



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년08월31일
(11) 등록번호 10-0978684
(24) 등록일자 2010년08월23일

(51) Int. Cl.
C07K 16/22 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7024149
(22) 출원일자(국제출원일자) 2006년04월20일
심사청구일자 2007년10월19일
(85) 번역문제출일자 2007년10월19일
(65) 공개번호 10-2007-0114220
(43) 공개일자 2007년11월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/014943
(87) 국제공개번호 WO 2006/116002
국제공개일자 2006년11월02일
(30) 우선권주장
60/674,082 2005년04월22일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02005010049 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
일라이 릴리 앤드 캄파니
미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 릴리 코포
레이트 센터
(72) 발명자
데이비스, 줄리안
미국 92109 캘리포니아주 샌 디에고 아케이트 스트
트리트938
다킨슨, 크레이그, 듀안
미국 92129 캘리포니아주 샌 디에고 수시타 스트
리트15165
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영, 양영준

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 김지윤

(54) TGF 베타 1 특이적 항체

(57) 요약

성숙한 TGF 베타 2 및 성숙한 TGF 베타 3에 비해 성숙한 TGF 베타 1에 대해 특이적인 항체가 제공된다. 이러한 항체는 중쇄 GYRX1X2X3Y의 CDR3 (여기서, X1은 W 또는 A이고, X2는 F 또는 L이며, X3은 A, E 또는 Y이다)을 특징으로 한다.

(72) 발명자

후양, 리후아

미국 46032 인디애나주 카멜 코르삼 서클 3563

존스, 브라이언, 에드워드

미국 46032 인디애나주 카멜 비콘 파크 드라이브
14772

마르퀴스, 데이비드, 매튜

미국 92024 캘리포니아주 엔시니타스 메도우그린
코트2106

로린슨, 스콧, 윌리엄

미국 46077 인디애나주 지온스빌 오번 크릭 크로싱
11796

탕, 잉

미국 92129 캘리포니아주 샌 디에고 파크 빌리지
로드7179

바일란코트, 피터, 에드워드

미국 92014 캘리포니아주 텔 마 로자나 로드 2540

왓킨스, 제프리, 딘

미국 92024 캘리포니아주 엔시니타스 포추나 랜치
로드3442

특허청구의 범위

청구항 1

a) I. GYX₁FX₂DYNX₃X₄ (서열 2) [여기서, X₁은 D이고; X₂는 T이며; X₃은 I이고; X₄는 H임]의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1;

II. X₁X₂YPYDGY₃TGX₄NX₅KX₆KS (서열 3) [여기서, X₁은 Y이고; X₂는 I이며; X₃은 E이고; X₄는 Y이며; X₅는 Q이고; X₆은 F임]의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 및

III. GYRX₁X₂X₃Y (서열 4) [여기서, X₁은 W이고; X₂는 L이며; X₃은 A임]의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3

을 갖는, DM4의 중쇄 가변 영역 (HCVR)을 포함하는 HCVR; 및

b) I. X₁AX₂X₃X₄VX₅YMH (서열 5) [여기서, X₁은 R이고; X₂는 S이며; X₃은 S이고; X₄는 S이며; X₅는 S임]의 아미노산 서열을 포함하는 CDR1;

II. ATSNX₁AX₂ (서열 6) [여기서, X₁은 L이고; X₂는 Y임]의 아미노산 서열을 포함하는 CDR2; 및

III. X₁QWDX₂X₃X₄PA (서열 7) [여기서, X₁은 Q이고; X₂는 L이며; X₃은 N이고; X₄는 P임]의 아미노산 서열을 포함하는 CDR3

을 갖는, DM4의 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하는 LCVR

을 포함하는, 인간 TGF-β1을 중화시키고 인간 TGF-β1에 대한 K_d 값이 40 pM 미만인 항체 또는 그의 항원 결합성 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 인간 TGF-β2 및/또는 TGF-β3과의 교차 반응률이 20% 미만인 항체 또는 그의 항원 결합성 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 인간 TGF-β1에 대한 K_d 값이 35 pM 내지 0.1 pM 범위인 항체 또는 그의 항원 결합성 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 다음과 같은 4개의 중쇄 골격 영역과 4개의 경쇄 골격 영역을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합성 단편:

중쇄 골격 1은 서열 8에 제시된 아미노산 서열을 포함하고;

중쇄 골격 2는 서열 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하며;

중쇄 골격 3은 서열 10에 제시된 아미노산 서열을 포함하고;

중쇄 골격 4는 서열 11에 제시된 아미노산 서열을 포함하며;

경쇄 골격 1은 서열 12에 제시된 아미노산 서열을 포함하고;

경쇄 골격 2는 서열 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하며;

경쇄 골격 3은 서열 37에 제시된 아미노산 서열을 포함하고;

경쇄 골격 4는 서열 38에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.

청구항 5

제4항에 있어서, 서열 40에 제시된 아미노산 서열을 갖는 IgG4 불변 영역과 서열 41에 제시된 아미노산 서열을

갖는 카파 쇠 불변 영역을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합성 단편.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 서열 90에 제시된 DM4의 HCVR 및 서열 43에 제시된 DM4의 LCVR을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합성 단편.

청구항 8

제7항에 있어서, 서열 40에 제시된 아미노산 서열을 갖는 IgG4 불변 영역과 서열 41에 제시된 아미노산 서열을 갖는 카파 쇠 불변 영역을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합성 단편.

청구항 9

제1항 내지 제5항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합성 단편 및 제약상 허용 가능한 담체를 포함하는, 인간 대상체의 섬유증을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제5항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항의 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합성 단편 및 제약상 허용 가능한 담체를 포함하는, 인간 대상체의 섬유증을 치료하기 위한 의약.

청구항 11

제1항 내지 제5항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항의 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합성 단편 및 제약상 허용 가능한 담체를 포함하는, 인간 대상체의 만성 신부전을 치료하기 위한 의약.

청구항 12

제10항에 있어서, ACE 억제제와 병용해서 투여되는 것인 의약.

청구항 13

제11항에 있어서, ACE 억제제와 병용해서 투여되는 것인 의약.

청구항 14

제1항 내지 제5항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항의 항체 또는 그의 항원 결합성 단편 및 제약상 허용 가능한 담체를 포함하는, 인간 대상체의 암을 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제5항, 제7항 및 제8항 중 어느 한 항의 모노클로날 항체 또는 그의 항원 결합성 단편 및 제약상 허용 가능한 담체를 포함하는, 인간 대상체의 암을 치료하기 위한 의약.

청구항 16

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 개략적으로 TGF 베타 1 단백질과 관련된 조성물에 관한 것이다. 특히, 본 발명은, 예를 들어 세포 증식성, 자가면역/염증성, 심혈관계 및 섬유성 장애를 진단, 치료 및 예방하는데 유용하고, 상기 단백질의 핵산 및 아미노산 서열의 발현에 대한 외인성 화합물의 효과를 평가하는데 유용한, 정제된 결합성 조성물 및 관련 시약을 제공한다.

배경 기술

- [0002] 분비형 폴리펩티드 인자들로 이루어진 전환 성장 인자-베타 (TGF-베타) 상과의 제1 구성원인 TGF-베타 1은 대략 20년 전에 발견되었다. 그 후에 상기 단백질 과는 상당히 확장되어 현재에는 30가지 이상의 척추동물 유래 구성원과, 10여 가지의 구조적 및 기능적으로 관련된 비척추동물 (예: 벌레 및 파리) 단백질을 포함하고 있다 [참고: 예를 들어, Attisano & Lee-Hoeflich, 2001 Gen. Biol. 2, review 30101; Moustakas, et al., 2001 J. Cell Sci. 114:4359; Wrana, 2000 Cell 100:189]. TGF-베타 과의 구성원들은 많은 세포성 기능을 제어하고, 그들의 활성화는 수 많은 발생적 및 생체 항상성 과정을 조절하는데 있어 결정적이다. 실험 결과, 보존된 TGF-베타 신호 전달 경로가 척추동물, 벌레 및 파리들 간에 존재하는 것으로 밝혀졌다.
- [0003] 이 단백질 과의 한 구성원인 TGF-베타 1은 각종 세포성 과정, 예를 들어 세포 증식 및 분화, 이동, 분화, 세포 소멸 (apoptosis), 배아 발생, 세포외 매트릭스 형성, 뼈 발생, 상처 치유, 조혈, 및 면역 및 염증 반응에 관여한다 [참고: 예를 들어, Roberts, & Sporn 1990 Peptide Growth Factors and Their Receptors, pp. 419-72, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany; Massague, J. 1998 Annu. Rev. Biochem 67:753].
- [0004] 부가적으로, 전임상 및 임상 데이터는 TGF-베타 1이 간질성 섬유증에서의 매트릭스 단백질 침착의 주요 원인 물질이고, 상기 구성원이 수 많은 관련 섬유성 질병 상태, 예를 들어 신 섬유증 [이는 모든 형태의 만성 신 질환 (CRD)에 공통적인 증상임]의 개시와 진행에 관여한다는 것을 나타낸다. 신 섬유증의 정도는 만성 신부전증 [CRF; 이는 말기 신 질환 (ESRD)으로 알려져 있기도 함]으로의 진행과 실제적으로 상관이 있으며, 이로써 사망, 만성 투석, 또는 신장 이식을 야기시킬 수 있다.
- [0005] TGF-베타는 대다수의 신장 세포에 영향을 미치는 복잡하고도 다양한 사건들을 통하여 CRF와 연관이 있다 [참고: Bottinger, 2002, J. Am. Soc. Nephrol. 13: 2600]. 이들 사건은 궁극적으로는, 세뇨관간질성 섬유증과 사구체 경화증 둘 다를 야기시켜 네프론 (nephron) 기능 상실을 가져와 결과적으로 만성 신부전증을 일으킨다. 3가지 TGF-베타 이소형 중에서, TGF-베타 1이 만성 신 질환의 진행을 매개하는데 있어 우세한 것으로 여겨지는데, 이는 가장 우세하게 발현된 이소형으로서 간주될 뿐만 아니라 TGF-베타 2와 TGF-베타 3 둘 다도 TGF-베타 1 발현을 상향 조절함으로써 그들의 효과를 매개하는 것으로 여겨지기 때문이다 [참고: Yu, 2003, Kid. Int. 64, 844]. 결과적으로, CRD와 같은 장애의 해로운 효과를 예방하기 위해서는, TGF-베타 1 발현을 조정할 필요가 있다.
- [0006] 따라서, 새로운 TGF-베타 1 결합성 조성물의 발견은 만성 신 질환과 같은 섬유성 장애를 진단, 예방 및 치료하는데 유용한 조성물을 제공함으로써 당해 분야에서의 필요성을 충족시켜 준다.
- [0007] **발명의 요약**
- [0008] 본 발명은 부분적으로는, 성숙한 TGF 베타 2 및/또는 성숙한 TGF 베타 3에 비해 성숙한 TGF 베타 1과 특이적 및/또는 선택적으로 결합하고, 성숙한 TGF 베타 1을 중화시키는 개선된 특성을 지닌 결합성 조성물의 발견에 기초한다.
- [0009] 이들 결합성 조성물은 a) 다음 서열들 중의 하나 이상을 포함하는 제1 부분: GYRX₁X₂X₃Y [서열 4] [여기서, X₁은 W 또는 A이고; X₂는 F 또는 L이며; X₃은 A, E, 또는 Y임]; b) GYX₁FX₂DYNX₃X₄ [서열 2] [여기서, X₁은 T 또는 D이고; X₂는 T, E, 또는 F이며; X₃은 M, I, L, 또는 V이고; X₄는 H, V, 또는 A임]; 또는 c) X₁X₂YPYDGX₃TGX₄NX₅KX₆KS [서열 3] [여기서, X₁은 Y, Q, 또는 S이고; X₂는 I, 또는 V이며; X₃은 D, 또는 E이고; X₄는 Y, T, H, 또는 L이며; X₅는 Q, K, P, 또는 S이고; X₆은 F 또는 Y임]; 및/또는 b) 다음 서열들 중의 하나 이상을 포함하는 제2 부분: X₁QWDX₂X₃X₄PA [서열 7] [여기서, X₁은 Q 또는 S이고; X₂는 L, D, 또는 P이며; X₃은 N 또는 R이고; X₄는 P, F, Y, 또는 R임]; X₁AX₂X₃X₄VX₅YMH [서열 5] [여기서, X₁은 R, Y, E, 또는 Q이고; X₂는 S 또는 T이며; X₃은 S, V, 또는 A이고; X₄는 S 또는 L이며; X₅는 S, P, L, 또는 Y임]; 또는 ATSNX₁AX₂ [서열 6] [여기서, X₁은 L, N, 또는 P이고; X₂는 S, K, Y, L, M, F, E, Q, R, 또는 H임]을 포함하고; 상기 결합성 조성물은 a) 상기 제1 부분이 2개 이상의 상기 서열을 포함하거나; b) 상기 제1 부분이 상기 3개 서열을 포함하거나; c) 상기 제2 부분이 2개 이상의 상기 서열을 포함하거나; d) 상기 제2 부분이 상기 3개 서열을 포함하거나; e) 상기 제1 부분이 2개 이상의 상기 서열을 포함하고 제2 부분이 상기 3개 서열을 포함하거나; f) 상기 제2 부분이 2개 이상의 상기 서열을 포함하고 제1 부분이 상기 3개 서열을 포함하거나; 또는 g) 상기 제1 부분이 상기 3

개 서열을 포함하고 제2 부분이 상기 3개 서열을 포함할 수도 있고; 이러한 결합성 조성물의 결합 부위는 인간 TGF 베타-1의 폴리펩티드와 특이적으로 면역반응성이거나; 뮤린 TGF 베타-1의 폴리펩티드와 특이적으로 면역반응성이거나; 정제된 또는 재조합적으로 생성된 인간 TGF 베타-1 단백질 또는 그의 단편에 대항하여 생성되거나; 모노클로날 항체, 또는 특정 항체의 Fab, Fv, scFv, F(ab)2, 또는 가변 도메인 내에 있거나; 1개, 2개 또는 3개 이상의 보존적 치환물을 갖고 있거나; 또는 인간 또는 인간화 항체 골격 내에 있으며; 상기 결합성 조성물은 항체 분자이거나; 모노클로날 항체 분자이거나; 디아보디 (diabody) 분자이거나; 트리아보디 (triabody) 분자이거나; 테트라보디 (tetrabody) 분자이거나; 미니보디 (minibody) 분자이거나; 모노클로날 항형질이거나; 탐지 가능하게 표지되거나; 동결건조되거나; 멸균성이거나; 또는 완충 조성물 내에 있으며; 상기 결합성 조성물은 개선된 특성을 지닌 모노클로날 항체이다.

발명의 상세한 설명

I. 총론

본 발명이 본원에 기재된 특정한 조성물, 방법 및 기술로 제한되지 않는데, 이는 이러한 조성물, 방법, 및 기술들이 물론 다양할 수 있기 때문이란 것을 인지해야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어들은 단지 특정한 양태를 기재하기 위한 것이고, 이로써 본 발명의 범위가 제한되지 않으며, 본 발명의 범위는 첨부된 청구의 범위에 의해서만 제한된다.

첨부된 청구의 범위를 포함하여 본원에 사용된 바와 같은 단수 형태의 단어들에는, 예를 들어 달리 명백히 지시하지 않는 한은 그들의 상응하는 복수 형태가 포함된다. 따라서, 예를 들어 "유기체"에는 예를 들면, 한 가지 이상의 상이한 유기체가 포함되고, "세포"에는 예를 들어, 이러한 세포 하나 이상이 포함되며, "방법"에는 예를 들어, 당업자에게 공지된 등가의 단계 및 방법들이 포함된다.

달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 흔히 인식하고 있는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 등가의 방법 및 물질을 사용하여 본 발명을 실시하거나 시험할 수 있긴 하지만, 적합한 방법 및 물질이 다음에 기재된다. 본원에 논의된 모든 공개공보, 특허원, 특허 및 기타 참고 문헌은 본원의 출원일 전에 그들의 명세서가 제공되었다. 본원 어디에서도 본 발명이 그의 선행 발명에 의해 상기 명세서보다 선행될 권리가 없다는 것을 승인하는 것으로 간주되지 않는다. 본원에 언급된 모든 공개공보, 특허원, 특허 및 기타 참고 문헌은 모든 도면, 그림, 그래프, 하이퍼링크, 및 기타 형태의 브로셔-실행 코드를 포함한, (전후 문맥이 명백하게 지시함에 따라) 그들이 인용되는 교시에 대해 그들 전문이 참고로 도입된다.

II. 정의

"**결합성 조성물**"은 한 가지 이상의 다른 분자적 실체 또는 결합 파트너에 대한 선택적 및/또는 특이적 결합 친화성을 지닌 분자적 실체이다. 전형적으로, 연합은 공유적 또는 비공유적으로, 천연상 생리학적으로 관련된 상호 반응으로 존재할 것이며, 이에 수 많은 다중-단백질 복합체의 구성원들, 예를 들어 캐리어 화합물, 이량체화 또는 다량체화 파트너가 포함될 수 있다. 결합성 조성물은 전부 또는 일부가 천연에서 유래되거나 (예를 들어, 분리 및/또는 정제되거나) 또는 합성적으로 생성될 수 있다. 전형적으로, 결합성 조성물은 결합 파트너 상의 특정 부위 또는 영역의 특정한 공간 및/또는 극성 구성과 특이적 및/또는 선택적으로 "맞거나", "결합하거나" 또는 "상보적인" 하나 이상의 영역, 예를 들어 표면 부위, 외형 (예: 강, 갈라진 틈, 열극, 또는 돌출부), 분자 배열, 또는 공간적 입체 배치를 갖는다. 따라서 예를 들어, 결합성 조성물이 잠재적 결합 파트너에 충분히 근접하여 위치한 경우, 이러한 결합성 조성물과 파트너는 서로 특이적 및/또는 선택적으로 결합할 것이다. 결합 파트너와 쌍을 형성한 결합성 조성물의 비제한적 예에는 항원-항체, 및 합텐-결합 부위가 포함된다. 항체 결합성 조성물의 비제한적 예에는 항체, 디아보디, 트리아보디, 테트라보디, 미니보디, Fab 단편 (예를 들어, 이량체성 또는 삼량체성 Fab 포함), Fv 단편, scFv 단편, F(ab)2 단편 등이 포함된다 [본 발명에 포함된 항체 결합성 조성물의 비제한적 예에 대해서는, 예를 들어 문헌 (Hudson & Souriau 2003 Nature Medicine 9:129-34)을 참고할 수 있다]. 모노클로날 항체 결합성 조성물은 이것이 실질적으로 균질한 항체 집단 [즉, 집단을 구성하고 있는 개개의 항체가 실질적으로 동일하다 (예를 들어, 이들 항체가 단일 세포 유형의 클론으로부터 유래될 수 있다)]으로부터 유래된다는 의미에서 모노클로날이다. 그러나, 이것이 특정한 기원으로만 제한되는 것을 의미하지는 않는다. 이러한 항체는 통상적으로 항체를 생산하지 않는 세포, 예를 들어 CHO, NSO 또는 COS 세포에서 용이하게 생성될 수 있다. 또한, 이러한 항체는 기타 유형의 세포가 항체 생성물을 형성하는 폴리펩티드 경쇄와 중쇄를 발현하고 어셈블리하도록 상기 세포를 유전공학적으로 처리함으로써, 이러한 기타 유형의 세포, 특히 포유류 및 심지어 식물 세포에서 생성될 수 있다. 또한, 상기 세는 화학적으로 합성할 수 있지

만, 이들쇄는 소정의 항원 결정기에 대해 특이적이기 때문에, 해당 용어가 본원에 사용되는 요지 내에서는 여전히 "모노클로날" 항체를 구성할 것이다. 따라서 본원에 사용된 용어 모노클로날 항체는 이러한 항체 생성을 위해 사용된 단순한 기전이 아니라 항체 분자의 특이성과 순도를 보다 의미하는 것으로 간주된다.

[0016] "**결합 부위**"는 다른 분자적 실체와의 특이적 및/또는 선택적 결합에 참여하는 분자적 실체의 특이적 영역, 부위 또는 입체 배치이다. 결합 부위의 비제한적 예는 항체의 상보성 결정 영역 (CDR)을 포함하는 연속되는 아미노산 서열이다. 한 양태에서, 본 발명의 결합 부위는 표 1에 제시된 식을 갖는 서열을 포함한다. 또 다른 비제한적 양태에서, 결합 부위는 표 1의 서열의 조합물을 포함한다. 또 다른 비제한적 예는 Fab 단편의 8개-가닥 베타 배럴 (barrel)의 모서리에 가변 중쇄 및 경쇄의 6개 CDR 루프를 포함하는 아미노산 서열의 3차원적 입체 배치 및 공간적 구성으로부터 형성된 결합 부위이다 [참고: 예를 들어, Chothia & Lesk, 1987 *J. Mol. Biol.* 196:901-17]. 기재된 본 발명의 CDR은 예를 들어, CDR 이식법에서와 같이 골격 또는 분자상 구조에 포매 (매립)/도입될 수 있다. 한 양태에서, 본 발명의 CDR을 운반하기 위한 구조는 일반적으로, 항체 중쇄 또는 경쇄 서열 또는 그의 상당한 부분일 것인데, 여기서 CDR은 재배열된 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 천연 발생적 VH 및 VL 항체 가변 도메인의 CDR에 상응하는 위치에 위치한다. 면역글로불린 가변 도메인의 구조와 위치는 다음 문헌을 참고로 하여 결정될 수 있다 [참고: Kabat, et al, 1987 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4th Ed. US Department of Health and Human Services, and updates thereof; 현재 인터넷 (<http://immuno.b-me.nwu.edu>) 상에서 입수 가능함]. CDR은 일반적으로, 카바트 (Kabat)에 의해 정의된 바와 같지만, 초티아 [참고: Chothia (*J. Mol. Biol.* 196:901-17)] 및/또는 맥칼럼 [참고: MacCallum (*J. Mol. Biol.* 262:732-45)]의 정의에 의해서도 알 수 있다. 당업자는 통상적으로, 내부에 그것이 포매된 가변 영역 아미노산 서열이 제공된 특정한 CDR을 포함하는 잔기가 어느 것인지를 결정할 수 있다. 부가적으로, CDR 이식에서는 카바트 VH CDR1에 인접한, 초티아에 의해 규정된 루프 잔기를 이식할 수 있다.

[0017] 한 양태에서는, 본 발명의 CDR 서열을, 재조합 DNA 기술을 이용하여 CDR 영역이 결합된 가변 도메인의 레퍼토리 (repertoire) 내로 도입할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [참고: Marks et al (1992 *BioTechnology* 10:779-83)]에는 가변 도메인 부위의 5' 말단을 대상으로 하거나 이러한 5' 말단에 인접한 부위를 대상으로 한 컨센서스 프라이머를, 인간 VH 유전자의 제3 골격 영역에 대한 컨센서스 프라이머와 연계해서 사용하여 CDR3이 결합된 VH 가변 도메인의 레퍼토리를 제공하는, 항체 가변 도메인의 레퍼토리를 생성시키는 방법이 기재되어 있다. 상기 막스 (Marks) 등의 문헌에는 이러한 레퍼토리를 특정한 항체 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같음)의 CDR3과 합할 수 있는 방법이 추가로 기재되어 있다. 유사한 기술을 사용하여, 본 발명의 CDR3 서열을 CDR3이 결합된 VH 또는 VL 도메인의 레퍼토리에서 서플링할 수 있고, 이와 같이 서플링된 완전한 VH 또는 VL 도메인을 동족 VL 또는 VH 도메인과 합하여 본 발명의 특이적 결합성 조성물 구성원을 제공하였다. 또 다른 한편, CDR3 서열은 유사한 전략을 이용하여 본 발명의 기타 CDR과 합할 수 있다. 이어서, 상기 레퍼토리를 적합한 숙주 시스템, 예를 들어 WO 92/01047의 파아지 디스플레이 (phage display) 시스템에서 디스플레이하여 적합한 특이적 결합성 구성원이 선별될 수 있도록 할 수 있다.

[0018] 결합성 조성물:TGF 베타 1 복합체

[0019] 본원에 사용된 용어 "**결합성 조성물:TGF 베타 1 복합체**"는 TGF 베타 1 단백질에 대한 결합성 조성물의 특이적 및/또는 선택적 결합에 의해 형성된, 상기 결합성 조성물과 TGF 베타 1 단백질의 복합체를 지칭한다. 바람직한 양태에서, 전반에 걸쳐 지칭된 TGF 베타 1은 "성숙한" 성장류 TGF 베타 1 단백질이다. 보다 바람직한 양태에서, 전반에 걸쳐 지칭된 TGF 베타 1은 성숙한 인간 TGF 베타 1 단백질이다 [예를 들어, 인간 전환 성장 인자 베타 1 전구체 (TGF 베타 1)의 아미노산 서열 및 그의 성숙한 부분을 기재하고 있는 NCBI 승인 번호 P01137 참고]. 각 경우에 있어, 전반에 걸쳐 지칭된 TGF 베타 1은 그의 성숙한 생물학적 활성 형태의 TGF 베타 1이다 [(TGF 베타 1은 2개의 프로-절편 (이에 몇 가지 TGF 잠복성 베타 1 결합성 단백질 중의 하나가 종종 연결된다)과의 비공유 복합체 중에 TGF 베타 1 동종-이량체를 포함하는, 불활성 '잠복성' 복합체로서 세포로부터 방출된다) (참고: 예를 들어, Annes, et al., 2003 *J. Cell Science* 116:217-24; Miyazono, et al., 1993 *Growth Factors* 8:11-22; Munger, et al. 1997 *Kidney Int.* 51:1376-82; Oklu & Hesketh 2000 *Biochem. J.* 352:601-10). 이러한 잠복성 TGF 베타 1 복합체는 '우연한' 활성화에 대항하여 중요한 보호책을 나타내고, 이는 잠복성 TGF 베타 1을 안정화시킬 수 있고 잠복성 TGF 베타 1이 세포의 매트릭스를 표적으로 할 수 있게 한다 (이것이 봉쇄된다) (참고: Taipale, et al. 1998 *Adv. Cancer Res.* 75:87-134). 따라서, 세포의 매트릭스는 신규 세포 합성을 필요로 하지 않으면서도 TGF 베타 1을 용이하게 활성화시킬 수 있는 저장고로서 작용한다. TGF 베타 1이 잠복성 복합체로서 분비하기 위해서는, TGF 베타 1 프로-절편을 우선적으로 분해시킴으로써 고도로 안정한 성숙한 활성 TGF 베타 1 이량체 형태를 방출시키는 프로테아제의 활성을 통하여 대부분 매개하는 것

으로 추정되는 조절된 활성화 과정이 존재해야 한다)).

[0020] 결합성 조성물의 특이적 결합은 이러한 결합성 조성물이 전형적으로 그의 본래의 활성 입체 형태의 TGF 베타 1 영역을 인식하는 결합 부위를 갖는 것을 의미한다. 예를 들어, TGF 베타 1에 대해 생성되고 TGF 베타 1의 에피토프를 인식하는 항체는 특이적 결합에 의해 결합성 조성물:TGF 베타 1 복합체를 형성할 수 있다. 전형적으로, 결합성 조성물:TGF 베타 1 단백질 복합체의 형성으로 인해, 특정 생물학적 샘플, 예를 들어 기타 단백질 및 생물학적 제제와의 혼합물 중에서 TGF 베타 1를 측정할 수 있게 된다. 본 발명의 결합성 조성물의 에피토프는 본원에 기재되거나 당해 분야에 보고된 기술 [참고: 예를 들어, G. Tribbick 2002 Journal of Immunological Methods 267:27-35; Woods & Hamuro 2001 Journal of Cellular Biochemistry Supplement 37:89-98]을 사용하여 결정할 수 있고/있거나 본원에 기재된 바와 같은 경쟁적 결합에 의해 결정된 바와 같다. 바람직한 양태에서, 본 발명의 결합성 조성물의 에피토프는 서열 1의 아미노산 잔기 YYVGRK [서열 136]을 포함하고; 또 다른 양태에서, 본 발명의 결합성 조성물의 에피토프는 서열 1의 아미노산 잔기 YYVGRK [서열 136] 및 서열 1의 YSKV를 포함하며; 부가의 양태에서, 본 발명의 결합성 조성물의 에피토프는 서열 1의 아미노산 잔기 YYVGRK [서열 136]로부터의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 이상 잔기 (연속적이거나 연속적이지 않음) 및/또는 서열 1의 YSKV로부터의 1, 2, 3 또는 4개 이상 잔기 (연속적이거나 연속적이지 않음)를 포함한다 (이러한 양태는 그의 모든 조합을 포함하는데, 예를 들어 서열 1의 YYVGRK [서열 136]와 KV; 또는 서열 1의 YVGRK [서열 137]와 Y 및 KV가 있지만, 그에 제한되지 않고, 이러한 조합 모두는 컴퓨터 알고리즘과 널리 공지된 순열 및 조합용 대수식을 사용함으로써 단지 이용 가능하다). 또한 추가의 바람직한 양태에서, 본 발명의 결합성 조성물의 에피토프는 동일한 항원 (예: TGF 베타 1)을 놓고 결합성 조성물과 경쟁함으로써 후속 결합성 복합체의 형성을 방지할 수 있는 본 발명의 결합성 조성물의 능력에 의해 기능적으로 규정된다 (상기 경쟁적 결합은 본원에 기재되어 있다).

