



등록특허 10-2619359



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년01월02일
(11) 등록번호 10-2619359
(24) 등록일자 2023년12월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/18 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/18 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7023748
- (22) 출원일자(국제) 2016년01월28일
심사청구일자 2021년01월27일
- (85) 번역문제출일자 2017년08월24일
- (65) 공개번호 10-2017-0120607
- (43) 공개일자 2017년10월31일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2016/050414
- (87) 국제공개번호 WO 2016/120809
국제공개일자 2016년08월04일
- (30) 우선권주장
62/109,001 2015년01월28일 미국(US)
62/266,557 2015년12월11일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문현
US20140056904 A1
W02010030203 A1

- (73) 특허권자
노보 노르디스크 에이/에스
덴마크 박스바에르트 (우편번호 디케이-2880) 노
보 알레 1
유니버시티 헬스 네트워크
캐나다 온타리오 엠5쥐 2씨4 토론토 엘리자베스
스트리트 190 알. 브레이저 엘리엇 빌딩-룸 1
에스-417
- (72) 발명자
니자 타를로칸 에스.
미국 캘리포니아주 94563 오란다 아이언바크 코트
712
캐크라바티 아비짓
캐나다 온타리오주 엘4케이 2이1 본 포인츠 오
우즈 드라이브 77
히가키 제프리 엔.
미국 캘리포니아주 94402 샌 마테오 퀸즈 레인
2071
- (74) 대리인
특허법인아주김장리

전체 청구항 수 : 총 26 항

심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 항-트랜스타이레틴 항체

(57) 요약

본 발명은 트랜스타이레틴(TTR)에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 항체는 TTR 축적 또는 TTR 침착물의 축적과 관련된 질환 또는 장애(예를 들어, TTR 아밀로이드증)를 치료하거나 또는 예방을 달성하기 위해 사용될 수 있다. 항체는 또한 용도 중에서도 TTR 아밀로이드증을 진단하고, TTR의 응집을 저해 또는 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1

	10	20	30	40
m6C1VH	EVOLVESGGGLVOPGGSLKLSCAASGFTFSNYYMSWVRQ 40			
2OTU_B_pro	QVQLQESEGGGLVQPGGSLKLSCAAGGFTFFRDYYMSWVRQ 40			
ADX65650	EVQLVESEGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTFSYEMNWVRQ 40			
Hu6C1Vhv1	EVQLVESEGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTFNYYMSWVRQ 40			
Hu6C1Vhv1b	EVQLVESEGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTFNYYMSWVRQ 40			
Hu6C1Vhv2	EVQLVESEGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTFNYYMSWVRQ 40			
Hu6C1Vhv2b	EVQLVESEGGGLVQPGGSLRLSCAAGGFTFNYYMSWVRQ 40			
Hu6C1Vhv3	EVQLVESEGGGLVQPGGSLKLSCAAGGFTFNYYMSWVRQ 40			
Hu6C1Vhv3b	EVQLVESEGGGLVQPGGSLKLSCAAGGFTFNYYMSWVRQ 40			
	50	60	70	80
m6C1VH	PEKRLLEWVAVISIDGNNIYHEDSVKGRTTISRDNAKNTLY 80			
2OTU_B_pro	PEKRLLEWVAVISNGGGSTYYXPDTVKGRFTTISRDNAKNTLY 80			
ADX65650	PGKGLEWVWSVISSSGSTIYYADSVKGRTTISRDNAKNTLY 80			
6C1Vhv1	PGKGLEWVWSVIIDGNNIYHEDSVKGRTTISRDNAKNTLY 80			
Hu6C1Vhv1b	PGKGLEWVAVISIDGNNIYHEDSVKGRTTISRDNAKNTLY 80			
Hu6C1Vhv2	PGKGLEWVWSVIIDGNNIYHEDSVKGRTTISRDNAKNTLY 80			
Hu6C1Vhv2b	PGKGLEWVAVISIDGNNIYHEDSVKGRTTISRDNAKNTLY 80			
Hu6C1Vhv3	PGKGLEWVWSVIIDGNNIYHEDSVKGRTTISRDNAKNTLY 80			
Hu6C1Vhv3b	PGKRLLEWVAVISIDGNNIYHEDSVKGRTTISRDNAKNTLY 80			
	90	100	110	
m6C1VH	LQMNSLKSEDTAMYCCARDSDYGYFDVWGQTTLVTVSS 118	(서열번호 1)		
2OTU_B_pro	LQMNSLKSEDTAMYCCARDGRGYWVFAWYVGQGTTLVTVSS 118	(서열번호 2)		
ADX65650	LQMNSLRAEDTAVYYCCARDLSGSYYGVGGQTLVTVSS 118	(서열번호 3)		
Hu6C1Vhv1	LQMNSLRAEDTAVYYCCARDSDYGYFDVWGQGTTLVTVSS 118	(서열번호 4)		
Hu6C1Vhv1b	LQMNSLRAEDTAVYYCCARDSDYGYFDVWGQGTTLVTVSS 118	(서열번호 5)		
Hu6C1Vhv2	LQMNSLRAEDTAVYYCCARDSDYGYFDVWGQGTTLVTVSS 118	(서열번호 6)		
Hu6C1Vhv2b	LQMNSLRAEDTAVYYCCARDSDYGYFDVWGQGTTLVTVSS 118	(서열번호 7)		
Hu6C1Vhv3	LQMNSLKAEDTAMYYCCARDSDYGYFDVWGQGTTLVTVSS 118	(서열번호 8)		
Hu6C1Vhv3b	LQMNSLKAEDTAMYYCCARDSDYGYFDVWGQGTTLVTVSS 118	(서열번호 9)		

(52) CPC특허분류

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

C07K 2317/56 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2317/567 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

트랜스타이레틴에 특이적으로 결합하는 단클론성 항체로서, 성숙 중쇄 가변 영역 및 성숙 경쇄 가변 영역을 포함하고, 상기 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 3개의 중쇄 CDR을 포함하고, 상기 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 13의 3개의 경쇄 CDR을 포함하는, 단클론성 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 각각 서열번호 10 내지 12로 표시되는 3개의 카바트(Kabat) 중쇄 CDR 및 각각 서열번호 18 내지 20으로 표시되는 3개의 카바트 경쇄 CDR을 포함하는, 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 중쇄 CDR-H1의 서열이 서열번호 63인, 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 키메라, 인간화(humanized) 또는 베니어(veneered) 항체인, 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 항체는 인간 IgG1 아이소타입, 인간 IgG2 아이소타입 또는 인간 IgG4 아이소타입을 갖는, 항체.

청구항 6

제4항에 있어서, 서열번호 9와 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 성숙 중쇄 가변 영역 및 서열번호 17과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 갖는 성숙 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 7

제6항에 있어서, 제공된 위치 H19, H44, H49, H77, H83 및 H89가 각각 K, R, A, T, K 및 M에 의해 점유되는, 항체.

청구항 8

제7항에 있어서, 제공된 위치 L45가 K에 의해 점유되는, 항체.

청구항 9

제6항에 있어서, 서열번호 9와 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 성숙 중쇄 가변 영역 및 서열번호 17과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 성숙 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 10

제9항에 있어서, 서열번호 9와 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 갖는 성숙 중쇄 가변 영역 및 서열번호 17과 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 갖는 성숙 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

청구항 11

제6항에 있어서, 상기 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 9의 아미노산 서열을 갖고, 상기 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 17의 아미노산 서열을 갖는, 항체.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 항체는 무손상 항체인, 항체.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 항체는 결합 단편인, 항체.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 결합 단편은 단일쇄 항체, Fab 또는 $F(ab')_2$ 단편인, 항체.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 성숙 경쇄 가변 영역은 경쇄 불변 영역에 융합되고, 상기 성숙 중쇄 가변 영역은 중쇄 불변 영역에 융합된, 항체.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 성숙 중쇄 가변 영역은 C-말단 라이신을 갖거나 갖지 않는 서열번호 26의 서열을 갖는 중쇄 불변 영역에 융합된, 항체.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 28의 서열을 갖는 경쇄 불변 영역에 융합된, 항체.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 성숙 중쇄 가변 영역은 C-말단 라이신을 갖거나 갖지 않는 서열번호 26의 서열을 갖는 중쇄 불변 영역에 융합되고, 상기 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 28의 서열을 갖는 경쇄 불변 영역에 융합된, 항체.

청구항 19

제1항의 항체 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 트랜스타이레틴 매개 아밀로이드증의 치료 또는 예방을 위한 약제학적 조성물.

청구항 20

제1항의 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는, 핵산 또는 핵산들.

청구항 21

제20항의 핵산을 포함하는, 재조합 발현 벡터.

청구항 22

제19항의 재조합 발현 벡터를 이용하여 형질전환된 단리된 숙주 세포.

청구항 23

항체를 인간화하는 방법으로서,

(a) 하나 이상의 수용자(acceptor) 항체 서열을 선택하는 단계;

(b) 보유될 마우스 항체의 아미노산 잔기를 동정하는 단계;

(c) 상기 마우스 항체의 중쇄의 CDR을 포함하는 인간화 중쇄를 암호화하는 핵산 및 상기 마우스 항체의 경쇄의 CDR을 포함하는 인간화 경쇄를 암호화하는 핵산을 합성하는 단계; 및

(d) 숙주 세포에서 상기 핵산을 발현시켜 인간화 항체를 생산시키는 단계를 포함하되,

상기 마우스 항체는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 성숙 중쇄 가변 영역 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 갖는 성숙 경쇄 가변 영역을 포함하는, 항체를 인간화하는 방법.

청구항 24

인간화, 키메라 또는 베니어 항체의 생산 방법으로서,

(a) 세포가 항체를 분비하도록, 형질전환된 세포를 상기 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 핵산과 함께 배양시키는 단계; 및

(b) 세포 배양물 배지로부터 상기 항체를 정제하는 단계를 포함하되,

상기 항체는 제1항의 항체의 인간화, 키메라 또는 베니어 항체 형태인, 인간화, 키메라 또는 베니어 항체의 생산 방법.

청구항 25

인간화, 키메라 또는 베니어 항체를 생산하는 세포주의 생성 방법으로서,

(a) 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 백터 및 선택 가능한 마커를 세포 내로 도입하는 단계;

(b) 상기 백터의 복제 수가 증가된 세포를 선택하기 위한 조건 하에 상기 세포를 증식시키는 단계;

(c) 선택된 세포로부터 단일 세포를 단리시키는 단계; 및

(d) 항체의 수율에 기초하여 선택된 단일 세포로부터 클로닝된 세포를 보관(banking)하는 단계를 포함하되,

상기 항체는 제1항의 항체의 인간화, 키메라 또는 베니어 형태인, 세포주의 생성 방법.

청구항 26

대상체에서의 트랜스타이레틴 침착물의 존재 또는 부재를 검출하는 방법으로서,

아밀로이드 축적을 포함하는 것으로 의심되는 상기 대상체로부터의 생물학적 샘플을 유효량의 제1항의 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 트랜스타이레틴 침착물의 존재 또는 부재를 검출하는 방법.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련출원에 대한 상호참조

[0002]

본 출원은 2015년 1월 28일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/109,001호 및 2015년 12월 11일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/266,557호와 관련되며, 이들 각각은 그들의 전문이 참고로 포함된다.

[0003]

서열목록에 대한 참조

[0004]

본 출원은 2016년 1월 28일자로 생성되고 용량이 70,775 바이트인 파일명473380_SEQLST.TXT의 전자 서열 목록을 포함하며, 이는 본 명세서에 모든 목적을 위하여 그의 전체가 참고로 포함된다.

배경 기술

[0005]

몇몇 질환은 질환-특정 단백질의 비정상적 폴딩 및 응집에 의해 야기되는 것으로 생각된다. 이들 단백질은 특정 조직학적 균주에 의해 시작화되는 아밀로이드로서 알려진 병리적으로 진단된 축적물 내로 축적될 수 있다. 아밀로이드는 염증 반응을 유발하는 것으로 생각되고, 연루된 조직에 대한 다중 음성 결과를 가진다. 추가로, 비정상적으로 폴딩된 단백질의 더 작은 응집물이 존재하고, 세포독성 효과를 발휘할 수 있다.

[0006]

트랜스타이레틴(TTR)은 미스폴딩하고 응집하는 것으로 알려진 다수의 단백질 중 하나이다(예를 들어, 아밀로이드 생성(아밀로이드 생성)을 겪음). 트랜스타이레틴-관련 아밀로이드증은 2가지 형태의 질환을 포함한다: 돌연

변이 또는 변이체 TTR의 미스풀딩으로부터 생기는 가족성 질환, 및 야생형 TTR의 잘못된 응집에 의해 야기되는 산발적인, 비유전적 질환. TTR 아밀로이드 생성 과정은 신경계 및/또는 심장에서 뿐만 아니라 다른 조직에서의 병리를 야기할 수 있다.

발명의 내용

[0007]

일 양상에서, 본 발명은 항체 6C1로부터의 실질적으로 3개의 중쇄 CDR 및 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 트랜스타이레틴에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 일부 이러한 항체는 항체 6C1의 3개의 카바트(Kabat) 중쇄 CDR(각각 서열번호 10 내지 12) 및 3개의 경쇄 CDR(각각 서열번호 18 내지 20)을 포함한다. 일부 항체에서, 중쇄 CDR-H1은 복합 카바트-코티아(composite Kabat-Chothia) CDR-H1(서열번호 63)이다. 일부 이러한 항체는 단클론성 항체이다. 일부 이러한 항체는 키메라, 인간화된(humanized), 베니어(veneered) 또는 인간 항체이다. 일부 이러한 항체는 인간 IgG1 아이소타입을 가진다. 일부 이러한 항체는 인간 IgG2 또는 IgG4 아이소타입을 가진다.

[0008]

일부 이러한 항체는 트랜스타이레틴에 특이적으로 결합하는 인간화된 또는 키메라 6C1 항체이되, 6C1은 서열번호 1의 성숙 중쇄 가변 영역 및 서열번호 13의 성숙 경쇄 가변 영역을 특징으로 하는 마우스 항체이다.

[0009]

일부 항체에서, 인간화된 성숙 중쇄 가변 영역은 6C1의 3개의 중쇄 CDR을 포함하고, 인간화된 성숙 경쇄 가변 영역은 6C1의 3개의 경쇄 CDR을 포함한다. 일부 항체에서, 인간화된 성숙 중쇄 가변 영역은 6C1의 3개의 중쇄 CDR(서열번호 10 내지 12)을 포함하고, 인간화된 성숙 경쇄 가변 영역은 6C1의 3개의 경쇄 CDR(서열번호 18 내지 20)을 포함한다.

[0010]

일부 항체에서, 인간화된 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 9에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 가지고, 인간화된 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 17에 대해 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 가진다. 일부 이러한 항체에서, 위치 H77은 T에 의해 점유된다. 일부 이러한 항체에서, 위치 H49는 A에 의해 점유된다. 일부 이러한 항체에서, 위치 H76 및 H82(a)는 S에 의해 점유된다. 일부 이러한 항체에서, 위치 H49는 A에 의해 점유된다. 일부 이러한 항체에서, 위치 H19, H44, H83 및 H89는 각각 K, R, K 및 M에 의해 점유된다. 일부 이러한 항체에서, 위치 H49는 A에 의해 점유된다. 일부 이러한 항체에서, 위치 L45는 K에 의해 점유된다. 일부 이러한 항체에서, 위치 L2는 V에 의해 점유된다.

[0011]

일부 항체는 서열번호 9에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 성숙 중쇄 가변 영역 및 서열번호 17에 대해 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 성숙 경쇄 가변 영역을 포함한다. 일부 항체는 서열번호 9에 대해 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 갖는 성숙 중쇄 가변 영역 및 서열번호 17에 대해 적어도 98% 동일한 아미노산 서열을 갖는 성숙 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0012]

일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 4의 아미노산 서열을 가진다. 일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 5의 아미노산 서열을 가진다. 일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 6의 아미노산 서열을 가진다. 일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 7의 아미노산 서열을 가진다. 일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 8의 아미노산 서열을 가진다. 일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 9의 아미노산 서열을 가진다.

[0013]

일부 이러한 항체에서, 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 16의 아미노산 서열을 가진다. 일부 이러한 항체에서, 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 17의 아미노산 서열을 가진다.

[0014]

일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지고, 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 16의 아미노산 서열을 가진다. 일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지고, 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 17의 아미노산 서열을 가진다.

[0015]

일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 5의 아미노산 서열을 가지고, 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 16의 아미노산 서열을 가진다. 일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 5의 아미노산 서열을 가지고, 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 17의 아미노산 서열을 가진다.

[0016]

일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지고, 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 16의 아미노산 서열을 가진다. 일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 6의 아미노산 서열을 가지고, 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 17의 아미노산 서열을 가진다.

[0017]

일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지고, 성숙 경쇄 가변 영역은

서열번호 16의 아미노산 서열을 가진다. 일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 7의 아미노산 서열을 가지고, 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 17의 아미노산 서열을 가진다.

[0018] 일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 8의 아미노산 서열을 가지고, 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 16의 아미노산 서열을 가진다. 일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 8의 아미노산 서열을 가지고, 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 17의 아미노산 서열을 가진다.

[0019] 일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 9의 아미노산 서열을 가지고, 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 16의 아미노산 서열을 가진다. 일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 9의 아미노산 서열을 가지고, 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 17의 아미노산 서열을 가진다.

[0020] 일부 항체에서, 항체는 무손상 항체이다. 일부 항체에서, 항체는 결합 단편이다. 일부 이러한 항체에서, 결합 단편은 단일쇄 항체, Fab 또는 Fab'2 단편이다.

[0021] 일부 항체에서, 성숙 경쇄 가변 영역은 경쇄 불변 영역에 융합되고, 성숙 중쇄 가변 영역은 중쇄 불변 영역에 융합된다. 일부 이러한 항체에서, 중쇄 불변 영역은 천연 인간 중쇄 불변 영역에 대해 Fc γ 수용체에 대해 감소된 결합을 갖는 천연 인간 중쇄 불변 영역의 돌연변이체 형태이다. 일부 이러한 항체에서, 중쇄 불변 영역은 IgG1 아이소타입을 가진다. 일부 이러한 항체에서, 성숙 중쇄 가변 영역은 서열번호 26의 서열을 갖는 중쇄 불변 영역에 융합되고/되거나 성숙 경쇄 가변 영역은 서열번호 28의 서열을 갖는 경쇄 불변 영역에 융합된다.

[0022] 일부 항체에서, 서열번호 1 및 13으로부터의 성숙 중쇄 가변 영역 및 성숙 경쇄 가변 영역의 CDR의 임의의 차이는 각각 위치 H60 내지 H65에 존재한다.

[0023] 다른 양상에서, 본 발명은 임의의 상기 언급한 항체 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0024] 다른 양상에서, 본 발명은 임의의 상기 언급한 항체의 중쇄 및/또는 경쇄를 암호화하는 핵산을 제공한다. 다른 양상에서, 본 발명은 이러한 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터를 제공한다. 다른 양상에서, 본 발명은 이러한 재조합 발현 벡터에 의해 형질변환된 숙주 세포를 제공한다.

[0025] 다른 양상에서, 본 발명은 항체를 인간화하는 방법을 제공하며, 상기 방법은

[0026] (a) 수용자 항체를 선택하는 단계;

[0027] (b) 보유될 마우스 항체의 아미노산 잔기를 동정하는 단계;

[0028] (c) 상기 마우스 항체 중쇄의 CDR을 포함하는 인간화된 중쇄를 암호화하는 핵산 및 상기 마우스 항체 경쇄의 CDR을 포함하는 인간화된 경쇄를 암호화하는 핵산을 합성하는 단계; 및

[0029] (d) 숙주 세포에서 상기 핵산을 발현시켜 인간화 항체를 생성하는 단계를 포함하되,

[0030] 상기 마우스 항체는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 13의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0031] 다른 양상에서, 본 발명은 인간화된, 키메라 또는 베니어 항체를 생성하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 하기 단계들을 포함한다:

[0032] (a) 세포가 항체를 분비하도록, 형질전환된 세포를 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 핵산과 함께 배양시키는 단계; 및

[0033] (b) 세포 배양물 배지로부터 상기 항체를 정제하는 단계;

[0034] 상기 항체는 6C1의 인간화된, 키메라 또는 베니어 형태이다.

[0035] 다른 양상에서, 본 발명은 인간화된, 키메라 또는 베니어 항체를 생성하는 세포주의 생성 방법을 포함하며, 상기 방법은,

[0036] (a) 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 벡터 및 선택 가능한 마커를 세포 내로 도입하는 단계;

[0037] (b) 상기 벡터의 복제 수가 증가된 세포를 선택하기 위한 조건 하에서 상기 세포를 증식시키는 단계;

[0038] (c) 상기 선택된 세포로부터 단일 세포를 단리시키는 단계; 및

- [0039] (d) 항체의 수율에 기반하여 선택된 단일 세포로부터 클로닝된 세포를 보관(banking)하는 단계를 포함하되,
- [0040] 상기 항체는 6C1의 인간화된, 키메라 또는 베니어 형태이다.
- [0041] 일부 이러한 방법은 선택적 조건 하에서 세포를 증식시키는 단계 및 적어도 $100\text{mg/l} / 10^6\text{개 세포}/24\text{시간}$ 으로 자연적으로 발현 및 분비하는 세포주를 선별하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0042] 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에게 유효 요법의 임의의 상기 언급된 항체를 투여함으로써, 대상체에서의 트랜스타이레틴의 응집을 저해 또는 감소시키는 단계를 포함하는, 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증이 발생하였거나 또는 발생할 위험에 있는 대상체에서의 트랜스타이레틴의 응집을 저해 또는 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0043] 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에게 유효 요법의 임의의 상기 언급된 항체를 투여함으로써, 대상체에서의 트랜스타이레틴 축적을 저해 또는 감소시키는 단계를 포함하는, 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증이 발생하였거나 또는 발생할 위험에 있는 대상체에서의 트랜스타이레틴 피브릴 형성을 저해 또는 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0044] 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에게 유효 요법의 임의의 상기 언급된 항체를 투여함으로써, 대상체에서의 트랜스타이레틴 침착을 감소시키는 단계를 포함하는, 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증이 발생하였거나 또는 발생할 위험에 있는 대상체에서의 트랜스타이레틴 침착을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0045] 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에게 유효한 요법의 임의의 상기 언급된 항체를 투여함으로써, 항체를 받지 않은 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증을 갖거나 또는 가질 위험에 있는 대상체에 대해 대상체로부터 응집된 트랜스타이레틴을 클리어런스하는, 즉, 제거하는(clearing) 단계를 포함하는, 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증이 발생하였거나 또는 발생할 위험에 있는 대상체에서 응집된 트랜스타이레틴을 클리어런스하는 방법을 제공한다.
- [0046] 다른 양상에서, 본 발명은 대상체에게 유효 요법의 임의의 상기 언급된 항체를 투여함으로써, 대상체에서의 트랜스타이레틴의 비독성 입체배좌를 안정화시키는 단계를 포함하는, 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증이 발생하였거나 또는 발생할 위험에 있는 대상체에서의 트랜스타이레틴의 비독성 입체배좌를 안정화시키는 방법을 제공한다.
- [0047] 다른 양상에서, 본 발명은 추가로 대상체에게 유효 요법의 임의의 상기 언급된 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서의 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증을 치료하거나 또는 예방을 달성하는 방법을 제공한다.
- [0048] 다른 양상에서, 본 발명은 추가로 대상체에게 유효 요법의 임의의 상기 언급된 항체를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서의 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증의 개시를 지연시키는 방법을 제공한다.
- [0049] 다른 양상에서, 본 발명은 대상체로부터의 생물학적 샘플을 유효량의 임의의 상기 언급된 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 대상체에서의 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증을 진단하는 방법을 제공한다. 일부 이러한 방법은 트랜스타이레틴에 대한 항체의 결합을 검출하는 단계를 추가로 포함하되, 결합된 항체의 존재는 대상체가 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증을 가진다는 것을 나타낸다. 일부 이러한 방법은 생물학적 샘플에 대한 항체의 결합을 대조군 샘플에 대한 항체의 결합과 비교하는 단계를 추가로 포함하며, 이에 의해 대조군 샘플에 비해 증가된 생물학적 샘플에 대한 항체의 결합은 대상체가 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증을 가진다는 것을 나타낸다.
- [0050] 일부 이러한 방법에서, 생물학적 샘플 및 대조군 샘플은 동일한 조직 유래의 세포를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 생물학적 샘플 및/또는 대조군 샘플은 혈액, 혈청, 혈장 또는 고형 조직이다. 일부 이러한 방법에서, 고형 조직은 심장, 말초신경계, 자율신경계, 신장, 눈 또는 위장관이다.
- [0051] 일부 이러한 방법에서, 상기 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증은 가족성 트랜스타이레틴 아밀로이드증 또는 산발적 트랜스타이레틴 아밀로이드증이다. 일부 이러한 방법에서, 가족성 트랜스타이레틴 아밀로이드증은 가족성 아밀로이드 심근증(FAC), 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP), 또는 중추 신경계 선택적 아밀로이드증(CNSA)이다. 일부 이러한 방법에서, 산발적 트랜스타이레틴 아밀로이드증은 노인성 전신 아밀로이드증(SSA) 또는 노인성 심장 아밀로이드증(SCA)이다.
- [0052] 일부 방법에서, 상기 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증은 상기 대상체의 심장, 말초신경계, 자율신경계, 신장, 눈 또는 위장관에서의 아밀로이드 축적과 관련된, 대상체에서의 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증을 진단한다.

[0053]

다른 양상에서, 본 발명은 추가로 아밀로이드 축적을 포함하는 것으로 의심되는 대상체로부터의 생물학적 샘플을 유효량의 임의의 상기 언급된 항체와 접촉시키는 단계를 포함하는, 대상체에서의 트랜스타이레틴 침착물의 존재 또는 부재를 검출하는 방법을 제공한다. 일부 이러한 방법은 트랜스타이레틴에 대한 항체의 결합을 검출하는 단계를 추가로 포함하되, 결합된 항체의 검출은 트랜스타이레틴 침착물의 존재를 나타낸다. 일부 이러한 방법은 생물학적 샘플에 대한 항체의 결합을 대조군 샘플에 대한 항체의 결합과 비교하는 단계를 추가로 포함하며, 이에 의해 대조군 샘플에 비해 증가된 생물학적 샘플에 대한 항체의 결합은 대상체가 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증을 가진다는 것을 나타낸다. 일부 이러한 방법에서, 생물학적 샘플 및 대조군 샘플은 동일한 조직 유래의 세포를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 생물학적 샘플 및/또는 대조군 샘플은 혈액, 혈청, 혈장 또는 고형 조직이다. 일부 이러한 방법에서, 고형 조직은 심장, 말초신경계, 자율신경계, 신장, 눈 또는 위장관이다.

[0054]

다른 양상에서, 본 발명은 대상체에서 임의의 상기 언급된 항체를 투여하는 단계 및 결합된 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 대상체에서의 트랜스타이레틴 침착 수준을 결정하는 방법을 제공한다. 일부 이러한 방법에서, 결합된 항체의 존재는 양전자 방출 단층 촬영(PET)에 의해 결정된다.

도면의 간단한 설명

[0055]

도 1은 마우스 6C1 항체, 마우스 모델 항체, 인간 수용자(acceptor) 항체 및 6C1 항체의 인간화된 형태의 중쇄 가변 영역의 정렬을 도시한 도면. 첫 번째 둘러싸인 박스가 코티아 CDR-H1 및 카바트 CDR-H1의 복합물이라는 것을 제외하고(카바트 CDR-H1은 밑줄 및 볼드체 표시됨), 카바트에 의해 정해지는 CDR은 박스로 둘러싸여 있다.

도 2는 마우스 6C1 항체, 마우스 모델 항체, 인간 수용자 항체 및 6C1 항체의 인간화된 형태의 경쇄 가변 영역의 정렬을 도시한 도면. 카바트에 의해 정해지는 CDR은 박스로 둘러싸여 있다.

도 3A 및 도 3B: 도 3A는 pH4-처리된 TTR에 대한 뮤린 5A1, 6C1, 9D5 및 14G8 항체의 결합 곡선을 도시한 도면. 도 3B는 pH4-처리된 또는 천연 TTR에 대한 뮤린 5A1, 6C1, 9D5 및 14G8 항체의 결합 곡선을 도시한 도면.

도 4A, 도 4B 및 도 4C: 도 4A는 미스-TTR 항체에 의한 TTR-Y78F 섬유질 형성의 저해를 도시한 도면. 도 4B는 14G8에 의한 TTR-V122I 섬유질 형성의 저해를 도시한 도면. 도 4C는 대조군 항체에 의한 TTR-V122I 섬유질 형성의 저해를 도시한 도면.

도 5A 및 도 5B: 도 5A는 9D5 미스-TTR 항체를 이용하는, V30M ATTR에 대해 확인된 환자로부터의 혈장 샘플(샘플 #21, #22, #23, #24, #25 및 #27) 및 정상 대상체로부터의 샘플(샘플 #11, #12, #15, #18, #19, ##20)의 웨스턴 블롯 분석의 농도 계측 분석을 도시한 도면. 도 5B는 5A1 미스-TTR 항체를 이용하는, 동일한 샘플의 웨스턴 블롯 분석의 농도 계측 분석을 도시한 도면.

도 6은 6C1 항체를 이용하는 V30M ATTR에 대해 확인된 환자로부터의 혈장 샘플(샘플 #21, #22, #23, #24, #25, #27) 및 정상 대상체로부터의 샘플(샘플 #11, #12, #15, #18, #19, ##20)의 메조스케일 디스커버리(MSD) 플레이트 분석을 도시한 도면.

도 7A 및 도 7B: 도 7A는 THP-1 세포에 의한 F87M/L110M TTR의 흡수에 대한 항체 14G8의 효과를 도시한 도면. 도 7B는 THP-1 세포에 의한 V30M TTR의 흡수에 대한 각각의 미스-TTR 항체의 효과를 도시한 도면.

서열의 간단한 설명

서열번호 1은 마우스 6C1 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 2는 마우스 중쇄 가변 영역 구조 주형의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 3은 중쇄 가변 수용자 수탁번호 ADX65650의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 4는 인간화된 6C1 항체 형태 1(Hu6C1VHv1)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 5는 인간화된 6C1 항체 형태 1b(Hu6C1VHv1b)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 6은 인간화된 6C1 항체 형태 2(Hu6C1VHv2)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 7은 인간화된 6C1 항체 형태 2b(Hu6C1VHv2b)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 8은 인간화된 6C1 항체 형태 3(Hu6C1VHv3)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 9는 인간화된 6C1 항체 형태 3b(Hu6C1VHv3b)의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 10은 마우스 6C1 항체의 카바트 CDR-H1의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 11은 마우스 6C1 항체의 카바트 CDR-H2의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 12은 마우스 6C1 항체의 카바트 CDR-H3의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 13은 마우스 6C1 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 14는 마우스 중쇄 가변 영역 구조 주형의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 15는 경쇄 가변 수용자 수탁번호 ABI74084의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 16은 인간화된 6C1 항체 형태 1(Hu6C1VLv1)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 17은 인간화된 6C1 항체 형태 2(Hu6C1VLv2)의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 18은 마우스 6C1 항체의 카바트 CDR-L1의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 19는 마우스 6C1 항체의 카바트 CDR-L2의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 20은 마우스 6C1 항체의 카바트 CDR-L3의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 21은 신호 펩타이드를 지니는 마우스 6C1 항체의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 22는 신호 펩타이드를 지니는 마우스 6C1 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 23은 신호 펩타이드를 지니는 마우스 6C1 항체의 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 24는 신호 펩타이드를 지니는 마우스 6C1 항체의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 25는 예시적인 IgG1 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 26은 예시적인 IgG1 G1m3 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 27은 예시적인 IgG1 G1m3 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 28은 N-말단의 알기닌을 지니는 예시적인 경쇄 불변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 29는 N-말단의 알기닌이 없는 예시적인 경쇄 불변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 30은 인간화된 6C1 항체 형태 1의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 31은 인간화된 6C1 항체 형태 1b의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 32는 인간화된 6C1 항체 형태 2의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 33은 인간화된 6C1 항체 형태 2b의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 34는 인간화된 6C1 항체 형태 3의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 35는 인간화된 6C1 항체 형태 3b의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 36은 인간화된 6C1 항체 형태 1의 경쇄 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 37은 인간화된 6C1 항체 형태 2의 경쇄 영역의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 38은 수탁번호 P02766.1(유니프롯(UniProt))에 제시된 인간 트랜스타이레틴의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 39는 수탁번호 AAB35639.1(젠햄크(GenBank))에 제시된 인간 트랜스타이레틴의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 40은 수탁번호 AAB35640.1(젠햄크)에 제시된 인간 트랜스타이레틴의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 41은 수탁번호 ABI63351.1(젠햄크)에 제시된 인간 트랜스타이레틴의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 42는 인간 트랜스타이레틴의 잔기 89 내지 97 잔기의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 43은 잠재적 트랜스타이레틴 면역원의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 44는 잠재적 트랜스타이레틴 면역원의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 45는 잠재적 트랜스타이레틴 면역원의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 46은 예시적인 IgG1 G1m3 중쇄 불변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 47은 N-말단의 아르기닌을 갖는 예시적인 경쇄 불변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 48은 N-말단의 아르기닌이 없는 예시적인 경쇄 불변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 49는 중쇄 불변 영역 신호 펩타이드의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 50은 중쇄 불변 영역 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 51은 경쇄 불변 영역 신호 펩타이드의 아미노산 서열을 제시한다.

