 알콜성 간염, 예를 들어, 급성 알콜성 간염 또는 중증 알콜성 간염을 치료하는데 사용되며, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이며, 특정한 실시양태에서 Wnt 신호 증강 분자는 정맥내로 투여된다.

[0207] 간세포의 항상성 재생을 위한 특이적 증식 세포 집단은 계통 추적 연구, 예를 들어 중심 주변 영역에서의 Axin2-양성 세포를 통해 확인되었다. 계통 추적 연구는 또한 Lgr-양성 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 부가의 잠재적 간 전구 세포를 확인하였다. Lgr5-양성 및 Axin2-양성 세포를 포함한, 자기-재생 간 세포 및 잠재적 전구 세포의 다른 집단은 손상 후 Wnt 신호 및/또는 R-스폰딘에 반응하는 재생이 가능한 것으로 확인되었다. 급성 간 손상 및 부전 및 만성 간 질환의 수많은 전임상 모델은 간세포의 회복 및 재생이 Wnt 신호 증강으로부터 이익을 얻는 것으로 나타났다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 조성물은, 예를 들어, 모든 원인의 급성 간부전, 약물-유발 급성 간부전, 급만성 간부전 (ACLF), 간의 급성 대상부전, 간경변증으로 인한 복수, 간경변증이 있는 환자의 저나트륨혈증, 간신장 증후군-급성 신장 손상 (HRS-AKI), 간성 뇌병증, 알콜성 간 질환, 모든 원인의 만성 간부전, 비대상성 간부전, 말기 대상성 간부전, 간경변증, 모든 원인의 간 섬유증, 문맥 고혈압, 모든 원인의 만성 간 기능부전, 말기 간 질환 (ESLD), 비알콜성 지방간염 (NASH), 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD) (지방간), 알콜성 간염, 급성 알콜성 간염 (AAH), 만성 알콜성 간염, 알콜성 간 질환 (ALD) (알콜-관련 간 질환 (ARLD)으로 불리기도 함), C형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HCV), B형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HBV), 기타 바이러스성 간염 (예를 들어, A형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HAV) 및 D형 간염 바이러스-유발 간 질환 (HDV)), 원발성 담즙성 간경변증, 자가면역성 간염, 간 수술, 간 손상, 정맥-폐쇄성 질환 (VOD), 골혈관 폐쇄 증후군 (SOS), 원발성 담즙성 담관염 (PBC), 원발성 경화성 담관염 (PSC), 간 이식, 간 수술 및 이식에서의 "과소 이식편" 증후군, 선천성 간 질환 및 장애, APAP (아세트아미노펜) 과다복용으로 인한 간부전, 및 유전 질환, 퇴행, 노화, 약물 또는 손상으로 인한 임의의 다른 간 질환 또는 장애의 치료에 사용될 수 있다. 그들은 또한 생체내에서 또는 시험관내에서 간 세포의 재생을 증강시키는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 간세포 재생 증가, 간 기능 개선 및/또는 섬유증 감소를 초래한다. 간 조직의 재생을 위한 방법은 본 발명의 화합물의 투여로부터 이익을 얻으며, 이는 전신적이거나 국부적일 수 있다. 이들은, 예를 들어, 간 조직 내로의 주사에 의하거나, 간으로 유도하는 정맥 또는 혈관 내로의 주사에 의하거나, 지속 방출 제형의 체내 이식에 의한 전신 투여의 방법 및 국부 투여의 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정한 실시양태에서, 조성물은 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하는 Wnt 신호 증강 분자, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자를 포함한다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다.

[0208] 특정한 실시양태에서, 본원에 개시된 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 알콜성 간염 (AH), 예컨대 중증 알콜성 간염 (중증 AH)으로서 지칭되기도 한 급성 알콜성 간염 (AAH)을 치료, 억제 또는 예방하기 위해 사용된다. AAH (또는 중증 AH)는 상당한 단기 사망률과 연관된 중증 형태의 알콜-관련 간 질환이다. 알콜성 간염은 전형적으

로 10년 이상 정기적으로 과음한 후에 발생하며; 한 연구에서 평균 소모량은 100 g/일이었다 (하루 10잔에 상응함). 전형적인 환자는 최근에 황달, 복수 및 근위 근육 손실이 발병하였다. 발열 및 백혈구 증가증도 흔하지만 감염, 특히 자발적 박테리아성 복막염에 대한 평가를 신속히 해야 한다. 이들 환자에서의 간 생검은 지방증, 호산구성 봉입 [말러리(Mallory)] 소체를 함유하는 팽창된 간세포, 및 눈에 띄는 호중구 염증 세포 침윤을 제시한다. 임상 진단의 정확성으로 인해, 생검은 거의 필요하지 않으며, 대신 진단을 위해 임상 및 실험실 징후에 의존한다. 급성 알콜성 간염 (AH)은 알콜성 간 질환 (ALD)의 급성 대상부전의 중증 형태이며, 과음자에게서 발생하고 황달, 불쾌감, 식욕 부진, 압통 간비대 및 전신 염증 반응 증후군 (SIRS) 징후의 급속한 발병을 특징으로 한다. 중증 또는 급성 알콜성 간염 (AH)은 180일 사망률이 매우 높은 치명적인 질환이며, 전형적으로 입원이 필요하다. 감염이 존재하는 경우에는 예후가 더 나빠지고 간 질환 중증도가 더 높아지는, 급만성 간부전으로서 나타날 수 있다. 환자는 황달 및 응고병증, 간성 뇌병증, 정맥류 출혈 및 간의 장기 부전을 초래하는 패혈증을 동반한 특징적인 간 효소 상승 패턴 뿐만 아니라 기타 잠재적 증상, 예컨대 가려움증 및/또는 발열이 나타난 후 3개월 이내에 과도한 알콜 소비의 최근 병력이 있을 수 있다. 특정한 실시양태에서, 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자는 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나, 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하며, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다. 특정한 실시양태에서, 이는 정맥내로 투여된다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 간세포 재생 증가, 간 기능 개선 및/또는 섬유증 감소를 초래한다.

[0209] 본 발명의 조성물은 말기 간 질환 (ESLD)을 치료하기 위해 사용될 수 있다. ESLD 또는 만성 간부전은 종종 중증 간경변증과 그 결과로 생긴 간 섬유증의 결과이다. ESLD는 복수, 정맥류 출혈, 간성 뇌병증 및/또는 간 기능 손상 (예를 들어, 비대상성 간 질환)의 발생으로 나타난다. ESLD와 연관된 통상적인 질환 또는 장애는 알콜성 간염, 만성 C형 간염 감염, 만성 B형 간염 감염, 만성 D형 간염 감염, 비알콜성 지방간염 (NASH)을 포함한 비알콜성 지방간 질환 (NAFLD), 및 유전 질환, 예컨대 낭포성 섬유증, 알파-1 항트립신 결핍증, 혈액소침착증, 윌슨병, 갈락토스혈증 및 글리코젠 축적 질환을 포함한다. 약물, 독성 화학물질, 기생충 감염 및 간 울혈을 동반한 반복적인 심부전에 대한 장기간 노출이 또한 ESLD를 유발할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 조성물은 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하는 Wnt 신호 증강 분자, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다. 특정한 실시양태에서, 이는 정맥내로 투여된다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 간세포 재생 증가, 간 기능 개선 및/또는 섬유증 감소를 초래한다.

[0210] 특정한 실시양태에서, 조성물은 비경구적으로, 예를 들어 정맥내로, 경구로, 직장으로 또는 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 이는 국부적으로, 예를 들어 국소적으로 또는 근육내로 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 표적 조직, 예를 들어 간에 투여된다. 본 발명의 방법은 생체내에서 또는 생체외에서 실시될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 세포 또는 조직을 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자와 접촉시키는 것은 생체외에서 수행되며, 이어서 세포 또는 조직, 예를 들어 활성화된 줄기 세포 또는 전구 세포를 대상체에 체내 이식한다. 통상의 기술자는 치료중인 질환 또는 장애에 기초하여 적절한 투여 부위 및 투여 경로를 결정할 수 있다. 투여 방법은, 예를 들어, 간 조직 내로의 주사에 의하거나, 간으로 유도하는 정맥 또는 혈관 내로의 주사에 의하거나, 지속 방출 제형의 체내 이식에 의한 전신 투여의 방법 및 국부 투여의 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0211] 용량 및 투여 요법은 의사에 의해 쉽게 결정되는 다양한 요인, 예컨대 질환 또는 장애의 특성, 대상체의 특징, 및 대상체의 병력에 따라 달라질 수 있다. 특정한 실시양태에서, 대상체에게 투여되거나 제공되는 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자, 예를 들어, 용합 단백질의 양은 대상체 체중의 약 0.01 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 0.1 mg/kg 내지 약 500 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg의 범위이다.

[0212] 특정 실시양태에서, 대상체는 임의의 포유동물, 예를 들어 인간, 설치류 (예를 들어, 마우스, 래트, 게르빌루스 쥐), 토끼, 고양이, 개, 염소, 양, 돼지, 말, 소 또는 영장류일 수 있다.

[0213] 일부 실시양태에서, 대상 방법은, 예를 들어, 간 질환 또는 장애의 발생을 억제 또는 예방하고, 간 질환 또는 장애의 진행을 중단시키고, 간 질환 또는 장애의 진행을 역전시키는 등의 치료 이익을 가져온다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 간세포 재생을 증가시키고/거나, 간 기능을 증가시키고/거나 간 섬유증을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 대상 방법은 치료 이익이 달성되었음을 검출하는 단계를 포함한다. 통상의 기술자는 이러한

치료 이익의 조치가, 변형되는 특정한 질환 또는 장애에 적용될 수 있음을 인식할 것이며, 치료 효능을 측정하기 위해 사용하기 위한 적절한 검출 방법을 인식할 것이다.

[0214] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 하기 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게, 간 조직과 결합하는 표적화 모듈, 예를 들어 ASGR1과 특이적으로 결합하는 표적화 모듈을 포함하는 Wnt 신호 증강 분자를 포함하는 제약 조성물을 제공하는 것을 포함하는, 감소된 Wnt 신호전달과 연관되거나 또는 간 조직에서 증가된 Wnt 신호전달 활성으로부터 이익을 얻을 것인 질환 또는 장애, 예컨대 예를 들어, 간 재생으로부터 이익을 얻을 것인 본원에 개시된 질환 또는 장애 중 임의의 것을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하며, 여기서 Wnt 신호 증강 분자는 대상체의 간 조직에서의 Wnt 신호전달을 증가시키거나 증강시킨다. 특정한 실시양태에서, 조성물은 본원에 개시된 것들 중 임의의 것으로부터 선택되거나 또는 본원에 개시된 폴리펩티드 서열 중 임의의 것을 포함하는 Wnt 신호 증강 분자, 예를 들어 EEST-EE, EEST-RA, EEAT-EE, 또는 8M24 EASE-EE 또는 8M24 EASE-RA로서 지칭된 Wnt 신호 증강 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다. 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 경구로 또는 전신으로, 예를 들어 비경구로 투여된다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 R-스폰딘 푸린 도메인 1 또는 그의 단편 또는 변이체, 및 임의로 돌연변이된 푸린 도메인 2 또는 그의 단편 또는 변이체를 포함하는 작용 모듈을 포함한다.

[0215] **간 세포, 조직 및 오가노이드를 생산 또는 유지하는 방법**

[0216] 다른 실시양태는 부분적으로, 예를 들어 간 세포, 간 조직 또는 간 오가노이드를 본원에 개시된 하나 이상의 Wnt 신호 증강 분자, 예를 들어 1R34-EEST-EE, 8M24-EASE-EE, 또는 8M24-EASE-RA와 접촉시킴으로써 간 세포, 간 조직 및 오가노이드의 성장 또는 증식을 촉진 또는 증강시키기 위한 본원에 개시된 분자의 용도에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 EEST-EE이다. 특정 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 8M24 EASE-EE 또는 8M2 EASE-RA이다. 특정 실시양태에서, 상기 방법은 간 세포, 간 조직 또는 간 오가노이드의 성장 또는 증식을 증강시키거나, 또는 생육력을 유지 또는 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 간 세포, 간 조직 또는 간 오가노이드는 생체외에서, 시험관내에서 또는 생체내에서 접촉된다. 본원에 개시된 방법은 치료적 사용을 위해, 예를 들어 대상체 내로 이식 또는 그래프트될 간 세포, 조직 또는 오가노이드를 생성 및/또는 유지하는데 사용될 수 있다. 이들은 또한 연구용 간 세포, 조직 또는 오가노이드를 생성 및/또는 유지하는데 사용될 수 있다. Wnt 신호 증강 분자는 비-치료적 방법, 예를 들어 시험관내 연구 방법에서 광범위하게 적용된다.

[0217] 특정 실시양태에서, 간 조직은 Wnt 신호 증강 분자와 접촉되어 간 조직의 생육력을 유지한다. 특정한 실시양태에서, 간 조직은 이를 필요로 하는 수용자에게 이식될 공여자 간 조직이다. 특정 실시양태에서, 공여자 간 조직은, 예를 들어, 공여자로부터 간 조직을 제거하기 전에 본원에 개시된 Wnt 신호 증강 분자를 포함하는 용액으로 생체내에서 관류된다. 특정 실시양태에서, 공여자 간 조직은, 예를 들어, 저장 동안 또는 공여자로부터 수용자로의 수송 동안 본원에 개시된 Wnt 신호 증강 분자를 포함하는 용액으로 생체외에서 관류된다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자와 접촉된 간 조직은 Wnt 신호 증강 분자와 접촉되지 않은 경우보다 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 50%, 또는 적어도 100% 더 오랫동안 이식을 위해 생육가능한 상태로 남아 있다.

[0218] 특정 실시양태에서, 간 오가노이드 배양물은 이를 본원에 개시된 하나 이상의 Wnt 신호전달 분자와 접촉시킴으로써 생성, 성장 또는 유지된다. 특정한 실시양태에서, Wnt 신호 증강 분자는 간 오가노이드 조직을 성장시키거나 유지하는데 사용되는 배양 배지에 존재한다.

[0219] 본 명세서에 언급되고/거나 출원 데이터 시트에 열거된 상기 모든 미국 특허, 미국 특허 출원 공보, 미국 특허 출원, 외국 특허, 외국 특허 출원 및 비-특허 공보는 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

[0220] 전술한 내용으로부터, 본 발명의 구체적 실시양태가 예시의 목적으로 본원에 기재되었지만, 본 발명의 요지 및 범위를 벗어나지 않고서도 다양한 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명은 첨부된 청구 범위를 제외하고는 제한되지 않는다.

[0221] **실시예**

[0222] 하기 실시예는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 본 발명을 어떻게 만들고 사용하는지에 대한 완전한 개시내용 및 설명을 제공하기 위해 제시된 것이며, 본 발명자들이 자신의 발명으로서 간주하는 범위를 제한하려는 것이 아니며, 하기의 실험이 수행된 모든 또는 유일한 실험임을 나타내려는 의도도 아니다. 사용된 숫자 (예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위해 노력했지만, 일부 실험 오류 및 편차가 고려되어야 한

다. 달리 나타내지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이며, 온도는 섭씨온도이고, 압력은 대기압 또는 대기압에 가깝다.

[0223] 분자 생물학, 세포 생물학 및 생화학에서의 일반적인 방법은 문헌 ["Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed." (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001); "Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed." (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); "Protein Methods" (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); "Nonviral Vectors for Gene Therapy" (Wagner et al. eds., Academic Press 1999); "Viral Vectors" (Kapliff & Loewy eds., Academic Press 1995); "Immunology Methods Manual" (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997); and "Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology" (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998)]과 같은 표준 교과서에서 찾을 수 있으며, 그의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. 본 개시내용에서 언급된 유전적 조작을 위한 시약, 클로닝 벡터 및 키트는 상업적 공급업체, 예컨대 바이오래드(BioRad), 스트라타젠(Stratagene), 인비트로젠(Invitrogen), 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich) 및 클론테크(Clontech)로부터 입수가 가능하다.

[0224] 하기 실시예에 이용된 재료 및 방법은 하기를 포함한다.

[0225] **단백질 생산:** 모든 재조합 단백질은 달리 명시되지 않는 한 일시적 형질감염에 의해 Expi293F 세포 [썸코 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)]에서 생산되었다. 모든 IgG-기반 및 Fc 함유 구축물을 CaptivA 단백질 A 친화성 수지 [레플리젠(Repligen)]로 정제하고 0.1 M 글리신 pH 3.3으로 용출하였다. 모든 단백질을 1xHBS 완충액 (20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl) 또는 2xHBS 완충액 (40 mM HEPES pH 7.4, 300 mM NaCl)을 사용하여 슈퍼덱스(Superdex) 200 증가 10/300 GL [GE 헬스케어 라이프 사이언스(GE Healthcare Life Sciences)] 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)로 추가로 연마하였다. 단백질은 -80°C에서 장기 저장을 위해 글리세롤을 10%까지 보충하였다. 시험된 모든 단백질은 SDS-폴리아크릴아미드 전기영동으로 검사했으며 순도가 적어도 90%인 것으로 추정되었다.

[0226] **슈퍼탑 플래시 (STF) 검정:** Wnt 신호전달 활성화는 보고된 바와 같이 (문헌 [Janda et al., 2017; Nature 545:234]) Wnt-반응성 프로모터 (슈퍼 탑 플래시 리포터 검정, STF)에 의해 제어되는 루시페라제 유전자를 함유하는 세포주를 사용하여 측정되었다. 간단히 언급하면, 세포를 처리 24시간 전에 96-웰 플레이트에 웰당 10,000개의 밀도로 시딩한 다음, Rspo 또는 모방 단백질로 단독으로 또는 100 pM WNT3A 대체물, R2M3-26과 함께 밤새 처리하였다. 루시페라제 세포 배양물 용해 시약 [프로메가(Promega)]으로 세포를 용해시키고 판매자가 제안한 절차를 사용하여 루시페라제 검정 시스템 (프로메가)으로 활성을 측정하였다. 데이터는 삼중물의 평균 +/- 표준 편차로서 플롯팅되었고 프리즘(Prism) [그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software)]을 사용하여 비-선형 회귀로써 피팅되었다.

[0227] **유전자 발현의 반정량적 PCR 분석:** MagMAX™ mirVana™ 전체 RNA 단리 키트 (썸코피셔, A27828)를 사용하여 마우스 조직 (간 및 소장 샘플)으로부터 RNA를 추출하였다. cDNA는 고품질 cDNA 역전사 키트 (썸코피셔, 43-688-14) 또는 SuperScript™ IV VIL0™ 마스터 믹스 (썸코피셔, Cat. No. 11756050)를 사용하여 생산되었다. 마우스 *Axin2* 및 *Ki67* mRNA 발현은 TaqMan® 고속 고급 마스터 믹스 (썸코피셔, 4444963) 및 Mm00443610_m1 *Axin2*, Mm01278617_m1 *Ki67*, Mm01300555_g1 *wnt1*, Mm00470018_m1 *wnt2*, Mm00437336_m1 *wnt3*, Mm01194003_m1 *wnt4*, Mm00437347_m1 *wnt5a*, Mm01183986_m1 *wnt5b*, Mm00437353_m1 *wnt6*, Mm00437356_m1 *wnt7a*, Mm01301717_m1 *wnt7b*, Mm01157914_g1 *wnt8a*, Mm00457102_m1 *wnt9b*, Mm00442104_m1 *wnt10b*, Mm00437327_g1 *wnt11*, Mm00446420_m1 *wnt16*, Mm00507077_m1 *rspo1*, Mm00555790_m1 *rspo2*, Mm01188251_m1 *rspo3*, 및 Mm00615419_m1 *rspo4* 프로브 (썸코피셔, 4331182)를 사용함으로써 측정되었다. 값은 Mm02619580_g1 프로브 (썸코피셔, 4351368)를 사용하여 구성적 액틴 B 유전자의 발현에 대해 정규화되었다.

[0228] **다중특이성 검정:** ELISA 방법을 사용하여 인간 인슐린 [시그마(Sigma) 91077C-100MG], 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH) (시그마 H7017-50MG), 이. 콜라이(*E. coli*)로부터의 리포폴리사카라이드 (LPS) (시그마 L3012-10MG), 이중 가닥 DNA (dsDNA) (시그마 D1626-5G), 및 헤파린을 포함한 비-표적 항원에 대한 결합을 조사하였다. dsDNA는 사용하기 전에 초음파 처리를 사용하여 200-200 bp로 절단되었다. 코닝(Corning®) 96-웰 EIA/RIA 이지 워시(Easy Wash™) 투명 평면 바닥 폴리스티렌 고 결합 마이크로플레이트 (코닝 3369)를 4°C에서 밤새 10 mg/ml의 PBS에서 50 µl KLH, LPS 및 dsDNA로 코팅하였다. 인슐린은 5 mg/ml로 코팅되었다. 헤파린 코팅된 플레이트를 구입하였다 (썸코 사이언티픽 C995X60). 코팅된 플레이트를 실온에서 1시간 동안 300 µl 300 슈퍼블록(SuperBlock) (썸코 37516)으로 차단한 다음, 실온에서 1시간 동안 (또는 4°C에서 밤새) 1000, 250, 125, 62.5 mg/ml에서 100 µl의 관심 단백질 (항체 또는 융합체)로 프로빙하였다. 항-hFc-HRP [잭슨(Jackson) IR 109-

035-098]를 검출 및 화학발광 정량화에 사용하였다.

- [0229] **단백질 열 안정성 검정:** 잉클 기기 [언체인드 랩스(Unchained Labs)]를 사용하여 단백질 열 안정성을 측정하였다. 반응은 1XHS 완충액 중 단백질 샘플을 유니스(Unis)에 부가함으로써 수행된 다음, 실리콘 밀봉체로 밀봉하고 프레임에 담아두었다. 형광 관독값은 분당 1°C씩 증가시키면서 15°C 내지 95°C의 온도 범위에서 UV266 nm 및 블루 473 nm에서 측정되었다. Tm/Tagg는 잉클 데이터 분석 소프트웨어를 사용하여 수득되었다.
- [0230] **마우스 연구:** 6주령의 C57B1/6J 수컷 마우스를 잭슨 래보러토리즈 (미국 메인주 바 하버)로부터 수득하고 그룹별로 수용하였다. 모든 동물 실험은 국립 과학 아카데미에서 작성한 "실험실 동물의 관리 및 사용에 관한 지침"의 기준에 따랐다. 동물 실험용 프로토콜은 서로젠(Surrozen) 기관내 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받았다. 실험을 시작하기 최소 2일 전에 마우스를 새로운 환경에 순응시켰다. 마우스는 정제된 실험실 등급의 산성화된 물에 무제한으로 접근할 수 있었고 자유롭게 급식하였다 [2018 테클라드(Teklad) 글로벌 18% 단백질 설치류 식단]. 마우스는 30% 내지 70% 습도 환경 및 20°C 내지 26°C 범위의 실온에서 12/12시간 명/암 주기로 유지되었다.
- [0231] 인간 *ASGR* 유전자 발현을 위해 마우스를 인간화한 경우, 각각의 마우스에게 제0일에 1×10^{11} 개의 ssAAV8-CAG-h*ASGR1* 게놈 카피 [벡터 바이오랩스 (Vector Biolabs; 미국 펜실베이니아주 맬번)]를 정맥내로 투여하였다. 제7일에, 마우스에게 αGFP, Fc-RSP02-WT, αGFP-RSP02-RA 또는 αASGR1-RSP02-RA를 복강내로 (i.p.) 주사하였다. 단백질 투여 후 표시된 시간에, 마우스를 이소플루란으로 마취시키고 심장 천자에 의해 혈액을 제거하였다. 왼쪽 간엽과 십이지장의 일부분을 분석을 위해 수집하였다.
- [0232] **CC1₄ 연구에서 유전자 발현의 반정량적 PCR 분석:** MagMAX™ mirVana™ 전체 RNA 단리 키트 (써모피셔, A27828)를 사용하여 마우스 조직 (간 샘플)으로부터 RNA를 추출하였다. cDNA는 고용량 cDNA 역전사 키트 (써모피셔, 43-688-14) 또는 SuperScript™ IV VIL0™ 마스터 맥스 (써모피셔, Cat. No. 11756050)를 사용하여 생산되었다. TaqMan® 고속 고급 마스터 믹스 (써모피셔, 4444963) 및 Mm00443610_m1 *Axin2*, Mm00432359_m1 *Ccnd1*, Mm01278617_m1 *Mki67*을 사용하여 마우스 mRNA 발현을 측정하였다. 값은 Mm02619580_g1 프로브 (써모피셔, 4351368)를 사용하여 구성적 액틴 B 유전자의 발현에 대해 정규화되었다.
- [0233] **혈청 화학:** 제7일에 꼬리 끝으로부터 혈액을 수집하고, 제14일에 심장 천자를 통해 종료하는 동안 혈액을 수집하였다. 젤이 있는 혈청 분리 튜브 (피셔, 22030401)에서 혈액을 10,000 RPM으로 7분 동안 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 상청액은 새로운 튜브로 옮겨 분석 전까지 -20°C 하에 유지하였다. 베티악셀(VetAxcel) 임상 분석기, 알칼리성 포스파타제 및 알부민 검정 키트 [각각 404200-3, SA2002 및 SA2001, 알파-와서만 다이아그노스틱 테크놀로지스(Alfa-Wasserman Diagnostic Technologies)]를 사용하여 혈청 샘플을 분석하였다.
- [0234] **조직학적 분석 및 면역형광:** 포르말린 고정 및 파라핀 포매 간 샘플을 절개하고 항-Ki-67 토끼 항체 (피셔, 50245564), 항-HNF4a 항체 [압캠(Abcam), ab199431], 염소 항-라트 IgG H&L [알렉사 플루오르(Alexa Fluor®) 488] (ab150157) 및 당나귀 항-토끼 IgG H&L (알렉사 플루오르® 647) (ab150075)로 염색하였다. 전체 조직학적 간 절편을 표준 절차를 사용하여 피크로시리우스 레드 (PSR)로 염색하고 디지털 영상으로 스캐닝하였다. 이미지 J는 PSR로 염색된 절편의 백분율을 정량화하는데 사용되었다.
- [0235] 실시예 1
- [0236] 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 개발 및 특징규명
- [0237] ASGR은 ASGR1과 ASGR2라는 2개의 폴리펩티드로 구성된 헤테로-올리고머이며, 주로 간세포에서 발현되며 급속 세포내이입을 거친다. 간-특이적 RSP0-유사 Wnt 신호전달 인핸서 분자를 생성하기 위해, 아시아알로당단백질 수용체 (ASGR)을 표적으로 하였다.
- [0238] 각각 2개의 항-ASGR1 항체 경쇄, 및 링커 서열을 통해 N-말단과 융합된 변형된 RSP02 폴리펩티드를 갖는 2개의 항-ASGR1 항체 중쇄를 포함하는 다수의 IgG-유사, 간-특이적 Wnt 신호전달 인핸서 분자가 생산되었다 (αASGR1-RSP02 구축물). 이러한 설계에서, 상기 분자의 항-ASGR1 항체 부분은 간 특이성을 제공하는 "표적화 모듈"인 반면, 분자의 RSP02 부분은 E3 리가제와 상호작용하는 "작용 모듈"로서 기능한다. Wnt 신호전달 인핸서 분자는 달리 나타내지 않는 한 IgG1 백분을 포함한다.
- [0239] 만들어진 초기 αASGR1-RSP02 Wnt 신호전달 인핸서 분자는 ASGR1의 줄기 영역과 결합하는 αASGR1 결합 도메인을 포함하고 1R34-DDNN/RA로서 지칭된다. 1R34-DDNA/RA 분자의 경쇄 서열은 밀줄 표시된 CDR과 함께 하기에 제

공된다:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWYQQKPGQAPVLYYGKNNRPSGI
 PDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDYCYNSLERIGYLSYVFGGGTKLTVLGQPKA
 APSVTLFPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSN
 NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (서열식별번호: 1).

[0240]

1R34-DDNA/RA 분자에 대한 융합된 RSP02 서열을 갖는 중쇄의 서열은 밑줄 표시된 CDR, 이탤릭체로 표시된 RSP02 서열 및 볼드체로 표시된 링커 서열과 함께 하기에 제시된다:

[0241]

*NPICKGCLSCSKDNGCSRC***QOKLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAPDMNRCAR**
*CR*ENCDSC**R**SKD**A**CTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECV**E****GGGGSGGGG**
SGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKLEWVS
AISGGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDFSSRRW
YLEYWGQGLTVVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 APIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK (서열식별번호: 2).

[0242]

야생형 인간 RSP02 서열과 비교 시 2개의 아미노산 치환이 볼드체, 이탤릭체 및 밑줄체로서 표시된다.

[0243]

후속 αASGR1-RSP02 Wnt 신호전달 인핸서 분자인 8M24-v1은 ASGR1의 탄수화물 결합 도메인과 결합하는 αASGR1 결합 도메인을 포함하고 8M24 항체로부터 유래되었다. 8M24-v1 분자의 경쇄의 가변 도메인 서열은 밑줄 표시된 CDR과 함께 하기에 제공된다:

[0244]

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRISENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAAINLADGV
 PSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQHFWGTPFTFGQGTKLEIK (서열식별번호: 3).

[0245]

8M24-v1 분자의 경쇄 서열은 밑줄 표시된 CDR과 함께 하기에 제공된다:

[0246]

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRISENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAAINLADGV
 PSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQHFWGTPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGTASVCLLNPFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (서열식별번호: 5).

[0247]

8M24v1 분자의 융합된 RSP02 서열을 갖는 중쇄의 가변 도메인의 서열은 밑줄 표시된 CDR, 이탤릭체로 표시된 RSP02 서열 및 볼드체로 표시된 링커 서열과 함께 하기에 제시된다:

[0248]

*NPICKGCLSCSKDNGCSRC***QOKLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAPDMNRCAR**
*CR*ENCDSC**R**SKD**A**CTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECV**E****GGGGSGGGG**
SGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTNYGINWVRQAPGQGLEWM
 GEIFPRSDNTFYAQKFQGRVITADKSTSTAYMELSSRLSEDTAVYYCARKGRDYGT
SHYFDYWGQTTTVSS (서열식별번호: 4).

[0249]

야생형 인간 RSP02 서열과 비교 시 2개의 아미노산 치환이 볼드체, 이탤릭체 및 밑줄체로서 표시된다.

[0250]

우수한 특징을 갖는 변형된 형태를 확인하기 위해, 이들 2개의 출발 분자 각각에 대한 변형을 시험용으로 만들었다.