[0021] 본원에 사용된 용어 "**특이적 결합**"은 특이적 결합 쌍의 하나의 구성원이 그의 특이적 결합 파트너(들) 이외의 분자와는 유의적 결합을 나타내지 않는 상황을 지칭한다. 상기 용어는, 예를 들어 항원 결합성 도메인이 수 많은 항원에 수반되는 특별한 에피토프에 대해 특이적인 경우에도 적용 가능한데, 각 경우에 있어 항원 결합성 도메인을 수반하는 특이적 결합성 구성원은 에피토프를 수반하는 각종 항원과 결합할 수 있을 것이다. 따라서, 성숙한 TGF 베타 1에 대해 특이적인 결합성 조성물은 "그의 특이적 결합 파트너(들), 즉 성숙한 TGF 베타 1 이외의 분자와는 유의적인 어떠한 결합도 나타내지 않을 것이다".

[0022] 결합성 조성물과 관련하여 "**특이적으로 결합**"하거나 또는 결합성 조성물과 "**특이적으로 면역반응성**"이란, 단백질 및 기타 생물학적 구성분의 이중 집단의 존재 하에 결합성 단백질의 존재를 결정하는 결합 반응을 지칭한다. 따라서, 지정된 면역검정 조건 하에서 명시된 결합성 조성물은 특이적 단백질과 결합하고, 샘플 중에 존재하는 기타 단백질과는 유의적으로 결합하지 않는다. 이러한 조건 하에서 결합성 조성물에 대한 특이적 결합에는, 특별한 단백질에 대한 그의 특이성을 기준으로 하여 선별되는 결합성 조성물이 요구될 수 있다. 예를 들어, 결합성 조성물 (예: 항체)는 TGF 베타 1의 인간 활성 이량체 형태 (그의 성숙한 아미노산 서열 단량체가 [서열 1]에 제시되었다)에 대해 생성될 수 있고, 그 후에 TGF 베타 1 단백질과는 특이적으로 면역반응성이지만 기타 단백질과는 그렇지 못한 항체를 수득하도록 선별할 수 있다. 이러한 결합성 조성물은 인간 TGF 베타 1 단백질과 고도로 상동성인 단백질, 예를 들어 기타 인간 TGF 베타 이소형 (예: 인간 TGF 베타 2 또는 인간 TGF 베타 3)를 구별할 수 있었다. 바람직한 양태에서, 성숙한 TGF 베타 1에 대한 본 발명의 결합성 조성물의 특이성은 성숙한 TGF 베타 2 및/또는 성숙한 TGF 베타 3에 대한 그의 특이성과 비교해서 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 125, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 또는 10,000배 이상이다. 또 다른 바람직한 양태에서, 본 발명의 조성물의 특이성은 상기 목록으로부터 인간 TGF 베타 2에 대한 특별한 특이성 값과, 인간 TGF 베타 3에 대한 상이한 특이성 값을 가질 수 있는데, 예를 들어 성숙한 TGF 베타 2와 비교해서 그의 특이성이 100 배 이상이고 성숙한 TGF 베타 3과 비교해서 그의 특이성이 900배 이상인 성숙한 TGF 베타 1에 대한 특이성을 지닌다. 이러한 조합 어떠한 것도 포괄된다.

[0023] 본 발명의 결합성 조성물은 바람직하게, TGF 베타 1을 중화시키고 TGF 베타 1에 대한 해리 상수 (Kd)가 약 100 pM, 95 pM, 90 pM, 85 pM, 80 pM, 75 pM, 70 pM, 65 pM, 60 pM, 55 pM, 50 pM, 45 pM, 40 pM, 35 pM, 30 pM, 25 pM, 20 pM, 15 pM, 14 pM, 13 pM, 12 pM, 11 pM, 또는 10 pM 미만; 보다 바람직하게는, 약 10 pM, 9.9 pM, 9.8 pM, 9.7 pM, 9.6 pM, 9.5 pM, 9.4 pM, 9.3 pM, 9.2 pM, 9.1 pM, 9.0 pM, 8.9 pM, 8.8 pM, 8.7 pM, 8.6 pM, 8.5 pM, 8.4 pM, 8.3 pM, 8.2 pM, 8.1 pM, 8.0 pM, 7.9 pM, 7.8 pM, 7.7 pM, 7.6 pM, 7.5 pM, 7.4 pM, 7.3 pM, 7.2 pM, 7.1 pM, 7.0 pM, 6.9 pM, 6.8 pM, 6.7 pM, 6.6 pM, 6.5 pM, 6.4 pM, 6.3 pM, 6.2 pM, 6.1

pM, 6.0 pM, 5.9 pM, 5.8 pM, 5.7 pM, 5.6 pM, 5.5 pM, 5.4 pM, 5.3 pM, 5.2 pM, 5.1 pM 또는 5.0 pM 미만; 보다 더 바람직하게는, 약 5.0 pM, 4.9 pM, 4.8 pM, 4.7 pM, 4.6 pM, 4.5 pM, 4.4 pM, 4.3 pM, 4.2 pM, 4.1 pM, 4.0 pM, 3.9 pM, 3.8 pM, 3.7 pM, 3.6 pM, 3.5 pM, 3.4 pM, 3.3 pM, 3.2 pM, 3.1 pM, 3.0 pM, 2.9 pM, 2.8 pM, 2.7 pM, 2.6 pM, 2.5 pM, 2.4 pM, 2.3 pM, 2.2 pM, 2.1 pM, 2.0 pM, 1.9 pM, 1.8 pM, 1.7 pM, 1.6 pM, 1.5 pM, 1.4 pM, 1.3 pM, 1.2 pM, 1.1 pM, 1.0 pM 미만; 보다 더 바람직하게는, 9.9 pM, 9.8 pM, 9.7 pM, 9.6 pM, 9.5 pM, 9.4 pM, 9.3 pM, 9.2 pM, 9.1 pM, 9.0 pM, 8.9 pM, 8.8 pM, 8.7 pM, 8.6 pM, 8.5 pM, 8.4 pM, 8.3 pM, 8.2 pM, 8.1 pM, 8.0 pM, 7.9 pM, 7.8 pM, 7.7 pM, 7.6 pM, 7.5 pM, 7.4 pM, 7.3 pM, 7.2 pM, 7.1 pM, 7.0 pM, 6.9 pM, 6.8 pM, 6.7 pM, 6.6 pM, 6.5 pM, 6.4 pM, 6.3 pM, 6.2 pM, 6.1 pM, 6.0 pM, 5.9 pM, 5.8 pM, 5.7 pM, 5.6 pM, 5.5 pM, 5.4 pM, 5.3 pM, 5.2 pM, 5.1 pM, 5.0 pM, 5.0 nM, 4.9 pM, 4.8 pM, 4.7 pM, 4.6 pM, 4.5 pM, 4.4 pM, 4.3 pM, 4.2 pM, 4.1 pM, 4.0 pM, 3.9 pM, 3.8 pM, 3.7 pM, 3.6 pM, 3.5 pM, 3.4 pM, 3.3 pM, 3.2 pM, 3.1 pM, 3.0 pM, 2.9 pM, 2.8 pM, 2.7 pM, 2.6 pM, 2.5 pM, 2.4 pM, 2.3 pM, 2.2 pM, 2.1 pM, 2.0 pM, 1.9 pM, 1.8 pM, 1.7 pM, 1.6 pM, 1.5 pM, 1.4 pM, 1.3 pM, 1.2 pM, 1.1 pM, 1.0 pM, 0.9 pM, 0.8 pM, 0.7 pM, 0.6 pM, 0.5 pM, 0.4 pM, 0.3 pM, 0.2 pM, 0.1 pM, 또는 0.01pM이다. 결합성 조성물의 해리 상수 (K_d)는 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들어 문헌 [참고: Karlsson et al., 1991 J. Immunol. Methods 145, 299-340]의 방법을 채택하는 비아코어 (BIAcore™)에 의해 결정할 수 있다. 기타 설명에 대해서는 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Jonsson, et al. 1993 Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, et al. 1991 Biotechniques 11:620-7; Johnsson, et al. 1995 J. Mol. Recognit. 8:125-31; and Johnsson, et al. 1991 Anal. Biochem. 198:268-77].

[0024] 본원에 사용된 용어 " k_{on} "은 M-1sec-1 단위로 측정된, 연합 또는 작동 속도 상수, 또는 정배향 또는 복합체-형성 반응의 특이적 반응 속도를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 " k_{off} "은 1/second 단위로 측정된, 해리 또는 이탈 속도 상수, 또는 항체/항원 복합체로부터의 항체를 해리시키기 위한 특이적 반응 속도를 지칭한다. 본원에 사용된 용어 " K_d "는 특정 항체-항원 상호 작용의 해리 상수를 지칭한다. 이는 식 $k_{off}/k_{on} = K_d$ 로써 계산된다. 결합성 조성물의 친화도는 높은 k_{on} 보다는 낮은 k_{off} 와 훨씬 더 상관이 있지만, 이러한 이론에 얽매이지 않고 개선된 k_{off} 와 k_{on} 둘 다의 양태가 포괄된다. 보다 바람직한 양태에서, 본 발명의 결합성 조성물은 일반적으로 낮은 k_{off} 값을 나타내는, 효력이 높은 항체 또는 그의 단편이다. 보다 더 바람직한 양태에서, 본 발명의 Fab 양태의 k_{on} 속도는 필적하는 Fab, 예를 들어 PCT/US2004/018921; US 60/485,820에 기재된 mAb2471보다 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 또는 2.4배 이상 개선된 k_{on} 속도를 갖는다. 또 다른 양태에서, 본 발명의 조성물은 필적하는 결합성 조성물 (예를 들어, Fab 또는 mAb)에 비해 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 130, 150, 195, 200, 225, 250, 260, 270, 280, 290, 또는 300배 이상 개선된 k_{off} 속도를 갖는다.

[0025] 바람직하게, 항체 결합성 조성물은 TGF 베타 2 및/또는 TGF 베타 3과 비교해서 TGF 베타 1과 특이적 및/또는 선택적으로 결합하고, 보다 바람직하게 항체 결합성 조성물은 인간 TGF 베타 2 및/또는 인간 TGF 베타 3과 비교해서 인간 TGF 베타 1과 특이적 및/또는 선택적으로 결합한다. 바람직하게, 이러한 항체는 TGF 베타 2 및/또는 TGF 베타 3과의 교차-반응률 (해리 상수의 비로써 측정된 바와 같음)이 약 20% 미만, 보다 바람직하게는 약 15% 미만, 보다 더 바람직하게는 약 10% 미만, 보다 더 바람직하게는 약 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 미만이다.

[0026] 추가로, 항체 결합성 조성물은 바람직하게 활성 형태의 TGF 베타 1은 인식하지만, 잠복 형태의 TGF 베타 1은 그렇지 못하는데; 보다 바람직하게는 활성 형태의 인간 TGF 베타 1은 인식하지만, 잠복 형태의 인간 TGF 베타 1은 그렇지 못하다.

[0027] **중화**

[0028] 결합성 조성물과 관련한 용어 "**중화**" 또는 "**길항**"시킨다는 것은 특정의 결합성 조성물이 또 다른 분자적 실체와 특이적 및/또는 선택적으로 결합하면, 이러한 결합성 조성물에 의해 결합된 분자적 실체의 생물학적 효과기 기능이 폐기되거나 억제되는 상황을 지칭한다. TGF 베타 1과 관련하여 용어 "**중화**" 또는 "**길항**"시킨다는 것은 결합성 조성물이 TGF 베타 1과 결합하거나 이와 상호 작용하면, TGF 베타 1에 의해 유도된 생물학적 활성이 억제된다는 것을 지칭한다. TGF 베타 1 생물학적 활성의 억제는 TGF 베타 1 생물학적 활성의 한 가지 이상의 시험 관내 또는 생체내 지표, 예를 들어 수용체 결합의 억제, 섬유증 억제, 화학주성 억제, 또는 TGF 베타 1 결합 검정에서 신호 변환의 억제 등을 측정함으로써 평가할 수 있다 [포괄된 중화 검정의 비제한적 예에 관해서는 EP 0 945 464를 참고할 수 있다]. 비제한적 양태에서, TGF 베타 1 활성을 중화 또는 길항시킬 수 있는 결합성 조성

물의 능력은 본원 실시예에 기재된 바와 같은 검정을 사용함으로써 평가한다.

[0029] 결합성 조성물 (예를 들어, 항체 양태)의 **중화 활성**은 당해 분야에서 널리 허용되고 있는 방법에 의해 시험할 수 있다. 비제한적 예에서는, 문헌 [참고: Randall et al (1993) J. Immunol Methods 164, 61-67]의 TGF 검정을 개작/변형시킴으로써 시험을 수행한다. 이러한 검정은 적백혈병 세포주 TF1의 인터루킨-5 (IL-5) 유도된 증식을 억제할 수 있는 TGF 베타 1 및 TGF 베타 2의 능력과, TGF 베타 특이적 결합성 조성물을 사용하여 TGF 베타 억제를 역전시킬 수 있는 TGF 베타 1 및 TGF 베타 2의 능력에 근거한 것이다. 이러한 검정은 500 fg/ml 미만의 TGF 베타 1, 및 5 내지 10 pg/ml의 TGF 베타 2에 대해 신속하고, 재현 가능하며 민감한 것으로 보고되고 있다. 상기 검정은 인터페론-베타, 인터페론-감마 및 TNF-알파와 같은 기타 억제성 분자에 대해서는 100 내지 1000배 덜 민감한 것으로 보고되기도 한다. 상기 검정은 또한, TGF 베타 1 또는 TGF 베타 2에 대한 특이적 중화 항체를 포함시킴으로써 TGF 베타 1 또는 TGF 베타 2에 대해 특이적이 되도록 할 수 있다고 보고되며, 이들 분자의 용이하게 이용 가능한 모든 재조합 분자 중 뿐만 아니라 인간 및 소 혈소판으로부터 생성된 천연 단백질을 인식하고, 혈청 샘플 중에서 TGF 베타를 탐지하는 것으로 보고되고 있다.

[0030] 본원에 기재되거나 당해 분야에 공지되어 있는 기타 검정도 또한 포괄된다. 예를 들어, 랫트 항-Thy1.1 모델이 널리 확립된 메산지음 증식성 사구체신염 (mesangioproliferative glomerulonephritis) 모델인데 [참고: 예를 들어, Morita, et al., 1998 Am J Kidney Dis 31:559-73; Bagchus, et al., 1986 Lab. Invest. 55:680-7 and Yamamoto & Wilson 1987 Kidney Int. 32:514-25], 여기서는 혈관사이 세포 표면 상에 위치한 Thy 항원에 대항하여 유도된 항체를 주사하면, 메산지음용해 (mesangiolysis)가 유도된 다음 혈관사이 세포의 과대상성 증식 단계가 유도되어, 뇨 단백질 수준이 상승된다 (단백뇨). 항-Thy1.1 신염 모델은 많은 국면에 있어서 인간 IgA 신염 또는 헤노흐-손라인 (Henoch-Schonlein) 자반증과 유사하고 [참고: O'Donoghue, et al., 1991 J Clin Invest 88:1522-30], 이를 사용하여 단백뇨에서 용량-관련 감소를 달성할 수 있는 시험 조성물의 능력을 결정함으로써 신장 질환에 대한 잠재적인 치료적 접근방식을 시험하였다 [참고: 예를 들어, Burg, et al., 1997 Lab Invest 76:505-16; Johnson, et al., 1995 Kidney Int 47:62-9]. 바람직한 양태에서, 본 발명의 결합성 조성물은 상기 모델에서 단백뇨를 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 또는 80% 이상 저하시킨다. (상기 모델에서) 단백뇨 저하율 범위가 상기 표시된 2개의 값 사이 값인 양태가 추가로 고려되는데, 이러한 범위는 종말점 수치 중의 어느 하나 또는 둘 다를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다 (예를 들어, >12% 및 ≤ 42%).

[0031] 부가적으로, 샤르마 (Sharma) [참고: 예를 들어, 2000 PNAS 97:8015-20]의 db/db 당뇨병 마우스 모델 검정을 개작시켜, 신장에서 TGF-베타의 생물학적 작용을 만성적으로 억제하는 것이 당뇨병 u.c.로부터 비롯되는 신부전증을 효과적으로 예방한다는 것을 입증하거나, 또는 샤르마 STZ 당뇨병 마우스 모델 [참고: 1996 Diabetes 45, 522-30]을 개작시켜 당뇨병성 신병증을 개선 또는 예방할 수 있는 결합성 조성물의 능력을 시험할 수 있다. 추가로 문헌 [참고: Ueberham et al., 2003 Hepatology 37(5):1067-78]에는 간 섬유증의 이중-트랜스제닉 (double-transgenic) 마우스 모델에서 테트라사이클린-조절된 유전자 발현 시스템이 기재되어 있는데, 여기서는 독시사이클린 히드로클로라이드를 음료수에 부가하거나 이를 제거하여 TGF 베타 1 발현을 마음대로 작동 또는 중지시킴으로써 TGF 베타 1의 발현을 조절한다. 이러한 동물 모델의 간에서의 TGF 베타 1 발현이 증가되면 섬유성 질환 상태가 유발되는데, 이는 간 질량이 59% 감소된 후일지라도 TGF 베타 1 발현을 중지시킴으로써 가역적이 된다. 이러한 모델을 사용하여, TGF 베타 1 발현을 중지시키는 독시사이클린 히드로클로라이드의 효과를 지닌 본 발명의 결합성 조성물을 비교함으로써 TGF 베타 1 생물학적 기능을 억제하는 것에 대한, 본 발명의 결합성 조성물의 효과를 평가할 수 있게 된다. HT-2 세포 증식 검정 (본원에 기재된 바와 같음)을 사용하는 특별한 양태에서, 본 출원인은 동일하거나 유사한 검정 조건 하에 유사한 결합성 조성물, 예를 들어 mAb2471 (PCT/US2004/018921; US 60/485,820에 기재됨)을 사용하여 수득한 IC₅₀ 값과 비교해서 IC₅₀ 값이 50, 60, 70, 80, 90, 100, 105, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 또는 450배 이상 개선된 결합성 조성물 양태를 포괄하는 것이 바람직하다. IC₅₀ 개선 배율 범위 (상기 규정된 바와 같음)가 상기 2개의 값 사이 값인 양태가 추가로 고려되는데, 이러한 범위는 종말점 수치 중의 어느 하나 또는 둘 다를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다 (예를 들어, IC₅₀ 개선 배율은 mAb2471 등에 비해 >80 내지 ≤100배 개선된 범위이다).

- [0032] **항체**
- [0033] 본 발명의 **항체 결합성 조성물**에는, 예를 들어 폴리클로날, 모노클로날, 다중-특이적, 인간, 인간화 또는 키메라 항체, 단일쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, Fab 발현 라이브러리에 의해 생성된 단편, 항-개체특이형 (항-Id) 항체 (예를 들어, 본 발명의 항체에 대한 항-Id 항체 포함), 및 이들 모두의 에피토프-결합성 단편이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.
- [0034] 본원에 사용된 용어 "**항체**"는 면역글로불린 조성물 및 면역글로불린 조성물의 면역학적 활성 부분, 예를 들어 항원과 특이적 및/또는 선택적으로 결합하는 결합 부위를 함유하는 결합성 조성물 분자를 지칭한다. 본 발명의 면역글로불린 조성물은 면역글로불린 분자의 어떠한 유형 (예: IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 부류 (예: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2) 또는 아부류일 수 있다. 바람직하게는 항체가 본 발명의 인간 항원-결합성 항체 단편, 예를 들어 Fab, Fab' 및 F(ab')₂, Fc, 단일쇄 Fvs (scFv), 단일쇄 항체, 디설파이드-연결된 Fvs (sdFv), 및 VL 또는 VH 도메인을 포함하는 단편이다. 단일쇄 항체를 포함한 항원-결합성 항체 단편은 가변 영역(들)을 단독으로 포함할 수 있거나 또는 가변 영역을 다음 영역의 전부 또는 일부와 조합하여 포함할 수 있다: 힌지 (hinge) 영역, CH1, CH2 또는 CH3 도메인, 또는 그의 조합물. 본 발명에는 또한, 가변 영역(들)과 힌지 영역, 예를 들어 CH1, CH2 또는 CH3 도메인, 또는 그의 조합물과의 모든 조합물을 포함할 수도 있는 항원-결합성 단편이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 본 발명의 항체는 조류 및 영장류를 포함한 모든 동물 기원으로부터 유래될 수 있다. 바람직하게, 상기 항체는 인간, 영장류, 뮌 (예: 마우스 및 랫트), 당나귀, 토끼, 염소, 기니아 피그, 낙타, 말 또는 치킨이다.
- [0035] 본원에 사용된 바와 같은 "**인간 항체**"에는 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 항체, 예를 들어 본원에 기재되어 있거나 또는 예를 들어, 미국 특허 제5,939,598호에 교시된 바와 같이, 내인성 면역글로불린을 발현하지 않고 하나 이상의 인간 면역글로불린에 대해 트랜스제닉인 동물로부터 분리되거나 인간 면역글로불린 라이브러리 (예: 인간 생식세포계 라이브러리)로부터 분리된 항체가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.
- [0036] 결합성 조성물은 단일-특이적, 이중-특이적, 삼중-특이적이거나, 또는 보다 큰 다중-특이성을 지닐 수 있다. 다중-특이적 항체는 표적 단백질, 폴리펩티드 (또는 그의 단편)의 상이한 에피토프에 대해 특이적일 수 있거나, 또는 TGF 베타 1 뿐만 아니라 이중 에피토프, 예를 들어 이중 TGF 베타 이소형 또는 고체 지지체 물질 둘 다에 대해 특이적일 수 있다 [참고: 예를 들어, WO 2093/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al. (1991) J. Immunol. 147:60-69; 미국 특허 제4,474,893호; 제4,714,681호; 제4,925,648호; 제5,573,920호; 또는 제5,601,819호; 또는 Kostelny, et al. (1992) J. Immunol. 148:1547-1553].
- [0037] 결합성 조성물은 그를 인식하거나 선택적 및/또는 특이적으로 결합하는 TGF 베타 1 단백질 (또는 그의 단편)의 부분(들) 또는 에피토프(들)의 측면에서 기재되거나 명시될 수 있다. 에피토프(들) 또는 폴리펩티드 부분(들)은 본원에 기재된 바와 같이, 예를 들어 N-말단 및 C-말단 위치, 연속되는 아미노산 잔기의 크기에 의해 명시될 수 있거나, 또는 첨부된 표 및/또는 도면에 기재되거나 본원에 기재된 바와 같이 명시될 수 있다. 부가적으로, 특정 에피토프, 폴리펩티드, 단백질, 또는 폴리펩티드 또는 단백질의 단편과 특이적으로 결합하는 항체는 본 발명으로부터 구체적으로 배제될 수도 있다. 예를 들어, 본 출원인은 특정 에피토프, 폴리펩티드, 단백질, 또는 폴리펩티드 또는 단백질의 단편과 특이적으로 결합하는 항체의 배제를 조건으로 할 권리가 있다. 따라서, 본 발명은 특정 폴리펩티드 또는 단백질, 또는 그의 단편과 특이적으로 결합하는 제1 (또는 기타) 항체를 포괄함과 동시에, 동일한 단백질 또는 폴리펩티드, 또는 그의 단편과 선택적으로 결합할 수도 있는 제2 (또는 기타) 항체를, 예를 들어 상이한 에피토프와 결합함으로써 배제시킬 수 있다. 바람직한 양태에서, 본 출원인은 TGF 베타 2 및/또는 TGF 베타 3에 비해 TGF 베타 1 이소형과 특이적 및/또는 선택적으로 결합하고 TGF 베타 1을 중화시키며; QQWNGNPPA [서열 126]로부터의 4개 이상의 연속되는 아미노산; QQWDSNPPA [서열 127]로부터의 6개 이상의 연속되는 아미노산; YIYPYNGDTGYNQKFKS [서열 128]로부터의 5개 이상의 연속되는 아미노산 (여기서, 상기 5개 이상의 연속되는 아미노산 중의 1개가 D이다); 또는 GYTFTDYTMH [서열 129]로부터의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 포함하는 1개 이상의 결합 부위를 포함하는 결합성 조성물을 배제시킨다.
- [0038] 본 발명의 항체는 그들의 교차-반응성(률) 측면에서 기재되거나 명시될 수도 있다. 표적 단백질, 폴리펩티드 (또는 그의 단편)의 기타 모든 유사체, 오르토크 (ortholog), 파라로그 (paralog), 또는 상동체와 결합하지 않는 항체가 포함된다.
- [0039] 본 발명에 추가로 포괄되는 것은 엄격한 혼성화 조건 (본원에 기재된 바와 같음) 하에 인간 TGF 베타 1 폴리뉴클레오티드 서열과 안정적으로 혼성화하는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 폴리펩티드와 선택적으로 결합

하는 항체이다.