서열번호 52는 경쇄 불변 영역 신호 펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 53은 마우스 6C1 가변 경쇄 영역을 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 54는 마우스 6C1 가변 중쇄 영역을 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 55는 인간화된 6C1 항체 형태 1(Hu6C1VHv1)의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 56은 인간화된 6C1 항체 형태 1b(Hu6C1VHv1b)의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 57은 인간화된 6C1 항체 형태 2(Hu6C1VHv2)의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 58은 인간화된 6C1 항체 형태 2b(Hu6C1VHv2b)의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 59은 인간화된 6C1 항체 형태 3(Hu6C1VHv3)의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 60은 인간화된 6C1 항체 형태 3b(Hu6C1VHv3b)의 중쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 61은 인간화된 6C1 항체 형태 1(Hu6C1VLv1)의 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 62는 인간화된 6C1 항체 형태 2(Hu6C1VLv2)의 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 제시한다.

서열번호 63은 마우스 6C1 항체의 복합 CDR-H1(잔기 26 내지 35)의 아미노산 서열을 제시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056]

정의

단클론성 항체 또는 다른 생물학적 독립체는 전형적으로 단리된 형태로 제공된다. 이는 항체 또는 다른 생물학적 독립체가 전형적으로 이의 생성 또는 정제에서 발생하는 간접 단백질 및 다른 오염물질의 적어도 50% w/w 순도라는 것을 의미하지만, 단클론성 항체가 과량의 약제학적으로 허용 가능한 담체(들) 또는 그의 사용을 용이하게 하기 위한 것으로 의도되는 다른 비히클과 조합되는 가능성을 제외하지는 않는다. 때때로 단클론성 항체는 생성 또는 정제로부터의 간접 단백질 및 오염물질의 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% w/w 순도이다. 종종 단리된 단클론성 항체 또는 다른 생물학적 독립체는 그의 정제 후에 남아있는 우세한 거대분자 종이다.

[0058]

항체의 그의 표적 항원에 대한 특이적 결합은 적어도 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 또는 $10^{10} M^{-1}$ 의 친화도를 의미한다. 특이적 결합은 검출 가능하게 큰 규모이며, 적어도 하나의 관련없는 표적에 대해 생기는 비특이적 결합과 구별 가능하다. 특이적 결합은 특정 작용기 또는 특정 공간적 맞춤(예를 들어, 자물쇠와 열쇠 유형) 사이의 결합의 형성을 초래할 수 있는 반면, 비특이적 결합은 보통 반데르 발스힘의 결과이다. 특이적 결합은 반드시 항체가 한 사람 및 하나의 표적에만 결합한다는 것을 의미하는 것은 아니다.

[0059]

기본적 항체 구조 단위는 서브유닛의 사량체이다. 각각의 사량체는 폴리펩타이드 쇄의 2개의 동일한 쌍을 포함하고, 각각의 쌍은 하나의 "경쇄"(약 25kDa) 및 하나의 "중쇄"(약 50 내지 70kDa)를 가진다. 각각의 쇄의 아미노 말단 부분은 주로 항원 인식을 초래하는 약 100 내지 110개 또는 그 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 절단 가능한 신호 펩타이드에 연결된 이 가변 영역은 초기에 발현된다. 신호 펩타이드가 없는 가변 영역은 때때로 성숙 가변 영역으로서 지칭된다. 따라서, 예를 들어, 경쇄 성숙 가변 영역은 경쇄 신호 펩타이드가 없는

경쇄 가변 영역을 의미한다. 각각의 쇄의 카복시-말단 부분은 주로 효과기 기능을 초래하는 불변 영역을 정한다.

[0060] 경쇄는 카파 또는 람다로서 분류된다. 중쇄는 감마, 뮤, 알파, 텔타 또는 엡실론으로서 분류되고, 각각 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE로서 항체의 아이소타입을 정한다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 및 불변 영역은 약 12가지 이상의 아미노산의 "J" 영역에 의해 결합되며, 중쇄는 또한 약 10개 이상의 아미노산의 "D" 영역을 포함한다. 일반적으로, 문헌[Fundamental Immunology, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7] 참조(본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함됨).

[0061] 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 가변 영역(또한 각각 본 명세서에서 "경쇄 가변 도메인"("VL 도메인") 또는 "중쇄 가변 도메인"("VH 도메인")으로서 지칭됨)은 3개의 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"에 의해 방해되는 "프레임워크" 영역으로 이루어진다. 프레임워크 영역은 항원의 에피토프에 대한 특이적 결합을 위해 CDR을 정렬시키는 역할을 한다. CDR은 주로 항원 결합을 초래하는 항체의 아미노산 잔기를 포함한다. 아미노-말단으로부터 카복실-말단까지, VL과 VH 도메인은 둘 다 다음의 프레임워크(FR) 및 CDR 영역을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4. VL 도메인의 CDR 1, 2 및 3은 본 명세서에서 각각 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3으로서 지칭되며; VH 도메인의 CDR 1, 2 및 3은 또한 본 명세서에서 각각 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3으로서 지칭된다.

[0062] 각각의 VL 및 VH 도메인에 대한 아미노산의 정렬은 CDR의 임의의 통상적인 정의에 따른다. 통상적인 정의는 카바트 정의(Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 and 1991), 코티아 정의(Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987; Chothia et al., *Nature* 342:878-883, 1989); CDR-H1이 코티아 및 카바트 CDR의 복합인 코티아 카바트 CDR의 복합; 옥스포드 몰레큘러 항체 모델링 소프트웨어(Oxford Molecular's antibody modelling software)에 의해 사용되는 AbM 정의; 및 마틴(Martin) 등의 접촉 정의(bioinfo.org.uk/abs)(표 1 참조)를 포함한다. 카바트는 상이한 중쇄 사이의 또는 상이한 경쇄 사이의 대응하는 잔기가 동일한 수로 정렬되는 널리 사용되는 넘버링 관례(카바트 넘버링)를 제공한다. 항체가 CDR의 특정 정의(예를 들어, 카바트)에 의해 CDR을 포함하는 것으로 언급될 때, 정의는 항체에 존재하는 CDR 잔기(즉, 카바트 CDR)의 최소 수를 구체화한다. 이는 다른 통상적인 CDR 정의에 속하지만, 구체화된 정의 밖에서 또한 존재하는 다른 잔기를 제외하지 않는다. 예를 들어, 카바트에 의해 정의되는 CDR을 포함하는 항체는 특히, CDR이 카바트 CDR 잔기를 함유하고, 다른 CDR 잔기를 함유하지 않는 항체, 및 CDR H1이 복합 코티아-카바트 CDR H1이고, 다른 CDR은 카바트 CDR 잔기를 함유하며, 다른 정의에 기반한 추가적인 CDR 잔기는 없는 항체를 포함한다.

표 1

카바트 넘버링을 이용하는 CDR의 통상적인 정의를 이용하는 CDR의 통상적인 정의					
루프	카바트	코티아	코티아와 카바트의 복합	AbM	접촉
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

*코티아에 의한 CDR-H1은 (루프 길이에 따라서) H32, H33 또는 H34에서 말단일 수 있다. 이는 카바트 넘버링 계획이 35A 및 35B에서 추가 잔기의 삽입을 위치시키기 때문이지만, 코티아 넘버링은 그들을 31A 및 31B에 위치시킨다. H35A도 또는 H35B(카바트 넘버링)도 존재하지 않는다면, 코티아 CDR-H1 루프는 H32에서 끝난다. H35A만이 존재한다면, 이는 H33에서 끝난다. H35A와 H35B가 둘 다 존재한다면, 이는 H34에서 끝난다.

[0064] 용어 "항체"는 무손상 항체 및 이의 결합 단편을 포함한다. 전형적으로, 단편은 별개의 중쇄, 경쇄 Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)c, Dab, 나노바디 및 Fv를 포함하는 표적에 대한 특이적 결합에 유래된 무손상 항체와 경쟁한다.

단편은 재조합 DNA 기법에 의해, 또는 무손상 면역글로불린의 효소적 또는 화학적 분리에 의해 생성될 수 있다. 용어 "항체"는 또한 이중특이성 항체 및/또는 인간화 항체를 포함한다. 이중특이성 또는 이작용성 항체는 2개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍 및 2개의 상이한 결합 부위를 갖는 인공 혼성체 항체이다(예를 들어, 문헌[Songsivilai and Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148:1547-53

(1992)] 참조). 일부 이중특이성 항체에서, 2개의 상이한 중쇄/경쇄쌍은 6C1에 의해 결합된 것보다 트랜스타이레틴 상의 상이한 에피토프에 대해 특이적인 인간화된 6C1 중쇄/경쇄 쌍 및 중쇄/경쇄 쌍을 포함한다.

[0065] 일부 이중특이성 항체에서, 하나의 중쇄/경쇄 쌍은 이하에 추가로 개시되는 바와 같은 인간화된 6C1 항체이고, 다른 중쇄/경쇄 쌍은 혈액뇌 장벽, 예컨대 인슐린 수용체, 인슐린-유사 성장 인자(IGF) 수용체, 렙틴 수용체, 또는 리포단백질 수용체, 또는 트랜스페린 수용체 상에서 발현된 수용체에 결합하는 항체로부터 유래된다 (Friden *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4771-4775, 1991; Friden *et al.*, *Science* 259:373-377, 1993). 이러한 이중특이성 항체는 수용체-매개 통과세포외 배출에 의해 혈액뇌 장벽을 가로질러 전달될 수 있다. 이중특이성 항체의 뇌 흡수는 혈액뇌 장벽 수용체에 대한 그의 친화도를 감소시키기 위해 이중특이성 항체를 조작함으로써 추가로 향상될 수 있다. 수용체에 대해 감소된 친화도는 뇌에서 더 넓은 분포를 야기하였다 (예를 들어, 문헌[Atwal *et al.*, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra43, 2011; Yu *et al.*, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra44, 2011] 참조).

[0066] 예시적인 이중특이성 항체는 또한 다음과 같을 수 있다: (1) 이중-가변-도메인 항체(DVD-Ig), 여기서 각각의 경쇄 및 중쇄는 짧은 웨타이드 결합을 통해 동시에 2개의 가변 도메인을 함유한다(Wu *et al.*, Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule, In: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) Tandab, 이는 각각의 표적 항원에 대해 2개의 결합 부위를 갖는 4가 이중특이성 항체를 초래하는 2개의 단일쇄 다이어바디(diabody)의 융합임; (3) 플렉시바디(flexibody), 이는 다가 분자를 초래하는 다이어바디와 scFv의 조합임; (4) 단백질 키나제 A에서의 "이량체화 및 도킹 도메인"에 기반한 소위 "도킹과 잠금", 이는 Fab에 적용될 때, 상이한 Fab 단편에 연결된 2개의 동일한 Fab 단편으로 이루어진 3가 이중특이성 결합 단백질을 수득할 수 있음; 또는 (5) 소위 스콜피온(Scorpion) 분자, 예를 들어, 인간 Fc-영역의 말단 둘 다에 융합된 2개의 scFv를 포함함. 이중특이성 항체를 제조하는 데 유용한 플랫폼의 예는 BiTE(마이크로메트(Micromet)), DART(마크로제닉스(MacroGenics)), Fcab 및 Mab2(F-스타(F-star)), Fc-조작된 IgG1(젠크오(Xencor)) 또는 듀오바디(DuoBody)(Fab 아암 교환에 기반함, 젠맙(Genmab))을 포함한다.

[0067] 용어 "에피토프"는 항체가 결합하는 항원 상의 부위를 지칭한다. 에피토프는 하나 이상의 단백질의 3차 폴딩에 의해 접합된 인접 아미노산 또는 비인접 아미노산으로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산으로부터 형성된 에피토프(또한 선형 에피토프로서 알려짐)는 전형적으로 변성 용매에 대한 노출 시 남아있는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프(또한 입체배좌 에피토프로서 알려짐)는 전형적으로 변성 용매에 의한 처리 시 상실된다. 에피토프는 전형적으로 독특한 공간적 입체배좌에서 적어도 3, 더 보통으로는, 적어도 5 또는 8 내지 10개의 아미노산을 포함한다. 에피토프의 공간적 입체배좌를 결정하는 방법은, 예를 들어, x-선 결정학 및 2-차원 핵 자기 공명을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Epitope Mapping Protocols, in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)] 참조. 에피토프는, 예를 들어, 서열번호 38로부터의 2 내지 5, 3 내지 5, 3 내지 9 또는 5 내지 9개의 인접 아미노산의 에피토프와 같이 선형일 수 있다. 에피토프는 또한, 예를 들어, 서열 번호 38의 잔기 89 내지 97 내에서 아미노산의 2개 이상의 비인접 세그먼트를 포함하는 입체배좌 에피토프일 수 있다. 항체가 트랜스타이레틴(TTR)의 아미노산 89 내지 97 내에서 에피토프에 결합하는 것으로 언급된다면, 예를 들어, 에피토프는 범위의 외부 제한을 정하는 것을 포함하여 인용된 범위의 아미노산 내에 있다는 것을 의미한다. 범위 내의 모든 아미노산이 에피토프의 부분을 구성한다는 것을 반드시 의미하지는 않는다. 따라서, 예를 들어, TTR의 아미노산 89 내지 97 내의 에피토프는 서열번호 42의 선형 세그먼트의 다른 선형 세그먼트 중에서, 또는 입체배좌 에피토프, 서열번호 42의 아미노산의 비인접 세그먼트의 경우에 아미노산 89 내지 97, 89 내지 96, 90 내지 96, 91 내지 96, 92 내지 96, 93 내지 96, 94 내지 96, 89 내지 96, 89 내지 95, 89 내지 94, 89 내지 93, 89 내지 92 또는 89 내지 93으로 이루어질 수 있다.

[0068] 동일한 또는 중복되는 에피토프를 인식하는 항체는 표적 항원에 대한 다른 항원의 결합과 경쟁하는 하나의 항체의 능력을 나타내는 단순한 면역분석에서 동정될 수 있다. 항체의 에피토프는 또한 접촉 잔기를 동정하기 위해 항원에 결합된 항체의 X-선 결정학에 의해 정해질 수 있다. 대안적으로, 하나의 항체의 결합을 감소 또는 제거하는 항원에서의 모든 아미노산 돌연변이가 다른 것의 결합을 감소 또는 제거한다면, 2개의 항체는 동일한 에피토프를 가진다. 하나의 항체의 결합을 감소 또는 제거하는 일부 아미노산 돌연변이가 다른 것의 결합을 감소 또는 제거한다면, 2개의 항체는 중복 에피토프를 가진다.

[0069] 항체 사이의 경쟁은 시험 하의 항체가 통상적인 항원에 대한 기준 항체의 특이적 결합을 저해하는 분석에 의해 결정된다(예를 들어, 문헌[Jungmann *et al.*, *Cancer Res.* 50:1495, 1990] 참조). 경쟁적 결합 분석에서 측정하여, 과량의 시험 항체(즉, 적어도 2x, 5x, 10x, 20x 또는 100x)가 적어도 50%만큼 기준 항체의 결합을 저해한다

면 시험 항체는 기준 항체와 경쟁한다. 일부 시험 항체는 적어도 75%, 90% 또는 99%만큼 기준 항체의 결합을 저해한다. 경쟁 분석에 의해 동정된 항체(경쟁 항체)는 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체 및 입체 장애가 일어나도록 기준 항체에 의해 결합되는 에피토프에 충분히 근위인 인접한 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다.

[0070] 구조 트랜스타이레틴(TTR)에 대해 용어 "천연"은 적절하게 기능성인 상태로 TTR의 정상 폴딩된 구조(즉, TTR 사량체)를 지칭한다. TTR은 그의 천연으로 폴딩된 형태로 사량체이기 때문에, TTR의 비천연 형태는, 예를 들어, 미스폴딩된 TTR 사량체, TTR 단량체, TTR의 응집 형태 및 TTR의 피브릴 형태를 포함한다. TTR의 비천연 형태는 야생형 TTR 아미노산 서열 또는 돌연변이를 포함하는 문자를 포함할 수 있다.

[0071] TTR에 대해 용어 "미스폴딩된"은 TTR 폴리펩타이드 단량체 또는 다량체의 2차 및 3차 구조를 지칭하고, 폴리펩타이드는 그의 적절하게 기능성인 상태로 해당 단백질에 대해 정상이 아닌 입체배좌를 채택한다는 것을 나타낸다. TTR 미스폴딩은 단백질의 돌연변이(예를 들어, 결실, 치환 또는 첨가)에 의해 야기될 수 있지만, 야생형 TTR 단백질은 또한 질환에서 미스폴딩되어 특정 에피토프를 노출시킬 수 있다.

[0072] 용어 "약제학적으로 허용 가능한"은 담체, 화석제, 부형제 또는 보조제가 제형의 다른 성분과 양립 가능하고, 이의 수용인에 대해 실질적으로 유해하지 않다는 것을 의미한다.

[0073] 용어 "환자"는 예방적 또는 치료적 치료 중 하나를 받는 인간 및 다른 포유류 대상체를 포함한다.

[0074] 위험 인자가 없는 개체보다 질환이 발생할 통계학적으로 유의한 더 큰 위험에 위험 인자를 갖는 개체를 위치시키는 적어도 하나의 공지된 위험 인자(예를 들어, 유전자, 생화학, 가족력 및 상황적 노출)를 갖는다면, 개체는 질환의 증가된 위험에 있다.

[0075] 용어 "생물학적 샘플"은 생물학적 공급원, 예를 들어 인간 또는 포유류 대상체 내의 또는 이들로부터 얻을 수 있는 생물학적 물질의 샘플을 지칭한다. 이러한 샘플은 기관, 세포 소기관, 조직, 조직의 부문, 체액, 말초 혈액, 혈장, 혈액 혈청, 세포, 분자, 예컨대 단백질 및 웹타이드, 및 이들로부터 유래된 임의의 부분 또는 조합물일 수 있다. 용어 생물학적 샘플은 또한 샘플을 가공하는 것에 의해 유도된 임의의 물질을 포함할 수 있다. 유도된 물질은 세포 또는 그들의 자손을 포함할 수 있다. 생물학적 샘플의 가공은 여과, 증류, 추출, 농도, 고정, 간접 성분의 비활성화 등 중 하나 이상을 수반할 수 있다.

[0076] 용어 "대조군 샘플"은 트랜스타이레틴(TTR), 예컨대 TTR 아밀로이드 침착물 중의 트랜스타이레틴(TTR)의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태를 포함하는 것으로 알려져 있지 않은 또는 의심되지 않는 생물학적 샘플을 지칭한다. 대조군 샘플은 TTR 아밀로이드중 또는 TTR 아밀로이드중의 구체적으로 선택된 유형으로 고통받지 않는 개체로부터 얻을 수 있다. 대안적으로, 대조군 샘플은 TTR 아밀로이드중 또는 TTR 아밀로이드중의 구체적으로 선택된 유형으로 고통받는 환자로부터 얻을 수 있다. 이러한 샘플은 TTR 아밀로이드중을 포함하는 것으로 생각되는 생물학적 샘플과 동시에 또는 상이한 경우에 얻을 수 있다. 생물학적 샘플과 대조군 샘플은 둘 다 동일한 조직(예를 들어, TTR 아밀로이드 침착물과 주위의 정상 조직을 둘 다 함유하는 조직 부문)으로부터 얻을 수 있다. 바람직하게는, 대조군 샘플은 본질적으로 또는 전체적으로 TTR 아밀로이드 침착물이 없는 조직으로 이루어지고, TTR 아밀로이드 침착물을 포함하는 것으로 생각되는 생물학적 샘플에 비교하여 사용될 수 있다. 바람직하게는, 대조군 샘플 내 조직은 생물학적 샘플 중의 조직(예를 들어, 심장 내 심장 근육 세포)과 동일한 유형이다.

[0077] 용어 "질환"은 생리적 기능을 손상시키는 임의의 비정상적 병태를 지칭한다. 상기 용어는 병인의 특성과 관계없이 생리적 기능이 손상된 임의의 장애, 질병, 이상, 병리, 병, 병태 또는 증후군을 포함하도록 광범위하게 사용된다.

[0078] 용어 "증후군"은 대상체에 의해 인식되는 바와 같이 질환의 주관적 증거, 예컨대 변경된 보행을 지칭한다. "정후"는 의사에 의해 관찰되는 바와 같은 질환의 객관적 증거를 지칭한다.

[0079] 아미노산 치환을 보존적 또는 비보존적으로 분류하는 목적을 위해, 아미노산은 다음과 같이 그룹화된다: 그룹 I(소수성 측쇄): met, ala, val, leu, ile; 그룹 II(중성 친수성 측쇄): cys, ser, thr; 그룹 III(산성 측쇄): asp, glu; 그룹 IV(염기성 측쇄): asn, gln, his, lys, arg; 그룹 V(쇄 배향에 영향을 미치는 잔기): gly, pro; 및 그룹 VI(방향족 측쇄): trp, tyr, phe. 보존적 치환은 동일한 부류에서의 아미노산 간의 치환을 수반한다. 비보존적 치환은 이들 부류 중 하나의 구성원을 다른 것의 구성원으로 교환하는 것으로 구성된다.

[0080] 서열 동일성 백분율은 카바트 넘버링 관례에 의해 최대로 정렬되는 항체 서열에 의해 결정된다. 정렬 후에, 대

상 항체 영역(예를 들어, 중쇄 또는 경쇄의 전체 성숙 가변 영역)이 기준 항체의 동일한 영역과 비교된다면, 대상과 기준 항체 영역 사이의 서열 동일성 백분율은 대상과 기준 항체 영역 둘 다에서의 동일한 아미노산에 의해 점유되는 위치의 수를 두 영역의 정렬된 위치의 총 수로 나누고(캡은 계수화하지 않음), 100을 곱하여서 백분율로 전환한다.

[0081] 하나 이상의 인용된 요소를 "포함하는(comprising)" 또는 "포함하는(including) 조성물 또는 방법은 구체적으로 인용되지 않은 다른 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체를 "포함하는(comprise)" 또는 "포함하는(include)" 조성물은 단독으로 또는 다른 성분과 조합하여 항체를 함유할 수 있단.

[0082] 값의 범위의 표기는 범위 내의 또는 범위를 정하는 모든 정수, 및 범위 내의 정수에 의해 정해지는 모든 하위범위를 포함한다.

[0083] 문맥으로부터 달리 명확하지 않다면, 용어 "약"은 언급된 값의 측정 오차(예를 들어, SEM)의 표준 차이 내의 값을 포함한다.

[0084] 통계학적 유의도는 $p \leq 0.05$ 를 의미한다.

[0085] 항목의 단수 형태는 달리 분명하게 표시되지 않는 한 복수의 대상을 포함한다. 예를 들어, 용어 "화합물" 또는 "적어도 1종의 화합물"은 이들의 혼합물을 포함하는 복수의 화합물을 포함할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 일반

[0088] 본 발명은 트랜스타이레틴(TTR)의 잔기 89 내지 97에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 항체는 TTR의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태에 결합하는 능력을 가진다. 항체는 TTR 축적 또는 TTR 침착물의 축적과 관련된 질환 또는 장애(예를 들어, TTR 아밀로이드증)를 치료하거나 또는 예방을 달성하기 위해 사용될 수 있다. 항체는 또한 용도 중에서도 TTR 아밀로이드증을 진단하고, TTR의 응집을 저해 또는 감소시키기 위해 사용될 수 있다.

II. 표적 분자

[0090] 트랜스타이레틴(TTR)은 주로 간에 의해 합성되는 127-아미노산, 55kDa 혈청 및 뇌척수액 수송 단백질이다. 이는 또한 프레알부민, 티록신 결합 프레알부민, ATTR 및 TBPA로서 지칭되었다. 그의 천연 상태에서, TTR은 사량체로서 존재한다. 동형접합체에서, 사량체는 동일한 127-아미노산 베타-시트-풍부 서브유닛을 포함한다. 이형접합체에서, TTR 사량체는 전형적으로 통계학적 방식과 조합된 변이체 및/또는 야생형 서브유닛으로 이루어진다.

[0091] 혈액 중의 TTR의 확립된 작용은 홀로-레티놀 결합 단백질을 수송하는 것이다. TTR은 설치류 혈액 중의 티록신(T_4)의 주요 운반체이지만, 홀로(holo)-레티놀 결합 단백질에 대해 사용되는 것과 직각인 결합 부위를 이용하여, T_4 결합 부위는 인간에서 효과적으로 점유되지 않는다.

[0092] TTR은 적어도 30종의 상이한 인간 단백질 중 하나인데, 응집 구조의 범위 내로의 세포외 미스폴딩 및/또는 미스어셈블리(아밀로이드 생성)는 아밀로이드 질환으로서 지칭되는 퇴행성 질환을 야기하는 것으로 생각된다. TTR은 아밀로이드가 생성되도록 입체배좌 변화를 겪는다. 부분적 비폴딩은 궁극적으로 교차-베타 시트 아밀로이드 구조로의 입체배좌 전환을 겪는 대체로 비구조화된 구체 응집물로 효율적으로 미스어셈블리된 연장된 입체배좌에서 대부분 비변화된 소수성 잔기의 신장을 노출시킨다.

[0093] 문맥에서 달리 명확하지 않다면, 트랜스타이레틴(TTR) 또는 그의 단편 또는 도메인에 대한 언급은 동형단백질, 돌연변이체 및 대립형질 변이체를 포함하는 천연 인간 아미노산 서열을 포함한다. 예시적인 TTR 폴리펩타이드 서열은 등록 번호 P02766.1(유니프롯)(서열번호 38), AAB35639.1(젠햄크)(서열번호 39), AAB35640.1(젠햄크)(서열번호 40) 및 ABI63351.1(젠햄크)(서열번호 41)로 표기된다. 잔기는 스위스 프로트(Swiss Prot) P02766.1에 따라 넘버링되며, 성숙 단백질의 제1 아미노산(즉, 20개의 아미노산 신호 서열을 포함하지 않음)은 잔기 1로 표기된다. 임의의 다른 TTR 단백질에서, 잔기는 최대 정렬에 대해 P02766.1에서 대응하는 잔기에 따라 넘버링된다.

III. 트랜스타이레틴 아밀로이드증

[0095] 트랜스타이레틴(TTR) 아밀로이드증은 병원성, 미스폴딩된 TTR 및 TTR로 구성된 아밀로이드 피브릴의 세포외 침착을 특징으로 하는 전신 장애이다. TTR 아밀로이드증은 일반적으로 (환경적 또는 유전적 병태에 기인하여) 천

연 TTR 사량체의 탈안정화에 이해 야기되어, 다양한 기관 및 조직에서 축적되는 아밀로이드 퍼브릴로의 TTR의 해리, 미스풀딩 및 응집을 유발하여, 진행성 기능장애를 야기한다. 예를 들어, 문헌[Almeida and Saraiva, *FEBS Letters* 586:2891-2896 (2012); Ando et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013)] 참조.

[0096] 인간에서, 돌연변이체 및 야생형 서브유닛을 포함하는 야생형 TTR 사량체와 혼합된 사량체는 둘 다 해리, 미스풀딩 및 응집되어서, 아밀로이드 생성 과정은 유사분열 후 조직의 퇴행을 야기할 수 있다. 따라서, TTR 아밀로이드증은 TTR에서의 돌연변이로부터 초래되거나 또는 비돌연변이, 미스풀딩된 TTR로부터 초래되는 병원성 미스풀딩 TTR에 의해 야기되는 질환을 포함한다.

[0097] 예를 들어, 노인성 전신 아밀로이드증(SSA) 및 노인성 심장 아밀로이드증(SCA)은 심장의 심장 근육 세포 외에서 그리고 내에서 야생형 TTR 아밀로이드의 분해로부터 초래되는 노화관련 아밀로이드증이다. TTR 아밀로이드증은 또한 TTR 단백질을 탈안정화시키는 돌연변이에 이해 야기되는 유전적(가족성) 아밀로이드증의 가장 통상적인 형태이다. TTR 유전자에서 점 돌연변이와 관련된 TTR 아밀로이드증은 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP), 가족성 아밀로이드 심근증(FAC), 및 희귀 중추 신경계 선택적 아밀로이드증(CNSA)을 포함한다. 유전적(가족성) TTR 아밀로이드증을 지니는 환자는 거의 항상 이형접합체인데, 이는 TTR 사량체가 일반적으로 통계학적으로 분포되는 돌연변이체 및/또는 야생형 TTR 서브유닛으로 구성된다는 것을 의미한다. TTR 아밀로이드증의 유전적(가족성) 형태는 일반적으로 상염색체 우세이며, 전형적으로 산발적 질환(SSA 및 SCA)보다 더 조기에 개시된다.

[0098] 상염색체 우세 장애 FAP 및 FAC에 연루된 TTR을 암호화하는 유전자에서 100개 초과의 돌연변이가 있다. 예를 들어, 미국 특허 제2014/0056904호; 문헌[Saraiva, *Hum. Mutat.* 17(6):493-503 (2001); Damas and Saraiva, *J. Struct. Biol.* 130:290-299; Dwulet and Benson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:657-662 (1983)] 참조. 이를 아밀로이드-유발 돌연변이는 TTR의 전체 분자 전체적으로 분포된다. 일반적으로, 돌연변이체 서브유닛을 더욱 탈안정화시키는 것은 TTR 사량체 구조에 대해서이며, 아밀로이드 질환의 더 빠르게 개시한다. TTR 변이체의 병원성 가능성은 일반적으로 그의 불안정성과 그의 세포 분비 효율의 조합에 의해 결정된다. 일부 TTR 변이체에 의해 야기되는 초기 병리는 심장 조직의 그들의 선택적 파괴로부터 초래되는 반면, 다른 TTR 변이체로부터의 병리는 말초 및 자율신경계의 손상으로부터 유래된다. 세포외 아밀로이드의 축적은 TTR 아밀로이드증의 후기 단계에서 기관 구조에 기여하고, 거의 분명히 손상시킬 수 있지만, TTR 아밀로이드 생성에 의해 야기되는 조직 손상은 대부분 작은 확산성 TTR 응집물의 독성으로부터 기인하는 것으로 나타난다.

[0099] TTR 아밀로이드증은 개체 및 지리학적 위치에 따라 상당한 표현형 변이와 함께 다수의 상이한 형태로 존재한다. 예를 들어, TTR 아밀로이드증은 진행성, 신경돌기 감각 자율신경 및 운동신경병증으로서 존재할 수 있다. TTR 아밀로이드증은 또한 침윤성 심근병증으로서 존재할 수 있다.

[0100] 질환-관련 증상의 개시 시 연령은 생애의 20년 내지 90년 사이에서 변하며, 상이한 진단에 걸쳐 큰 변화가 있다. TTR 아밀로이드증의 다중시스템 연루는 그의 진단에 대한 단서이다. 예를 들어, TTR 아밀로이드증 진단은 다음 중 하나 또는 몇몇이 존재할 때 고려된다: (1) 특히 심부전과 관련된 신경병 질환의 가족력; (2) 알려지지 않은 병인의 신경병 통증 또는 진행성 감각 장애; (3) 분명한 원인이 없는 손목 터널 증후군(특히 그것이 양쪽 성이며 수술적 복구를 필요로 한다면); (4) 알려지지 않은 병인의 위장 운동성 장애 또는 자율성 신경 기능장애 (예를 들어, 발기성 기능장애, 기립성 저혈압, 신경인성 방광); (5) 고혈압 없이 두꺼워진 심실벽을 특징으로 하는 심장 질환; (6) 특히 두꺼워진 심장을 수반할 때 알려지지 않은 유래의 진행된 방실계 차단; 및 (6) 솜털 유형의 유리체 포함. 문헌[Ando et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013)] 참조. 다른 증상은, 예를 들어, 말초신경병증, 감각소실, 통증, 다리의 약화, 발한 이상증, 설사, 변비, 체중 감소 및 요실금/정체를 포함할 수 있다.

[0101] TTR 아밀로이드증의 진단은 전형적으로 표적 기관 생검, 다음에 아밀로이드-특이적 염료, 콩고 레드(Congo red)에 의한 절단 조직의 조직학적 염색에 의존한다. 아밀로이드에 대한 양성 검사가 관찰된다면, 아밀로이드 형성을 초래하는 전구체 단백질이 사실 TTR이라는 것을 보장하기 위해 TTR에 대한 면역조직학적 염색이 후속적으로 수행된다. 질환의 가족성 형태에 대해, 이어서, 진단이 이루어질 수 있기 전에 TTR을 암호화하는 유전자에서 돌연변이의 입증이 필요하다. 이는, 예를 들어, 등전점 전기영동, 중합효소 연쇄 반응, 또는 레이저 절개/액체 크로마토그래피-이중질량분석법을 통해 달성될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제2014/0056904호; 문헌[Ruberg and Berk, *Circulation* 126:1286-1300 (2012); Ando et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013)] 참조.

IV. 항체

A. 결합 특이성 및 기능성 특성

[0103] 본 발명은 트랜스타이레틴(TTR) 단백질에 대해, 더 구체적으로는, TTR의 아미노산 잔기 89 내지 97(서열번호 42) 내의 에피토프에 대해 결합하는 단클론성 항체를 제공한다. 이러한 에피토프는 천연 TTR 사량체에 묻혀 있으며, TTR의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태로 노출된다.