[0251]

1R34-DDNA/RA 분자 변형

[0252]

초기 αASGR1-RSP02 Wnt 신호전달 인핸서 분자인 1R34-DDNA/RA의 다양한 아미노산 변형을 수행하고, 개선된 특성을 가진 분자를 확인하기 위해 시험하였다. 도 1은 1R34-DDNA/RA 출발 분자의 경쇄 폴리펩티드 및 중쇄-Rspo2 융합 폴리펩티드의 아미노산 서열을 제공하고, 변이체에서 변형된 아미노산 잔기를 볼드체로 표시한다. 모든 분자는 IgG1 백본에 N297G 치환을 포함하였다 (NG). 일부 분자에서는, RSP02 폴리펩티드에 의한 LGR 결합

[0253]

을 없애기 위해, RSP02의 Fu2 도메인 내에서 LGR 단백질과 결합하는데 중요한 것으로 보고된 2개의 고도로 보존된 소수성 잔기인 F105 및 F109에 점 돌연변이를 도입하였다. 도 1에 제시된 1R34-DDNA/RA 중쇄 서열은 야생형 RSP02 서열과 비교 시 F105R 및 F109A 치환을 포함하며, 이는 이탤릭체로 표시되고 밑줄 표시되어 있다.

[0254] 1R34-DDNA/RA Wnt 신호전달 인핸서 분자의 ASGR1 결합 IgG 부분의 CDR에는 탈아미드화 또는 Asp 이성질체화 책임가능성이 있는 4개의 Asn 및 Asp 부위가 존재한다 (도 1에 볼드체로 표시됨). 이들 위치 각각에서의 다양한 아미노산 치환이 이루어졌다. 분자는 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 조작되었고 Expi293 세포에서 일시적인 형질감염에 의해 발현된 다음, 2개의 컬럼 정제 (단백질 A에 이어 SEC)를 거쳤다. 그 결과로 생성된 분자는 탈아미드화 또는 Asp 이성질체화 책임을 제거하기 위해 Wnt 신호전달 인핸서 분자에 도입될 가능성에 관하여 시험되었다.

[0255] 놀랍게도, 중쇄의 CDR2 내의 D62 위치는 다른 아미노산으로 대체되기에 제한된 유연성을 보였다. 도 2에 제시된 바와 같이, Ser 또는 Ala로 돌연변이된 D62는 분자의 SEC 프로파일에 상당한 변화를 가져왔고, 이는 이러한 돌연변이가 분자의 폴딩을 방해하는 반면, Glu로의 돌연변이는 폴딩을 유지하고 있었다는 것을 시사한다. 이러한 후자의 돌연변이는 또한 STF 활성을 보유하고 있었다 (데이터는 제시되지 않음).

[0256] 유사하게, 경쇄의 CDR1 내의 D25 위치는 도 3에 제시된 바와 같이, 단백질 폴딩을 방해하기 때문에, 세린으로 대체될 수 없었다. 그러나, D25를 Glu 또는 Ala로 치환하면 단백질 폴딩 및 STF 활성이 유지되었다 (도 3 및 데이터는 제시되지 않음).

[0257] 경쇄의 CDR2 내의 N51 위치는 Gln, Ser 또는 Ala로 대체될 수 있는 유연성을 가졌다 (도 4). 이들 치환 각각은 STF 활성을 유지했지만, 위치 51에서의 Gln 돌연변이로 인해 STF 활성이 다소 감소되었다 (데이터는 제시되지 않음).

[0258] 경쇄의 CDR3 내의 N88 위치의 변형은, 도 5에 제시된 바와 같이 Gln, Ser 또는 Ala로 대체될 때 단백질 SEC 프로파일에 영향을 미치지 않았다. 이들 치환 각각은 STF 활성을 유지했지만, 위치 88에서의 Gln 돌연변이로 인해 STF 활성이 다소 감소되었다 (데이터는 제시되지 않음). 그러나, SDS-PAGE 분석 결과, N88S 및 N88A 돌연변이체가 잘 발현되었지만, 도 6에 제시된 바와 같이 S 또는 A로의 돌연변이가 적절하게 폴딩되지 않은 단백질을 야기시킨 것으로 밝혀졌다. 다른 돌연변이체와 조합하여, LC N88Q는 활성을 손상시켰고 L88A는 무결성을 손상시켰다. His (EESH), Thr (EEST), Arg (EESR) 또는 Lys (EESK) (및 기타 아미노산 잔기)로의 CD3 내의 N88 위치의 추가 변형은 중쇄 CDR2 D62E, 경쇄 CDR1 D25E, 및 경쇄 CDR2 N51S 치환의 배경에서 만들어졌고, Huh-7 및 Hek-293 세포에서 시험되었다 (도 50a-d). 돌연변이체 EESH와 EESR은 STF 활성이 감소되었는데, 이는 세포 표면 상의 결합 부위를 방해하기 때문일 수 있다. 돌연변이체 EEST, EESK 및 EEAT는 WT와 비슷한 STF 활성을 가진 반면, 하기 돌연변이의 조합은 활성이 감소되었다: EESL, EESE, EESH, EESR, EESY, EEAL, EEAE, EEAH, EEAY, 및 EEAR. N88을 대체하는 상이한 아미노산을 갖는 돌연변이체의 다양한 조합의 단백질 폴딩을 또한 조사하였다 (도 41). 유사한 활성을 갖는 서열의 조합을 비교하였으며, EEST가 가장 높은 E_{max} 및 가장 낮은 EC₅₀을 가졌다 (도 42). 놀랍게도, Thr로의 N88의 돌연변이는 STF 활성과 적당한 단백질 폴딩 둘 다를 유지하였다 (도 41).

[0259] 다양한 변형된 위치에서의 바람직한 치환은 활성에 기초하여 선택되었고 표 1에 제시되어 있으며, 바람직한 아미노산 치환은 볼드체로 강조 표시되어 있다 (WT는 야생형을 나타냄).

[0260] 표 1.

위치	위치	돌연변이체 1
1	CDR_H2	D62 S, E, A
2	CDR_L1	D25 S, E, A
3	CDR_L2	N51 Q, S, A
4	CDR_L3	N88 Q, S, A, L, E, H, T, R, K, Y, WT

[0261] [0262] 상기 확인된 바람직한 아미노산 치환의 다양한 조합을 포함하는 Wnt 신호전달 인핸서 분자를 만들고 STF 검정, 옥텟 결합 및 다중특이성 검정에 의해 시험하였다. 이들 분자는 표 1의 위치 1-4에서의 하기 아미노산을 포함하였다: EESY, EEAL, EEAE, EEAH, EEAT, EEAY, EEAR, EESN, EEAN, EESL, EESE, EESH, EEST, EESR, 및 EESK. 비환원 및 환원 조건 하에서 SDS-PAGE 분석을 수행하여 단백질 폴딩을 결정하였다 (도 7: 좌측 패널: 레인 1 = 마커, 레인 2-8 = 각각 EESY, EEAL, EEAE, EEAH, EEAT, EEAY, EEAR, 비환원, 및 레인 9-15 = 각각 EESY, EEAL, EEAE, EEAH, EEAT, EEAY, EEAR, 환원; 우측 패널: 레인 1 = 마커, 레인 2-9 = EESN, EEAN, EESL, EESE, EESH,

EEST, EESR, EESK).

[0263] 공급된 Wnt 공급원의 존재 하에 Huh-7 STF Wnt 반응성 리포터 세포에서 Wnt 신호전달을 조정할 수 있는 이들 분자의 능력을 평가하기 위해 STF 검정을 수행하였다. 돌연변이체 1R34-EEST/RA ("EEST"), 1R34-EESA/RA ("EESA"), 1R34-EESN/RA ("EESN"), 1R34-EEAN/RA ("EEAN"), 1R34-EEAT/RA ("EEAT"), 및 1R34-EESK/RA ("EESK")만이 1R34-DDNN/RA 출발 분자 ("NG")와 비슷한 STF 활성을 가졌다 (도 8 및 도 39a-c).

[0264] 도 8에 요약된 바와 같이, EEST, EESN, EEAN 및 EEAT 돌연변이체는 모두 단분산이었고, 액체 질소를 실온으로 동결시키는 사이에 3회의 동결-해동을 포함하는 동결-해동에 대해 안정적이었다. 동결-해동 안정성은 STF 및 SEC에 의해 검정되었다 (데이터 표시되지 않음). ASGR1 항원에 대한 결합이 또한 결정되었다. 도 8 및 도 9에 제시된 바와 같이, 이들 4개의 돌연변이체 및 모 분자는 ASGR1 항원에 대해 유사한 결합 친화도를 가졌다. 인슐린, 헤파린, dsDNA, KLH 및 LPS에 대한 다중특이적 결합을 또한 검사하였다. ELISA는 이들 돌연변이체 간에 헤파린과 비슷한 상호작용을 나타내었다. 고농도에서, 돌연변이체는 또한 dsDNA, KLH 및 LPS에 대해 비슷한 약한 결합을 나타냈지만, 인슐린과는 결합하지 않았다. 따라서, 이들 구축물은 비슷한 활성과 안정성을 보였다.

[0265] RSP02 폴리펩티드에 의한 LGR 결합을 없애기 위해, huRSP02의 Fu2 도메인 내의 2개의 고도로 보존된 소수성 잔기인 F105 및 F109에서 상이한 점 돌연변이를 만들었다. 특히, 이들 잔기는 F105R 및 F109A 또는 F105E 및 F109E로 대체되었다. 표 2는 이러한 변이체 각각에 존재하는 치환의 구체적 조합을 제시한다.

[0266] 표 2.

구축물
α ASGR1-RSP02-EEST-EE (1R34-EEST/EE)
α ASGR1-RSP02-EEST-RA (1R34-EEST/RA)
α ASGR1-RSP02-EEAT-EE (1R34-EEAT-EE)
α ASGR1-RSP02-NG (WT) (1R34-DDNN/NG)

[0267]

이들 분자 각각에 존재하는 경쇄 및 중쇄:RSP02 융합 단백질의 서열은 하기에 제시된다.

[0268]

[0269] α ASGR1-RSP02-EEST-EE (1R34-EEST/EE) 분자의 경쇄 서열은 밑줄 표시된 CDR과 함께 하기에 제공된다:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITC**QGESLRSYYASWYQKPGQAPVLVIYGKSNRPSGI**
PDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDAEDYY**CTSLERIGYLSYVFGGGTKLTVLGQPKA**
APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTSPKQSN
NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (서열식별번호: 7).

[0270]

[0271] α ASGR1-RSP02-EEST-EE 분자에 대한 융합된 RSP02 서열을 갖는 중쇄의 서열은 밑줄 표시된 CDR, 이탤릭체로 표시된 RSP02 서열, 및 볼드체로 표시된 링커 서열과 함께 하기에 제시된다:

*NPICKGCLSCSKDNGCSRC**QOKLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAPDMNRCAR***
*CRINCDSC**ESKDECTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECVEGGGGSGGGG***
SGGGGSEVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
AISGGGSTYYAESYKGRFTISRDN**SKNTLYLQMN**SLRAEDTAVYYCAKDFSSRRW****
YLEYWQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV**PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK**KVEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNV**FSCSV**MHEALHNHYTQKLSL
SPGK (서열식별번호: 8).

[0272]

[0273] 야생형 인간 RSP02 서열과 비교 시 2개의 아미노산 치환이 볼드체, 이탤릭체 및 밑줄체로서 표시된다.

[0274] α ASGR1-RSP02-EEST-RA 분자의 경쇄의 서열은 밑줄 표시된 CDR과 함께 하기에 제공된다:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGESLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIYGKSNRPSGI
 PDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDAADYYCTSLERIGYLSYVFGGGTKLTVLGQPKA
 APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN
 NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (서열식별번호: 9).

[0275]

[0276] α ASGR1-RSP02-EEST-RA 분자에 대한 융합된 RSP02 서열을 갖는 중쇄의 서열은 밑줄 표시된 CDR, 이탤릭체로 표시된 RSP02 서열, 및 볼드체로 표시된 링커 서열과 함께 하기에 제시된다:

NPICKGCLSCSKDNGCSRCQQLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGGYGHRA^{*PM*}NRCAR
 CRIENCDS**CSKDA**CTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMEC**VEGGGGSGGGG**
SGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY**AMS**WVRQAPGKGLEWVS
AISGGSGSTYYAESV**KGR**FTISRDN**SKNT**LYLQMN**SLRA**EDTAVYY**CAKDFSSRRW**
YLEYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK**KVEP**
 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK (서열식별번호: 10).

[0277]

[0278] 야생형 인간 RSP02 서열과 비교 시 2개의 아미노산 치환이 볼드체, 이탤릭체 및 밑줄체로서 표시된다.

[0279] α ASGR1-RSP02-EEAT-EE 분자의 경쇄의 서열은 밑줄 표시된 CDR과 함께 하기에 제공된다:

SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGESLRSYYASWYQQKPGQAPVLVIY**GKANR**PSGI
 PDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDAADYYCTSLERIGYLSYVFGGGTKLTVLGQPKA
 APSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN
 NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (서열식별번호: 11).

[0280]

[0281] α ASGR1-RSP02-EEAT-EE 분자에 대한 융합된 RSP02 서열을 갖는 중쇄의 서열은 밑줄 표시된 CDR, 이탤릭체로 표시된 RSP02 서열, 및 볼드체로 표시된 링커 서열과 함께 하기에 제시된다:

NPICKGCLSCSKDNGCSRCQQLFFFLRREGMRQYGECLHSCPSGGYGHRA^{*PM*}NRCAR
 CRIENCDS**ESKDE**CTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMEC**VEGGGGSGGGG**
SGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSY**AMS**WVRQAPGKGLEWVS
AISGGSGSTYYAESV**KGR**FTISRDN**SKNT**LYLQMN**SLRA**EDTAVYY**CAKDFSSRRW**
YLEYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
 SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK**KVEP**
 KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKF
 NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
 APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
 ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL
 SPGK (서열식별번호: 12).

[0282]

[0283] 야생형 인간 RSP02 서열과 비교 시 2개의 아미노산 치환이 볼드체, 이탤릭체 및 밑줄체로서 표시된다.

[0284] 도 10에 제시된 바와 같이, 돌연변이 F105E와 F109E의 조합 (SWEETS-1_RSP02EE_NG_EEST_G4S; 1R34-EEST/EE)은 특히 Huh-7 세포에서 돌연변이 F105R과 F109A의 조합 (SWEETS-1_NG_EEST_G4S; 1R34-EEST/RA)과 비교 시 STF 검정에서 시험관내 활성이 적었으며, 후자는 거의 6배 더 강력하였다. 그러나, 놀랍게도, 이러한 더 큰 시험관내 활성은 돌연변이 F105R과 F109A의 조합에 대한 증가된 생체내 활성으로 해석되지 않았다. 그 대신에, SWEETS-1_NG_EEST_G4S (1R34-EEST/RA) 또는 SWEETS-1_RSP02EE_NG_EEST_G4S (1R34-EEST/EE)로 처리된 비-인간 영장류에서 Axin mRNA 발현 수준을 분석했을 때, 돌연변이 F105E와 F109E의 조합은 돌연변이 F105R과 F109A의 조합과 비교 시 Axin2 발현에서 동등하거나 더 큰 증가를 보였으며 (도 11), 이는 시험관내 효능의 반대이다.

[0285] 8M24-v1 분자 변형

[0286] 8M24 기반 αASGR1-RSPO2 Wnt 신호전달 인핸서 분자 (8M24-v1)의 다양한 아미노산 변형을 만들고 개선된 특성을 가진 분자를 확인하기 위해 시험하였다.

[0287] 초기에는, 출발 8M24 항체 서열의 VH 및 VL 도메인을 각각 2가지 상이한 방식 (H1, H2, V1 및 V2)으로 인간화하였다. 원래 및 인간화 VH 및 VL 서열은 도 25에 제시되어 있다 (서열식별번호: 13-18). 인간화 VH 및 VL 서열의 다양한 조합을 조합하고, 모 8M24 IgG1 불변 영역의 맥락에서, 모 8M24 VH 및 VL 서열과 비교 시 인간 ASGR1에 대한 그들의 결합 친화도에 관하여 시험하였다. 표 3에 제시된 바와 같이, L1 및 H1 인간화 VL 및 VH 쌍의 조합은 인간 ASGR1에 대한 동역학적 결합에 미치는 영향이 최소화되는 것에 기초하여 선택되었다.

[0288] 표 3.

VH 및 VL	KD	kon	koff
모체	<1E-12	5.89E5	<1E-7
L1H1	5.73E-12	4.6E5	2.64E-6
L1H2	<1E-12	5.11E5	<1E-7
L2H1	<1E-12	4.89E5	<1E-7
L2H2	1.10E-10	5.73E5	6.29E-5

[0289]

[0290] 잠재적인 탈아미드화 또는 Asp 이성질체화 책임은 Wnt 신호전달 인핸서 분자의 8M24 ASGR1 결합 IgG 부분의 CDR에서 확인되었다 (도 26에 볼드체로 표시됨). 이들 아미노산 각각은 도 26에 제시된 다양한 아미노산에 의해 치환되었고 상기 기재된 바와 같이 STF 검정에서 L1H1-인간화 8M24-기반 αASGR1-RSPO2 Wnt 신호전달 인핸서 분자의 맥락에서 시험되었다. RSPO2 서열은 상기 기재된 F105R 및 F109A 치환을 포함하였다. 단일 돌연변이의 맥락에서 시험할 때, 경쇄 D56E 돌연변이체가 선택되었고, 중쇄 N31A 돌연변이체는 그 위치에서 가장 강력한 돌연변이였으며 또한 선택되었다. 중쇄 N57Q, S 및 A 돌연변이체는 모두 거의 동일하게 잘 작동하였다. D102E 돌연변이체가 또한 선택되었다. D110에서의 3개의 돌연변이는 모두 효능이 좋지 않았으므로, 야생형 D110 잔기가 선택되었다 (데이터는 제시되지 않음). D56E 돌연변이를 포함하는 경쇄는 상기 확인된 다양한 중쇄 돌연변이와 조합하여 시험되었고, 이는 도 27에 제시되어 있다. 도 27에 제시된 바와 같이, N31A, N57S 및 D102E에서의 중쇄 돌연변이를 포함하는 돌연변이체 (EASE)가 가장 뛰어난 활성을 가졌다. 단백질 폴딩, HIC, 다중특이성, Tm/Tagg, 안정성 및 옥텟 Kd를 포함한, 다양한 다른 검정에서 다양한 조합 돌연변이체를 시험하였다. 이들 검정의 결과가 도 28에 요약되어 있다. EASE 돌연변이체는 활성과 옥텟 Kd의 최상의 조합을 가졌다. 그의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드의 서열은 밑줄 표시된 CDR과 함께 하기에 제시되어 있다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRISENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLIYAAINLAEGVP
 SRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQHFWGTPFTFGQGTKLEIK (서열식별번호:
 19).

[0291]

[0292] RSPO2 변이체 서열과 융합된 중쇄 가변 도메인의 서열은 RSPO2 서열이 이탤릭체로 표시되고, 링커가 볼드체로 표시되고, CDR에 밑줄 표시되어 하기에 제시되어 있다:

NPICKGCLSCSKDNGCSCRCQQLKFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAPDMNRCAR
*CRIENCDSCKD***ACTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFAPLEETMECVEGGGGSGGGG**
SGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTAYGINWVRQAPGGLEWM
GEIFPRSDSTFYAQKFQGRVITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARKGREYGT
HYFDYWGQGTTVTVSS (서열식별번호: 20).

[0293]

[0294] 전체 중쇄는 또한 서열식별번호:에 제시된 바와 같은 불변 영역 서열을 포함하였다.

[0295] 상기 연구에 기초하여, 우수한 특성을 제공하기 위해 경험적으로만 결정될 수 있는 돌연변이의 특이적 조합을 갖는 Wnt 신호 인핸서 분자가 확인되었다.

[0296] 실시예 2

[0297] 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 생체내 간 효과

[0298] 실시예 1에 기재된 αASGR1-RSPO2 구축물이 생체내에서 조직 특이적 방식으로 Wnt-신호전달 경로를 활성화시킬 수 있었는지를 입증하기 위해, 마우스를 다양한 구축물로 처리하였다.

- [0299] Wnt 신호전달 인핸서 분자에 의한 Wnt-신호전달 경로의 조직 특이적 활성화를 분석하기 위해, 나이브 마우스에게 10 mg/kg의 α ASGR1-RSPO2-EEST-EE (1R34-EEST/EE), R-spo2 또는 대조군 (항- β gal 또는 항-GFP-mutRSPO) (그룹당 n=5 마우스)을 단일 i.p. 용량으로 투여하였다. EEST는 도 1의 위치 1-4에 존재하는 치환을 나타내고, 하기 EE는 RSPO2 영역에서의 N105E 및 N109E 치환을 나타낸다. 처리 후 48시간에, 분석을 위해 다양한 기관 및 조직을 수집하였다. Axin2/ActB 유전자 발현을 결정하고 대조군에 대해 정규화하였다. Axin2 mRNA 수준은 Rspo2로 처리한 후 대부분의 조직에서 유의미하게 증가되었다. 그러나, α ASGR1-RSPO2-EEST-EE는 간에서 Axin2 mRNA의 증가만을 초래하였다 (도 12). 각각의 조직에 대해, 좌측에서 우측으로 항-bgal, 항-GFP-mutRSPO, α ASGR1-RSPO2-EEST-EE 및 RSPO2가 표시된다. 그 결과로 생성된 데이터는 Wnt 신호 증강 분자가 간에서 Wnt 경로를 선택적으로 활성화시킨다는 것을 제시하였다 (도 12).
- [0300] 간 및 소장에서의 Ki67의 mRNA 및 단백질 발현은 RT-PCR 및 면역형광에 의해 결정되었고, HNF4 α 의 단백질 발현은 면역형광에 의해 결정되었다. 항원 Ki-67은 증식의 세포 마커와 연관되어 사용되는 핵 단백질이며, 간세포 핵 인자 4a (HNF4 α)는 간 분화에 중요한 역할을 하는 고아 핵 수용체이다. 도 21 및 22에 제시된 바와 같이, α ASGR1-RSPO2-EEST-EE (EE)는 간세포의 증식을 자극했지만 (도 21), 소장 세포의 증식은 자극하지 않았다 (도 22). 또한, α ASGR1-RSPO2-EEST-EE로 처리된 동물의 간은 면역형광에 의해 Ki67과 HNF4 α 의 발현을 보였다.
- [0301] Wnt-신호전달 경로의 활성화 시 상황 조절된 유전자의 발현을 분석하기 위해, 나이브 마우스에게 10 mg/kg의 α ASGR1-RSPO2-EEST-EE (1R34-EEST/EE), α ASGR1-RSPO2-EEST-RA (1R34-EEST/RA) 또는 α GFP-IgG (그룹당 n=20 마우스)를 단일 i.p. 용량으로 투여하였다. 발현 분석을 위해 단백질 투여 후 1시간, 4시간, 24시간 및 72시간에 혈청 및 간 샘플을 수집하였다 (각각의 시점에서, 각각의 그룹에 대해 n=5). mRNA 발현을 qPCR로 분석하고, 샘플을 ActB에 대해 정규화하였다. 상대 배수는 1시간에서 항-GFP 그룹의 평균을 1의 값으로 설정함으로써 계산되었다.
- [0302] α ASGR1-RSPO2-EEST-EE 또는 α ASGR1-RSPO2-EEST-RA로 처리하면, α GFP-IgG 음성 대조군으로 처리된 마우스에서의 발현과 비교할 때 간 Axin2, Ccnd1 및 Notum의 발현이 유의미하게 유도되었다 (도 13; 각각의 시점에서 좌측에서 우측으로: α GFP-IgG, α ASGR1-RSPO2-EEST-EE 및 α ASGR1-RSPO2-EEST-RA; 이원 ANOVA 분석, 항-GFP에 대한 홀름-시닥(Holm-Sidak) 다중 비교, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001). 이러한 결과는 α ASGR1-RSPO2 변이체가 생체내 간에서 Wnt 경로를 활성화시킨다는 것을 입증해준다.
- [0303] 또 다른 연구에서, 마우스에게 10 mg/kg의 α ASGR1-RSPO2-EEST-EE, α ASGR1-RSPO2-EEST-RA 또는 α GFP-IgG (그룹당 n=5 마우스)를 단일 i.p. 용량으로 투여하였다. 발현 분석 및 조직면역화학을 위해 간 샘플을 1시간, 4시간, 24시간 및 72시간 후에 수집하였다. α ASGR1-RSPO2-EEST-EE 또는 α ASGR1-RSPO2-EEST-RA로 처리하면, α GFP-IgG 음성 대조군으로 처리된 마우스와 비교할 때 세포 증식 마커 유전자 Mki67의 발현이 유도되었다 (도 14a; 각각의 시점에서 좌측에서 우측으로: α GFP-IgG, α ASGR1-RSPO2-EEST-EE, 및 α ASGR1-RSPO2-EEST-RA; 이원 ANOVA 분석, 항-GFP에 대한 홀름-시닥 다중 비교, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001). 이러한 결과는 α ASGR1-RSPO2 변이체가 간 실질 세포에서의 증식을 자극할 수 있다는 것을 입증해준다. 부가의 연구는 이러한 효과가 용량 의존적임을 제시하였다 (도 14b).
- [0304] 마우스 간에서의 인간 ASGR1의 발현은 α ASGR1-RSPO2 구축물로 처리하기 7일 전에 내인성 간 Asgr1 mRNA와 동등한 트랜스진 발현 수준을 달성하는 것으로 제시된 용량인 마우스당 1×10^{11} 개의 게놈 입자를 사용하여, ssAAV8-CAG-hASGR1의 IV 주사에 의해 유도되었다 (데이터는 제시되지 않음).
- [0305] Wnt 신호전달 경로에 의해 조절되는 유전자의 발현을 유도할 수 있는 원래 8M24-RA 분자 (8M24-v1) 및 8M24-RA EASE 돌연변이체 (8M24-EASE)의 능력이 입증되었다. 마우스에게 8M24-RA (8M24-v1) 또는 8M24-RA EASE (8M24-EASE-RA; 1, 3, 10 또는 30 mg/kg), 항-GFP (10 mg/kg), 또는 α ASGR1-RSPO2-EEST-EE (1R34-EEST/EE)를 정상적인 IgG1 포맷 대신 IgG2 포맷으로 단일 i.p. 용량으로 투여하였다. 혈청 및 간 샘플을 처리 후 24시간, 48시간 또는 72시간에 수집하였다 (각각의 시점에서 n=4). qPCR에 의한 mRNA 발현은 Actb에 대해 정규화되었다. 각각의 시점에 대해 항-GFP 그룹의 평균을 1로 설정하여 상대 배수를 계산하였다. 도 29에 제시된 바와 같이, 8M24-RA는 Wnt 신호 표적 유전자 Axin2 및 Ccnd1, 및 증식 마커 Mki67의 발현을 유도하였다. 도 30에 제시된 바와 같이, 8M-24-EASE-RA는 또한 Wnt 신호 표적 유전자 Axin2 및 Ccnd1, 및 증식 마커 Mki67의 발현을 유도하였다. 8M24-RA 및 8M-24-EASE-RA 둘 다는 또한 혈청 ALP의 제거에서 ASGR의 역할과 일치하는, ALP의 작지만 유의미한 용량-의존적 증가를 유도하였다 (데이터는 제시되지 않음).
- [0306] 실시예 3

- [0307] 간-특이적 Wnt 신호 증강 분자의 약동학적 프로파일
- [0308] Wnt 신호 증강 분자의 약동학적 프로파일을 마우스에서 조사하였다. 마우스를 6개의 그룹 (그룹당 n=25)으로 나누고, 이들에게 EEST-EE 구축물의 단일 용량을 3, 10, 30, 100 mg/kg으로 IV 투여하거나 또는 10 또는 30mg/kg으로 i.p. 투여하였다. 각각의 시점에서 단백질 투여 후 5분 및 30분 (IV), 30분 및 1시간 (i.p.) 및 2시간, 6시간, 24시간, 제4일, 제7일, 제10일 또는 제14일 (IV 및 i.p.)에 혈청 샘플 (희소)을 수집하였다 (각각의 그룹에 대해 n=5). ASGR1 또는 RNF43 포획 리간드로 ELISA를 수행하여 EEST-EE의 혈청 수준을 정량화하였다. 클리어런스, 말기 반감기, Cmax 및 MRT는 도 15의 표에 제시되어 있다. 간 샘플은 단백질 투여 후 30분 (IV), 1시간 (i.p.), 6시간, 24시간, 제7일 또는 제14일 (IV 및 i.p.)에 종료 시 수집하였다 (각각의 시점에 대해 n=5). 각각의 시점에 대해 항-GFP 그룹의 평균을 1로 설정하여 상대 배수를 계산하였다. 도 15에 제시된 바와 같이, 1R34-EEST/EE는 용량 증가에 대한 비-선형 PK 반응을 나타냈다. IV 투여와 i.p. 투여 사이에 수득된 AUC의 비교는 높은 생체이용률을 나타내었다.
- [0309] 1R34-EEST/RA, 1R34-EEST/EE, 8M24-EASE-RA, 및 8M24-EASE-EE 구축물을 비교하기 위해 유사한 연구를 수행하였다. 그 결과가 도 31에 제공된다.
- [0310] 실시예 4
- [0311] 간-표적화된 Wnt 신호 증강 분자는 간 섬유증의 마우스 모델에서 간 기능을 개선시킨다.
- [0312] 간 기능에 대한 Wnt 신호전달 인핸서 분자의 효과를 간 섬유증의 2가지 마우스 모델에서 조사하였다.
- [0313] 간 섬유증의 만성 티오아세트아미드-유발 마우스 모델을 사용하였다. 6주령의 C57Bl/6J 수컷 마우스를 티오아세트아미드 (TAA)로 처리하였다. TAA는 간 섬유증을 유발하기 위해 13주 동안 200 mg/L의 농도로 음용수에 부가되었다. 또한, TAA 컨디셔닝의 마지막 8주 동안, 마우스에게 TAA를 매주 3회 i.p. 투여하였다. αASGR1-RSPO2 단백질을 투여하기 2일 전에 TAA 처리를 중단하고, 마우스에게 정제된 실험실 등급의 산성화된 음용수를 제공하였다. 도 16에 도표로 나타낸 바와 같이, 마우스에게 재조합 αASGR1-RSPO2-EEST-EE (1R34-EEST/EE) 또는 αASGR1-RSPO2-EEST-RA (1R34-EEST/RA)를 매일 복강내 (i.p.) 주사하거나, 또는 αGFP-IgG 또는 Rspo2를 1주 동안 매주 2회 복강내 주사하였다.
- [0314] 도 16에 나타낸 시간에, 로슈(Roche) CoaguChek - XS Plus를 사용하여 INR을 측정하였다. 투여 시작 후 3, 10 및/또는 30일에, 마우스를 이소플루란으로 마취시키고 심장 천자에 의해 혈액을 제거하였다. 왼쪽 간엽과 십이지장의 일부분을 분석을 위해 수집하였다. 포르말린 고정 및 파라핀 포매 간 샘플을 절개하고 항-Ki-67 토끼 항체 (압캡, ab15580)로 염색하였다. 이미지 J를 사용하여, 무작위로 선택한 필드 (10x 대물렌즈를 사용하여 100x 배율)당 Ki-67 양성 핵의 수를 카운트하였다. αASGR1-RSPO2-EEST-EE (1R34-EEST/EE)로 처리하면, INR이 유의미하게 감소한 반면 αASGR1-RSPO2-EEST-RA (1R34-EEST/RA) 또는 Rspo2로 처리하면 그렇지 않았다 (도 17a; 일원 ANOVA 분석, 항-GFP와의 비교; (*) p < .05, (**) p < .01, (***) p < .001, (****) p < .0001). αASGR1-RSPO2-EEST-EE 또는 Rspo2로 처리하면, *axin2* 및 *CYP2e1* mRNA 발현이 유의미하게 증가한 반면, αASGR1-RSPO2-EEST-RA로 처리하면 *axin2* 및 *CYP2e1* mRNA 발현이 더 작긴 하지만 유의미하게 증가하였다 (도 17b 및 17c; (*) p < .05, (**) p < .01, (***) p < .001, (****) p < .0001). Ki67 면역형광 염색은 또한 TAA-유발 손상 모델에서 간세포 특이성을 확인시켜 주었다 (도 18).
- [0315] αASGR1-RSPO2-EEST-EE의 효과가 또한 CC14-유발 손상 모델에서 조사되었다. CC14 i.p. C57Bl/6J 수컷 마우스에게 11주 동안 매주 2회 CC14를 i.p. 주사 투여하였다. 마우스의 대조군 그룹에게는 올리브 오일만을 i.p. 주사 투여하였다 (n=8). CC14 처리를 중단하고 마우스를 10개 그룹 (n=8)으로 나누어 다양한 투여량 (mg/kg)의 αASGR1-RSPO2-EEST-EE 또는 αASGR1-RSPO2-EEST-RA를 매일 또는 q.o.d 투여하거나 항-GFP (10 mg/kg) 또는 RSPO2 (4.6 mg/kg)를 매주 2회 투여하였다. 혈액 및 간 샘플은 제7일 또는 제14일에 종료 시 수집되었다.
- [0316] 도 19에 제시된 바와 같이, αASGR1-RSPO2-EEST-EE는 제7일에 *Axin2* 및 *Mki67* mRNA의 수준을 유의미하게 유도하였다. αASGR1-RSPO2-EEST-RA를 사용한 경우보다 αASGR1-RSPO2-EEST-EE를 사용한 경우에 *Axin2*, *Ccnd1* 및 *Mki67* mRNA에서의 더 큰 증가가 관찰되었다. 또한, 면역형광을 통해 이러한 증가가 간세포-특이적임을 확인하였다 (도 20).
- [0317] 실시예 5
- [0318] Wnt 신호 증강 분자는 간 합성 기능을 개선시키고 섬유증을 감소시킨다.