- [0040] 결합성 조성물은 또한, 특정 단백질 또는 폴리펩티드 (그의 단편), 또는 에피토프에 대한 결합 친화도 측면에서 정상 확인되거나 명시될 수 있다. 또 다른 양태에서, 결합 조성물 (예: 항체 또는 항체 결합성 단편)의 바람직한 결합 친화도에는, 예를 들어 다음 수치 미만의 해리 상수 또는 Kd을 나타내는 결합 친화도 (이는 본원에 기재된 검정을 사용하여 측정함) (또는 다음에 규정된 2개 수치 사이의 범위이고, 이러한 범위는 종말점 중의 어느 하나 또는 둘 다를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다)가 포함된다: $5 \times 10^{-2} \text{ M}$, 10^{-2} M , $5 \times 10^{-3} \text{ M}$, 10^{-3} M , $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, 10^{-4} M , $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, 10^{-5} M , $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, 10^{-6} M , $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, 10^{-7} M , $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, 10^{-8} M , $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, 10^{-9} M , $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, 10^{-10} M , $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, 10^{-11} M , $5 \times 10^{-12} \text{ M}$, $4.9 \times 10^{-12} \text{ M}$, $4.8 \times 10^{-12} \text{ M}$, $4.7 \times 10^{-12} \text{ M}$, $4.6 \times 10^{-12} \text{ M}$, $4.5 \times 10^{-12} \text{ M}$, $4.4 \times 10^{-12} \text{ M}$, $4.3 \times 10^{-12} \text{ M}$, $4.2 \times 10^{-12} \text{ M}$, $4.1 \times 10^{-12} \text{ M}$, $4.0 \times 10^{-12} \text{ M}$, $3.9 \times 10^{-12} \text{ M}$, $3.8 \times 10^{-12} \text{ M}$, $3.7 \times 10^{-12} \text{ M}$, $3.6 \times 10^{-12} \text{ M}$, $3.5 \times 10^{-12} \text{ M}$, $3.4 \times 10^{-12} \text{ M}$, $3.3 \times 10^{-12} \text{ M}$, $3.2 \times 10^{-12} \text{ M}$, $3.1 \times 10^{-12} \text{ M}$, $3.0 \times 10^{-12} \text{ M}$, $2.9 \times 10^{-12} \text{ M}$, $2.8 \times 10^{-12} \text{ M}$, $2.7 \times 10^{-12} \text{ M}$, $2.6 \times 10^{-12} \text{ M}$, $2.5 \times 10^{-12} \text{ M}$, $2.4 \times 10^{-12} \text{ M}$, $2.3 \times 10^{-12} \text{ M}$, $2.2 \times 10^{-12} \text{ M}$, $2.1 \times 10^{-12} \text{ M}$, $2.0 \times 10^{-12} \text{ M}$, $1.9 \times 10^{-12} \text{ M}$, $1.8 \times 10^{-12} \text{ M}$, $1.7 \times 10^{-12} \text{ M}$, $1.6 \times 10^{-12} \text{ M}$, $1.5 \times 10^{-12} \text{ M}$, $1.4 \times 10^{-12} \text{ M}$, $1.3 \times 10^{-12} \text{ M}$, $1.2 \times 10^{-12} \text{ M}$, $1.1 \times 10^{-12} \text{ M}$, $1.0 \times 10^{-12} \text{ M}$, $0.9 \times 10^{-12} \text{ M}$, $0.8 \times 10^{-12} \text{ M}$, $0.7 \times 10^{-12} \text{ M}$, $0.6 \times 10^{-12} \text{ M}$, $0.5 \times 10^{-12} \text{ M}$, $0.4 \times 10^{-12} \text{ M}$, $0.3 \times 10^{-12} \text{ M}$, $0.2 \times 10^{-12} \text{ M}$, $0.1 \times 10^{-12} \text{ M}$, 10^{-12} M , $5 \times 10^{-13} \text{ M}$, 10^{-13} M , $5 \times 10^{-14} \text{ M}$, 10^{-14} M , $5 \times 10^{-15} \text{ M}$, 또는 10^{-15} M .
- [0041] 본 발명은 또한, 경쟁적 결합을 결정하는 것으로 당해 분야에 널리 공지된 모든 방법, 예를 들어 본원에 기재되거나 참고된 면역검정에 의해 결정된 바와 같이 TGF 베타 1의 에피토프에 대한 결합성 단백질의 결합을 경쟁적으로 억제하는 항체를 포괄한다. 바람직한 양태에서, 이러한 항체는 에피토프에 대한 결합을 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 또는 91% 이상, 90%, 89%, 88%, 87%, 86% 이상; 85% 이상, 80% 이상, 75% 이상, 70% 이상, 60% 이상, 또는 50% 이상 (또는 상기 2개 수치 사이의 범위이고, 이러한 범위는 종말점 중의 어느 하나 또는 둘 다를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다) 정도 경쟁적으로 억제시킨다.
- [0042] 본 발명의 항체는 TGF 베타 1 (또는 그의 단편)의 길항제로서 작용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 결합성 조성물은, 예를 들어 TGF 베타 1과 동족 수용체/리간드와의 상호 작용을 부분적으로 또는 완전히 붕괴시킬 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 항체는 TGF 베타 1, 또는 그의 일부의 항원성 에피토프와 결합한다.
- [0043] 마찬가지로, 리간드와 결합하여 이것이 수용체와 결합하는 것을 방지하는 (예를 들어, 입체 장애에 의한) 항체가 본 발명에 포괄된다. 유사하게, 수용체 결합을 억제시키지 않으면서 수용체 활성화를 억제시키는 리간드-결합성 항체가 본 발명에 포괄된다.
- [0044] 본 발명의 항체를 사용하여, 예를 들어 시험관내 및/또는 생체내 진단 및 치료 방법을 위해 TGF 베타 1 (또는 그의 단편)을 정제, 탐지 또는 표적으로 할 수 있다. 예를 들어, 상기 항체는 생물학적 샘플 중의 본 발명의 TGF 베타 1 (또는 그의 단편)의 수준을 정성적 및/또는 정량적으로 측정하기 위한 면역검정에 사용한다 [참고: 예를 들어, Harlow & Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)].
- [0045] 결합성 조성물은 단독으로 사용되거나 또는 기타 조성물과 병용해서 사용될 수 있다. 더우기, 항체와 같은 결합성 조성물은 N- 또는 C-말단에서 이중 폴리펩티드와 재조합적으로 융합될 수 있거나, 또는 폴리펩티드 또는 기타 조성물과 화학적으로 접합될 수 있다 (공유적 및 비공유적 접합 포함). 예를 들어, 본 발명의 항체를, 탐지 검정에서 표지로서 유용한 분자 및 효과기 분자, 예를 들어 이중 폴리펩티드, 약물, 방사성핵종, 또는 독소와 재조합적으로 융합시키거나 접합시킬 수 있다 [참고: 예를 들어, WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; 미국 특허 제5,314,995호; 및 EP 396,387].
- [0046] 결합성 조성물에는, 예를 들어 모든 유형의 분자를 항체 등에 공유 부착시킴으로써 변형시킨 (이러한 공유 부착으로 인해, 상기 항체가 항-개체특이형 반응을 유발하지 못하게 하지는 않는다) 유도체가 포함된다. 항체 유도체에는, 예를 들어 당화, 아세틸화, 페닐화, 인산화, 아마이드화, 공지된 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질 분해적 절단, 세포성 리간드 또는 기타 단백질과의 연쇄 등에 의해 변형시킨 항체가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 수 많은 화학적 변형들은 공지된 기술, 예를 들어 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 제형화, 투니카마이신 (tunicamycin)의 대사적 합성 등에 의해 수행할 수 있다. 부가적으로, 유도체는 1개 이상의 비전통적 아미

노산을 함유할 수 있다. 결합성 조성물은 당해 분야에 공지된 적합한 모든 방법에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 모노클로날 항체는 당해 분야에 공지된 기술, 예를 들면 문헌 [참고: 예를 들어, Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); Harlow & Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); Breitling & Dubel 1999 Recombinant Antibodies (John Wiley & Sons, New York); H. Zola, Monoclonal Antibodies (Garland Press); and James W. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (Academic Press)]에 기재된 기술을 사용하여 제조할 수 있다.

[0047] 본원에 사용된 용어 "**모노클로날 항체**"는 특별한 기술 (예: 하이브리도마 기술)에 의해 생성된 항체로 제한되지 않는다. 하이브리도마 기술을 사용하여 특이적 항체를 생성시키고 스크리닝하는 방법은 통상적이고 당해 분야에 공지되어 있다. 용어 "**모노클로날 항체**"는 임의의 진핵성, 원핵성, 또는 파아지 클론을 포함하여 단일 클론으로부터 유래된 항체를 지칭하고, 이를 생성시키는 방법으로써 제한되지 않는다.

[0048] 특이적 에피토프를 인식하는 **항체 단편**은 공지된 기술에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 Fab 및 F(ab')₂ 단편은 파파인 (Fab 단편을 생성시키기 위함) 또는 펩신 (F(ab')₂ 단편을 생성시키기 위함)과 같은 효소를 사용하여, 면역글로불린 분자를 단백질 분해적 절단시킴으로써 생성시킬 수 있다. F(ab')₂ 단편은 가변 영역, 경쇄 불변 영역 및 경쇄의 CH1 도메인을 함유한다. 예를 들어, 결합성 조성물은 당해 분야에 공지되어 있는 각종 파아지 디스플레이 방법을 사용하여 생성시킬 수 있는데, 여기서는 기능적 항체 도메인을, 이들을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 수반하는 파아지 입자 표면 상에 디스플레이한다.

[0049] 특정한 양태에서는, 파아지 디스플레이 방법을 사용하여 레퍼토리 또는 조합 항체 라이브러리 (예: 인간 또는 무린)로부터 발현된 항원-결합성 도메인을 디스플레이한다. 관심있는 항원과 결합하는 항원 결합성 도메인을 발현하는 파아지를 선별할 수 있거나 또는 이를 대상으로 하여, 예를 들어 고체 표면 또는 비드와 결합되거나 이에 포획된 항원 또는 표지된 항원을 사용하여 항원과의 일체감을 확인할 수 있다. 파아지 선별 후, 파아지로부터의 항체 암호화 영역을 분리하고, 이를 사용하여 완전한 항체 (인간 항체 포함), 또는 기타 목적하는 모든 항원 결합성 단편을 생성시키고, 예를 들어 본원 또는 당해 분야의 문헌에 기재된 바와 같이, 목적하는 모든 숙주, 예를 들면 포유류 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 효모 및 세균에서 발현시킨다.

[0050] Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편을 재조합적으로 생성시키는 기술은 또한, 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들어 문헌 [참고: WO 92/122324; Mullinax, et al., BioTechniques 1992 12(6):864-9; and Sawai, et al., 1995 AJRI 34:26-34; and Better, et al., 1988 Science 240:1041-3]에 기재된 방법을 사용하여 이용할 수 있다. 단일쇄 Fvs 및 항체를 생성시키는 방법의 예에는, 예를 들어 문헌 [참고: 미국 특허 제4,946,778호 및 제5,258,498호; Huston, et al., 1991 Methods in Enzymology 203:46-88; Shu, et al., 1993 PNAS USA 90:7995-9; and Skerra, et al., 1988 Science 240: 1038-40]의 방법이 포함된다. 항체를 인간에게서 생체내 사용하는 것과 시험관내 탐지 검정을 포함한 몇몇 용도에 대해서는, 당해 분야에 공지된 기술에 의해 생성된 인간화 또는 인간 항체를 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0051] 본원의 **인간화 항체**는 (예를 들어, 비경구 투여 후) 인간 숙주 시스템으로의 생체내 도입시 해로운 면역원성 반응을 창출시키는 경향이 덜한 골격 영역 내에 포매된, 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 상보성 결정 영역 (CDR)을 갖는 목적하는 항원과 결합하는 결합성 조성물이다. 종종, CDR 공여자 영역을 인간 골격 영역 내에 적당히 포매시켜 항원 결합성을 개선시키고/시키거나 면역원성을 저하시킨다. 유용한 골격 영역은 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들어 (1) 항원 결합에 중요한 골격 잔기를 확인하기 위해 CDR과 골격 잔기의 상호 작용을 모델링함으로써; (2) 특정한 위치에서 이상한 골격 잔기를 확인하기 위해 서열 비교함으로써 [참고: 예를 들어, 미국 특허 제5,585,089호, Riechmann, et al., Nature 332:323 (1988)] 또는 (3) 실험적으로 확인할 수 있다.

[0052] 본 발명의 특정한 모노클로날 항체 결합성 조성물 양태의 가변 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR)이 다음 표 1(a & b)에 제시되어 있다. 이러한 CDR 영역은 표준 아미노산 단일 문자 코드 및 표준 CDR 넘버링을 이용하여 표시한다 (즉, CDR의 수치 증가는 전형적인 IgG 중쇄 또는 경쇄 구조의 불변 도메인에 대한 근접성 증가에 상응하는데; 예를 들어, VH CDR3은 VH CDR1보다 CH1 도메인에 보다 근접하다).

[0053] 구체적 CDR 양태는 일반적으로, CDR 종류를 기재하기 위해 아미노산 서열식을 이용하여 나타낸다 [문자 "X"로 표시한 치환 가능한 아미노산 잔기를 수반하고 아래 첨자 숫자 (그의 수치는 CDR 중의 가장 낮은 (아미노에 가장 가깝다) 잔기에서 부터 가장 높은 (카복시에 가장 가깝다) 잔기로 증가하는데, 예를 들어 VHCDR2 중의 X₁은 CDR의 아미노에 가장 가까운 잔기인 반면, 카복시에 가장 가까운 치환 가능한 잔기는 X₆이다)으로써 표시한 특정한

CDR 내에서의 그들의 잔기 대체를 수반한 표준 단일 문자 아미노산 코드를 사용한다]. 이들 일반식을 이용하여, 당업자는 본 발명에 포괄되는 가변 중쇄 또는 경쇄 도메인 (V_L 또는 V_H) 양태에서 각각의 지정된 위치에서 가능한 모든 CDR 양태들을 결정할 수 있다. 가능한 아미노산 서열의 특정한 모든 예시는 단지, 아미노산 코드를 사용하여 특별한 CDR 식 내의 모든 특별한 X 잔기에서의 가능한 모든 치환을 생성시킴으로써 결정한다. 이러한 양태 모두가 본원에 포괄된다.

[0054] 추가로, 가능한 CDR 배합의 가능한 모든 V_L 또는 V_H 양태 또한 본 발명에 동등하게 포괄된다 [예를 들어, 제공된 정보를 이용하여, 당업자는 본 발명의 결합성 조성물의 특정한 가변 중쇄 항체 양태 내에서 총 72x384x12개의 가능한 V_H CDR 조합물을 생성시킬 수 있는, 72개의 가능한 VHCDR1; 384개의 가능한 VHCDR2; 및 12개의 가능한 VHCDR3이 존재한다는 것을 용이하게 계산할 수 있다. 이러한 조합물 모두가 또한 본원에 포괄된다. 유사한 이론이 경쇄 가변 도메인 V_L 에 포괄된 가능한 조합물 모두에게 적용되고 모든 V_L CDR에도 적용된다. 예를 들어, 본 발명의 결합성 조성물의 특정한 가변 경쇄 항체 양태 내에서 총 192x12x48개의 가능한 V_L CDR 조합물을 생성시킬 수 있는, 192개의 가능한 VLCDR1; 12개의 가능한 VLCDR2; 및 48개의 가능한 VLCDR3이 존재한다]. 유사하게, 특정한 결합성 조성물 양태 내에서 V_H 와 V_L 쌍 형성물의 가능한 모든 조합물이 또한 포괄된다.

표 1a

결합성 조성물의 CDR 중쇄 서열식		
중쇄 CDRs		
CDR1	CDR2	CDR3
GYX ₁ FX ₂ DYNX ₃ X ₄ *	X ₁ X ₂ YPYDGYX ₃ TGX ₄ NX ₅ KX ₆ KS **	GYRX ₁ X ₂ X ₃ Y ***
[서열: 2]	[서열: 3]	[서열: 4]

- [0055]
- [0056] · * VHCDR1에 대해: X₁는 T 또는 D이고; X₂는 T, E, 또는 F이며; X₃는 M, I, L, 또는 V이고; X₄는 H, V, 또는 A이다.
- [0057] · ** VHCDR2에 대해: X₁는 Y, Q, 또는 S이고; X₂는 I, 또는 V이며; X₃는 D, 또는 E이고; X₄는 Y, T, H, 또는 L이며; X₅는 Q, K, P, 또는 S이고; X₆는 F 또는 Y이다.
- [0058] · *** VHCDR3에 대해: X₁는 W 또는 A이고; X₂는 F 또는 L이며; X₃는 A, E, 또는 Y이다.

표 1b

결합성 조성물의 CDR 경쇄 서열식		
경쇄 CDRs		
CDR1	CDR2	CDR3
X ₁ AX ₂ X ₃ X ₄ VX ₅ YMH *	ATSNX ₁ AX ₂ **	X ₁ QWDX ₂ X ₃ X ₄ PA ***
[서열: 5]	[서열: 6]	[서열: 7]

- [0059]
- [0060] · * VLCDR1에 대해: X₁는 R, Y, E, 또는 Q이고; X₂는 S, 또는 T이며; X₃는 S, V, 또는 A이고; X₄는 S, 또는 L이며; X₅는 S, P, L 또는 Y이다.
- [0061] · ** VLCDR2에 대해: X₁는 L, N, 또는 P이고; X₂는 S, K, Y, L, M, F, E, Q, R, 또는 H이다.
- [0062] · *** VLCDR3에 대해: X₁는 Q 또는 S이고; X₂는 L, D, 또는 P이며; X₃는 N 또는 R이고; X₄는 P, F, Y 또는 R이다.
- [0063] 추가로, 생성되는 결합성 조성물이 성숙한 TGF 베타 2 및/또는 성숙한 TGF 베타 3에 비해 성숙한 TGF 베타 1과 특이적 및/또는 선택적으로 결합하고 성숙한 TGF 베타 1을 중화시킬 수 있도록 하기 위해 인간 항체 골격 영역 내에 수반되거나 이에 포매되는 (적당한 배향으로 포매됨), 본원에 포괄된 CDR을 이용하는 항체 결합성 조성물이 포괄된다. 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여, 특정한 CDR를 적당한 골격 내에 포매 또는 위치시킬 수 있다. 본 발명에 이용된 가변 도메인은 모든 생식세포계 또는 재배열된 인간 가변 도메인으로부터 유래될 수 있거나, 또는 공지된 인간 가변 도메인의 컨센서스 서열에 기초한 합성 가변 도메인일 수 있다.

[0064] 바람직한 가변 도메인 골격은 항-TGF 베타 1 항체 결합성 조성물 양태의 생물학적 특성, 즉 성숙한 TGF 베타 2 및/또는 TGF 베타 3에 비해 성숙한 TGF 베타 1과 특이적 및/또는 선택적으로 결합하고 이를 중화시킬 수 있는 능력에 상당한 영향을 미치지 않는 것이다. 보다 바람직하게는, 인간 대상체에게 (예를 들어, 비경구적으로) 투여되는 경우에 상당한 면역원성 반응을 부가적으로 유발시키지 않는 골격이다. 바람직한 골격 서열은 천연 발생적 인간 항체의 서열, 또는 몇 가지 인간 항체의 컨센서스 서열일 수 있다. 본 발명의 항체 양태의 중쇄 가변 영역에 대한 골격 서열의 비제한적 예에는 VH 절편 DP-5 [참고: Tomlinson, *et al.* 1992 *J. Mol. Biol.* 227:776-98] 및 J 절편 JH4, JH1 또는 JH5 [참고: Ravetch, *et al.* 1981 *Cell* 27:583-91]가 포함된다. Vk 절편 L1 [참고: Cox, *et al.* 1994 *Eur. J. Immunol.* 24:827-36] 및 J 절편 Jk4 [참고: Hieter, *et al.* 1982 *J. Biol. Chem.* 10:1516-22]은 경쇄 가변 영역에 대한 골격 서열의 비제한적 예이다. 바람직한 양태에서, HCVR FR1 골격은 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKAS [서열 8]을 포함하고; HCVR FR2 골격은 WVRQAPGQGLEWMG [서열 9]을 포함하며; HCVR FR3 골격은 RVTMTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR [서열 10]을 포함하고; HCVR FR4 골격은 WGQGLTVTVSS [서열 11]을 포함한다. 또 다른 바람직한 양태에서, LCVR FR1 골격은 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [서열 12]를 포함하고; LCVR FR2 골격은 [서열 13-36] 중에서 선택된 서열을 포함하고; LCVR FR3 골격은 GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC [서열 37]을 포함하며; LCVR FR4 골격은 FGQGTKLEIK [서열 38]을 포함한다. 보다 바람직한 양태에서, 이러한 골격 영역은 변경, 결실, 부가, 치환, 또는 그의 조합을 함유할 수도 있다. 더우기, 모든 조합에 있어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산이 치환, 결실 또는 부가된 골격이 또한 바람직하다.

[0065] 한 양태에서, 본 발명의 항체 결합성 조성물 CDR을 포매시키는데 사용하기 바람직한 중쇄 불변 영역에는, 예를 들어 IgG 불변 영역이 포함된다. 보다 바람직한 양태에서, IgG 불변 영역은 다음에 제시된 바와 같은 IgG1 불변 영역 또는 IgG4 불변 영역이다:

IgG1 [서열: 39]:

STKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITL
MISRTPEVTCVVDVSDHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSG
PG; or

IgG4 [서열: 40]

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMS
RTPEVTCVVDVSDHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSLG

[0066]

[0067] 본 발명의 바람직한 경쇄 불변 영역 서열은 다음에 제시된 카과 쇠 불변 영역이다:

[0068]

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YLSSTLTLSKADYEIKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [서열: 41]

[0069]

또 다른 바람직한 양태에서, 항체 결합성 조성물은 IgG1 중쇄 불변 영역 또는 IgG4 중쇄 불변 영역 및 카과 경 쇠 불변 영역을 함유한다.

[0070]

본원에 제공된 정보를 이용하여, 당업자는 본 발명의 mAb 양태, 예를 들어

[0071]

다음을 포함하는 경쇄:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCEASSSVSYMHWYQQKPGKAPKPLIYATSNLASGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQWDLNPPAFGQGTGLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ
LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKA
DYEIKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC [서열: 130]

[0072]

{상기에서, LCVR FR1 골격은 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [서열 12]이고;

[0073]

VL CDR1은 서열식 $X_1AX_2X_3X_4VX_5YMH$ [서열 5] [여기서, X_1 은 R, Y, E 또는 Q이고; X_2 는 S 또는 T이며; X_3 은 S, V, 또는 A이고; X_4 는 S 또는 L이며; X_5 는 S, P, L, 또는 Y임]의 EASSSVSYMH [서열 138]이며;

[0074]

LCVR FR2 골격은 WYQQKPGKAPKPLIY [서열 13]이고;

[0075]

VL CDR2은 서열식 $ATSNX_1AX_2$ [서열 6] [여기서, X_1 은 L, N, 또는 P이고; X_2 는 S, K, Y, L, M, F, E, Q, R, 또는 H임]의 ATSNLAS [서열 139]이며;

[0076]

- [0077] LCVR FR3 골격은 GVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYC [서열 37]이고;
- [0078] VL CDR3은 서열식 $X_1QWDX_2X_3X_4PA$ [서열 7] [여기서, X_1 은 Q 또는 S이고; X_2 는 L, D, 또는 P이며; X_3 은 N 또는 R이고; X_4 는 P, F, Y, 또는 R임]의 QQWDLNPPA [서열 140]이며;
- [0079] LCVR FR4 골격은 FGQGTKLEIK [서열 38]이고;
- [0080] 경쇄 불변 영역은
- RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT
HQLGLSSPVTKSFNRGEC [서열: 41];
- [0081]
- [0082] 이다} 및
- [0083] 다음을 포함하는 중쇄:
- QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYNMHWVRQAPGQGLEWMGYIYPYDGD
TGYNQKFKSRTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGYRWFAYWGQGLTVTS
SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPAEFLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG [서열: 131]
- [0084]
- [0085] {상기에서, HCVR FR1 골격은 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS [서열 8]이고;
- [0086] VH CDR1은 서열식 $GYX_1FX_2DYNX_3X_4$ GYTFTDYNMH [서열 2] [여기서, X_1 은 T 또는 D이고; X_2 는 T, E, 또는 F이며; X_3 은 M, I, L, 또는 V이고; X_4 는 H, V, 또는 A임]의 GYTFTDYNMH [서열 141]이며;
- [0087] HCVR FR2 골격은 WVRQAPGQGLEWMG GYTFTDYNMH [서열 9]이고;
- [0088] VH CDR2는 서열식 $X_1X_2YPYDGX_3TGX_4NX_5KX_6KS$ [서열 3] [여기서, X_1 은 Y, Q, 또는 S이고; X_2 는 I, 또는 V이며; X_3 은 D, 또는 E이고; X_4 는 Y, T, H, 또는 L이며; X_5 는 Q, K, P, 또는 S이고; X_6 은 F 또는 Y임]의 YIYPYDGD TGYNQKFKS GYTFTDYNMH [서열 142]이며;
- [0089] HCVR FR3 골격은 RVTMTTDTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR YIYPYDGD TGYNQKFKS GYTFTDYNMH [서열 10]이고;
- [0090] VH CDR3은 서열식 $GYRX_1X_2X_3Y$ [서열 4] [여기서, X_1 은 W 또는 A이고; X_2 는 F 또는 L이며; X_3 은 A, E, 또는 Y임]의 GYRWFAY [서열 143]이며;
- [0091] HCVR FR4 골격은 WGQGLTVTVSS [서열 11]이고;
- [0092] 중쇄 불변 영역은
- ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPAEFLGGPSVFLF
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR
VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG [서열: 40].
- [0093]
- [0094] 이다}를 가질 수 있는 제46P-L1-6호를 창출할 수 있었다.
- [0095] **항체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드**
- [0096] 본 발명은 추가로, 본 발명의 결합성 조성물 (또는 그의 단편) 또는 폴리펩티드 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 포괄한다. 이러한 폴리뉴클레오티드는 당해 분야에 공지된 방법에 의해 수득할 수 있고, 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은, 예를 들어 폴리펩티드 서열 (예를 들면, 항체 또는 그의 단편의 폴리펩티드 서열)이 공지된 경우에는 당해 분야에 공지된 방법에 의해 결정할 수 있으며, 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 유전자 암호 축퇴를 모든 컴퓨터 알고리즘에 간단히 사용함으로써 결정할 수 있고, 이로써 생성된 서열 정보를 이용하여, 예를 들어 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오티드를 어셈블리할 수 있는데 [참고: Kutmeier, et al., (1994) BioTechniques 17:242], 이러한 과정은 간략하게 언급하면, 폴리펩티드를 서열을 암호화하는 서열 일부를 함유하는 중복 올리고뉴클레오티드를 합성하고, 이들 올리고뉴클레오

티드를 어닐링 및 연결시킨 다음, 이와 같이 연결시킨 올리고뉴클레오티드를 폴리머라제 연쇄 반응을 이용하여 증폭시키는 것을 포함한다.