[0104] 6C1로 표기된 항체는 이러한 예시적인 마우스 항체이다. 이 항체는 TTR의 아미노산 잔기 89 내지 97(서열번호 42) 내에서 특이적으로 결합한다. 이 항체는 추가로 TTR의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태에 대해 결합하지만, TTR의 천연 사량체 형태에 대해서는 결합하지 않는 그의 능력을 특징으로 한다. 추가로, 이 항체는 TTR-매개 아밀로이드증 심장 조직에 대해 그가 면역반응성이지만, 건강한 심장 조직에 대해서는 면역반응성이 아닌 것을 특징으로 한다. 특정 단백질 또는 이들의 단편에 결합하는 능력은 실시예에 제공되는 예시적인 분석 형식을 이용하여 입증될 수 있다.

[0105] 일부 항체는 6C1로 표기된 항체와 동일하거나 또는 중복되는 에피토프에 결합한다. 6C1의 중쇄 및 경쇄 성숙 가변 영역의 서열은 각각 서열번호 1 및 13으로 표기된다. 이러한 결합 특이성을 갖는 다른 항체는 TTR, 또는 목적으로 하는 에피토프를 포함하는 이의 일부(예를 들어, 서열번호 42)를 이용하여 마우스를 면역화함으로써, 그리고 선택적으로 마우스 6C1의 가변 영역(IgG1 카파)을 갖는 항체와 경쟁하여, 얻어진 항체를 단량체 TTR 또는 서열번호 42를 포함하는 웨بت아이드에 대한 결합을 위해 선별함으로써 생성될 수 있다. 목적으로 하는 에피토프를 포함하는 TTR의 단편은 단편에 대해 항체 반응을 유발하게 하는 담체에 연결될 수 있고/있거나 이러한 반응을 유발하게 하는 애주번트와 조합될 수 있다. 이러한 항체는 구체화된 잔기의 돌연변이체에 비해 TTR 또는 이의 단편(예를 들어, 서열번호 38)의 야생형, 단량체 형태에 대한 차별적인 결합을 위해 선별될 수 있다. 이러한 돌연변이체에 대한 선별은 더 정확하게는 결합이 특정 잔기의 돌연변이유발에 의해 저해되고, 다른 예시된 항체의 기능적 특성을 공유할 가능성이 있는 항체의 동정을 허용하도록 결합 특이성을 정한다. 돌연변이는 표적 전체적으로 또는 에피토프가 존재하는 것으로 알려진 부문 전체적으로 한 번에 또는 더 크게 떨어진 간격으로 알라닌(또는 알라닌이 이미 존재한다면 세린)의 하나의 잔기로의 전체적인 대체적 치환일 수 있다. 돌연변이의 동일한 세트가 두 항체의 결합을 상당히 감소시킨다면, 두 항체는 동일한 에피토프에 결합한다.

[0106] 선택된 뮤린 항체(예를 들어, 6C1)의 결합 특이성을 갖는 항체는 또한 파지 디스플레이 방법의 변이체를 이용하여 생성될 수 있다. 윈터(Winter)의 WO 92/20791 참조. 이 방법은 인간 항체를 생성하는 데 특히 적합하다. 이 방법에서, 선택된 뮤린 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 중 하나는 출발 물질로서 사용된다. 예를 들어, 경쇄 가변 영역이 출발 물질로서 선택된다면, 구성원이 동일한 경쇄 가변 영역(즉, 뮤린 출발 물질) 및 상이한 중쇄 가변 영역을 나타내는 파지 디스플레이가 구성된다. 중쇄 가변 영역은, 예를 들어, 재배열된 인간 중쇄 가변 영역의 라이브러리로부터 얻어질 수 있다. 단량체 TTR 또는 이의 단편(예를 들어, 아미노산 잔기 89 내지 97)에 대해 강한 특이적 결합(예를 들어, 적어도 10^8 및 바람직하게는 적어도 $10^9 M^{-1}$)을 나타내는 파지가 선택된다. 이어서, 이 파지로부터의 중쇄 가변 영역은 추가적인 파지 라이브러리를 구성하기 위한 출발 물질로서 작용한다. 이 라이브러리에서, 각각의 파지는 동일한 중쇄 가변 영역(즉, 제1 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리된 영역) 및 상이한 경쇄 가변 영역을 나타낸다. 경쇄 가변 영역은, 예를 들어 재배열된 인간 가변 경쇄 영역의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 또한, 단량체 TTR 또는 이의 단편(예를 들어, 아미노산 잔기 89 내지 97)에 대해 강한 특이적 결합을 나타내는 파지가 선택된다. 얻어진 항체는 보통 뮤린 출발 물질과 동일 또는 유사한 에피토프 특이성을 가진다.

[0107] 다른 항체는 예시적인 항체 항체, 예컨대 6C1의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 cDNA의 돌연변이유발에 의해 얻을 수 있다. 성숙 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열 내 6C1에 대해 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하고, 그의 기능적 특성을 유지하고/하거나 소수의 기능적으로 중요하지 않은 아미노산 치환(예를 들어, 보존적 치환), 결실 또는 삽입에 의해 각각의 항체와 다른 단클론성 항체가 또한 본 발명에 포함된다. 6C1의 대응하는 CDR에 대해 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한 통상적인 정의(그러나 바람직하게는 카바트)에 의해 정해지는 적어도 하나 또는 모두 6개의 CDR(들)을 갖는 단클론성 항체가 또한 포함된다.

[0108] 본 발명은 또한 6C1로부터 전체적으로 또는 실질적으로 일부 또는 모든(예를 들어, 3, 4, 5 및 6개의) CDR을 갖는 항체를 제공한다. 이러한 항체는 6C1의 중쇄 가변 영역으로부터 전체적으로 또는 실질적으로 적어도 2, 보통은 모두 3개의 CDR을 갖는 중쇄 가변 영역 및/또는 6C1의 경쇄 가변 영역으로부터 전체적으로 또는 실질적으로 적어도 2, 보통은 모두 3개의 CDR을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다. 항체는 중쇄와 경쇄를 둘 다 포함할 수 있다. CDR은, CDR-H2(카바트에 의해 정해질 때)가 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 치환, 삽입 또는 결실을 가질 수 있다는 것을 제외하고, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 치환, 삽입 또는 결실을 함유할 때, 대응하는 6C1

CDR로부터 실질적으로 유래된다. 이러한 항체는 성숙 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열 내 6C1에 대해 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 가질 수 있고, 그들의 기능적 특성을 유지하고/하거나 소수의 기능적으로 중요하지 않은 아미노산 치환(예를 들어, 보존적 치환), 결실 또는 삽입에 의해 6C1과 다르다.

[0110] 이러한 분석에 의해 동정되는 일부 항체는 실시에 또는 다른 것에 기재하는 바와 같이, TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태에 결합할 수 있지만, TTR의 천연 사량체 형태에 결합되지 않는다. 마찬가지로, 일부 항체는 TTR-매개 아밀로이드증 조직에 대해 면역반응성이지만, 건강한 조직에 대해서는 그렇지 않다.

[0111] 일부 항체는 동물 모델 또는 임상 시험에서 TTR의 응집을 저해 또는 감소시킬 수 있거나, TTR 피브릴 형성을 저해 또는 감소시킬 수 있거나, TTR 침착 또는 응집된 TTR을 감소시키거나 또는 클리어런스하거나, 또는 TTR의 비독성 입체배좌를 안정화시킨다. 일부 항체는 동물 모델 또는 임상 시험에서 나타낸 바와 같이 TTR 아밀로이드증을 치료하거나, 예방을 달성하거나 또는 개시를 지연시킬 수 있다. TTR 아밀로이드증에 대한 활성을 시험하기 위한 예시적인 동물 모델은 문헌[Kohno *et al.*, *Am. J. Path.* 150(4):1497-1508 (1997); Teng *et al.*, *Laboratory Investigations* 81:385-396 (2001); Wakasugi *et al.*, *Proc. Japan Acad.* 63B:344-347 (1987); Shimada *et al.*, *Mol. Biol. Med.* 6:333-343 (1989); Nagata *et al.*, *J. Biochem.* 117:169-175 (1995); Sousa *et al.*, *Am. J. Path.* 161:1935-1948 (2002); 및 Santos *et al.*, *Neurobiology of Aging* 31:280-289 (2010)]에 기재된 것을 포함한다.

B. 비인간 항체

[0113] 단량체 TTR 또는 이의 단편(예를 들어, 아미노산 잔기 89 내지 97)에 대한 다른 비인간 항체의 생성, 예를 들어, 뮤린, 기니픽, 영장류, 토끼 또는 래트는, 예를 들어, TTR 또는 이의 단편을 이용하여 동물을 면역화함으로써 달성될 수 있다. 문헌[Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988)] 참조(모든 목적을 위해 참고로 포함됨). 이러한 면역원은 천연 공급원으로부터, 웨타이드 합성에 의해 또는 재조합 발현에 의해 얻을 수 있다. 선택적으로, 운반체 단백질과 융합 또는 달리 복합체화된 면역원이 투여될 수 있다. 선택적으로, 면역원은 애주번트와 함께 투여될 수 있다. 몇몇 유형의 애주번트는 이하에 기재되는 바와 같이 사용될 수 있다. 완전 프로인트 애주번트 다음에 불완전 애주번트는 실험실 동물의 면역화를 위해 바람직하다. 토끼 또는 기니픽은 전형적으로 다클론성 항체를 제조하기 위해 사용된다. 마우스는 전형적으로 단클론성 항체를 제조하기 위해 사용된다. 항체는 단량체 TTR 또는 TTR 내의 에피토프(예를 들어, 아미노산 잔기 89 내지 97 중 하나 이상을 포함하는 에피토프)에 대한 특이적 결합을 위해 선별된다. 이러한 선별은 아미노산 잔기 89 내지 97 또는 이들 잔기 내에서 돌연변이를 함유하는 단량체 TTR 변이체, 예컨대 TTR 변이체의 수집물에 대한 항체의 결합을 결정하고, TTR 변이체가 항체에 결합하는 것을 결정함으로써 달성될 수 있다. 결합은, 예를 들어, 웨스턴 블롯, FACS 또는 ELISA에 의해 평가될 수 있다.

C. 인간화 항체

[0115] 인간화 항체는 비인간 "공여자(donor)" 항체로부터의 CDR이 인간 "수용자" 항체 서열에 접합된 유전자 조작된 항체이다(예를 들어, 퀸(Queen)의 미국 특허 제5,530,101호 및 제5,585,089호; 원터(Winter)의 미국 특허 제5,225,539호; 카터(Carter)의 미국 특허 제6,407,213호; 아다이르(Adair)의 미국 특허 제5,859,205호; 및 푸트(Foote)의 미국 특허 제6,881,557호 참조). 수용자 항체 서열은, 예를 들어, 성숙 인간 항체 서열, 이러한 서열의 복합체, 인간 항체 서열의 공통 서열 또는 생식계열 서열일 수 있다. 따라서, 인간화 항체는 공여자 항체 및 가변 영역 프레임워크 서열 및 불변 영역으로부터 전체적으로 또는 실질적으로, 존재한다면 인간 항체 서열로부터 전체적으로 또는 실질적으로 적어도 3, 4, 5 또는 모든 CDR을 갖는 항체이다. 유사하게, 인간화된 중쇄는 공여자 항체 중쇄, 및 중쇄 가변 영역 프레임워크 서열 및 중쇄 불변 영역으로부터 전체적으로 또는 실질적으로, 존재한다면, 인간 중쇄 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역 서열로부터 실질적으로 적어도 1, 2 및 보통으로는 모두 3개의 CDR을 가진다. 유사하게, 인간화된 경쇄는 공여자 항체 경쇄, 및 경쇄 가변 영역 프레임워크 서열 및 경쇄 불변 영역으로부터 전체적으로 또는 실질적으로, 존재한다면, 인간 경쇄 가변 영역 프레임워크 및 불변 영역 서열로부터 실질적으로 적어도 1, 2 및 보통으로는 모두 3개의 CDR을 가진다. 나노바디 및 dAb 이외에, 인간화 항체는 인간화된 중쇄 및 인간화된 경쇄를 포함한다. 인간화 항체 내 CDR은 대응하는 잔기의 적어도 85%, 90%, 95% 또는 100%(임의의 통상적인 정의에 의해 정하지만, 바람직하게는 카바트에 의해 정함)가 각각의 CDR 사이에서 동일할 때, 비인간 항체 내 대응하는 CDR로부터 실질적으로 유래된다. 항체 쇄의 가변 영역 프레임워크 서열 또는 항체 쇄의 불변 영역은 임의의 통상적인 정의에 의해 정해지는(그러나 바람직하게는 카바트에

의해 정해지는) 대응하는 잔기의 적어도 85%, 90%, 95% 또는 100%가 동일할 때 인간 가변 영역 프레임워크 서열 또는 인간 불변 영역으로부터 각각 실질적으로 유래된다.

[0116] 인간화 항체는 종종 마우스 항체로부터 모두 6개의 CDR(바람직하게는 카바트에 의해 정함)을 혼입하지만, 그들은 또한 마우스 항체로부터 모든 CDR 미만으로(예를 들어, 적어도 3, 4 또는 5개의 CDR) 이루어질 수 있다(예를 들어, 문헌[Pascalis *et al.*, *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos *et al.*, *J. of Mol. Biol.*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi *et al.*, *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura *et al.*, *J. Immunol.*, 164:1432-1441, 2000] 참조).

[0117] 일부 항체에서, CDR의 단지 일부, 즉, SDR로 칭해지는 결합에 필요한 CDR 잔기의 서브세트가 인간화 항체에서 결합을 보유하는 데 필요하다. 항원과 접촉하지 않고 SDR과 접촉하지 않는 CDR 잔기는 분자 모델링에 의해 그리고/또는 경험적으로, 또는 문헌[Gonzales *et al.*, *Mol. Immunol.* 41: 863, 2004]에 기재된 바와 같이 코티아 초가변 루프 밖에 놓인 카바트 CDR의 영역으로부터 이전의 연구(예를 들어, CDR H2 내 잔기 H60 내지 H65는 종종 필요하지 않음)에 기반하여 동정될 수 있다(Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987). 하나 이상의 공여자 CDR 잔기가 없거나 또는 전체 공여자 CDR이 생략되는 위치에서의 이러한 인간화 항체에서, 위치를 점유하는 아미노산은 수용자 항체 서열에서 대응하는 위치(카바트 넘버링에 의함)를 점유하는 아미노산일 수 있다. 포함되는 CDR 내 공여자 아미노산에 대한 수용자의 이러한 치환의 수는 경쟁적 사항의 균형을 반영한다. 이러한 치환은 인간화 항체 내 마우스 아미노산의 수를 감소시키고, 결과적으로 잠재적 면역원성을 감소시킴에 있어서 잠재적으로 유리하다. 그러나, 치환은 또한 친화도의 변화를 야기할 수 있고, 친화도의 상당한 감소는 바람직하게는 회피된다. 치환을 위한 CDR 및 아미노산 내의 치환에 대한 위치는 또한 경험적으로 선택될 수 있다.

[0118] 인간 수용자 항체 서열은 선택적으로 인간 수용자 서열 가변 영역 프레임워크와 공여자 항체 쇄의 대응하는 가변 영역 프레임워크 사이의 높은 정도의 서열 동일성(예를 들어, 65 내지 85% 동일성)을 제공하기 위해 다수의 공지된 인간 항체 서열 중에서 선택될 수 있다.

[0119] 중쇄에 대한 수용자 서열의 예는 NCBI 수탁 코드 ADX65650(서열번호 3)을 지니는 인간 성숙 중쇄 가변 영역이다. 이 수용자 서열은 마우스 6C1 중쇄와 동일한 정규 형태를 갖는 2개의 CDR을 포함한다. 경쇄에 대한 수용자 서열의 예는 NCBI 수탁 코드 ABI74084(서열번호 15)를 갖는 인간 성숙 경쇄 가변 영역이다. 이 수용자 서열은 마우스 6C1 경쇄와 동일한 정규 형태를 갖는 2개의 CDR을 포함한다.

[0120] 인간 가변 영역 프레임워크 잔기로부터의 특정 아미노산은 CDR 입체배좌 및/또는 항원에 대한 결합에 대한 그들의 가능한 영향에 기반하여 치환을 위해 선택될 수 있다. 이러한 가능한 영향의 연구는 특정 위치에서 아미노산의 특징의 시험, 또는 특정 아미노산의 치환 또는 돌연변이유발 효과의 경험적 관찰을 모델링하는 것에 의한다.

[0121] 예를 들어, 아미노산이 뮤린 가변 영역 프레임워크 잔기와 선택된 인간 가변 영역 프레임워크 잔기 사이에서 다를 때, 인간 프레임워크 아미노산은 그것이 아미노산에 대해 합리적으로 예상될 때에 마우스 항체와 동등한 프레임워크 아미노산에 의해 치환될 수 있다:

[0122] (1) 비공유적으로 항원에 직접 결합함;

[0123] (2) 코티아(그러나 카바트는 아님)에 의해 나타내는 바와 같은 CDR 영역에 인접하거나 또는 CDR 내입;

[0124] (3) CDR 영역(예를 들어, CDR 영역의 약 6Å 내입)과 달리 상호작용함, (예를 들어, 상동성의 알려진 면역 글로불린 쇄의 풀어진 구조에 대해 경쇄 또는 중쇄를 모델링하는 것에 의해 동정됨); 또는

[0125] (4) VL-VH 계면에 참여하는 잔기임.

[0126] 퀸의 미국 특허 제5,530,101호에 의해 정의되는 바와 같은 부류 (1) 내지 (3)으로부터의 프레임워크 잔기는 때때로 정규 및 베니어(vernier) 잔기로서 대안적으로 지칭된다. CDR 루프의 입체배좌를 정하게 하는 프레임워크 잔기는 때때로 정규 잔기로서 지칭된다(Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Thornton & Martin, *J. Mol. Biol.* 263:800-815 (1996)). 항원-결합 루프 입체배좌를 지지하고, 항원에 대한 항체의 맞춤을 미세하게 조율하는 역할을 하는 프레임워크 잔기는 때때로 베니어 잔기로서 지칭된다(Foote & Winter, *J. Mol. Biol.* 224:487-499 (1992)).

[0127] 치환을 위한 후보인 다른 프레임워크 잔기는 잠재적 글리코실화 부위를 생성하는 잔기이다. 치환을 위한 또 다른 후보는 해당 위치에서 인간 면역글로불린에 대해 보통인 수용자 인간 프레임워크 아미노산이다. 이들 아미노산은 마우스 공여자 항체의 동등한 위치로부터 또는 더 전형적인 인간 면역글로불린의 동등한 위치로부터 아미

노산으로 치환될 수 있다.

[0128] 예시적인 인간화 항체는 Hu6C1로 표기된 마우스 6C1 항체이다. 마우스 항체는 서열번호 1 및 서열번호 13을 각각 포함하는 아미노산 서열을 갖는 성숙 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 본 발명은 6개의 예시된 인간화된 성숙 중쇄 가변 영역을 제공한다: Hu6C1VHv1(서열번호 4), Hu6C1VHv1b(서열번호 5), Hu6C1VHv2(서열번호 6), Hu6C1VHv2b(서열번호 7), Hu6C1VHv3(서열번호 8) 및 Hu6C1VHv3b(서열번호 9). 본 발명은 추가로 2개의 예시화된 인간 성숙 경쇄 가변 영역을 제공한다: Hu6C1VLv1(서열번호 16) 및 Hu6C1VLv2(서열번호 17). 도 1 및 도 2는 6C1의 각각 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 배열, 6C1의 마우스 모델 항체, 인간 수용자 항체 및 인간화된 항체 형태를 나타낸다.

[0129] CDR 입체배좌 및/또는 항원에 대한 결합에 대해 가능한 영향과 같은 이유로, 중쇄와 경쇄 사이의 상호작용의 매개, 불변 영역과의 상호작용, 목적으로 하는 또는 목적으로 하지 않는 번역 후 변형을 위한 부위가 되는 것, 인간 가변 영역 서열에서 그의 위치를 위한 보통이 아닌 잔기가 되는 것 및 따라서 잠재적으로 면역원성인, 응집 퍼텐셜을 얻는 것, 및 다른 이유로 다음의 10개의 가변 영역 프레임워크 위치를 실시예에서 추가로 구체화하는 바와 같이 6개의 예시된 인간 성숙 경쇄 가변 영역 및 2개의 예시된 인간 성숙 중쇄 가변 영역에서 치환을 위한 후보로서 고려하였다: L2, L45, H19, H44, H49, H76, H77, H82(a), H83 및 H89.

[0130] 여기서, 다른 곳에서와 같이, 처음 언급된 잔기는 CDR-H1의 경우에 인간 수용자 프레임워크 내로 카바트 CDR 또는 복합 코티아 카바트 CDR을 접합함으로써 형성된 인간화된 항체의 잔기이고, 두 번째로 언급된 잔기는 이러한 잔기를 대체하는 것으로 고려되는 잔기이다. 따라서, 가변 영역 프레임워크 내에서, 처음 언급된 잔기는 인간이고, CDR 내에서, 처음 언급된 잔기는 마우스이다.

[0131] 예시된 항체는 예시된 성숙 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 임의의 순열 또는 조합(예를 들어, Hu6C1VHv1/VLv1 또는 H1L1, Hu6C1VHv1b/VLv1 또는 H1bL1, Hu6C1VHv1/VLv2 또는 H1L2, Hu6C1VHv1b/VLv2 또는 H1bL2, Hu6C1VHv2/VLv1 또는 H2L1, Hu6C1VHv2b/VLv1 또는 H2bL1, Hu6C1VHv2/VLv2 또는 H2L2, Hu6C1VHv2b/VLv2 또는 H2bL2, Hu6C1VHv3/VLv1 또는 H3L1, Hu6C1VHv3b/VLv1 또는 H3bL1, Hu6C1VHv3/VLv2 또는 H3L2, 및 Hu6C1VHv3b/VLv2 또는 H3bL2)을 포함한다.

[0132] 본 발명은 인간화된 성숙 중쇄 가변 영역이 서열번호 4 내지 9에 대해 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일성을 나타내고, 인간화된 성숙 경쇄 가변 영역이 서열번호 16 또는 17에 대해 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 나타내는 인간화된 항체의 변이체를 제공한다. 일부 이러한 항체에서, 서열번호 4 내지 9, 16 및 17에서 복귀돌연변이 또는 다른 돌연변이 중 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 모두가 보유된다.

[0133] 일부 항체에서, V_H 영역에서 위치 H19, H44, H49, H76, H77, H82(a), H83, 및 H89 중 적어도 하나는 각각 K, R, A, S, T, S, K 및 V에 의해 점유된다. 일부 항체에서, V_H 영역 내 위치 H77은 Hu6C1VHv1에서와 같이 T에 의해 점유된다. 일부 항체에서, V_H 영역 내 위치 H49 및 H77은 Hu6C1VHv1b에서와 같이 각각 A 및 T에 의해 점유된다. 일부 항체에서, V_H 영역 내 위치 H76, H77 및 H82(a)는 Hu6C1VHv2에서와 같이 각각 S, T 및 S에 의해 점유된다. 일부 항체에서, V_H 영역 내 위치 H49, H76, H77 및 H82(a)는 Hu6C1VHv2b에서와 같이 각각 A, S, T 및 S에 의해 점유된다. 일부 항체에서, V_H 영역 내 위치 H19, H44, H77, H83 및 H89는 Hu6C1VHv3에서와 같이 각각 K, R, T, K 및 M에 의해 점유된다. 일부 항체에서, V_H 영역 내 위치 H19, H44, H49, H77, H83 및 H89는 Hu6C1VHv3b에서와 같이 각각 K, R, A, T, K, 및 M에 의해 점유된다. 일부 항체에서, 위치 V_L 영역 내 L45는 K에 의해 점유된다. 일부 항체에서, V_L 영역 내 위치 L2는 I에 의해 점유된다. 일부 항체에서, V_L 영역 내 L2 및 L45 중 하나 또는 둘 다는 Hu6C1VLv1에서와 같이 각각 V 및 K에 의해 점유된다. 일부 항체에서, V_H 영역 내 위치 L2 및 L45 중 하나 또는 둘 다는 Hu6C1VLv2에서와 같이 각각 I 및 K에 의해 점유된다. 이러한 인간화 항체의 CDR 영역은 6C1 마우스 공여자 항체의 CDR 영역에 대해 동일하거나 또는 실질적으로 동일할 수 있다. CDR 영역은 임의의 통상적인 정의(예를 들어, 코티아, 또는 코티아 및 카바트의 복합)에 의해 정해질 수 있지만, 바람직하게는 카바트에 의해 정해진다.

[0134] 가변 영역 프레임워크 위치는 달리 언급되지 않는 한 카바트 넘버링에 따른다. 다른 이러한 변이체는 전형적으로 소수의(예를 들어, 전형적으로 1, 2, 3, 5, 10 또는 15개 이하) 대체, 결실 또는 삽입에 의해 예시된 Hu6C1 항체의 서열과 다르다. 이러한 차이는 보통 프레임워크에 있지만, 또한 CDR 내에서 발생할 수 있다.

[0135] 인간화된 6C1 변이체에서 추가적인 변이에 대한 가능성은 가변 영역 프레임워크 내 추가적인 복귀돌연변이이다. 인간화된 mAb 내 CDR과 접촉되지 않는 다수의 프레임워크 잔기는 공여자 마우스 mAb 또는 다른 마우스 또는 인간 항체의 대응하는 위치로부터의 아미노산의 치환을 수용할 수 있으며, 훨씬 다수의 잠재적 CDR-접촉 잔기는 또한 치환될 수 있다. 심지어 CDR 내의 아미노산은, 예를 들어, 가변 영역 프레임워크를 공급하기 위해 사용되는 인간 수용자 서열의 대응하는 위치에서 발견되는 잔기에 의해 변경될 수 있다. 추가로, 대안의 인간 수용자 서열은, 예를 들어, 중쇄 및/또는 경쇄에 대해 사용될 수 있다. 상이한 수용자 서열이 사용된다면, 대응하는 공여자 및 수용자 잔기가 이미 복귀돌연변이 없이 동일하기 때문에, 상기 권장된 복귀돌연변이 중 하나 이상은 수행되지 않을 수도 있다.

[0136] 바람직하게는, Hu 6C1 변이체에서의 대체 또는 복귀돌연변이는 (보존적이든 아니든) 인간화된 mAb의 결합 친화도 또는 효능, 즉, 단량체 TTR에 결합하는 그의 능력에 대해 실질적인 효과가 없다(예를 들어, 변이체 인간화된 6C1 항체의 본 실시예에 기재된 일부 또는 모든 분석에서의 효능은 뮤린 6C1의 효능과 같이 본질적으로 동일하며, 즉, 실험 오차 내이다).

D. 키메라 및 베니어 항체

[0138] 본 발명은 추가로 비인간 항체, 특히 실시예의 6C1 항체 키메라 및 베니어 형태를 제공한다.

[0139] 키메라 항체는 비-인간 항체(예를 들어, 마우스)의 경쇄 및 중쇄의 성숙 가변 영역이 인간 경쇄 및 중쇄 불변 영역과 조합되는 항체이다. 이러한 항체는 마우스 항체의 결합 특이성을 실질적으로 또는 전체적으로 보유하고, 인간 서열의 약 2/3이다.

[0140] 베니어 항체는 CDR의 일부, 보통은 모두 및 비-인간 항체의 비-인간 가변 영역 프레임워크 잔기의 일부를 보유 하지만, B- 또는 T-세포 에피토프에 기여할 수 있는 다른 가변 영역 프레임워크 잔기, 예를 들어 노출된 잔기 (Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991)를 인간 항체 서열의 대응하는 위치로부터의 잔기로 대체하는 인간화 항체의 유형이다. 결과는 CDR이 비-인간 항체로부터 전체적으로 또는 실질적으로 유래되고, 비인간 항체의 가변 영역 프레임워크는 치환에 의해 더 인간 유사로 만들어지는 항체이다. 6C1 항체의 베니어 형태는 본 발명에 포함된다.

E. 인간 항체

[0142] 단량체 TTR 또는 이의 단편(예를 들어, TTR의 아미노산 잔기 89 내지 97(서열번호 42))에 대한 인간 항체는 이하에 기재한 다양한 기법에 의해 제공된다. 일부 인간 항체는 특정 마우스 항체, 예전대 실시예에 기재된 마우스 단클론성 항체 중 하나와 동일한 에피토프 특이성을 갖도록 상기 또는 다른 곳에서 경쟁적 결합 실험에 의해, 원터의 파지 디스플레이 방법에 의해 선택된다. 인간 항체는 또한 표적 항원으로서 단지 TTR의 단편, 예전대 단지 TTR의 아미노산 잔기 89 내지 97을 함유하는 TTR 변이체를 이용함으로써, 및/또는 TTR 변이체, 예전대 TTR의 아미노산 잔기 89 내지 97 내에서 다양한 돌연변이를 함유하는 TTR 변이체의 수집물에 대해 항체를 선별함으로써 특정 에피토프에 대해 선별될 수 있다.

[0143] 인간 항체를 생성하기 위한 방법은 문헌[Oestberg *et al.*, *Hybridoma* 2:361-367 (1983)]; 외스트베르크 (Oestberg)의 미국 특허 제4,634,664호; 및 인글먼(Engleman) 등의 미국 특허 제4,634,666호의 트라이오마 방법, 인간 면역글로불린 유전자를 포함하는 유전자이식 마우스의 용도(예를 들어, 론버그(Lonberg) 등의 WO93/12227(1993); 미국 특허 제5,877,397; 미국 특허 제5,874,299; 미국 특허 제5,814,318; 미국 특허 제5,789,650호; 미국 특허 제5,770,429호; 미국 특허 제5,661,016호; 미국 특허 제5,633,425호; 미국 특허 제5,625,126호; 미국 특허 제5,569,825호; 미국 특허 제5,545,806호; 문헌[Neuberger, *Nat. Biotechnol.* 14:826 (1996)]; 및 쿠체라파티(Kucherlapati)의 WO 91/10741 (1991) 참조) 및 파지 디스플레이 방법(예를 들어, 다워 (Dower) 등의 WO 91/17271; 맥카터(McCafferty) 등의 WO 92/01047; 미국 특허 제5,877,218호; 미국 특허 제5,871,907호; 미국 특허 제5,858,657호; 미국 특허 제5,837,242호; 미국 특허 제5,733,743호; 및 미국 특허 제5,565,332호)을 포함한다.

F. 불변 영역의 선택

[0145] 키메라, 베니어 또는 인간화 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 인간 불변 영역의 적어도 일부에 연결될 수 있다. 불변 영역의 선택은 항체-의존적 세포-매개 세포독성, 항체 의존적 세포의 식세포작용 및/또는 상보체 의존적 세포독성이 요망되는지의 여부에 부분적으로 의존한다. 예를 들어, 인간 아이소토프 IgG1 및 IgG3은 상보체-의존적 세포독성을 가지고, 인간 아이소타입 IgG2 및 IgG4는 그렇지 않다. 인간 IgG1 및 IgG3은 인간 IgG2

및 IgG4보다 더 강한 세포 매개 효과기 기능을 유도한다. 경쇄 불변 영역은 람다 또는 카파일 수 있다.

[0146] 경쇄 및/또는 중쇄의 아미노 또는 카복시 말단에서 하나 또는 몇몇 아미노산, 예컨대 중쇄의 C-말단의 라이신은 분자의 부분 또는 모두에서 상실되거나 또는 유도체화될 수 있다. 치환은 효과기 기능, 예컨대 상보체-매개 세포독성 또는 ADCC를 감소 또는 증가시키기 위해(예를 들어, 원터 등의 미국 특허 제5,624,821호; 트소(Tso) 등의 미국 특허 제5,834,597호; 및 문헌[Lazar *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:4005, 2006]), 또는 인간에서 반감기를 연장시키기 위해(예를 들어, 인간[Hinton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279:6213, 2004]) 불변 영역에서 이루어질 수 있다. 예시적인 치환은 항체의 반감기를 증가시키기 위해 위치 250에서 Gln 및/또는 위치 428에서 Leu(EU 넘버링은 이 단락에서 불변 영역에 대해 사용됨)을 포함한다. 임의의 또는 모든 위치 234, 235, 236 및/또는 237에서 치환은 Fc γ 수용체, 특히 Fc γ RI 수용체에 대해 친화도를 감소시킨다(예를 들어, 미국 특허 제6,624,821호). 인간 IgG1의 위치 234, 235 및 237에서 알라닌 치환은 효과기 기능을 감소시키기 위해 사용될 수 있다. 일부 항체는 효과기 기능을 감소시키기 위해 인간 IgG1의 위치 234, 235 및 237에서 알라닌 치환을 가진다. 선택적으로, 인간 IgG2에서 위치 234, 236 및/또는 237은 알라닌으로 치환되고, 위치 235에서 글루타민으로 치환된다(예를 들어, 미국 특허 제5,624,821호). 일부 항체에서, 인간 IgG1의 EU 넘버링에 의해 위치 241, 264, 265, 270, 296, 322, 329 및 331 중 하나 이상에서의 돌연변이가 사용된다. 일부 항체에서, 인간 IgG1의 EU 넘버링에 의해 위치 318, 320 및 322 중 하나 이상에서의 돌연변이가 사용된다. 일부 항체에서, 위치 234 및/또는 235는 알라닌으로 치환되고/되거나 위치 329는 글리신으로 치환된다. 일부 항체에서, 위치 234 및 235는 서열번호 27에서와 같이 알라닌으로 치환된다. 일부 항체에서, 아이소타입은 인간 IgG2 또는 IgG4이다.