[0319] 6주령의 C57B1/6J 수컷 마우스를 티오아세트아미드 (TAA)로 처리하였다. TAA는 간 섬유증을 유발하기 위해 18 주 동안 200 mg/L의 농도로 음용수에 추가되었다. 또한, TAA 컨디셔닝의 마지막 7주 동안 마우스에게 TAA를 매주 3회 i.p. 투여하여 간 섬유증을 유발하였다. αASGR1-RSPO2-EEST-EE (1R34-EEST/EE)를 투여하기 2일 전에 TAA 처리를 중단하였으며 마우스에게 정제된 실험실 등급의 산성화된 음용수를 제공하였다. 마우스에게 제조합 αASGR1-RSPO2-EEST-EE 또는 음성 대조군을 14일 동안 매일 10 mg/kg으로 복강내 (i.p.) 주사하였다.

[0320] 도 16a에 표시된 시간에, 로슈 CoaguChek - XS Plus를 사용하여 INR을 측정하였다. INR (내재화된 정규화 비율)은 혈전 형성 속도를 측정한다. 높은 INR 수치는 간 질환 또는 간경변증을 반영하며, 이와 관련하여 정상적인 양의 단백질을 생산할 수 없고 최적의 혈액 응고가 이루어지지 않는다는 것을 나타낸다. 투여 시작 후 3, 7, 14일에, 마우스를 이소플루란으로 마취시키고 심장 천자에 의해 혈액을 제거하였다. αASGR1-RSPO2-EEST-EE로 처리하면, 대조군과 비교 시 INR이 유의미하게 감소되었다 (도 16b). 이러한 섬유증 마우스 모델에서, Rspo 및 αASGR1-RSPO2-EEST-EE 둘 다를 사용한 단기 처리는 섬유증에서의 완만하고 가변적인 감소를 초래하였다 (데이터는 제시되지 않음).

[0321] 실시예 6

[0322] 간 섬유증의 만성 CCl₄-유발 마우스 모델에서 간 기능에 대한 조직-표적화된 RSPO 모방체의 효과

[0323] 간 섬유증은 또한 간 섬유증의 만성 CCl₄-유발 마우스 모델을 사용하여 조사되었다. 특히, CCl₄-유발 간 섬유증에 대한 1R23-EEAT/EE의 효과를 면역결핍 및 면역적격 마우스에서 비교하였다.

[0324] 32마리의 6주령 C57BL/6J 수컷 마우스 (잭슨 래보러토리즈)와 32마리의 NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J (SCID) 마우스에게 10주 동안 CCl₄ (0.5 mL/kg, 2회/주)를 복강내 주사하였다. 각각의 계통의 16마리의 마우스에게 올리브 오일 운반체 (0.5 mL/kg)를 복강내 주사하였다. CCl₄ 처리 후, CCl₄ 처리 유무에 관계없이 각각의 계통의 8마리 마우스를 종료시키고 기준선 측정을 위해 혈액과 조직을 수집하였다. 나머지 CCl₄ 처리된 마우스는 체중을 기준으로 여러 처리 그룹으로 무작위 배정되었고 (표 4), 2주 동안 단백질이 투여되었다. 처리 그룹은 각각의 계통에 대해 하기와 같다: 20 mg/kg 1R34-EEAT/EE, n=8 (매일 투여); 4.6 mg/kg Fc-RSPO2-WT, n=8 (주당 2회 투여); 10 mg/kg 항-GFP, n=8 (주당 2회 투여). 이전에 오일만 주사한 부가의 대조군 그룹, n=8이 포함되었다. 혈청 화학 검사를 위해 제7일 (단백질 투여 첫날이 제0일로 표시됨)에 마우스로부터 혈액을 채취하였다. 마우스는 제14일에 종료시켰다. 총 체중과 간 중량을 측정하고, 혈액, 간 조직을 수집하여 시험을 위해 보존하였다.

[0325] 표 4는 CCl₄-유발 마우스 섬유증 모델에 대한 처리 그룹의 설명을 제공한다. 면역결핍의 NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J 수컷 또는 면역적격의 C57BL/6J 수컷은 올리브 오일 운반체에 희석된 CCl₄ 또는 올리브 오일 단독으로 사전 컨디셔닝되었다. 마우스를 표시된 바와 같이 그룹 A 내지 L로 나누었다. 그런 다음 표시된 용량 및 빈도로 마우스에게 시험 항목을 주사한 후, 제0일의 기준선 또는 시험 항목 투여 시작 후 14일에 종료하였다.

[0326] 표 4. CCl₄-유발 섬유증 처리 그룹

그룹	계통	N	CCl ₄	시험 항목	용량 (mpk)	빈도	종료	
A	NOD.CB17-Prkdc ^{scid} /J	8	오일	없음	0		기준선	
B		8	✓	없음	0		기준선	
C		8	오일	없음	0		제 14일	
D		8	✓	항-GFP	10		2x/wk	제 14일
E		8	✓	EEAT/EE	20		q.d.	제 14일
F		8	✓	RSPO2	4.6		2x/wk	제 14일
G	C57BL/6J	8	오일	없음	0		기준선	
H		8	✓	없음	0		기준선	
I		8	오일	없음	0		제 14일	
J		8	✓	항-GFP	10		2x/wk	제 14일
K		8	✓	EEAT/EE	20		q.d.	제 14일
L		8	✓	RSPO2	4.6		2x/wk	제 14일

[0327]

[0328] 간 대 체중 비율은 RSPO 모방체, 1R34-EEAT/EE로 처리된 그룹 뿐만 아니라 RSPO2 양성 대조군으로 처리된 그룹에서 유의미하게 상승되었다 (도 32).

[0329] 단백질 처리 1주 및 2주 후 시점에서, 혈청 알칼리성 포스파타제 (ALP) 및 알부민을 측정하였다. 마우스 혈청

을 제7일에 꼬리 출혈 및 제14일에 종료 출혈로부터 수집하고 베타악셀 (알파-와서만)을 사용하여 분석하였다. 데이터는 도 33a 및 33b에 제시되어 있다. 혈청 ALP는 ASGR1-KO 마우스 모델에서 기재된 바와 같이 ASGR 수용체의 제거로 인한 알칼리성 포스파타제 단백질 수준의 상향 조절과 일치하여, 1주 및 2주 시점 둘 다에서 통계적으로 더 높았다 (예를 들어, 문헌 [Cell Host Microbe. 2018 Oct 10;24(4):500-513] 참조). 혈청 알부민 수치는 RSP02 및 1R34-EEAT/EE에 대한 반응으로 상당히 감소되었다. 이러한 결과는 증가된 Wnt 신호전달에 의해 유발된, 중심 주변 간세포 확장 증가로 인해 문맥주위 간세포의 기능이 일시적으로 감소할 것으로 예상된다는 것을 시사한다.

[0330] 간 유전자 발현에서의 변화를 측정하기 위해 정량적 PCR을 사용하였다. 마우스를 RSP02 또는 1R34-EEAT/EE로 처리하면, SCID 마우스에서 Wnt-유도성 *Axin2* 유전자의 발현이 증가하였지만 제14일에 C57BL/6J 마우스에서는 그렇지 않았다. 이들 결과는 시험 항목 활성이 2주 후에 면역결핍 마우스에서는 지속되지만 면역적격 마우스에서는 그렇지 않다는 것을 시사한다.

[0331] RSP02 및 1R34-EEAT/EE로 처리하면 또한, 1R34-EEAT/EE 처리 후 간에서 *Mki67* 및 사이클린 D1 (*Ccnd1*) 증식 마커가 증가하는 경향이 있고 RSP02 처리 후에는 상당히 증가하는 것으로 밝혀졌다 (도 34). 간 절편의 면역형광 염색은 Ki67-HNF4 α 이중 양성 세포의 수가 SCID 마우스로부터의 RSP02 및 1R34-EEAT/EE 간 샘플에서 증가되었다는 것을 제시하였다 (도 35). C57BL/6J 마우스로부터의 간 샘플에서도 유사한 결과가 획득되었다 (데이터는 제시되지 않음). 이러한 결과는 RSP02 및 1R34-EEAT/EE가 간세포의 증식을 촉진시킨다는 것을 시사한다.

[0332] 섬유증 수준을 측정하기 위해 조직학적 간 절편을 시리우스 레드로 염색하였다 (도 36a). 시리우스 레드로 염색된 영역을 이미지 J (NIH)에 의해 정량화하였다 (도 36b). 이러한 결과는 1R34-EEAT/EE가 면역적격 및 면역결핍 마우스 둘 다에서 시리우스 레드로 염색된 콜라겐 섬유 영역 백분율을 상당히 감소시켰다는 것을 제시한다. RSP02는 SCID 마우스에서 유의미하지는 않지만 시리우스 레드로 염색된 영역 백분율도 감소시킨다.

[0333] 종합하면 이들 데이터는 RSP0 모방체인 1R34-EEAT/EE가, 마우스 간이 섬유증을 해결하고 기능적 간세포를 재생할 수 있는 속도에 상당한 영향을 미친다는 것을 시사한다.

[0334] 실시예 7

[0335] 간-표적화된 RSP0 Wnt 신호 증강 분자는 WNT 신호전달을 활성화시키고 비-인간 영장류에서의 표적과 맞물린다.

[0336] 비-인간 암컷 영장류는 제1일과 제15일에 정맥내 볼루스에 의해 10 mg/kg의 α ASGR1-RSP02-EEST-EE (1R34-EEST/EE), α ASGR1-RSP02-EEST-RA (1R34-EEST/RA), 8M24 α ASGR1-RSP02-EASE-RA (M24-EASE/RA), 8M24-EASE-RSP02-EASE-EE (8M24/EASE/EE) 또는 비히클 대조군으로 처리된 다음, 제16일에 두 번째 투여 후 24시간에 종료되었다. 간 샘플을 수득하여 혈액학적 분석 및 조직병리학을 실시하였다. 간 샘플을 qPCR로 *AXIN2* 발현에 대해 분석하고 *ACTB* 발현에 대해 정규화하였다. 비히클 그룹의 평균값을 1로 설정하여 상대 배수를 계산하였다. 평균 +/- SEM. 일원 ANOVA 분석, 비히클에 대한 홀름-시닥 다중 비교, * $p < 0.05$.

[0337] α ASGR1-RSP02-EEST-EE, α ASGR1-RSP02-EEST-RA, 8M24 α ASGR1-RSP02-EASE-RA, 또는 8M24-EASE-RSP02-EASE-EE로 처리하면, 예정되지 않은 사망이 없고, 비정상적인 임상 관찰이 없으며, 체중 또는 음식 섭취량에서의 변화가 초래되지 않았다. *Axin2* mRNA 수준은 간에서 상당히 증가하였고, α ASGR1-RSP02-EEST-RA로 처리한 경우보다 α ASGR1-RSP02-EEST-EE, 8M24 α ASGR1-RSP02-EASE-RA, 또는 8M24-EASE-RSP02-EASE-EE로 처리한 후에 약간 더 높았다 (도 11). 임상 병리와 관련하여, 혈액학에서의 실질적인 변화는 없었지만, ASGR1에 대한 분자의 결합과 일치하는 ALP의 실질적이고 일시적인 증가가 있었으므로, 이러한 수용체에 의한 ALP의 클리어런스를 억제하였다 (도 24).

[0338] 이러한 연구는 Wnt 신호전달 인핸서 분자가 비-인간 영장류에서 내약성이 우수하며 또한 활성이라는 것을 명확하게 제시한다.

[0339] 실시예 8

[0340] 인간 ASGR1-CBD:8M24 복합체의 결정 구조

[0341] 주로 포유동물 간 세포 (간세포)에서 발현되는 C-유형 렉틴인 아시알로당단백질 수용체 (ASGR; ASGPR)는 수용체 매개 세포내이입을 통해 탈시알틸화된 갈락토스- 또는 N-아세틸갈락토사민-종결 혈장 당단백질의 클리어런스를 매개한다. ASGR의 어셈블리는 각각 H1 및 H2로서 지칭된 2개의 ASGR1 및 1개의 ASGR2 폴리펩티드로 구성된 이종삼량체인 것으로 생각된다. 구조적으로, ASGR1 (H1) 및 ASGR2 (H2) 폴리펩티드 둘 다는 짧은 N-말단 세포질 도메인에 이어 단일 막횡단 나선, 및 코일드-코일 구조를 통해 올리고머화를 매개하는 나선형 줄기 영역과 그의

C-말단에서의 탄수화물 결합 도메인 (CBD)을 포함하는 외질 영역을 갖는 유형-II 막 단백질이다. 인간 ASGR1과 ASGR2는 그들 사이에 54%의 서열 동일성을 공유한다.

[0342] 8M24로 명명된 항체의 Fab 도메인과 복합체를 형성한 인간 ASGR1-CBD (HuASGR1-CBD) 도메인 (유니프로트 항목 P07306의 잔기 154 내지 291; <https://www.dot.uniprot.org/uniprot/P07306>)의 결정 구조를 결정하였다. N-말단에 옥타-히스티딘 모티프 및 비오틴 수용체 펩티드 (BAP)를 함유하는 구조적 연구에 사용된 HuASGR1-CBD 구조물의 서열은 하기와 같다:

HuASGR1-CBD_P07306_154-291
 HHHHHHHHSGSGSLNDIFEAQKIEWHESGSGCPVNWVEHERSCYWFSRSGKAWAD
 ADNYCRLEDAHLVVVTSWEEQKFVQHHIGPVNTWMGLHDQNGPWKWVDGTDYE
 TGFKNWRPEQPDDWYGHGLGGGEDCAHFTDDGRWNDDVCQRPYRWVCETELDK
 ASQEPPLL (서열식별번호: 52).

[0343]

[0344] 구조적 연구를 위한 HuASGR1-CBD의 발현 및 정제

[0345]

HuASGR1-CBD를 발현하는 플라스미드는 제조업체 [폴리플러스 트랜스펙션 (Polyplus Transfection; 미국 뉴욕주)]로부터의 표준 프로토콜에 따라 팩토프로 (FectoPro) 형질감염제를 사용하여, 전형적으로 1000 mL 규모로 Expi293 세포 (썬코퍼서; 미국)에서의 발현을 위해 형질감염되었다. 4일간의 연속 세포 성장 후, 배지를 원심분리에 의해 수거하고, HuASGR1-CBD를 50 mM 인산이수소나트륨 pH 8.0, 300 mM NaCl에 미리 평형시킨 HisComplete 수지 (배양액 L당 1 mL; 로슈)와 인큐베이션함으로써 배지로부터 정제하며, 10 mM 이미다졸로 세척하고, 평형화 완충액 중에서 250 mM 이미다졸로 용출시켰다. 용출액을 5 mL로 농축시키고, HBS (20 mM HEPES pH 7.4 및 150 mM 염화나트륨)로 미리 평형시킨 하이로드(HiLoad) 16/600 슈퍼텍스 200 pg 컬럼 [GE 라이프 사이언스(GE Life Sciences)]에서 추가로 연마하였다. 주요 피크 부근의 분획을 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 [SDS-PAGE; Tris-HCl 4-15% 겔; 바이오-래드 (Bio-Rad; 미국 캘리포니아주 헤라클레스)]에 의해 추가로 분석하여 함량을 확인하였다. 샘플은 램리(Laemmli) 샘플 완충액에서 준비되었고 100°C에서 5분 동안 가열되었다. HuASGR1-CBD를 함유하는 분획을 1.78 mg/mL로 농축시키고 추가 사용시까지 -80°C에서 저장하기 위해 10% 글리세롤의 존재 하에 동결시켰다. 다이렉트 UV A280 방법으로 나노드롭(NanoDrop) 분광광도계 (썬코퍼서)를 사용하여 단백질 농도를 결정하였다. 단백질 농도에 대한 흡광도의 관계는 비어-램버트(Beer-Lambert) 방정식 $A = \epsilon lc$ 에 기초하여 선형이며; 여기서 A는 흡광도 값이고, ϵ 는 파장-의존적 흡광 계수이며, l은 센티미터 단위의 경로 길이이고, c는 단백질 농도이다. 생산된 모든 단백질의 흡광 계수는 그의 아미노산 서열에 의해 추정되었다.

[0346]

[0347] 8M24 Fab의 발현 및 정제

[0347]

8M24 Fab (SZP19057+19056에 상응하는 L1H1 버전)의 경쇄 및 중쇄 (C-말단에 핵사-히스티딘 태그 포함)를 발현하는 플라스미드는 제조업체 (폴리플러스 트랜스펙션; 미국 뉴욕주)로부터의 표준 프로토콜에 따라 팩토프로 형질감염제를 사용하여, 전형적으로 1000 mL 규모로 Expi293 세포 (썬코퍼서; 미국)에서의 발현을 위해 형질감염되었다. 4일간의 연속 세포 성장 후, 배지를 원심분리에 의해 수거하고, PBS에 미리 평형시키고 PBS 중 250 mM 이미다졸을 사용하여 중력 흐름 하에 용출된 Complete-His 수지 (배양액 1 L당 2.5 mL; 로슈)와 결합시켰다. Fab 결합제를 함유하는 용출액을 ~5 mL로 농축시키고, HBS로 미리 평형시킨 하이로드 16/600 슈퍼텍스 200 pg 컬럼 (GE 라이프 사이언스)에서 추가로 연마하였다. 주요 피크 부근의 분획을 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE; Tris-HCl 4-15% 겔; 바이오-래드; 미국 캘리포니아주 헤라클레스)에 의해 추가로 분석하여 함량을 확인하였다. 샘플은 램리 샘플 완충액에서 준비되었고 100°C에서 5분 동안 가열되었다. 8M24 Fab를 함유하는 분획을 7.12 mg/mL로 농축시키고 추가 사용시까지 -80°C에서 저장하기 위해 10% 글리세롤의 존재 하에 동결시켰다. 다이렉트 UV A280 방법으로 나노드롭 분광광도계 (썬코퍼서)를 사용하여 단백질 농도를 결정하였다. 단백질 농도에 대한 흡광도의 관계는 비어-램버트 방정식 $A = \epsilon lc$ 에 기초하여 선형이며; 여기서 A는 흡광도 값이고, ϵ 는 파장-의존적 흡광 계수이며, l은 센티미터 단위의 경로 길이이고, c는 단백질 농도이다. 생산된 모든 단백질의 흡광 계수는 그의 아미노산 서열에 의해 추정되었다.

[0348]

[0349] HuASGR1-CBD:8M24 복합체 형성, 결정화 및 구조 결정

[0349]

정제된 HuASGR2-CBD 및 8M24 Fab를 1.1:1 몰비 (HuASGR1-CBD가 약간 과량임)로 혼합하고, 카르복시-펩티다제 A 및 B와 100:1의 w/w 비율로 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 복합체 형성은 HBS에서 미리 평형시킨 슈퍼텍스 S200 증가 (10/300 GL) 컬럼에서 단일 주요 피크를 관찰함으로써 확인되었다. 복합체를 함유하는 분획을 SDS-

PAGE에 의해 추가로 확인하고 결정화 스크린을 위해 ~20 mg/mL로 농축시켰다. 상업적으로 입수가 가능한 MCSG1, MCSG2, MCSG3, MCSG4, PACT [몰레큘라 디멘션즈 (Molecular Dimensions; 미국)], PEGs I 및 PEGs II [퀴아젠 (Qiagen; 미국)] 스크린을 사용한 결정화 스크린은 모기 [TTP 랩테크(TTP LabTech)] 액체 처리기를 사용하여 수행되었으며 에코써모(EchoTherm) 인큐베이터 [토레이 파인스 사이언티픽 (Torrey Pines Scientific; 미국)] 내부에서 18°C 하에 평형화되었다. 96-웰 플레이트 결정 스크리닝 실험은 디스커버리V20 입체현미경 [자이스 (Zeiss; 미국)]을 통해 수동으로 주기적으로 모니터링되었으며, 데이터 수집을 위해 다양한 저온 보호제 (전형적으로 15 내지 30% v/v의 글리세롤 또는 에틸렌글리콜)의 존재 하에 액체 질소 내로 플런지함으로써 결정을 동결하였다. X선 회절 데이터 세트는 고급 광원 (ALS)에서의 버클리 구조 생물학 센터 (미국 캘리포니아주 버클리)에서 수집하고, XDS (문헌 [XDS. Kabsch W. (2010) Acta Cryst. D66, 125-132]), 및 xdsme (문헌 [Legrand P. (2017) XDSME: XDS Made Easier GitHub repository], <https://github.com/legrandp/xdsme> DOI 10.5281/zenodo.837885) 프로그램으로 프로세싱하였다. HuASGR1-CBD:8M24 복합체의 구조는 ASGR1-CBD [PDB code: 5JPV; Efficient Liver Targeting by Polyvalent Display of a Compact Ligand for the Asialoglycoprotein Receptor. Sanhueza CA, Baksh MM, Thuma B, Roy MD, Dutta S, Preville C, Chrnyk BA, Beaumont K, Dullea R, Ammirati M, Liu S, Gebhard D, Finley JE, Salatto CT, King-Ahmad A, Stock I, Atkinson K, Reidich B, Lin W, Kumar R, Tu M, Menhaji-Klotz E, Price DA, Liras S, Finn MG, Mascitti V. (2017) J. Am. Chem. Soc. 139: 3528-3536]의 공개된 구조의 폴리-알라닌 모델과 서로젠 인크.(Surrozen Inc.)에서 관련 없는 Fab의 이전에 결정된 결정 구조의 가변 및 불변 도메인과 함께 Phaser [Phaser crystallographic software. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, and Read RJ. (2007) J Appl Crystallogr 40, 658-674]를 사용하는 분자 대체 방법에 의해 결정되었으며, 이어서 Phenix [PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. P.D. Adams, P.V. Afonine, G. Bunkoczi, V.B. Chen, I.W. Davis, N. Echols, J.J. Headd, L.W. Hung, G.J. Kapral, R.W. Grosse-Kunstleve, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, R. Oeffner, R.J. Read, D.C. Richardson, J.S. Richardson, T.C. Terwilliger, and P.H. Zwart. (2010) Acta Cryst D66, 213-221; MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, and Richardson DC. (2010) Acta Cryst. D66, 12-21]에서 구현된 바와 같은 몰프로비트(MolProbity)에 의한 정제 및 검증이 뒤따른다. 결정학 모델은 COOT를 사용하여 수동으로 검사하고 구축하였다 [Features and development of Coot. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, and Cowtan K. (2010) Acta Cryst. D66, 486-501]. 정제된 결정 구조의 분석, 및 영상 생성은 MOE (CCG) 및 PyMol [슈뢰딩거 (Schrodinger)]을 사용하여 수행되었다.

[0350] HuASGR2-CBD:8M24 복합체의 구조

[0351] 구조적 연구에 사용된 8M24 Fab의 경쇄 및 중쇄의 서열은 하기에 제시된다.

[0352] 8M24L1 경쇄:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRISENIYNSLAWYQQKPGKAPKLLIYAAINL
ADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQHFHWGTPFTFGQGTKLEIKRTVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCVCLNNFYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (서열식별번호: 53).

[0353]

[0354] 8M24H1 중쇄:

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTNYGINWVRQAPGQGLEWMGE
IFPRSDNTFYAQQKQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARKGRDYGTSH
YFDYWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVP
KSCGSGSGHHHHHH (서열식별번호: 54).

[0355]

[0356] HuASGR1-CBD:8M24 복합체 (농도 = 20 mg/mL)의 회절 품질 결정은 0.1 M SPG (숙신산, 인산나트륨 1염기성 1수화물, 글리신 완충액) pH 9.0 및 25% w/v PEG 1500을 함유하는 PACT-A6 결정화 조건에서 성장하였다. 결정은 웰-용액에서 20% 글리세롤을 사용하여 냉동 보호되었다. HuASGR1-CBD:8M24 복합체는 $P 2_12_12_1$ 공간 그룹 ($a = 38.91 \text{ \AA}$, $b = 90.32 \text{ \AA}$, $c = 167.80 \text{ \AA}$)에서 비대칭 단위당 하나의 복합 분자로 결정화된다. HuASGR1-CBD:8M24 복합체의 구조는 1.7 \AA 의 분해능에서 결정되었고 각각 17.3% 및 20.5%의 R_{cryst} 및 R_{free} 인자로 정제되

었다.

- [0357] HuASGR1-CBD:8M24 복합체의 전체 구조는 도 37a에 제시되어 있다. HuASGR1-CBD의 구조적 분석 결과, 전체 폴딩과 CBD의 구조적 안정성에 중요한 3개의 Ca^{2+} 이온 둘 다가 이전에 공개된 구조와 유사한 것으로 밝혀졌다 [PDB Code: 1DV8; Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of the H1 subunit of the asialoglycoprotein receptor. Meier M, Bider MD, Malshkevich VN, Spiess M, and Burkhard P. (2012) J Mol Biol 300, 857-865]. 그러한 구조는 또한 ASGR1 상의 8M24 에피토프가 자연 리간드 결합 부위의 일부인 Ca^{2+} 이온으로부터 멀리 위치한다는 것을 밝혀내었다 (도 37b).
- [0358] 복합체의 구조는 8M24에 대한 인간 ASGR1의 에피토프를 확인하는데 사용되었으며, 하기 잔기는 핵심 상호작용 부위 (5 Å 컷오프)를 규정한다:
- [0359] Gly163, Pro165, Val166, Asn167, Cys175, Trp177, Ser181, Lys183, Ala184, Ala186, Asp187, Asn190, Tyr191, Arg193, Leu194, Glu195, Asp196, Trp285, Thr289, Glu290, 및 Leu291.
- [0360] 또한, 인간 ASGR1 상의 하기 잔기는 8M24에 대한 즉각적인 상호작용 부위로서 확인되었다 (원자간 거리 > 5.0 Å 및 ≤ 8.0 Å):
- [0361] Cys164, Trp168, Arg173, Ser174, Phe178, Ser179, Arg180, Gly182, Trp185, Ala188, Asp189, Cys192, Ala197, Gln227, Cys279, Gln280, Arg281, Cys287, 및 Glu288.
- [0362] HuASGR1-CBD:8M24 복합체의 구조를 사용하여 인간 ASGR1의 임의의 원자로부터 5.0 Å 이하에서 8M24의 하기 잔기를 확인하였다:
- [0363] 8M24 중쇄: Asn31, Phe52, Arg54, Ser55, Asn57, Phe59, Lys99, Arg101, Asp102, Tyr103, Gly104, Thr105, Ser106, 및 His107.
- [0364] 8M24 경쇄: Tyr30, Ser31, Asn32, Phe91, Trp92, Gly93, 및 Phe96.
- [0365] 추가로, HuASGR1-CBD:8M24 복합체의 구조는 원자간 거리 > 5.0 Å 및 ≤ 8.0 Å인 인간 ASGR1에 대한 즉각적인 상호작용 부위인 8G8의 하기 잔기를 밝혀내었다:
- [0366] 8M24 중쇄: Thr28, Thr30, Tyr32, Gly33, Asn35, Glu50, Ile51, Pro53, Asp56, Thr58, Gly100, Tyr108 및 Phe109.
- [0367] 8M24 경쇄: Ile2, Asn28, Ile29, Ala50, His90, 및 Thr94.
- [0368] 실시예 9
- [0369] 아세트아미노펜-유발 간 손상 후 간 기능 및 조직 복구에 대한 간세포-표적화된 RSPO 모방체의 효과
- [0370] 아세트아미노펜 (APAP) 간독성의 마우스 모델은 급성 간 손상의 널리 확립된 모델이며, 메커니즘과 중증도는 마우스와 인간 간에 유사하다. APAP-유발 간 손상의 간독성 효과를 복구할 수 있는 1R34-EEAT-EE의 능력을 조사하였다.
- [0371] 100마리의 수컷 C57BL/6J 마우스 (9주령)를 체중을 기준으로 무작위로 10개의 연구 그룹 (그룹 A-J)으로 나누어 다음 밤새 절식시켰다. 간 손상을 유발하기 위해, 마우스에게 APAP 300 mg/kg (그룹 B-J, n=90)의 단일 복강내 (IP) 용량을 투여하였고; 대조군 그룹 (그룹 A, n=10)에게는 식염수를 IP 투여하였다. 그 후, 마우스는 우리로 되돌아갔으며 또한 음식은 자유롭게 섭취할 수 있었다. APAP 투여 후 2시간 및 무작위 배정 그룹에 따라, 그룹 B-J 내의 마우스에게는 하기 처리물 중 하나의 단일 IP 주사를 투여하였다: 항-GFP 10 mg/kg (음성 대조군), N-아세틸시스테인 (NAC) 1200 mg/kg (양성 대조군) 또는 1R34-EEAT-EE 10 mg/kg. 그룹 A 마우스는 비히클을 추가로 주사 투여하지 않고 계속 추적하였다. 그런 다음 마우스를 최대 72시간 동안 추적했으며, 종료는 처리 후 24, 48 또는 72시간에 발생하였다.
- [0372] 각각의 종료 시점에서, 임상 화학 및 면역조직병리학적 분석을 위해 혈액 및 간을 수집하였다. 간 mRNA의 정량적 폴리머라제 연쇄 반응 (qPCR) 분석은 Wnt 표적 유전자와 주요 시토크롬 P450 (CYP) 대사 효소의 발현 수준을 측정하였다.