- [0097] 또 다른 한편, 본 발명의 폴리펩티드 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 적합한 모든 공급원의 핵산으로부터 생성될 수 있다. 특정한 항체를 암호화하는 핵산 분자를 함유하는 클론은 입수 가능하지 않지만, 이러한 항체 분자의 서열이 공지된 경우에는, 면역글로불린을 암호화하는 핵산을 화학적으로 합성할 수 있거나 또는 적합한 공급원으로부터 수득할 수 있다. 예를 들어, 공급원은 관심있는 항체를 발현하는 모든 조직 또는 세포, 예를 들면 관심있는 폴리뉴클레오티드 서열의 3' 및 5' 말단과 혼성화 가능한 합성 프라이머를 이용한 PCR 증폭에 의해 또는 특정한 유전자 서열에 대해 특이적인 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여 클로닝하여, 예를 들어 해당 항체를 암호화하는 cDNA 라이브러리로부터 cDNA 클론을 확인함으로써 본 발명의 항체를 발현하도록 선별된 하이브리도마 세포로부터 분리된, 폴리 A+ RNA로부터 생성된 cDNA 라이브러리, 또는 항체 cDNA 라이브러리일 수 있고, 상기 항체에 대한 핵산 분자를 생성시킬 수 있다.
- [0098] 증폭시킨 핵산은 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 복제 가능한 클로닝 벡터 내로 클로닝할 수 있다. 해당 항체의 뉴클레오티드 및 상응하는 아미노산 서열이 일단 결정되면, 이러한 항체의 뉴클레오티드 서열은 당해 분야에 공지된 방법, 예를 들어 재조합 DNA 기술, 부위 지시된 돌연변이 유발, PCR 등을 사용하여 조작하여 아미노산 치환물, 결실물 및/또는 삽입물을 창출시키는 상이한 아미노산 서열을 갖는 항체를 생성시킬 수 있다 [참고: 예를 들어, Sambrook, et al., and Ausubel, et al., eds., cur. ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY].
- [0099] 구체적 양태에서는, 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열을 조사하여, 공지된 방법에 의해, 예를 들어 기타 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 공지된 아미노산 서열을 비교하여 서열 초가변 영역을 결정함으로써 상보성 결정 영역 (CDR) 서열을 확인할 수 있다. 통상적인 재조합 DNA 기술을 이용하여, 본원에 기재된 하나 이상의 CDR을 적합한 골격 영역 내에, 예를 들어 인간 골격 영역 내로 삽입하여 면역원성을 저하시킬 수 있다. 골격 영역은 천연 발생적 또는 컨센서스 골격 영역 (또는 본원에 교시된 바와 같음)일 수 있고, 바람직하게는 인간 골격 영역이다 [인간 골격 영역에 관한 열거는, 예를 들어 문헌 (Chothia, et al. 1998 J. Mol. Biol. 278: 457-79)을 참고할 수 있다]. 일반적으로 말하자면, 항원 결합 부위의 완전성에 영향을 미치므로 항원 결합성에도 영향을 미치는 것으로 예상되는 인간 골격 내의 잔기를 확인하기 위해, 공여자 서열과 선별된 인간 수용자 서열 둘 다를, 항체 레퍼토리로부터 유래된 몇 가지 서열 주형과 정렬시킬 수 있다. '불변 잔기' [참고: Kabat et al., 1991] 및 '주요 잔기' [참고: Chothia et al., 1989]를 확인하고, 서열 주형에 대향한 서열을 스크리닝함으로써 공여자 항원 결합성 루프 L1-L3, H1 및 H2 각각의 기준-부류 (canonical-class) 할당에 관해 결정할 수 있다 [참고: Martin & Thornton, 1996 Mol. Biol. 263:800-15 at <http://www.bioinf.org.uk/>]. 더우기, VH/VL 계면 잔기 [참고: Chothia et al., 1985] 및 코어 부위에 구조적으로 보존되는 것으로 공지된 잔기 [참고: Chothia et al., 1998]를 상응하는 공여자 및 수용자 잔기와 비교한다. 이들 부위에서 일치되지 않는 공여자 및 수용자 골격 잔기를, 단백질 데이터 은행으로부터 공지된 구조의 기타 항체에 관한 정보에 근거하여 분석한다 [참고: Berman, et al., 2000 Nucl. Acids Res. 28(1):235-42]. 외래 V 영역을 인간화하기 위한 주형으로서 사용하기 위해 인간 골격을 선별하는 것은 어느 잔기를 인간화시켜야 하는 것에 관한 후속 결정을 명확히 할 수 있다. 입수 가능한 데이터 베이스로부터 유래된 생식세포계, 비생식세포계 또는 컨센서스 서열로부터, 공지된 결정 구조를 지닌 항체로부터 상동성 주형을 택하는 것은 선택 사항 (옵션)이다 [참고: Routledge et al. (Routledge, et al., 1993 in Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man (Clark, M., ed) pp. 14-44, Academic Titles, Nottingham, UK; and B. Lo, 2004 Antibody Engineering: Methods and Protocols, Humana Press)]. 항체를 인간화시키기 위한 또 다른 전략은 공여자 CDR를 수용하기 위한 골격으로서 가장 근접한 인간 생식세포계 서열 [참고: Tomlinson et al., 1992]을 선택하는 것이다. 이러한 생식세포계 접근방식은 최량 적합 (best-fit) 전략과 동일한 이론적 근거에 기초하지만, 생식세포계 서열 만을 해당 데이터베이스에서 조사한다 [예를 들어, V BASE를 참고할 수 있는데, 이는 유전자은행 및 EMBL 데이터 라이브러리의 현행 릴리즈 (release) 내의 것을 포함한, 공개된 수 천개 서열 전반에 걸쳐 편집된 모든 인간 생식세포계 가변 영역 서열의 포괄적 디렉토리 (directory)이다. V BASE 데이터 베이스는 인간 항체 유전자의 서열 분석과 지도화에 관한 연구의 연장선으로서, 그리고 그들을 분석하는데 사용하기 위한 도구로서 MRC 단백질 유전공학 센터 (MRC Center for Protein Engineering; Cambridge, UK)가 수 년에 걸쳐 개발하였다]. 생식세포계 골격 방법은 매우 유용한데, 이는 인간 생식세포계 서열이 잠재적으로 면역원성인 체세포 초변이물을 제시하지 않기 때문이다. 컨센서스 인간 생식세포계 전략을 이용하여 CDR을 인간 골격 내로 이식 또는 포매시킬 수 있는데, 여기서는 인간 아군 중의 하나를 골격으로서 사용한다 [참고: 예를 들어, Presta et al., 1993 J. Immunol 151:2623-32; Couto et al., 1994 Hybridoma, 13:215-9; Couto et al.,

1995 Cancer Res. (Suppl.), 55, 5973s-7s; Werther et al., 1996 J. Immunol., 157:4986-95; O'Connor et al., 1998 Protein Engng 11:321-8].

[0100] 바람직하게, 골격 영역과 CDR을 조합함으로써 생성시킨 폴리뉴클레오티드는 TGF 베타 1 (또는 그의 에피토프)와 특이적 및/또는 선택적으로 결합하는 항체 (또는 그의 단편)를 암호화한다. 바람직하게, 본원에 논의된 바와 같이, 골격 영역 내에 하나 이상의 아미노산 치환이 이루어지도록 하여 항원에 대한 항체의 결합성을 개선시킬 수 있다.

[0101] 부가적으로 상기 방법을 사용하여, 하나 이상의 쇠내 디설파이드 결합이 결여된 항체 분자를 생성시키기 위해 쇠내 디설파이드 결합에 참여하는 하나 이상의 가변 영역, 시스테인 잔기의 아미노산 치환물 또는 결실물을 만들 수 있다. 폴리뉴클레오티드에 대한 기타 변형물이 본 발명에 포괄되고, 당업자 (예를 들어, 분자 생물학자)의 기술 수준 내에 있다.

[0102] 또 다른 한편, 단일 쇠 항체를 생성하도록 기술을 변경시킬 수 있다 [참고: 예를 들어, 미국 특허 제4,946,778 호; Bird, Science 242:423-42 (1988); Huston, et al., PNAS 85:5879-5883 (1988); and Ward, et al., Nature 334:544-54 (1989)]. 단일 쇠 항체는 Fv 영역의 중쇄와 경쇄 단편을 아미노산 브릿지를 통하여 연결시켜 단일 쇠 폴리펩티드를 생성시킴으로써 형성된다. 이. 콜라이 (*E. coli*)에서 기능적 Fv 단편을 어셈블리하는 기술을 사용할 수도 있다 [참고: Skerra, et al. (1988) Science 242: 1038-1041].

[0103] 폴리펩티드 단편

[0104] 본 발명은 또한, 결합성 조성물의 단편을 포괄한다. "폴리펩티드 단편 또는 절편"은 본원에 기재된 서열의 일 부이거나 또는 특정 서열 (번호)의 폴리펩티드 서열의 일부인 아미노산 서열을 포괄한다. 단백질 및/또는 폴리펩티드 단편 또는 절편은 "독립적 (free-standing)"일 수 있거나, 또는 보다 큰 폴리펩티드 또는 단백질의 일부를 구성할 수 있는데, 상기 단편 또는 절편은 특정 부분 또는 영역, 예를 들어 융합 단백질에서 연결된 본원의 서열의 단일 연속 영역을 형성한다.

[0105] 바람직하게, 폴리펩티드 절편은 연속되는 아미노산 길이가 약 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 110, 120, 130, 140, 또는 150개 이상일 수 있다. 이러한 맥락에서 "약"에는, 예를 들어 본원에 구체적으로 인용된 범위 또는 기재된 값이 포함되고, 해당 단편의 어느 한 말단 또는 양 말단의 몇 개 아미노산 잔기 (예를 들어, +/- 5, +/- 4, +/- 3, +/- 2 또는 +/- 1 아미노산 잔기)가 이들 인용 수치와 상이한 값을 또한 포괄한다. 이러한 폴리펩티드 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에 포괄된다.

[0106] 더우기, 본 발명은 복수 개의 상기 아미노산 절편 또는 단편, 예를 들어 명시된 길이의 비중복 절편을 포함하는 단백질 또는 폴리펩티드를 포괄한다. 전형적으로, 복수 개는 2개 이상, 보다 통상적으로 3개 이상, 바람직하게 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 이상일 것이다. 최소 길이의 절편이 제공된다 할지라도, 최대 길이의 각종 크기가 특정한 모든 복수 개의 절편에 포괄되는데, 예를 들어 전체로서 3개 복수 개의 절편은 7개의 연속되는 아미노산 길이의 1개 절편과, 2개의 부가의 비중복 절편 (이들 각각은 길이가 12개이다)을 가질 수 있다.

[0107] 예를 들어, 상보성 결정 영역 (CDR, 예를 들면 VL 또는 VH: CDR1, CDR2, 또는 CDR3), 가변 영역 (예를 들어, 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역, VL 또는 VH), 골격 영역 (FH1, 2, 3, 또는 4), D 또는 J 영역, 불변 영역 (예를 들어, C_L, C_H1, C_H2 또는 C_H3), 힌지 영역, Fc 감마 수용체 결합성 영역, 알파-나선 및 알파-나선 형성 영역, 베타-시트 및 베타-시트 형성 영역, 회전 및 회전 형성 영역, 코일 및 코일 형성 영역, 친수성 영역, 소수성 영역, 알파 양친매성 영역, 베타 양친매성 영역, 가요성 영역, 루프 영역, 헤어핀 (hairpin) 도메인, 베타-알파-베타 모티프, 나선 다발, 알파/베타 배럴, 상향 및 하향 베타 배럴, 젤리 롤 또는 스위스 롤 모티프, 막관통 (transmembrane) 도메인, 표면 형성 영역, 기질 결합성 영역, 막관통 영역, 링커, 면역원성 영역, 에피토프성 영역, 및 고 항원성 지수 영역을 포함하는 구조적 또는 기능적 도메인, 예를 들면 단편, 또는 그의 조합물을 특징으로 하는 폴리펩티드 단편 또는 절편 (및 그의 상응하는 폴리뉴클레오티드 단편)이 또한 바람직하다. 더우기, 이들 도메인을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 또한 포괄된다.

[0108] 기타 바람직한 폴리펩티드 절편은 생물학적 활성 단편이다. 생물학적 활성 단편은 결합성 조성물 폴리펩티드 (또는 그의 단편)의 활성과 유사한 활성을 나타내긴 하지만, 이의 활성과 반드시 동일하지 않는 단편, 예를 들어 Fab, Fv, scFv, 또는 F(ab)₂이다. 이들 폴리펩티드 단편을 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 또한 본 발명에

포괄된다.

- [0109] 바람직하게, 폴리뉴클레오타이드 단편은 기능적 활성을 나타내는 폴리펩티드를 암호화한다. "기능적 활성"이란 한 가지 이상의 공지된 기능적 활성을 수행할 수 있는 폴리펩티드 절편을 포괄한다. 이러한 기능적 활성에는 생물학적 활성, 항원성 [항체 결합성 조성물이 본 발명의 폴리펩티드와 결합할 수 있거나 결합을 놓고 특정 폴리펩티드와 경쟁할 수 있는 능력], 면역원성 (본 발명의 폴리펩티드와 결합하는 항체를 생성시킬 수 있는 능력), 본 발명의 폴리펩티드와 다량체를 형성할 수 있는 능력, 및 본원에 기재된 폴리펩티드의 리간드 또는 수용체와 결합할 수 있는 능력이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.
- [0110] 특정 폴리펩티드 (그의 단편, 변이체, 유도체 및 유사체 포함)의 기능적 활성은 각종 방법에 의해 검정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드의 항체와의 결합을 놓고 본 발명의 완전한 길이의 폴리펩티드와 경쟁할 수 있거나 그와 결합할 수 있는 능력에 관해 검정하는 경우에는, 방사성 면역검정, ELISA (효소 결합 면역흡착 검정), "샌드위치" 면역검정, 면역방사측정 검정, 겔 확산 침전 반응, 면역-확산 검정, 계내 면역검정 (예를 들어, 콜로이드상 금, 효소 또는 방사성 동위원소 표지를 사용함), 웨스턴 블롯 (western blot), 침전 반응, 응집 검정 (예: 겔 응집 검정, 적혈구 응집 검정, 보체 고정 검정, 면역형광 검정, 단백질 A 검정 및 면역-전기영동 검정 등) 등의 기술을 사용하는 경쟁적 및 비경쟁적 검정 시스템을 포함되지만 그에 제한되지 않는, 당해 분야에 공지된 각종 면역검정을 사용할 수 있다.
- [0111] 또 다른 양태에서는, 일차 항체 상의 표지를 탐지함으로써 항체 결합을 달성한다. 또 다른 양태에서, 일차 항체는 이러한 일차 항체에 대한 이차 항체 또는 시약의 결합을 탐지함으로써 탐지한다. 추가의 양태에서는, 이차 항체를 표시시킨다. 면역검정에서 결합을 탐지하기 위한 많은 수단이 당해 분야에 공지되어 있고, 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0112] 또 다른 양태에서, 리간드를 확인하는 경우, 또는 본 발명의 폴리펩티드 단편, 변이체 또는 유도체를 다량체화할 수 있는 능력을 평가하는 경우에는, 예를 들어 환원성 및 비환원성 겔 크로마토그래피, 단백질 친화 크로마토그래피 및 친화 블롯팅을 사용함으로써 결합을 검정할 수 있다 [참고: Phizicky, et al. (1995) Microbial. Rev. 59:94-123]. 또 다른 양태에서, 폴리펩티드가 그의 기질과 결합하는 것의 생리학적 상관관계 (신호 변환)는 통상의 기술을 사용하여 검정할 수 있다. 또한, 본원에 기재된 검정 (예를 들어, 본원의 "실시예" 섹션 참고), 또는 당해 분야에 공지된 검정을 통상적으로 적용하여, TGF 베타 1의 관련 생물학적 활성 (시험관내 또는 생체내)을 조정할 수 있는 결합성 조성물 (그의 단편, 변이체, 유도체 및 유사체)의 능력을 측정할 수 있다.
- [0113] **항체의 생성 방법**
- [0114] 항체 결합성 조성물은 당해 분야에 공지된 방법, 특히 화학적 합성 또는 바람직하게 재조합 발현 기술에 의해 생성시킬 수 있다.
- [0115] 결합성 조성물, 또는 그의 단편, 유도체 또는 유사체 (예를 들어, 본 발명의 항체의 중쇄 또는 경쇄, 또는 본 발명의 단일 쇠 항체)를 재조합 발현시키기 위해서는, 해당 항체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 함유하는 발현 벡터를 구축해야 한다. 본 발명의 항체 분자 또는 항체의 중쇄 또는 경쇄, 또는 그의 일부 (바람직하게는 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인을 함유한다)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 일단 수득하면, 이러한 항체 분자를 생성하기 위한 벡터를 공지된 재조합 DNA 기술에 의해 생성시킬 수 있다.
- [0116] 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 결합성 조성물 암호화 서열과 적당한 전사 및 해독 제어 신호를 함유하는 발현 벡터를 구축할 수 있다. 이들 방법에는, 예를 들어 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술, 및 생체내 유전자 재조합이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 따라서 본 발명은 본 발명의 항체 (또는 그의 단편), 또는 그의 중쇄 또는 경쇄, 또는 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인, 또는 프로모터와 작동적으로 연결된 CDR을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 복제 가능한 벡터를 포괄한다. 이러한 벡터에는, 예를 들어 항체 분자의 불변 영역을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열이 포함될 수 있고 [참고: 예를 들어, WO 86/05807; WO 89/01036; 또는 미국 특허 제5,122,464호], 항체의 가변 도메인을 이러한 벡터 내로 클로닝하여 완전한 중쇄 또는 경쇄 또는 그의 일부를 발현시킬 수 있다.
- [0117] 일반적으로 말하자면, 발현 벡터는 통상적인 기술에 의해 숙주 세포에 전이시킨 다음, 이와 같이 전이시킨 세포를 배양하여 항체 또는 그의 일부를 생성시킨다. 따라서 본 발명은 또한, 예를 들어 이중 프로모터와 작동적으로 연결된, 본 발명의 단일 쇠 항체, 또는 본 발명의 항체, 또는 그의 중쇄 또는 경쇄를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 숙주 세포를 포괄한다. 이중 가닥 항체를 발현하기 위한 바람직한 양태에서는, 중쇄와 경쇄 둘 다를 암호화하는 벡터를 숙주 세포에서 공동-발현시켜, 본원에 기재된 바와 같거나 당해 분야에 공지된 바와

같이 완전한 번역글로볼린 분자를 발현시킬 수 있다.

- [0118] 각종 숙주-발현 벡터 시스템을 활용하여 본 발명의 항체 분자를 발현할 수 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은 관심있는 모든 암호화 서열을 생성시킬 수 있고 후속 정제할 수 있는 비히클을 나타낸다. 그러나, 적당한 뉴클레오타이드 암호화 서열로 형질전환 또는 형질감염시킨 경우에는, 숙주-발현 시스템 세포가 계내 본 발명의 항체 분자를 나타낼 수도 있다. 이들 세포에는, 예를 들어 항체 암호화 서열을 함유하는 재조합 박테리오파아지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환시킨 미생물, 예를 들면 세균 [예: 이. 콜라이, 비. 서브틸리스 (*B. subtilis*)]; 항체 암호화 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환시킨 효모 [예: 삭카로마이세스 (*Saccharomyces*), 피치아 (*Pichia*)]; 항체 암호화 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터 [예: 바쿨로바이러스 (baculovirus)]로 감염시킨 곤충 세포 시스템; 항체 암호화 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터 (예: 콜리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)로 감염시켰거나 또는 항체 암호화 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터 (예: Ti 플라스미드)로 형질전환시킨 식물 세포 시스템; 또는 포유류 세포의 계놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유류 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5 K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 구조물을 정착시킨 포유류 세포 시스템 (예: COS, CHO, BHK, 293, 3T3 세포)이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.
- [0119] 바람직하게, 세균 세포, 예를 들어 에스케리차 콜라이 (*Escherichia coli*), 보다 바람직하게 진핵성 세포를 재조합 항체 분자 발현에 사용한다. 예를 들어, 중국산 햄스터 난소 세포 (CHO) 등의 포유류 세포를, 인간 시토메갈로바이러스 (cytomegalovirus)로부터의 주요 중간 초기 유전자 프로모터 요소 등의 벡터와 연계한 것이, 항체에 유효한 발현 시스템이다 [참고: Foecking, et al. (1986) *Gene* 45:101; Cockett, et al. (1990) *Bio/Technology* 8:2].
- [0120] 세균 시스템에서는, 발현된 항체 분자의 의도한 용도에 따라서 수 많은 발현 벡터를 유리하게 선별할 수 있다. 예를 들어, 항체 분자의 제약 조성물을 생성시키기 위해 다량의 단백질을 생성시켜야 하는 경우에는, 용이하게 정제되는 고 수준의 융합 단백질 생성물의 발현을 지시하는 벡터가 요망될 수 있다. 이러한 벡터에는, 예를 들어 이. 콜라이 발현 벡터 pUR278 [참고: Ruther, et al., *EMBO J.* 2: 1791 (1983)] [여기서는, 항체 암호화 서열을 lac Z 암호화 영역과 동일 프레임 내에서 벡터와 개별적으로 연결시켜 융합 단백질을 생성시킨다]; pIN 벡터 [참고: Inouye and Inouye, *Nucleic Acids Res.* 13:3 101-3 109 (1985); Van Heeke and Schuster, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509 (1989)] 등이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. pGEX 벡터를 또한 사용하여 외래 폴리펩티드를 글루타치온 S-트랜스퍼라제 (GST)와의 융합 단백질로서 발현할 수 있다.
- [0121] 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이고, 매트릭스 글루타치온-아가로스 비드에 흡착 및 결합시킨 다음, 자유 글루타치온의 존재 하에 용출시킴으로써 용해된 세포로부터 용이하게 정제할 수 있다. pGEX 벡터는 클로닝된 표적 유전자 생성물이 GST 부분으로부터 방출될 수 있도록 인자 Xa 프로테아제 절단 부위, 또는 트롬빈을 포함하도록 설계한다. 외래 유전자를 발현하기 위한 벡터로서 사용된 하나의 곤충 시스템은 아우토그라파 칼리포르니카 (*Autographa californica*) 핵 다각체병 바이러스 (AcNPV) 시스템이다. AcNPV 바이러스는 스포도프테루 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 성장한다. 항체 암호화 서열을 상기 바이러스의 비필수 영역 (예: 다각형 유전자) 내로 개별적으로 클로닝하고, 이를 AcNPV 프로모터 (예: 다각형 프로모터)의 제어 하에 놓아둘 수 있다.
- [0122] 포유류 숙주 세포에서는, 바이러스에 의거한 수 많은 발현 시스템을 활용할 수도 있다. 발현 벡터로서 아데노바이러스를 사용하는 경우에는, 관심있는 항체 암호화 서열을 아데노바이러스 전사/해독 제어 복합체, 예를 들어 후기 프로모터 및 삼련 (tripartite) 리더 서열에 연결시킬 수 있다. 이어서, 이러한 키메라 유전자를 시험관내 또는 생체내 재조합을 이용하여 아데노바이러스 계놈에 삽입할 수 있다. 바이러스성-계놈의 비필수 영역 (예: 영역 E1 또는 E3)에 삽입하면, 감염된 숙주에서 항체 분자를 발현할 수 있고 생육성인 재조합 바이러스가 생성된다 [참고: 예를 들어, Logan & Shenk, 1984 *PNAS* 81:355-9]. 삽입된 항체 암호화 서열을 효율적으로 해독하기 위해서는 특이적 개시 신호가 요구될 수도 있다. 이들 신호에는, 예를 들어 ATG 개시 코돈, 및 인접한 서열이 포함된다. 더우기, 개시 코돈은 전체 삽입물의 적당한 해독을 보장하기 위해 목적하는 암호화 서열의 판독 프레임과 동일 상에 존재해야만 한다. 이들 외인성 해독 제어 신호와 개시 코돈은 천연 및 합성의 각종 기원일 수 있다.
- [0123] 발현 효율은 적당한 전사 증강인자 요소, 전사 종결인자 등을 봉입시킴으로써 증강시킬 수 있다 [참고: 예를 들어, Bittner, et al., 1987 *Methods in Enzymol.* 153:5 1-4]. 또한, 삽입된 서열의 발현을 조정시키거나, 또

는 유전자 생성물을 목적하는 특이적 방식으로 변형 및 프로세싱하는 숙주 세포 균주를 선택할 수 있다. 이러한 단백질 생성물의 변형 (예: 당화) 및 프로세싱 (예: 절단)은 단백질 기능에 중요할 수 있다.

[0124] 상이한 숙주 세포는 단백질 및 유전자 생성물의 해독 후 프로세싱과 변형에 대해 특징적이고도 특이적인 기전을 갖는다. 발현되는 외래 단백질의 정확한 변형과 프로세싱을 보장하는 적당한 세포주 또는 숙주 시스템을 선택할 수 있다. 이를 위해, 일차 전사체의 적당한 프로세싱, 당화 및 인산화를 위한 세포성 기구 (machinery)를 보유하고 있는 진핵성 숙주 세포를 사용할 수도 있다. 이러한 포유류 숙주 세포에는, 예를 들어 CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, 및 특히, 유방암 세포주, 예를 들면 BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, 및 정상적인 유선 세포주, 예를 들면 CRL7030 및 Hs578Bst가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0125] 본 발명은 융합 단백질을 생성하기 위해 특정 폴리펩티드 (또는 그의 일부, 바람직하게는 폴리펩티드의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100개 이상의 연속되는 아미노산을 포함하는 일부)와 재조합적으로 융합되거나 화학적으로 접합된 (공유 및 비공유 접합 포함) 항체를 포괄한다. 이러한 융합은 반드시 직접적일 필요는 없지만, 링커 서열을 통하여 일어날 수도 있다.

[0126] 폴리펩티드와 융합되거나 접합된 항체는 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 시험관내 면역검정 및 정제 방법에 사용할 수도 있다 [참고: 예를 들어, Harbor, et al., *supra*, and WO 9312 1232; EP 439,095; Naramura et al. (1994) *Immunol. Lett.* 39:9 1-9; 미국 특허 제5,474,981호; Gillies, et al. 1992 *PNAS* 89:1428-32; Fell, et al. 1991 *J. Immunol.* 146:2446-52].

[0127] 본 발명은 추가로, 가변 영역 이외의 항체 도메인과 융합되거나 접합된 폴리펩티드 (또는 그의 단편)을 포함하는 조성물을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드 (또는 그의 단편)는 항체 불변 영역, D 또는 J 영역, 또는 Fc 영역, 또는 그의 일부와 융합되거나 접합될 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드 (또는 그의 단편)와 융합되는 항체 부분은 불변 영역, 힌지 영역, CH1 도메인, CH2 도메인, 및/또는 CH3 도메인, 또는 완전한 도메인 또는 그의 일부의 모든 조합물을 포함할 수 있다. 폴리펩티드 (또는 그의 단편)는 본원에 기재된 항체 부분과 융합시키거나 접합시켜 다량체를 형성할 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드 (또는 그의 단편)와 융합시킨 Fc 부분은 Fc 부분들 간의 디설파이드 결합을 통하여 이량체를 형성할 수 있다. 보다 고 차수의 다량체 형태는 상기 폴리펩티드를 IgA 및 IgM의 일부와 융합시킴으로써 만들 수 있다. 본 발명의 폴리펩티드 (또는 그의 단편)를 항체 부분과 융합 또는 접합시키는 방법은 공지되어 있다 [참고: 예를 들어, 미국 특허 제5,336,603호; 제5,622,929호; 제5,359,046호; 제5,349,053호; 제5,447,851호; 제5,112,946호; EP 307,434; EP 367,166; WO 96/04388; WO9106,570; Ashkenazi, et al. (1991) *PNAS* 88: 10535-10539; Zheng, et al. (1995) *J. Immunol.* 154:5590-5600; and Vie, et al. (1992) *PNAS* 89: 11337- 11341].

[0128] 본원에 논의된 바와 같이, 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편을 본원에 기재되거나 당해 분야에 공지된 항체 부분과 융합 또는 접합시켜 생체내 반감기를 증가시킬 수 있다. 추가로, 폴리펩티드, 폴리펩티드 단편을 항체 부분과 융합 또는 접합시켜 정제를 촉진시킬 수 있다. 한 가지 예는 인간 CD4-폴리펩티드의 첫 번째 2개 도메인과, 포유류 면역글로불린의 중쇄 또는 경쇄의 불변 영역의 각종 도메인을 포함하는 키메라 단백질을 이용한다 [참고: 예를 들어, EP 394,827; Traunecker, et al. (1988) *Nature* 33 1:84-86].

[0129] 많은 경우에 있어, 융합 단백질의 Fc 부분은 치료 및 진단에 유익하므로, 예를 들어 개선된 약동학적 특성이 야기될 수 있다 [참고: 예를 들어, EP A232,262]. 또 다른 한편, 융합 단백질을 발현, 탐지 및 정제한 후에 Fc 부분을 제거하는 것이 쉽게 이루어질 수 있다. 예를 들어, Fc 부분은 융합 단백질이 면역을 위한 항원으로서 사용되는 경우에는 치료와 진단을 방해할 수 있다. 신약 개발에서는, hIL-5의 길항제를 확인하기 위한 고-처리 능력 스크리닝 검정을 위해, 예를 들어 인간 단백질 (예: hIL-5)를 Fc 부분과 융합시켰다 [참고: 예를 들어, Bennett, et al. (1995) *J. Molecular Recognition* 8:52-58; Johanson, et al. (1995) *J. Biol. Chem.* 270:9459-9471].

[0130] 더우기, 결합성 조성물 (또는 그의 단편)을 마커 서열, 예를 들어 펩티드와 융합시켜 정제를 촉진시킬 수 있다. 바람직한 양태에서는, 마커 아미노산 서열이 헥사-히스티딘 펩티드, 예를 들어 특히 pQE 벡터 (공급처: QIAGEN, Inc., Chatsworth, CA)에 제공된 태그인데, 이들 중 상당 수가 시판되고 있다. 헥사-히스티딘은 융합 단백질의 편리한 정제를 제공한다 [참고: Gentz, et al. (1989) *PNAS* 86:821-824]. 정제에 유용한 기타 펩티드 태그에는, 예를 들어 인플루엔자 적혈구응집소 단백질로부터 유래된 에피토프에 상응하는 "HA" 태그 [참고: Wilson, et al. (1984) *Cell* 37:767] 및 "플래그 (flag)" 태그가 포함된다.