[0147] 예시적인 인간 경쇄 카파 불변 영역은 서열번호 28의 아미노산 서열을 가진다. 서열번호 28의 N-말단의 알기닌은 생략될 수 있으며, 이 경우에 경쇄 카파 불변 영역은 서열번호 29의 아미노산 서열을 가진다. 예시적인 인간 IgG1 중쇄 불변 영역은 (C-말단의 라이신이 있는 또는 없는) 서열번호 25의 아미노산 서열을 가진다. 항체는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 함유하는 사량체로서, 별개의 중쇄, 경쇄로서, Fab, Fab', F(ab')2 및 Fv로서, 또는 중쇄 및 경쇄 성숙 가변 도메인이 스페이서를 통해 연결되는 단일쇄 항체로서 발현될 수 있다.

[0148] 인간 불변 영역은 상이한 개체 사이의 동종이인자형 변이 및 동종동질이인자형 변이를 나타내며, 즉, 불변 영역은 하나 이상의 다형체 위치에서 상이한 개체에서 상이할 수 있다. 동종동질이인자형은 동종이인자형과 다르며, 즉, 동종동질이인자형을 인식하는 혈청은 하나 이상의 다른 아이소타입의 비다형성 영역(non-polymorphic region)에 결합한다. 따라서, 예를 들어, 다른 중쇄 불변 영역은 IgG1 G1m3 동종이인자형을 가지며, 서열번호 26의 아미노산 서열을 가진다. IgG1 G1m3 동종이인자형의 다른 중쇄 불변 영역은 (C-말단의 라이신이 있는 또는 없는) 서열번호 27의 아미노산 서열을 가진다. 인간 불변 영역에 대한 언급은 임의의 천연 동종이인자형 또는 천연 동종이인자형에서 위치를 점유하는 잔기의 임의의 순열을 지니는 불변 영역을 포함한다.

G. 재조합 항체의 발현

[0149] 항체-발현 세포주(예를 들어, 하이브리도마)를 이용하여 키메라 및 인간화 항체를 생성하기 위한 다수의 방법이 공지되어 있다. 예를 들어, 항체의 면역글로불린 가변 영역은 잘 공지된 방법을 이용하여 클로닝 및 시퀀싱될 수 있다. 일 방법에서, 중쇄 가변 VH 영역은 하이브리도마 세포로부터 제조된 mRNA를 이용하여 RT-PCR에 의해 클로닝된다. 5' 프라이머 및 g2b 불변 영역 특이적 3' 프라이머로서 번역 개시 코돈을 포함하는 VH 영역 리더 웨بت아이드에 대해 공통 프라이머가 사용된다. 예시적인 프라이머는 쟁크(Schenk) 등(본 명세서에서 이후에 "쟁크")에 의해 미국 특허 공개 제2005/0009150호에 기재된다. 다중의 독립적으로 유래된 클론으로부터의 서열은 종종 동안 도입된 변화가 없다는 것을 보장하기 위해 비교될 수 있다. VH 영역의 서열은 또한 5' RACE RT-PCR 방법 및 3' g2b 특이적 프라이머에 의해 얻어지는 VH 단편을 시퀀싱함으로써 결정 또는 확인될 수 있다.

[0150] 경쇄 가변 VL 영역은 유사한 방식으로 클로닝될 수 있다. 일 접근에서, 공통 프라이머 세트는 번역 개시 코돈을 포함하는 VL 영역에 혼성화하도록 설계된 5' 프라이머 및 V-J 결합 영역 하류의 Ck 영역에 특이적인 3' 프라이머를 이용하여 VL 영역의 중폭을 위해 설계된다. 두 번째 접근에서, 5'RACE RT-PCR 방법은 VL 암호화 cDNA를 클로닝하기 위해 사용된다. 예시적인 프라이머는 상기의 쟁크에 기재되어 있다. 이어서, 클로닝된 서열은 인간(또는 다른 비인간 종) 불변 영역을 암호화하는 서열과 조합된다. 인간 불변 영역을 암호화하는 예시적인 서열은 인간 IgG1 불변 영역을 암호화하는 서열번호 46, 및 인간 카파 경쇄 불변 영역을 암호화하는 서열번호 47 및 48을 포함한다.

[0151] 일 접근에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 각각의 VDJ 또는 VJ 접합 하류의 스플라이스 공여자 서열을 암호화하도록 재조작되고, 포유류 밸런 벡터, 예컨대 중쇄에 대해 pCMV-h γ 1 및 경쇄에 대해 pCMV-Mcl 내로 클로닝된다. 이를 벡터는 삽입된 가변 영역 카세트 하류의 엑손 단편으로서 인간 γ 1 및 Ck 불변 영역을 암호화한다. 서열

확인 후에, 중쇄 및 경쇄 발현 벡터는 키메라 항체를 생성하기 위해 CHO 세포 내로 공동형질감염될 수 있다. 조건화 배지를 형질감염 후 48시간에 수집하고 나서, 항원 결합에 대해 웨스턴 블롯 분석 또는 항원 결합에 대해 ELISA에 의해 수집한다. 키메라 항체는 상기 기재한 바와 같이 인간화된다.

[0153] 키메라, 베니어, 인간화 및 인간 항체는 전형적으로 재조합 발현에 의해 생성된다. 재조합 폴리뉴클레오타이드 작제물은 전형적으로 자연적으로 관련된 또는 이종성 발현 제어 요소, 예컨대 프로모터를 포함하는 항체쇄의 암호 서열에 작동 가능하게 연결된 발현 제어 서열을 포함한다. 발현 제어 서열은 진핵 또는 원핵 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시킬 수 있는 벡터 내 프로모터 시스템일 수 있다. 일단, 벡터가 적절한 숙주 내로 혼입되었다면, 숙주는 뉴클레오타이드 서열의 고수준 발현 및 교차반응 항체의 수집 및 정제에 적합한 조건 하에 유지된다.

[0154] 이를 발현 벡터는 전형적으로 에피솜으로서 또는 숙주 염색체 DNA의 통합 부분으로서 숙주 유기체에서 복제 가능하다. 통상적으로, 발현 벡터는 목적으로 하는 DNA 서열을 이용하여 형질전환된 해당 세포의 검출을 허용하기 위해 선택 마커, 예를 들어, 암피실린 내성 또는 하이그로마이신 내성을 함유한다.

[0155] 이콜라이(*E. coli*)는 발현 항체, 특히 항체 단편에 유용한 하나의 원핵 숙주이다. 미생물, 예컨대 효모는 또한 발현에 유용하다. 사카로마이세스(*Saccharomyces*)는 원한다면 발현 제어 서열, 복제 기점, 종결 서열 등을 갖는 적합한 벡터를 지니는 효모 숙주이다. 전형적인 프로모터는 3-포스포글리세레이트 키나제 및 다른 당분해 효소를 포함한다. 유도성 효모 프로모터는 특히 알코올 탈수소효소, 아이소사이토크롬 C 및 밀토스 및 갈락토스 효용을 초래하는 효소를 포함한다.

[0156] 포유류 세포는 면역글로불린 또는 이의 단편을 암호화하는 뉴클레오타이드 세그먼트에 대해 사용될 수 있다. 문헌[*Winnacker, From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987)] 참조. 무손상 이종성 단백질을 분비할 수 있는 다수의 적합한 숙주 세포주가 개발되었고, CHO 세포주, 다양한 COS 세포주, HeLa 세포, HEK293 세포, L 세포 및 Sp2/0 및 NS0를 포함하는 비항체 생성 골수종을 포함한다. 세포는 비인간일 수 있다. 이를 세포에 대한 발현 벡터는 발현 제어 서열, 예컨대 복제기점, 프로모터, 인핸서(Queen *et al.*, *Immunolet. Rev.* 89:49 (1986)), 및 필수적인 가공 부위, 예컨대 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위 및 전사 종결자 서열을 포함할 수 있다. 발현 제어 서열은 내인성 유전자, 사이토메갈로바이러스, SV40, 아데노바이러스, 소 유두종 바이러스 등으로부터 유래된 프로모터를 포함할 수 있다. 문헌[Co *et al.*, *J. Immunolet.* 148:1149 (1992)] 참조.

[0157] 대안적으로, 항체 암호 서열은 유전자 이식 동물의 계놈 내로 도입 및 유전자 이식 동물의 모유에서의 후속적 발현을 위해 이식유전자에 도입될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,741,957호; 미국 특허 제5,304,489호; 및 미국 특허 제5,849,992호 참조). 적합한 이식유전자는 유선 특이적 유전자로부터의 프로모터 및 인핸서, 예컨대 카제인 또는 베타 락토글로불린과 작동 가능하게 연결된 경쇄 및/또는 중쇄에 대한 암호 서열을 포함한다.

[0158] 관심 대상의 DNA 세그먼트를 함유하는 벡터는 세포 숙주의 유형에 따르는 방법에 의해 숙주 세포 내로 전달될 수 있다. 예를 들어, 염화칼슘 형질감염은 통상적으로 원핵 세포에 대해 이용되는 반면, 인산칼슘 처리, 전기천공법, 리포액션, 바이오리스틱스 또는 바이러스 기반 형질감염은 다른 세포 숙주에 대해 사용될 수 있다. 포유류 세포를 형질감염하기 위해 사용되는 다른 방법은 폴리브렌, 원형질체 융합, 리포좀, 전기천공법 및 미세주입법의 사용을 포함한다. 유전자 이식 동물의 생성을 위해, 이식 유전자는 수정된 난모세포 내로 미세주사될 수 있거나, 또는 배아 줄기 세포의 계놈 내로 혼입될 수 있고, 이러한 세포의 핵은 제핵 난모세포에 전달된다.

[0159] 세포 배양물 내로 항체 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 벡터(들)를 도입하여, 세포 풀은 무 혈청 배지에서의 성장 생산성 및 제품 품질에 대해 선별될 수 있다. 이어서, 단클론성 계통을 생성하기 위해 상부 생성 세포풀에 FACS-기반 단일 세포 클로닝이 실시될 수 있다. 7.5g/ℓ 배양물 초과의 생성물 역가에 대응하는 50pg 또는 100pg/세포/일 초과의 구체적 생산성이 사용될 수 있다. 단일 세포 클론에 의해 생성된 항체는 또한 탁도, 여과 특성, PAGE, IEF, UV 스캔, HP-SEC, 탄수화물-올리고당 맵핑, 질량 스펙트럼 및 결합 분석, 예컨대 ELISA 또는 비아코어(Biacore)에 대해 시험될 수 있다. 이어서, 선택된 클론은 다중 바이알에 보관되고, 후속 사용을 위해 냉동저장될 수 있다.

[0160] 일단 발현되면, 항체는 단백질 A 포획, HPLC 정제, 칼럼 크로마토그래피, 젤 전기영동 등을 포함하는 당업계의 표준 절차에 따라 정제될 수 있다(일반적으로, 문헌[Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)] 참조).

[0161] 코돈 최적화, 프로모터의 선택, 전사 요소의 선택, 종결자의 선택, 무혈청 단일 세포 클로닝, 세포 보관(cell

banking), 복제 수의 증폭을 위한 선택 마커의 사용, CHO 종결자, 또는 단백질 역가의 개선을 포함하는 항체의 상업적 생산을 위한 방법이 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,786,464호; 미국 특허 제6,114,148호; 미국 특허 제6,063,598호; 미국 특허 제7,569,339호; WO2004/050884; WO2008/012142; WO2008/012142; WO2005/019442; WO2008/107388; WO2009/027471; 및 미국 특허 제5,888,809호 참조).

[0162] H. 항체 선별 분석

[0163] 항체는 결합 분석, 기능적 선별, TTR 침착과 관련된 질환의 동물 모델에서의 선별 및 임상 시험을 포함하는 몇몇 선별이 실시될 수 있다. 결합 분석은 특이적 결합 및 선택적으로, 단량체 TTR 또는 이의 단편에 대한 친화도 및 에피토프 특이성에 대해 시험한다. 예를 들어, 결합 분석은 천연 TTR 사량체에 문하고, TTR 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태로 노출된 에피토프인, TTR의 아미노산 잔기 89 내지 97(서열번호 42)에 결합하는 항체를 선별할 수 있다. 항체는 또한 TTR 및 TTR 아밀로이드 피브릴의 프레-피브릴, 비천연 입체배좌에 결합하지만, 천연 TTR 입체배좌에 결합하지 않는 능력에 대해 선별될 수 있다. 예를 들어, 항체는 천연 사량체 TTR의 해리 또는 분리에 의해 생성된 TTR의 단량체 형태에 결합하는 능력에 대해 선별될 수 있고, 실시예 또는 다른 곳에 기재된 천연 사량체 TTR에 대해 반대선별(counter-screened)될 수 있다. 마찬가지로, 항체는 또한 TTR-매개 아밀로이드증 조직에 대한 그들의 면역반응성에 대해 선별될 수 있지만, 건강한 조직에 대해서는 그렇지 않다. 이러한 선별은 때때로 예시적인 항체, 예컨대 6C1의 가변 영역을 갖는 항체 또는 IgG1 카파 아이소타입과 경쟁적으로 수행된다. 선택적으로, 항체 또는 TTR 표적은 이러한 분석에서 고정된다.

[0164] 기능성 분석은 TTR을 자연적으로 발현시키는 세포를 포함하는 세포 모델에서 수행될 수 있거나 또는 TTR 또는 이의 단편을 암호화하는 DNA로 형질감염된다. 적합한 세포는 TTR 아밀로이드 생성에 의해 영향받는 심장 조직 또는 다른 조직으로부터 유래된 세포를 포함한다. 세포는 피브릴 감소된 수준의 TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태(예를 들어, 세포 추출물 또는 상청액의 웨스턴 블로팅 또는 면역침전법에 의해) 또는 TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태에 기인할 수 있는 감소된 독성에 의해 선별될 수 있다. 예를 들어, 항체는 TTR의 응집을 저해 또는 감소시킬 수 있거나, TTR 피브릴 형성을 저해 또는 감소시킬 수 있거나, TTR 침착을 감소시키거나, 응집된 TTR을 클리어런스하거나, 또는 TTR의 비독성 입체배좌를 안정화시키는 능력에 대해 시험될 수 있다.

[0165] 항체가 용액 중의 단량체 TTR 또는 미스풀딩된 TTR 중간체가 항체와 접촉될 때 항체가 TTR 피브릴 형성을 방해 또는 감소시킬 수 있는지 여부를 시험하는 것과 같은 다른 기능성 분석이 용액 중에서 수행될 수 있다. 피브릴 형성 정도는, 예를 들어, 온도 제어 유닛을 구비한 UV-가시광선 분광계 상의 400nm에서 탁도 측정에 의해 프로빙될 수 있다. 티오플라빈-T는 또한 아밀로이드 피브릴 형성 정도를 평가하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 5배 몰 과량의 티오플라빈-T는 TTR 샘플에 첨가될 수 있고, 측정하기 전 30분 동안 실온에 남겨둔다. 티오플라빈-T 형광은 분광 형광계를 이용하여 모니터링될 수 있다. 미국 특허 제2014/0056904호 참조.

[0166] 동물 모델은 TTR 또는 TTR 침착물의 축적과 관련된 인간 질환을 시뮬레이션하는 동물 모델에서 정후 또는 증상을 치료적 또는 예방적으로 치료하는 항체의 능력을 선별 시험한다. 이러한 질환은 TTR 아밀로이드증의 유형, 예컨대 노인성 전신 아밀로이드증(SSA), 노인성 심장 아밀로이드증(SCA), 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP), 가족성 아밀로이드 심근증(FAC) 및 중추 신경계 선택적 아밀로이드증(CNSA)을 포함한다. 모니터링될 수 있는 적합한 정후 또는 증상은 다양한 조직, 예컨대 위장관 또는 심장에서 아밀로이드 침착물의 존재 또는 정도를 포함한다. 아밀로이드 침착물의 감소 정도는 적절한 대조군, 예컨대 대조군 항체(예를 들어, 아이소타입 매칭 대조군 항체), 위약 또는 전혀 처리 없음을 받은 대조군 동물에서의 TTR 아밀로이드 침착물의 수준에 비교하여 결정될 수 있다. TTR 아밀로이드증에 대한 활성을 시험하기 위한 예시적인 동물 모델은 가족성 아밀로이드성 말초신경병증과 관련된 V30M 돌연변이를 포함하는 내인성 마우스 *Ttr* 좌위 및 인간 돌연변이체 TTR 유전자에서 삭제 돌연변이를 운반하는 마우스 모델이다. 예를 들어, 문헌[Kohno *et al.*, *Am. J. Path.* 150(4):1497-1508 (1997); Cardoso and Saraiva, *FASEB J* 20(2):234-239 (2006)] 참조. TTR 아밀로이드증의 가족성 형태에 대한 다른 모델 및 TTR 아밀로이드증의 산발적 형태에 대한 모델을 포함하는 유사한 모델이 또한 존재한다. 예를 들어, 문헌[Teng *et al.*, *Lab. Invest.* 81(3): 385-396 (2001); Ito and Maeda, *Mouse Models of Transthyretin Amyloidosis*, *in Recent Advances in Transthyretin Evolution, Structure, and Biological Functions*, pp. 261-280 (2009) (Springer Berlin Heidelberg)] 참조. 유전자 이식 동물은 인간 TTR 이식유전자, 예컨대 TTR 아밀로이드증과 관련된 돌연변이를 갖는 TTR 이식유전자 또는 야생형 TTR 이식유전자를 포함할 수 있다. 동물 모델에서의 시험을 용이하게 하기 위해, 동물 모델에 적절한 불변 영역을 갖는 키메라 항체가 사용될 수 있다(예를 들어, 마우스-래트 키메라는 래트에서 항체를 시험하기 위해 사용될 수 있었다). 대응하는 마우스 항체 또는 키메라 항체가 적절한 동물 모델에서 효과적이고, 인간화 항체가 유사한 결합 친화도를 가진다면 항체의

인간화된 형태는 (예를 들어, 실험 오차 내에서, 예컨대 1.5, 2 또는 3배만큼) 효과적일 것이라는 결론을 내릴 수 있다.

[0167] 임상 시험은 TTR 아밀로이드증과 관련된 질환을 갖는 인간에서의 안전성 및 효능에 대해 시험한다.

I. 핵산

[0169] 본 발명은 추가로 상기 기재한 임의의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 핵산(예를 들어, 서열번호 4 내지 9, 16 및 17)을 제공한다. 선택적으로, 이러한 핵산은 추가로 신호 펩타이드를 암호화하고, 불변 영역에 연결된 신호 펩타이드(예를 들어, 각각 서열번호 49(중쇄) 및 각각 51(경쇄)에 의해 암호화될 수 있는 서열번호 50(중쇄) 및 52(경쇄)의 아미노산 서열을 갖는 신호 펩타이드)에 의해 발현될 수 있다. 핵산의 암호 서열은 암호 서열의 발현을 보장하기 위해 조절 서열, 예컨대 프로모터, 인핸서, 리보솜 결합 부위, 전사 종결 신호 등과 작동 가능하게 연결될 수 있다. 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 핵산은 단리된 형태로 생길 수 있거나 또는 하나 이상의 벡터로 클로닝될 수 있다. 핵산은, 예를 들어, 중첩 올리고뉴클레오타이드의 고체상 합성 또는 PCR에 의해 합성될 수 있다. 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 핵산은 하나의 인접한 핵산으로서, 예를 들어 발현 벡터 내에 결합될 수 있거나, 또는 예를 들어 각각 그 자신의 발현 벡터로 분리될 수 있다.

J. 컨쥬케이팅된 항체

[0171] TTR의 병원성 형태로 노출되지만 TTR의 천연 사량체 형태, 예컨대 TTR의 아미노산 잔기 89 내지 97(서열번호 42에는 노출되지 않은 항원에 특이적으로 결합하는 컨쥬케이팅된 항체는 TTR의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태의 존재를 검출하거나; TTR 아밀로이드증으로 진단된 환자를 치료하기 위해 사용 중인 치료제의 효능을 모니터링 및 평가하거나; TTR의 응집을 저해 또는 감소시키거나; TTR 피브릴 형성을 저해 또는 감소시키거나; TTR 침착을 감소 또는 클리어런스하거나; TTR의 비독성 입체배좌를 안정화시키거나; 또는 환자에서 TTR 아밀로이드증을 치료하거나 또는 예방을 달성하는 데 유용하다. 예를 들어, 이러한 항체는 다른 치료적 모이어티, 다른 단백질, 다른 항체 및/또는 검출 가능한 표지와 컨쥬케이팅될 수 있다. WO 03/057838; 미국 특허 제 8,455,622호.

[0172] 컨쥬케이팅된 치료적 모이어티는 환자에서의 원치않는 병태 또는 질환, 예컨대 TTR 아밀로이드증을 치료하거나, 방지하거나, 좋아지게 하거나 또는 개선시키기 위해 사용될 수 있는 임의의 제제일 수 있다. 치료적 모이어티는, 예를 들어, 항체의 활성을 용이하게 하거나 또는 향상시키는 면역조절제 또는 임의의 생물학적 활성제를 포함할 수 있다. 면역조절제는 면역학적 반응의 발생 또는 유지를 자극하거나 또는 저해하는 임의의 제제일 수 있다. 이러한 치료적 모이어티가 TTR의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태에 대해 특이적인 항체, 예컨대 본 명세서에 기재된 항체에 결합된다면, 결합된 치료적 모이어티는 TTR의 천연 사량체 형태 이상으로 TTR의 비천연, 병원성 형태에 대해 특이적인 친화도를 가질 것이다. 결과적으로, 컨쥬케이팅된 항체의 투여는 주위의 정상, 건강한 조직에 대해 최소로 손상시키면서 TTR의 병원성 형태를 포함하는 조직을 직접 표적화한다. 이는 그들 자신에 대해 투여되기에 너무 독성인 치료적 모이어티에 대해 특히 유용할 수 있다. 추가로, 더 소량의 치료적 모이어티가 사용될 수 있다.

[0173] 적합한 치료적 모이어티의 예는 TTR 수준을 감소시키거나, TTR의 천연 사량체 구조를 안정화시키거나, TTR의 응집을 저해하거나, TTR 피브릴 또는 아밀로이드 형성을 방해하거나, 또는 세포 독성을 없애는 약물을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Almeida and Saraiva, *FEBS Letters* 586:2891-2896 (2012); Saraiva, *FEBS Letters* 498:201-203 (2001); Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013); Ruberg and Berk, *Circulation* 126:1286-1300 (2012); 및 Johnson *et al.*, *J. Mol. Biol.* 421(2-3):185-203 (2012)] 참조. 예를 들어, 항체는 타파미디스, 디플루니실, ALN-TTR01, ALNTTR02, ISIS-TTTRRx, 독시사이클린(독시), 타우로우르소데옥시콜산(TUDCA), 독시-TUDCA, 에피갈로카테킨 갈레이트(EGCG), 쿠르쿠민 또는 레스베라트롤(3,5,4'-트라이하이드록시스틸벤)에 컨쥬케이팅될 수 있다. 다른 대표적인 치료적 모이어티는 TTR 아밀로이드증 또는 TTR 아밀로이드증의 증상의 치료, 관리 또는 개선에 유용한 것으로 알려진 다른 제제를 포함한다. 예를 들어, TTR 아밀로이드증의 통상적인 임상적 증상 및 해당 증상을 치료하기 위해 사용되는 전형적인 제제에 대해 문헌[Ando *et al.*, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013)] 참조.

[0174] 항체는 또한 다른 단백질과 결합될 수 있다. 예를 들어, 항체는 파이노머(Fynomer)와 결합될 수 있다. 파이노머는 인간 Fyn SH3 도메인으로부터 유래된 작은 결합 단백질(예를 들어, 7kDa)이다. 그들은 안정하고 가용성일 수 있고, 그들은 시스테인 잔기 및 이황화 결합이 없을 수 있다. 파이노머는 항체와 동일한 친화도 및 특이성을 지니는 표적 분자에 결합하도록 조작될 수 있다. 그들은 항체에 기반하여 다중 특이적 융합 단백질을 생성하는 데

적합하다. 예를 들어, 파이노머는 상이한 구조를 지니는 이중 및 삼중 특이성 FynomAb를 생성하기 위해 항체의 N-말단 및/또는 C-말단 끝에 융합될 수 있다. 파이노머는 최적의 특성을 지니는 파이노머의 효율적인 선택을 허용하는 FACS, 비아코어 및 세포 기반 분석을 이용하는 선별 기법을 통해 파이노머 라이브러리를 이용하여 선택될 수 있다. 파이노머의 예는 문헌[Grabulovski *et al.*, *J. Biol. Chem.* 282:3196-3204 (2007); Bertschinger *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* 20:57-68 (2007); Schlatter *et al.*, *Mabs.* 4:497-508 (2011); Banner *et al.*, *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69(Pt6):1124-1137 (2013); 및 Brack *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 13:2030-2039 (2014)]에 개시되어 있다.

[0175] 본 명세서에 개시된 항체는 또한 (예를 들어, 항체 헤테로컨쥬케이트를 형성하기 위해) 하나 이상의 다른 항체에 결합 또는 컨쥬케이팅될 수 있다. 이러한 다른 항체는 TTR 또는 이의 일부 내에서 상이한 애피토프에 결합될 수 있거나 또는 상이한 표적 항원에 결합할 수 있다.

[0176] 항체는 또한 검출 가능한 표지와 결합될 수 있다. 이러한 항체는, 예를 들어, TTR 아밀로이드증을 진단하기 위해, TTR 아밀로이드증의 진행을 모니터링하기 위해, 그리고/또는 치료 효능을 평가하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 항체는 TTR 아밀로이드증을 갖거나 또는 여지가 있는 대상체에서, 또는 이러한 대상체로부터 얻은 적절한 생물학적 샘플에서 이러한 결정을 수행하는 데 특히 유용하다. 인간화된 6C1 항체에 결합되거나 또는 연결될 수 있는 대표적인 검출 가능한 표지는 다양한 효소, 예컨대 겨자무과산화효소, 알칼리 포스파타제, 베타-갈اكت 시다제 또는 아세틸콜린에스터라제; 보결분자단, 예컨대 스트렙타비딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴; 형광 물질, 예컨대 웜벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 아이소티오사이아네이트, 로다민, 디아클로로트라이아진 일아민 플루오레세인, 염화단실 또는 피코에리트린; 발광 물질, 예컨대 루미놀; 생발광 물질, 예컨대 루시퍼라제, 루시페린 및 아에쿠오린; 방사성 물질, 예컨대 이트륨⁹⁰(90Y), 방사성 은-111, 방사성 은-199, 비스무트²¹³, 아이오딘(¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I,), 탄소(¹⁴C), 황(⁵S), 삼중수소(³H), 인듐(¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In,), 테크네튬(⁹⁹Tc), 탈륨(²⁰¹Ti), 갈륨(⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), 팔라듐(¹⁰³Pd), 몰리브데넘(⁹⁹Mo), 제논(¹³³Xe), 플루오린(¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn 및 ¹¹⁷Tin; 다양한 양전자 방출 단층촬영을 이용하는 양전자 방출 물질; 비방사성 상자성 금속 이온; 및 방사성표지되거나 또는 특정 방사성동위원소에 컨쥬케이팅된 분자를 포함한다.

[0177] 항체에 대한 방사성동위원소의 결합은 통상적인 2작용성 킬레이트에 의해 수행될 수 있다. 방사성 은-111 및 방사성 은-199 결합을 위해, 황 기반 링커가 사용될 수 있다. 문헌[Hazra *et al.*, *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994)] 참조. 은 방사성동위원소의 결합은 아스코르브산을 이용하여 면역글로불린을 감소시키는 단계를 수반할 수 있다. 방사성동위원소, 예컨대 111In 및 90Y에 대해, 이브리투모맙 튜세탄이 사용될 수 있고, 각각 111In-이브리투모맙 튜세탄 및 90Y-이브리투모맙 튜세탄을 형성하기 위해 이러한 동위원소와 반응할 것이다. 문헌[Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95 (2001)] 참조.

[0178] 치료적 모이어티, 다른 단백질, 다른 항체 및/또는 검출 가능한 표지는 당업계에 공지된 기법을 이용하여 뮤린, 키메라, 베니어 또는 인간화된 6C1 항체에 직접적으로 또는 중간체(예를 들어, 링커)를 통해 간접적으로 결합되거나 또는 컨쥬케이팅될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery," in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985); and Thorpe *et al.*, *ImmunoL. Rev.*, 62:119-58 (1982)] 참조. 적합한 링커는, 예를 들어, 절단 가능한 및 비-절단 가능한 링커를 포함한다. 산성 또는 환원성 조건 하에서, 특정 프로테아제에 대한 노출 시 또는 다른 정해진 조건 하에서 결합된 치료적 모이어티, 단백질, 항체 및/또는 검출 가능한 표지를 방출하는 상이한 링커가 사용될 수 있다.

V. 치료적 용도

[0179] 상기 항체는 트랜스타이래틴(TTR)에 의해, 특히 TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태에 의해 적어도

부분적으로 매개된 질환을 갖거나 또는 질환에 대한 위험에 있는 환자에서 질환을 치료하거나 또는 예방을 달성하기 위해 사용될 수 있다. 메커니즘의 이해가 실행을 위해 필요하지는 않지만, 임의의 또는 모든 다음의 메커니즘은 상기 항체를 이용하는 TTR 아밀로이드증의 치료에 기여할 수 있는 것으로 여겨진다: TTR 응집 및 피브릴 형성의 항체-매개 저해, TTR의 비독성 입체배좌의 항체-매개 안정화(예를 들어, 사량체 형태), 또는 응집된 TTR, 올리고머 TTR 또는 단량체 TTR의 항체-매개 클리어런스. 항체-약물 컨쥬게이트는 컨쥬게이팅된 모이어티에 의해 결정되는 추가적인 작용 메커니즘을 가질 수 있다.

[0181] 항체는 개시를 지연시키고/시키거나 중증도를 감소시키고/시키거나, 추가적인 악화를 저해하고/하거나 치료 중인 장애의 적어도 하나의 정후 또는 증상을 개선시키는 투약량, 투여 경로 및 투여 빈도를 의미하는 유효한 요법으로 투여된다. 환자가 이미 장애로 고통받고 있다면, 요법은 치료적으로 유효한 요법으로서 지칭될 수 있다. 환자가 아직 증상을 경험하지는 않았지만 일반적인 집단에 비해 장애의 상승된 위험에 있다면, 요법은 예방적으로 유효한 요법으로서 지칭될 수 있다. 일부 예에서, 치료적 또는 예방적 효능은 동일한 환자에서의 이력 조절 또는 과거의 경험에 비교하여 개개 환자에서 관찰될 수 있다. 다른 예에서, 치료적 또는 예방적 효능은 비치료 환자의 대조군 집단에 비해 처리 환자의 집단에서의 전임상 또는 임상 시험에서 입증될 수 있다.

[0182] 투여 빈도는 인자들 중에서도 순환 시 항체의 반감기, 환자의 병태 및 투여 경로에 의존한다. 빈도는 환자의 병태 또는 치료 중인 장애의 진행에 반응하여 매일, 매주, 매달, 분기별, 또는 비정기적 간격일 수 있다. 정맥내 투여의 예시적인 빈도는 다수 빈번한 투약이 또한 가능하지만, 치료의 지속적 원인에 따라 매주와 분기별 사이이다. 피하 투여를 위해, 예시적인 투약 빈도는 다소 빈번한 투약이 또한 가능하지만, 매일 내지 매달이다.

[0183] 투여되는 투약량의 수는 장애가 급성 또는 만성인지의 여부, 치료에 대한 장애의 반응에 의존한다. 급성 장애 또는 만성 장애의 급성 악화에 대해, 1 내지 10회의 용량이 종종 충분하다. 때때로 선택적으로 분할된 형태의 단일 볼루스 용량은 급성 장애 또는 만성 장애의 급성 악화에 충분하다. 치료는 급성 장애 또는 급성 악화의 재발을 위해 반복될 수 있다. 만성 장애에 대해, 항체는 정기적 간격으로, 예를 들어, 적어도 1, 5 또는 10년 동안, 또는 환자의 수명 동안 매주, 40일마다, 매달, 분기별로, 6개월마다 투여될 수 있다.

VI. 약제학적 조성물 및 사용 방법

[0185] 본 명세서에서 트랜스타이레틴(TTR)에 의해, 특히 TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태(예를 들어, TTR 아밀로이드증)에 의해 적어도 부분적으로 매개된 질환 또는 병태를 진단, 모니터링, 치료하거나 또는 예방을 달성하는 몇몇 방법이 제공된다. 이러한 질환의 예는 가족성 TTR 아밀로이드증, 예컨대 가족성 아밀로이드 심근증(FAC), 가족성 아밀로이드성 다발신경병증(FAP) 또는 중추 신경계 선택적 아밀로이드증(CNSA) 및 산발적 TTR 아밀로이드증, 예컨대 노인성 전신 아밀로이드증(SSA) 또는 노인성 심장 아밀로이드증(SCA)을 포함한다. 상기 기재한 항체는 이러한 방법에서 사용하기 위해 약제학적 조성물을 내로 혼입될 수 있다. 일반적으로, 항체 또는 항체를 함유하는 약제학적 조성물은 이들의 투여가 필요한 대상체에게 투여된다. 치료 받을 수 있는 환자는 TTR 아밀로이드증의 위험에 있지만, 증상을 나타내지 않는 개체뿐만 아니라 현재 증상을 나타내는 환자를 포함한다. 일부 환자는 TTR 아밀로이드증의 전구증상 단계 동안 치료될 수 있다.