[0373] 표 5. APAP-유발 간 손상 처리 그룹

그룹	APAP	N	시험 항목	용량 (mpk)	경로	빈도	종료
A	없음	10	없음			단일 용량	24 h
B	✓	10	항-GFP	10	i.p.		24 h
C	✓	10	Nac	1200			24 h
D	✓	10	EEAT-EE	10			24 h
E	✓	10	항-GFP	10			48 h
F	✓	10	Nac	1200			48 h
G	✓	10	EEAT-EE	10			48 h
H	✓	10	항-GFP	10			72 h
I	✓	10	Nac	1200			72 h
J	✓	10	EEAT-EE	10			72 h

[0374]

[0375]

1R-34 EEAT-EE는 Wnt/ β -카테닌 활성화의 마커인 *Axin2*의 간 mRNA 발현 상의 증가, 및 Wnt 표적 유전자이자 세포 주기의 G1/S 기 전이의 증식 마커인 사이클린 D1 (*Ccnd1*)의 유도에 의해 제시된 바와 같이, Wnt/ β -카테닌 신호전달 경로를 활성화시켰다 (도 43). 또한, Wnt 표적 유전자이자 Wnt 리간드의 생리적 음성 조절인자인 *Notum*은 1R34-EEAT-EE에 의해 유도되었다.

[0376]

Cyp1a2 및 *Cyp2e1* 유전자의 발현은 APAP-유발 간 손상 후 모든 그룹에서 현저하게 감소되었다 (도 43). 1R34-EEAT-EE 처리는 투여 후 48시간 및 72시간에 상당히 더 높은 수준의 *Cyp1a2* 및 *Cyp2e1* 발현을 초래하였다.

[0377]

처리 후 72시간에, 면역반응성 Ki67+ 핵의 존재에 의해 입증된 바와 같이, 자발적 복구가 항-GFP로 처리된 간의 중심 주변 영역에서 면역형광에 의해 관찰되었다. 1R34-EEAT-EE의 재생 능력은 Ki-67 및 문맥주위 발현된 CYP2F2를 사용한 이중 면역형광 염색에 의해 제시된 바와 같이, 문맥주위 영역을 포함한 모든 간 영역에서 균일한 분포로 자발적으로 발생하는 것 이상으로 Ki67+/HNF4 α + 이중-양성 간세포 (도 44, 백색 사각형)의 증가에 의해 입증되었다 (도 45). 대조적으로, 상당한 비율의 비-간세포는 검출할 수 없는 HNF4 α (황색 사각형)를 갖는 Ki67+ 핵의 존재에 기초하여 항-GFP 및 N-아세틸시스테인 그룹에서 증식하는 것으로 나타났다.

[0378]

조직학적 분석은 대조군 그룹에서 간의 중심 주변 영역에서의 미만성 괴사의 넓은 영역을 제시하였지만, 1R34-EEAT-EE 처리된 간에서는 괴사가 감소하였다 (도 46).

[0379]

혈청 알칼리성 포스파타제 (ALP)는 처리 후 24시간 및 48시간에 유의미하게 증가하였으며, 이는 1R34-EEAT-EE에 의한 ASGR1 점유 및 ALP 클리어런스에서의 ASGR의 공지된 역할과 일치한다 (도 47). 혈장 암모니아 수준은 측정된 모든 시점에서 항-GFP와 비교하여 1R34-EEAT-EE에 의해 상당히 감소되었다. 측정된 임의의 시점에서 1R34-EEAT-EE와 항-GFP 간에 AST 또는 ALT의 혈청 수준에 있어서 유의미한 차이가 없었다.

[0380]

APAP-유발 간 손상의 무린 모델에 대한 이러한 연구는 1R34-EEAT-EE가 간에서 Wnt/ β -카테닌 신호전달의 표적화된 활성화 및 간세포-특이적 재생의 자극을 통해 APAP-유발 간독성을 완화시킨다는 것을 입증해주었다.

[0381]

실시예 10

[0382]

만성 폭음 에탄올-유발 간 손상 후 간 기능 및 조직 복구에 대한 간세포-표적화된 RSPO 모방체의 효과

[0383]

알콜성 간 손상의 동물 모델은 환자에서 AH의 많은 징후, 예컨대 지방증 및 인플라마솜 성분, 예컨대 IL-1 β 의 상승된 간 발현을 다양한 정도로 재현한다. 만성 폭음 모델은 리베르-데칼리(Lieber-DeCarli) 액상 에탄올 (EtOH) 함유 식이와 구강 위관영양으로 전달되는 에탄올을 사용한 자발적인 급식으로 구성된, 통상적으로 사용되는 모델이다 (Bertola et al. 2013). 이러한 연구는 마우스 간의 자발적 재생 능력이 현저하게 손상되는, 노령의 마우스의 연장된 만성, 다발성 폭음, 급성 알콜성 간염 (AAH) 모델에서 간세포 확장 및 기능에 대한 1R34-EEAT-EE의 효과를 조사하였다.

[0384]

11개월령의 C57BL/6J 암컷 마우스에게 5일 동안 대조군 리베르-데칼리 식이를 자유롭게 급식하게 하여 액상 식이 및 튜브 급식에 순응시켰다 (도 48). 그런 다음 모든 마우스를 무작위 배정하였다 (도 55). EtOH-급식 그룹 내의 마우스는 7주 동안 5% (vol/vol) EtOH를 함유하는 리베르-데칼리 (L-D) 식이에 자유롭게 접근할 수 있었으며, 짝-급식 그룹은 등가 열량의 말토스 텍스트린에 에탄올로 대체된 L-D 대조군 식이를 받았다. 급식 기간의 2주차부터 시작하여 7주차까지 계속해서 EtOH-급식 마우스와 짝-급식 마우스에게는 각각 EtOH 20% (5.23 g/kg 체중) 또는 등가 열량의 말토스 텍스트린을 주 2회 위관 영양 공급하였다. EtOH 급식 기간이 완료되면, 마우스를 대조군 L-D 액상 식이로 되돌리고 무작위로 1R34-EEAT-EE (30 mg/kg) 또는 항-GFP (10 mg/kg)로 처리하였으며; 처리물은 복강내 주사를 통해 1일 1회 투여되었다. 그런 다음 마우스는 처리 3일 또는 7일 후에 중

료되었다.

[0385] 표 6. 에탄올-유발 손상 처리 그룹

그룹	EtOH	n	시험 항목	용량 (mpk)	경로	빈도	종료 *
B	없음	6	없음				제0일
C	✓	6	없음				제0일
D	✓	7	항-GFP	10	i.p.	매주 2x	제3일
E	✓	7	EEST-EE	30		매일	제3일
F	✓	7	항-GFP	10		매주 2x	제7일
G	✓	7	EEST-EE	30		매일	제7일

[0386]

[0387]

각각의 종료 시점에서, 임상 화학 분석을 위해 혈액 및 조직 샘플을 수집하였다. Wnt 경로의 활성화, 증식 및 염증 마커는 간 mRNA의 정량적 폴리머라제 연쇄 반응 (qPCR) 분석에 의해 조사되었다.

[0388]

1R34-EEST-EE는 2개의 Wnt 표적 유전자인 *Axin2* 및 *Ccnd1*의 간 mRNA 발현에서의 증가 (도 49), 및 간 증식 마커, 예컨대 *Rrm2*, *Cdk1*, *Ccnb1*, *Cdc20* 및 *Mki67*의 유도 (도 50)에 의해 제시된 바와 같이 Wnt/ β -카테닌 신호 전달 경로를 활성화시켰다. 1R34-EEST-EE의 간세포-특이적 재생 활성화는 증식 마커 Ki67과 간세포-특이적 마커 HNF4A로의 이중 면역형광 염색에 의해 확인되었다 (도 51).

[0389]

또한, 1R34-EEST-EE는 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 측정된 바와 같이, Wnt 활성화의 2가지 혈청 바이오마커, 백혈구 세포 유래 케모타신-2 (Lect2) 및 안지오팀닌을 유의미하게 증가시켰다 (도 53). 1R34-EEST-EE는 또한 염증성 마커인 인터루킨 *I11b* 및 *I16*의 mRNA 발현을 감소시켰고 (도 54). ALT는, 항-GFP (대조군 그룹)와 비교했을 때, 1R34-EEST-EE에 대한 반응으로 약간 상승하였으며 AST는 유의미하게 감소되었고, 1R34-EEST-EE로 처리한 지 3일 후에 유의미한 변화가 관찰되어 AST/ALT 비율의 강한 감소를 초래하였다 (도 52). 또한, 순환 암모니아는 제3일에 항-GFP와 비교하여 1R34-EEST-EE에 의해 상당히 감소되었다 (도 52).

[0390]

결론적으로, 1R34-EEST-EE는 노령의 마우스의 AAH 모델에서 간-특이적 Wnt/ β 카테닌 신호전달을 유도하였다. 추가로, 1R34-EEST-EE는 간세포-특이적 세포 재생을 자극하였다. 이러한 데이터는 1R34-EEST-EE가 노화 및 알콜 사용으로 인한 증식 장애가 있는 조건에서 간세포 확장을 자극한다는 개념 증명을 제공한다.

[0391]

실시예 11

[0392]

약물-유발 간부전에서 재생을 위한 바이오마커

[0393]

아세트아미노펜 (APAP) 과다복용으로 인한 급성 간부전 (ALF) 또는 기타 약물-유발 간 손상 (DILI)은 치료 옵션이 제한적이다. APAP-유발 ALF 환자의 65%가 자발적으로 생존하지만, 매년 대략 500명이 미국에서 APAP 간독성으로 인해 사망한다. DILI에서, 이식 없는 생존율은 대략 25%이며 미국에서 300-500명이 사망하는 것으로 추정된다. N-아세틸시스테인 정맥 주사와 같은 1차 요법 후 회복될 것으로 예상되지 않는 환자는 간 이식 대상 리스트에 오른다. 간 이식의 수요 증가와 공급 제한으로 인해, 간 회복을 예측할 수 있는 신뢰할 수 있는 시험이 요망된다.

[0394]

Wnt 신호전달은 발생 및 조직 복구 동안 간세포 확장에서 중추적인 역할을 한다. β -카테닌 안정화에 의해 매개되는 하류 표준 Wnt 신호전달은 ALF 환자에서의 재생 증가와 상관이 있다 (Apte 2009, Bhushan 2014).

[0395]

여기에서, 간 이식을 받지 않은 ALF 환자와 간 이식을 받았거나 사망한 환자 간의 간 손상 바이오마커 (알파-태아단백질 및 콜론에스테라제) 및 Wnt 신호전달 마커 (안지오팀닌 및 백혈구 세포 유래 케모타신 2)의 혈청 수준 상의 차이를 결정하였다.

[0396]

알파-태아단백질 (AFP)은 미성숙 간세포 증식에 의해 분비되며 간 손상 시 상승된다. ALF에서, 자발적 생존자는 사망되었거나 이식된 환자보다 제3일 대 제1일 AFP 비율이 더 높았는데, 이는 AFP 수준 상의 변화의 예후 가치를 시사한다 (Schiøt 2006).

[0397]

부티릴콜론에스테라제 (BChE)는 간에 의해 생산되는 비특이적 에스테라제이며 급성 및 만성 간 손상, 염증 및 감염을 포함한 많은 간 기능 장애에서 감소된다.

[0398] 안지오제닌은 주로 간세포에 의해 분비되는 직접적인 Wnt 표적이다. 안지오제닌은 혈관신생을 유도하고 세포 성장과 생존에 중요한 역할을 한다. 안지오제닌과 ALF 결과 사이에 연관성이 있는지는 보고되지 않았다.

[0399] 백혈구 세포 유래 케모타xin 2 (LECT2)는 간세포에 의해 거의 독점적으로 분비되는 헤파토카인이며 직접적인 Wnt 표적이다. LECT2는 간 재생에서 중요한 역할을 하며: ALF에 특이적으로, LECT2 수준은 간 기능이 회복될 때 증가했지만 (문헌 [Sato 2004]), 손상 후 처음 3일 동안 낮은 LECT2 수준은 더 높은 생존 확률과 상관이 있었다 (Slowik 2019).

[0400] 미국 성인 급성 간부전 연구 그룹 등록부 (NCT 00518440)로부터 혈청 샘플을 선택하였다. 간부전의 병인은 ALFSG에 의해 판정된 바와 같은 APAP 또는 DILI/기타/불명의 2가지 그룹으로 나뉘었다. 자발적 생존자 (SS)는 이식 없이 회복된 환자로서 정의되었고, 이식을 진행하였거나 사망한 환자 (LT/D)와 비교되었다. 등록 후 제1일, 제3일, 제7일에 SS 그룹 내의 APAP 과다복용 환자 10명과 DILI 환자 5명으로부터 채취된 샘플, 및 제1일 및 제3일에 LT/D 그룹 내의 APAP 환자 10명과 DILI 환자 10명으로부터 채취된 샘플이 있다 (표 7 참조).

[0401] 표 7. 간부전 환자의 생존

등록 후 일	APAP	DILI	APAP	DILI
	자발적 생존		이식됨 또는 사망함	
제1일	N=11	N=4	N=10	N=9
제3일	N=10	N=5	N=10	N=9
제7일	N=10	N=5		

[0402]

[0403] AFP, 안지오제닌 및 LECT2는 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 측정되었고, BChE는 효소적 활성 검정에 의해 측정되었다.

[0404] 연구 등록 이후의 시간은 환자들 사이에서 임상 과정에서 상이한 시간을 나타냈다. 이를 설명하기 위해, 병원 입원 이후 시간의 맥락에서 바이오마커 수준을 해석하였다. 바이오마커 수준의 로그 척도는 무작위 혼합 효과 모델을 시행함으로써 모델링되었으며, 공변량은 병원 입원 이후 시간에 대한 용어와 SS 또는 LT/D를 나타내는 상태 그룹을 포함한다. 구조화되지 않은 상관관계는 동일한 환자 내에서 시간이 지남에 따라 반복 측정으로 인한 상관관계를 설명하는 것으로 가정하였다. 각각의 상태 그룹에 대한 최소 제곱 평균에 대한 포인트 추정치 및 95% 신뢰 구간 (CI), 및 두 상태 간의 차이를 추정하였다.

[0405] AFP, 안지오제닌, LECT2 및 BChE의 프로파일은 SS 및 LT/D에 대해 별도로 병원 입원 시간에 대항하여 플롯팅되었다. SS와 LT/D 간의 포인트 추정치와 최소 제곱 평균의 95% CI를 비교하였다. LT/D와 비교한 SS에 대한 배수 차이가 표 8에 요약되어 있다.

[0406] 표 8. AFP, 안지오제닌, LECT2 및 BChE 프로파일

분석물	배수 SS vs LT/D	95% CI	P-값
AFP	1.72	(0.53, 5.57)	0.3583
안지오제닌	2.63	(1.76, 3.93)	<0.0001
LECT2	6.26	(1.68, 23.39)	0.0078
BChE	1.84	(0.96, 3.53)	0.0663

[0407]

[0408] SS와 LT/D 간의 안지오제닌 및 LECT2에 대한 포인트 추정치에서의 배수 차이는 유의미한 반면, AFP 및 BChE에 대한 배수 차이는 유의미하지 않았다.

[0409] 간부전의 병인 (APAP 및 DILI/기타)에 대해 별도로 SS와 LT/D 간에 포인트 추정치에서의 배수 차이를 비교하였다. APAP 환자에서는 안지오제닌 및 LECT2 둘 다에 대해 상당한 배수 차이가 있었지만, DILI/기타 환자에서는 안지오제닌에 대해서만 유의미한 배수 차이만 있었다 (표 9).

[0410] 표 9. AFP, 안지오제닌, LECT2 및 BChE 프로파일

분석물	병인	배수 SS vs LT/D	95% CI	P-값
AFP	APAP	2.24	(0.79, 6.33)	0.1246
AFP	DILI/기타	0.98	(0.07, 13.54)	0.9874
안지오제닌	APAP	2.09	(1.31, 3.34)	0.0032
안지오제닌	DILI/기타	2.55	(1.23, 5.30)	0.0154
LECT2	APAP	3.64	(2.10, 6.33)	<0.0001
LECT2	DILI/기타	0.98	(0.28, 3.42)	0.9766
BChE	APAP	1.16	(0.79, 1.73)	0.4349
BChE	DILI/기타	1.35	(0.70, 2.63)	0.3445

[0411]

[0412] ALF에서, 간 이식 없이 회복된 환자의 병원 입원 후 초기에는, 순환 안지오제닌에서의 >2.5배 증가가 관찰되었고 순환 LECT2에서의 >6배 증가가 관찰되었다. 이러한 결과는 혈청 마커가 재생의 예후 지표로서 기능할 수 있고 Wnt 신호전달의 활성화를 위한 바이오마커로서 기능할 수 있음을 시사한다. 더욱이, 1R34-EEST-EE는 실시예 10에서 LECT2 및 안지오제닌을 상당히 증가시킨 것으로 나타났기 때문에, 이들 데이터는 1R34-EEST를 사용한 처리가 증가된 Wnt 신호전달 및 재생과 연관이 있음을 시사한다.

[0413] 참고문헌:

Acute liver failure induced by idiosyncratic reaction to drugs: challenges in diagnosis and therapy. Authors: Tujios, S; Lee, W. Journal Title: Liver International. Publisher: Wiley. Publication Date: 01/2018. Volume: 38. Issue: 1. Pages: 6-14. DOI: 10.1111/liv.13535. PMID: 28771932.

Beta-catenin activation promotes liver regeneration after acetaminophen-induced injury. Authors: Apte, U; Singh, S; Zeng, G; Cieply, B; Virji, M; Wu, T; Monga, S. Journal Title: The American Journal of Pathology. Publisher: Elsevier. Publication Date: 09/2009. Volume: 175. Issue: 3. Pages: 1056-1065. DOI: 10.2353/ajpath.2009.080976. PMID: 19679878.

Pro-regenerative signaling after acetaminophen-induced acute liver injury in mice identified using a novel incremental dose model. Authors: Bhushan, B; Walesky, C; Manley, M; Gallagher, T; Borude, P; Edwards, G; Monga, S; Apte, U. Journal Title: The American Journal of Pathology. Publisher: Elsevier. Publication Date: 11/2014. Volume: 184. Issue: 11. Pages: 3013-3025. DOI: 10.1016/j.ajpath.2014.07.019. PMID: 25193591.

Alpha-fetoprotein and prognosis in acute liver failure. Authors: Schiøt, F; Ostapowicz, G; Murray, N; Satyanarana, R; Zaman, A; Munoz, S; Lee, W. Journal Title: Liver Transplantation. Publisher: Wiley. Publication Date: 12/2006. Volume: 12. Issue: 12. Pages: 1776-1781. DOI: 10.1002/lt.20886. PMID: 17133565.

Serum LECT2 level as a prognostic indicator in acute liver failure. Authors: Sato, Y.; Watanabe, H.; Kameyama, H.; Kobayashi, T.; Yamamoto, S.; Takeishi, T.; Hirano, K.; Oya, H.; Nakatsuka, H.; Watanabe, T.; Kokai, H.; Yamagoe, S.; Suzuki, K.; Oya, K.; Kojima, K.; Hatakeyama, K. Journal Title: Transplantation Proceedings. Publisher: Elsevier. Publication Date: 10/2004. Volume: 36. Issue: 8. Pages: 2359-2361. DOI: 10.1016/j.transproceed.2004.07.007. PMID: 15561249.

Leukocyte cell derived chemotaxin-2 (Lect2) as a predictor of survival in adult acute liver failure. Authors: Slowik, V; Borude, P; Jaeschke, H; Woolbright, B; Lee, W; Apte, U, the Acute Liver Failure Study Group. Journal Title: Translational Gastroenterology and Hepatology. Publisher: AME Publishing Company. Publication Date: 03/2019. Volume: 4. Issue: 17. Pages: 2359-2361. DOI: 10.21037/tgh.2019.03.03. PMID: 30976720.

[0414]

[0415] 상기 기재된 다양한 실시양태는 추가 실시양태를 제공하기 위해 조합될 수 있다.

[0416] 실시양태의 측면은 추가 실시양태를 제공하기 위해 다양한 특허, 출원 및 공보의 개념을 이용하도록 변형될 수 있다. 전술한 상세한 설명에 비추어 실시양태에 대해 이들 및 다른 변화가 이루어질 수 있다. 일반적으로, 하기 청구범위에 사용된 용어는 본 청구범위를 본 명세서 및 청구범위에 개시된 구체적 실시양태로 제한하는 것으로 해석되어서는 안되며, 그러한 청구범위가 적용되는 등가물의 전체 범위와 함께 가능한 모든 실시양태를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 따라서, 본 청구범위는 본 개시내용에 의해 제한되지 않는다.

[0417] 본 명세서에 언급되고/거나 출원 데이터 시트에 열거된 모든 미국 특허, 미국 특허 출원 공보, 미국 특허 출원,

외국 특허, 외국 특허 출원 및 비-특허 간행물은 그 전체내용이 본원에 참조로 포함된다.

도면

도면1

물드레: 탈아미드화 또는 이성질체화 위험
이델릭체: RSP02

aASGR1-RSP02 (1R34-DDNN/RA) 경쇄 가변 영역:

SSHLIQDPAVSVVALGQTVRITQQCD¹SLRSYASWYQQKPGQAPVLYIYGRM¹NRPSGIPDRFGSSSSGNTASLITLGGQAEDRDADYYCN²SLERIGYLSYVFG
GGTKLEVL (SEQ. ID NO:23)

D¹:CDR_{L1}_D25, N¹:CDR_{L2}_N51, N²:CDR_{L3}_N98

물연변이체 Rspo2를 갖는 aASGR1-RSP02 (1R34-DDNN/RA) 중쇄 가변 영역:

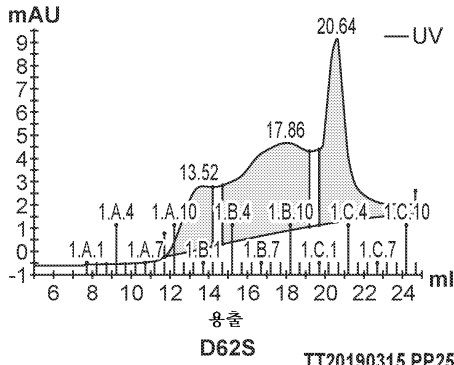
NPICKGCLSCSKDNCCKRCQOKLFFFLRBRGMQYGECLHSCPSGYGHRAPDMRCARCRIMCDSQSKQACTKCKVGYIHRGRCFDECDGSHAFLE
ETMECTVGGGGGGGGGGGGGGVQLIESGGGIVQPGSLRLSCAASGFTFSYAMSWRQAPGRGLEWVSAISGGGGSTYYAD¹SYKSRFTISRDNSK
NTLYIQNSLRRAEDTAIVYCAKDFSSRWYIEIYWGQGLVTVSS (SEQ. ID NO:20)

D¹:CDR_{H2}

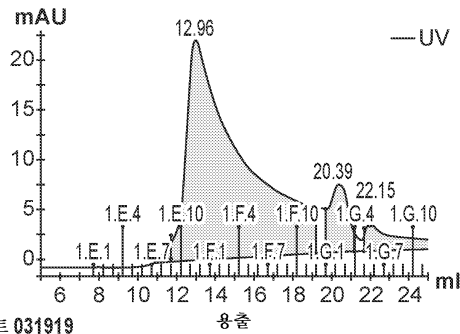
번호	구분	아미노산 서열
1	CDR _{H2}	D62 S, E, A
2	CDR _{L1}	D25 S, E, A
3	CDR _{L2}	N51 Q, S, A
4	CDR _{L3}	N88 Q, S, A, L, E, H, T, R, K, Y, WT

도면2

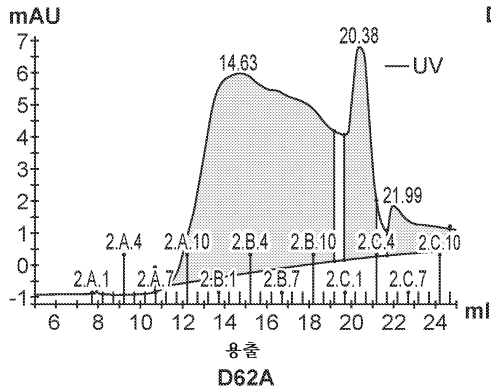
TT20190315 PP24 SEC 업데이트 031919



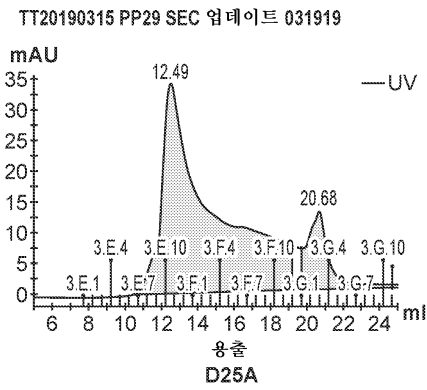
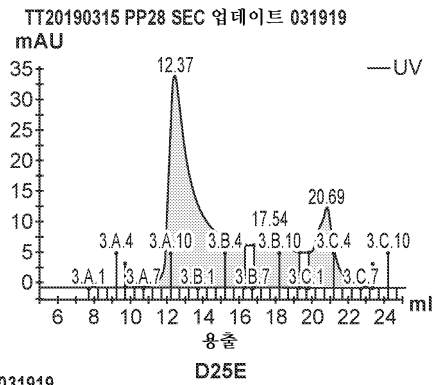
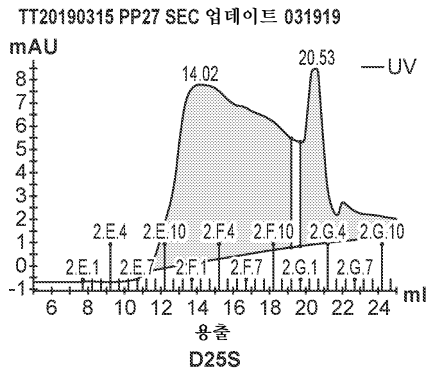
TT20190315 PP25 SEC 업데이트 031919



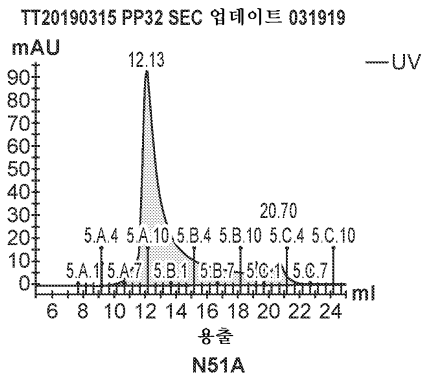
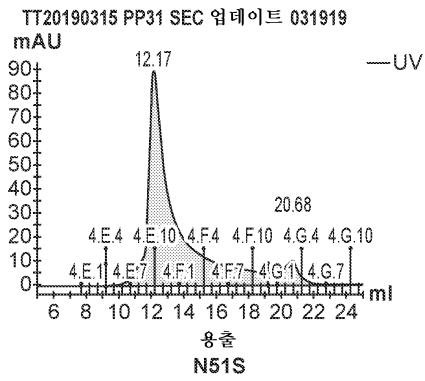
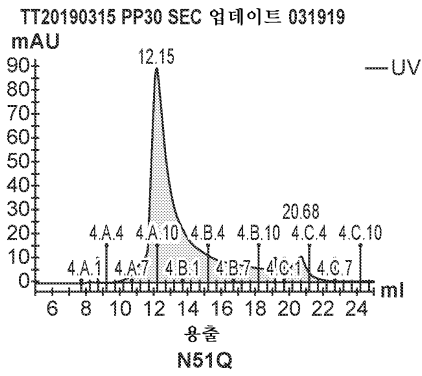
TT20190315 PP26 SEC 업데이트 031919



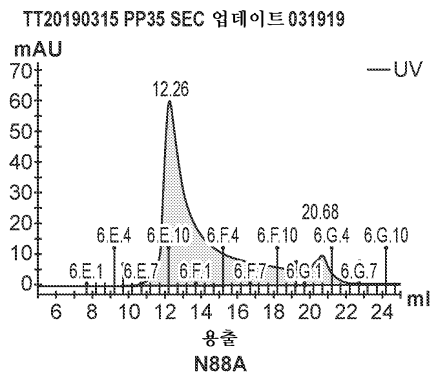
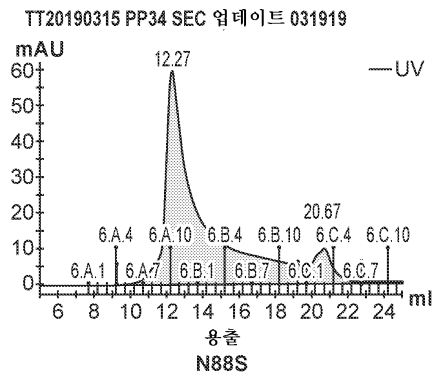
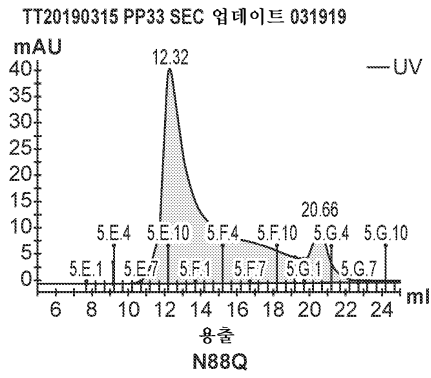
도면3