[0131] 본 발명은 추가로, 진단제 또는 치료제와 접합된 항체 또는 그의 단편을 포괄한다. 이러한 항체는, 예를 들어

소정의 치료 섭생의 효능을 결정하기 위한 임상 시험 과정의 일부로서 종양의 발생이나 진행을 모니터링하기 위해 진단적으로 사용될 수 있다. 항체를 탐지 가능한 물질과 커플링함으로써 탐지를 촉진시킬 수 있다. 탐지 가능한 물질의 예에는, 예를 들어 각종 효소, 보결 분자단, 형광성 물질, 발광성 물질, 생물발광성 물질, 방사성 물질, 각종 양전자 방출 단층촬영술을 이용한 양전자 방출 금속, 및 비방사성 상자성 금속 이온이 포함된다. 탐지 가능한 물질은 확립된 기술을 사용하여 항체 (또는 그의 단편)와 직접적으로, 또는 중간체 (예를 들어, 당해 분야에 공지된 링커)를 통하여 간접적으로 커플링 또는 접합시킬 수 있다 [예를 들어, 본 발명에 따라서는 진단제로서 사용하기 위해 항체와 접합될 수 있는 금속 이온에 관해서는 미국 특허 제4,741,900호를 참고할 수 있다]. 적합한 효소의 예에는 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 또는 아세틸 콜린에스테라제가 포함되지만, 그에 제한되지 않고; 적합한 보결 분자단 착체의 예에는 스트렙타비딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴이 포함되지만, 그에 제한되지 않고; 적합한 형광성 물질의 예에는 옴벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아나이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드, 또는 피코에리트린이 포함되지만, 그에 제한되지 않으며; 발광성 물질의 예에는 루미놀이 포함되지만, 그에 제한되지 않고; 생물발광성 물질의 예에는 루시페라제, 루시페린 및 애쿠오린이 포함되지만, 그에 제한되지 않으며; 적합한 방사성 물질의 예에는 I^{125} , I^{131} , I^{111} 또는 Tc^{99} 이 포함된다.

- [0132] 본 발명의 결합성 조성물을 표적 항원의 정제 또는 면역검정에 특히 유용한 고체 지지체에 부착시킬 수도 있다. 적합한 고체 지지체에는 유리, 셀룰로스, 폴리-아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리프로필렌이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 치료적 부분을 항체에 접합시키는 기술은 공지되어 있다 [참고: 예를 들어, Amon, 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., "The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates," *Immunol. Rev.* 62: 119-58 (1982)].

[0133] B. 면역검정

- [0134] TGF 베타 1과 같은 특정한 단백질은 각종 면역검정 방법, 예를 들어 웨스턴 블롯, 방사성 면역검정, ELISA (효소 결합 면역흡착 검정), "샌드위치" 면역검정, 면역침전 검정, 침전 반응, 겔 확산 침전 반응, 면역확산 검정, 응집 검정, 보체 고정 검정, 면역방사측정 검정, 형광성 면역검정 및 단백질 A 면역검정 등의 기술을 사용하는 경쟁적 및 비경쟁적 검정 시스템 등에 의해 측정할 수 있다. 면역학적 및 면역검정 과정에 관한 고찰은 일반적으로 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Stites and Terr (eds.) (1991) Basic and Clinical Immunology (7th ed.)]. 더욱이, 본 발명의 면역검정은 다음 문헌에 광범위하게 고찰된 수 많은 입체 배치로 수행할 수 있다 [참고: Maggio (ed.) (1980) Enzyme Immunoassay CRC Press, Boca Raton, Florida; Gosling J P 2000 Immunoassays: A Practical Approach (Practical Approach Series) Oxford Univ Press; Diamandis & Christopoulos, 1996 Immunoassay Academic Press, San Diego, CA; Tijan (1985) "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays," Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam; Wild, D. (Ed.), 2001 The Immunoassay Handbook (2nd edition) Nature Pub Group; James T. Wu, 2000 Quantitative Immunoassay: A Practical Guide for Assay Establishment, Troubleshooting, and Clinical Application, Amer Assn for Clinical Chemistry, Brousseau & Beaudet (Eds.) Manual of Immunological Methods CRC Press Boca Raton, Florida; and Harlow and Lane Antibodies, A Laboratory Manual, *supra.*; Chan (ed.) (1987) Immunoassay: A Practical Guide Academic Press, Orlando, FL; Price and Newman (eds.) (1991) Principles and Practice of Immunoassays Stockton Press, NY; and Ngo (ed.) (1988) Non-isotopic Immunoassays Plenum Press, NY].

- [0135] 측정을 위한 면역검정은 당해 분야에 공지된 각종 방법에 의해 수행할 수 있다. 간략하게 설명하면, 단백질을 측정하기 위한 면역검정은 경쟁적 또는 비경쟁적 결합 검정일 수 있다. 경쟁적 결합 검정에서는, 분석하고자 하는 샘플이, 고체 표면과 결합된 포획제 상의 특이적 결합 부위를 놓고 표지된 분석물과 경쟁한다. 바람직하게는, 포획제가 본원에 기재된 바와 같은 TGF 베타 1 단백질과 특이적으로 반응성인 항체이다. 포획제와 결합

된 표지된 분석물의 농도는 샘플에 존재하는 자유 분석물의 양과 반비례한다.

[0136] 경쟁적 결합 면역검정에서는, 샘플에 존재하는 표적 단백질이 이러한 표적 단백질과 특이적 및/또는 선택적으로 반응성인 특이적 결합성 조성물, 예를 들어 항체와 같은 결합성 조성물과의 결합을 놓고 표지된 단백질과 경쟁한다. 이러한 결합성 조성물을 고체 표면과 결합시켜 결합된-표지된 단백질을 결합되지 않은-표지된 단백질로부터 격리시킬 수 있다. 또 다른 한편, 경쟁적 결합 검정을 액체 상으로 수행할 수 있고, 당해 분야에 공지된 각종 기술을 사용하여 결합된-표지된 단백질을 결합되지 않은-표지된 단백질로부터 격리시킬 수 있다. 격리시킨 후, 결합된 표지된 단백질의 양을 결정한다. 샘플에 존재하는 단백질의 양은 표지된 단백질 결합 양에 반비례한다.

[0137] 또 다른 한편, 격리 단계가 필요치 않은 균질적 면역검정을 수행할 수 있다. 이들 면역검정에서는, 단백질을 그의 특이적 결합성 조성물과 결합시킴으로써 단백질 상의 표지를 변경시킨다. 이와 같이 표지된 단백질을 변경시키면, 표지에 의해 방출된 신호가 감소되거나 증가되기 때문에, 면역검정이 끝날 무렵에 표지를 측정하는 것이 단백질을 탐지 또는 정량화할 수 있게 해준다.

[0138] 세포를 단백질에 대한 공지된 결합 친화도를 지닌 항체, 예를 들어 ^{125}I -항체, 또는 표지된 결합 파트너와 접촉시키고 함께 항은 배양하며, 결합성 조성물에 대한 시험 샘플의 결합 친화도를 측정하는 경쟁적 검정이 또한 특히 유용하다. 이어서, 결합된 결합성 조성물과 자유-표지된 결합성 조성물을 격리시켜 단백질 결합도를 평가한다. 결합된 시험 화합물의 양은 공지된 공급원에 대한 표지된 결합 파트너 결합 양에 반비례한다. 수 많은 기술 중의 어느 한 가지를 사용하여 결합된 단백질을 자유 단백질로부터 격리시켜 단백질 결합도를 평가할 수 있다. 이러한 격리 단계는 전형적으로, 필터에 부착시킨 다음 세척하거나, 플라스틱에 부착시킨 다음 세척하거나, 또는 세포막을 원심분리시키는 등의 과정을 포함할 수 있다. 생존 세포를 또한 사용하여, TGF 베타 단백질 매개된 기능 (예: 제2 메신저 수준, 예를 들어 세포 증식; 이노시톨 인산염 풀 변화, 루시페라제-유형 검정을 이용한 전사 등)에 대한 약물 효과에 대해 스크리닝할 수 있었다. 몇몇 탐지 방법, 예를 들어 근접-민감성 탐지 시스템을 이용하여, 격리 단계를 없앨 수 있다.

[0139] 단백질의 정성적 또는 정량적 분석은 각종 비경쟁적 면역검정 방법에 의해 결정할 수도 있다. 예를 들어, 2-부위 고체 상 샌드위치 면역검정을 사용할 수 있다. 이러한 유형의 검정에서는, 단백질에 대한 결합성 조성물 (예: 항체)을 고체 지지체에 부착시킨다. 항체일 수도 있고 상이한 부위에서 단백질과 결합하는 제2의 단백질-결합성 조성물을 표지시킨다. 단백질 상의 양 부위에 결합시킨 후, 결합되지 않은-표지된 결합성 조성물을 제거하고, 고체 상과 결합된 표지된 결합성 조성물의 양을 측정한다. 결합된 표지된 결합성 조성물의 양은 샘플 중의 단백질 양과 정비례한다.

[0140] 상기 언급된 면역검정 포맷은 표지된 검정 성분을 이용한다. 표지는 당해 분야에 널리 공지된 방법에 따라서 검정의 목적 성분과 직접 또는 간접적으로 커플링시킬 수 있다. 각종 표지 및 방법을 사용할 수 있다. 전통적으로, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , 또는 ^{32}P 를 도입한 방사성 표지를 사용하였다. 비방사성 표지에는 표지된 항체와 결합하는 단백질, 형광단, 화학발광제, 효소, 및 표지된 단백질에 대한 특이적-결합 쌍 구성원으로서 제공될 수 있는 항체가 포함된다. 표지의 선택은 요구되는 민감도, 화합물과의 접합 용이성, 안정성 요구 사항, 및 이용 가능한 수단에 좌우된다. 사용될 수 있는 각종 표지화 또는 신호 생성 시스템에 관한 고찰은 미국 특허 제 4,391,904호를 참고할 수 있다.

[0141] 특정한 단백질과 반응성인 항체 결합성 조성물을 각종 면역검정 방법에 의해 측정할 수도 있다. 면역검정 기술에 의해 항체를 측정하는데 적용 가능한 면역학적 및 면역검정 과정에 관한 고찰은 다음 문헌을 참고할 수 있다 [참고: Stites and Terr (eds.) Basic and Clinical Immunology (7th ed.) *supra*; Maggio (ed.) Enzyme Immunoassay, *supra*; and Harlow and Lane Using Antibodies, A Laboratory Manual, *supra*].

[0142] 간략하게 설명하면, 표적화 단백질과 반응성인 항체 결합성 조성물을 측정하기 위한 면역검정은 경쟁적 또는 비경쟁적 결합 검정일 수 있다. 경쟁적 결합 검정에서는, 샘플 분석물이 고체 표면과 결합된 포획제 상의 특이적 결합 부위를 놓고 표지된 분석물과 경쟁한다. 바람직하게는, 포획제가 정제된 재조합 단백질이다. 분리되거나 부분적으로 정제된 천연 발생 단백질도 포함하는 단백질의 기타 공급원을 사용할 수도 있다. 비경쟁적 검정에는 샘플 분석물을 2개 분석물-특이적 결합성 시약 사이에 결합시키는 샌드위치 검정이 포함된다. 결합성 조성물 중의 하나를 포획제로서 사용하고 고체 표면과 결합시킨다. 제2 결합성 조성물을 표지시키고, 이를 사용하여 이로써 생성된 복합체를 가시적 또는 기기 수단에 의해 측정 또는 탐지한다. 포획제와 표지된 결합성 조성물의 수 많은 조합물을 사용할 수 있다. 각종 상이한 면역검정 포맷, 격리 기술, 및 표지를, 특정 단백질을 측정하기 위해

상기 언급된 바와 유사하게 사용할 수 있다.

- [0143] 특정한 항원을 면역침전시킬 수 있는 관심있는 항체의 능력은, 예를 들어 웨스턴 블롯 분석에 의해 평가할 수 있다. 당업자는 (예를 들어, 세포 용해물을 세포로스 비드로 예비-클리어함으로써) 항원에 대한 항체의 결합을 증가시키고 배경을 저하시키기 위해 파라미터를 변형시킬 수 있는지에 대해 알고 있을 것이다. 면역침전 프로토콜에 관한 추가의 논의가, 예를 들어 다음 문헌에 보고되었다 [참고: Ausubel et al., eds., 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York].
- [0144] ELISA 검정은 항원을 제조하고; 96 웰 미세역가-판의 웰을 항원으로 피복하며; 탐지 가능한 화합물, 예를 들어 효소적 기질 (예: 서양고추냉이 피옥시다제 또는 알칼리성 포스포타제)과 접합된 관심있는 항체를 상기 웰에 부가하며; 일정 기간 동안 항온 배양한 다음; 항원의 존재 여부를 탐지하는 것을 포함한다. ELISAs에서는, 관심있는 항체가 탐지 가능한 화합물과 접합되지 않고, 대신 탐지 가능한 화합물과 접합된 제2 항체 (이는 관심있는 항체를 인식한다)를 웰에 가할 수 있다. 추가로, 웰을 항원으로 피복하는 것 대신, 항체를 웰에 피복시킬 수도 있다. 이러한 경우에는, 관심있는 항원을 상기 피복된 웰에 부가한 후에, 탐지 가능한 화합물과 접합된 제2 항체를 부가할 수 있다. 당업자는 과도한 실험없이도, 예를 들어 신호를 증가시키기 위해 조정해야 할 파라미터가 무엇인지를 결정할 수 있을 뿐만 아니라 ELISA에 대해 사용해야 할 기타 변수들이 무엇인지를 결정할 수 있다 [참고: 예를 들어, Ausubel, et al., eds., 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York].
- [0145] 항원에 대한 항체의 결합 친화도와, 항체-항원 상호 작용의 작동 속도 및 이탈 속도는, 예를 들어 경쟁적 결합 검정을 사용함으로써 결정할 수 있다. 한 가지 비제한적 예는 표지된 항원 (예를 들어, ^3H 또는 ^{125}I 을 사용함)을 증가량의 표지되지 않은 항원의 존재 하에 관심있는 항체와 함께 항온 배양한 다음, 상기 표지된 항원과 결합된 항체의 양을 탐지하는 것을 포함하는 방사성 면역검정이다. 특정한 항원에 대한 관심있는 항체의 친화도와 결합 이탈 속도는, 예를 들어 스캐차드 (Scatchard) 플롯 분석에 의해 해당 데이터로부터 결정할 수 있다. 제2 항체와의 경쟁은, 예를 들어 방사성 면역검정을 이용하여 결정할 수도 있다. 이러한 경우에는, 항원을 증가량의 표지되지 않은 제2 항체의 존재 하에 표지된 화합물 (예: ^3H 또는 ^{125}I)과 접합된 관심있는 항체와 함께 항온 배양한다.
- [0146] **물리적 변이체**
- [0147] 본 발명은 또한, 본원에 기재된 아미노산 서열과 상당한 아미노산 서열 유사성 및/또는 동일성을 지닌 폴리펩티드 서열을 포괄한다. 아미노산 서열 유사성 또는 서열 동일성은 잔기 정합물을 최적화함으로써 결정한다. 이는 보존적 치환물을 정합물로서 간주할 경우에는 변한다. 보존적 치환물에는 전형적으로, 다음 기 내에서의 치환물이 포함된다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소류이신, 루이신; 아스파르트산, 글루탐산; 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 리신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신 [참고: Needleham, et al. (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453; Sankoff, et al. (1983) *Time Warps, String Edits, and Macromolecules: The Theory and Practice of Sequence Comparison* Chapter One, Addison-Wesley, Reading, MA; and software packages from IntelliGenetics, Mountain View, CA; and the University of Wisconsin Genetics Computer Group, Madison, WI].
- [0148] 본 발명은 본원의 특이적 서열 식별자에 의해 암호화된 폴리펩티드와 기능적으로 관련되는 폴리펩티드 서열을 포괄하지만, 이에 제한되지 않는다. 기능적으로 관련된 폴리펩티드에는 결합성 조성물과 기능적 특징을 공유하는 (예를 들어, TGF 베타 1과는 선택적 및/또는 특이적으로 결합할 수 있지만, TGF 베타 2 및/또는 3과는 결합하지 않는 능력) 모든 폴리펩티드가 포함된다. 이러한 기능적으로 관련된 폴리펩티드에는 본원에 기재된 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열 내에서의 아미노산 잔기의 부가물 또는 치환물이 포함되지만, 그에 제한되지 않고; 특히 침묵 변화를 가져다 줌으로써, 기능적으로 등가의 폴리펩티드를 생성시키는 것이 있다. 아미노산 치환물은 관련된 잔기의 극성, 전하, 용해도, 소수성, 친수성 및/또는 양친매성 특성 상의 유사성에 근거하여 만들어질 수 있다.
- [0149] 예를 들어, 비극성 (소수성) 아미노산에는 알라닌, 루이신, 이소류이신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌이 포함되고; 극성 중성 아미노산에는 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민이 포함되며; 양 전하를 띤 (염기성) 아미노산에는 아르기닌, 리신, 및 히스티딘이 포함되고; 음 전하를 띤 (산성) 아미노산에는 아스파르트산 및 글루탐산이 포함된다.
- [0150] 더우기, 비전통적 아미노산 또는 화학적 아미노산 유사체를 치환시킬 수 있거나 또는 특정 폴리펩티드 서열 내

로 부가할 수 있다. 비전통적 아미노산에는 일반적으로, 통상 아미노산의 D-이성체; 2,4-디아미노부티르산; α-아미노 이소부티르산, 4-아미노부티르산, Abu, 2-아미노 부티르산, g-Abu, e-Ahx, 6-아미노 헥사노산, Aid, 2-아미노 이소부티르산, 3-아미노 프로피온산, 오르니틴, 노르루이신, 노르발린, 히드록시프롤린, 사르코신, 시트룰린, 호모시트룰린, 시스트산, t-부틸글리신, t-부틸알라닌, 페닐글리신, 시클로헥실알라닌, b-알라닌, 플루오로-아미노산, 디자이너 (designer) 아미노산, 예를 들어 b-메틸 아미노산, Ca-메틸 아미노산, Na-메틸 아미노산, 및 아미노산 유사체가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 추가로, 아미노산은 우선성 (D) 또는 좌선성 (L)일 수 있다.

[0151] 펩티드 부분을 부가하여 조작을 촉진시키는 것을 당해 분야에 널리 알려진 통상적인 기술이다. 더우기, 결합성 조성물 (그의 모든 단편, 및 구체적으로는 에피토프를 포함함)를 면역글로불린 (예: IgA, IgE, IgG, IgM) 또는 그의 일부의 불변 도메인 (CH1, CH2, CH3)의 일부와 합할 수 있는데 (그의 조합물 모두에는 완전한 도메인과 그의 일부 둘 다 포함된다), 이로써 키메라 폴리펩티드가 생성된다. 이러한 융합 단백질은 정제를 촉진시킬 수 있고, 단백질의 생체내 반감기를 증가시키는데 종종 유용하다. 예를 들어, 이는 인간 CD4 폴리펩티드의 첫 번째 2개 도메인과, 포유류 면역글로불린의 중쇄 또는 경쇄의 불변 영역의 각종 도메인을 포함하는 키메라 단백질에 대해 입증되었다 [참고: EP 394,827; Traunecker, et al., 1988 Nature 331:84-6]. 디설파이드-연결된 이량체성 구조 (IgG 도메인에 기인함)를 지닌 융합 단백질은 단량체성의 분비된 단백질 또는 단일 단백질 단편 이외의 기타 분자와 결합하고 이를 중화시키는데 있어 보다 효율적일 수도 있다 [참고: Fountoulakis, et al. 1995 J. Biochem.15 270:3958-64]. 면역계에 대한 상피 장벽을 가로질러 항원 전달이 증강된 것은 FcγR 결합 파트너, 예를 들어 IgG 또는 Fc 단편과 접합시킨 항원 (예: 인슐린)에 대해 입증되었다 [참고: WO 96/22024 and WO 99/104813].

[0152] 부가적으로, 융합 단백질은 인간 단백질 (또는 그의 일부)와 함께 면역글로불린 분자의 불변 영역의 각종 부분을 포함할 수 있다. 많은 경우에 있어, 융합 단백질 중의 Fc 부분은 치료 및 진단에 유익하므로, 예를 들어 개선된 약동학적 특성이 야기될 수 있다. 또 다른 한편, 융합 단백질을 발현, 탐지 및 정제한 후에 Fc 부분을 제거하는 것이 요망될 수도 있다. 예를 들어, Fc 부분은 융합 단백질이 면역을 위한 면역원으로서 사용되는 경우에는 치료 및/또는 진단을 방해할 수 있다. 예를 들어 신약 개발에서는, 길항제를 확인하기 위한 고-처리능력 스크리닝 검정을 위해 인간 단백질을 Fc 부분과 융합시켰다.

[0153] 더우기, 기타 단백질로부터의 유사한 기능적 도메인들을 합함으로써 새로운 구조물을 만들 수 있다. 예를 들어, 단백질-결합성 또는 기타 절편을 신규한 상이한 융합 폴리펩티드 또는 단편 사이에 "스와핑 (교환: swapping)"할 수 있다. 이로써, 신규한 특이성 조합을 나타내는 새로운 키메라 폴리펩티드가 단백질-결합성 특이성과 기타 기능적 도메인의 기능적 연쇄로부터 생성될 것이다. 부가적으로, 유전자-서플링 (gene-shuffling), 모티프-서플링, 엑손 서플링, 및/또는 코돈 서플링 기술을 통하여 융합 구조물을 생성시킬 수 있다.

[0154] "실질적으로 순수한"이란 그들의 천연 환경으로부터 제거되고 기타 오염성 단백질, 핵산 및 기타 생물학적 제제로부터 분리 및/또는 단리된 핵산, 단백질 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 순수, 또는 "단리"는 표준 방법에 의해 평가할 수 있고, 이는 통상적으로 약 50% 이상 순도, 보다 통상적으로는 약 60% 이상 순도, 일반적으로 약 70% 이상 순도, 보다 일반적으로 약 80% 이상 순도, 종종 약 85% 이상 순도, 보다 종종 약 90% 이상 순도, 바람직하게는 약 95% 이상 순도, 보다 바람직하게는 약 98% 이상 순도, 가장 바람직하게는 99% 이상 순도일 것이다. 유사한 개념을, 예를 들어 결합성 조성물 (예: 본 발명의 항체)에 적용한다. 예를 들어, 폴리펩티드를 재조합 세포 단백질 또는 폴리펩티드로부터 정제하는 것이 요망될 수도 있다.

[0155] 특정 단백질 또는 폴리펩티드의 "용해도"는 특정한 조건 하에 분자의 침강 속도 측정치인 스베드베리 (Svedberg) 단위로 측정된 침강을 반영한 것이다. 침강 속도 결정은 전통적으로 분석적 초원심분리기에서 수행하였지만, 지금은 전형적으로 표준 초원심분리기에서 수행한다 [참고: Freifelder 1982 Physical Biochemistry (2d Ed.) W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA; and Cantor and Schimmel (1980) Biophysical Chemistry parts 1-3, W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA]. 대략적인 결정으로서, 추정상 가용성 폴리펩티드를 함유하는 샘플을 약 10분 동안 약 50K rpm으로 완전한 크기의 표준 초원심분리기에서 방사하면, 가용성 분자가 상등액에 잔존할 것이다. 가용성 입자 또는 폴리펩티드는 전형적으로 약 30S 미만, 보다 전형적으로 약 15S 미만, 통상적으로 약 10S 미만, 보다 통상적으로 약 6S 미만, 특히 바람직한 양태에서는 바람직하게 약 4S 미만, 보다 바람직하게 약 3S 미만일 것이다. 폴리펩티드 또는 단편의 용해도는 환경 및 폴리펩티드에 좌우된다. 많은 파라미터가 폴리펩티드 용해도에 영향을 미치는데, 이에 는 온도, 전해질 환경, 폴리펩티드의 크기 및 분자 특징, 및 용매의 종류가 포함된다. 전형적으로, 폴리펩티드가 사용되는 온도는 약 4℃ 내지 약 65℃ 범위

이다. 통상적으로 사용 온도는 약 18℃ 초과, 보다 통상적으로 약 22℃ 초과이다. 진단 목적인 경우에는, 온도가 약 실온 이상일 것이지만, 검정 중의 성분들의 변성 온도 미만일 것이다. 치료 목적인 경우에는 온도가 통상적으로 체온, 전형적으로 인간의 경우에는 37℃일 것이지만, 특정 상황 하에서는 계내 또는 시험관내 온도가 더 높거나 낮을 수 있다. 폴리펩티드의 크기와 구조는 일반적으로, 실질적으로 안정한 상태여야 하고, 통상 변성 상태가 아니어야 한다. 폴리펩티드를 4급 구조의 기타 폴리펩티드와 연합하여, 예를 들어 용해도를 부여할 수 있거나, 또는 천연 지질 이중 상호 작용에 근사한 방식으로 지질 또는 세정제와 연합할 수 있다.

[0156] 용매는 통상적으로, 생물학적 활성을 보존하기 위해 사용되는 유형의, 생물학적으로 적합한 완충제일 것이며, 통상적으로 생리적 용매에 근사할 것이다. 통상적으로, 용매는 중성 pH, 전형적으로 약 5 내지 10, 바람직하게는 약 7.5의 pH를 가질 것이다. 몇몇 경우에는, 세정제, 전형적으로 순한 비변성 세정제, 예를 들어 CHS (콜레스테릴 헤미석시네이트) 또는 CHAPS (3-[3-클로로아미도프로필]-디메틸암모니오]-1-프로판 설포네이트), 또는 단백질의 구조적 또는 생리적 특성의 상당한 붕괴를 피하기에 충분히 낮은 농도를 부가할 것이다. 바람직한 양태에서는, 본 발명의 결합성 조성물의 용해도 (pH 5.0-6.0 및 150 mM NaCl)는 10, 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40 mg/mL 초과이고; 보다 바람직한 양태에서는, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 mg/mL 초과이며; 보다 더 바람직한 양태에서는, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 또는 60 mg/mL 초과이고, 훨씬 더 바람직한 양태에서는, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 또는 150 mg/mL 초과 (또는 상기 2개 수치 사이의 범위이고, 이러한 범위는 종말점 중의 어느 하나 또는 둘 다를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다)이다.

[0157] **변이체**

[0158] 본 발명은, 예를 들어 본 발명의 폴리펩티드 서열 (또는 그의 단편)과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이러한 서열로 이루어진 폴리펩티드에 관한 것이다. 특정 한 서열이 결합성 조성물 서열과 동일성을 나타내는지를 결정하는 것은 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 달성할 수 있다.

[0159] 전형적으로 이러한 서열 비교에서는, 하나의 서열이 시험 서열과 비교하고자 하는 기준 서열로서 작용한다. 서열 비교용 알고리즘을 사용하는 경우에는, 시험 서열과 기준 서열을 컴퓨터 내에 입력하고, 필요한 경우 후속 좌표를 지정하고, 서열 알고리즘 프로그램 파라미터를 지정한다. 이때, 서열 비교용 알고리즘은 지정된 프로그램의 파라미터에 근거하여, 기준 서열과 비교한 시험 서열(들)에 대한 서열 동일률(%)을 계산한다.

[0160] 비교하기 위해 서열을 최적으로 정렬하는 것은, 예를 들어 문헌 [참고: Smith and Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482]의 국소 상동성 알고리즘에 의해; 문헌 [참고: Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해; 문헌 [참고: Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444]의 유사성 방법에 대해 조사함으로써; 이들 알고리즘을 컴퓨터를 이용하여 이행함으로써 (GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA; the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI); DNASTAR (Madison, Wisconsin)가 생산한 LASERGENE 생물정보학 컴퓨팅 스위트 (computing suite)에 의해; 노트레담 (Notredame) 등이 개발한 다중 서열 정렬 방법 [예를 들어, 3Dcoffee 또는 Tcoffee (참고: Nucleic Acids Res. 2004;32(Web Server issue):W37-40; Nucleic Acids Res. 2003 Jul 1;31(13):3503-6; or Pharmacogenomics. 2002 Jan;3(1):131-4)]에 의해; 또는 가시적으로 검사함으로써 [Ausubel, et al. 상기 참고] 수행할 수 있다. 최적의 정렬을 결정함으로써 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열을 비교하기 위한 기타 방법은 널리 공지되어 있다 [참고: 예를 들어, Peruski and Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997); Wu, et al. (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins," in Methods in Gene Biotechnology, pages 123-151 (CRC Press, Inc. 1997); or Bishop (ed.), Guide to Human Genome Computing, 2nd Edition (Academic Press, Inc. 1998)].