[0186] 약제학적 조성물은 TTR 아밀로이드증의 알려진 유전적 위험을 갖는 개체에 대해 예방적으로 투여될 수 있다. 이러한 개체는 이러한 질환을 경험한 친척이 있는 개체, 및 위험이 본 명세서에 제공된 진단 방법을 이용하는 것을 포함하는 유전적 또는 생화학적 마커(예를 들어, TTR 아밀로이드증과 관련된 TTR의 돌연변이)의 분석에 의해 결정되는 개체를 포함한다. 예를 들어, TTR 아밀로이드증에 연루된 TTR을 암호화하는 유전자에서 100개 초과의 돌연변이가 있다. 예를 들어, 미국 특허 제2014/0056904호; 문헌[Saraiva, *Hum. Mutat.* 17(6):493-503 (2001); Damas and Saraiva, *J. Struct. Biol.* 130:290-299; Dwulet and Benson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:657-662 (1983)] 참조.

[0187] TTR 아밀로이드증으로 고통 받고 있는 개체는 때때로 다음 중 하나 이상을 포함하는 TTR 아밀로이드증의 임상 정후로부터 인식될 수 있다: (1) 특히 심부전과 관련된 신경병 질환의 가족력; (2) 알려지지 않은 병인의 신경 병 통증 또는 진행성 감각 장애; (3) 분명한 원인이 없는 손목 터널 증후군(특히 그것이 양쪽이며 수술적 복구를 필요로 한다면); (4) 알려지지 않은 병인의 위장 운동성 장애 또는 자율성 신경 기능장애(예를 들어, 발기 성 기능장애, 기립성 저혈압, 신경인성 방광); (5) 고혈압 없이 두꺼워진 심실벽을 특징으로 하는 심장 질환; (6) 특히 두꺼워진 심장을 수반할 때 알려지지 않은 유래의 진행된 방실계 차단; 및 (6) 솜털 유형의 유리체 포함. 문헌[Ando et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013)] 참조. 그러나, TTR 아밀로이드증의 최종적 진단은 전형적으로 표적 기관 생검, 다음에 아밀로이드-특이적 염료, 콩고 레드에 의한 절단 조직의 조직학적 염색에 의존한다. 아밀로이드에 대한 양성 검사가 관찰된다면, 아밀로이드 형성을 초래하는 전구체 단백

질이 사실 TTR이라는 것을 보장하기 위해 TTR에 대한 면역조직학적 염색이 후속적으로 수행된다. 질환의 가족성 형태에 대해, 이어서, 최종적 진단이 이루어질 수 있기 전에 TTR을 암호화하는 유전자에서 돌연변이의 입증이 필요하다.

- [0188] 대상체의 동정은 임상 환경에서, 또는 그 밖에, 예컨대 대상체의 집에서, 예를 들어, 대상체 자신의 자가 시험 키트의 사용을 통해 일어날 수 있다. 예를 들어, 대상체는 다양한 증상, 예컨대 밀초신경병증(감각 및 운동), 자율 신경병증, 위장관 장애, 심근병증, 신경병증 또는 안구 침착에 기반하여 동정될 수 있다. 문헌[Ando et al., *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013)] 참조. 대상체는 또한 실시예에 개시하는 바와 같이 대조군 샘플에 비해 대상체로부터의 혈장 샘플에서 TTR의 비천연 형태의 증가된 수준에 의해 동정될 수 있다.
- [0189] 가족력, 유전자 검사, 또는 TTR 아밀로이드증에 대한 의학적 선별에 의해 보장되는 바와 같이, 치료는 임의의 연령에 시작할 수 있다(예를 들어, 20, 30, 40, 50, 60 또는 70세). 치료는 전형적으로 시간 기간에 걸쳐 다회 투약량을 수반하고, 시간에 따라 치료제(예를 들어, 아미노산 잔기 89 내지 97을 포함하는 TTR의 절단된 형태)에 대한 항체 또는 활성화된 T-세포 또는 B-세포를 분석함으로써 모니터링될 수 있다. 반응이 떨어진다면, 부스터 투약량이 표시된다.
- [0190] 예방적 용도에서, 항체 또는 이의 약제학적 조성물은 위험을 감소시키거나, 중증도를 줄이거나 또는 질환의 적어도 하나의 징후 또는 증상의 개시를 지연시키는 데 유효한 요법(투여 용량, 빈도 및 경로)에서 질환(예를 들어, TTR 아밀로이드증)에 걸리기 쉽거나 또는 달리 위험에 있는 대상체에게 투여된다. 치료적 용도에서, 항체 또는 항체를 유도하기 위한 면역원은 질환의 적어도 하나의 징후 또는 증상을 개선시키거나 또는 징후 또는 증상의 추가적인 악화를 저해하는 데 유효한 요법(투여 용량, 빈도 및 경로)에서 질환(예를 들어, TTR 아밀로이드증)의 여지가 있거나, 또는 이미 질환으로 고통받고 있는 대상체에게 투여된다.
- [0191] 요법은 개개의 치료되는 대상체가 본 명세서에 개시된 방법에 의해 치료되지 않은 비슷한 대상체의 대조군 집단에서의 평균 결과보다 더 바람직한 결과를 달성한다면, 또는 더 바람직한 결과가 통제 임상 시험에서의 대조군 대상체(예를 들어, II상, II/III 상 또는 III 상 시험) 또는 $p < 0.05$ 또는 0.01 또는 심지어 0.001 수준에서의 동물 모델에 비교한 처리 대상체에서의 요법에 대해 입증된다면 치료적 또는 예방적으로 유효한 것으로 고려된다.
- [0192] 항체의 유효 요법은, 예를 들어, TTR 축적과 관련된 병태가 있거나 또는 병태의 위험에 있는 대상체에서 TTR의 응집을 저해 또는 감소시키기 위해; TTR 축적과 관련된 병태가 있거나 또는 병태의 위험에 있는 대상체에서 TTR 피브릴 형성을 저해 또는 감소시키기 위해; TTR 축적과 관련된 병태가 있거나 또는 병태의 위험을 갖는 대상체에서 TTR 침착물 또는 응집된 TTR을 감소 또는 클리어런스하기 위해; TTR 축적과 관련된 병태가 있거나 또는 또는 병태의 위험을 갖는 대상체에서 TTR의 비독성 입체배좌를 안정화시키기 위해; TTR 축적과 관련된 병태가 있거나 또는 또는 병태의 위험을 갖는 대상체에서 TTR 응집, 피브릴 또는 침착물의 독성 효과를 저해하기 위해; 아밀로이드 축적을 포함하는 것으로 의심되는 조직에서 TTR 아밀로이드 축적의 존재 또는 부재를 진단하기 위해; 항체의 투여 후 대상체에서 결합된 항체의 존재를 검출함으로써 대상체에서 TTR 침착물의 수준을 결정하기 위해; 대상체에서 TTR의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태의 존재를 검출하기 위해; TTR 아밀로이드 증으로 진단된 환자를 치료하기 위해 사용 중인 치료제의 효능을 모니터링 및 평가하기 위해; 대상체에서 TTR에 대한 항체를 포함하는 면역반응을 유발하기 위해; 대상체에서 TTR 아밀로이드 축적과 관련된 병태의 개시를 지연시키기 위해; 또는 환자에서 TTR 아밀로이드증을 치료하거나 또는 예방을 달성하기 위해 사용될 수 있다.
- [0193] 유효 용량은 다수의 상이한 인자, 예컨대 투여 수단, 표적 부위, 대상체의 생리학적 상태, 대상체가 인간 또는 동물인지의 여부, 투여되는 다른 의약, 및 치료가 예방적 또는 치료적인지의 여부에 따라 다르다.
- [0194] 항체에 대한 예시적인 용량 범위는 고정된 투약량으로서 약 0.1 내지 20, 또는 0.5 내지 5mg/kg 체중(예를 들어, 0.5, 1, 2, 3, 4 또는 5mg/kg) 또는 10 내지 1500mg일 수 있다. 투약량은 인자들 중에서도 환자의 병태 및 선행 치료에 대한 반응, 만약에 있다면, 치료가 예방적인지 또는 치료적인지의 여부 및 장애가 급성 또는 만성인지의 여부에 의존한다.
- [0195] 항체는 매일, 격일로, 매주, 격주, 매달, 분기별로 또는 경험적 분석에 의해 결정되는 임의의 다른 스케줄에 따라 이러한 용량이 투여될 수 있다. 예시적인 치료는 장기간, 예를 들어, 적어도 6개월에 걸쳐 다회 용량으로의 투여를 수반한다. 추가적인 예시적인 치료 요법은 2주마다 1회 또는 1개월에 1회 또는 3 내지 6개월마다 1회 투여를 수반한다.
- [0196] 항체는 주변 경로를 통해 투여될 수 있다. 투여 경로는 국소, 정맥내, 경구, 피하, 동맥내, 두개내, 척추강내,

복강내, 비강내 또는 근육내를 포함한다. 항체의 투여를 위한 경로는 정맥내 또는 피하일 수 있다. 정맥내 투여는, 예를 들어, 30 내지 90분과 같은 기간에 걸친 주입에 의할 수 있다. 이 주사 유형은 가장 전형적으로는 팔 또는 다른 근육에서 수행된다. 일부 방법에서, 제제는 침착물이 축적되는 특정 조직 내로 직접적으로 주사된다(예를 들어 두개내 주사).

[0197] 비경구 투여를 위한 약제학적 조성물은 멸균 및 실질적으로 등장성(250 내지 350mOsm/kg 물)이고, GMP 조건 하에 제조된다. 약제학적 조성물은 단위 용량 형태로(즉, 단일 투여를 위한 용량) 제공될 수 있다. 약제학적 조성물은 하나 이상의 생리적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 보조제를 이용하여 제형화될 수 있다. 제형은 선택된 투여 경로에 의존한다. 주사를 위해, 항체는 (주사 부위에서 불편함을 감소시키기 위해) 수용액 중에서, 예를 들어 생리적으로 적합한 완충제, 예컨대 헤크스 용액, 링거 용액 또는 생리 식염수 또는 아세트산염 완충제 중에서 제형화될 수 있다. 용액은 제형화제, 예컨대 혼탁제, 안정제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 대안적으로 항체는 사용 전에 적합한 비허클, 예를 들어 멸균 무발열원 수를 이용하는 구성을 위해 동결건조 형태일 수 있다.

[0198] 요법은 치료 중인 질환의 치료 또는 예방에서 유효한 다른 제제와 병용하여 투여될 수 있다. 이러한 제제는 TTR의 발현을 저해하기 위한 siRNA 또는 빈다켈(Vyndaqel), 사랑체 형성에서 TTR의 안정제를 포함할 수 있다.

[0199] 치료 후에, 대상체의 형태는 이러한 치료의 진행 또는 효능을 결정하기 위해 평가될 수 있다. 이러한 방법은 바람직하게는 TTR 아밀로이드 수준 또는 TTR의 비천연 형태의 수준의 변화에 대해 시험한다. 예를 들어, TTR 아밀로이드 수준은 치료 전에 비슷한 환경 하의 대상체의 TTR 아밀로이드 수준에 대한 개선을 결정하기 위해 평가될 수 있다. 대상체의 TTR 아밀로이드 수준은 또한 비슷한 환경 하의 대조군 집단에 비교될 수 있다. 대조군 집단은 비치료 대상체 또는 정상 비치료 대상체(특히 대조군 대상체)와 유사하게 병으로 고생할 수 있다. 유사하게 병에 걸린, 비치료 대상체에 대한 개선 또는 비치료 정상 대상체의 수준에 접근 또는 도달하는 수준은 치료에 대한 양성 반응을 나타낸다.

[0200] TTR 아밀로이드 수준은 영상화 기법을 포함하는 다수의 방법에 의해 측정될 수 있다. 적합한 영상화 기법의 예는 방사성 표지된 TTR 또는 이의 단편을 이용하는 PET 스캐닝, TTR 항체 또는 이의 단편, 콩고-레드-기반 아밀로이드 영상화제, 예컨대, PIB(미국 특허 제2011/0008255호), 아밀로이드-영상화 웨პ타이드 p31(아밀로이드-영상화 웨პ타이드인 p31의 생체 분포는 콩고 레드 조직 염색에 기반한 아밀로이드 정량화와 상관 관계가 있다, 문헌 [Wall *et al.*, Abstract No. 1573, 2011 ISNM Annual Meeting]), 및 기타 PET 표지를 포함한다. TTR의 비천연 형태 수준은, 예를 들어, 대상체로부터의 혈장 샘플 또는 생검 샘플에 대해 본 명세서에 개시된 항체를 이용하는 SDS-PAGE/웨스턴 블로트 또는 메조 스케일 디스커버리(Meso Scale Discovery) 플레이트 분석을 수행하고, 실시 예에 기재된 바와 같은 대조군 샘플을 비교함으로써 측정될 수 있다.

A. 진단 및 모니터링 방법

[0202] 또한 TTR 침착 또는 TTR의 병원성 형태(예를 들어, TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태)와 관련된 질환으로 고통 받거나 또는 질환에 걸리기 쉬운 환자에서 TTR에 대한 면역 반응을 검출하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 본 명세서에 제공된 제제를 이용하여 치료적 및 예방적 치료 과정을 모니터링하기 위해 사용될 수 있다. 수동 면역화 후에 항체 프로파일은 전형적으로 항체 농도에서 즉각적인 피크 다음에 지수함수형 붕괴를 나타낸다. 추가적인 용량 없이, 붕괴는 투여되는 항체의 반감기에 따라서 며칠 내지 몇 개월의 기간 내에 전처 리 수준에 접근한다. 예를 들어, 일부 인간 항체의 반감기는 대략 20일이다.

[0203] 일부 방법에서, 대상체에서 TTR에 대한 항체의 기준 측정은 투여 전에 이루어지고, 제2 측정은 최대 항체 수준을 결정하기 위해 이후에 곧 이루어지며, 1회 이상의 추가적인 측정이 항체 수준의 붕괴를 모니터링하기 위한 간격으로 이루어진다. 항체 수준이 기준 또는 기준 미만의 피크의 사전결정된 백분율(예를 들어, 50%, 25% 또는 10%)로 감소될 때, 항체의 추가적인 용량의 투여가 투여된다. 일부 방법에서, 피크 또는 배경 미만의 후속적인 측정 수준은 다른 대상체에서 유리한 예방적 또는 치료적 치료 요법을 구성하기 위해 이전에 결정된 기준 수준과 비교된다. 측정된 항체 수준이 기준 수준보다 상당히 더 적다면(예를 들어, 치료가 유리한 대상체 집단에서 기준 값의 평균 - 하나 또는 바람직하게는 두 표준 편차보다 적다면) 항체의 추가적인 용량의 투여가 표시된다.

[0204] 또한, 예를 들어, 대상체로부터의 샘플에서 TTR 아밀로이드 또는 TTR의 병원성 형태(예를 들어, TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태)를 측정함으로써 또는 대상체에서 TTR의 생체내 영상화에 의해 대상체에서 TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태를 검출하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 TTR의 이러한 병원성 형태와 관련된 질환(예를 들어, TTR 아밀로이드증)의 진단, 또는 그에 대한 감수성을 진단하거나 또는 확

인하는 데 유용하다. 상기 방법은 또한 무증상 대상체에 대해 사용될 수 있다. TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태의 존재는 장래의 증상이 있는 질환에 대한 감수성을 나타낸다. 상기 방법은 또한 TTR 아밀로이드증으로 이미 진단된 대상체에서 질환 진행 및/또는 치료에 대한 반응을 모니터링하는 데 유용하다.

[0205] TTR 아밀로이드증을 갖거나, 갖는 것으로 의심되거나 또는 가질 위험에 있는 대상체로부터 얻은 생물학적 샘플은 TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태의 존재를 평가하기 위해 본 명세서에 개시된 항체와 접촉될 수 있다. 예를 들어, 이러한 대상체에서 TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태의 수준은 건강한 대상체에서 존재하는 것에 비교될 수 있다. 대안적으로, 질환에 대한 치료를 받는 이러한 대상체에서 TTR 아밀로이드 또는 TTR의 병원성 형태(예를 들어, TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태) 수준은 TTR 아밀로이드증에 대해 치료되지 않은 대상체의 수준에 비교될 수 있다. 일부 이러한 시험은 이러한 대상체로부터 얻은 조직의 생검을 수반한다. ELISA 분석은 또한, 예를 들어, 유체 샘플에서 TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태의 수준을 평가하기 위한 유용한 방법일 수 있다. 일부 이러한 ELISA 분석은 TTR의 정상 사량체 형태에 비해 TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태에 우선적으로 결합하는 항-TTR 항체를 수반한다.

[0206] 생체내 영상화 방법은 시약, 예컨대 대상체에서 TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태에 결합하는 항체를 투여하고, 이어서, 그것이 결합된 후에 시약을 검출함으로써 작업할 수 있다. 이러한 항체는 전형적으로 TTR의 잔기 89 내지 97 내의 에피토프에 결합한다. 원한다면, 클리어런스 반응은 전장 불변 영역, 예컨대 Fab가 없는 항체 단편을 이용함으로써 회피될 수 있다. 일부 방법에서, 동일한 항체는 치료와 진단 시약 둘 다로서 작용할 수 있다.

[0207] 진단 시약은 대상체의 신체 내로 정맥내 주사에 의해 또는 합리적인 것으로 여겨지는 다른 경로를 통해 투여될 수 있다. 시약의 용량은 치료 방법과 동일한 범위 내이어야 한다. 전형적으로, 일부 방법에서, TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태에 대한 친화도를 지니는 1차 시약은 비표지이며, 2차 표지 시약은 1차 시약에 결합하기 위해 사용되지만, 시약은 표지된다. 표지의 선택은 검출 수단에 따른다. 예를 들어, 형광 표지는 광학 검출에 적합하다. 상자성 표지의 사용은 수술적 개입이 없는 단층 촬영 검출에 적합하다. 방사성 표지는 또한 PET 또는 SPECT를 이용하여 검출될 수 있다.

[0208] 진단은 표지된 좌위의 수, 크기 및/또는 강도를 대응하는 기초선 값과 비교함으로써 수행된다. 기초선 값은 병이 없는 개체 집단에서의 평균값을 나타낸다. 기초선 값은 또한 동일한 대상체에서 결정된 이전의 수준을 나타낼 수 있다. 예를 들어, 기초선 값은 치료를 시작하기 전에 대상체에서 결정될 수 있고, 기초선 값과 비교하여 이후에 값이 측정될 수 있다. 기초선에 대한 값의 감소는 일반적으로 치료에 대한 긍정적 반응을 암시한다.

IX. 키트

[0210] 본 발명은 추가로 본 명세서에 개시된 인간화된 6C1 항체 및 관련된 물질, 예컨대 사용을 위한 설명서(예를 들어, 패키지 삽입물)을 포함하는 키트(예를 들어, 용기)를 제공한다. 사용을 위한 설명서는, 예를 들어, 항체 및 선택적으로 1종 이상의 추가적인 제제의 투여를 위한 설명서를 포함할 수 있다. 항체의 용기는 단위 용량, 벌크 패키지(예를 들어, 다회 용량 패키지) 또는 하위 단위 용량일 수 있다.

[0211] 패키지 삽입물은 이러한 치료적 제품의 지시사항, 용법, 투약량, 투여, 사용 금지 사유 및/또는 사용에 관한 경고에 대한 정보를 포함하는 치료적 제품의 상업적 패키지에 관례적으로 포함되는 설명서를 지칭한다.

[0212] 키트는 또한 약제학적으로-허용 가능한 완충제, 예컨대 주사용 정균수(BWFI), 인산염 완충 식염수, 링거 용액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 포함할 수 있다. 이는 또한 다른 완충제, 희석제, 충전제, 바늘 및 주사기를 포함하는 상업적 및 사용자 견지로부터 바람직한 다른 물질을 포함한다.

X. 다른 용도

[0214] 항체는 연구에서 임상 진단 또는 치료와 관련하여 트랜스타이레틴(TTR), 또는 이의 단편의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체는 생물학적 샘플이 TTR 아밀로이드 침착물을 포함한다는 표시로서 생물학적 샘플 중의 TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태의 존재를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 생물학적 샘플에 대한 항체의 결합은 대조군 샘플에 대한 항체의 결합에 비교될 수 있다. 대조군 샘플 및 생물학적 샘플은 동일한 조직 유래의 세포를 포함할 수 있다. 대조군 샘플 및 생물학적 샘플은 동일한 개체 또는 상이한 개체로부터 그리고 동일한 경우에 또는 상이한 경우에 얻을 수 있다. 원한다면, 다중 생물학적 샘플 및 다중 대조군 샘플은 샘플 간의 차이와 독립적인 무작위 변이에 대한 보호를 위해 다수의 경우에 대해 평가된다. 이어서, 생물학적 샘플(들)에 대한 항체 결합(즉, TTR의 단량체, 미스풀딩, 응집 또는 피브릴 형태의 존재)이 대조군 샘플(들)에 대한 항체 결합과 비교하여 증가되거나, 감소되거나 또는 동일

한지의 여부를 결정하기 위해 생물학적 샘플(들)과 대조군 샘플(들) 간에 직접적인 비교가 이루어질 수 있다. 대조군 샘플(들)에 비해 증가된 생물학적 샘플에 대한 항체의 결합(들)은 생물학적 샘플(들) 중에서 TTR의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태의 존재를 나타낸다. 일부 예에서, 증가된 항체 결합은 통계적으로 유의하다. 선택적으로, 생물학적 샘플에 대한 항체 결합은 대조군 샘플에 대한 항체 결합보다 적어도 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배 또는 100배 더 높다.

[0215] 추가로, 항체는 TTR 아밀로이드증으로 진단된 환자를 치료하기 위해 사용 중인 치료제의 효능을 모니터링 및 평가하기 위해 생물학적 샘플 중의 TTR의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태의 존재를 검출하는 데 사용될 수 있다. TTR 아밀로이드증으로 진단된 환자로부터의 생물학적 샘플은 치료제에 대한 요법을 시작하기 전에 샘플에 대한 항체의 결합에 대한 기준(즉, 샘플 중의 TTR의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태의 존재에 대한 기준)을 확립하기 위해 평가된다. 일부 예에서, 환자로부터의 다중 생물학적 샘플은 치료와 독립적인 기준과 무작위 변이의 측정을 둘 다 확립하기 위해 다수의 경우에 대해 평가된다. 이어서, 치료제는 요법에서 투여된다. 요법은 시간 기간에 걸쳐서 제제의 다회 투여를 포함할 수 있다. 선택적으로, 항체의 결합(즉, TTR의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태의 존재)은 무작위 변이의 측정을 확립하기 위해 그리고 면역요법에 반응하는 경향을 나타내기 위해 환자로부터의 다중 생물학적 샘플에서 다수의 경우에 대해 평가한다. 이어서, 생물학적 샘플에 대한 항체 결합의 다양한 평가를 비교한다. 단지 2회의 평가가 이루어지면, 항체 결합(즉, TTR의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태의 존재)이 두 평가 사이에서 증가되거나, 감소되거나 또는 동일하게 남아있는지의 여부를 결정하기 위해 두 평가 사이의 직접적인 비교가 이루어질 수 있다. 2회 초과의 측정이 이루어지면, 측정은 치료제에 의한 치료 전에 시작하고 요법 과정을 통해 진행되는 시간 과정으로서 분석될 수 있다. 생물학적 샘플에 대한 항체 결합이 감소된 환자에서(즉, TTR의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태의 존재), 치료제는 환자에서의 TTR 아밀로이드증을 치료하는 데 효과적이라는 결론을 내릴 수 있다. 항체 결합의 감소는 통계적으로 유의할 수 있다. 선택적으로, 결합은 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 100%만큼 감소한다. 항체 결합의 평가는 TTR 아밀로이드증의 다른 징후 및 증상을 평가하는 것과 함께 이루어질 수 있다.

[0216] 항체는 또한 TTR의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태 또는 이의 단편을 검출함에 있어서 실험실 연구를 위한 연구 시약으로서 사용될 수 있다. 이러한 용도에서, 항체는 형광 분자, 스핀 표지 분자, 효소 또는 방사성 동위원소로 표지될 수 있고, 검출 분석을 수행하기 위한 모든 필요한 시약과 함께 키트의 형태로 제공될 수 있다. 항체는 또한 TTR의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태, 또는 TTR의 단량체, 미스폴딩, 응집 또는 피브릴 형태의 결합 상대를, 예를 들어, 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하기 위해 사용될 수 있다.

[0217] 항체는 또한 생물학적 샘플에서 TTR의 응집을 저해 또는 감소시키거나, TTR 피브릴 형성을 저해 또는 감소시키거나, TTR 침착 또는 TTR 응집을 감소 또는 클리어런스하거나, 또는 TTR의 비독성 입체배좌를 안정화시키기 위해 사용될 수 있다. 생물학적 샘플은, 예를 들어, 혈액, 혈청, 혈장 또는 조직(예를 들어, 심장, 말초신경계, 자율신경계, 신장, 눈 또는 위장관으로부터의 조직)을 포함할 수 있다. 일부 예에서, TTR 응집, TTR 피브릴 형성 또는 TTR 침착률은 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50% 또는 75%(예를 들어, 10% 내지 75% 또는 30% 내지 70%)만큼 저해 또는 감소된다. 피브릴 형성을 검출하기 위한 분석은 본 명세서의 다른 곳에 기재되어있다. 또한 미국 특허 제2014/0056904호 참조.

[0218] 상기 또는 이하에 인용되는 모든 특허 출원, 웹사이트, 다른 간행물, 수탁번호 등은 각각의 개개 항목이 참조로 포함되기 위해 구체적이고 개별적으로 표시되는 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그들의 전문이 참고로 포함된다. 서열의 상이한 형태가 상이한 시간의 수탁 번호와 관련된다면, 본 출원의 유효한 출원일의 수탁 번호와 관련된 형태를 의미한다. 유효한 출원일은 적용 가능하다면 수탁 번호에 관한 실제 출원일 또는 우선권 출원의 출원일 중 빠른 것을 의미한다. 마찬가지로, 상이한 형태의 간행물, 웹사이트 등이 상이한 시간에 공개된다면, 달리 표시되지 않는 한, 본 출원의 유효한 출원일에 가장 최근에 발행된 형태를 의미한다. 본 발명의 임의의 특징, 단계, 요소, 실시형태 또는 양상은 달리 구체적으로 표시되지 않는 한 임의의 다른 것과 조합하여 사용될 수 있다. 본 발명은 분명함 및 이해의 목적을 위해 예시 및 실시예에 의해 일부 상세하게 기재되었지만, 특정 변화 및 변형이 첨부하는 청구범위의 범주 내에서 실행될 수 있다는 것은 분명할 것이다.

실시예

실시예 1. 미스-TTR 단클론성 항체의 동정

TTR의 단량체, 미스폴딩, 피브릴 또는 응집된 형태(미스-TTR)에 대한 입체배좌적으로-특이적인 단클론성 항체를 물질 및 방법(a 내지 d)에서 기재하는 바와 같이 생성, 선별, 발현 및 정제하였다. 미스-TTR 단클론성 항체를

생성하기 위해, 사량체에 묻혀있지만, 사량체의 단량체 서브유닛으로의 해리 시 노출되는 단백질 영역을 찾도록 인간 사량체 TTR의 결정 구조를 검사하였다. 동정한 영역은 TTR의 F 가닥 내에 위치되고, 사량체 단백질의 이량체 계면에서 격리된 잔기 89 내지 97(EHAEVVFTA)(서열번호 42)이다. 단백질 데이터베이스의 BLAST 검색은 이 서열을 가공하는 임의의 다른 인간 단백질을 나타내지 않았다.

[0222] 이 서열(ggEHAEVVFTAggkg)(서열번호 43)을 포함하는 웨타이드를 합성하였다. 대문자는 TTR의 잔기 89 내지 97을 나타낸다. 소문자는 항원 웨타이드의 용해도를 증가시키고 내부 서열로서 9개의 아미노산 단편을 확인하기 위해 첨가된 추가적인 링커 잔기를 나타낸다. 이 웨타이드는 폴리-라이신 수지상 코어에 연결되어, TTR 89 내지 97 웨타이드에 연결된 다중 가지를 갖는 라이신 잔기의 코어를 포함하는 다중 항원성 웨타이드 면역원(TTR-MAP)을 생성한다. 표 2에 열거된 항체를 TTR-MAP에 대해 생성하였다.

[0223] 이 다중 항원 웨타이드에 추가로, 열쇠구멍 삿갓조개 헤모사이아닌(keyhole limpet hemocyanin)(TTR89-97-N-KLH 및 TTR89-97-C-KLH)에 대한 N- 및 C-말단 시스테인 잔기를 통해 유사한 TTR 89-97 웨타이드(Ac-cggEHAEVVFTA-아마이드(서열번호 44) 및 Ac-EHAEVVFTAcgg-아마이드(서열번호 45))를 공유 결합함으로써 동일한 TTR 단편을 함유하는 두 다른 면역원을 생성하였다.

[0224] 항체 생성, 선별, 발현 및 정제 후에, 상술한 결합 역학 매개변수(결합 속도(k_a), 해리 속도(k_d) 및 결합 친화도 상수(K_D))를 표 2에 나타내는 바와 같이 재조합 인간 TTR F87M/L110M에 대한 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 리드 미스-TTR 항체에 대해 결정하였다. 항-마우스 IgG(GE 헬스케어(GE Healthcare))를 GE 헬스케어 항-마우스 키트에 제공된 지시에 따라 아민 결합을 통해 센서칩 C5(렉스트린 사슬 없음) 상에 고정시키고 나서, 30 내지 50 RU의 분석물의 최대 결합을 보장하기 위한 수준으로 미스-TTR mAb를 포획하였다. 다양한 농도의 분석물(재조합 인간 TTR F87M/L110M)을 3배 희석으로 실행 완충제(HBS + 0.05% P-20, 1mg/ml BSA) 중에서 30 μ l/분으로 포획 리간드에 대해 통과시켰다. 각각의 농도에 대해, 결합 동안 평형상태에 도달될 뿐만 아니라 해리 동안 적어도 10%의 신호가 붕괴되는 더 고농도의 분석물을 허용하는 시간 동안 반응을 진행시켰다. 적어도 하나의 농도(가장 높거나 또는 가장 낮지 않음)를 2회 중복해서 실행하였다. K_D 의 적어도 10배 초과 내지 K_D 의 10배 미만으로 확장하는 예비 실험에 기반하여 분석물의 농도 범위를 선택하였다.

[0225] 리드 미스-TTR mAb의 SPR 분석 결과를 이하의 표 2에 나타낸다.

표 2

인간 TTR(F87M/L110M)에 대한 리드 미스-TTR 항체의 SPR 분석				
mAb	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	R_{max}
9D5	2.715E+4	4.930E-4	1.816E-8	31.55
14G8	2.880E+4	5.358E-4	1.861E-8	27.13
5A1	6.107E+4	4.693E-4	7.684E-9	30.98
6C1	4.607E+4	4.151E-4	9.010E-9	26.32

0227] 실시예 2. TTR 항원에 대한 미스-TTR 항체의 결합

[0228] 4개의 리드 미스-TTR mAb(9D5, 14G8, 6C1 및 5A1)를 코팅 항원으로서 pH4.0-처리 TTR(pH4-TTR)과 천연 TTR을 둘 다 이용하여 0.31 내지 2.5 μ g/ml 범위의 농도에서 ELISA에 의해 분석하였다. TTR 항원 제조 및 ELISA 프로토콜을 물질 및 방법의 다른 곳(e 내지 g)에 기재한다.

[0229] 얻어진 결합 곡선 및 표로 만든 K_d 및 B_{max} 값을 이하의 도 3 및 표 3에 나타낸다. 도 3의 결과를 y-축 상의 임의의 단위(a.u.)에 제시한다. 모든 mAb는 16nM (6C1) 내지 282nM(9D5) 범위의 K_d 값으로 pH4-TTR에 대한 유의한 결합을 나타내었다. pH4-TTR에 대한 결합을 위한 B_{max} 값은 최저 0.65 a.u(14G8) 내지 최고 2.02(9D5)의 범위였다. pH4-TTR에 대한 결합과 대조적으로, 항체 중 어떤 것도 천연 TTR에 대한 유의한 결합을 나타내지 않았는데, 이는 생성된 모든 TTR 항체가 TTR의 비천연 형태에 특이적이라는 것을 나타낸다.

표 3

pH4-TTR에 대한 리드 미스-TTR 항체 결합의 ELISA 분석		
mAb	K_d (nM)	B_{max} (a.u.)

9D5	282	2.02
14G8	108	0.65
6C1	16	1.07
5A1	23	1.61

[0231] 실시예 3. SDS-PAGE 및 천연-PAGE에 의한 미스-TTR 항체의 분석

[0232] 단량체/천연, 비변성 TTR에 대한 TTR의 변성 형태에 대한 결합의 특이성을 입증하기 위해 9D5 및 14G8을 SDS-PAGE/웨스턴에 의해 분석하였다. SDS-PAGE, 천연-PAGE 및 웨스턴 블롯 프로토콜을 방법 및 물질의 다른 곳(h 내지 j)에 기재한다.