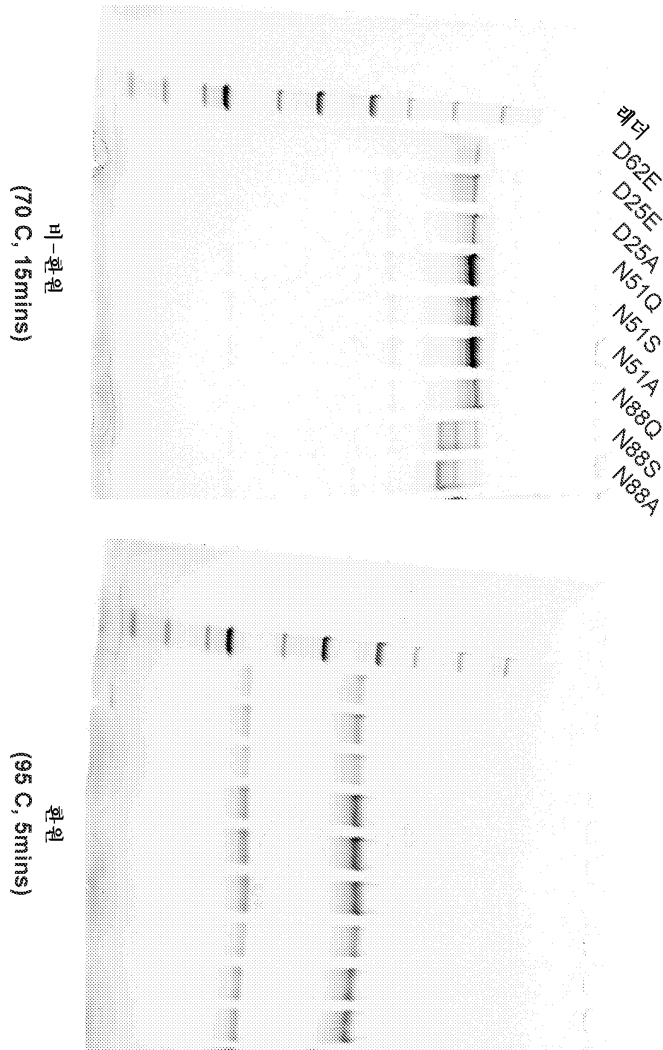
도면4



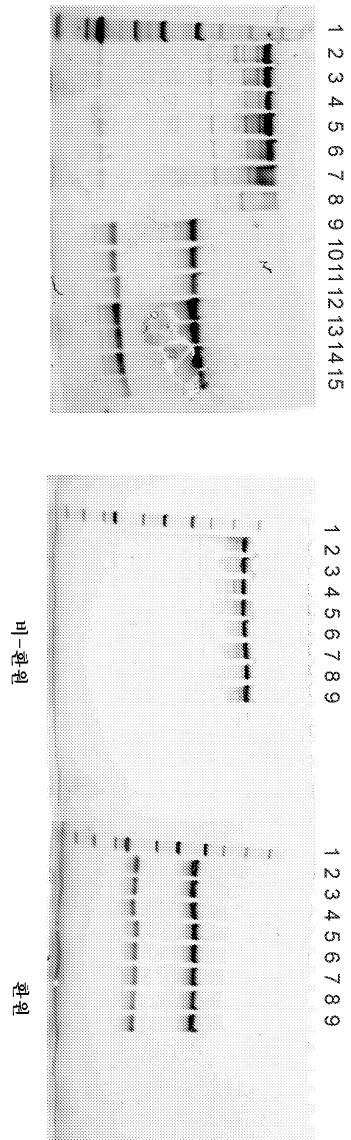
도면5



도면6



도면7



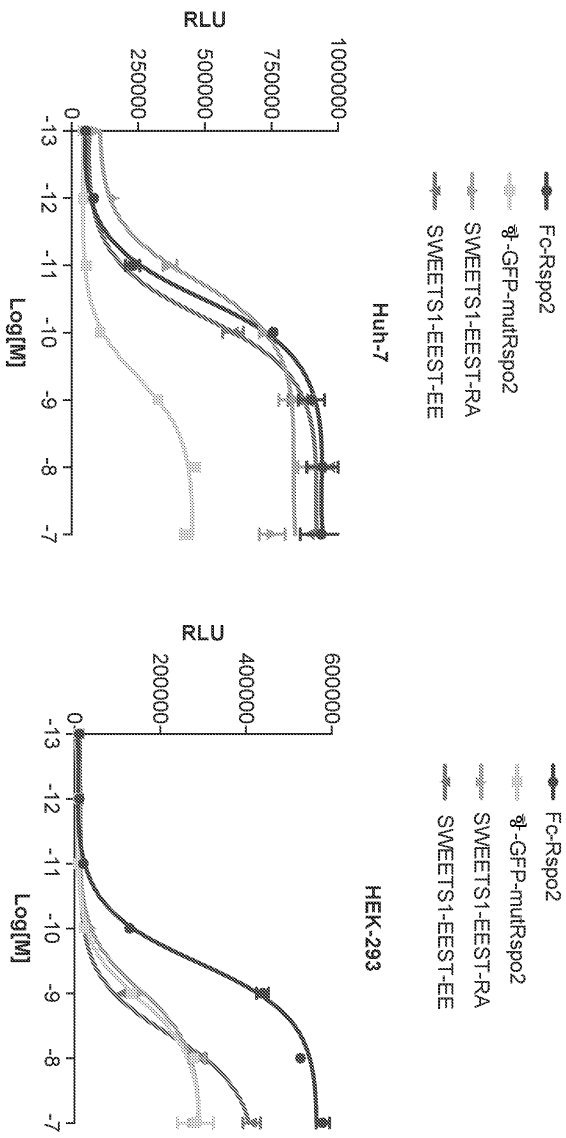
도면8

경차	STF EG-40 19(01)	STF EMAX (NO.9) (01)	HIC (단분산 vs 단분산)	부속 특이성 (01)	Tm/Tagg	부속/ 비중 비중	ASGR1 수인 (kg (M))	ASGR1 수인 (MHS)	ASGR1 수인 (HS)
DDNN- RA (“야생 형”)	2.96	100%	단분산	해파린/ dSDNA/ KLH/LPS	64.7/63.7	안정적	7.67E-09	2.36E+05	1.81E+03
EEST- RA	3.79	101%	단분산	해파린/ dSDNA/ KLH/LPS	64.1/63.8	안정적	1.83E-08	1.74E+05	3.19E+03
EESN- RA	3.43	98%	단분산	해파린/ dSDNA/ KLH/LPS	64.5/65.3	안정적	1.02E-08	2.24E+05	2.28E+03
EEAN- RA	2.60	101%	단분산	해파린/ dSDNA/ KLH/LPS	64.0/64.0	안정적	1.77E-08	1.93E+05	3.41E+03
EEAT- RA	3.45	93%	단분산	해파린/ dSDNA/ KLH/LPS	64.2/63.0	안정적	2.69E-08	1.48E+05	3.99E+03

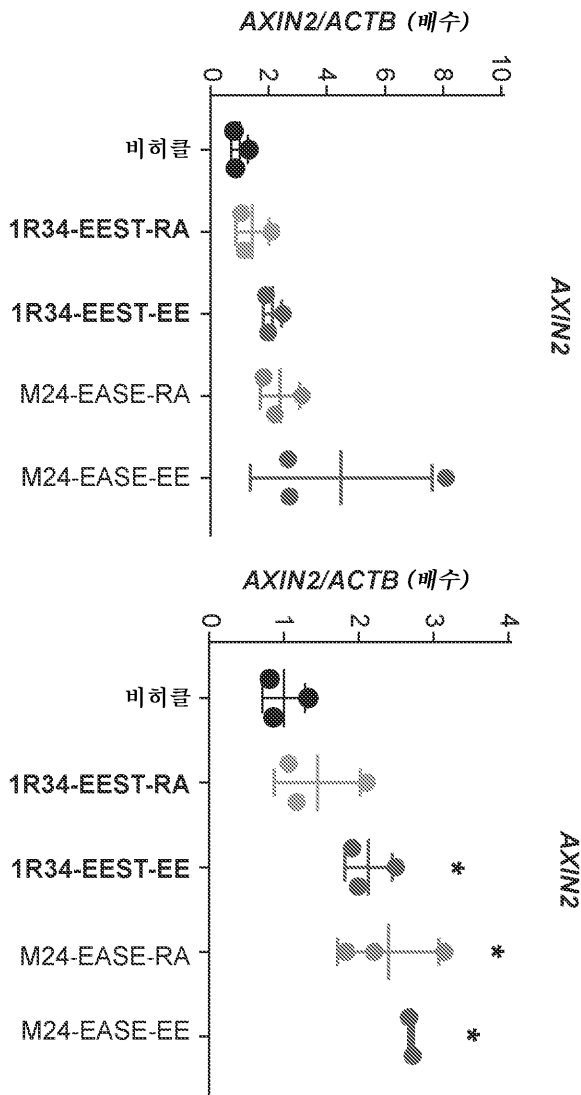
도면9

아이템 ID	아이템 이름	USD (M)	kom (units)	kols (hrs)	비율 (%)
아셈형	바이오-ASGR1	3.13E-08	2.53E+05	7.89E-03	0.9987
EESQ	바이오-ASGR1	1.80E-06	7.38E+04	1.33E-01	0.991
EESN	바이오-ASGR1	1.09E-08	3.65E+05	3.96E-03	0.998
EESL	바이오-ASGR1	1.08E-04	1.42E+01	1.54E-03	0
EESH	바이오-ASGR1	1.36E-04	2.56E+03	3.49E-01	0.9118
EESE	바이오-ASGR1	9.59E-07	4.74E+04	4.55E-02	0.9908
EESA	바이오-ASGR1	2.14E-06	3.65E+05	7.82E-01	0.9961
EEAQ	바이오-ASGR1	1.51E-06	1.26E+05	1.90E-01	0.9947
EEAN	바이오-ASGR1	2.74E-06	3.38E+05	9.26E-01	0.9971
EEAA	바이오-ASGR1	2.57E-08	3.16E+05	8.14E-03	0.997
EEST	바이오-ASGR1	1.25E-08	3.09E+05	3.84E-03	0.9983
EESR	바이오-ASGR1	7.64E-08	2.41E+04	1.84E-03	0.9793
EESK	바이오-ASGR1	2.13E-06	4.09E+05	8.72E-01	0.9976
EESY	바이오-ASGR1	4.39E-07	7.91E+03	3.47E-03	0.9811
EEAL	바이오-ASGR1	1.55E-03	8.88E+01	1.38E-01	0.0226
EEAE	바이오-ASGR1	3.59E-06	2.02E+04	7.25E-02	0.9927
EEAH	바이오-ASGR1	2.35E-04	9.59E+03	2.25E+00	0.9593
EEAT	바이오-ASGR1	4.69E-08	1.55E+05	7.25E-03	0.9917
EEAY	바이오-ASGR1	6.13E-04	2.57E+03	1.58E+00	0.9632
EEAR	바이오-ASGR1	2.71E-03	3.50E+02	9.48E-01	0.9588

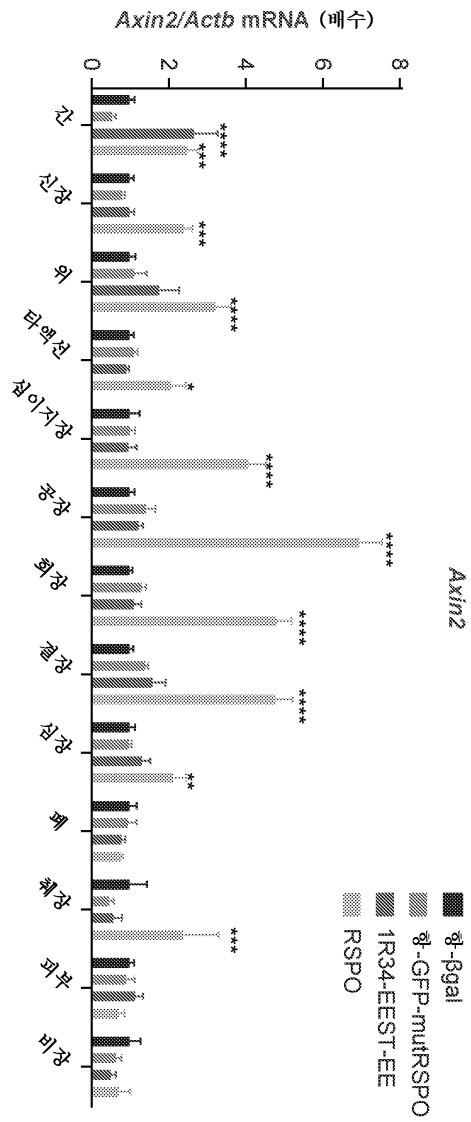
도면10



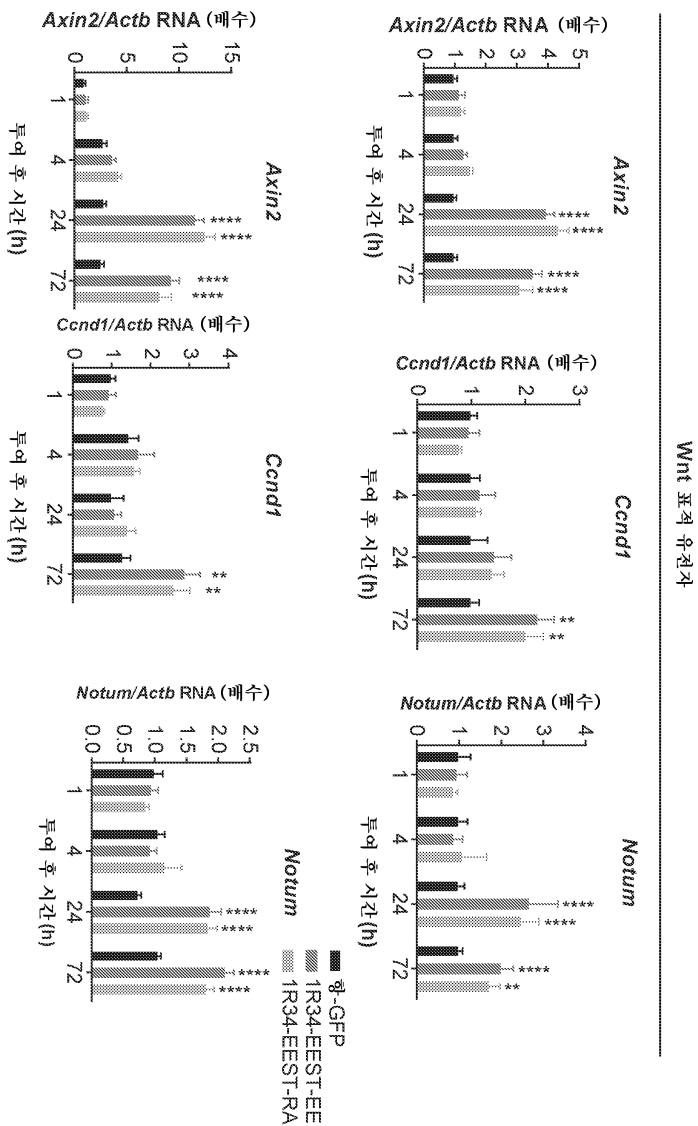
도면11



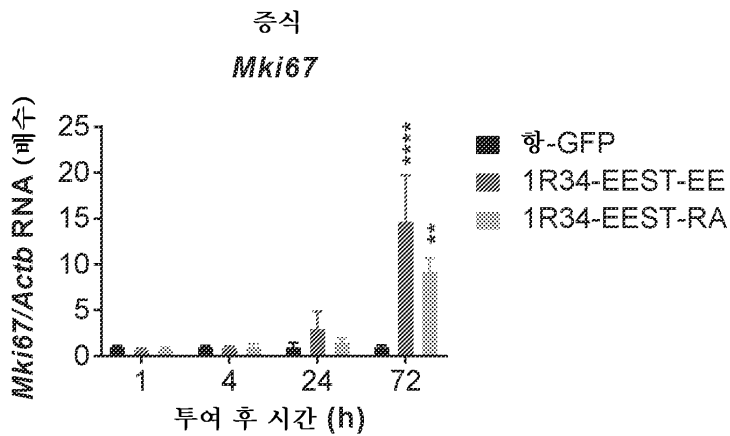
도면12



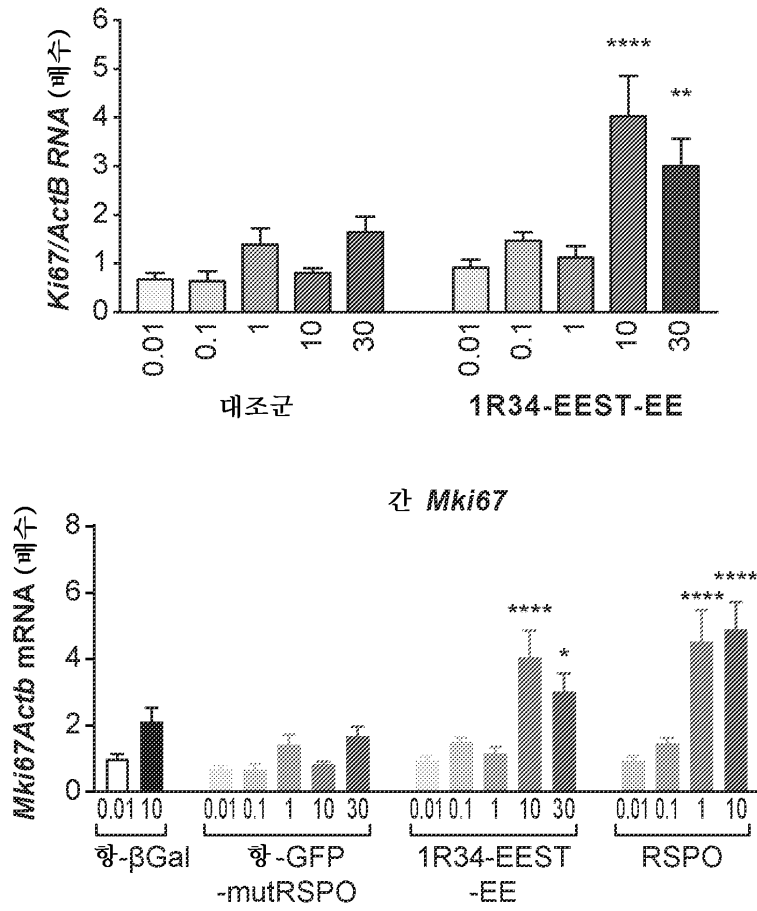
도면13



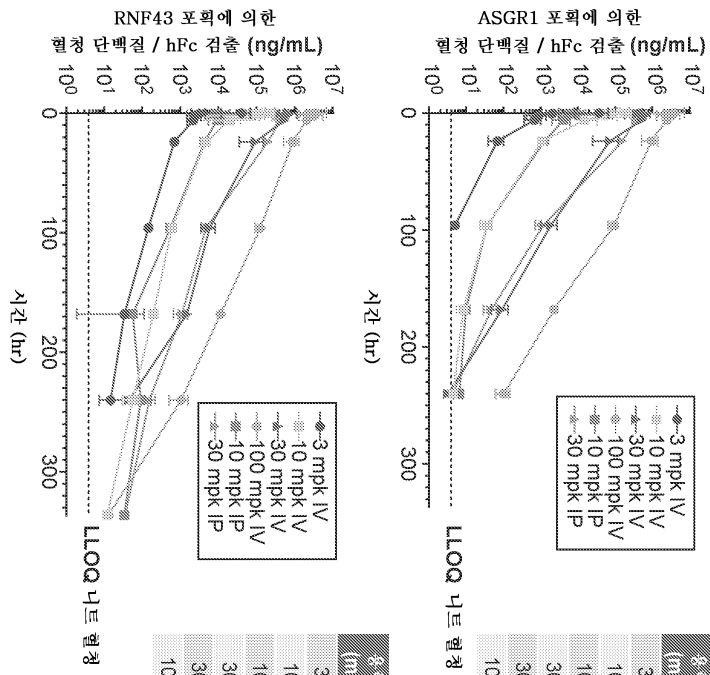
도면14a



도면14b



도면15



ASGR1 포획에 의한
평균 단백질 / hFc 검출 (ng/mL)

LLOQ 노트 열침

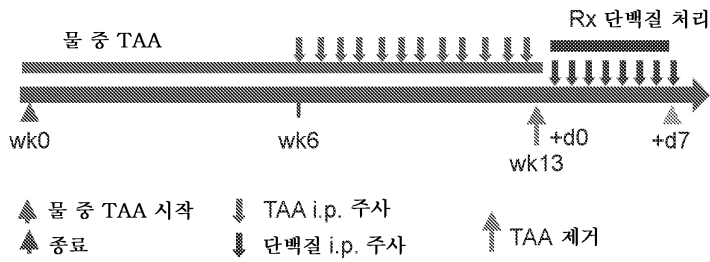
용량 / RA (mg/kg)	CL (mL/h/kg)	반감기 t _{1/2} (hr)	C _{max} (μg/mL)	MRT (hr)
3 / IV	2630	0.793	37.1	0.22
10 / IV	489	1.99	200	0.248
10 / IP	N/A	2.42	59.67	0.5
30 / IV	62.2	0.652	677	0.472
30 / IP	N/A	0.74	426.06	0.68
100 / IV	27.1	0.61	3740	0.886

RNF43 포획에 의한
평균 단백질 / hFc 검출 (ng/mL)

LLOQ 노트 열침

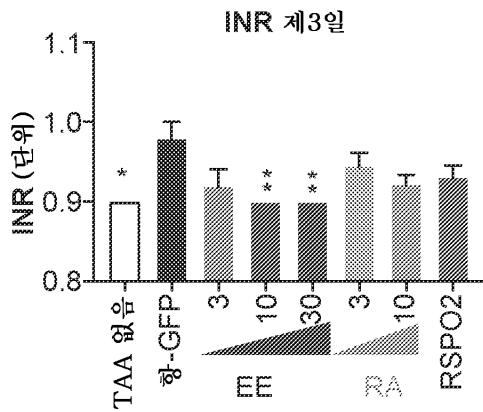
용량 / RA (mg/kg)	CL (mL/h/kg)	반감기 t _{1/2} (hr)	C _{max} (μg/mL)	MRT (hr)
3 / IV	778	1.6	40.7	1.12
10 / IV	298	1.76	216	0.753
10 / IP	N/A	2.47	68.79	1.16
30 / IV	55.1	0.852	723	0.639
30 / IP	N/A	1.39	426.6	0.8
100 / IV	27.8	0.759	3590	1.05

도면16

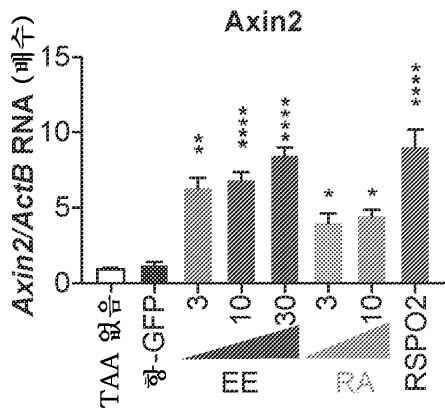


그룹	일	TAA	n	Rspo/SWEETS	용량 (mg/kg)	빈도
A	7	∅	5			
B	7	✓	5	항-GFP	10	매주 2x (D0/D3)
C	7	✓	10	αASGR1-RSPO2-EEST-EE (EE)	3	매일
D	7	✓	10	αASGR1-RSPO2-EEST-EE (EE)	10	매일
E	7	✓	5	αASGR1-RSPO2-EEST-EE (EE)	30	매일
F	7	✓	10	αASGR1-RSPO2-EEST-RA (RA)	3	매일
G	7	✓	10	αASGR1-RSPO2-EEST-RA (RA)	10	매일
H	7	✓	10	RSPO2	4.6	매주 2x (D0/D3)