[0161] 또 다른 아미노산 서열과 약 95% 이상의 "서열 동일성"을 나타내는 폴리펩티드에는, 예를 들어 시험 아미노산 서열의 각 100개 아미노산 연장물당 5개 이하의 아미노산 변경이 포함될 수 있다. 달리 말하면, 제2 아미노산 서열과 95% 이상 동일한 제1 아미노산 서열은 그의 총 아미노산 잔기 수의 5% 이하가, 예를 들어 아미노산 잔기의 삽입, 결실 또는 치환에 의해 제2 서열과 상이할 수 있다. 폴리펩티드 서열의 아미노산 잔기 변경은, 예를 들어 아미노 또는 카복시 말단 위치에서 일어날 수 있거나, 또는 해당 서열 내의 잔기들 간에 개별적으로 산재되거나 해당 서열 내의 하나 이상의 연속되는 아미노산 잔기 섹션, 일부 또는 단편에 산재된, 상기 말단 위치 사이의 모든 지점에서 일어날 수 있다. 실제적 사항으로서, 특정한 폴리펩티드 서열이, 예를 들어 본원의 표에

제시된 바와 같이 또 다른 서열과의 유사성이 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상인지의 여부는 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여 결정할 수 있다.

[0162] 본 발명에 포괄된 변이체는 암호화 영역, 비암호화 영역, 또는 둘 다 내에서의 변형을 포함할 수 있다. 더우기, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산이 어떠한 조합으로든 치환, 결실 또는 부가된 변이체가 또한 바람직하다. 비천연 발생적 변이체는 돌연변이 유발 기술에 의해 생성될 수 있거나, 또는 단백질 공학 및 재조합 DNA 기술의 공지된 방법을 사용하여 직접 합성함으로써 생성될 수 있다. 이러한 변이체를 생성시켜 결합 조성물 폴리펩티드 (또는 그의 단편)의 특징을 개선시키거나 변경시킬 수 있다. 예를 들어, 생물학적 기능에는 상당한 손실을 가하지 않으면서도 하나 이상의 아미노산을 본 발명의 분비된 폴리펩티드 (또는 그의 단편)의 N-말단 또는 C-말단으로부터 제거할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [참고: Ron, et al. 1993 J. Biol. Chem. 268:2984-8]에는 심지어 3, 8 또는 27개 아미노-말단 아미노산 잔기를 결실시킨 후에도 hepatin 결합 활성을 지니고 있는 변이체 KGF 단백질이 보고되었다. 예를 들어, 과반수보다 적은 분비 형태 잔기가 N-말단 또는 C-말단으로부터 제거되는 경우에는 항원성 및/또는 면역원성 (예를 들어, 성숙한 형태의 폴리펩티드를 인식하는 항체를 유도시키고/시키거나 이와 결합할 수 있는 결실 변이체의 능력)이 유지될 수 있다. 단백질의 N- 또는 C-말단 잔기가 결여된 폴리펩티드가 이러한 활성을 유지하고 있는지는 본원에 기재되거나 당해 분야에 공지된 통상적인 방법에 의해 결정할 수 있다. 따라서 본 발명은 면역원성 또는 항원성과 같은 생물학적 활성을 나타내는 폴리펩티드 변이체를 포괄하기도 한다. 이러한 변이체에는 당해 분야에 공지된 일반적인 규칙을 이용해서 활성에 거의 영향을 미치지 않도록 선별된 결실물, 삽입물, 전좌물, 반복물 및 치환물이 포함된다. 예를 들어, 표현형적으로 무반응 (침묵)인 아미노산 치환물을 제조하는 기술이 다음 문헌에 보고되었다 [참고: Bowie, et al. (1990) Science 247: 1306-1310].

[0163] 보존적 아미노산 치환물을 사용하는 것 이외에도, 본 발명의 기타 변이체에는, 예를 들어 (i) 하나 이상의 비보존 아미노산 잔기를 수반한 치환물 (이와 같이 치환된 아미노산 잔기는 유전자 암호에 의해 암호화된 것이거나 그렇지 않은 것일 수 있다), 또는 (ii) 치환체 기를 갖는 하나 이상의 아미노산 잔기를 수반한 치환물, 또는 (iii) 성숙한 폴리펩티드와 또 다른 화합물, 예를 들어 폴리펩티드의 안정성 및/또는 용해도를 증가시키는 화합물 (예: 폴리에틸렌 글리콜)과의 융합물, 또는 (iv) 상기 폴리펩티드와 부가의 아미노산, 예를 들어 IgG Fc 융합 영역 펩티드, 또는 리더 또는 분비성 서열, 또는 정제를 촉진시키는 서열과의 융합물이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 이러한 변이체 모두가, 예를 들어 독특한 폴리뉴클레오티드와 폴리펩티드 서열을 구체화하고 있는 본원의 교시를 제공한 분자 생물학 전문기술 분야의 범위 내에 있다.

[0164] 예를 들어, 전하를 띤 아미노산을 기타 전하를 띠거나 중성의 아미노산으로 치환시킨 아미노산 치환물을 함유하는 폴리펩티드 변이체는 개선된 특징, 예를 들어 응집 저하를 나타내는 폴리펩티드를 생성시킬 수 있다. 제약 제형이 응집하면, 이로 인해 활성이 저하되고 응집체의 면역원성 활성에 기인하여 청소율이 증가하게 된다 [참고: Pinckard, et al. (1967) Clin. Exp. Immunol. 2:331-340; Robbins, et al. (1987) Diabetes 36:838-845; Cleland, et al. (1993) Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems 10:307-377]. 바람직한 양태에서, 적당한 pH/완충제 시스템 (본원에 기재되거나 당해 분야에 공지된 바와 같음)에서 제형화시킨 본 발명의 결합성 조성물은 약 1 내지 10°C, 보다 바람직하게는 2 내지 8°C, 보다 더 바람직하게는 3 내지 7°C, 보다 더 바람직하게는 5 내지 6°C 범위의 온도 조건 하에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개월 이상 동안 항온 배양한 후에도 상당한 응집을 나타내지 않는다.

[0165] 본 발명의 추가 양태는 1개 이상 50개 이하의 아미노산 치환, 보다 바람직하게는 40개 이하의 아미노산 치환, 보다 더 바람직하게는 30개 이하의 아미노산 치환, 보다 더 바람직하게는 20개 이하의 아미노산 치환, 보다 더 바람직하게는 15개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 본 발명의 아미노산 서열을 포함하는 조성물을 포괄한다. 물론 선호도 증가순으로 보면, 특정 펩티드 또는 폴리펩티드가 1개 이상 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2개 이하의 아미노산 치환을 함유하는 본 발명의 아미노산 서열을 포함하는 아미노산 서열을 갖는 것이 고도로 바람직하다. 구체적 양태에서, 본 발명의 폴리펩티드 서열 또는 그의 단편 내에서의 부가, 치환 및/또는 결실 횟수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 10-50, 또는 50-150 이상인데; 보존적 아미노산 치환이 비보존적 치환보다 더 바람직하다.

[0166] 치료 용도

[0167] 본 발명은 또한, 유용한 치료적 가치를 지닌 시약을 제공한다. 본 발명의 치료적 결합성 조성물에는 본 발명의 항체-결합성 조성물 (본원에 기재된 바와 같은 그의 단편, 유사체 및 유도체 포함) 및 이들을 암호화하는 핵산 분자 (본원에 기재된 바와 같은 그의 단편, 유사체 및 유도체, 및 항-개별특이형 항체 포함)가 포함되지만, 그

에 제한되지 않는다. 이러한 항체를 사용하여 TGF 베타 1 (또는 그의 단편)의 이상한 발현 및/또는 활성과 연관된 질병, 장애 또는 질환 (이에는 본원에 기재된 질병, 장애, 증후군 또는 질환들 중의 한 가지 이상이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다)을 조정, 치료, 억제, 개선 또는 예방할 수 있다. TGF 베타 1의 이상한 발현 및/또는 활성과 연관된 질병, 장애 또는 질환의 치료, 개선 및/또는 예방에는 이들 질병, 장애 또는 질환과 연관된 증상을 개선시키는 것이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0168] 예를 들어, TGF 베타 1에 의한 비정상적인 발현이나 비정상적인 신호 전달과 연관된 질병 또는 장애는 TGF 베타 1의 길항제, 예를 들어 본 발명의 결합성 조성물에 대한 표적이다. 본 발명은 결합성 조성물을 동물, 바람직하게는 포유류, 가장 바람직하게는 영장류 (예: 사람)에게 투여하여 본원에 기재된 질병, 장애 또는 질환들 중의 한 가지 이상을 조정, 치료, 억제, 또는 개선시키는 것을 포함하는, 결합성 조성물에 의거한 요법을 포괄한다. 예를 들어, 특정 이론에 얽매어는 것은 아니지만, 인간 TGF 베타에 대해 특이적인 항체는 TGF 수용체 (TGR)가 과발현되는 질병을 치료하기 위한 동물 모델에 유효한 것으로 밝혀졌다. TGF 베타에 대한 항혈청이 사구체신염 [참고: Border, et al. 1990 Nature 346:371-4]; 및 폐 섬유증 [참고: Giri, et al. 1993 Thorax 48:959-66]을 치료하는데 유효한 것으로 밝혀졌다. 결과적으로, 개선된 특징을 지닌 본 발명의 신규한 결합성 조성물은 또한, TGF 베타 1과 연관된 섬유성 질병 및 질환 등을 개선시키는데 유효할 것이다.

[0169] 본 발명의 재조합 및/또는 분리된 결합성 조성물, 예를 들어 항체를 정제하고 이를 치료를 위해 특정 대상체에 투여할 수 있다. 이들 시약을 부가의 활성 또는 불활성 성분과, 예를 들어 통상적인 제약상 허용 가능한 담체 또는 희석제, 예를 들면 면역원성 아조반트 (adjuvant) 중에서, 생리적으로 무독한 안정화제 및 부형제와 함께 조합해서 사용할 수 있다. 이들 조합물을 멸균성 여과시키고, 이를 투여용 바이알에 동결건조시키거나 안정화된 수성 제제에 저장함으로써 투여 형태로 놓아둘 수 있다. 본 발명은 또한 보체 결합성이 아닌 형태를 포함한, 항체 또는 그의 결합성 단편을 사용하는 것을 고려한다.

[0170] 본 발명에 포함된 또 다른 치료적 접근방식은 시약, 제형 또는 조성물을 통상적인 모든 투여 기술 (예를 들어, 국소 주사, 흡입 또는 전신 투여 등)에 의해 대상체에게 직접 투여하는 것을 포함한다. 본 발명은 또한, 본 발명의 조성물의 한 가지 이상의 성분을 충전시킨 1개 이상의 용기와, 예를 들어 처분에 관한 지시사항을 포함하는 제약 팩 또는 키트 (전형적으로, 제약 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 지정된 형태)를 제공한다. 투여 방법에는 정맥내, 복강내, 또는 근육내 투여, 경피 확산 등이 포함된다. 제약상 허용 가능한 담체에는 물, 식염수, 완충제, 및 예를 들어, 문헌 [참고: Merck Index, Merck & Co., Rahway, NJ]에 기재된 기타 화합물이 포함될 것이다.

[0171] 본원에 포괄된 기타 비정상적인 발생적 질환은 노던 블롯 분석에 의해 TGF 베타 1 mRNA를 보유하고 있는 것으로 밝혀진 세포 유형에 공지되어 있다 [참고: 예를 들어, Berkow (ed.) The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, Merck & Co., Rahway, N.J.; Thorn et al. Harrison's Principles of Internal Medicine, McGraw-Hill, N.Y.; and Rich (ed.) Clinical Immunology; Principles and Practice, Mosby, St. Louis (cur. ed.); and below]. (예를 들어, 신경세포, 면역 또는 조혈계의) 발생적 또는 기능적 비정상으로 인해, 상당한 의학적 비정상 및 질환이 유발되는데, 이는 본원에 제공된 조성물을 이용한 예방 또는 치료에 대해 감수성일 수 있다.

[0172] 본 발명에 포함된 또 다른 치료적 접근방식은 시약, 제형 또는 조성물을 통상적인 모든 투여 기술 (예를 들어, 국소 주사, 흡입 또는 전신 투여 등)에 의해 대상체에게 직접 투여하는 것을 포함한다. 포괄된 상기 시약, 제형 또는 조성물은 본원에 기재되거나 당해 분야에 공지된 모든 방법에 의해 표적화될 수 있다. 특정 질병, 장애, 질환, 증후군 등을 조정하는 시약, 제형 또는 조성물의 실제적 투여량은 유기체의 크기와 건강 상태를 포함한 많은 요인들에 의해 좌우되지만, 당업자는 임상 투여량을 결정하기 위한 방법 및 기술에 관해 기재하고 있는 다음 교시를 이용할 수 있다 [참고: 예를 들어, Spilker (1984) Guide to Clinical Studies and Developing Protocols, Raven Press Books, Ltd., New York, pp. 7-13, 54-60; Spilker (1991) Guide to Clinical Trials, Raven Press, Ltd., New York, pp. 93-101; Craig and Stitzel (eds. 1986) Modern Pharmacology, 2d ed., Little, Brown and Co., Boston, pp. 127-33; Speight (ed. 1987) Avery's Drug Treatment: Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 3d ed., Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 50-56; Tallarida, et al. (1988) Principles in General Pharmacology, Springer-Verlag, New York, pp. 18-20; and 미국 특허 제4,657,760호; 제5,206,344호; 또는 제5,225,212호]. 일반적으로는, 제약상 허용 가능한 담체 중에 약 0.5 fg/ml 내지 500 µg/ml 범위의 최종 농도로 1일 성인에게 투여한다. 더우기 동물 실험은 인간 요법에 유효한 용량을 결정하는데 있어 신뢰할 만한 지침을 제공한다. 유효 용량에 대한 중간 크기 조정은 당해 분야에 공지된 원리에 따라서 수행할 수 있다 [참고: 예를 들어, Mordenti and Chappell (1989) "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics" in Toxicokinetics and New Drug Development; Yacobi, et al.

(eds.) Pergamon Press, NY].

- [0173] 유효 용량은 시험관내 또는 동물-모델 시험 시스템으로부터 유래된 용량-반응 곡선을 이용하여 외삽할 수도 있다. 예를 들어, 항체의 경우 투여량은 전형적으로, 수용자의 체중 kg당 0.1 mg 내지 100 mg이다. 바람직하게는, 투여량이 수용자의 체중 kg당 0.1 mg 내지 20 mg이다. 보다 바람직하게는, 투여량이 수용자의 체중 kg당 1 mg 내지 10 mg이다. 일반적으로, 동종-특이적 항체는 이종-특이적 항체보다 반감기가 더 길다 (예를 들어, 인간 항체는 또 다른 종, 예를 들면 마우스로부터의 항체보다 인간 숙주 내에서 더 오랫동안 지속되는데, 이는 외래 조성물에 대한 숙주의 면역 반응때문인 것으로 추정된다). 따라서 인간 항체를 인간 대상체에게 투여하는 경우에는 이러한 항체를 더 적은 투여량으로 덜 투여하는 것이 종종 가능하다. 더욱이, 본 발명의 항체의 투여량과 투여 횟수는 지질화와 같은 변형을 이용함으로써 흡수와 (예를 들어, 뇌로의) 조직 침투를 증강시킴으로써 감소시킬 수 있다.
- [0174] 본 발명은 또한, 본 발명의 조성물의 한 가지 이상의 성분을 충전시킨 1개 이상의 용기와, 예를 들어 처분에 관한 지시사항을 포함하는 제약 팩 또는 키트 (전형적으로, 제약 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 지정된 형태)를 제공한다.
- [0175] 유효한 치료에 필요한 시약의 양은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리적 상태, 및 투여된 기타 약물을 포함한 상이한 많은 요인들에 의해 좌우될 것이다. 따라서 치료 투여량은 안전성과 효능을 최적화도록 적정될 것이다. 전형적으로는, 시험관 내에서 사용된 투여량이 이들 시약의 계내 투여에 유용한 양에 관한 유용한 지침을 제공할 수 있다. 특정한 장애를 치료하는데 유효한 용량에 관한 동물 시험은 인간 투여량에 관한 추가의 예측 지표를 제공할 것이다. 각종 고려 사항이 예를 들어 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Gilman, et al. (eds.) (1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics (8th ed.) Pergamon Press; and (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences (17th ed.) Mack Publishing Co., Easton, PA]. 투여 방법, 예를 들어 경구, 정맥내, 복강내 또는 근육내 투여, 경피 확산 등이 상기 문헌 및 다음 문헌에 논의되어 있다. 제약상 허용 가능한 담체에는 물, 식염수, 완충제, 및 예를 들어, 문헌 [참고: Merck Index, Merck & Co., Rahway, NJ]에 기재된 화합물이 포함될 것이다. 투여량 범위는 적당한 담체를 수반하여, 1 mM 미만 농도, 전형적으로 약 10 μ M 미만 농도, 통상적으로 약 100 nM 미만 농도, 바람직하게는 약 10 pM (피코몰) 미만 농도, 가장 바람직하게는 약 1 fM (펨토몰) 미만 농도인 것으로 통상 예상될 것이다. 지속적인 투여의 경우에는 서방출 제형, 또는 서방출 장치가 종종 활용될 것이다.
- [0176] 결합성 조성물은 치료하고자 하는 숙주에게 직접 투여할 수 있거나, 또는 화합물의 크기에 따라서 상기 조성물을 운반체 단백질, 예를 들어 오프알부민 또는 혈청 알부민과 접합시킨 후에 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 치료적 제형은 통상적인 모든 투여 제형으로 투여할 수 있다. 활성 성분을 단독으로 투여하는 것이 가능하긴 하지만, 이를 제약 제형으로서 제시하는 것이 바람직하다. 제형은 전형적으로, 본원에 규정된 바와 같은 한 가지 이상의 활성 성분을, 그의 하나 이상의 허용 가능한 담체와 함께 포함한다. 각 담체는 기타 성분들과 화합성이고 환자에게 해롭지 않다는 점에서 제약상 및 생리적으로 허용 가능해야 한다. 제형에는 경구, 직장, 비내 또는 비경구 (피하, 근육내, 정맥내 및 피내) 투여에 적합한 것이 포함된다. 제형은 단위 투여 형태로 제시되는 것이 편리할 수 있고 조제학 분야에 널리 공지된 방법에 의해 제조할 수 있다 [참고: 예를 들어, Gilman, et al. (eds.) (1990) Goodman and Gilman's: The Pharmacological Bases of Therapeutics (8th ed.) Pergamon Press; and (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences (17th ed.) Mack Publishing Co., Easton, PA; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets Dekker, NY; and Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems Dekker, NY]. 본 발명의 치료제를 기타 치료제, 예를 들어 ACE 억제제와 병용할 수 있거나 연합해서 사용할 수 있다.
- [0177] 본 발명은 또한 제약 조성물을 제공한다. 이러한 조성물은, 예를 들어 치료상 유효량의 본 발명의 조성물을 제약상 허용 가능한 담체 중에 포함한다. 본원에 사용된 용어 "제약상 허용 가능한 담체"는 미국 연방 관리 기관에 의해 승인되었거나, 또는 미국 주정부의 관리/행정 기관에 의해 승인된 담체, 또는 미국 약전 또는 기타 약전에 열거되어 있는 담체를 의미하는데, 이는 동물, 예를 들어 포유류, 보다 특히 영장류 (예: 인간 영장류)에 사용하는 것으로 당업자에 의해 일반적으로 인식되고 있다.
- [0178] 본원에 사용된 용어 "담체"는 본 발명의 조성물과 함께 투여되는 희석제, 아주반트, 부형제 또는 비히클을 지칭한다. 제약 담체는 전형적으로, 멸균성 액체, 예를 들어 물 또는 오일 (석유, 동물, 식물성, 또는 합성 기원 오일, 예를 들면 땅콩유, 대두유, 광유, 참깨유 등 포함)일 수 있다. 전형적으로, 제약 조성물을 정맥내 투여

하는 경우에는 멸균수가 바람직한 담체이다. 식염수 용액과 수성 텍스트로스와 및 글리세롤 용액을 액상 담체, 특히 주사제용 액상 담체로서 이용할 수도 있다.

[0179] 적합한 제약 부형제에는 전분, 글루코스, 락토스, 슈크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 쇼크, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 탈지 분유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 본 발명의 조성물은 경우에 따라, 미량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수도 있다.

[0180] 본 발명의 조성물은 용제, 현탁제, 에멀션, 정제, 환제, 캡셀제, 산제, 지속 방출 제형 등으로 존재할 수 있거나, 또는 좌제 (전통적인 결합제, 및/또는 담체, 예를 들어 트리글리세라이드를 수반함)로서 제형화할 수 있다. 적합한 제약 담체의 부가 예가 다음 문헌의 현행 판에 기재되어 있다 [참고: Remington's Pharmaceutical Sciences by E.W. Martin]. 이러한 제형은 바람직하게는 정제된 형태의 치료상 유효량의 본 발명의 조성물을, 대상체에게 적당한 투여를 제공해주는데 적합한 양의 담체와 함께 함유할 것이다. 전통적으로는, 제형이 투여 방식에 잘 맞을 것이다.

[0181] 바람직한 양태에서는, 조성물을 통상적인 과정에 따라서, 예를 들어 인간에게 정맥내 투여하기에 맞도록 적응시킨 제약 조성물로서 제형화한다. 전형적으로, 정맥내 투여용 조성물은 멸균성 등장성 수성 완충액 중의 용제이다. 필요한 경우, 이러한 조성물은, 예를 들어 주사 부위에서의 위안감을 증대시키기 위해 국소 마취제 (예: 리도카인) 및 가용화제를 포함할 수도 있다. 일반적으로, 성분들은 개별적으로 공급되거나 또는 단위 투여 형태로 혼합해서, 예를 들어 기밀 용기 (예를 들어, 활성제의 양을 표시하는 앰플 또는 작은 봉지) 중의 동결건조된 산제로서 또는 무수 농축제로서 공급된다. 조성물을 주입 투여하고자 하는 경우에는, 멸균성 약제 등급수 또는 식염수를 함유하는 주입용 병을 이용하여 투약할 수 있다. 조성물을 주사 투여하는 경우에는, 주사용 멸균수 또는 식염수 앰플을 제공하여 성분들을 투여 전에 혼합할 수 있다.

[0182] 본 발명의 조성물은 중성 또는 염 형태로서 제형화할 수 있다. 제약상 허용 가능한 염에는 음이온성 염 (예를 들어, 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산 등으로부터 유래된 염) 및 양이온성 염 (예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래된 염)이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0183] **섬유성 질병, 장애 또는 질환**

[0184] 결합성 조성물, 예를 들어 항체는 섬유성 질병과 연관된 상태를 치료하는데 유용하다. 세포의 매트릭스 (ECM) 성분이 축적되거나 또는 정상적인 세포성 물질이 광범위한 세포, 조직 및 기관에서 ECM 성분으로 대체되면, 질병을 야기시키는 섬유증이 발생한다. 진행성 섬유증은 치명적이어서 여러가지 장기 (예: 신장)에 말단 기관 기능상실을 유발시킬 수 있다. 전임상 데이터와 임상 데이터 둘 다는 TGF-베타 1이 간질성 섬유증에서의 매트릭스 단백질 침착의 주요 원인 물질이고, 수 많은 관련 섬유성 질병 상태, 예를 들어 신 섬유증 [이는 모든 형태의 만성 신 질환 (CRD)에 공통적인 증상임]의 개시와 진행에 관여한다는 것을 나타낸다. 신 섬유증의 정도는 만성 신부전증 [CRF; 이는 말기 신 질환 (ESRD)로서 공지되기도 함]으로의 진행과 실제적으로 상관이 있으며, 이로써 만성 투석 또는 신장 이식, 및 사망이 야기될 수 있다. TGF-베타 1은 이러한 섬유성 과정을 수반하는 인간 및 동물 연구에서 연합에 의해 그리고 실험적으로 가장 일관되게 연결된 사이토킨이다.

[0185] ECM에 대한 TGF-베타 1의 현저한 효과, 예를 들어 세포의 매트릭스 성분의 합성을 자극하고 이러한 성분의 분해를 억제시키는데 있어서의 그의 역할은 수 많은 문헌의 주제가 되어 왔다 [참고: 예를 들어, Rocco & Ziyadeh 1991 in Contemporary Issues in Nephrology v.23, "Hormones, autoids and the kidney" Ed. Jay Stein, Churchill Livingstone, New York pp.391-410; Roberts, et al. 1988 Rec. Prog. Hormone Res. 44:157-97]. TGF-베타 1은 ECM이 다중적이고도 협력적인 방식으로 축적되는 것을 유도시킬 수 있는데, 예를 들어 TGF-베타 1은 주요 ECM 성분 (유형 I 콜라겐, 유형 IV 콜라겐, 피브로넥틴 및 라미닌 포함)의 mRNA 발현과 단백질 생성을 자극한다 [참고: Sharma & Ziyadeh 1997 Semin Nephrol 17:80-92]. 이와 동시에, TGF-베타 1은 상기 매트릭스를 분해시키는 프로테아제 (예를 들어, 플라스미노겐 활성화제, 콜라게나제, 엘라스타제 및 스트로멜리신)의 생성을 억제하고 이들 프로테아제의 억제제, 예를 들어 메탈로프로테이나제의 조직 억제제 및 플라스미노겐 활성화제 억제제 1를 활성화시킴으로써 ECM의 분해를 지연시킨다 [참고: Sharma & Ziyadeh 1995 Kidney Int 51:S34-6]. TGF-베타 1은 또한, 인테그린 (integrin)과 ECM에 대한 세포 표면 수용체를 상향 조절함으로써, 특이적 ECM 단백질과 상호 작용할 수 있는 세포의 능력을 증강시킨다 [참고: Heino, et al. 1989 J Biol Chem 264:380-8]. 부가적으로, TGF-베타 1은 ECM 세포, 예를 들어 섬유아세포 및 포식세포를 유인할 수 있는 강력한 화학주성 특성을 지니고 있다 [참고: Reibman, et al. 1991 PNAS 88:6805-9]. 더욱이, TGF-베타 1은 이상한

섬유성 과정을 잠재적으로 증폭시키는 자신의 발현을 유도시킬 수 있는 독특한 능력을 지니고 있다 [참고: Kim, et al. 1990 Mol Cell Biol 10:1492-7].