[0233] 비변성 TTR 또는 pH4-TTR을 열변성 TTR 및 열변성 pH4-TTR과 함께 SDS-PAGE 겔 상에서 실행하였다. 전기영동 후에, 겔을 나이트로셀룰로스 상에서 웨스턴 블로팅하고 나서, TTR mAb 9D5 및 14G8을 이용하여 염색하였다. 항체를 pH4에서 처리하였을 때 또는 TTR 또는 pH4-TTR을 SDS-PAGE 전에 처음 열변성시켰을 때, 항체는 둘 다 TTR만을 인식하였다. 따라서 이들 9D5 및 14G8은 pH4에서 TTR의 변성에 의해 또는 TTR의 처리에 의해 생성된 TTR 형태이성질체에 대한 특이성을 나타낸다.

[0234] 총 TTR mAb(7G7, 8C3) 및 상업적으로 입수 가능한 시그마(Sigma) 다클론성 항체와 함께 6C1 및 5A1을 또한 SDS-PAGE/웨스턴에 의해 분석하였다. 각각의 블롯은 염색된 분자량 마커, 비변성 TTR 및 pH4-TTR을 포함하였다.

[0235] 염색한 SDS-PAGE 겔은 비변성 TTR에서 존재하는 주요 종이 대략 38kDa 이량체라는 것을 나타내었다. 대조적으로, pH4-TTR 샘플 중에 존재하는 주요 성분은 대략 15kDa 단량체의 소량의 이량체와 대략 35kDa 이량체로서 실행되었다. 이 이량체는 비변성 TTR 샘플 중에 존재하는 이량체보다 약간 소량의 단백질로서 실행되는데, 이는 이들 두 TTR 이량체 종 사이의 입체배좌적 차이를 나타낸다.

[0236] 4개의 미스-TTR 항체를 이용하는 TTR 및 pH4-TTR의 웨스턴 블롯은 이들 mAb가 비변성 TTR을 인식하지 않지만, pH4-TTR 샘플 중에 존재하는 비변성 단량체와 이량체에 둘 다 결합한다는 것을 나타낸다. 따라서, 4개의 미스-TTR mAb(9D5, 14G8, 6C1 및 5A1)은 SDS-PAGE/웨스턴에 의해 분석될 때 TTR의 비천연 입체배좌에 대한 유사한 특이성을 나타낸다.

[0237] 4개의 미스-TTR mAb와 대조적으로, 무손상 TTR을 지니는 마우스의 면역화를 통해 생성된 2개의 TTR 대조군 mAb, 7G7 및 8C3은 사량체 TTR 종을 포함하는 TTR 및 pH4-TTR 샘플 중에 존재하는 모든 TTR 종을 인식하였다. 따라서 미스-TTR mAb와 달리, 이들 대조군 mAb는 TTR에 결합하지만, 입체배좌 특이성은 없었다. 시그마 다클론성 항체는 7G7 및 8C3 대조군 mAb와 유사하게 거동하였다.

[0238] 4개의 미스-TTR mAb가 비변성 겔 조건 하에서 입체배좌 특이성을 나타낼 수 있는지의 여부를 알아보기 위해 TTR 및 pH4-TTR을 또한 천연 겔 상에서 실행하였다. 염색한 천연 PAGE 겔 상에서, TTR은 소량의 사량체와 함께 대략 35kDa 천연 이량체로서 실행하였다. 대조적으로, pH4-TTR은 미량의 대략 35kDa 이량체를 지니는 고분자량 도말로서 주로 실행하였다. 비특이적 시그마 다클론성 항체는 TTR과 pH4-TTR 샘플 둘 다에 존재하는 모든 TTR 종을 인식하였다. 대조적으로, 9D5는 단지 pH4-TTR 샘플 중에 존재하는 고분자량 TTR 종을 인식하였다. SDS-PAGE/웨스턴 연구에서 관찰하는 바와 같이, 9D5는 임의의 TTR 종을 인식하지 않았다.

[0239] 모두 4개의 미스-TTR mAb를 후속적으로 천연-PAGE/웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 예상한 바와 같이 그리고 9D5와 유사하게, 다른 미스-TTR mAbs, 14G8, 6C1 및 5A1은 pH4-TTR 샘플 중에 존재하는 TTR의 고분자량 비천연 형태에 특이적으로 결합하였다. 이를 항체 중 어떤 것도 대략 35kDa 천연 TTR 이량체를 인식하지 못하였다. 이들 결과는 4개의 미스-TTR mAb가 유사하게 거동하고, 천연 TTR과 입체배좌적으로 별개인 비천연 TTR 종만을 인식한다는 것을 나타낸다.

[0240] 실시예 4. 미스-TTR 항체에 의한 TTR 섬유 형성의 저해

[0241] TTR-Y78F는 TTR 사량체를 틸안정화하는 단백질 서열 내 위치 78에서 점 돌연변이를 포함하는 TTR 변이체이다. 시간에 따라 그리고 중간으로 산성인 조건 하에서, 이 TTR 변이체는 그의 단량체 서브유닛으로 해리되고, 이어서 티오플라빈-T에 결합할 수 있는 섬유질을 계속해서 응집하고 형성할 수 있다. 따라서 섬유질 형성 정도는 480nm에서 티오플라빈-T 형광을 측정함으로써 모니터링할 수 있다. 해리된 TTR 단량체 또는 응집물에 특이적인 미스-TTR 항체의 도입은 TTR 섬유질의 조립을 방지하여 항체가 없는 대조군 반응에 비해 티오플라빈-T 형광의 감소를 초래할 것이다. TTR 섬유질 형성의 저해를 시험하기 위한 프로토콜은 물질 및 방법의 다른 곳(k)에 기재

되어 있다.

[0242] 모두 4개의 미스-TTR 항체는 아이소타입 대조군에 비해 티오플라빈-T 반응성 TTR-Y78F 섬유질의 형성을 강하게 저해하였다(결과를 도 4에 나타내며, y-축 상의 임의의 단위(a.u.)로 제시한다). 미스-TTR 항체 5A1은 섬유질 형성을 거의 완전하게 저해하였다. 이들 결과는 미스-TTR 항체가 TTR의 단량체 및/또는 응집된 형태에 결합함으로써, TTR 섬유질의 형성을 방지한다는 생각과 일치된다.

[0243] 표 4는 TTR의 비천연 형태에 대해 양호한 입체배좌적 선택성을 나타낸 4개의 미스-TTR 항체(9D5, 14G8, 6C1 및 5A1)의 세트에 대해 얻은 특성규명 데이터를 요약한다. 이들 항체는 14.5nM(6C1) 내지 257nM(9D5) 범위의 pH4-TTR에 대한 친화도(K_D) 및 0.65 a.u.(14G8) 내지 2.02(9D5) 범위의 B_{max} 값을 가졌다. 이들 항체 중 어떤 것도 천연 TTR을 인식하지 않았지만, SDS-PAGE/웨스턴에 대해 pH4-TTR에 그리고 천연-PAGE/웨스턴에 대해 고분자량 TTR 응집물에 대해 결합하였다. 이들 항체는 또한 판독으로서 티오-T를 이용하는 피브릴 형성 분석에서 TTR 피브릴의 형성을 저해하였다.

표 4

미스-TTR-Y78F mAb 특성규명 요약 표

클론 ID	센드위치 ELISA (pH4-TTR)		웨스턴 블로트			저해% 피브릴 (티오-T)	
	K_D (nM)	B_{max} (OD ₄₅₀ a.u.)	SDS-PAGE		천연 (HMW-TTR)		
			(TTR)	(pH4-TTR)			
9D5	257	2.02	-	+++	+++	83	
14G8	98.7	0.65	-	+++	++	65	
6C1	14.6	1.07	-	+++	+++	72	
5A1	21.3	1.61	-	+++	+++	100	

[0244]

[0245] TTR-V122I은 사량체를 탈안정화시키는 위치 122에서 단일 점 돌연변이를 포함하는 TTR 변이체이다. 피브릴 형성은 ThT 형광의 단조로운 감소에 의해 야기되는 ThT 형광 증가 14G8 mAb의 증가와 관련되는데, 이는 TTR 피브릴화의 아화학량론 저해를 나타낸다($IC_{50}=0.028\pm0.009\text{mg/ml}$; n=3; 도 4B 및 표 4a). 아이소타입 대조군 mAb는 TTR 피브릴화 저해를 야기하지 않았고(도 4C), 따라서 14G8 매개 저해의 특이성을 입증하였다.

[0246] 비슷한 아화학량론 IC_{50} 값이 5A1 및 6C1에 대해 결정되었는데(표 4a) 이는 이들 미스-TTR mAb 각각에 대한 피브릴 저해의 유사한 메커니즘을 시사하였다. 대조적으로, 9D5는 비천연 TTR에 대한 유사한 특이성 및 친화도를 나타냄에도 불구하고 예상치 못하게 TTR-V122I 피브릴 형성을 저해하지 않았다. 이는 9D5가 사용되는 분석 조건에 대해 더 민감한지의 여부를 탐구하도록 남아있다.

[0247]

(표 4a)

미스-TTR-V122I mAb 특성규명 요약 표

항체	$IC_{50} \pm SD$ (mg/mL)
9D5	저해 없음
14G8	0.028 ± 0.009
6C1	0.048 ± 0.059
5A1	0.015 ± 0.02
EG 27/1	저해 없음

[0248]

[0249]

실시예 5. 미스-TTR mAb를 이용하는 ATTR 조직의 면역조직학적(IHC) 특성규명

[0250]

트랜스타이레틴 단백질의 TTR 89 내지 97 단편에 대해 상승된 리드 미스-TTR mAb를 확인된 TTR 심장 아밀로이드 증 환자로부터의 새로 냉동 및 파라핀 처리된 조직에 대해 면역조직화학적으로 시험하였다. 심장 조직 샘플을 얻고 제조하기 위한 프로토콜, 면역조직화학(IHC), 및 영상 분석을 물질 및 방법의 다른 곳(1 내지 0)에서 제공한다. IHC에 대해 사용한 항체를 표 5에 기재한다.

표 5

[0251]

면역조직화학적 특성규명을 위해 사용한 항체				
항체	항체 유형	공급업자	염색 심장 조직	농도
14G8	미스-TTR	프로테나 바이오사이언시즈(Prothena Biosciences)	있음	$0.5\mu\text{g}/\text{mL}$
9D5	미스-TTR	프로테나 바이오사이언시즈	있음	$0.5\mu\text{g}/\text{mL}$
6C1	미스-TTR	프로테나 바이오사이언시즈	있음	$0.5\mu\text{g}/\text{mL}$
5A1	미스-TTR	프로테나 바이오사이언시즈	있음	$0.5\mu\text{g}/\text{mL}$
7G7	TTR	프로테나 바이오사이언시즈	있음	$0.5\mu\text{g}/\text{mL}$
6F10	아이소타입 대 조군	프로테나 바이오사이언시즈	없음	$0.5\mu\text{g}/\text{mL}$
프래알부민 (A0002)	TTR	다코 노스 아메리카(Dako North America)	있음	1:2,000 및 1:20,000
카파 경쇄 (A0191)	LC-κ	다코 노스 아메리카	없음	1:8,000
람다 경쇄 (A0193)	LC-λ	다코 노스 아메리카	없음	1:8,000
아밀로이드 A (M0759)	AA	다코 노스 아메리카	없음	1:8,000

[0252]

ATTR 돌연변이의 진단이 확인된 환자로부터 심장 조직 샘플을 얻었다. 면역조직화학적으로 시험한 사례에 대한 인구 통계는 다음과 같았고, 표 6에 요약한다: FAC = 가족성 아밀로이드성 심근병증; FAP = 가족성 아밀로이드성 말초신경병증; ^1AL = 경쇄 아밀로이드증; ATTR = 트랜스타이레틴-매개 아밀로이드증; Unk = 알려지지 않음

표 6

[0253]

미스-TTR 항체를 이용하는 심장 조직 샘플의 면역조직화학적 염색				
사례	진단	TTR 돌연변이	형식	TTR 항체로 염색하였는가?
환자 1	FAC	I1leu122	냉동	염색함
환자 2	FAP	야생형	냉동	염색함
환자 3	FAP	84Ser	냉동	염색함
환자 4	FAP	84Ser	냉동	염색함

환자 5	1° AL	--	냉동	염색하지 않음
환자 6	1° AL	--	냉동	염색하지 않음
환자 7	ATTR	10Arg	냉동	염색함
환자 8	ATTR	V122I	냉동	염색함
환자 H1	ATTR	Val1122Ile	FFPE	염색함
환자 H2	ATTR	Thr60Ala	FFPE	염색함
환자 H3	ATTR	Thr49Ala	FFPE	염색함
환자 H4	ATTR	Ile84Ser	FFPE	염색함
환자 H5	Unk.	노인 심장	FFPE	염색함
환자 H6	ATTR	Ile84Ser	FFPE	염색함

[0254] 트랜스타이레틴 단백질의 89 내지 97 단편에 대해 상승된 마우스 단클론성 항체(미스-TTR mAb)를 확인된 TTR 심장 아밀로이드증 환자로부터의 새로 냉동 및 파라핀 처리된 조직에 대해 면역조직화학적으로 시험하였다. 각각의 미스-TTR 항체는 ATTR 심장 조직에 대해 면역반응성을 나타내었다. 심근 및 혈관구조 전체적으로 침착물에서 진한 염색이 관찰되었다. 면역반응성을 티오플라빈-T의 콩고 레드에 의한 염색과 비교하였을 때, 조직 내 대다수의 면역반응성은 콩고 레드 복굴절 및 티오플라빈 T-양성 염색과의 높은 일치를 나타내었다. 이는 이 조직에서 침착된 TTR 아밀로이드의 베타 병풍 시트 특성을 확인하였다. 이들 미스-TTR 항체는 또한 TTR-면역양성이지만 콩고 레드 또는 티오플라빈 T-음성인 심근 영역으로 국소화된 프레-아밀로이드 TTR을 검출하였다. IgG-아이소타입 대조군 항체와 1차 항체 생략 부문은 둘 다 시험한 모든 조직에 걸쳐 염색에 대해 음성이었다. 다른 아밀로이드 생성 단백질(람다 및 카파 경쇄 또는 아밀로이드 A)에 대해 반응성인 항체는 이 분석에서 사용되는 ATTR 심장 조직에 대해 비반응성이었는데, 이는 침착물이 천연에서 구체적으로는 TTR이라는 것을 나타낸다.

[0255] 미스-TTR 항체의 염색 패턴을 잘 특성규명된 상업적 TTR 기준 항체에 의해 얻은 것과 비교하였다(프레알부민, A0002; 캘리포니아주 카르핀테리아에 소재한 다코사). 다코 기준 항체는 미스-TTR 항체와 동일한 면적에서 병에 걸린 심근을 염색하였지만, 더 확산하는 염색 패턴을 생성하였다. 다코 기준 항체는 미스-TTR 항체만큼 강하게 혈관구조 상에 존재하는 콩고친화성 TTR 아밀로이드 침착물을 염색하지 않았다.

[0256] 미스-TTR 항체는 정상의 병에 걸리지 않은 조직을 염색하지 않았다. 더 나아가, 예상한 바와 같이, 아이소타입 대조군 항체인 6F10에 의한 염색은 또한 음성이었다.

[0257] 미스-TTR 항체의 반응성이 TTR 침착물에 특이적인지의 여부를 결정하기 위해, 1차 AL 아밀로이드증으로 진단된 환자로부터 유래된 심장 조직에 대한 이들 항체의 교차 반응성을 시험하였다. 예상한 바와 같이, AL 아밀로이드 조직의 염색은 관찰되지 않았는데, TTR 항체는 ATTR 병에 걸린 조직에 대해 특이적으로 반응한다는 것을 확인한다.

[0258] 노인성 전신 아밀로이드증의 진단이 확인된 환자로부터의 또는 TTR 유전자 내 점 돌연변이에 의해 야기된 FAF 또는 FAP가 확인된 환자로부터의 심장 조직은 또한 14G8, 9D5, 6C1 및 5A1에 의해 양성으로 염색되었다. 이들 결과는 미스-TTR 항체가 ATTR 유전자형과 상관없이 심장 조직 내 TTR 침착물을 인식하는 능력을 가진다는 것을 나타낸다.

[0259] TTR을 발현시키는 것으로 알려진 다른 비심장 조직을 14G8, 9D5, 6C1 및 5A1에 의한 염색에 대해 시험하였고, 다코 기준 항체를 이용하여 얻은 염색과 비교하였다. 예상한 바와 같이, 간, 췌장 및 맥락총은 모두 다코 기준 항체를 이용하여 TTR에 대해 양성으로 염색하였다. 대조적으로, 미스-TTR 항체는 랑제르ハン스섬 및 맥락총에서 단리한 췌장 알파 세포만을 염색하였는데, 이는 이들 기관에 대해 국소화된 일부 TTR이 간에서 발현된 TTR과 입체배좌적으로 별개라는 것을 시사한다. 간에서 미스-TTR mAb 면역반응성의 결여는 다량의 TTR일 발현되었고, 주로 사량체, 천연 TTR이 있으며, 노출된 미스-TTR 에피토프를 갖지 않는다는 것을 시사한다.

[0260] 실시예 6. SDS-PAGE/웨스턴 블롯에 의한 그리고 메조 스케일 디스커버리(MSD) 플레이트 분석에 의한 ATTR 대 정상 인간 혈장의 분석

[0261] V30M ATTR에 대해 확인한 환자로부터의 6개 혈장 샘플(샘플 #21, #22, #23, #24, #25, #27) 및 정상 대상체로부터의 6개 샘플(샘플 #11, #12, #15, #18, #19, #20)을 엠. 사라이바(M. Saraiva)(포르투갈에 소재한 포르투 유니버시티(Porto University))로부터 얻었다. 샘플 #C6은 상업적 공급업자(바이오래클라메이션 IVT(BioreclamationIVT))로부터 얻은 정상 인간 혈청 샘플이었다. 샘플을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯에 의해, 또

는 메조스케일 디스커버리(MSD) 플레이트 분석에 의해 분석하였다. 이들 분석에 대한 프로토콜은 물질 및 방법의 다른 곳(p 내지 r)에 기재되어 있다. 6C1을 이용하는 MSD 플레이트 분석에 대해 표준 곡선을 생성하였다.

[0262] 9D5 또는 5A1 미스-TTR mAb 중 하나를 이용하는 얻어진 웨스턴 블롯에서, 정상과 TTR-V30M 질환 혈장 샘플 사이의 밴딩 패턴의 차이는 분명하였다. 모든 혈장 샘플은 pH4-TTR 기준 샘플 중에 존재하는 비천연 TTR 단량체와 함께 공동 이동되는 대략 14 kDa TTR 밴드를 함유하였다. 일반적으로, TTR-V30M 환자로부터 유래된 혈장 샘플(#21, 22, 23, 24, 25 및 27)은 더 많은 이런 미스-TTR 종을 가졌다. 추가로, V30M 환자로부터 유래된 혈장 샘플은 또한 기준 샘플 중에 존재하는 비천연 TTR 이량체와 함께 공동이동되는 대략 30kDa 밴드를 함유하였다. 샘플 #12 및 #18을 제외하고, 정상 개체로부터 유래된 혈장 샘플은 더 적은 이런 이량체 종을 가졌다.

[0263] 얻어진 웨스턴 블롯을 스캐닝하고 나서, 조합한 9D5- 또는 5A1-반응성 TTR 이량체 및 단량체 밴드의 강도를 각각의 샘플에 대해 플롯팅하였다(결과를 5A(9D5) 및 5B(5A1)에 나타내고, y-축 상에서 임의의 단위(a.u.)로 제공한다). 혈장 샘플 #15 및 #18을 제외하고, 정상 개체로부터 유래된 혈장 샘플(11, 12, 19 및 20)은 V30M 환자로부터 유래된 샘플(21 내지 25 및 27)보다 더 적은 9D5- 이량체 및 단량체를 함유하였다.

[0264] 9D5 및 5A1 웨스턴 블롯에 의해 분석한 12개 혈청 샘플을 또한 미스-TTR 포획 항체로서 6C1 및 검출 항체로서 다코-슬포 태그 항체를 이용하여 MSD 플레이트 분석에 의해 분석하였다. 이들 MSD 분석 결과를 도 6에 나타내고, y-축 상의 임의의 단위(a.u.)로 제시한다. 샘플 11, 12, 15, 18, 19 및 20은 정상 혈장을 나타낸다. 샘플 21 내지 25 및 27은 V30M 질환 혈장을 나타낸다.

[0265] 혈장 샘플 #15 및 #18을 제외하고, 정상 개체로부터 유래된 혈장 샘플 중에 존재하는 6C1-반응성 TTR의 양은 TTR-V30M 질환 개체로부터의 혈장에서 관찰한 것보다 더 낮았다. MSD 분석에 의해 측정한 6C1 반응성 수준은 SDS-PAGE/웨스턴에 의해 상기 관찰한 9D5 반응성 이량체 및 단량체의 양과 매우 상관관계가 있었다.

[0266] 혈장 샘플 중에 존재하는 반응성 TTR 종의 농도를 결정하기 위해, 포획 항체로서 6C1 및 검출 항체로서 8C3-슬포 태그를 이용하여 동일한 샘플을 재분석하였다. MSD 신호는 상기 생성한 TTR F87M/L110M 표준 곡선을 이용하여 반응성 TTR 종의 ng/ml 농도로 전환하였다. 이 분석에 기반하여, 대조군 샘플 중에 존재하는 6C1-반응성 TTR의 평균 농도는 271 +/- 185ng/ml이었다. 대조적으로, V30M 질환 혈장 샘플 중에 존재하는 반응성 TTR의 평균 농도는 331 +/- 95ng/ml에서 더 높았다. 종합하면, 이들 MSD 결과는 미스-TTR 항체가 정상 혈장에 대해 ATTR 질환을 구별할 수 있다는 것을 시사한다. 이는 ATTR 질환의 진단 분석에서 사용하기 위한 미스-TTR 항체의 추가적인 개발을 보장한다.

실시예 7. 인간화된 6C1 항체의 설계

[0268] 인간화를 위한 출발 지점 또는 공여자 항체는 마우스 항체 6C1이었다. 성숙 m6C1의 중쇄 가변 아미노산 서열은 서열번호 1로서 제공된다. 성숙 m6C1의 경쇄 가변 아미노산 서열은 서열번호 13으로서 제공된다. 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 각각 서열번호 10 내지 12로서 제공한다(카바트에 의해 정함). 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3 아미노산 서열을 각각 서열번호 18 내지 20으로서 제공한다(카바트에 의해 정함). 카바트 넘버링을 이 실시예 전체적으로 사용한다.

[0269] m6C1의 가변 카파(V_k)는 마우스 카바트 하위그룹 2에 속하는데, 이는 인간 카바트 하위그룹 2에 대응한다. m6C1의 가변 중쇄(V_h)는 마우스 카바트 하위그룹 3d에 속하는데, 이는 카바트 하위그룹 3에 대응한다. 문헌[Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242, 1991] 참조. V_k에서 16-잔기 CDR-L1은 정규 부류 4에 속하고, 7-잔기 CDR-L2는 정규 부류 1에 속하며, 9-잔기 CDR-L3은 정규 부류 1에 속한다. 문헌[Martin & Thornton, J. Mol. Biol. 263:800-15, 1996] 참조. 10-잔기 CDR-H1(코티아 및 카바트 CDR-H1의 복합, 표 7에 나타낸 잔기 26 내지 35)은 정규 부류 1에 속하고, 17-잔기 CDR-H2는 정규 부류 1에 속한다. 문헌[Martin & Thornton, J Mol. Biol. 263:800-15, 1996] 참조. CDR-H3은 정규 부류가 없다.

[0270] V_k와 V_h 도메인 사이의 계면에서 잔기는 통상적으로 발견되는 것이다.

[0271] 6C1의 대량의 구조적 모델을 제공하는 구조를 찾기 위해 PDB 데이터베이스 내 단백질 서열에 대해 검색하였다 (Deshpande et al., Nucleic Acids Res. 33: D233-7, 2005). 항체 fab의 결정 구조(pdb 코드 3EYS)(Gardberg et al., Biochemistry (2009) Vol. 48(23), pp. 5210-5217)를 V_k 구조에 대해 사용하였는데, 이는 양호한 분해능(1.95Å) 및 6C1 V_k에 대한 전반적인 서열 유사성을 가져서, 루프에 대해 6C1와 동일한 정규 규조가 남아있기 때문이다. V_h 구조에 대해 이량체 항체(pdb 코드 2OTU)(Li et al., Submission to GenBank (2007))를 사용하였는데, 그것이 양호한 유사성 및 분해능(1.68Å)을 가지고, CDR-H1 및 CDR-H2에 대해 6C1 V_h와 동일한 정규 구조

를 포함하기 때문이다. 바이오루미네이트 소프트웨어(슈뢰딩거 인코포레이티드로부터 허가)를 사용하여 6C1의 대략의 구조를 모델링하였다.

[0272] NCBI로부터의 흔하지 않은 단백질 서열의 검색은 뮤린 CDR에 접합되는 적합한 인간 프레임워크의 선택을 허용하였다. Vh에 대해, Ig중쇄 ADX65650(GI:323432015)(서열번호 3)을 선택하였다(Bowers et al, Submission to GenBank (2010)). 이는 6C1의 정규 형태를 공유한다. Vk에 대해, NCBI 수탁 코드 ABI74084(GI: 114385652)를 지니는 인간 카파 경쇄를 선택하였다(서열번호 15)(Shriner et al. Submission to GenBank (2006)). CDR-L1 및 L2에 대해 비경구 Vk와 동일한 정규 부류를 가졌다.

[0273] 상이한 치환 순열(Hu6C1VHv1, Hu6C1VHv1b, Hu6C1VHv2, Hu6C1VHv2b, Hu6C1VHv3, 및 Hu6C1VHv3b(각각 서열번호 4 내지 9) 및 Hu6C1VLv1-2(각각 서열번호 16 및 17))을 함유하는 6개의 인간화된 중쇄 가변 영역 변이체 및 2개의 인간화된 경쇄 가변 영역 변이체를 구성하였다(표 7 및 표 8). 선택된 인간 프레임워크에 기반한 복귀돌연변이 및 다른 돌연변이를 지니는 예시적인 인간화된 Vh 및 Vk 설계를 각각 표 7 및 표 8에 나타낸다. 표 7 및 표 8의 첫 번째 열의 회색 음영 영역은 코티아로 정한 CDR을 나타내고, 표 7 및 표 8의 남아있는 열의 회색 음영 영역은 카바트로 정한 CDR을 나타낸다. 서열번호 4 내지 9, 16 및 17은 표 9에 나타내는 바와 같은 복귀돌연변이 및 다른 돌연변이를 포함한다. Hu6C1VHv1, Hu6C1VHv1b, Hu6C1VHv2, Hu6C1VHv2b, Hu6C1VHv3 및 Hu6C1VHv3b 내, 그리고 Hu6C1VLv1-2 내 위치 L2, L45, H19, H44, H49, H76, H77, H82(a), H83 및 H89에서의 아미노산을 표 10에 열거한다.

표 7

인간화된 6C1 VH 영역

코티아 잔기 #	카바트 잔기 #	선행 잔기 #	FR 또는 CDR	뮤린 6C1 VH (서열번호 1)	Hu VH 수용자 Fr 수탁번호 ADX65650 (서열번호 3)	6C1 VHv1 (서열번호 4)	6C1 VHv1b (서열번호 5)	6C1 VHv2 (서열번호 6)	6C1 VHv2b (서열번호 7)	6C1 VHv3 (서열번호 8)	6C1 VHv3b (서열번호 9)
1	1	1	Fr1	E	E	E	E	E	E	E	E
2	2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V
3	3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L
5	5	5	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V
6	6	6	Fr1	E	E	E	E	E	E	E	E
7	7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G
9	9	9	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G
10	10	10	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G
11	11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V
13	13	13	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
14	14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P
15	15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G
16	16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S
18	18	18	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L
19	19	19	Fr1	K	R	R	R	R	R	K	K
20	20	20	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L
21	21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S
22	22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C
23	23	23	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A

[0274]

인간화된 6C1 Vh 영역

24	24	24	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A
25	25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	26	CDR-H1	G	G	G	G	G	G	G	G	G
27	27	27	CDR-H1	F	F	F	F	F	F	F	F	F
28	28	28	CDR-H1	T	T	T	T	T	T	T	T	T
29	29	29	CDR-H1	F	F	F	F	F	F	F	F	F
30	30	30	CDR-H1	S	S	S	S	S	S	S	S	S
31	31	31	CDR-H1	N	S	N	N	N	N	N	N	N
32	32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	33	CDR-H1	Y	E	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	34	CDR-H1	M	M	M	M	M	M	M	M	M
35	35	35	CDR-H1	S	N	S	S	S	S	S	S	S
36	36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W
37	37	37	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V	V
38	38	38	Fr2	R	R	R	R	R	R	R	R	R
39	39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	40	Fr2	T	A	A	A	A	A	A	A	A
41	41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P
42	42	42	Fr2	E	G	G	G	G	G	G	G	G
43	43	43	Fr2	K	K	K	K	K	K	K	K	K
44	44	44	Fr2	R	G	G	G	G	G	R	R	R
45	45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L
46	46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E	E	E
47	47	47	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W
48	48	48	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V	V
49	49	49	Fr2	A	S	S	A	S	A	S	A	
50	50	50	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
51	51	51	CDR-H2	I	I	I	I	I	I	I	I	I
52	52	52	CDR-H2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
52A	52A	53	CDR-H2	I	S	I	I	I	I	I	I	I
53	53	54	CDR-H2	D	S	D	D	D	D	D	D	D
54	54	55	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G
55	55	56	CDR-H2	N	S	N	N	N	N	N	N	N

[0275]

인간화된 6C1 Vh 영역

56	56	57	CDR-H2	N	T	N	N	N	N	N	N
57	57	58	CDR-H2	I	I	I	I	I	I	I	I
58	58	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
59	59	60	CDR-H2	H	Y	H	H	H	H	H	H
60	60	61	CDR-H2	P	A	P	P	P	P	P	P
61	61	62	CDR-H2	D	D	D	D	D	D	D	D
62	62	63	CDR-H2	S	S	S	S	S	S	S	S
63	63	64	CDR-H2	V	V	V	V	V	V	V	V
64	64	65	CDR-H2	K	K	K	K	K	K	K	K
65	65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G	G	G	G
66	66	67	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R
67	67	68	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F
68	68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T
69	69	70	Fr3	I	I	I	I	I	I	I	I
70	70	71	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S
71	71	72	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R
72	72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D
73	73	74	Fr3	N	N	N	N	N	N	N	N
74	74	75	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A
75	75	76	Fr3	K	K	K	K	K	K	K	K
76	76	77	Fr3	N	N	N	N	S	S	N	N
77	77	78	Fr3	T	S	T	T	T	T	T	T
78	78	79	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L
79	79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	80	81	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L
81	81	82	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
82	82	83	Fr3	M	M	M	M	M	M	M	M
82A	82A	84	Fr3	S	N	N	N	S	S	N	N
82B	82B	85	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S
82C	82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L
83	83	87	Fr3	K	R	R	R	R	R	K	K
84	84	88	Fr3	S	A	A	A	A	A	A	A
85	85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E
86	86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D
87	87	91	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T
88	88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A
89	89	93	Fr3	M	V	V	V	V	M	M	M
90	90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

[0276]

인간화된 6C1 Vh 영역

91	91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
92	92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C
93	93	97	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A
94	94	98	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R
95	95	99	CDR-H3	D	D	D	D	D	D	D	D
96	96	100	CDR-H3	S	L	S	S	S	S	S	S
97	97	101	CDR-H3	D	S	D	D	D	D	D	D
98	98	102	CDR-H3	Y	G	Y	Y	Y	Y	Y	Y
99	99	103	CDR-H3	G	S	G	G	G	G	G	G
100	100	104	CDR-H3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
100G	100G	105	CDR-H3	F	Y	F	F	F	F	F	F
101	101	106	CDR-H3	D	G	D	D	D	D	D	D
102	102	107	CDR-H3	V	Y	V	V	V	V	V	V
103	103	108	Fr4	W	W	W	W	W	W	W	W
104	104	109	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G
105	105	110	Fr4	T	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	106	111	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G
107	107	112	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T
108	108	113	Fr4	T	L	L	L	L	L	L	L
109	109	114	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V
110	110	115	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T
111	111	116	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V
112	112	117	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S
113	113	118	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S

[0277]

표 8

인간화된 6C1 Vk 영역

코티아 잔기 #	카바트 잔기 #	선행 잔기 #	FR 또는 CDR	유련 6C1 VL (서열번호 13)	Hu VL Acceptor Fr AcceptABT4/084 (서열번호 15)	6C1 VLv1 (서열번호 16)	6C1 VLv2 (서열번호 17)
1	1	1	Fr1	D	D	D	D
2	2	2	Fr1	V	I	V	I
3	3	3	Fr1	L	V	V	V
4	4	4	Fr1	M	M	M	M

[0278]