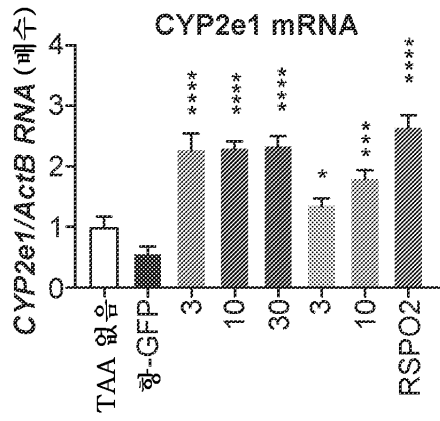
도면17a



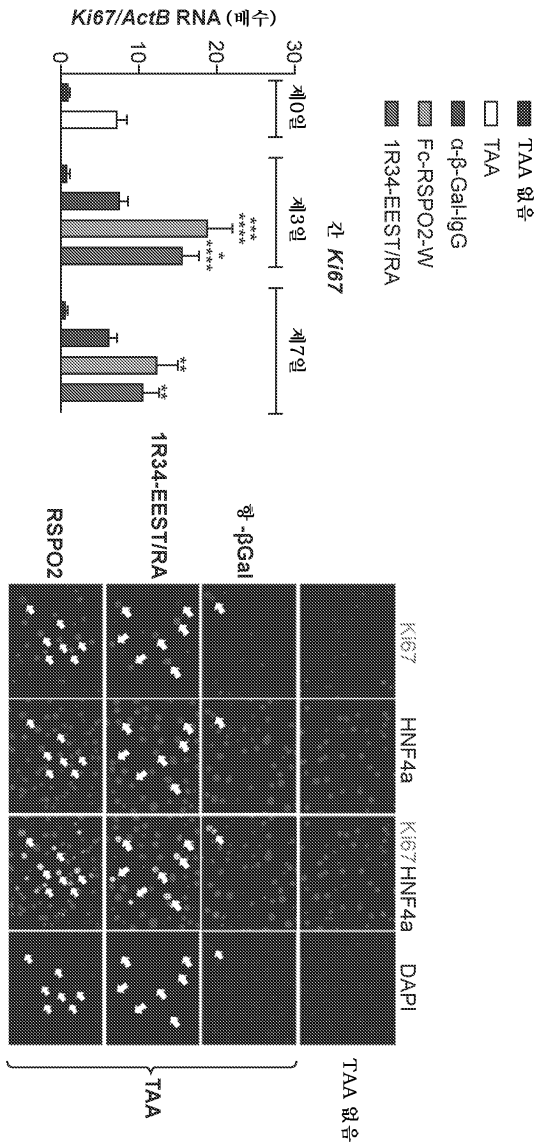
도면17b



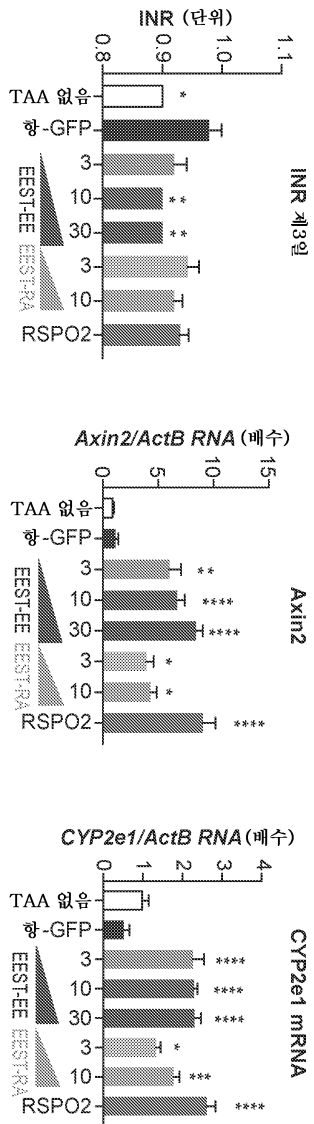
도면17c



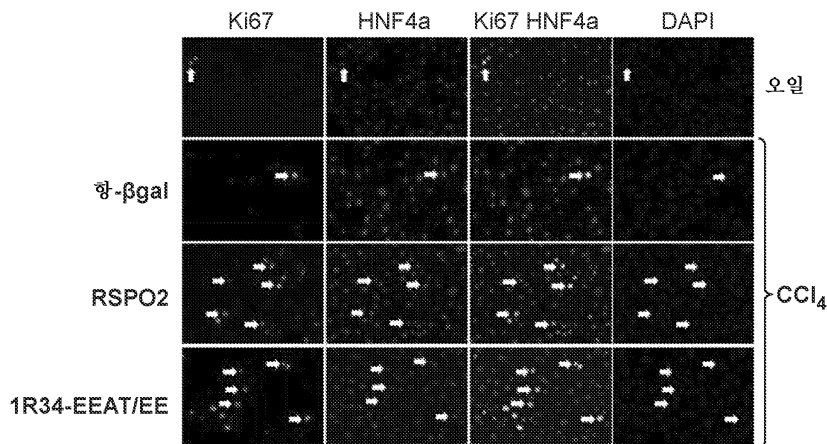
도면18



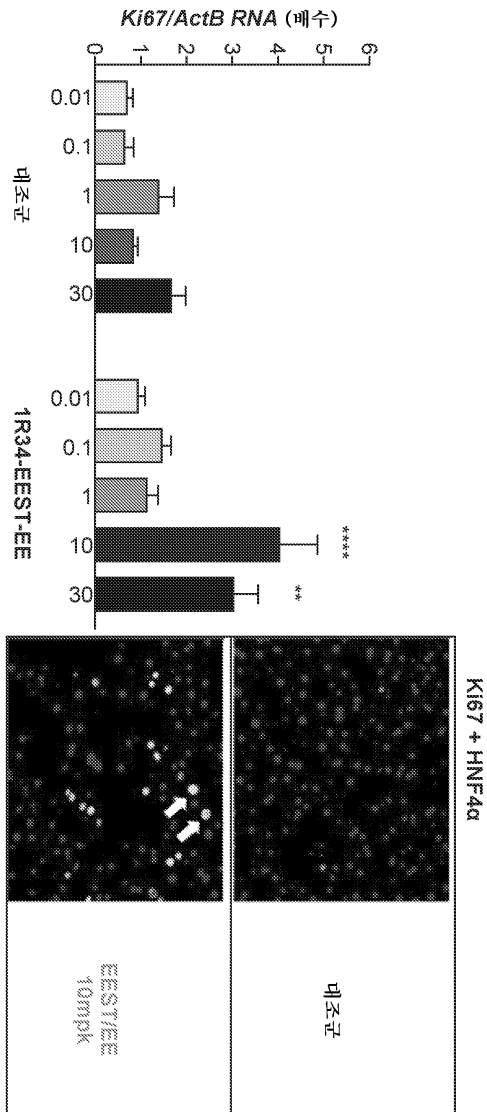
도면19



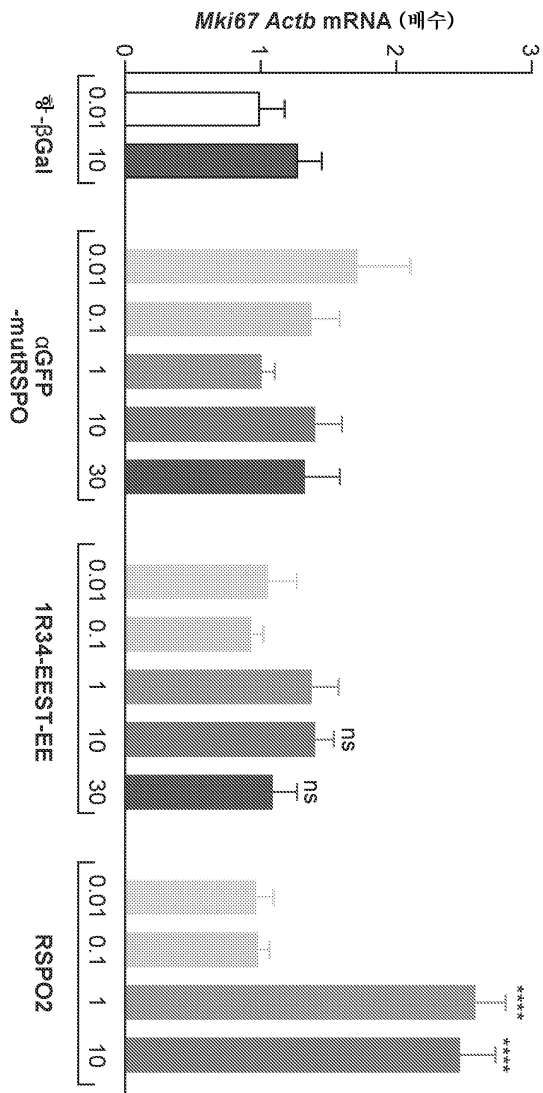
도면20



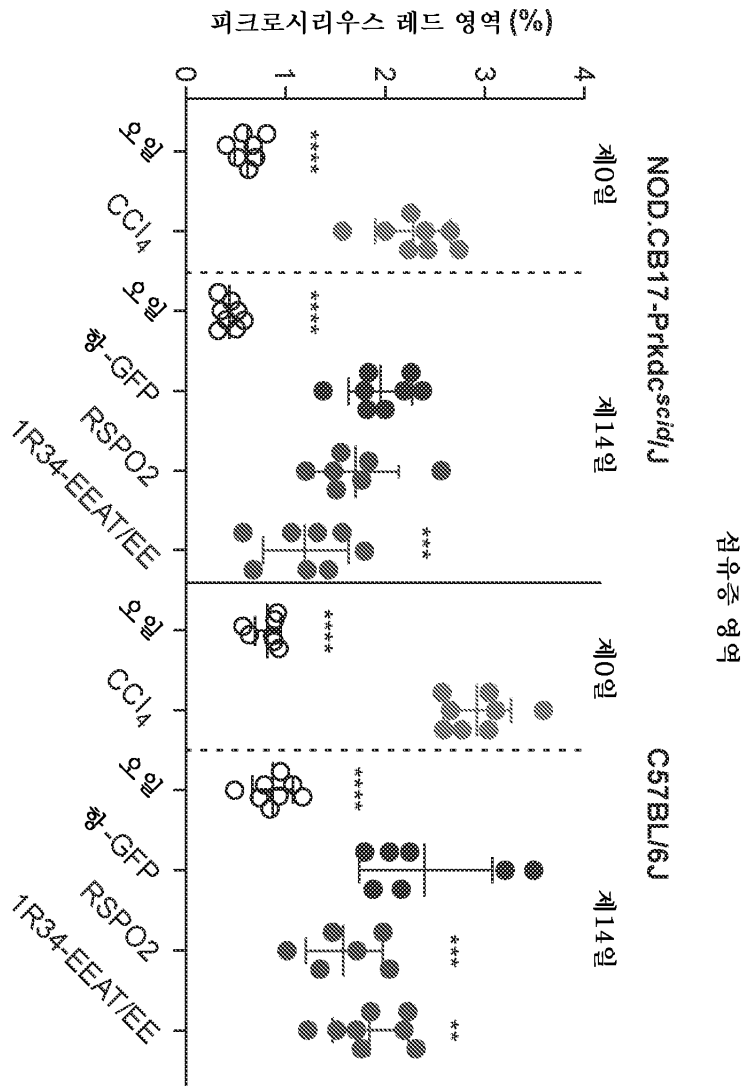
도면21



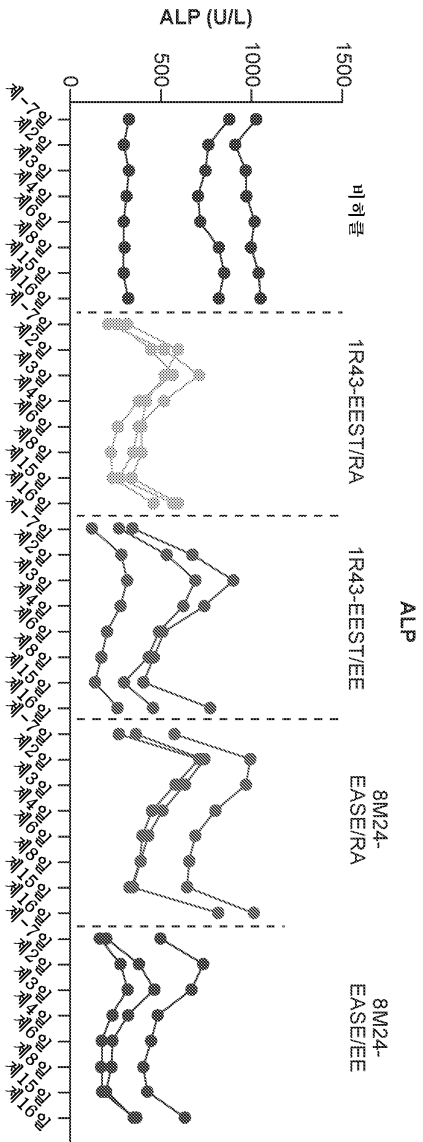
도면22



도면23



도면24



도면25

```

>h8M24_VH_..._H1
QVQLVQSGAEELARPGASVKISCKASGTFITNYGINWYKQRIQGGHEWISGIFTRPSDNTFYAEKFKKRAITLADKSSITAYMELSSITSEDSAVYFCARRKGRDYGTSIIFDYW
GGGTLITVSS(SEQ ID NO:13)

>h8M24_VL_..._H1
DIQMTQSPFASLSVSYGELTITTCRISENIVSNLAWYQQRKQKSPHLLVYAINLADGVPSRFRSGSGSGTQPSLKINSLQSEDFPSIYCOHFWGIPFTFGSGTKLEIK(SEQ ID
NO:14)

>h8M24_VH_..._H2
EVQLVQSGAEVKKRQGGSSIVKSCKASGTFITNYGINWYKQRFQGGHEWISGIFTRPSDNTFYAQRKQGRVITLADKSTIAYMELSSLRSEDTAVYYCARRKGRDYGTSIIFDY
WGGGTLITVSS(SEQ ID NO:15)

>h8M24_VH_..._H2
EVQLVQSGAEVKKRQGGSSIVKSCKASGTFITNYGINWYKQRFQGGHEWISGIFTRPSDNTFYAQRKQGRVITLADKSTIAYMELSSLRSEDTAVYYCARRKGRDYGTSIIFDYW
GGGTLITVSS(SEQ ID NO:16)

>h8M24_VL_..._H1
DIQMTQSPFASLSVSYGDRVITTCRISENIVSNLAWYQQRKQKAPHLIYAINLADGVPSRFRSGSGSGDTLITISLQPEDFAVYYCOHFWGIPFTFGSGTKLEIK(SEQ ID
NO:17)

>h8M24_VL_..._H2
DIQMTQSPFASLSVSYGDRVITTCRISENIVSNLAWYQQRKQKAPHLIYAINLADGVPSRFRSGSGSGDTLITISLQPEDFGIYYCOHFWGIPFTFGSGTKLEIK(SEQ ID
NO:18)

```

8M24 (변종 표시된 CDR)

LC

DIQMTQSPASISVSVEGETTITTCRISENLYSNLAWYQQKQKSPHLLVYAAINLADGVPSRFRFGSGSGTQ
FSIKINSLQSEDFGSSYYCQHFWGTFPTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 14)

HC

QVQLQQSGAELIARPGASVKLSCKASGYTFITNYGINWVKQRTGQGLEMTGELFPRSDNTFFYNEKFKGKA
TITADKSTIAYMELRSLTSEDSAVYFCARKGRDYGTSHYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 13)

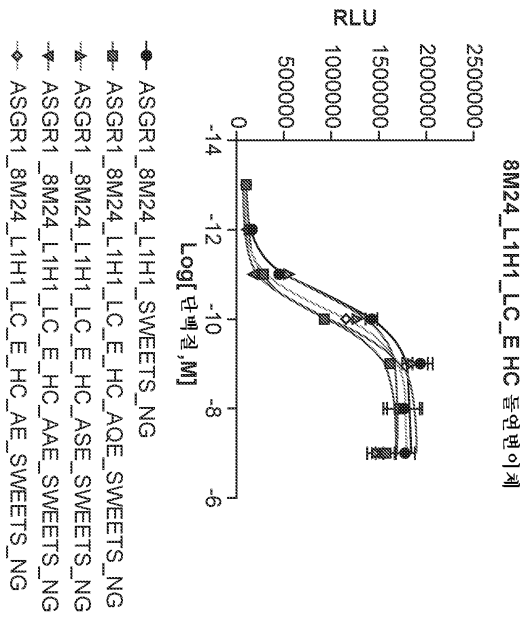
도면26a

도면26b

검사원 8M24 면이체

검사원 8M24 면이체	CDR_L12	CDR_H1	CDR_H2	CDR_H3	CDR_H3
돌연변이체	D56E,S,A	N31S,A,Q	NS7Q,S,A,N	D102E,S,A	D110 WT

도면27

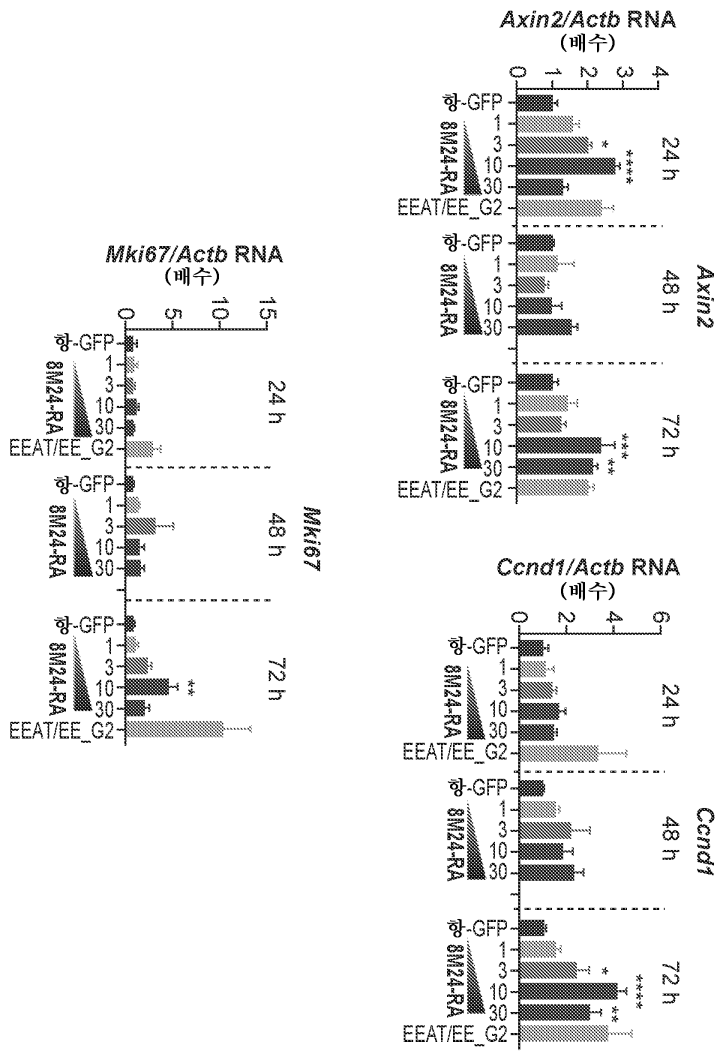


D56E				
N31A				
N57Q	N57S	N57A	N57	
D102E				
D110 WT				

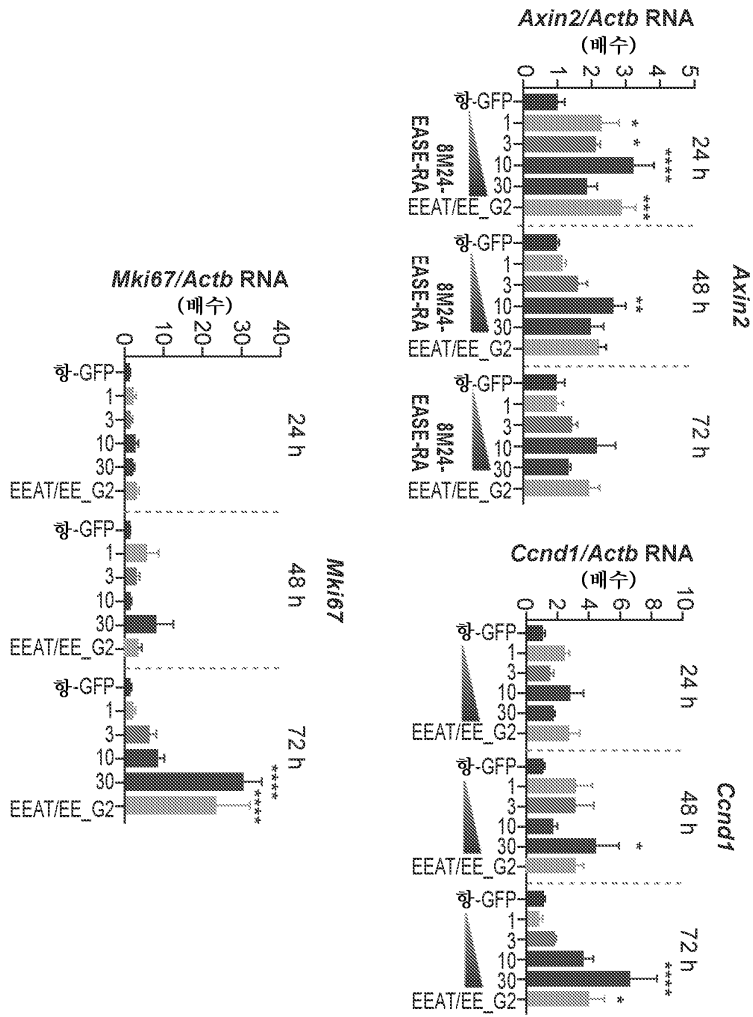
도면28

정량	STF E050 (ng/ml)	STF EMAX (SM124의 %)	SDS-PAGE	HIC (단분산 단위산)	단분 산 특이성	Tm (avg)	동결/융해 안정성	수명 (KD)
8M24	6.80	100%	양호	단분산	~검출가능한 dsDNA 및 해파린 결합	64.5/65	# 안정적	3.9E-10
EAQE	9.52	95.9%	양호	단분산	~검출가능한 dsDNA 및 해파린 결합	66.0/79.0	# 안정적	1.09E-09
EASE	7.99	98.8%	양호	단분산	~검출가능한 dsDNA 및 해파린 결합	66.2/79.0	# 안정적	3.1E-10
EAAE	10.5	104%	양호	단분산	~검출가능한 dsDNA 및 해파린 결합	67.0/80.0	# 안정적	5.00E-10
EANE	14.6	104%	양호	단분산	~검출가능한 dsDNA 및 해파린 결합	68.6/	# 안정적	<1.0E-12

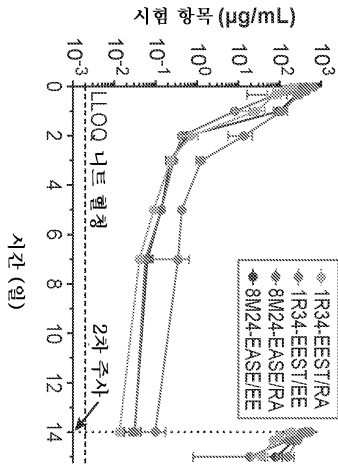
도면29



도면30



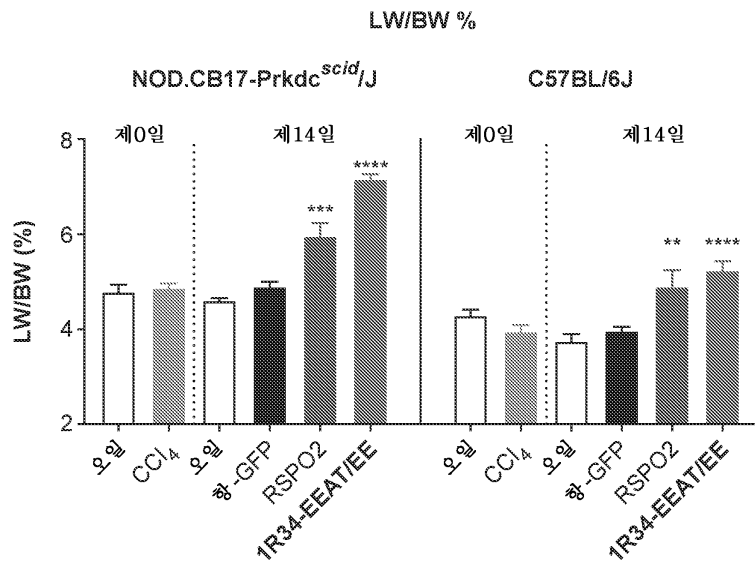
도면31



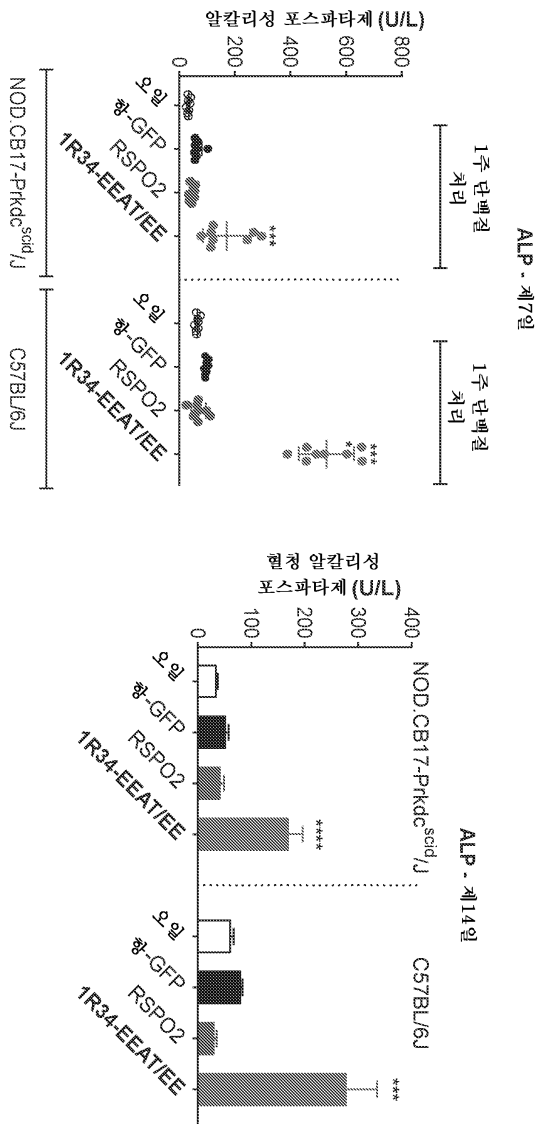
	CL (mL/min/kg)	t _{1/2} (h)	MRT (h)	V _c (mL/kg)	V _{ss} (mL/kg)
1R34-EEST/RA	31.8 (9.13)	3.73 (0.91)	0.581 (0.066)	14.3 (2.11)	18.9 (2.59)
1R34-EEST/EE	133 (60.4)	2.50 (1.02)	0.439 (0.058)	48.8 (5.25)	59.0 (21.6)
8M24-EASE/RA	42.9 (8.05)	3.10 (0.46)	0.471 (0.010)	23.1 (4.52)	20.7 (3.72)
8M24-EASE/EE	115 (42.3)	3.27 (0.20)	0.286 (0.063)	19.0 (3.41)	34.6 (7.85)