[0186] TGF-베타 1은 다음 질병, 증후군 및/또는 질환에 관련된 것으로 여겨지고 있다:

[0187] ● **신장 질환** - 예를 들어, 만성 신 질환 (CRD); 만성 신부전증 (CRF); 말기 신 질환 (ESRD); 사구체 신염 (GN), 예를 들어 메산지움 증식성 GN, 메산지움 모세관성 GN, 막성 GN, 국소 분절성 GN, 면역 GN 및 반월체형성 (crescentic) GN; 사구체경화증; 신경화증, 막성 신병증, 면역글로불린 A (IgA) 신병증; 신 간질성 섬유증; 국소 분절성 사구체경화증, 시클로스포린을 투여한 환자의 이식조직에서의 신 섬유증; 만성 신장 이식조직 거부; HIV 관련 신병증; 신 세포 비대증; 만성 신장 질환, 예를 들어 요로 폐색증 또는 진통제 관련 신병증으로부터 비롯되거나 또는 급성 신부전증 (예: 신 허혈증으로부터 비롯된 급성 신부전증) 에피소드 이후로부터 비롯되는 만성 신장 질환을 수반하는 세뇨관간질성 섬유증 [참고: Spurgeon et al. Am. J Physiol Renal Physiol 288:F568-F577, 2005]; 예를 들어, 사구체 내피 세포 손상이나 기타 미세혈관 내피 세포 손상과 연관된, 예를 들면 자간전증, 내독소증 및 방사선 노출과 연관된 신 혈전성 미세혈관병증 (microangiopathy); 신 맥관염; 국소 괴사성 사구체신염; 당뇨병성 신병증 {TGF 베타 1은 대다수의 신장 세포에 영향을 미치는 복잡하고 다양한 사건을 통하여 CRF와 관련이 있다 [참고: Bottinger, 2002, J. Am. Soc. Nephrol. 13, 2600]. 이들 사건은 궁극적으로, 세뇨관간질성 섬유증과 사구체 경화증 둘 다를 야기시켜 네프론 기능 상실을 가져와 결과적으로 만성 신부전증을 일으킨다. 3가지 TGF-베타 이소형 중에서, TGF-베타 1이 만성 신 질환의 진행을 매개하는데 있어 우세한 것으로 여겨지는데, 이는 가장 우세하게 발현된 이소형으로서 간주될 뿐만 아니라 TGF-베타 2와 TGF-베타 3 둘 다도 TGF-베타 1 발현을 상향 조절함으로써 그들의 효과를 매개하는 것으로 여겨지기 때문이다 [참고: Yu, 2003, Kid. Int. 64, 844]. 시험관내 및 생체내 연구 둘 다는 TGF-베타 1을 유형 1 또는 유형 2 당뇨병과 연관된 합병증을 포함한 당뇨병성 신장 질환 (예: 사구체경화증 및 세뇨관간질성 섬유증)의 발병 기전과 관련시켰다 [참고: Ziyadeh 1998 Cur. Pract. Med. 1:87-9]. TGF 베타에 대한 항혈청은 사구체신염을 치료하는데 유효하다 [참고: Border et al. 1990 Nature 346:371-4]}; 섬유성 신 질환 {TGF-베타 1은 p27Kip1 및 p21Cip1과 같은 사이클린-의존성 키나제 억제제를 유도시킴으로써 세포 주기의 정상적인 조절을 방해함으로써 당뇨병성 신병증의 또 다른 특징인 신 세포성 비대증을 매개한다 [참고: Wolf & Ziyadeh 1999 Kidney Int 56:393-405]. 이들 억제제는 고 글루코스와 당뇨병 상태에 의해 증가되기도 한다 [참고: Wolf, et al. 2001 Am J Pathol;158:1091-1100; Wolf, et al. 1999 Diabetologia 42:1425-32; Wolf, et al. 1997 Am J Physiol 273:F348-56]. 이들은 사이클린-의존성 키나제, 주로 사이클린 의존성 키나제 2/사이클린 E 키나제의 활성을 저해함으로써 [참고: Liu & Preisig 1999 Am J Physiol 277:F186-94], 망막모세포종 단백질의 인산화를 억제시키고, 후기 G1 상에서의 세포를 저지시킨다. 세포는 DNA 복제 없이도 단백질 합성 기간에 유입되어 비대증을 진행한다. 따라서, TGF-베타 1은 세포성 수준 상의 변화를 유발시켜, 결과적으로 당뇨병성 신병증의 병리생리적 특징을 야기시킨다}; 실험적 당뇨병성 신병증; 고혈압성 신경화증 {사구체의 구조와 여과 특성은 메산지움 및 사구체 막의 세포와 매트릭스 구성에 의해 대개 결정되기 때문에, TGF-베타 1이 신장에 대해 현저한 영향을 미치는 것은 놀라운 일이 아니다. TGF-베타 1은 당뇨병성 신장 질환의 병리적 변화를 매개한다 [참고: Ziyadeh 1998 Cur Prac Med 1:87-89]. 메산지움 (혈관사이) 매트릭스가 증식성 사구체신염 [참고: Border, et al. 1990 Kidney Int. 37:689-695] 및 당뇨병성 신병증 [참고: Mauer, et al. (1984) J. Clin. Invest. 74:1143-1155]에 축적되는 것은 해당 질병의 명백하고도 우세한 병리적 특징이다. TGF-베타 1 수준은 인간 당뇨병성 사구체경화증 (진행된 신병증)에서 상승된다 [참고: Yamamoto, et al. 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. 90:1814-1818]. TGF-베타 1은 또한, 수 많은 동물 모델에서 신 섬유증 발생에 있어 중요한 매개인자인 것으로 밝혀졌다 [참고: Phan, et al. 1990 Kidney Int. 37:426; Okuda, et al. 1990 J. Clin. Invest. 86:453]. 랫트에서 실험적으로 유도시킨 사구체신염의 저해는 TGF-베타에 대한 항혈청을 사용함으로써 [참고: Border, et al. 1990 Nature 346:371] 그리고 TGF-베타 1과 결합할 수 있는 세포와 매트릭스 단백질인 데코린 (decorin)에 의해 입증되었다 [참고: Border, et al. 1992 Nature 360:361-363; Border & Noble 1994 N. Engl. J. Med. 331:1286-92; Border, et al. 1989 Semin. Nephrol. 9:307-17; Han, et al. 2000 Am J Physiol Renal Physiol 278:F628-34; and Ziyadeh, et al. 2000 PNAS 97:8015-20]}. 결과적으로, 본 발명의 결합성 조성물은 상기 언급된 바와 같은 질병, 장애, 증후군 및/또는 질환을 치료, 개선, 조정, 진단 및/또는 억제하는데 유용할 것이다.

[0188] ● **간 질환** - 예를 들어 간경변; 간 섬유증; {간 섬유증은 광범위한 작용제, 예를 들어 간 생체항상성을 붕괴시키는 모든 과정 (특히, 염증, 독성 손상, 또는 변경된 간 혈류량) 및 간의 감염 (바이러스, 세균, 진균 및 기생충 감염)에 의해 유도될 수 있는 간세포성 괴사 또는 손상에 대한 통상적인 반응이다. 선천성 대사 이상으로부터 발생하는 수 많은 저장 장애는 종종 섬유증과 연관이 있는데, 이에는 지질 이상 (고체병: Gaucher's

disease); 글리코겐 저장 질병 (특히 유형 III, IV, VI, IX, 및 X); 1-항트립신 결핍증; 철 과부하 증후군 (혈색소증) 및 구리 저장 질병 (윌슨병: Wilson's disease)에서 관찰된 바와 같은, 외인성 물질의 저장; (티로신혈증, 프럭토스혈증 및 갈락토스혈증에서와 같은) 독성 대사물의 축적; 및 페록시솜성 장애 (peroxisomal disorder) (젤베거 증후군: Zellweger syndrome)이 포함된다. 수 많은 화학물질과 약물, 특히 알코올, 메토타렉세이트, 이소니아지드, 옥시페니사틴, 메틸도파, 클로르프로마진, 톨부타미드 및 아마오다론이 섬유증을 유발시킨다. 간 순환 장애 [예: 만성 심부전증, 바드-키아리 증후군 (Budd-Chiari syndrome), 혈관-폐쇄성 질병, 간 문맥 혈전증] 및 담즙 혈류량에 대한 만성 폐쇄로 인해 섬유증이 유발될 수 있다. 마지막으로, 선천성 간 섬유증은 상염색체 열성 기형이다.

[0189] 전세계적으로 대다수의 사람들은 만성 바이러스성 간염이나, 알코올 또는 비만과 연관된 지방성간염 (steatohepatitis)을 앓고 있지만, 기타 섬유성-유도성 손상에는, 예를 들어 기생충병 (예: 주혈흡충증), 간세포 또는 담즙 상피 상에서의 자가면역성 발작, 신생아 간 질환, 대사 장애 (윌슨 혈색소증 및 각종 저장 질병 포함), 만성 염증 질환 (예: 사르코이드증: sarcoidosis), 약물 독성 (예: 메토타렉세이트 또는 비타민 A 과다증), 및 선천성 또는 후천성 혈관 장애가 포함된다.

[0190] 간 성상 세포 (HSC)는 간 섬유증에 있어 중요한 세포성 ECM 공급원이다 [참고: Li & Friedman 1999 J. Gastroenterol. Hepatol. 14:618-33]. HSC는 간세포를 동모양 (sinusoidal) 내피로부터 격리시키는 디쎈 (Disse) 동모양혈관주위 공간에 거주한다. 언급된 바와 같은 간 손상은 정상적으로 휴지기 HSC를 활성화시킴으로써 계속해서 증식과 활성화가 이루어지도록 한다. 활성화된 HSC는 후속 표현형별 분화전환 (transdifferentiation)을 진행하여 수축성 근섬유모세포 (MFB)로 되는데, 이는 간 섬유증에서 발견된 과도한 ECM 분자와 평활근 악틴 (actin)을 발현한다. HSC가 MFB로 분화전환되는 것은 스트레스와 손상에 대한 간의 섬유성 반응의 주요 조절인자로서의 그의 역할에 있어서 TGF- β 1이 과발현하기 때문이다 [참고: Gressner, et al. 2002 Front Biosci. 7:d793-807]. TGF- β 1은 간 섬유증의 효과기 세포에서 섬유발생시키는 데에 있어 가장 강력한 유도인자로서 공지되어 있다 [참고: Schuppan, et al. 2003 Cell Death Differ. 10 Supl 1:S59-67]. 따라서, 활성 TGF- β 1의 조직 및 혈청 수준은 간 섬유증에서 상승하고, 트랜스제닉 마우스에서의 TGF- β 1의 과발현과 외인성 TGF- β 1의 적용은 기관 (장기) 섬유증을 유도시키는 것으로 밝혀졌다 [참고: Kanzler, et al. 1999 Am. J. Physiol. 276:G1059-68; Sanderson, et al. 1995 PNAS 2572-76]. 추가로, 실험적 섬유증은, 예를 들어 중화 항체 또는 가용성 TGF 수용체를 이용한 항-TGF- β 1 치료법에 의해 억제될 수 있다 [참고: George, et al. 1999 PNAS 12719-24; Qi, et al. 1999 PNAS 2345-49]. 이와 같이 관찰된 활성화 HSC/MFB의 TGF- β 1 발현, ECM 발현을 상향 조절할 수 있는 TGF- β 1의 효력, 및 HSC 상에서의 TGF 수용체의 발현이 광범위하게 허용된 모델에서 유발되었는데, 여기서는 활성화 HSC/MFB를 TGF- β 1에 의해 지속적으로 자가분비/측분비 자극하는 것이 기관 섬유증을 증진시키는데 있어 중요한 섬유형성 반응이다. 결과적으로, TGF- β 1의 감소가 간 섬유발생을 저하시키는 것으로 예상된다 [참고: Wu & Zern 2000 J. Gastroenterol. 35:665-72]];

[0191] ● **폐 질환** - 예를 들어, 폐 섬유증 [참고: Giri et al. Thorax 48, 959-966, 1993]; 특발성 폐 섬유증; 성인 호흡 곤란 증후군; 특발성 기질화 폐렴, 폐쇄성 세기관지염 (BO), 폐쇄성 세기관지염 (이식조직 연관성); 약물 유도성 폐 질환; 방사선조사 유도성 폐 질환; 천식 및 폐기종에서 기도 주변에 국한된 섬유증; 과민증 폐렴; 특발성 기질화 폐렴 (COP); 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD); 급성 간질성 폐렴 (AIP); 석면증; 자가면역 질환과 연관된 간질성 폐 섬유증, 예를 들어 전신성 홍반성 루푸스 및 피부경화증, 화학물질 접촉 또는 알레르기; 천식; 신생아 만성 폐 질환 (CLD) {TGF- β 1의 조절이상 발현이 수 많은 만성 폐 질환, 예를 들어 천식, 폐 섬유증 및 신생아 만성 폐 질환 (CLD)에 있어 이상한 기도 발생의 발병 기전에 중요한 역할을 한다 [참고: Holgate, et al. 2001 Int Arch Allergy Immunol 124 1-3:253-8; Khalil, et al. 2001 Thorax 56 12:907-15; Lecart, et al. 2000 Biol Neonate 77 4:217-23; Pulleyn, et al., 2001 Hum Genet 109 6:623-7; Sagara, et al. 2002 J Allergy Clin Immunol 110 2:249-54; Sheppard, 2001 Chest 120 1 Suppl:49S-53S; Strieter, 2001 Chest 120 1 Suppl:77S-85S; Toti, et al. 1997 Pediatr Pulmonol 24 1:22-8]. 활성 TGF- β 1을 마우스의 폐포성 표면을 따라 과발현시키면 강력한 섬유성 반응이 유발되고, 항체 또는 미끼에 의해 TGF- β 1을 억제시키면 블레오마이신-유도성 섬유증이 없어진다 [참고: Kelly, et al. 2003 Cur. Pharm. Des. 9:3949]. 더우기, 완전 폐 mRNA를 마이크로어레이 분석한 결과, 공지된 TGF- β 1-유도성 유전자의 대부분이 실험적-유도성 섬유증 동안 상향 조절되는 것으로 밝혀졌다 [참고: Kaminski, et al. 2000 PNAS 97:1778-83]];

[0192] ● **심혈관계 질환** - 아테롬성 경화증; {TGF- β 는 아테롬성 경화증과 연관이 있다 [참고: 예를 들어, T.A. McCaffrey: 2000 "TGF- β s and TGF- β Receptors in Atherosclerosis" Cytokine and Growth Factor Reviews 11:103-114]}; 비대성 심장 발육 [참고: Schultz, et al. 2002 J Clin Invest. 109 (6): 787-96; Brand &

Schneider 1995 J. Mol. Cell Cardiol. 27:518]; 진행성 전신 경화증 {이와 병행해서, 노화 혈관계에서의 TGF- β 1 수준 증가는 피브로blast 수준 상의 현저한 증가이다 [참고: Li et al. 1999]. 이러한 변화들로 인해 탄력 있는 혈관에서 섬유성/경직된 혈관으로의 전환이 이루어졌다는 것은 의심의 여지가 없다}; 기계적으로 유도된 미세혈관성 섬유증; 사르코이드증; 심실 섬유증; 방사선-유도성 허혈성 심장 질환 {홀킨즈병 (Hodgkin's disease) 및 유방암 환자를 방사선으로 치료한 경우에, 허혈성 심장 질환으로 인한 사망 위험률이 상당히 높다는 사실이 보고되었다. 특정의 사이토킨과 성장 인자, 예를 들어 TGF- β 1은 방사선-유도성 내피 증식, 섬유아 세포 증식, 콜라겐 침착, 및 아테롬성 경화증 병변의 진행을 야기시키는 섬유증을 자극할 수 있다}; 동맥 손상 [참고: Wolf, et al. 1994 J. Clin. Invest. 93, 1172-8]; 만성 정맥 부전증 (CVI); 경피 경관 관상동맥 성형술 (PTCA) 또는 스텐트 삽입 후 재발협착증 병변; 헤르만스키-푸들라크 (Hermansky-Pudlak) 증후군; 다발성 근염; 피부 경화증; 피부 근염; 호산구성 근막염; 국소 피부경화증, 또는 레이노이드 증후군 (Reynaud's syndrome) 발병과 연관된 국소 피부경화증; 비경색 심근의 벽내 관상 혈관계의 혈관주변 섬유증; 손상-유도성 과형성, 예를 들어 재발협착증; 콜라겐 혈관 질환을 수반한 아테롬성 경화증 섬유증 {TGF- β 1은 발원 혈관성형술 후 동맥에서의 세포의 매트릭스의 침착과 평활근 세포의 증식으로부터 비롯되는 동맥벽의 점진적인 비대화에 있어 특정 인자일 수 있다. 재발협착된 동맥의 직경은 이러한 비대화에 의해 90% 감소될 수 있고, 이러한 직경 감소의 대부분이 평활근 세포체가 아닌 세포외 매트릭스에 기인하기 때문에, 광범위한 세포외 매트릭스 침착을 단순히 저하시킴으로써 이들 혈관을 50%까지 개방하는 것이 가능할 수 있다. TGF- β 1 유전자로 생체 내에서 형질감염시킨, 손상을 입지 않은 돼지 동맥에서는 TGF- β 1 유전자 발현이 세포외 매트릭스 합성과 과형성 둘 다와 연관이 있었다 [참고: Nabel, et al. 1993 PNAS 90:10759-63]}; X조직구증 (호산구성 육아종);

[0193] ● **연질 조직 섬유증** - [참고: Border & Ruoslahti 1992 J Clin Inv 90:1-7; Border & Noble 1994 N Engl J Med 331:1286-91]; 발기 기능장애 [참고: Moreland, R. 1998 Int J Impot Res 10:113-20]; 류마티스성 관절염 [참고: Wahl, et al 1993 J. Exp. Medicine 177, 225-30];

[0194] ● **상처 치유** - 피부 흉터형성; 화상; 비대성 흉터형성; 켈로이드 형성; 결막 흉터형성 [참고: Cordeiro MF, 2003 Clin Sci (Lond). 104(2): 181-7] {태아 상처를 상이한 농도의 TGF- β 1로 처리하면 이들 상처의 현저한 흉터 형성이 야기되는데, 이는 TGF- β 1이 피부 흉터형성과 직접적인 관련이 있다는 것을 보여준다 [참고: Sullivan, et al. 1995 J Pediatr Surg 30:198-203]. 랫트의 치유 상처 가장자리에 중화 TGF- β 1 항체를 주사한 결과, 상처 치유 속도나 상처의 신장 강도를 방해하지 않으면서도 흉터형성을 억제시키는 것으로 밝혀졌다. 이와 동시에, 혈관형성이 저하되었고, 상처 내의 대식세포와 단구 수가 감소하였으며, 흉터 조직에서의 지리멸렬한 콜라겐 섬유 침착량이 감소되었다 [참고: Shah, et al. 1992 Lancet 339:213-4; Shah et al. 1994 J. Cell Science 107:1137-57; Shah et al. 1995 J Cell Sci. 108:985-1002]. 안티센스 TGF- β 1로 국소 처리한 마우스 상처에서는 감소된 흉터형성 반응이 일어난다 [참고: Choi, et al. 1996 Immunol Cell Biol 74:144-50]. 합성 TGF- β 1 길항제를 국소 적용하면, 돼지 화상 및 절제 상처에서의 흉터형성 뿐만 아니라 토끼 피부 절제부에서의 흉터형성이 저하되었다 [참고: Huang, et al. 2002 FASEB J 16:1269-70; Werner & Grose 2003 Physiol Rev 83(3): 835-70]};

[0195] ● **염증 질환** - 염증성 장 질환 (IBD), 예를 들어 크론병 (CD) 및 궤양성 결장염 (UC) {장 염증은 염증성 사이토킨, 특히 IFN- γ 활성화와 TGF- β 1 활성 간의 밸런스 (균형)에 좌우된다 [참고: Strober, et al. 1997 Immunol. Today 18:61-4; Neurath, et al. 1996 J. Exp. Med. 183, 2605-16; Ludviksson, et al. 1997 J. Immunol. 159; Boirivant, et al. 1998 J. Exp. Med. 188, 1929-39; Powrie, et al. 1996 J. Exp. Med. 183, 2669-74]. 소화관에서 면역학적으로 매개된 조직 손상은 각종 상이한 세포 유형에서 전사 인자 NF 카파-B를 활성화시키는 프로-염증성 사이토킨의 생성 증가와 연관이 있다}; 류마티스성 관절염 (RA); 활막 과형성 {TGF- β 1은 인간 류마티스성 관절염 활막에서 상승한다 [참고: Lotz, et al. 1990 J. Immunol. 144:4189-94]. 과도한 TGF- β 1은 골돌기체로 불리우는 통증있는 골 관절 증식물 [참고: van Beuningen, et al. 1994 Lab. Invest. 71:279-90], 활막 과형성물, 및 RA에서의 염증 [참고: Hamilton, et al. 1991 PNAS 88:7180-4]을 형성한다. 류마티스 관절염 모델에서 내인성 TGF- β 1을 억제시키면 골돌기체 형성이 방지되고 연골 복구가 손상되는데, 이는 이들 병리 사건에 있어서의 TGF- β 1의 역할을 제안하고 있다 [참고: Scharstuhl, et al. 2002 Immunol. 169:507-14]};

[0196] ● **세포 증식성 질환** - 수 많은 데이터는 TGF- β 1이 형질전환 능력을 보유하고 있을 뿐만 아니라 시험관내 및 생체내 둘 다에서 악성 진행, 침입 및 전이를 구동시킬 수 있다는 사실을 입증하고 있다 [참고: Derynck, et al. 2001 Nat. Genet 29:117-29; Cui, et al. 1996 Cell 86:531-42]. 과증식성 상태, 질병, 장애, 증후군 및/또는 질환의 예에는 결장, 복부, 뼈, 유방, 소화계, 간, 췌장, 복막, 내분비계 (예: 부신, 부갑상선, 뇌하수체,

고환, 난소, 흉선 또는 갑상선), 눈, 두부 (head), 경부 (neck), 신경계 (중추 또는 말초), 림프계, 골반, 피부, 비장, 흉곽 및 비뇨생식기계의 신생물 (종양)이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다. 유사하게, 기타 과증식성 질환에는 고감마글로불린혈증, 림프구증식성 질환, 파라단백질혈증, 자반증, 사르코이드증, 과오종 (Hamartoma), 세자리 증후군 (Sezary Syndrome), 발덴스트롬 (Waldenstrom) 마크로글로불린혈증, 고체병 증후군, 조직구증 및 기타 과증식성 상태가 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.

[0197] TGF- β 1의 종양 저해인자 활성화에도 불구하고, 종양 세포는 종종 이러한 성장 인자의 생성을 증가시키기도 하고 [참고: Derynck, et al. 1987 Cancer Res. 47:707-12; Dickson, et al. 1987 PNAS 84:837-41], 종양 미소환경상의 변화와 종양 세포 침입에 대한 그의 효과를 통하여 종양-증진 역할을 발휘한다는 상당히 명백한 증거가 제공되었다. 지금은 TGF- β 1이 종양 저해인자로서 작용할 수 있고, 또한 종양 진행, 침입 및 전이에 대한 상당한 자극인자로서 작용할 수 있다는 사실이 명백해졌다. 종양형성 초기 단계, 예를 들어 종양이 양성인 시기에는 TGF- β 가 암 세포에 직접 작용하여 종양 증식을 저해시킨다. 그러나 종양이 진행됨에 따라, 유전적 및/또는 생화학적 변화로 인해 TGF- β 1이 종양 세포 자체에 대한 그의 다형질성 활성화 뿐만 아니라 비악성 간질 세포 유형의 종양에 대한 그의 다형질성 활성화에 의해 종양 진행을 자극할 수 있다. TGF- β 1에 의한 종양 침입 및 전이의 자극은 그의 종양-저해 역할보다 임상적으로 훨씬 더 큰 결과를 가져다줄 수도 있는데, 이는 대부분의 인간 종양은 기능적 TGF- β 신호 전달 경로를 보유하고 있기 때문이다 [참고: Akhurst & Derynck 2001 Trends Cell Biol. 11:S44-51].

[0198] 세포 증식성 질환에 있어서의 과도한 TGF- β 1 생성이 불량한 예후와 연관이 있다는 일련의 증거가 많이 있다 [참고: Tsushima et al. 1996 Gastroenterology 110:375-82; Adler et al. 1999 J. Urol. 161:182-7]. 종양에 의해 생성된 TGF- β 1이 해로울 수도 있는 몇 가지 유형의 암이 있다. MATLyLu 랫트 전립선암 세포 [참고: Steiner & Barrack 1992 Mol. Endocrinol 6:15-25] 및 MCF-7 인간 유방암 세포 [참고: Arteaga, et al. 1993 Cell Growth and Differ. 4:193-201]는 마우스 TGF- β 1를 발현하는 벡터로 형질감염시킨 후에 보다 종양원성 및 전이성이 되었다. TGF- β 1은 인간 전립선과 진행성 위암에서의 혈관형성, 전이 및 불량한 예후와 연관이 있다 [참고: Wikstrom, P., et al. (1998) Prostate 37:19-29; Saito, H. et al. (1999) Cancer 86: 1455-62]. 유방암에서는 불량한 예후가 TGF- β 1 상승과 연관이 있고 [참고: Dickson, et al. 1987 PNAS 84:837-41; Kasid, et al. 1987; Cancer Res. 47:5733-8; Daly, et al. 1990 J. Cell Biochem. 43:199-211; Barrett-Lee, et al. 1990 Br. J Cancer 61:612-7; King, et al. 1989 J. Steroid Biochem. 34:133-8; Welch, et al. 1990 PNAS 87:7678-82; Walker, et al. 1992 Eur. J. Cancer 238:641-4], 타목시펜 처치에 의한 TGF- β 1의 유도 [참고: Butta, et al. 1992 Cancer Res. 52:4261-4]는 타목시펜을 이용한 유방암 치료 실패와 연관이 있다 [참고: Thompson, et al. 1991 Br. J. Cancer 63:609-14]. 항-TGF- β 1 항체는 무흉선 마우스에서 MDA-231 인간 유방암 세포의 성장을 억제시키는데 [참고: Arteaga, et al. 1993 J. Clin. Invest. 92:2569-76], 이는 비장 천연 킬러 세포 활성화 증가와 상관이 있는 치료법이다. 잠복성 TGF- β 1로 형질감염시킨 CHO 세포는 또한, 누드 마우스에서 NK 활성화 저하와 종양 성장 증가를 나타낸다 [참고: Wallick, et al. 1990 J. Exp. Med. 172:1777-84]. 따라서, 유방 종양에 의해 분비된 TGF- β 1은 내분비 면역 저해를 유발시킬 수 있다. TGF- β 1의 고 혈장 농도는 진행성 유방암 환자에 대한 불량한 예후의 지표이다 [참고: Anscher, et al. 1993 N. Engl. J. Med. 328:1592-8]. 고 용량 화학요법 및 자기 유래 골수 이식 전에 순환성 TGF- β 1 농도가 높은 환자는 간 정맥-폐색성 질환 위험이 높고 (사망률이 50% 이하인 모든 환자의 15 내지 50%) 특발성 간질성 폐렴 위험이 높다 (모든 환자의 40 내지 60%). 이러한 발견들이 암시하고 있는 것은 위험군 환자에게서 TGF- β 1 혈장 수준이 상승된 것을 확인할 수 있고 TGF- β 1 감소가 유방암 환자에 대한 상기 치료의 발병률과 사망률을 저하시킬 수 있었다는 것이다.

[0199] 많은 악성 세포는 TGF- β 1을 분비하는데, 이는 TGF- β 1 생성이 숙주 면역감시로부터 종양 세포의 도피 기전을 제공할 수 있다는 것을 제안하고 있다. 종양 보유 숙주에 있어서 봉괴된 TGF- β 1 신호 전달을 나타내는 백혈구 아집단의 확립은 암 면역요법에 대한 잠재적 수단을 제공해준다. T 세포에 있어서 봉괴된 TGF- β 1 신호 전달을 나타내는 트랜스제닉 동물 모델은 림프종 종양 EL4를 과발현하는 통상 치사적 TGF- β 1을 막멸할 수 있다 [참고: Gorelik & Flavell, 2001 Nature Medicine 7(10): 1118-22]. 종양 세포에서의 TGF- β 1 분비를 하향 조절하면, 숙주에서 면역원성이 복원되는 반면, TGF- β 1에 대한 T 세포 불감증은 분화와 자가면역을 가속화시키는데, 그의 요소들은 내성화 숙주에서 자기 항원-발현성 종양과 싸우도록 요구될 수도 있다. TGF- β 1의 면역저해 효과는 또한, 그들의 CD4/CD8 T 세포 계수에 근거하여 예측된 면역 반응보다 더 낮은 HIV 환자 아집단에 밀접한 영향을 끼쳐 왔다 [참고: Garba, et al. 2002 J. Immunology 168:2247-54]. TGF- β 1 중화 항체는 배양 효과를 역전시킬 수 있었는데, 이는 기타 TGF- β 1 항체 억제제가 상기 HIV 환자의 일부에 존재하는 면역 저해를 역전시키는데 유용할 수 있다는 지표이다.