인간화된 6C1 Vk 영역								
5	5	5	Fr1	T	T	T	T	T
6	6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	
7	7	7	Fr1	T	T	T	T	
8	8	8	Fr1	P	P	P	P	
9	9	9	Fr1	L	L	L	L	
10	10	10	Fr1	S	S	S	S	
11	11	11	Fr1	L	L	L	L	
12	12	12	Fr1	P	P	P	P	
13	13	13	Fr1	V	V	V	V	
14	14	14	Fr1	S	T	T	T	
15	15	15	Fr1	L	P	P	P	
16	16	16	Fr1	G	G	G	G	
17	17	17	Fr1	D	E	E	E	
18	18	18	Fr1	Q	P	P	P	
19	19	19	Fr1	A	A	A	A	
20	20	20	Fr1	S	S	S	S	
21	21	21	Fr1	I	I	I	I	
22	22	22	Fr1	S	S	S	S	
23	23	23	Fr1	C	C	C	C	
24	24	24	CDR-L1	R	R	R	R	
25	25	25	CDR-L1	S	S	S	S	
26	26	26	CDR-L1	S	S	S	S	
27	27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	
27A	27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	
27B	27B	29	CDR-L1	I	L	I	I	
27C	27C	30	CDR-L1	V	L	V	V	
27D	27D	31	CDR-L1	H	H	H	H	
27E	27E	32	CDR-L1	S	S	S	S	
28	28	33	CDR-L1	N	N	N	N	
29	29	34	CDR-L1	G	G	G	G	
30	30	35	CDR-L1	N	Y	N	N	
31	31	36	CDR-L1	T	N	T	T	
32	32	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	
33	33	38	CDR-L1	L	L	L	L	

[0279]

인간화된 6C1 Vk 영역

34	34	39	CDR-L1	E	D	E	E
35	35	40	Fr2	W	W	W	W
36	36	41	Fr2	Y	Y	Y	Y
37	37	42	Fr2	L	L	L	L
38	38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q
39	39	44	Fr2	K	K	K	K
40	40	45	Fr2	R	P	P	P
41	41	46	Fr2	G	G	G	G
42	42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q
43	43	48	Fr2	S	S	S	S
44	44	49	Fr2	P	P	P	P
45	45	50	Fr2	K	Q	K	K
46	46	51	Fr2	L	L	L	L
47	47	52	Fr2	L	L	L	L
48	48	53	Fr2	I	I	I	I
49	49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y
50	50	55	CDR-L2	K	L	K	K
51	51	56	CDR-L2	V	G	V	V
52	52	57	CDR-L2	S	S	S	S
53	53	58	CDR-L2	K	N	K	K
54	54	59	CDR-L2	R	R	R	R
55	55	60	CDR-L2	F	A	F	F
56	56	61	CDR-L2	S	S	S	S
57	57	62	Fr3	G	G	G	G
58	58	63	Fr3	V	V	V	V
59	59	64	Fr3	P	P	P	P
60	60	65	Fr3	D	D	D	D
61	61	66	Fr3	R	R	R	R
62	62	67	Fr3	F	F	F	F
63	63	68	Fr3	S	S	S	S
64	64	69	Fr3	G	G	G	G
65	65	70	Fr3	S	S	S	S
66	66	71	Fr3	G	G	G	G
67	67	72	Fr3	S	S	S	S
68	68	73	Fr3	G	G	G	G
69	69	74	Fr3	T	T	T	T
70	70	75	Fr3	D	D	D	D
71	71	76	Fr3	F	F	F	F
72	72	77	Fr3	I	T	T	T
73	73	78	Fr3	L	L	L	L

[0280]

인간화된 6C1 Vk 영역							
74	74	79	Fr3	K	K	K	K
75	75	80	Fr3	I	I	I	I
76	76	81	Fr3	S	S	S	S
77	77	82	Fr3	R	R	R	R
78	78	83	Fr3	V	V	V	V
79	79	84	Fr3	E	E	E	E
80	80	85	Fr3	A	A	A	A
81	81	86	Fr3	E	E	E	E
82	82	87	Fr3	D	D	D	D
83	83	88	Fr3	L	V	V	V
84	84	89	Fr3	G	G	G	G
85	85	90	Fr3	V	V	V	V
86	86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y
87	87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y
88	88	93	Fr3	C	C	C	C
89	89	94	CDR-L3	F	M	F	F
90	90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q
91	91	96	CDR-L3	G	G	G	G
92	92	97	CDR-L3	S	L	S	S
93	93	98	CDR-L3	H	Q	H	H
94	94	99	CDR-L3	V	T	V	V
95	95	100	CDR-L3	P	P	P	P
96	96	101	CDR-L3	L	L	L	L
97	97	102	CDR-L3	T	T	T	T
98	98	103	Fr4	F	F	F	F
99	99	104	Fr4	G	G	G	G
100	100	105	Fr4	G	G	G	G
101	101	106	Fr4	G	G	G	G
102	102	107	Fr4	T	T	T	T
103	103	108	Fr4	K	K	K	K
104	104	109	Fr4	L	V	V	V
105	105	110	Fr4	E	E	E	E
106	106	111	Fr4	L	I	I	I
107	107	112	Fr4	K	K	K	K

[0281]

표 9

V _H , V _L 복귀돌연변이 및 기타 돌연변이		공여자 프레임워크 잔기
V _H 또는 V _L 변이체	V _H 또는 V _L 액손 수용자 서열	
Hu6C1VHv1 (서열번호 4)	NCBI 수탁 코드 ADX65650 (서열번호 3)	H77
Hu6C1VHv1b (서열번호 5)	NCBI 수탁 코드 ADX65650 (서열번호 3)	H49, H77
Hu6C1VHv2 (서열번호 6)	NCBI 수탁 코드 ADX65650 (서열번호 3)	H76, H77, H82(a)
Hu6C1VHv2b (서열번호 7)	NCBI 수탁 코드 ADX65650 (서열번호 3)	H49, H76, H77, H82(a)
Hu6C1VHv3 (서열번호 8)	NCBI 수탁 코드 ADX65650 (서열번호 3)	H19, H44, H77, H83, H89
Hu6C1VHv3b (서열번호 9)	NCBI 수탁 코드 ADX65650 (서열번호 3)	H19, H44, H49, H77, H83, H89
Hu6C1VLv1 (서열번호 16)	NCBI 수탁 코드 ABI74084 (서열번호 15)	L2, L45
Hu6C1VLv2 (서열번호 17)	NCBI 수탁 코드 ABI74084 (서열번호 15)	L45

표 10

인간화된 6C1 항체에서 복귀돌연변이 및 기타 돌연변이에 대한 프레임워크 잔기의 카바트 넘버링											
잔기	ADX6565 0 중쇄	ABI7408 4 경쇄	마우스 6C1	Hu6C 1 VHv1 b	Hu6C 1 VHv2 b	Hu6C 1 VHv2 b	Hu6C 1 VHv3 b	Hu6C 1 VHv3 b	Hu6C 1 VLv1	Hu6C 1 VLv2	
L2	-	I	V	-	-	-	-	-	V	I	

[0283]

L45	-	Q	K	-	-	-	-	-	-	K	K
H19	R	-	K	R	R	R	K	K	-	-	
H44	G	-	R	G	G	G	R	R	-	-	
H49	S	-	A	S	A	S	A	S	A	-	-
H76	N	-	N	N	N	S	S	N	N	-	-
H77	S	-	T	T	T	T	T	T	T	-	-
H82(a)	N	-	S	N	N	S	S	N	N	-	-
H83	R	-	K	R	R	R	K	K	-	-	
H89	V	-	M	V	V	V	M	M	-	-	

- [0284] 마우스 모델 서열(2OUT_B.pro; 서열번호 2), 인간 수용자 서열(ADX65650; 서열번호 3), 및 Hu6C1VHv1, Hu6C1VHv1b, Hu6C1VHv2, Hu6C1VHv2b, Hu6C1VHv3, 및 Hu6C1VHv3b 서열(각각 서열번호 4 내지 9)과 함께 뮤린 6C1 VH 서열(서열번호 1)의 정렬을 도 1에 나타낸다. 카바트에 의해 정해지는 CDR 영역은 음영 표시되어 있다. 정규, 베니어 또는 계면 잔기가 마우스와 인간 수용자 서열 간에 다른 위치가 치환을 위한 후보이다. 베니어/CDR 토대 잔기의 예는 표 7에서 카바트 잔기 2, 49, 69, 71, 75, 78 및 94를 포함한다. 정규/CDR 상호작용 잔기의 예는 표 7에서 카바트 잔기 24, 48 및 73을 포함한다. 계면/페킹(VH+VL) 잔기의 예는 표 7에서 카바트 잔기 37, 39, 45, 47, 91, 93 및 103을 포함한다.
- [0285] 마우스 모델 서열(3EYS_L_St.pro; 서열번호 14), 인간 수용자 서열(ABI74084; 서열번호 15), 및 Hu6C1VLv1 및 Hu6C1VLv2 서열(각각 서열번호 16 및 17)과 함께 뮤린 6C1 Vk 서열(서열번호 13)의 정렬을 도 2에 나타낸다. 카바트에 의해 정해지는 CDR 영역은 음영 표시되어 있다. 정규, 베니어 또는 계면 잔기가 마우스와 인간 수용자 서열 간에 다른 위치가 치환을 위한 후보이다. 베니어/CDR 토대 잔기의 예는 표 8에서 카바트 잔기 4, 35, 46, 49, 66, 68, 및 69를 포함한다. 정규/CDR 상호작용 잔기의 예는 표 8에서 카바트 잔기 2, 48, 64 및 71을 포함한다. 계면/페킹(VH+VL) 잔기의 예는 표 8에서 카바트 잔기 36, 38, 44, 87 및 98을 포함한다.
- [0286] 치환을 위한 후보로서 경쇄 가변 영역 내 표 9 및 표 10에 나타낸 위치의 선택을 위한 이유는 다음과 같다.
- [0287] I2V: 이는 정규 CDR 상호작용 잔기이다. I1e의 더 큰 측쇄는 CDR L1 및 L2 패킹과 잠재적으로 방해할 수 있었다. 이 잔기는 Hu6C1VH1에서 Val로 복귀돌연변이된다.
- [0288] Q45K: Lys은 인간 서열 내 이 위치에서 Gln보다 더 빈번하며, 따라서 이는 빈도 기반 복귀돌연변이이다.
- [0289] 치환을 위한 후보로서 중쇄 가변 영역 내 표 9 및 표 10에 나타낸 위치의 선택을 위한 이유는 다음과 같다.
- [0290] R19K: Lys은 인접한 잔기와 H-결합을 형성하는 반면, Arg은 그렇지 않다.
- [0291] G44R: Arg은 경쇄 내 계면 잔기 Phe98과 H-결합을 형성하는 반면, Gly은 그렇지 않다.
- [0292] S49A: Ser은 잠재적으로 CDR-H2 내 Hys과 H-결합을 형성할 수 있다.
- [0293] N76S: 이 잔기에서 높은 탈아미드화 노출이 있다. Ser은 이 위치에서의 인간 생식 계열에서 두 번째로 빈번하다.
- [0294] S77T: 이 위치에서 세린은 인간 게르만 중쇄 프레임워크에서 매우 드문 반면, 트레오닌은 위치 77에서 가장 빈번하다. 이 복귀돌연변이는 임의의 면역원성 잠재력을 이동시켰다.
- [0295] N82(a)S: 이 잔기에서 높은 탈아미드화 노출이 있다. Ser은 이 위치에서의 인간 생식 계열에서 두 번째로 빈번하다.
- [0296] R83K: 이 위치에서 Lys은 인접 잔기와의 다중 상호작용을 형성하는데, 이는 루프 상에서 안정화 효과를 발휘하는 것으로 여겨지는 반면, Arg은 그렇지 않다.
- [0297] V89M: Met는 방해 잔기 Tyr91과 H-결합을 형성하며, 계면을 안정화시키는 것으로 나타난 반면, Val은 Tyr91과 상호작용하지 않는다.
- [0298] 2개의 인간화된 경쇄 가변 영역 변이체 및 2개의 인간화된 중쇄 가변 영역 변이체는 다음과 같다:

[0299] Hu6C1VL 형태 1(소문자로 I2V 및 Q45K 복귀돌연변이):

DvVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPkLLIYKVSKRFS

GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGGGTKEIK (서열 번호 16)

[0300] Hu6C1VL 형태 2(소문자로 Q45K 복귀돌연변이):

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPkLLIYKVSKRFS

GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGGGTKEIK

(서열 번호 17)

[0301] Hu6C1VH 형태 1(소문자로 S77T 복귀돌연변이):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWVSYISIDGNNIY

HPDSVKGRFTISRDNAKtLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWGQGTLVTVS

(서열 번호 4)

[0302] Hu6C1VH 형태 1b(소문자로 S49A 및 S77T 복귀돌연변이):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWV_aYISIDGNNIY

HPDSVKGRFTISRDNAKtLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWGQGTLVTVS

S (서열 번호 5)

[0303] Hu6C1VH 형태 2 (소문자로 N76S, S77T, 및 N82(a)S 복귀돌연변이):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWV_aYISIDGNNIY

HPDSVKGRFTISRDNAKtLYLQMNsSLRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWGQGTLVTVSS

(서열 번호 6)

[0304] Hu6C1VH 형태 2b(소문자로 S49A, N76S, S77T, 및 N82(a)S 복귀돌연변이):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKGLEWV_aYISIDGNNIY

HPDSVKGRFTISRDNAKtLYLQMNsSLRAEDTAVYYCARDSDYGYFDVWGQGTLVTVSS

(서열 번호 7)

[0305] Hu6C1VH 형태 3 (소문자로 R19K, G44R, S77T, R83K 및 V89M 복귀돌연변이):

EVQLVESGGGLVQPGGSLkLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKrLEWVSYISIDGNNIY

HPDSVKGRFTISRDNAKtLYLQMNSLkAEDTA_mYYCARDSDYGYFDVWGQGTLVTVS

S (서열 번호 8)

[0306] Hu6C1VH 형태 3b (소문자로 R19K, G44R, S49A, S77T, R83K 및 V89M 복귀돌연변이):

EVQLVESGGGLVQPGGSLkLSCAASGFTFSNYYMSWVRQAPGKrLEWV_aYISIDGNNIYH

PDSVKGRFTISRDNAKtLYLQMNSLkAEDTA_mYYCARDSDYGYFDVWGQGTLVTVSS

(서열 번호 9)

[0307] 실시예 8. 인간화된 6C1 항체의 결합 역학 분석

[0308] 형태 3b로부터 선택된 중쇄 및 형태 2로부터 선택된 경쇄를 포함하는 인간화된 6C1 항체의 결합 역학을 비아코어에 의해 특성규명하였고, 이하에 나타낸다.

mAb	$k_a(1/Ms)$	$k_d(1/s)$	$K_D(M)$	R_{max}
Hu-6C1-H3bL2	3.724E+5	5.449E-4	1.463E-9	38.80

[0309] 실시예 9. 물질 및 방법

[0319] a. 항체 일반 프로토콜

마우스를 RIBI 애주번트 중의 항원성 웨타이드 TTR-MAP, TTR89-97-N-KLH 또는 TTR89-97-C-KLH로 매주 또는 TiterMax 애주번트 중에서 매달 면역화하였다. 융합 전 3 내지 4일에, 선택 마우스를 식염수 용액 중의 면역원을 이용하여 최종 IV 부스트를 제공하였다. 비장세포를 준비하기 위해 비장을 균질화하고, 표준 전기융합 프로토콜을 이용하여 SP2/0 골수종 세포와 융합하였다. 선택 배지 중의 융합 세포를 96-웰 플레이트에서 풀레이팅하고, 7 내지 10일 후에 선별하였다.

[0321] b. 항체 선별 프로토콜

흔성세포 선택은 다음의 ELISA 선별에 기반하였다: 96-웰 ELISA 플레이트를 닦 항-His, $1\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS로 코팅하고 나서, 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 15분 동안 1% BSA/PBS 용액, $200\mu\text{l}/\text{웰}$ 로 차단하고, 이어서, $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ pH4-TTR, $50\mu\text{l}/\text{웰}$ 을 첨가하고 나서, 1시간 동안 인큐베이션시켰다. pH4-TTR에 TTR을 해리/옹집시키기 위해 낮은 pH(50mM 아세트산나트륨, pH 4.0)을 실시하여, TTR89-97 에피토프를 노출시킨 TTR이다. 플레이트를 TBS-T로 2회 세척하였다. 융합 플레이트로부터의 상청액을 $50\mu\text{l}/\text{웰}$ 로 첨가하고 나서, 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 0.5% BSA/PBS/TBS-T, $50\mu\text{l}/\text{웰}$ 에서 1:5,000로 희석시킨 플레이트를 TBS-T로 2회 세척하였다. 검출 항체, 염소 항-마우스(IgG1, 2a, 2b, 3 특이적)-HRP를 첨가하고 나서, 1시간 동안 인큐베이션시켰다. 최종적으로, 플레이트를 TBS-T 및 TMB 기질을 이용하여 5회 세척하였고, $100\mu\text{l}/\text{웰}$ 을 첨가하였다. 15분 후에, 2N 황산, $50\mu\text{l}/\text{웰}$ 을 이용하여 기질 연구를 중단하였다. 플레이트를 450nm에서 판독하였다. O.D. > 1.0로 선택하고 나서, 세포를 24-웰 플레이트에 옮겼다. 3일 성장 후에, 상기 분석을 이용하여 클론을 반대 선별하여 결합을 확인하고, 음성 반대 선별로서 천연 TTR을 pH4-TTR로 대체하고, TTR의 비천연 형태에 특이적인 TTR mAb를 생성하는 클론의 선택을 허용하였다.

[0323] c. 항체 발현 프로토콜

인간화된 단클론성 항체 서열을 운반하는 CMV 유발 경쇄 및 중쇄 플라스미드를 CHO-S1 세포(라이프 테크놀로지(Life Technology)) 내로 형질감염시켰다. 선택 풀을 제조하기 위해 이중 선택을 적용하였다. 조건화 배지를 역가에 대해 분석하고, 결합하고 나서, SDS-PAGE/웨스턴 블로팅에 의해 분석하였다. 클론픽스 시스템(Clonepix system)(몰레큘러 디바이시즈(Molecular Devices))을 이용하는 클론 생성을 위해 선택 풀을 사용하였다. 클론을 항체 역가에 기반하여 랭킹하였다. 선택 클론을 확장시키고, 보관하였다.

[0325] 가장 높게 생성되는 클론을 진탕 플라스크에서 확장시키고 나서, 배양물을 사용하여 10 내지 25ℓ 웨이브 백(Wave bag) 배양물을 접종하였다. 글루타맥스(Glutamax)(라이프 테크놀로지사로부터의 배지 및 글루타맥스)로 보충한 프리스타일(FreeStyle)-CHO, CD OptiCHO 및 프리스타일 F17 발현 배지의 혼합물을 진탕 플라스크뿐만 아니라 웨이브 백 배양물에 대해 사용하였다. 일정한 교반 하에 37°C, 7% CO₂에서 웨이브 바이오리액터(Wave Bioreactor)(GE 헬스케어)를 이용하여 배취 배양물을 제조하였다. 세포수, 생존도 및 항체 생성을 주기적으로 모니터링하기 위해 샘플을 회수하였다. 필요하다면, 세포 부스트(Cell Boost)(하이클론(HyClone))로 보충하였다. 세포 생존도가 90% 미만으로 쇠퇴하기 시작하였을 때(5 내지 7일), 배취 배양물을 채취하였다.

[0326] d. 항체 정제 프로토콜

[0327] 혼탁액 중의 세포가 4°C에서 중력을 통해 웨이브 백의 바닥으로 침강되는 것을 처음 허용한 후에 세포 배양물을 채취하였다. 채취한 배지를 멘스 필터(depth filter)(밀리포어사(Millipore)의 밀리스탁 포드 COHC(Millistak Pod COHC))를 통해 정화하고 나서, 접선유동 여과(밀리포어사의 펠리콘(Pellicon) 2PLC 30K)에 의해 10배 농축시키고, $0.2\mu\text{m}$ 필터(밀리포어사의 옵티캡(OptiCap) XL)를 통해 멸균 여과시켰다. 이어서, 농축시킨 조건화 배지를 FPLC(GE 라이프사이언시즈(GE Lifesciences) 아크타 아반트(Akta Avant))를 이용하여 1xPBS, pH 7.4에서 사전 평형상태로 만든 단백질 G 세파로스 패스트 플로(Protein G Sepharose Fast Flow) 칼럼(GE 라이프사이언시즈) 상에 부하하였다. OD₂₈₀이 기준에 도달될 때까지, 비결합 단백질을 1xPBS, pH 7.4의 5 내지 10개 칼럼 용적을 갖는 칼럼으로 세척하였다. IgG 용리 완충제(써모 사이언티픽)의 2칼럼 용적을 갖는 칼럼으로부터 결합된 항체를 용리시켰다. 용리 분획을 수집하고 나서, pH를 2M 트리스, pH 9.0($60\mu\text{l}/1\text{ml}$ 용리)로 중화시켰다.

[0328] 항체-함유 분획을 풀링하고 나서, 1xPBS, pH 7.4에 대해 4°C에서 밤새 투석시켰다. 이어서, 투석한 샘플을 $0.2\mu\text{m}$ PES 필터를 통한 한외여과에 의해 멸균시키고 나서, 4°C에서 저장하였다. 단백질 표준으로서 소 감마-글로불린(써모 사이언티픽)을 이용하여 바이신콘닌산(bicinchoninic acid: BCA)에 의해 최종 단백질 농도를 결정하였

다.

[0329] e. 재조합 TTR 발현 및 정제 프로토콜

F87M/L110M 이중 돌연변이를 함유하는 TTR 삽입물(Met-hTTR-(His)₆) 또는 TTR 변이체를 함유하는 pET21a(+) 플라스미드를 이용하여 이콜라이(BL21-A1) 세포를 형질전환하였다. 100 μ g/ml 암피실린을 함유하는 2YT 브로스에서 세포를 성장시켰다. 1mM IPTG 및 0.05% 아라비노스의 존재 하에 20°C에서 TTR의 발현을 밤새 유도하였다.

[0331] 4000 x g에서 10분 동안 원심분리에 의해 세포를 수집하고 나서, 사용할 때까지 -80°C에서 저장하였다. 10 내지 15g 세포 펠렛을 해동시키고 나서, LV-1 고전단 프로세서(마이크로플루이딕스 인코포레이티드(Microfluidics, Inc.))를 통한 가공에 의해 50ml 완충제 A(500mM NaCl, 20mM 이미다졸을 함유하는 1xPBS) 중에 용해시켰다. 용해 세포를 12,000 x g에서 15분 동안 원심분리시키고 나서, His-Trap HP 칼럼(GE 라이프사이언스) 상에서 정제 전에 0.2 μ m PES 필터를 통해 여과시켰다. 부하 후에, 칼럼을 10 c.v.의 완충제 A로 세척하고 나서, 완충제 B(500mM NaCl, 500mM 이미다졸과 함께 1xPBS)로 용리하였다. TTR에 대응하는 피크 분획을 수집하고 나서, 1xPBS에 대해 투석하고, 사용할 때까지, -80°C에서 저장하였다.

[0332] f. TTR 항원 제조

[0333] 1x PBS 중에서 최종 농도 2.5 μ g/ml까지 재조합 TTR-6His의 농축 저장액을 희석시킴으로써 천연 TTR 항원을 제조하였다. pH 3.95, 72시간 동안 실온에서 50mM 아세트산나트륨 중의 0.2mg/ml의 농도로 재조합 TTR을 인큐베이션 함으로써 pH4-처리 TTR을 생성하였다. 이들 조건 하에서, TTR을 천연 TTR과 구조적으로 별개인 응집된 형태와 TTR 단량체의 혼합물로 해리한다. 이어서, 분석에서 사용 직전에 1xPBS에서 2.5 μ g/ml의 최종 농도로 pH4-TTR을 희석시켰다. 1xPBS에서 1시간 동안 1.0 μ g/ml 닦-항-his 다클론성 항체(에이비캠(Abcam) #Ab9107)의 웰 당 50 μ l로 96-웰 플레이트(코스타(Costar) #3690)를 실온에서 코팅하였다. 코팅 용액을 버리고 나서, 1xPBS(G-바이오사이언스(G-Biosciences) #786-193) 중에서 1시간 동안 희석시킨 1x BSA-함유 차단 완충제의 웰 용적 당 250 μ l로 플레이트를 차단하였다.

[0334] g. ELISA 프로토콜

[0335] 코팅 및 차단시킨 96-웰 플레이트를 실온에서 1시간 동안 2.5 μ g/ml TTR 항원(천연 TTR 또는 pH4-TTR)의 웰 당 50 μ l로 처리하였다. 이어서, 세척 완충제(0.05% 트위-20을 함유하는 1x 트리스 완충 식염수)의 웰 당 250 μ l로 플레이트를 2회 세척하였다. 이어서, 세척 플레이트를 0.31 내지 2.5 μ g/ml 범위의 농도에서 1시간 동안 적절한 항-TTR 단클론성 항체의 웰 당 50 μ l로 처리하였다.

[0336] 처리한 플레이트를 웰 당 250 μ l 세척 완충제로 3회 세척하였다. 세척 후에, 1xPBS 중의 페옥사이드-컨쥬게이팅된 염소-항-마우스(잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch) #115-035-164)의 1:5,000 희석물을 포함하는 검출 항체의 웰 당 50 μ l로 플레이트를 1시간 동안 처리하였다. 이어서, 웰 당 100 μ l TMB 기질(락랜드(Rockland))의 첨가 전에 플레이트를 3회 세척하였다. 1N H₂SO₄의 웰 용적 당 50 μ l로 퀸칭하기 전에 실온에서 15분 동안 HRP 반응을 진행하였다. 분광학적 흡광도를 450nm 과장에서 측정하였다.

[0337] h. SDS-PAGE

[0338] SDS-폴리아크릴아마이드 겔 상의 전기영동을 다음과 같이 수행하였다. 1xLDS 샘플 완충제(라이프 테크놀로지) 중의 0.1 내지 1 μ g TTR 또는 pH 4.0-TTR을 10% NuPAGE 비스-트리스 겔 상에 부하하고 나서, 일정한 90V에서 105분 동안 MES 완충제 중에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후에, 겔을 인스턴트 블루(Instant Blue)(엑스페데온(Expedeon))에서 염색하거나 또는 웨스턴 블롯 분석을 위해 나이트로셀룰로스 필터에 옮겼다.

[0339] i. 천연-PAGE

[0340] 천연 트리스-글리신 겔 상의 전기영동을 다음과 같이 수행하였다. 1x트리스-글리신 샘플 완충제(라이크 테크놀로지) 중의 0.1 내지 1 μ g TTR 또는 pH 4.0-TTR을 10 내지 20% 트리스-글리신 겔 상에 부하하고 나서, 일정한 120V에서 105분 동안 1x 천연 트리스-글리신 실행 완충제 중에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동 후에, 겔을 인스턴트 블루(Instant Blue)(엑스페데온(Expedeon))에서 염색하거나 또는 웨스턴 블롯 분석을 위해 나이트로셀룰로스 필터에 옮겼다.

[0341] j. 웨스턴 블롯

[0342] SDS- 또는 천연-PAGE 겔을 나이트로셀룰로스 필터 페이퍼(iBlot, P7 프로그램) 상에서 블롯팅하고 나서, 차단

완충제(리퀴르(Licor))로 30분 동안 차단하였다. 이어서, 필터를 1시간 동안 실온에서(또는 밤새 4°C에서) 차단 완충제 중에서 0.5 μ g/ml 1차 항체에서 인큐베이션시킨 다음, 1xTBS로 3회, 10분 세척한다. 차단 완충제 중에서 1:20,000로 희석시킨 IRDye 800CW-컨쥬게이팅 염소-항 마우스 2차에 필터를 넣었다. 1시간 동안 실온에서 2차 항체 용액 중에서 필터를 인큐베이션한 후에, 필터를 세척하고 나서, 오디세이(Odyssey) CLx 적외선 이미저(리코르(Licor)) 상에서 영상화하였다.

[0343] k. TTR 섬유 형성 분석 프로토콜

50mM 아세트산나트륨, pH 4.8 중의 3.6 μ M(0.2mg/ml) TTR-Y78F의 용액을 1.4 μ M(0.2mg/ml) 미스-TTR 항체 또는 아이소타입 대조군의 존재 하에 37°C에서 72시간 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후에, 5X 몰 과량의 티오플라빈-T를 혼합물에 첨가하고 나서, 30분 동안 결합시켰다. 형광 측정을 방출 파장 480nm와 함께 440nm로 설정한 여기 파장에서 측정하였다. 0% 저해를 아이소타입 대조군 항체의 존재 하에 형광 광도(83 a.u.)로서 설정하였고, 100% 저해지점을 TTR-Y78F 단백질(38 a.u.)이 없는 형광으로서 설정하였다.

[0345] l. 심장 조직 샘플

ATTR 돌연변이의 진단이 확인된 심장 조직의 새로운 냉동 및 파라핀-처리 블록을 인디애나 유니버시티(Indiana University)의 메릴 벤슨(Merrill Benson) 박사로부터 얻었다. 샘플은 8개의 새로 냉동한 샘플 및 6개의 FFPE 샘플을 포함하였고, 각각의 샘플을 ATTR 또는 일부 다른 심장 아밀로이드증으로 진단하였다. 조직의 진단을 TTR 항체에 의한 특성규명 전에 카파 및 람다 경쇄 및 아밀로이드 A에 대한 항체에 의한 IHC 염색을 통해 프로테나(Prothena)에서 추가로 확인하였다.

[0346] m. 면역조직화학

가볍게 파라폼알데하이드 고정시킨, 10 μ m 슬라이드-장착 동결절편 상에서 그리고 5 μ m 파라핀 절편상에서 면역조직화학을 수행하였다. 이뮤노페옥시다제 방법은 원칙적 검출 시스템이었고, 이를 결합 중합체 정련 검출 키트(Bond Polymer Refine Detection Kit)(DS980, 레이카 바이오시스템즈(Leica Biosystems))를 이용하여 레이카 본드 Rx(Leica Bond Rx)(일리노이주 베팔로 그로브에 소재한 레이카 바이오시스템즈(Leica Biosystems)) 상에서 수행하였다. 1차 항체를 1시간 동안 (표 2의 농도에 따라) 인큐베이션시킨 다음, 항-마우스 및 항-토끼 중합체 HRP-링커 항체 컨쥬게이트와 함께 인큐베이션시켰다. 갈색 침착물을 생성하는 DAB 색원체를 이용하여 염색을 시각화하였다. 슬라이드를 해마톡실린을 이용하여 반대염색하고 나서, 일련의 상승 알코올 중에서 탈수하고, 자일렌 중에서 클리어런스하고 나서, 사이토실(CytoSeal) 60(미시간주 캘러미주에 소재한 리차드 앤더슨 사이언티픽(Richard Allen Scientific))으로 커버슬립하였다. 음성 대조군은 비면역 IgG 아이소타입 대조군 또는 1차 항체의 생략을 이용하여 인접한 절편 상에서 전체 면역조직화학적 절차를 수행하는 것으로 이루어졌다.

[0347] n. 아밀로이드의 입증: 콩고 레드 및 티오플라빈 T 염색

아메리칸 마스터 테크(American MasterTech)(캘리포니아주 로디에 소재)로부터의 키트를 이용하여 조직 내 TTR 아밀로이드를 입증하기 위해 콩고 레드 염색을 수행하였다. 제조업자의 절차에 따라 염색을 수행하였다. 슬라이드를 1시간 동안 콩고 레드 용액 중에서 염색한 다음 대략 15초 동안 1% 수산화나트륨 중에서 분화시켰다. 이어서, 슬라이드를 실행 중인 물 중에서 린스하고 나서, 증가되는 농도의 알코올 시리즈를 통해 탈수시키고, 자일렌의 3회 변화를 통해 클리어런스하고, 사이토실(CytoSeal) 60으로 커버슬립하였다.

[0348] o. 변형된 티오플라빈 T 염색 프로토콜(Schmidt et al 1995.)을 사용하여 조직 내 TTR 아밀로이드의 존재를 결정하였다. 간략하게, 슬라이드를 마이어(Mayer) 해마톡실린으로 반대염색하고 나서, 실행 중인 물 중에서 린스하고, 50% 에탄올 중에서 10분 동안 0.015% 티오플라빈 T(T3516-25G; 미주리주 세인트 루이스에 소재한 시그마-알드리치사(Sigma-Aldrich))의 여과 용액으로 염색하였다. 이어서, 슬라이드를 실행 중인 물 중에서 린스하고 나서, 10분 동안 1%(v/v) 아세트산 중에서 분화시키고, 수 중에서 3회 린스하였다. 슬라이드를 프로롱 골드(ProLong Gold)(라이프 테크놀로지즈)로 커버슬립하기 전에 공기 건조시켰다.

[0349] p. 영상 분석

올림푸스(Olympus) BX61 현미경, 하마마츠 나노주머(Hamamatsu Nanozoomer) 2.0HT 디지털 슬라이드 스캐너 또는 레이카(Leica) SPE 스펙트럼 공초점 시스템 중 하나를 이용하여 슬라이드를 영상화하였다. 영상을 수집하고 나서, TIFF 파일로서 저장하였다.

[0350] q. SDS-PAGE/웨스턴에 의한 인간 혈장 샘플의 분석

[0355] V30M ATTR에 대해 확인한 환자로부터의 6개 혈장 샘플(샘플 #21, #22, #23, #24, #25, #27) 및 정상 대상체로부터의 6개 샘플(샘플 #11, #12, #15, #18, #19, #20)을 엠. 사라이바(포르투갈에 소재한 포르토 유니버시티(Porto University))로부터 얻었다. 샘플 #C6은 상업적 공급업자(바이오레클라메이션IVT(BioreclamationIVT))로부터 얻은 정상 인간 혈청 샘플이었다. 이들 혈장 샘플을 다음과 같이 9D5를 이용하여 SDS-PAGE 및 웨스턴 블로트에 의해 분리하였다. 1.4 μ l 용적의 혈장을 환원제(라이프 테크놀로지즈) 없이 1xLDS 샘플 완충제에 1:8로 희석시켰다. 샘플에 SDS-PAGE 분리를 실시하고 나서, 앞서 기재한 바와 같이 0.5 μ g/ml 9D5로 웨스턴 블로팅하였다.