CL = 클리어런스
 t_{1/2} = 반감기
 MRT = 평균 상주 시간
 V_c = 중심 구획 용적
 V_{ss} = 양적 상태 용적

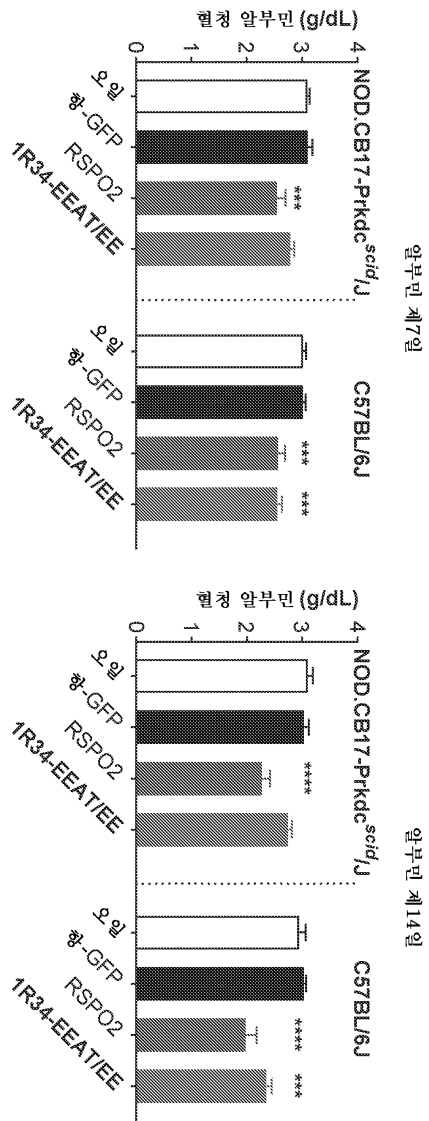
도면32



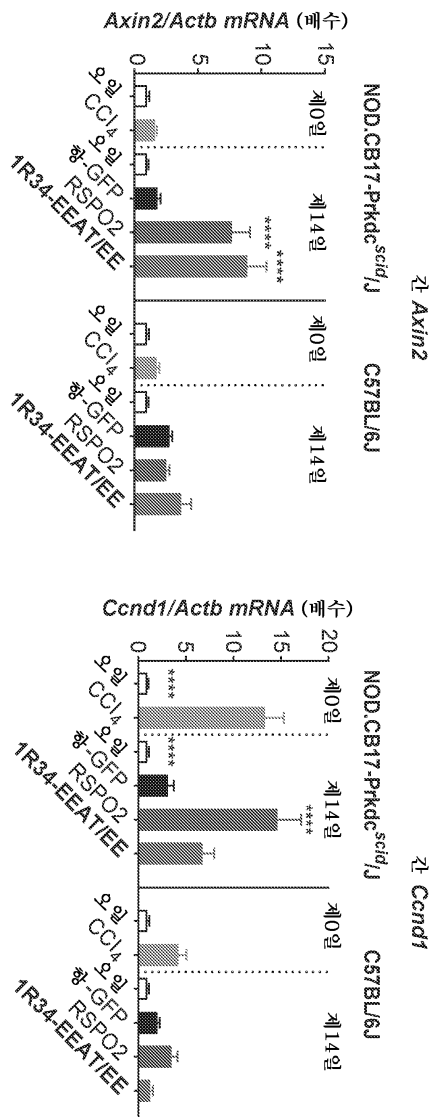
도면33a



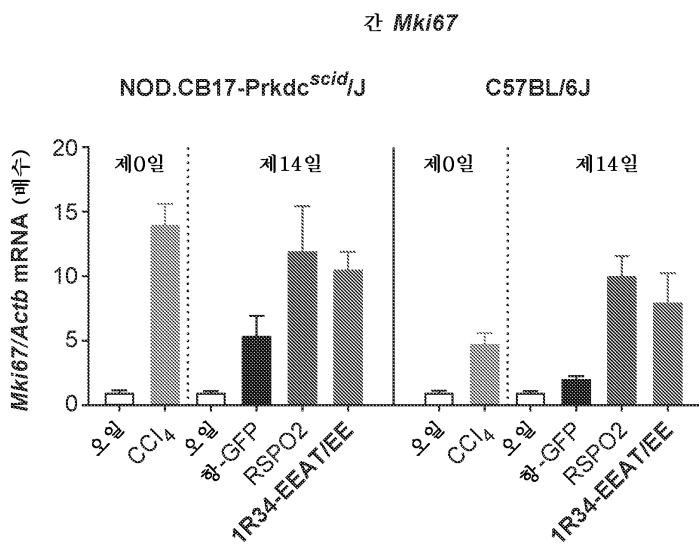
도면33b



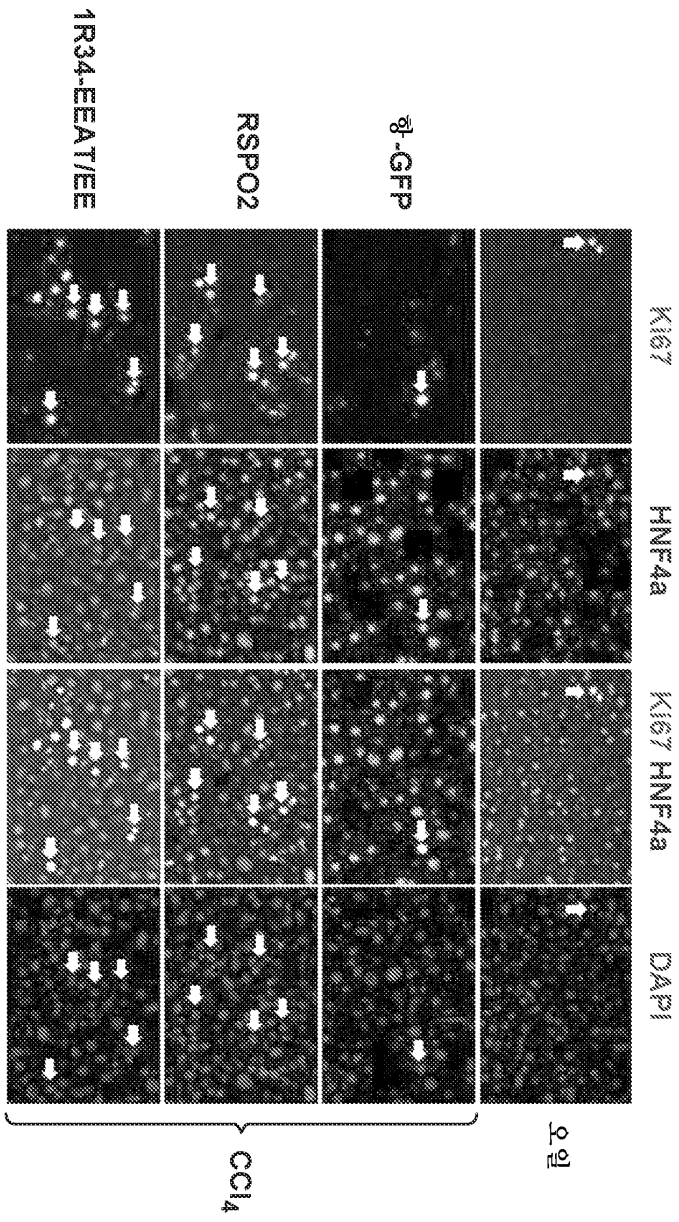
도면34i



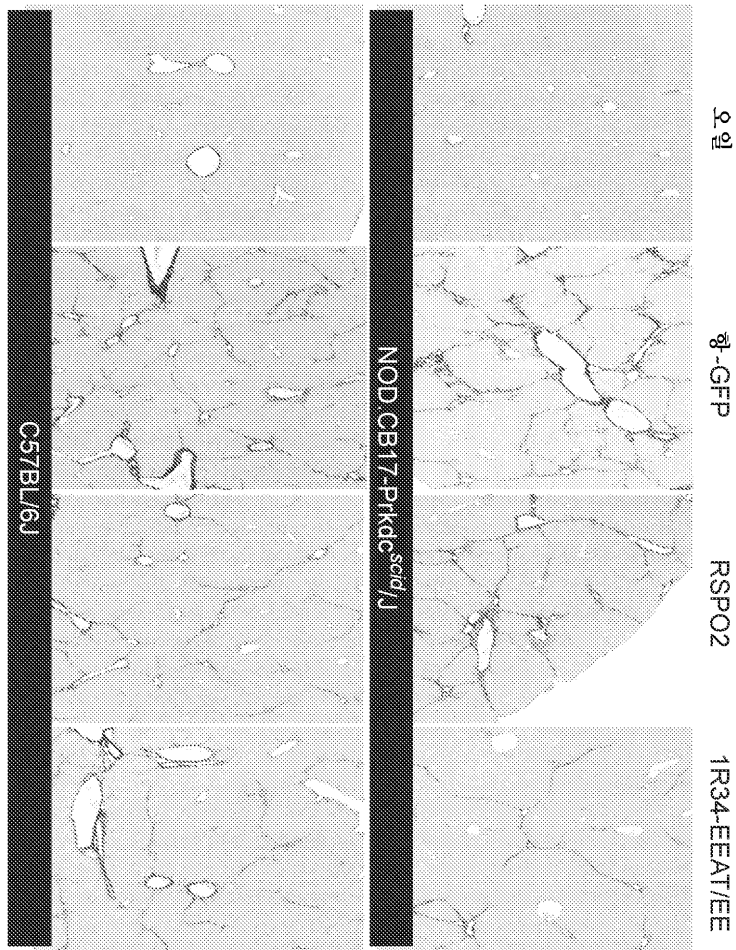
도면34ii



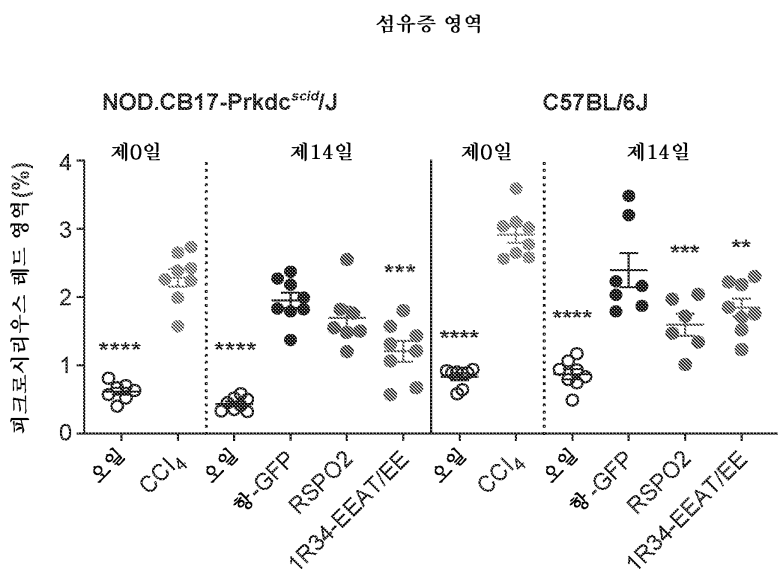
도면35



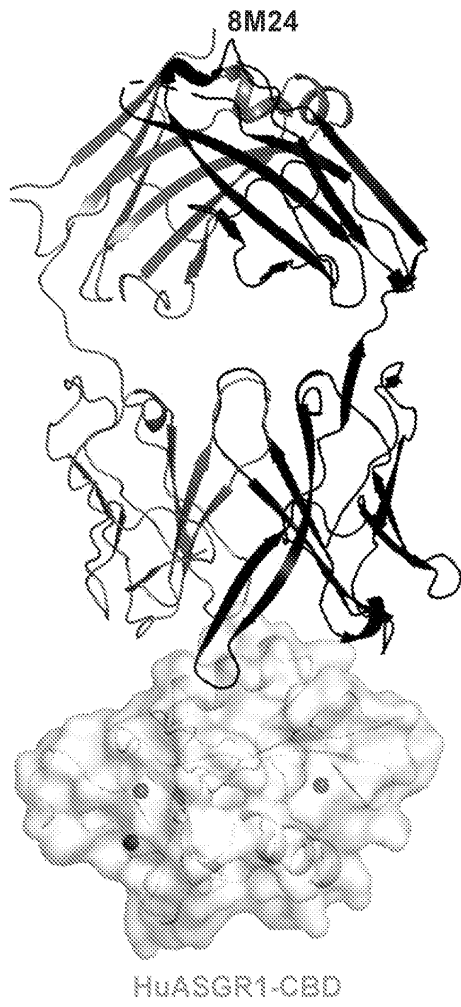
도면36a



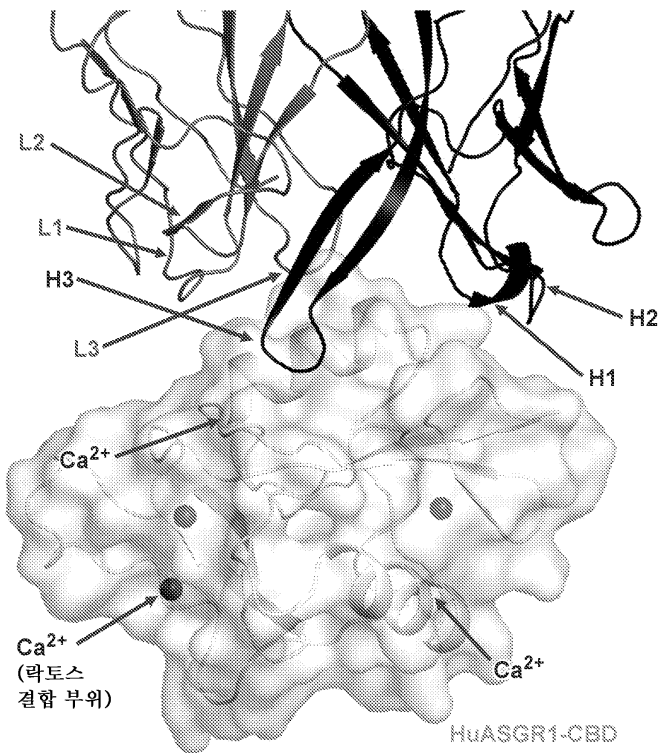
도면36b



도면37a



도면37b



도면38

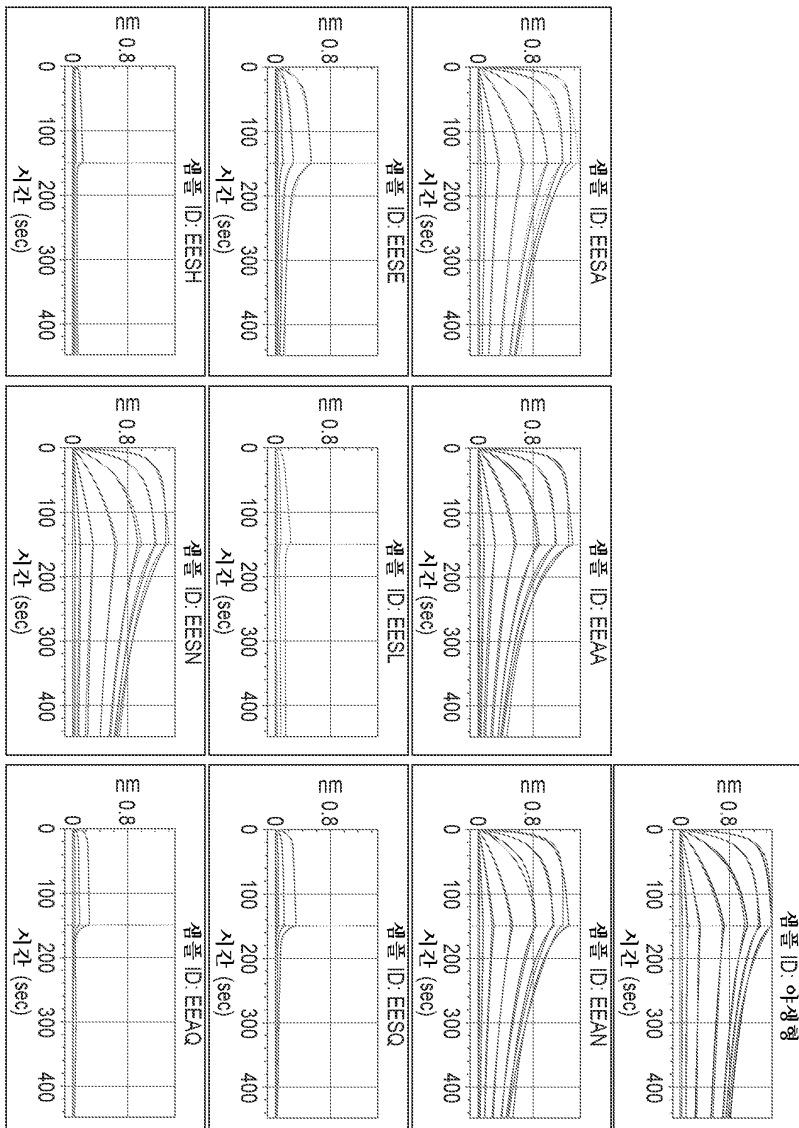
Rspo1	MRLGLC-VVAIVLSWTHLTISSRGIKGKRQRRI SAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPK	59
Rspo2	MQFRLFSFALIILNCMDYSHCQGNR-WRRSKR-ASYVSNPICKGLSCSKDNGCSRQOQK	58
Rspo3	MHLRLISWLFILNFM EYIGSQNASRGRRRMHPNVSQCGCGCATCSDYNGCLSCKPR	60
Rspo4	MRAPICLLLL-VAHAVDLA-----LNRKKQVGTGLGGNCTGCIICSEENGCTCQQR	53
	*: * : . . * : : ** ** * * * *	
Rspo1	LFILERNDIRQVGVCPLSCP PGYFDARNPDMNKCIKCKIENGEACPSHNPTCKEGELY	119
Rspo2	LEFFLRREGMRQYGECLHSCPSGYGHRAPDMNRCARCFIENCDSCFSKDFCTCKVGFY	118
Rspo3	LEFALERIGMKQIGVCLSSCP SGYGT RYVDINKCTCKA-PCDTCPNKNPCTCKSGFY	119
Rspo4	LELFIRREGIRQYKCLHDCPPGYPGIRGQEVNRCCKCGA-TCPSCFSDPTCKRQFY	112
	** : : * : : * * * * * * * * : * : : * * * * * * * * * * * *	
Rspo1	LHKGCYFACPEGSSAANGTMECSFAQCEMSEWSPWGPCSKKQQLCGFRGSEERTRRV	179
Rspo2	LHGRCPDECPDGFAPLEETMECVF--GCEVGHWSEWGTCSRNRNRTCGFKWGLETRTRQI	176
Rspo3	LHLGKCLNCPGLEANNHYMECVSIVHCEVSEWNPWSPCTKKGKTCGFKRGTETRVREI	179
Rspo4	LYKGCLEPTCPDPTLAPQYIRECCG--ECELGPWGGWSPCTHNGKTCGSAWGLESRVREA	170
	*: * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Rspo1	LHAPVGDHAACSDTKETRRCTVRRVPCPEGQKR--RKGQGRRENANRNLRKESKE---	234
Rspo2	VKKPVKDTILCPTIAESRRCKMTMRHCPGGKRT--PKAKEKRNKKKRLIERAQEQHSV	234
Rspo3	IQHPSAKGNLCPPTNETRKTCTVQRKKCQKGERG--KKGREKRKKPKNGESKEAIPDSKS	237
Rspo4	GRAGHEEAATQVLSESRKCFIQR-PCPGERSPGQKKGKDRRPRKDRKLDRLDVR---	226
	: . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Rspo1	--AGAGS-RRRKGQQQQQ-----QQGTVGPLTSAGPA	263 (SEQ ID NO: 47)
Rspo2	FLA-----TDRANQ-	243 (SEQ ID NO: 48)
Rspo3	LESSKEIPEQRENKQQQKRRKVDKQKSVSVTVH---	272 (SEQ ID NO: 49)
Rspo4	-----PRQPLQP-----	234 (SEQ ID NO: 50)

Fu1
 Fu2

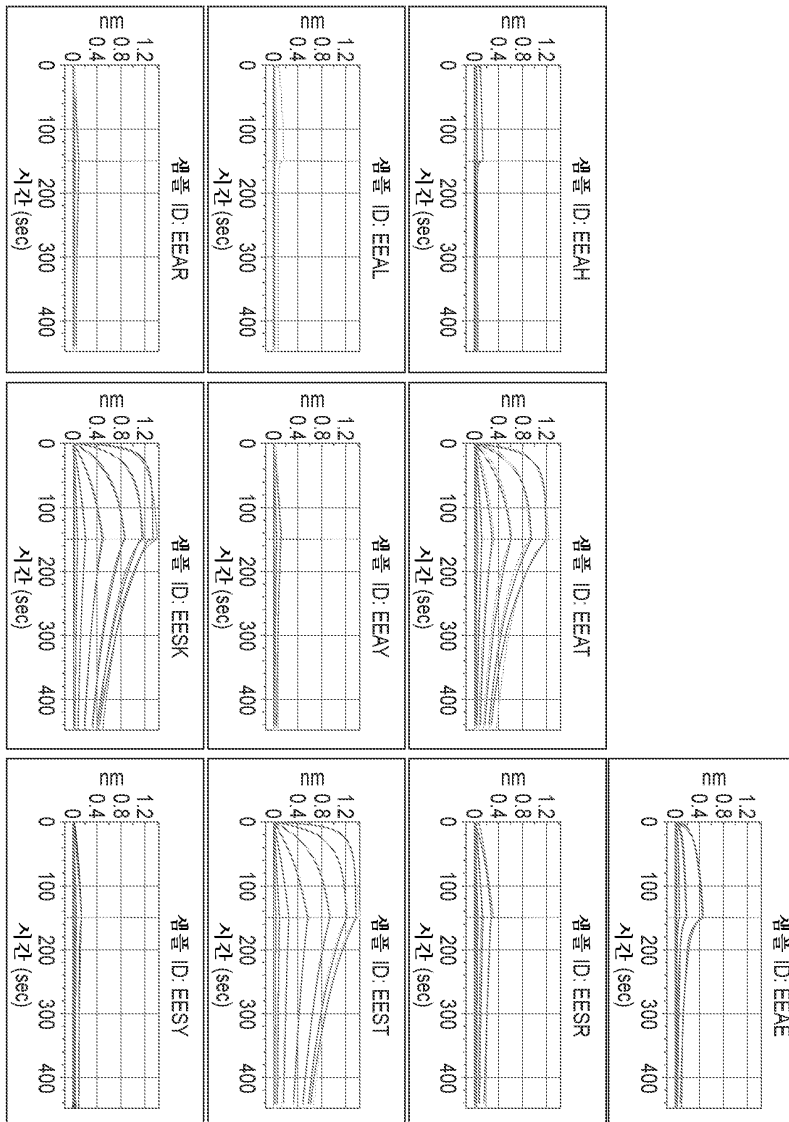
도면39a

아이디	아이디	KD (M)	Kent (TIMES)	정확도 (%)	시도 R _{0.97}
이생형	바이오-ASGR1	3.13E+08	2.53E+05	7.89E+03	0.9987
EESQ	바이오-ASGR1	1.80E+06	7.38E+04	1.33E+01	0.991
EESN	바이오-ASGR1	1.09E+08	3.65E+05	3.96E+03	0.998
EESL	바이오-ASGR1	1.08E+04	1.42E+01	1.54E+03	0
EESH	바이오-ASGR1	1.36E+04	2.56E+03	3.49E+01	0.9118
EESSE	바이오-ASGR1	9.59E+07	4.74E+04	4.55E+02	0.9908
EESA	바이오-ASGR1	2.14E+06	3.65E+05	7.82E+01	0.9961
EEAQ	바이오-ASGR1	1.51E+06	1.26E+05	1.90E+01	0.9947
EEAN	바이오-ASGR1	2.74E+06	3.38E+05	9.26E+01	0.9971
EEAA	바이오-ASGR1	2.57E+08	3.16E+05	8.14E+03	0.997
EEST	바이오-ASGR1	1.25E+08	3.09E+05	3.84E+03	0.9983
EESR	바이오-ASGR1	7.64E+08	2.41E+04	1.84E+03	0.9793
EESK	바이오-ASGR1	2.13E+06	4.09E+05	8.72E+01	0.9976
EESY	바이오-ASGR1	4.39E+07	7.91E+03	3.47E+03	0.9811
EEAL	바이오-ASGR1	1.55E+03	8.88E+01	1.38E+01	0.0226
EEAE	바이오-ASGR1	3.59E+06	2.02E+04	7.25E+02	0.9927
EEAH	바이오-ASGR1	2.35E+04	9.59E+03	2.25E+00	0.9593
EEAT	바이오-ASGR1	4.69E+08	1.55E+05	7.25E+03	0.9917
EEAY	바이오-ASGR1	6.13E+04	2.57E+03	1.58E+00	0.9632
EEAR	바이오-ASGR1	2.71E+03	3.50E+02	9.48E+01	0.9588

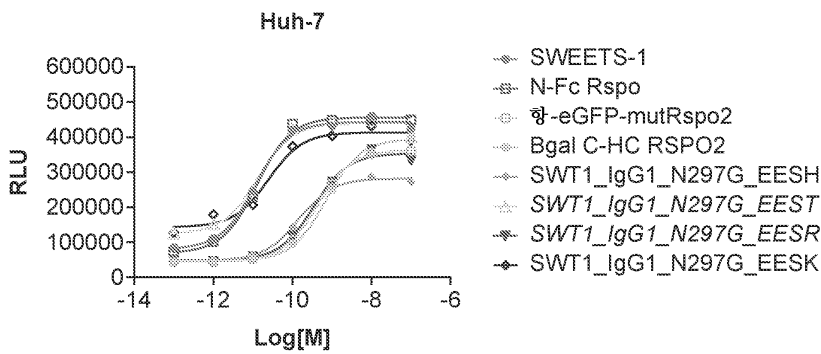
도면39b



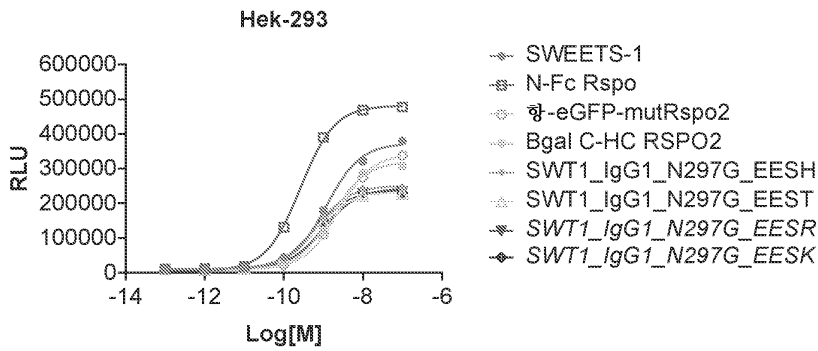
도면39c



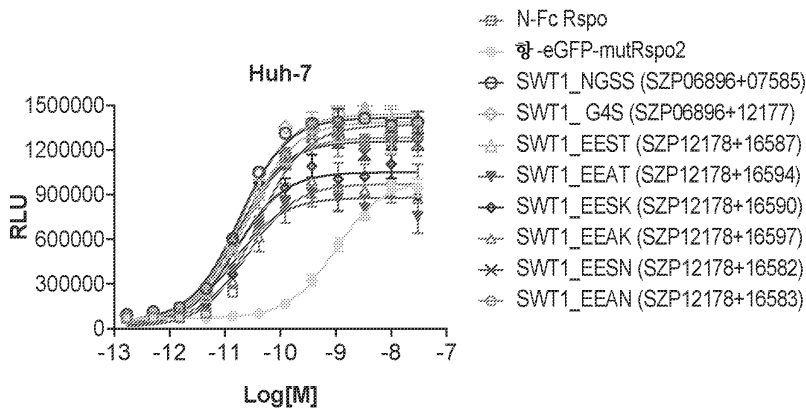
도면40a



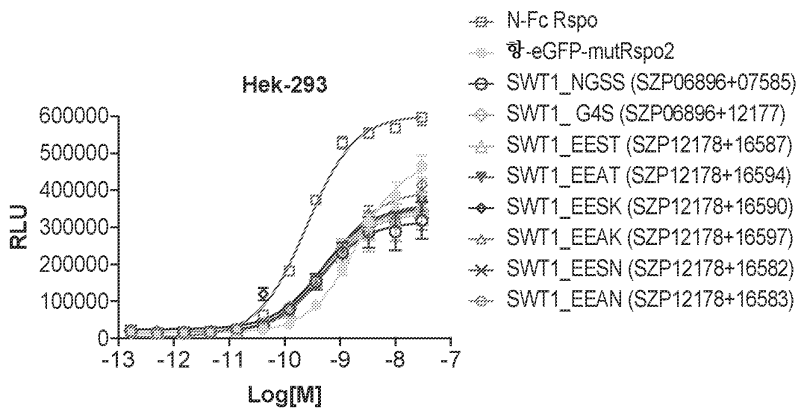
도면40b



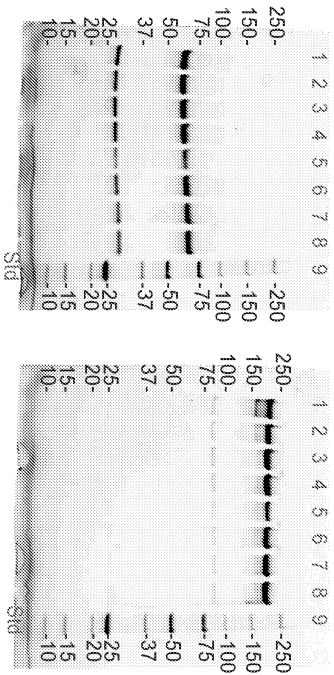
도면40c



도면40d



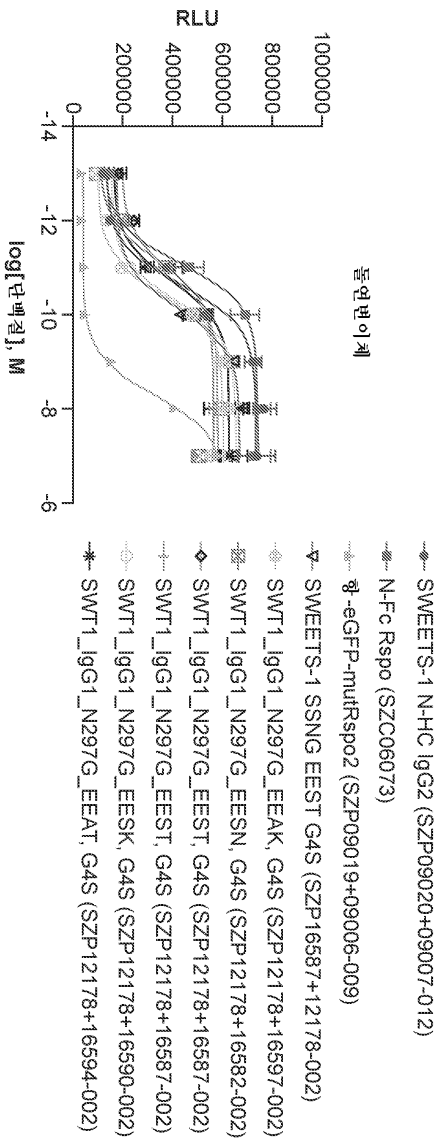
도면41



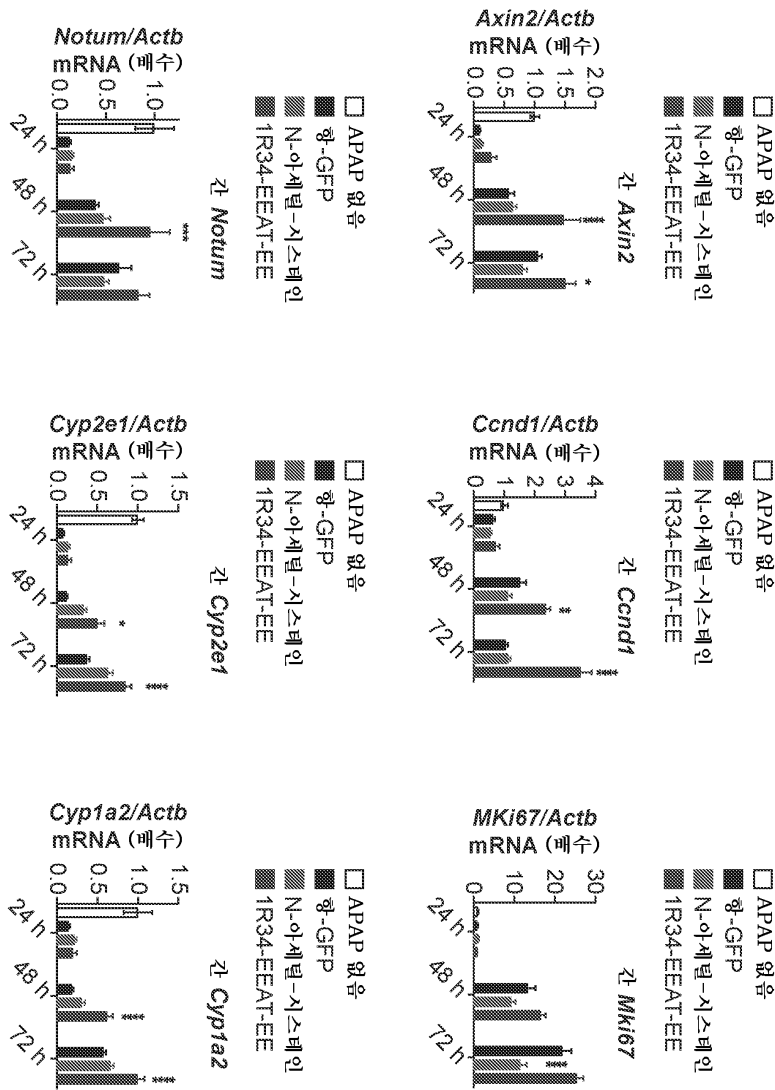
- 1: PPZ-3, SWT1_IgG1_N297융드 랭커(SS)
- 2: PPZ-4, SWT1_IgG1_N297_G4S (SS)
- 3: PPZ-5, SWT1_SS_EEST_NG_G4S
- 4: PPZ-6, SWT1_SS_EEAT_NG_G4S
- 5: PPZ-7, SWT1_SS_EESK_NG_G4S
- 6: PPZ-8, SWT1_SS_EEAK_NG_G4S
- 7: PPZ-9, SWT1_SS_EESN_NG_G4S
- 8: PPZ-10, SWT1_SS_EEAN_NG_G4S
- 9: 레퍼

PP#	SZP#	단백질 명칭	EC50, M	80 ml 배양물로부터의 농도 (µM)
Z-3	SZP06896+07585-013	SWT1_IgG1_N297G_융드 랭커	1.79E-11	1.98
Z-4	SZP06896+12177-001	SWT1_IgG1_N297G_(G4S)3 랭커	1.95E-11	1.85
Z-5	SZP12178+16587-001	SWT1_IgG1_N297G_EEST_G4S	2.39E-11	1.65
Z-6	SZP12178+16594-001	SWT1_IgG1_N297G_EEAT_G4S	1.45E-11	1.60
Z-7	SZP12178+16590-001	SWT1_IgG1_N297G_EESK_G4S	1.56E-11	0.78
Z-8	SZP12178+16597-001	SWT1_IgG1_N297G_EEAK_G4S	2.64E-11	1.32
Z-9	SZP12178+16582-001	SWT1_IgG1_N297G_EESN_G4S	1.65E-11	1.36
Z-10	SZP12178+16583-001	SWT1_IgG1_N297G_EEAN_G4S	2.05E-11	1.69

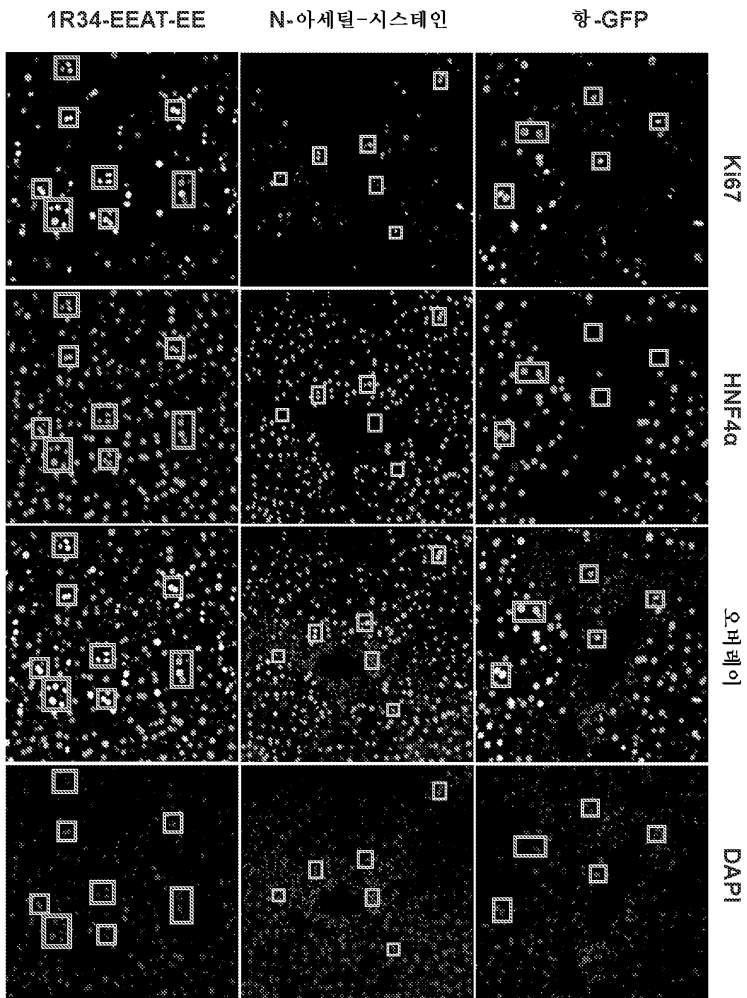
도면42



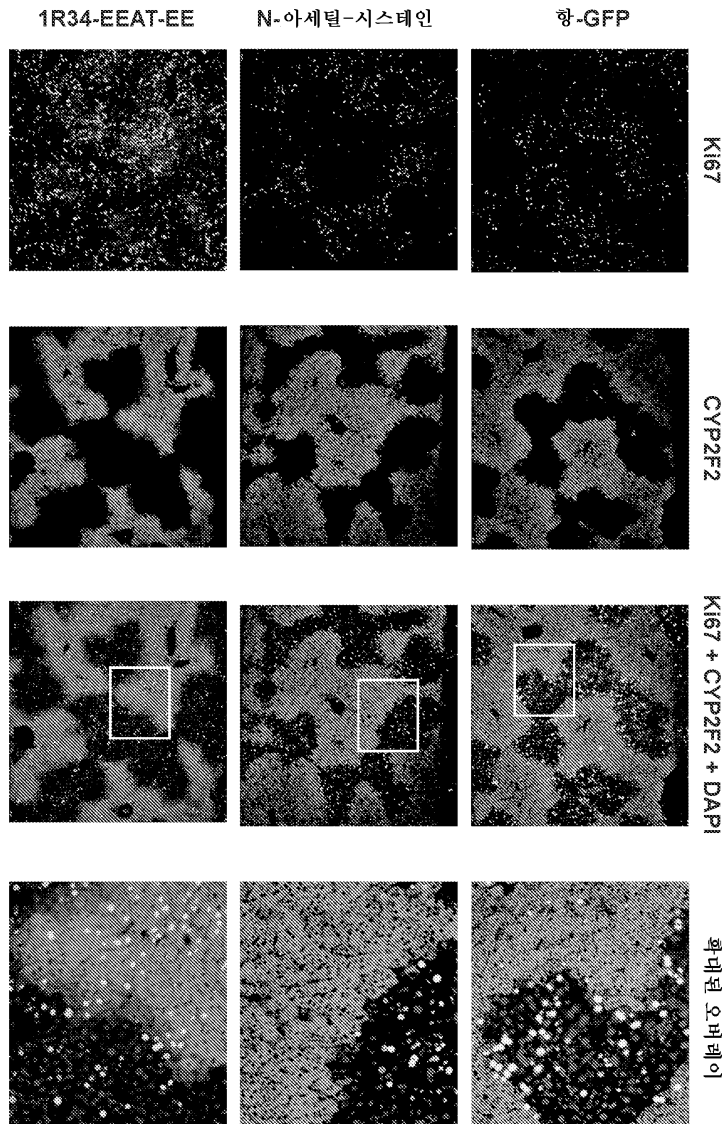
도면43



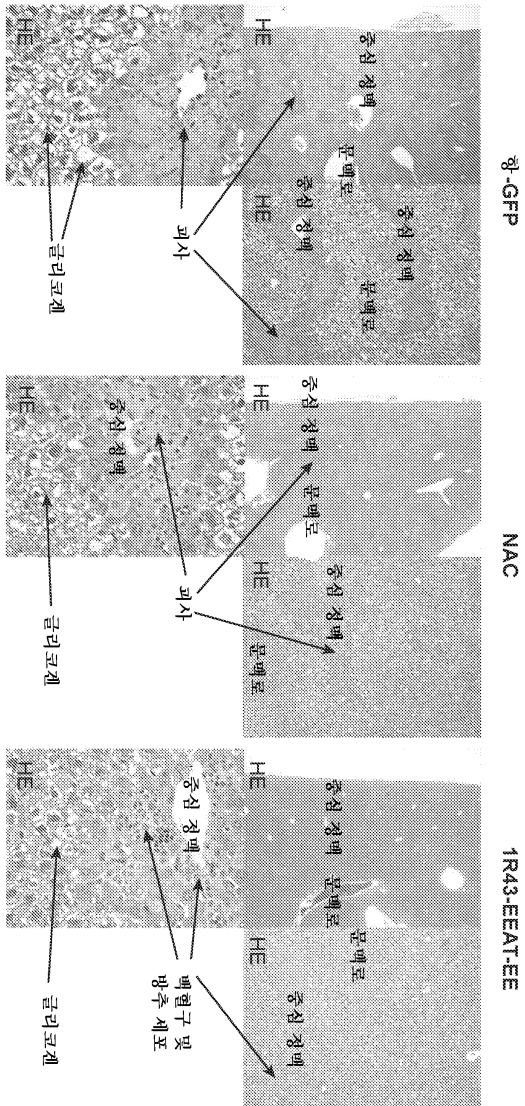
도면44



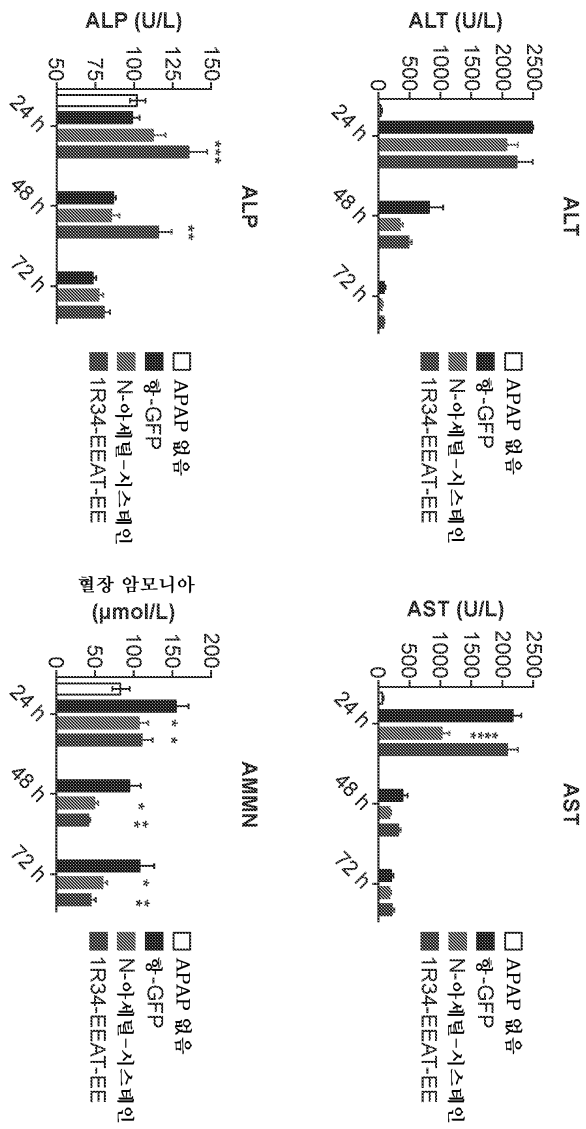
도면45



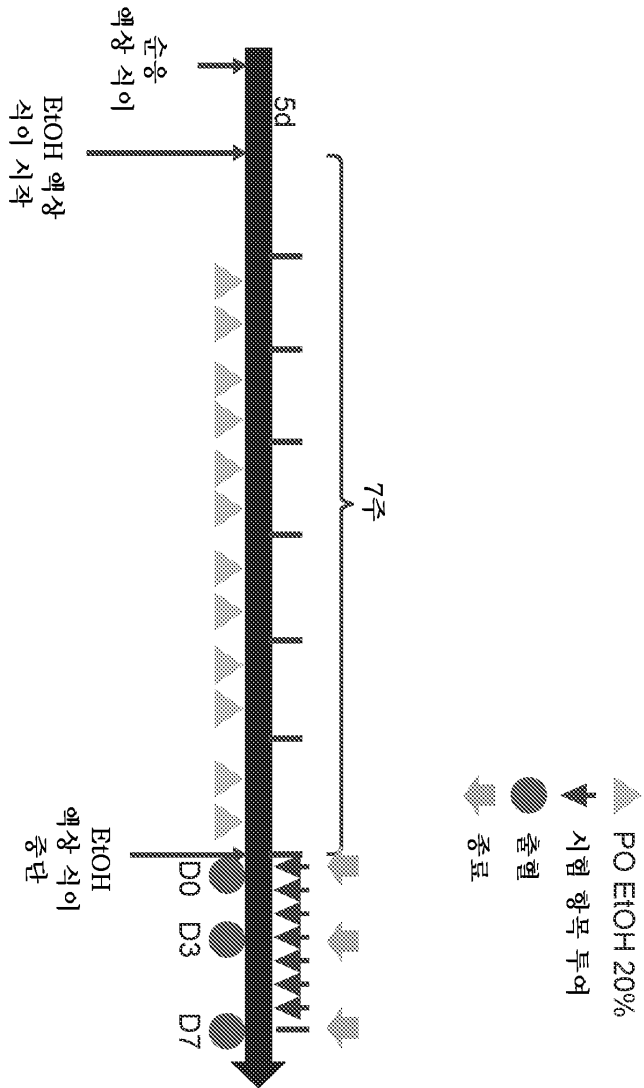
도면46



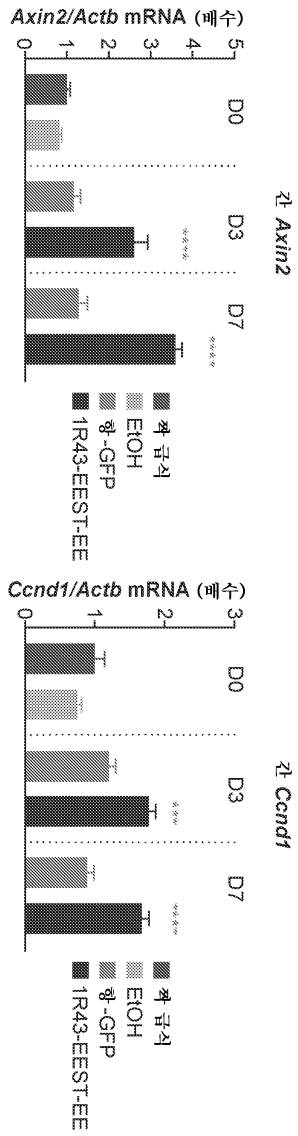
도면47



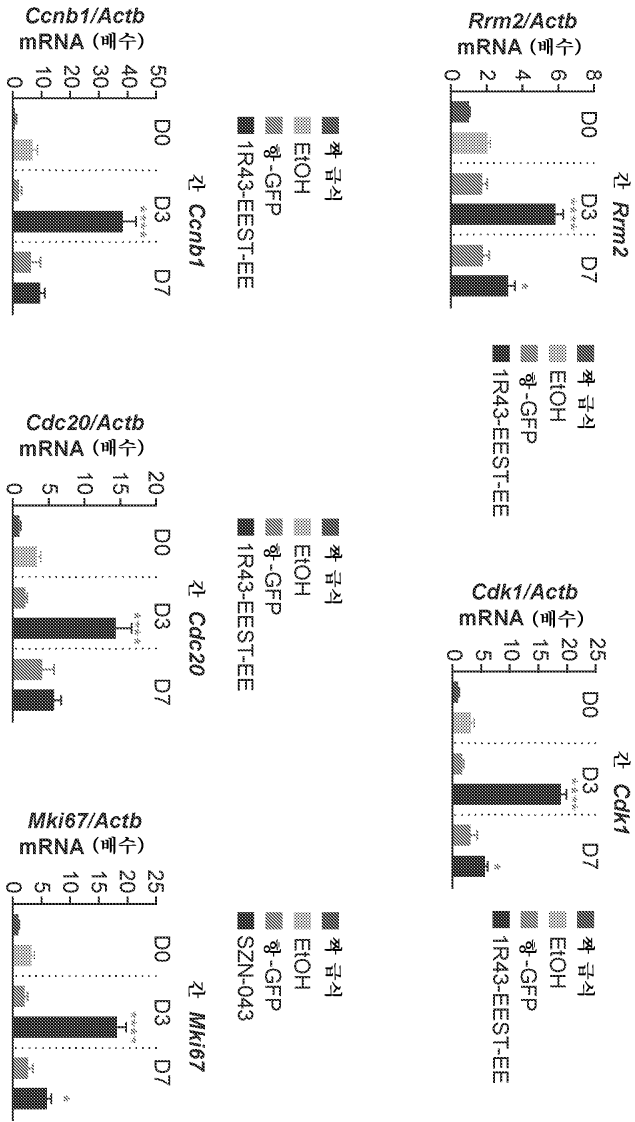
도면48



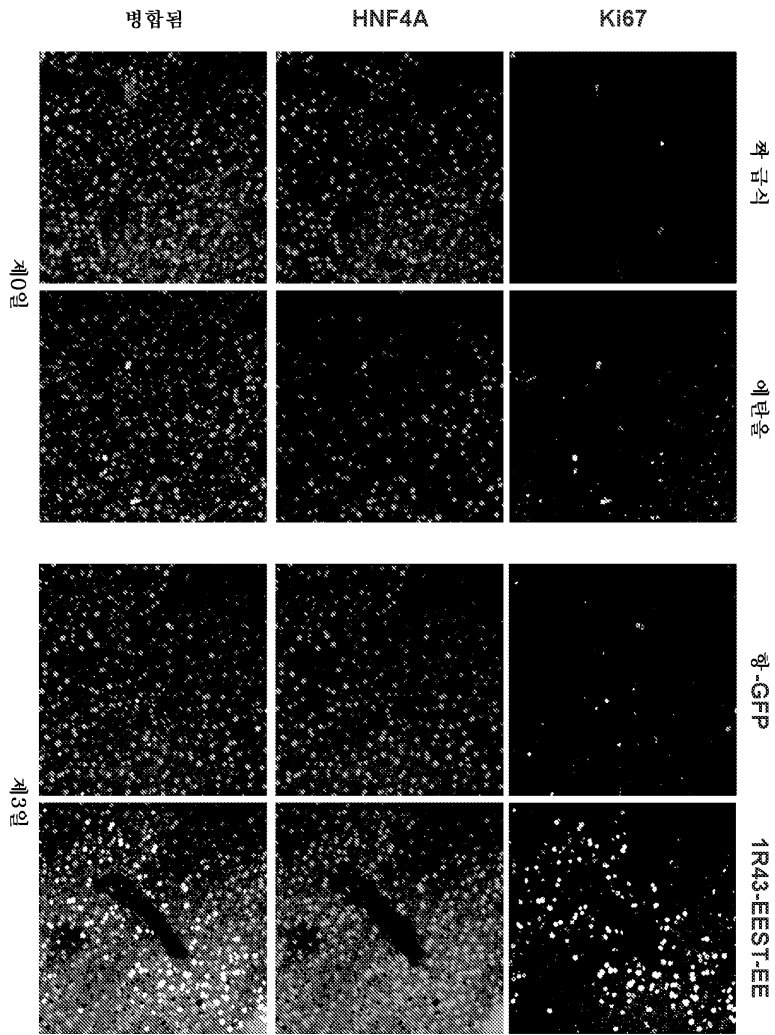
도면49



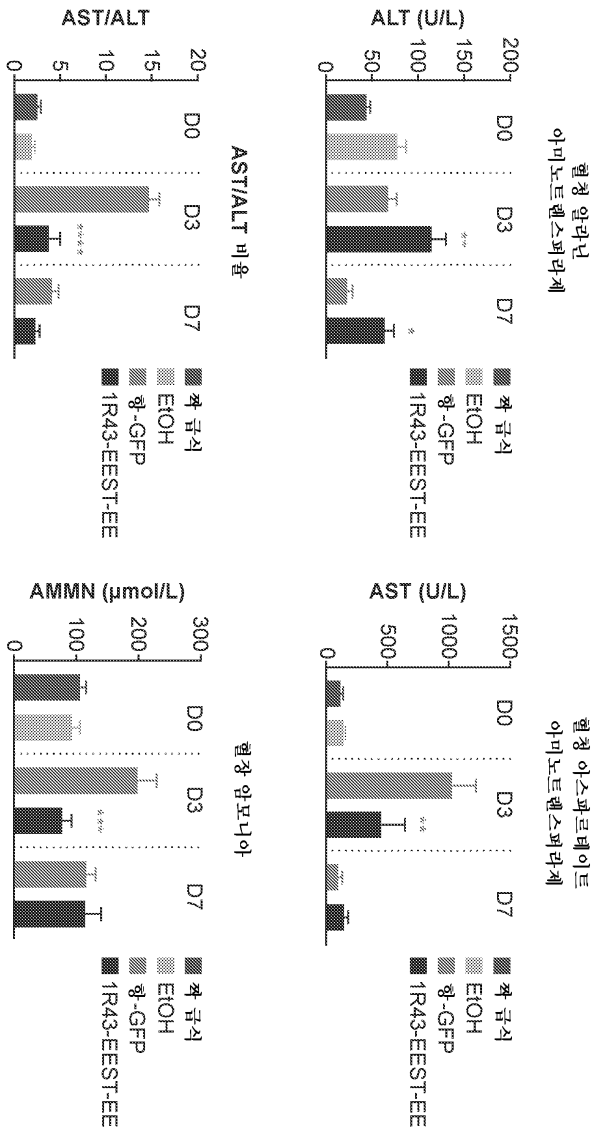
도면50



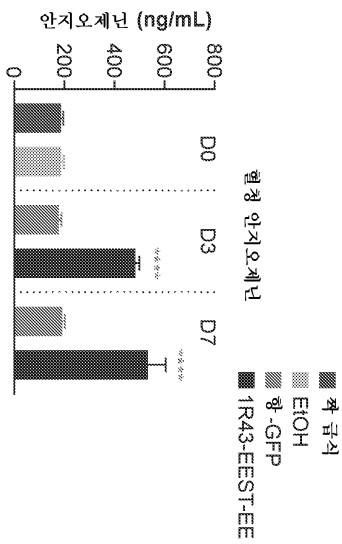
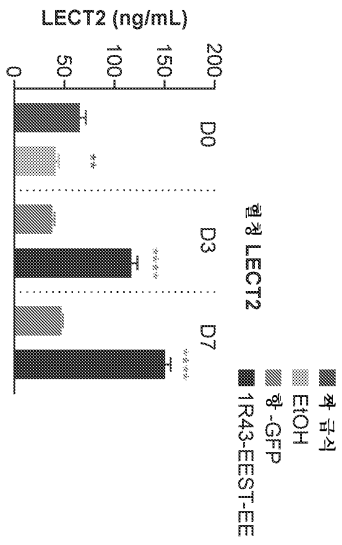
도면51



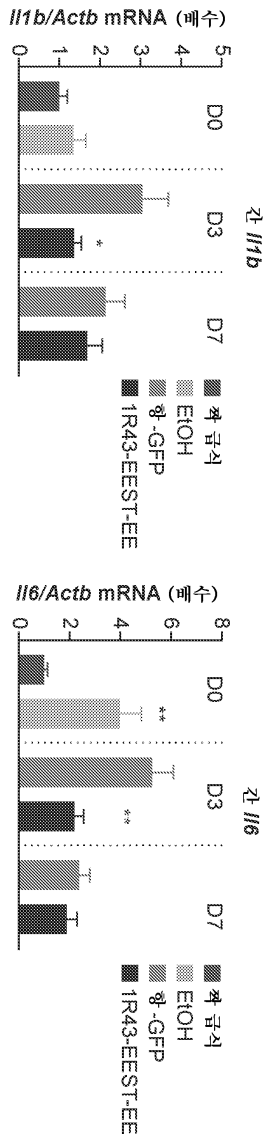
도면52



도면53



도면54



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Surrozen, Inc.

<120> LIVER-SPECIFIC WNT SIGNAL ENHANCING MOLECULES AND USES THEREOF

<130> SRZN-019/03WO 328202-2142

<150> US 63/114,457

<151> 2020-11-16

<150> US 63/182,106

<151> 2021-04-30

<150> US 63/248,157

<151> 2021-09-24

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

420 425 430

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

435 440 445

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln

530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His

545 550 555 560

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

565 570

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Humanized VL domain modified from 8M24 antibody

<400> 3

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 Ile Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

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

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 4

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - fusion construct heavy chain variable domain fused
 to RSP02

<400> 4

Asn Pro Ile Cys Lys Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys Asp Asn Gly Cys
 1 5 10 15
 Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Phe Leu Arg Arg Glu Gly Met

20 25 30
 Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly

35 40 45
 His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys Arg Ile Glu Asn

50 55 60
 Cys Asp Ser Cys Arg Ser Lys Asp Ala Cys Thr Lys Cys Lys Val Gly

65 70 75 80
 Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys Pro Asp Gly Phe

85 90 95
 Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu Gly Gly Gly Gly Ser

100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln

115 120 125

Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys
 130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Tyr Gly Thr Ser His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val

225 230 235 240

Thr Val Ser Ser

<210> 5

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - Humanized VL chain modified from 8M24 antibody

<400> 5

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ile Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Ala Ala Ile Asn Leu Ala Asp 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

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

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

<210> 8

<211> 572

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - fusion construct mutated EEST/EE heavy chain fused
 to RSP02

<400> 8

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

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

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 130 135 140

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg
 145 150 155 160

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser
 165 170 175

Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 180 185 190

Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 195 200 205

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Phe Ser Ser
 210 215 220

Arg Arg Trp Tyr Leu Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 225 230 235 240

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 245 250 255

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 260 265 270

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 275 280 285

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 290 295 300

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 305 310 315 320

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 325 330 335

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 340 345 350

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 355 360 365

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 370 375 380

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

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

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

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

 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 565 570

 <210> 9
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Made in Lab - mutated 1R34-EEST/RA light chain
 <400> 9
 Ser Ser Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Glu Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala

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

35 40 45
 Gly Lys Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser

50 55 60
 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu

65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Thr Ser Leu Glu Arg Ile Gly Tyr Leu

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

100 105 110
 Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu

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

130 135 140
 Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala

145 150 155 160
 Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala

165 170 175
 Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg

180 185 190
 Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr

195 200 205
 Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 10

<211> 572

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - fusion construct mutated 1R34-EEST/RA heavy chain

fused to RSP02

<400> 10

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

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

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

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

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 500 505 510

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 515 520 525

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 530 535 540

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 545 550 555 560

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 565 570

<210> 11

<211

> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - mutated 1R34-EEAT/EE light chain

<400> 11

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

Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Glu Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala
 20 25 30

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

Gly Lys Ala Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Thr Ser Leu Glu Arg Ile Gly Tyr Leu
 85 90 95

Ser Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 100 105 110

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

Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
 115 120 125
 Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
 130 135 140
 Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg
 145 150 155 160
 Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Ser
 165 170 175
 Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
 180 185 190
 Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 195 200 205
 Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Phe Ser Ser
 210 215 220
 Arg Arg Trp Tyr Leu Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 245 250 255
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 260 265 270
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 275 280 285
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 290 295 300
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 305 310 315 320
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 325 330 335
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24 antibody heavy chain variable domain

<400> 13

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

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

<210> 14

<211> 107

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24 antibody light chain variable domain

<400> 14

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

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

<210> 15

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24 antibody heavy chain variable domain
 (humanized 1)

<400> 15

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

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

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24 antibody heavy chain variable domain
(humanized 2)

<400> 16

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

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

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

Gln Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Lys Gly Arg Asp Tyr Gly Thr Ser His Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24 antibody light chain variable domain
(humanized 1)

<400> 17

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 Ile Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24 antibod light chain variable domain (humanized

2)

<400> 18

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 Ile Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ile Asn Leu Ala Asp 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 Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24-EASE-RA light chain variable domain

<400> 19

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 Ile Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 20

<211> 244

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - fusion construct 8M24-EASE-RA heavy chain variable domain fused to RSP02

<400> 20

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly

<400> 21

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

<210> 22

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - fusion construct 8M24-EASE-EE heavy chain fused to

RSPO2

<400> 22

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly

 35 40 45

His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys Arg Ile Glu Asn

 50 55 60

Cys Asp Ser Cys Glu Ser Lys Asp Glu Cys Thr Lys Cys Lys Val Gly

65 70 75 80

Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys Pro Asp Gly Phe

 85 90 95

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

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

 195 200 205

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

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 465 470 475 480

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 485 490 495

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 500 505 510

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 515 520 525

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 530 535 540

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 545 550 555 560

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 565 570

<210> 23

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 1R34-DDNN/RA light chain variable domain

<400> 23

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

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

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

Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 24

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - fusion construct 1R34-DDNN/RA heavy chain variable

domain fused to RSP02

<400> 24

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly

35 40 45

His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys Arg Ile Glu Asn

50 55 60

Cys Asp Ser Cys Arg Ser Lys Asp Ala Cys Thr Lys Cys Lys Val Gly

65 70 75 80

Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys Pro Asp Gly Phe

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg

145 150 155 160

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

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

Arg Arg Trp Tyr Leu Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 225 230 235 240
 Ser Ser

<210> 25

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24-EASE light chain

<400> 25

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 Ile Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30

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

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

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

130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 26

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - fusion construct 8M24-EASE heavy chain fused to
 RSPO2 (human IgG1_N297G)

<400> 26

Asn Pro Ile Cys Lys Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys Asp Asn Gly Cys
 1 5 10 15

Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Phe Leu Arg Arg Glu Gly Met
 20 25 30

Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly
 35 40 45

His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys Arg Ile Glu Asn
 50 55 60

Cys Asp Ser Cys Arg Ser Lys Asp Ala Cys Thr Lys Cys Lys Val Gly
 65 70 75 80

Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys Pro Asp Gly Phe
 85 90 95

Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu Gly Gly Gly Gly Ser
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Gln
 115 120 125

Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys
 130 135 140

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr Gly Ile Asn Trp Val Arg
 145 150 155 160

Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Glu Ile Phe Pro Arg
 165 170 175

Ser Asp Ser Thr Phe Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile
 180 185 190

Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
 195 200 205

Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Gly Arg Glu
 210 215 220

Tyr Gly Thr Ser His Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 225 230 235 240

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 245 250 255

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 260 265 270

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 275 280 285

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 290 295 300

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 305 310 315 320

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 325 330 335

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

340 345 350
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 355 360 365

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 370 375 380

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 385 390 395 400

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 405 410 415

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 420 425 430

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 435 440 445

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 450 455 460

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 465 470 475 480

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 485 490 495

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 500 505 510

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 515 520 525

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 530 535 540

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 545 550 555 560

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 565 570

<210> 27

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 1R34-EEST/EE light chain variable domain

<400> 27

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

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

 100 105

<210> 28

<211> 242

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - fusion construct 1R34-EEST/EE heavy chain variable region fused to RSP02

<400> 28

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly

 35 40 45

His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys Arg Ile Glu Asn

1 5 10 15
 Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Phe Leu Arg Arg Glu Gly Met
 20 25 30

Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly
 35 40 45

His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys Arg Ile Glu Asn
 50 55 60

Cys Asp Ser Cys Arg Ser Lys Asp Ala Cys Thr Lys Cys Lys Val Gly
 65 70 75 80

Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys Pro Asp Gly Phe
 85 90 95

Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu
 100 105

<210> 30

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - modified R-spondin-2

<400> 30

Asn Pro Ile Cys Lys Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys Asp Asn Gly Cys
 1 5 10 15

Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Phe Leu Arg Arg Glu Gly Met
 20 25 30

Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly
 35 40 45

His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys Arg Ile Glu Asn
 50 55 60

Cys Asp Ser Cys Ala Ser Lys Asp Ala Cys Thr Lys Cys Lys Val Gly
 65 70 75 80

Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys Pro Asp Gly Phe
 85 90 95

Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu

100

105

<210> 31

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - modified R-spondin-2

<400> 31

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly

 35 40 45

His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys Arg Ile Glu Asn

 50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys Pro Asp Gly Phe

 85 90 95

Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu

 100 105

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - modified R-spondin-2

<400> 32

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly

35 40 45
 His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys Arg Ile Glu Asn

50 55 60
 Cys Asp Ser Cys Glu Ser Lys Asp Glu Cys Thr Lys Cys Lys Val Gly
 65 70 75 80

Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys Pro Asp Gly Phe
 85 90 95

Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu
 100 105

<210> 33

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 1R34-DDNN/RA heavy chain

<400> 33

Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala Lys Asp Phe Ser Ser Arg Arg Trp Tyr Leu Glu Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

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

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

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

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

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 1R34-EEST/EE CDRH3

<400> 36

Asp Phe Ser Ser Arg Arg Trp Tyr Leu Glu Tyr

1 5 10

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 1R34-EEST/EE CDRL1

<400> 37

Gln Gly Glu Ser Leu Arg Ser Tyr Tyr Ala Ser

1 5 10

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 1R34-EEST/EE CDRL2

<400> 38

Tyr Gly Lys Ser Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 39

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 1R34-EEST/EE CDRL3

<400> 39

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

1 5 10

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 1R34-EEAT/EE CDRL2

<400> 40

Tyr Gly Lys Ala Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24-EASE CDRL1

<400> 41

Arg Ile Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24-EASE CDRL2

<400> 42

Ala Ala Ile Asn Leu Ala Glu

1 5

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24-EASE CDRL3

<400> 43

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24-EASE CDRH1

<400> 44

Ala Tyr Gly Ile Asn

1 5

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24-EASE CDRH2

<400> 45

Glu Ile Phe Pro Arg Ser Asp Ser Thr Phe Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24-EASE CDRH3

<400> 46

Lys Gly Arg Glu Tyr Gly Thr Ser His Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 47

<211> 263

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Ala Leu Val Leu Ser Trp Thr His

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Arg Gly Ile Lys Gly Lys Arg Gln Arg Arg Ile

20 25 30

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

35 40 45

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

Met Gln Phe Arg Leu Phe Ser Phe Ala Leu Ile Ile Leu Asn Cys Met
 1 5 10 15
 Asp Tyr Ser His Cys Gln Gly Asn Arg Trp Arg Arg Ser Lys Arg Ala
 20 25 30
 Ser Tyr Val Ser Asn Pro Ile Cys Lys Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys
 35 40 45
 Asp Asn Gly Cys Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Phe Leu Arg
 50 55 60
 Arg Glu Gly Met Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser
 65 70 75 80
 Gly Tyr Tyr Gly His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys
 85 90 95
 Arg Ile Glu Asn Cys Asp Ser Cys Phe Ser Lys Asp Phe Cys Thr Lys
 100 105 110
 Cys Lys Val Gly Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys
 115 120 125
 Pro Asp Gly Phe Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu Gly
 130 135 140
 Cys Glu Val Gly His Trp Ser Glu Trp Gly Thr Cys Ser Arg Asn Asn

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

 210 215 220
 Ile Glu Arg Ala Gln Glu Gln His Ser Val Phe Leu Ala Thr Asp Arg
 225 230 235 240
 Ala Asn Gln

<210> 49

<211> 272

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Met His Leu Arg Leu Ile Ser Trp Leu Phe Ile Ile Leu Asn Phe Met

1 5 10 15

Glu Tyr Ile Gly Ser Gln Asn Ala Ser Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg

 20 25 30

Met His Pro Asn Val Ser Gln Gly Cys Gln Gly Gly Cys Ala Thr Cys

 35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr

 85 90 95

Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr

 100 105 110

Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn

115 120 125

Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser

130 135 140

Ile Val His Cys Glu Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr

145 150 155 160

Lys Lys Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val

 165 170 175

Arg Glu Ile Ile Gln His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro

180 185 190

Thr Asn Glu Thr Arg Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln Lys

195 200 205

Gly Glu Arg Gly Lys Lys Gly Arg Glu Arg Lys Arg Lys Lys Pro Asn
 210 215 220

Lys Gly Glu Ser Lys Glu Ala Ile Pro Asp Ser Lys Ser Leu Glu Ser
 225 230 235 240

Ser Lys Glu Ile Pro Glu Gln Arg Glu Asn Lys Gln Gln Gln Lys Lys
 245 250 255

Arg Lys Val Gln Asp Lys Gln Lys Ser Val Ser Val Ser Thr Val His
 260 265 270

<210> 50

<211> 234

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Met Arg Ala Pro Leu Cys Leu Leu Leu Leu Val Ala His Ala Val Asp

1 5 10 15

Met Leu Ala Leu Asn Arg Arg Lys Lys Gln Val Gly Thr Gly Leu Gly
 20 25 30

Gly Asn Cys Thr Gly Cys Ile Ile Cys Ser Glu Glu Asn Gly Cys Ser
 35 40 45

Thr Cys Gln Gln Arg Leu Phe Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gly Ile Arg
 50 55 60

Gln Tyr Gly Lys Cys Leu His Asp Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Gly Ile

65 70 75 80

Arg Gly Gln Glu Val Asn Arg Cys Lys Lys Cys Gly Ala Thr Cys Glu
 85 90 95

Ser Cys Phe Ser Gln Asp Phe Cys Ile Arg Cys Lys Arg Gln Phe Tyr
 100 105 110

Leu Tyr Lys Gly Lys Cys Leu Pro Thr Cys Pro Pro Gly Thr Leu Ala
 115 120 125

His Gln Asn Thr Arg Glu Cys Gln Gly Glu Cys Glu Leu Gly Pro Trp

130

135

140

Gly Gly Trp Ser Pro Cys Thr His Asn Gly Lys Thr Cys Gly Ser Ala
 145 150 155 160
 Trp Gly Leu Glu Ser Arg Val Arg Glu Ala Gly Arg Ala Gly His Glu
 165 170 175
 Glu Ala Ala Thr Cys Gln Val Leu Ser Glu Ser Arg Lys Cys Pro Ile
 180 185 190
 Gln Arg Pro Cys Pro Gly Glu Arg Ser Pro Gly Gln Lys Lys Gly Arg

 195 200 205
 Lys Asp Arg Arg Pro Arg Lys Asp Arg Lys Leu Asp Arg Arg Leu Asp
 210 215 220
 Val Arg Pro Arg Gln Pro Gly Leu Gln Pro
 225 230

<210> 51

<211> 574

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - fusion construct 8M24-EASE-RA heavy chain fused to
 RSP02

<400> 51

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

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

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

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 355 360 365
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 370 375 380
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 385 390 395 400
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 405 410 415
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 420 425 430
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 435 440 445
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 450 455 460
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 465 470 475 480
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 485 490 495
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 500 505 510
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 515 520 525
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 530 535 540
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 545 550 555 560
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 565 570
 <210> 52
 <211> 169
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - modified human ASGR1

<400> 52

His His His His His His His His Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp
 1 5 10 15
 Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ser Gly Ser Gly Cys
 20 25 30
 Pro Val Asn Trp Val Glu His Glu Arg Ser Cys Tyr Trp Phe Ser Arg
 35 40 45
 Ser Gly Lys Ala Trp Ala Asp Ala Asp Asn Tyr Cys Arg Leu Glu Asp
 50 55 60
 Ala His Leu Val Val Val Thr Ser Trp Glu Glu Gln Lys Phe Val Gln
 65 70 75 80
 His His Ile Gly Pro Val Asn Thr Trp Met Gly Leu His Asp Gln Asn
 85 90 95
 Gly Pro Trp Lys Trp Val Asp Gly Thr Asp Tyr Glu Thr Gly Phe Lys
 100 105 110
 Asn Trp Arg Pro Glu Gln Pro Asp Asp Trp Tyr Gly His Gly Leu Gly
 115 120 125
 Gly Gly Glu Asp Cys Ala His Phe Thr Asp Asp Gly Arg Trp Asn Asp
 130 135 140
 Asp Val Cys Gln Arg Pro Tyr Arg Trp Val Cys Glu Thr Glu Leu Asp
 145 150 155 160
 Lys Ala Ser Gln Glu Pro Pro Leu Leu
 165

<210> 53

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24L1 Light-chain

<400> 53

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

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

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

 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 54
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - 8M24H1 Heavy-chain

<400> 54

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Lys Gly Arg Asp Tyr Gly Thr Ser His Tyr Phe Asp Tyr Trp

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

 180 185 190

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

 195 200 205

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

 210 215 220

Cys Gly Ser Gly Ser Gly His His His His His His

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - peptide linker

<400> 59

Gly Gly Gly Gly Gly Lys

1 5

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - peptide linker

<400> 60

Gly Gly Gly Gly Gly Lys Arg

1 5

<210> 61

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - peptide linker

<400> 61

Gly Gly Gly Lys Gly Gly Gly Gly

1 5

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Made in Lab - peptide linker

<400> 62

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

1 5 10 15