[0356] q. 메조스케일 디스커버리(MSD) 플레이트 분석에 의한 인간 혈장 샘플의 분석

[0357] 96-웰 MSD 플레이트를 PBS 중에서 4 μ g/ml의 농도에서 단클론성 항체 6C1로 코팅하고 나서, 실온에서 2시간 동안 진탕하면서 또는 4°C에서 밤새 인큐베이션시켰다. 플레이트를 1xTBST로 3회 세척한 후에, 1시간 진탕 동안 3% MSD 차단제 A 용액, 웰 당 150 μ l로 차단하였다. 0.6% 무 글로불린 소 혈청 알부민, 1.5mM 일염기성 인산나트륨, 8mM 이염기성 인산나트륨, 145mM 염화나트륨, 0.05% 트리톤 X-405 및 0.05% 티메로살을 포함한 샘플 완충제 중에서 1:10으로 희석시킨 인간 혈장 샘플의 웰 당 30 μ l 용적을 차단시킨 MSD 플레이트에 1시간 동안 첨가하였다. 플레이트를 1xTBST를 이용하여 3회 세척하였다. 샘플 완충제 중의 1 μ g/ml 설포-태그된 검출 항체(다코 다클론성 항체의 8C3 총 TTR 항체 중 하나)의 웰 당 50 μ l 용적을 진탕하면서 실온에서 1시간 동안 첨가하였다. 플레이트를 1xTBST로 3회 세척한 다음, 웰 당 150 μ l의 1X 판독 완충제 T 용액(메조 스케일 디스커버리)을 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 MSD 섹터 이미저(MSD Sector imager)에서 판독하였다.

[0358] r. MSD 표준 곡선의 생성

[0359] 인간 혈장 샘플 중에 존재하는 비천연, 6C1-반응성 TTR 단백질의 양을 정량화하기 위해, 6C1-반응성 TTR 표준으로서 재조합 TTR-F87M/L110M을 이용하여 MSD 표준 곡선을 생성하였다. 이 TTR 변이체는 사량체 형성을 방지하고 단량체 내 단백질을 유지하는 2개의 아미노산을 함유한다(Jiang et al. (2001) Biochemistry 40, 11442-11452). 그렇게 해서, 이 TTR 변이체는 모든 미스-TTR mAb에 의해 인식되며, 따라서 MSD 분석에서 기준 표준으로서 사용에 매우 적합하다.

[0360] 표준 곡선을 생성하기 위해, 96-웰 MSD 플레이트를 PBS 중에서 4 μ g/ml의 농도에서 미스-TTR 항체 6C1로 코팅하고 나서, 실온에서 2시간 동안 진탕하면서 또는 4°C에서 밤새 인큐베이션시켰다. 플레이트를 1xTBST로 3회 세척한 후에, 1시간 진탕 동안 3% MSD 차단제 A 용액, 웰 당 150 μ l로 차단하였다. 이어서, 차단한 플레이트를 웰 당 50 μ l의 1:5로 연속 희석시킨 25 μ g/ml TTR-F87M/L110M으로 1시간 동안 처리하였고, 최종 희석은 완충제 블랭크이다. 플레이트를 1xTBST로 3회 세척한 후에, 진탕하면서 실온에서 1시간 동안 웰 당 50 μ l 용적의 1 μ g/ml 설포-태그 검출 항체(8C3-설포 태그 또는 다코 pAb-설포태그)를 첨가하였다. 8C3 mAb와 다코 항체는 둘 다 설포태그에 결합하였고, 검출 항체로 사용할 수 있는데, 그들이 총 TTR에 결합하고, 입체배좌 특이적이지 않기 때문이다.

[0361] 검출 항체에 의한 처리 후에, 플레이트를 웰 당 150 μ l 용적의 1xTBST로 3회 세척한 다음, 웰 당 150 μ l의 1X 판독 완충제 T(MSD)를 첨가하였다. 플레이트를 MSD 섹터 이미저에서 판독하고 나서, 얻어진 TTR F87M/L110M 교정 곡선을 생성하였다.

[0362] 실시예 10. 유전자 이식 마우스 모델에서 미스-TTR 항체의 평가

[0363] 응집된 hTTR의 결합 및 제거에서 항-TTR 항체의 효능을 평가하기 위해 인간화된 유전자 이식 마우스 모델 V30M hTTR에서 생체내 연구를 수행한다(Inoue et al., (2008) Specific pathogen free conditions prevent transthyretin amyloidosis in mouse models. Transgenic Research 17:817-826).

[0364] 표준 절차를 이용하여 유전자 이식 마우스를 사육하고, 그들의 순환 hTTR 수준을 ELISA에 의해 평가한다. 후속 효능 연구를 위해 200 내지 400 μ g/ml의 hTTR의 혈청 수준을 갖는 마우스를 사용한다. 연구의 제1 설정은 유전자 이식 마우스에서 hTTR의 천연 침착을 시험한다. hTTR 침착물의 검출을 12개월령에 시작하고, 이후에 3 내지 6개 월마다 반복한다. 일단 허용 가능한 수준의 응집물이 유전자 이식 마우스에서 보이면, 효능 연구를 개시한다. 동물을 3개의 처리군(n=10/그룹)으로 나누고 나서, 비히클, 대조군 항체(아이소타입 대조군, 10mpk) 또는 항-hTTR 항체(10mpk)의 IP 용량으로 4주 동안 매주 처리한다. 마지막 처리의 1주 후에, 마우스를 안락사시키고 나서, 조직을 수집하고, 가공한 다음에, 염색하여 남아있는 TTR 침착물의 수와 크기를 평가한다. 정량적 방법 및 통계를 사용하여 그룹 중에서 보이는 클리어런스 정도를 결정한다.

[0365] 대안의 접근에서, hTTR 응집물을 시험관 내에서 준비하고, 이어서, 새로운 응집물의 침착을 파종하기 위해 유전

자 이식 마우스의 신장에 주사한다. 본 출원인은 이를 제제의 주사가 예측 가능한 방식으로 새로운 응집물의 침착을 더 신속히 처리할 수 있다는 것을 결정하였다. 이를 발견에 기반하여, 동물에게 진정제를 투여하고, 좌측 신장을 노출시키고 나서, 사전 응집된 hTTR 물질을 신장의 피질에 주사하였다. 적합한 회복 기간 후에, 동물을 3개의 처리군(n=10/그룹)으로 나누고 나서, 비히클, 대조군 항체(아이소타입 대조군, 10mpk) 또는 항-hTTR 항체(10mpk)의 IP 용량으로 48주 동안 매주 처리한다. 마지막 처리의 1주 후에, 마우스를 안락사시키고 나서, 신장을 수집하고, 가공한 다음에, 염색하여 TTR 침착물의 수와 크기를 평가한다. 정량적 방법 및 통계를 사용하여 그룹 중에서 보이는 변화 정도를 결정한다.

[0366] 실시예 11. 매트리겔(Matrigel) 이식물 모델에서 미스-TTR 항체의 평가

[0367] 본 출원인은 사전 응집된 hTTR이 매트리겔(BD 바이오사이언시즈(BD Bioscience), 카탈로그 번호 354263)에서 혼탁되어, 고형화되고, 이어서 마우스의 피하에 놓일 수 있다는 것을 결정하였다. 이식 후 4주에, 매트리겔 이식물은 그의 구조를 유지하였고, 응집된 hTTR은 여전히 이식물 내에 존재하였다. 게다가, 이식물을 마우스에 의해 잘 용인되었고, 항-hTTR 항체는 매트리겔 중에서 혼탁되는 응집물에 침투하고 결합할 수 있었다. 이를 발견에 기반하여, 항체 효능 연구를 수행한다. 동물에 진정제를 투여하고, 매트리겔에서 혼탁시킨 사전 응집된 hTTR을 함유하는 이식물을 마우스에 피하로 넣었다. 적합한 회복 기간 후에, 동물을 3개의 처리군(n=10/그룹)으로 나누고 나서, 비히클, 대조군 항체(아이소타입 대조군, 10mpk) 또는 항-hTTR 항체(10mpk)의 IP 용량으로 2 내지 4주 동안 매주 처리한다. 마지막 처리 후에, 마우스를 안락사시키고 나서, 이식물을 함유하는 피부를 수집하고 나서, 가공하고, 이어서, 조직학 및/또는 생화학적 방법을 이용하여 남아있는 TTR 침착물의 양을 평가하였다. 정량적 분석 및 통계를 사용하여 그룹 중에서 보이는 클리어런스 정도를 결정한다.

도면

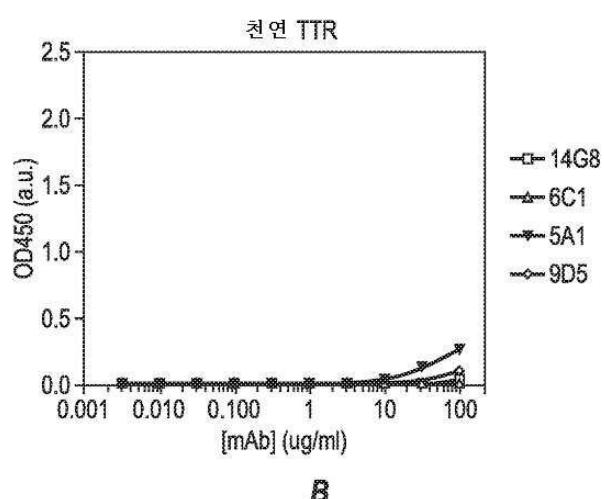
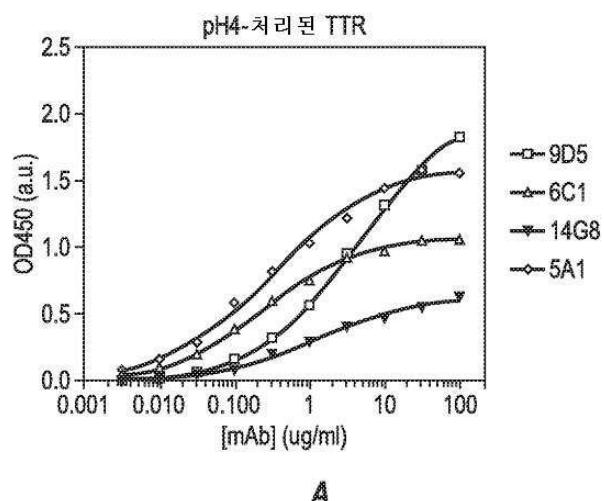
도면1

	10	20	30	40	
m6C1VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	GFTFS	NYYMSWVRQ T	40	
2OTU_B.pro	QVQLQESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	GFTFRDYYM	Y WVRQ	40	
ADX65650	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFS	SYEMN WVRQA	40	
Hu6C1VHv1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFS	NYYMS WVRQA	40	
Hu6C1VHv1b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFS	NYYMS WVRQA	40	
Hu6C1VHv2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFS	NYYMS WVRQA	40	
Hu6C1VHv2b	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	GFTFS	NYYMS WVRQA	40	
Hu6C1VHv3	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	GFTFS	NYYMS WVRQA	40	
Hu6C1VHv3b	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	GFTFS	NYYMS WVRQA	40	
	50	60	70	80	
m6C1VH	PEKRLEWVAYISIDGN	NNIYHPDSV	KGRFTI	SRDN	AKNTLY
2OTU_B.pro	PEKRLEWVAFISNGG	STYYPD	TVKGRFTI	SRDN	AKNTLY
ADX65650	PGKGLEWV	SYI	SSGSTI	YYADSV	KGRFTI
6C1VHv1	PGKGLEWV	SYI	IDGN	NNIYHPDSV	KGRFTI
Hu6C1VHv1b	PGKGLEWV	YAYISIDG	NNIYHPDSV	KGRFTI	SRDN
Hu6C1VHv2	PGKGLEWV	YAYISIDG	NNIYHPDSV	KGRFTI	SRDN
Hu6C1VHv2b	PGKGLEWV	YAYISIDG	NNIYHPDSV	KGRFTI	SRDN
Hu6C1VHv3	PGKGLEWV	YAYISIDG	NNIYHPDSV	KGRFTI	SRDN
Hu6C1VHv3b	PGKGLEWV	YAYISIDG	NNIYHPDSV	KGRFTI	SRDN
	90	100	110		
m6C1VH	LQMSSLKSEDTAM	YYCARDSDYGYFDV	WGQGT	TTV	VSS 118 (서열번호 1)
2OTU_B.pro	LQMSSLKSEDTAM	YYCARDGRGYVWFAY	WGQGT	TTV	VSS 118 (서열번호 2)
ADX65650	LQMNSRLKSEDTAV	YYCARDLGSYYGY	WGQGT	TLVT	VSS 118 (서열번호 3)
Hu6C1VHv1	LQMNSLRAEDTAV	YYCARDSDYGYFDV	WGQGT	TLVT	VSS 118 (서열번호 4)
Hu6C1VHv1b	LQMNSLRAEDTAV	YYCARDSDYGYFDV	WGQGT	TLVT	VSS 118 (서열번호 5)
Hu6C1VHv2	LQMSSLRAEDTAV	YYCARDSDYGYFDV	WGQGT	TLVT	VSS 118 (서열번호 6)
Hu6C1VHv2b	LQMSSLRAEDTAV	YYCARDSDYGYFDV	WGQGT	TLVT	VSS 118 (서열번호 7)
Hu6C1VHv3	LQMNSLKAEDTAM	YYCARDSDYGYFDV	WGQGT	TLVT	VSS 118 (서열번호 8)
Hu6C1VHv3b	LQMNSLKAEDTAM	YYCARDSDYGYFDV	WGQGT	TLVT	VSS 118 (서열번호 9)

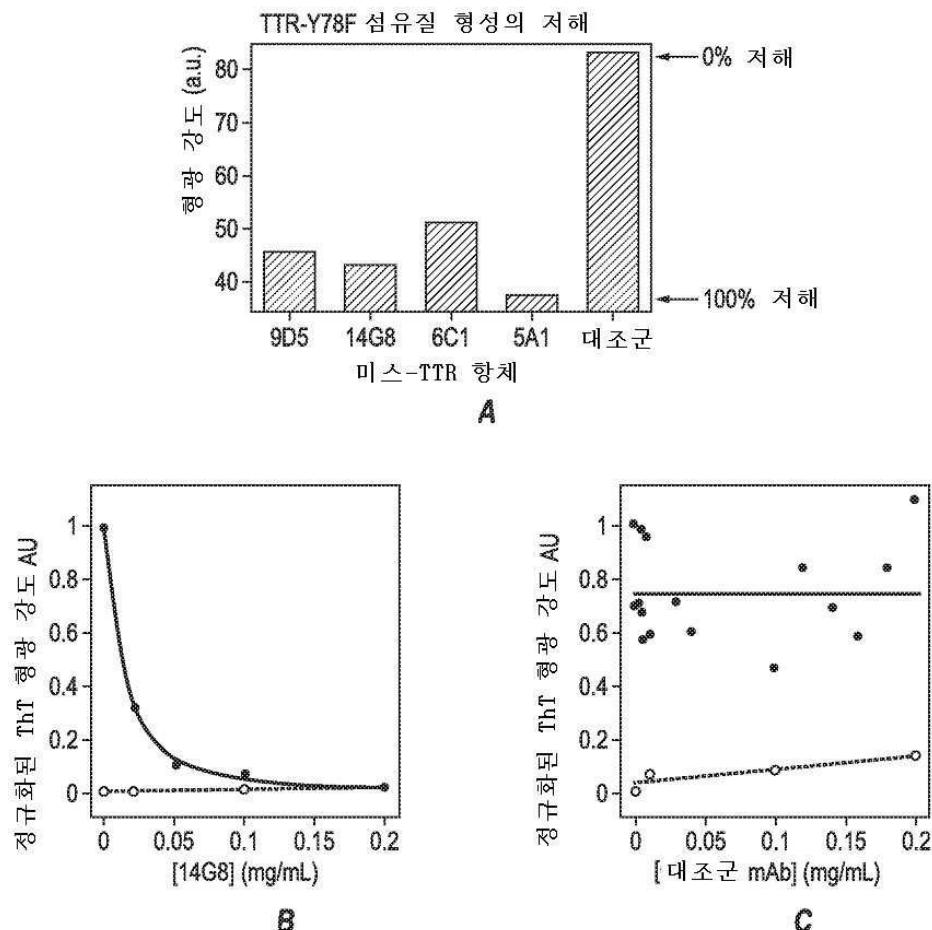
도면2

	10	20	30	40
m6C1VL	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEW			40
3EYS_L_St.pro	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEW			40
ABI74084	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNYLDW			40
Hu6C1VLv1	DVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEW			40
Hu6C1VLv2	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVHSNGNTYLEW			40
	50	60	70	80
m6C1VL	YLQKRGQSPKLLIYKVSKRFSGVPDFRSGSGSGTDFILKI			80
3EYS_L_St.pro	YLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDFRSGSGSGTDFTLKI			80
ABI74084	YLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDFRSGSGSGTDFTLKI			80
Hu6C1VLv1	YLQKPGQSPKLLIYKVSKRFSGVPDFRSGSGSGTDFTLKI			80
Hu6C1VLv2	YLQKPGQSPKLLIYKVSKRFSGVPDFRSGSGSGTDFTLKI			80
	90	100	110	
m6C1VL	SRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGGGTKEELK	112	(서열번호 13)	
3EYS_L_St.pro	SRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELK	112	(서열번호 14)	
ABI74084	SRVEAEDVGVYYCMQGLQTPLTFGGGTKEIK	112	(서열번호 15)	
Hu6C1VLv1	SRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGGGTKEIK	112	(서열번호 16)	
Hu6C1VLv2	SRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGGGTKEIK	112	(서열번호 17)	

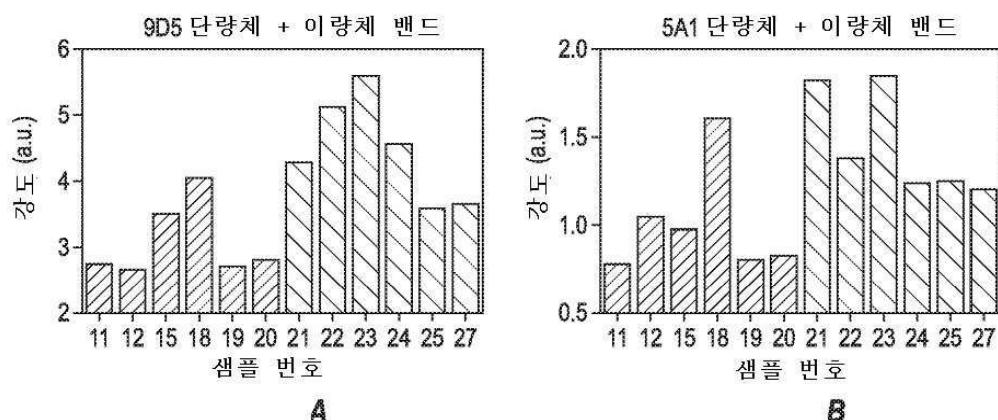
도면3



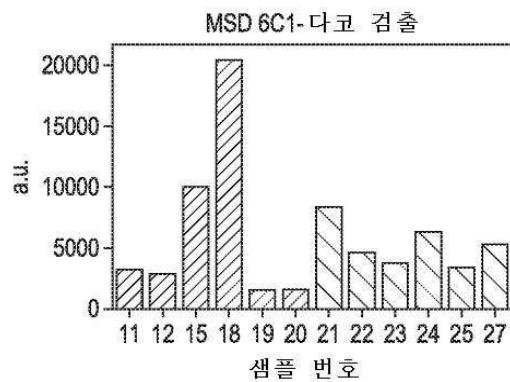
도면4



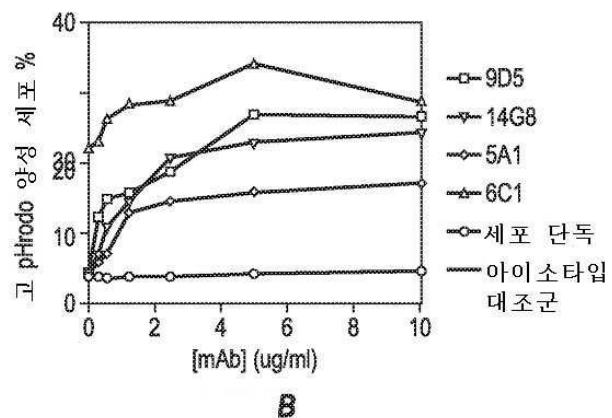
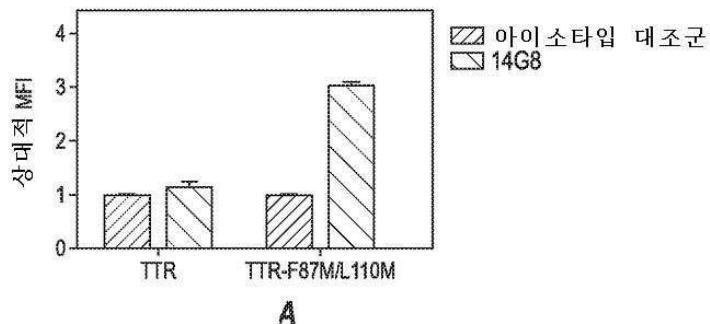
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Prothena Biosciences Limited

University Health Network

<120> ANTI-TRANSTHYRETIN ANTIBODIES

<130> WO/2016/120809

<140> PCT/IB2016/050414

<141> 2016-01-28

<150> US 62/109,001

<151> 2015-01-28

<150> US 62/266,557

<151> 2015-12-11

<160> 63

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Arg Gly Tyr Val Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 3

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Arg Asp Leu Ser Gly Ser Tyr Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Asn Tyr
 20 25 30

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

Ser Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 5		
<211> 118		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthesized		
<400> 5		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
		15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr		
20	25	30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75
		80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser		
115		
<210> 6		
<211> 118		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthesized		
<400> 6		

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Asn Tyr

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

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val

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

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

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

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

85	90	95
----	----	----

Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100	105	110
-----	-----	-----

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Asn Tyr

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

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

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

Ala Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val

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

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 10

Asn Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 11

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

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

Gly

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 12

Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val

1	5		
---	---	--	--

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 13

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

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Arg Gly Gln Ser

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

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

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

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 14

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

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 15

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 16

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 16

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 17

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 18

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 19

Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 20

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 21

<211> 411

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 21

atgaacttg gttcagctt gatttcctt gtcctgttt taaaagggtgt gaagtgtcaa 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggccctt gaaactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac ttttagtaac tattacatgt ctgggttcg ccagactcca 180

gagaagaggc tggagtgggt cgcatcatt agtattgtg gtaataatat ctaccatcca 240

gacagtgtga agggtcgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300

caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag agacagtgc 360
 tacggctact tcgatgtctg gggcacaggg accacggtca ccgtctcctc a 411

<210> 22

<211> 137

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 22

Met Asn Phe Gly Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Val Leu Lys Gly

1 5 10 15

Val Lys Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60
Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro
65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 23

<211> 393

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 23

atgaagttgc ctgttaggct gttggcgtg atgttctgga ttcctgcttc cagcagtat 60

gtttgtatca cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttgcatat ctatgtacat agtaatggaa acacctattt agaatggatc 180
 ctgcagaac gaggccagtc tccaaagtc ctgtatcaca aagttccaa acgatttct 240
 ggggtcccag acaggatcg tggcgttgaa tcagggacag atttatactt caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagttat tactgcttc aaggatcaca tggtccgctc 360
 acgttcggtg gtggcacaa gctggagctg aaa 393

<210> 24

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 24

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala

1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val

20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile

35 40 45

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

50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys

100 105 110

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

115 120 125

Glu Leu Lys

130

<210> 25

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

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

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

290	295	300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	325	330
<210> 27		
<211> 330		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Synthesized		
<400>		
27		
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
65	70	75
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
85	90	95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
100	105	110
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
160		

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 28

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 28

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

1 5 10 15

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

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

<210> 29
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthesized
<400> 29

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

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

<210> 30

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400>

> 30

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

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

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

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

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

435

440

445

<210> 31

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 31

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

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

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

435 440 445

<210> 32

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 32

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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 Asn Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

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

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

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

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 33

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
180	185	190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
210	215	220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
225	230	235
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		240
245	250	255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
260	265	270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr		
305	310	315
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		320
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		400
405	410	415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 34

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 35

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 35

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145	150	155	160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
165	170	175	
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
180	185	190	
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			
195	200	205	
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
210	215	220	
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
245	250	255	
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
260	265	270	
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
275	280	285	
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
290	295	300	
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			
325	330	335	
Ile Ser Lys Ala Lys Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
340	345	350	
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
355	360	365	
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
370	375	380	
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 36

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 36

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

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

<210> 37

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 37

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

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

35 40 45

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

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

100 105 110

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

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

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

210	215	
<210> 38		
<211> 147		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 38		
Met Ala Ser His Arg Leu Leu Leu Cys Leu Ala Gly Leu Val Phe		

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

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

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

115 120 125

Ala Leu Leu Ser Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Ala Val Val Thr Asn

130 135 140

Pro Lys Glu

145

<210> 39

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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

1 5 10 15

Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val Ala Val His Val

20 25 30

Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe Ala Ser Gly Lys

35 40 45

Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr Glu Glu Gln Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

<210> 40

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

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

100 105 110
 Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Ala Val Val Thr Asn Pro Lys Glu
 115 120 125

<210> 41

<211> 138

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Met Ala Ser His Arg Leu Leu Leu Cys Leu Ala Gly Leu Val Phe
 1 5 10 15
 Val Ser Glu Ala Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu
 20 25 30

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

85	90	95
----	----	----

Ser Tyr Trp Lys Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

Thr Thr Ala Val Val Thr Asn Pro Lys Glu

130	135	
-----	-----	--

<210> 42

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 42

Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala

1	5	
---	---	--

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 43

Gly Gly Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala Gly Gly Lys Gly

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

<210> 44

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 44

Cys Gly Gly Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala

1 5 10

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 45

Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala Cys Gly Gly

1 5 10

<210> 46

<211> 990

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 46

gcctccacca aggtccatc ggtttcccc ctggcacct cctccaagag cacctctggg 60

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtaag gactacttcc cgaaccgggt gacggtgtcg 120

tggaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccccttcc cggctgtctt acagtcccta 180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcagcttggg caccaggacc 240

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300

aaatcttgt acaaactca cacatgccca ccgtccccag cacctgaact cctgggggga 360

ccgtcagtct tcctttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 420

gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtaa gttcaactgg 480

tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac 540

agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600

gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660

aaagccaaag ggcagcccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccggaggag 720

atgaccaaga accaggttag cctgacctgc ctggtaaag gcttctatcc cagcgacatc 780

gccgtggagt gggagagcaa tggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctccgtg 840

ctggactccg acggctcctt cttccttat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900

cagcagggga acgtttctc atgctccgtg atgcattgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc cccggtaaa 990
 <210> 47
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthesized
 <400> 47
 cgaactgtgg ctgcaccatc tgtttcatc ttccgcatt ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagggc caaagtacag 120

 tggaagggtgg ataacgcctt ccaatcggtt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcaggccc tgagctgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagatgt t 321
 <210> 48
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthesized
 <400> 48
 actgtggctg caccatctgt cttcatcttcccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120

 aagggtggata acgcctcca atcggttaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
 aaggacagca cttacagcct cagcagcacc ctgacgtga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
 cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgccgt cacaaagagc 300
 ttcaacaggg gagagtgt 318
 <210> 49
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Synthesized

<400> 49

Met Asn Phe Gly Phe Ser Leu Ile Phe Leu Val Val Leu Lys Gly

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

Val Lys Cys

<210> 50

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 50

atgaactttg gttcagctt gatttcctt gtccttgtt taaaagggtt gaagtgt 57

<210> 51

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 51

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala

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

Ser Ser Ser

<210> 52

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 52

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttccctgcttc cagcagt 57

<210> 53

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 53

gatgtttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgaga tcaaggctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gaggcattgt a catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120
 tacatgcaga aacgaggcca gtctccaaag ctccctgatct acaaaggttt caaacgattt 180
 tctgggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcat actcaagatc 240
 agcagagtgg aggtcgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggttc acatgttccg 300

ctcacgttcg gtgggtggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 54

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 54

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc tttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacttttagt aactattaca tgtcttgggt tcgccagact 120
 ccagagaaga ggctggagtg ggctgcatac attagtattg atggtaataa tatctaccat 180
 ccagacagtg tgaagggtcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagagacagt 300

gactacggct acttcgatgt ctggggcaca gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 55

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 55

gaggtgcagc tggtgagtc cggcgccgc ctgggcagc cggcgctc cctgcgcctg 60
 tcctgcgcgc cctccggctt caccttctcc aactactaca tgtcctgggt ggcaggccc 120
 cccggcaagg gcctggagtg ggtgtctac atctccatcg acggcaacaa catctaccac 180
 cccgactccg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgctg cggcgaggac accggcggtt actactgcgc ccgcgactcc 300

gactacggct acttcgacgt gtggggccaa ggcaccctgg tgaccgtgtc ctca 354

<210> 56

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 56

gaggtgcagc tggtgagtc cggcgccgc ctgggcagc cggcgctc cctgcgcctg 60
 tcctgcgcgc cctccggctt caccttctcc aactactaca tgtcctgggt ggcaggccc 120
 cccggcaagg gcctggagtg ggtgtctac atctccatcg acggcaacaa catctaccac 180
 cccgactccg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgctg cggcgaggac accggcggtt actactgcgc ccgcgactcc 300

gactacggct acttcgacgt gtggggccaa ggcaccctgg tgaccgtgtc ctca 354

<210> 57

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 57

gaggtgcagc tggtgagtc cggcgccgc ctgggcagc cggcgctc cctgcgcctg 60
 tcctgcgcgc cctccggctt caccttctcc aactactaca tgtcctgggt ggcaggccc 120
 cccggcaagg gcctggagtg ggtgtctac atctccatcg acggcaacaa catctaccac 180
 cccgactccg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagtc caccctgtac 240
 ctgcagatgt cttccctgctg cggcgaggac accggcggtt actactgcgc ccgcgactcc 300

gactacggct acttcgacgt gtggggccaa ggcaccctgg tgaccgtgtc ctca 354

<210> 58

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 58

gagggtgcagc tgggtggagtc cggcgccggc ctgggtgcagc ccggcggtc cctgcgcctg 60
 tcctgcgcgg cctccggctt caccttctcc aactactaca tgtcctgggt ggcgcaggcc 120
 cccggcaagg gcctggagtg ggtggctac atctccatcg acggcaacaa catctaccac 180
 cccgactccg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagtc caccctgtac 240
 ctgcagatgt cttccctgcg cgccgaggac accgcccgtgt actactgcgc ccgcgactcc 300

gactacggct acttcgacgt gtggggccaa ggcaccctgg tgaccgtgtc ctca 354

<210> 59

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 59

gagggtgcagc tgggtggagtc cggcgccggc ctgggtgcagc ccggcggtc cctgaagctg 60
 tcctgcgcgg cctccggctt caccttctcc aactactaca tgtcctgggt ggcgcaggcc 120
 cccggcaagg gcctggagtg ggtggctac atctccatcg acggcaacaa catctaccac 180
 cccgactccg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgaa ggccgaggac accgcccgtgt actactgcgc ccgcgactcc 300

gactacggct acttcgacgt gtggggccaa ggcaccctgg tgaccgtgtc ctca 354

<210> 60

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 60

gaggtgcgc tggtggagtc cggcggcggc ctggcgcagc cccggcgctc cctgaagctg 60
 tcctgcgcgg cctccggctt caccttctcc aactactaca tgtcctgggt ggcgcggacc 120
 cccggcaagg gcctggagtg ggtggcctac atctccatcg acggcaacaa catctaccac 180
 cccgactccg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgaa ggccgaggac accgcccattgt actactgcgc ccgcgactcc 300

gactacggct acttcgacgt gtggggccaa ggcaccctgg tgaccgtgtc ctca 354

<210> 61

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 61

gacgtggta tgaccaggac cccccctgtcc ctgcccgtga ccccccggcga gcccgcctcc 60
 atctcctgcc gctcctccca gtccatcgta cactccaacg gcaacacacta cctggagtgg 120
 tacctgcaga agcccgccca gtcccccaag ctgctgatct acaagggtgtc caagcgcttc 180
 tccggcgtgc ccgaccgctt ctccggctcc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
 tcccgctgg aggccgagga cgtggcgtg tactactgct tccagggtct ccacgtgccc 300

ctgacacctcg gccggcggcac caaggtggag atcaaa 336

<210> 62

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 62

gacatcgta tgaccaggac cccccctgtcc ctgcccgtga ccccccggcga gcccgcctcc 60
 atctcctgcc gctcctccca gtccatcgta cactccaacg gcaacacacta cctggagtgg 120
 tacctgcaga agcccgccca gtcccccaag ctgctgatct acaagggtgtc caagcgcttc 180
 tccggcgtgc ccgaccgctt ctccggctcc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
 tcccgctgg aggccgagga cgtggcgtg tactactgct tccagggtct ccacgtgccc 300

ctgacacctcg gccggcggcac caaggtggag atcaaa 336

<210> 63

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 63

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Tyr Met Ser

1

5

10