[0200]

TGF- β 1의 이중적 종양 저해/종양 증진 역할은 각질세포에서 TGF- β 1을 과발현하는 트랜스제닉 시스템에서 명백하게 밝혀졌다. 이러한 트랜스제닉 시스템이 양성 피부 병변 형성에 대해 보다 내성이 있긴 하였지만, 트랜스제닉 시스템에서의 전이성 전환률이 현저하게 증가하였다 [참고: Cui, et al 1996 Cell 86(4): 531-42]. 원발성 종양에서 악성 세포에 의한 TGF- β 1의 생성은 종양 진행 단계가 진척됨에 따라 증가한다. 대다수의 상피암에 관한 연구는 인간 암에 의한 TGF- β 1 생성 증가가 종양 진행 동안 비교적 말기 사건으로서 일어난다고 제안하고 있다. 추가로, 종양 관련 TGF- β 1은 선택적 이점을 지닌 종양 세포를 제공하고 종양 진행을 증진시킨다. 세포/세포 및 세포/간질 상호 작용에 대한 TGF- β 1의 효과로 인해, 침입과 전이 경향이 훨씬 더 커진다. 종양 관련 TGF- β 1은 종양 세포가 면역감시로부터 벗어나도록 해줄 수 있는데, 이는 예를 들어, 침습성이 강한 (공격적) 뇌 또는 유방 종양 환자에게서 관찰된 바와 같이, 활성화 림프구의 클로날 확장의 강력한 억제제이기 때문이다 [참고: Arteaga, et al. 1993 J. Clin. Invest. 92:2569-76]. TGF- β 1은 안지오스타틴 (angiostatin)의 생성을 억제한다. 방사선 요법 및 화학요법과 같은 암 치료 양식은 종양에서 활성화 TGF- β 1의 생성을 유도시킴으로써, TGF- β 1의 성장 억제 효과에 대해 내성인 악성 세포의 증식을 선별한다. 따라서 이들 항암 치료법은 악성 종양 발생 위험을 증가시키고 악성 종양 발생을 재촉한다. TGF- β 1-매개된 신호 변환을 예방하는 작용제는 이러한 상황에 극히 유효한 치료 전략일 수 있다. TGF- β 1에 대한 종양 세포의 내성은 방사선 요법과 화학요법의 많은 세포독성 효과를 무효로 하고, 간질에 있어서 상기 치료-의존적 TGF- β 1 활성화는 심지어 해로울 수도 있는데, 이는 이러한 치료가 종양 진행에 훨씬 더 도움이 되는 미소환경을 만들 수 있고 섬유증을 유발시키는 조직 손상에 일조할 수 있기 때문이다. 전립선 암 세포는 고 수준의 TGF- β 1을 발현하는데, 이는 혈관형성을 자극하고 종양 세포에 대항하여 유도된 면역 반응을 억제함으로써 전립선 암 성장과 전이를 증강시키는 것으로 여겨진다. 전립선 암 세포는 종종 그들의 TGF-베타 수용체를 상실하고 TGF- β 1의 항증식성 및 프로-세포소멸성 효과에 대한 내성을 획득한다. 따라서, TGF- β 1의 고 발현과 TGF-베타 수용체 발현 상실이 인간 전립선 암 환자에게서 특히 나쁜 예후와 연관이 있었다 [참고: Wikstrom, et al. 2000 Scand J Urol Nephrol. 34(2): 85-94]. 간세포 암종 (HCC)에서는, 간 병소와 소결절에서 TGF- β 1 수용체 발현 상실과 동시에 TGF- β 1 발현이 유도되면, TGF- β 1 유도된 세포소멸로부터 벗어나는 변경된 간세포가 만들어짐으로써, 이와 같이 변경된 간세포에 간세포암 발생 동안의 성장 이점이 부여된다 [참고: Lim 2003 Mech Ageing Dev. 124(5): 697-708]. 두경부 평편 세포 암종에서는, 초기 단계에서의 TGF- β 1 과발현이 종양 증진성 미소환경을 제공해주므로 [참고: Lu, et al. 2004 Cancer Res 64(13): 4405-10]; 결합성 조성물을 사용하여 직접 또는 간접 상호 작용을 통하여 과증식성 질병, 질환, 장애 또는 증후군 (예: 신생물)을 조정, 개선, 치료, 예방 및/또는 진단할 수 있다. 이는 예를 들어, 궁극적으로 과증식성 상태를 조정하는 세포의 증식 억제를 예방함으로써 (예를 들어, TGF-베타 1은 T 림프구, 림포카인 활성화 길러 세포, NK 세포, 호중구, 대식세포 및 B 세포의 증식과 기능적 분화를 억제한다 [참고: Letterio & Roberts 1998 "Regulation of the immune response by TGF Beta" Ann Rev Immunol 16:137-61]); 또는 면역 반응을 증가시킴으로써 (예를 들어, 과증식성 질환에 관여하는 단백질의 항원성을 증가시킴으로써); 또는 특이적 세포 유형 (예: T 세포)의 증식, 분화 또는 이동을 유발시킴으로써 달성한다. 본 발명의 조성물을 사용하는 경우의 목적하는 효과는, 예를 들어 기존의 면역 반응을 증강시키거나, 또는 새로운 면역 반응을 개시시킴으로써 달성할 수도 있다. 또 다른 한편, 목적하는 결과는, 예를 들어 기존의 면역 반응을 저하 또는 차단시키거나, 또는 새로운 면역 반응 개시를 방지시킴으로써 작용할 수 있다. 비정상적으로 증식하는 세포에 국소 투여하는 것은 당해 분야에 공지되어 있는 방법 또는 본원에 논의된 기술, 예를 들어 형질감염, 전기천공, 세포의 미소주사에 의해, 또는 비허클 (예: 리포솜, 리포펙틴, 또는 있는 그대로의 폴리펩티드) 중에서 달성할 수 있다. "세포 증식성 질환"이란 양성이든 악성이든 간에, 세포, 세포군 또는 조직의 단일 또는 다중 국소 비정상적 증식을 특징으로 하는, 모든 세포, 조직, 모든 부위, 또는 기관, 조직 또는 신체 일부의 모든 조합물에 영향을 미치는 모든 인간 또는 동물 질병, 증후군, 장애, 질환 또는 상태를 의미한다;

[0201]

● **신경세포 질환** - 신경 흥터형성 [참고: Logan et al. 1994 Eur. J. Neurosci. 6:355-63]; 뇌혈관계 이상; 알츠하이머병 (Alzheimer's disease) [참고: Masliah, et al. 2001 Neurochemistry International 39:393-400] {중간-전두 뇌회 (midfrontal gyrus) 중의 TGF- β 1 mRNA 수준은 뇌 영역 내에서의 상대적 뇌혈관성 아밀로이드 침착 정도와 실제적으로 상관이 있는데, 이는 인간 뇌혈관계 이상에 있어서의 TGF- β 1에 대한 가능한 역할을 제안하고 있다. 정상세포에서 TGF- β 1을 과발현하는 트랜스제닉 마우스에서 알츠하이머병 (AD)-유사 뇌혈관계 이상이 발병하는데, 이에 는 혈관주위 정상세포증가증, 미소혈관 기저막 비대, 및 실질 (parenchymal) 변성의 부재 하에 티오플라빈 S-양성 아밀로이드의 축적이 포함된다. TGF- β 1이 뇌에 만성적으로 과생성되면, 아밀로이드 혈관병증을 수반한 AD 증례를 연상시키는 구조적 및 기능적 장애가 유발된다 [참고: Buckwalter, et al. 2002 Ann N Y Acad Sci. 977:87-95]}; 증식성 망막병증 [참고: Chaturvedi, et al. 2002 Diabetes Care 25:2320-7]; TGF- β 1 과생성과 연관된 섬유증증식성 질환과 연관된 기타 안과 질환에는 증식 유리체망막병증을 수

반하는 망막 박리 수술; 안내 렌즈 이식을 수반한 백내장 적출; 및 후 녹내장 배출 수술이 포함된다;

- [0202] ● **조혈 상태/질환** - {혈관형성의 내인성 자극인자와 억제제 간의 천연 발생적 밸런스는 억제 영향력이 전형적으로 우세하다 [참고: 예를 들어, Rastinejad, et al., Cell 56345-355 (1989)]. 신생혈관증식이 정상적인 생리적 조건, 예를 들어 상처 치유, 기관 재생, 배아 발생 및 여성 생식 과정 동안에 일어난 경우에는, 혈관형성이 엄격하게 조절되고 공간 및 시간적으로 한계가 정해진다. 병리적 혈관형성, 예를 들어 고형 종양 형성 동안에는, 이러한 조절성 제어가 실패하고, 많은 종양성 및 비종양성 질병이 지속적으로 진행됨으로써 조절되지 못한 혈관형성은 병리 상태로 될 수 있다. 수 많은 심각한 질병이 비정상적인 신생혈관증식에 의해 좌우된다 (예를 들어, 고형 종양 성장과 전이, 관절염, 몇몇 유형의 안과 질환, 및 건선 포함) [참고: Moses, et al., 1991 Biotech. 9630-634; Folkman, et al., 1995 N. Engl. J. Med., 333:1757-63; Auerbach, et al., 1985 J. Microvasc. Res. 29:401-11; Folkman, "Advances in Cancer Research", Eds. Klein and Weinhouse, Academic Press, New York, pp. 175-203 (1985); Patz, 1982 Am. J. Ophthalmol. 94:715-43; and Folkman, et al., 1983 Science 221:719-25]. 종양 혈관형성은 종양 성장과 침입에 있어 중요한데, 이는 혈관이 영양분과 산소를 종양 세포로 전달하여 이들이 혈액계를 침입할 수 있도록 하여 전이를 유발시키기 때문이다. TGF-베타 1은 몇 가지 검정에서 혈관형성의 강력한 유도인자로서 작용하고 [참고: Roberts, et al. 1986 PNAS 83:4167-71; Madri, et al. 1988 J. Cell Biol. 106:1375-84; Yang & Moses 1990 J. Cell Biol. 111:731-74; Gajdusek, et al. 1993 J. Cell. Physiol. 157:133-44; Choi & Ballermann 1995 J. Biol. Chem. 270:21144-50], TGF-신호 전달 성분에 결함이 있는 마우스 모델은 정상적인 혈관 발생에 있어서의 TGF-1의 중요성을 나타낸다. 더우기, TGF 베타 1 및 그의 수용체 ALK-5 및 ALK-1은 혈관형성의 혈관 성숙기에 당연히 수반된다 [참고: 예를 들어, Bull Acad Natl Med. 2000; 184 (3):537-44]. 수 많은 병리 상태에서는 혈관형성이 질병 상태에 일조하는데, 예를 들어 고형 종양 형성이 혈관형성에 의존적이란 사실을 제안하고 있는 유의적 데이터가 축적되었다 [참고: 예를 들어, Folkman & Klagsbrun 1987 Science 235:442-7]. 본 발명의 또 다른 양태에서는, 결합성 조성물을 투여하여 신생혈관증식 또는 조혈 세포 팽창과 연관된 질병, 장애, 증후군, 및/또는 질환의 치료, 개선, 조정, 진단 및/또는 억제를 제공한다. 결합성 조성물을 사용하여 목적하는 방식으로 영향을 미칠 수 있는 악성 및 전이성 질환에는 본원에 기재된 바와 같거나 당해 분야에 공지된 바와 같은, 악성 종양, 고형 종양 및 암이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다 [이러한 장애, 증후군 등에 관한 고찰은 문헌 (Fishman, et al., Medicine, Current Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia 2002)을 참고할 수 있다]. 예를 들어, 본 발명의 조성물을 사용하여 영향을 미칠 수 있는 암에는 고형 종양, 예를 들면 전립선, 폐, 유방, 난소, 위, 췌장, 후두, 식도, 고환, 간, 이하선, 담도, 결장, 직장, 자궁 경관, 자궁, 내피, 신장, 방광, 갑상선 암; 원발성 종양 및 전이; 흑색종; 교모세포종; 카포시 (Kaposi) 육종; 평활근육종; 비소세포 폐암; 결장직장암; 진행성 악성 종양; 및 혈행성 종양 (예: 백혈병)이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다;

- [0203] ● **감염증** - 패혈증; {마우스에서 리슈만편모충 (Leishmanial) 감염 과정은 TGF-β1에 의해 현저하게 변경된다. 유전적으로 내성이 있는 마우스는 TGF-β1 투여시 리슈만편모충에 감염되기 쉽다. TGF-β1은 상기 질병을 악화시키는 반면, TGF-β1 항체는 상기 질병 진행을 중지시켰다 [참고: Barral-Netto, et al. 1992 Science 257:545-7]};

- [0204] ● **모발 손실** - 탈모증; 모발 손실 {중화성 항-TGF-β1 항체는 용량 의존적 방식으로 각질세포의 안드로겐-유도된 성장 억제를 역전시켰는데, 이는 벗겨지기 시작한 진피 유두 세포로부터 유래된 안드로겐-유도성 TGF-β1이 안드로겐성 탈모증에서 모발 성장 저해를 매개하므로, 인간 패턴 대머리에 일정 역할을 할 수 있다는 사실을 제안하고 있다 [참고: Inui, et al. 2002 FASEB J. 16(14): 1967-9]}; 따라서, 본 발명은 특정 대상체에게 유익하게 유효한 양의 결합성 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 혈관형성 관련 질병 및/또는 장애를 개선, 조정, 치료, 예방 및/또는 진단하는 방법을 제공한다.

- [0205] 본 발명의 광범위한 범위는 다음 실시예를 기준으로 하여 보다 잘 이해되지만, 본 발명이 이들 구체적 양태로만 제한되지 않는다.

실시예

- [0206] **일반적 방법**

- [0207] 본원에 기재된 많은 표준 방법은, 예를 들어 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Sambrook, et al. (2001) Molecular Cloning, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY; and its associated web site: (www.MolecularCloning.com); Ausubel, et al., Biology Greene Publishing Associates, Brooklyn, NY; or Ausubel, et al. (1987 and Supplements) Current Protocols in Molecular

Biology Wiley/Greene, NY; Bartlett & Stirling (2003) PCR Protocols: Methods in Molecular Biology Vol. 226 Humana Press, NJ]. 단백질 정제 방법에는 황산암모늄 침전, 칼럼 크로마토그래피, 전기영동, 원심분리, 결정화 등과 같은 방법이 포함된다 [참고: 예를 들어, Ausubel, et al. (1987 and periodic supplements); Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification," Methods in Enzymology vol. 182, and other volumes in this series: Coligan, et al. (1995 and supplements) Current Protocols in Protein Science John Wiley and Sons, New York, NY; Matsudaira (ed.) (1993) A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing, Academic Press, San Diego, CA; and manufacturer's literature on use of protein purification products, e.g., Pharmacia, Piscataway, NJ, or Bio-Rad, Richmond, CA]. 재조합 기술과의 조합으로 적당한 절편 (에피토프 태그), 예를 들어 FLAG 서열과 융합할 수 있거나, 또는 예를 들어 프로테아제-제거 가능한 서열을 통하여 융합할 수 있는 당사물과 융합할 수 있다 [참고: 예를 들어, Hochuli (1989) Chemische Industrie 12:69-70; Hochuli (1990) "Purification of Recombinant Proteins with Metal Chelate Absorbent" in Setlow (ed.) Genetic Engineering, Principle and Methods 12:87-98, Plenum Press, NY; and Crowe, et al. (1992) QIAexpress: The High Level Expression and Protein Purification System QUIAGEN, Inc., Chatsworth, CA].

[0208] 표준 면역학적 기술이, 예를 들어 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: Hertzberg, et al. (eds.) 5th ed. 1996 Weir's Handbook of Experimental Immunology vols. 1-4, Blackwell Science; Bierer, et al., Eds. (2004) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY; and Methods in Enzymology volumes: 70, 73, 74, 84, 92, 93, 108, 116, 121, 132, 150, 162, and 163 Elsevier, USA].

[0209] 실시예 1: CDR 및 인간 골격을 이용한 Fab 단편의 구축 및 스크리닝

[0210] 단일 돌연변이물의 항체 가변 영역 CDR 라이브러리를 성상 확인하고 합성하기 위한 표준 접근 방식을 사용하였다 [참고: 예를 들어, Wu et al, 1998 PNAS 95:6037-42]. 본 발명의 CDR 서열과 함께 본원에 기재된 인간 불변 영역 및 가변 영역 골격 서열로 구성된 항체 경쇄 및 중쇄 유전자를 함유하는 박테리오파지 (bacteriophage) M13 발현 벡터에서 라이브러리를 구축하였다. 몇몇 경우에는, 표적 CDR을 먼저, 뉴클레오티드를 어닐링하기에 앞서 결실시켰다. 본 발명의 CDR 서열을 산출하기 위한 올리고뉴클레오티드 합성을 위해 코돈에 의거한 돌연변이 유발을 이용하였다.

[0211] 라이브러리를 캡처 리프트 (capture lift)에 의해 초기에 스크리닝하여 가장 높은 친화성 변이체를 확인하였다. 이러한 캡처 리프트 과정 [참고: Watkins, 2002 Methods Mol. Biol. 178:187-93]은 당해 분야에 공지되어 있고, WO/0164751 및 US2002/0098189에 기재되었다. 그 후에, 본원에 기재된 바와 같이 ELISA 및 세포 증식 효력 검정에서 고정화 항원에 대해 적정함으로써 목적하는 클론을 추가로 성상 확인하였다. 이러한 스크리닝 후, 관심있는 클론에 대한 해리 상수 (K_d), 연합 속도 (K_{on}) 및 해리 속도 (K_{off})를 결정하였다.

[0212] 본 발명의 포매성 공여자 CDR를 포함하는 잠재적 항체 결합성 조성물을 확인하기 위해, 합성 CDR의 라이브러리를 본원에 기재된 바와 같거나 당해 분야에 공지된 바와 같이 결실 주형 내로 삽입하였다. 표준 돌연변이 유발 기술 [참고: Kunkel, 1985 PNAS 82:488-92]을 이용하여 돌연변이 유발성 올리고뉴클레오티드 풀을 이용하여 특별한 CDR을 대체시켰다. 전형적으로, 특정 골격 내에서의 CDR 위치 설정은 CDRH1을 제외하고는 (이는 카바트와 초티아 정의의 요약이다) 카바트에 의해 정의된 바와 같은 시스템을 사용하여 달성하였다. 돌연변이 유발성 올리고뉴클레오티드를, 상응하는 CDR을 결실시킨 우리디닐화 파아지 주형과 어닐링시켰다.

[0213] 어닐링은 반응물을 85℃에서 5분 동안 항온 배양한 다음, 45분에 걸쳐 20℃로 서서히 냉각시킴으로써 달성한다. 어닐링된 샘플을 얼음 위에 놓아두고, T4 DNA 폴리머라제 및 T4 DNA 리가제를 가하여 이중 가닥 DNA를 생성시키고, 반응물을 4℃에서 5분 동안 항온 배양한 다음, 37℃에서 90분 동안 항온 배양하였다. 반응물을 페놀 추출하고, 에탄올 침전시킨 다음, 이로써 생성된 DNA를 DH10B 세포 내로 전기천공하였다. XL0LR 세포를 상기 반응물에 가하여 파아지 증폭시킨 후에 라이브러리를 도말하였다. 8 ml의 성장 배지를 판에 부가한 다음 4℃에서 최소 4시간 동안 항온 배양함으로써 파아지 원액을 제조하였다. 파아지 함유 배지를 수거하고, 원심분리시킴으로써 정화시키며, 나트륨 아지드 (0.02%)를 방부제로서 부가하였다.

[0214] 라이브러리의 초기 스크리닝은 다음 문헌에 기재된 바와 같이 플라크 리프트에 의해 수행하였다 [참고: Watkins, et al 1998 Anal Biochem 256: 169-77; and Watkins, 2002 Methods Mol. Biol., 178:187-93]. 고정화 항-인간 카파 항체와 결합된 개개의 플라크로부터의 발현된 Fab를 함유하는 필터를 바이오티닐화 TGF 베타-1 (바이오-TGF 베타-1), 뉴트라비딘-알칼리성 포스파타제 (NA-AP)와 함께 순차적으로 항온 배양하였는데, 그 사이

에 간단하게 세척하였다. 관심있는 클론을 서열 분석하고, ELISA에 의해 추가로 성상 확인하였다. ELISA는 일반적으로, 4℃에서 0.4 $\mu\text{g/ml}$ TGF 베타-1, TGF 베타-2 또는 TGF 베타-3으로 밤새 피복시킨 코스타르 (Costar) 3366 미세역가 판을 사용하였다. 100 μl 의 차단용 용액 (세척 완충액 중의 10 mg/ml BSA)을 각 웰에 부가하기에 앞서 판을 2회 후속 세척하였다. Fab의 희석물을 상기 피복된 웰에서 22℃ 하에 1.5시간 동안 항온 배양하였다. 세척한 후, 항-인간 카파-알칼리성 포스파타제 접합체를 가하고, 22℃에서 1시간 동안 항온 배양하였다. 광범위하게 세척한 후 비색 기질을 가하고, A560에서의 흡광도를 측정하여 양성 클론을 확인하였다.

[0215] ELISA에 의한 Fab 검정

[0216] 한 가지 비제한적 예에서는, 4℃에서 0.4 $\mu\text{g/ml}$ TGF 베타-1, TGF 베타-2 또는 TGF 베타-3으로 밤새 피복시킨 코스타르 3366 미세역가 판을 사용하는 ELISA를 이용하였다 [피복 완충액 중에서 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 으로 희석시킨, TGF-베타-1 (R&D Systems, Cat # 240-B/CF, 239 $\mu\text{g/ml}$), TGF-베타-2 (RDI, Cat # RDI-1035, 50 $\mu\text{g/ml}$) 및 TGF-베타-3 (RDI, Cat # RDI-1036/CF, 50 $\mu\text{g/ml}$)]. 100 μl 의 차단용 용액 (세척 완충액 중의 10 mg/ml BSA)을 각 웰에 부가하기에 앞서 판을 2회 후속 세척하였다. 본 발명의 Fab의 희석물을 상기 피복된 웰에서 22℃ 하에 1.5시간 동안 항온 배양하였다. 세척한 후, 항-인간 카파-알칼리성 포스파타제 접합체를 가하고, 22℃에서 1시간 동안 항온 배양하였다. 광범위하게 세척한 후 비색 기질을 가하고, A560에서 흡광도를 측정하였다.

[0217] 또 다른 예에서는, 본 발명의 결합성 조성물을 경쟁적 ELISA 검정에서 시험하였다. 전형적으로, 결합성 조성물 (예: 항체)과의 결합을 놓고 항원과 경쟁할 수도 있는 특정 화합물을 먼저, 용액 상의 항체와 합한 다음, 이러한 항체와 항원과의 결합도를 후속 측정하는 용액 상 검정을 수행하였다.

[0218] 재료:

[0219] 탄산염 피복 완충액은 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6)으로 이루어진다. 항원은 피복 완충액 중에서 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 으로 희석시킨, TGF-베타-1 (R&D Systems, Cat # 240-B/CF, 239 $\mu\text{g/ml}$), TGF-베타-2 (RDI, Cat # RDI-1035, 50 $\mu\text{g/ml}$) 및 TGF-베타-3 (RDI, Cat # RDI-1036/CF, 50 $\mu\text{g/ml}$)이다. 세척 완충액은 0.02 M 트리스 (Tris) pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.1% 트윈 (Tween) 20 및 세척 완충액 중에 용해시킨 10 mg/ml BSA (공급처: Sigma A-4503)의 차단용 용액으로 이루어진다. 양성 대조군으로서 사용된 단백질은 차단 완충액 중에서 1 $\mu\text{g/ml}$ 으로 희석시킨, 마우스-항-인간 TGF-베타 1, 2, 또는 3 (R&D Systems, cat# 1D11), 마우스-항-인간 TGF-베타 2 (R&D Systems, cat# BAF302) 및 마우스-항-인간 TGF-베타 3 (R&D Systems, cat# BAF243)이다. 사용된 탐지 항체 접합체는 차단용 용액 중에 1:2000의 작동 농도로 존재하는 항-마우스 카파 - 퍼옥시다제 접합체 (Southern Biotech, cat# 1050-05)이다. 색상 반응을 위해 사용된 기질은 기질 완충액, 즉 0.05 M 시트르산을 이용하여 pH를 5.0으로 만든 0.1 M Na_2HPO_4 에 용해시킨 0-페닐렌디아민 (OPD) 정제 (Sigma cat# P-6912)이다. 이러한 OPD 기질 작동용 용액 (즉, 1개의 196-웰 판에 대한 용적)은 각 판 발생 이전에, 1 x 5 mg OPD 정제를 12.5 ml의 기질 완충액에 용해시킨 다음 5 μl 의 30% H_2O_2 를 부가함으로써 신선하게 만들었다.

[0220] 프로토콜:

[0221] 단일 96 웰 판을 항원 (0.4 $\mu\text{g/ml}$ 하의 TGF-베타 1, 2 또는 3; 웰당 50 μl 으로 투여한다)으로 피복한 다음, 저장 (4℃ 하에 16 내지 20시간)하기 전에 접착 테이프로 밀봉시켰다. 상기 판을 세척 완충액 (상기 기재됨) 중에서 후속 세척한 다음 (2회), 100 μl 의 차단용 용액 (세척 완충액 중의 10 mg/ml BSA)를 각 웰에 가하였다. 항온 배양 (22℃에서 대략 1시간)한 후, 판을 세척 완충액으로 2회 세척하였다. 이어서, 100 μl 의 샘플 (완충액 중에 희석시킴) 또는 대조군 (PBS 중에 희석시킴)을 각 웰에 가하고, 항온 배양하였다 (22℃ 하에 1.5 시간). 항온 배양한 후, 판을 세척 완충액으로 6회 세척한 다음, 웰당 100 μl 의 항-마우스 카파 - 퍼옥시다제 접합체 (차단용 용액 중에서 1:2000으로 희석시킴) 또는 SA-HRP (차단용 용액 중에서 1:10,000로 희석시킴)을 가하였다. 시험 샘플을 항온 배양한 후 (22℃ 하에 1시간), 100 μl 의 OPD 기질을 각 웰에 가하였다. 발색 후 (대략 10분), 상기 96-웰 판을 대상으로 하여 490 nm 하에서의 흡광도를 측정하였다.

[0222] 이러한 조건 하에서의 성공적인 결과는 TGF-베타 1을 사용한 경우에 490 nm 하에서의 흡광도가 1.6 단위 초과이지만, TGF-베타 2 및 TGF-베타 3을 사용한 경우에는 상당히 더 낮은 흡광도 수치를 나타내므로, TGF-베타 1에 대한 특이적 및/또는 선택적 결합을 입증하는 Fab 양태이다.

[0223] 세포 기반 검정으로 mAb 검정

[0224] TGF 베타 생물성을 중화시킬 수 있고 특별한 TGF 베타 이소형을 중화시킬 수 있는 본 발명의 결합성 조성물의

능력을 시험하기 위해, 문헌 [참고: Tsang, et al., 1995 Cytokine 7:389-97]의 HT-2 세포 증식 검정을 이에 맞도록 적응시킬 수 있다. 이러한 HT-2 세포 증식 검정을 활용하여 Fab 및 mAb 조성물의 시험관내 효력을 결정하였다. 간략하게 언급하면, HT-2 세포는 IL-4의 존재 하에서는 증식하지만, TGF-베타의 존재 하에서는 세포소멸을 진행한다. TGF-베타 유도된 세포 사멸은 TGF-베타 1 중화 Fab 또는 mAb를 부가함으로써 방지시켰다.

[0225] 인간 세포주 HT-2는 IL-4에 반응해서 증식하지만, IL-4-유도된 증식은 TGF-베타 1, TGF-베타 2 또는 TGF-베타 3에 의해 억제된다. 결과적으로, TGF-베타 1에 대해 특이적이고/이거나 선택적인 결합성 조성물은, TGF-베타 1이 IL-4-유도된 HT-2 세포에 대해 갖는 정상적인 억제 효과를 방지하는 경우에 중화성이다. 따라서, IL-4-유도된 세포 증식은, 충분한 TGF-베타 1-특이적 결합성 조성물이 TGF-베타 1을 함유하는 HT-2 세포의 혼합물에 부가된 경우에는 제한없이 진행되어야 한다. 결과적으로, 본 발명의 결합성 조성물의 용량 반응 중화 능력은 특별한 TGF 이소형과 IL-4 증식 신호의 존재 하에 HT-2 검정을 사용하여 평가하였다. 세포 증식 정도는 시판용 비색 세포 증식 수단 (예를 들어, CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay; 공급처: Promega)을 이용하여 평가하였다.

[0226] HT-2 세포를 10% FBS, 각각 100 U/ml 및 100 µg/ml 하의 페니실린/스트렙토마이신, 50 µM 베타-머캅토에탄올 및 10 ng/ml 인간 IL-2 (공급처: R&D Systems)로 보충시킨 RPMI 1640에 유지시켰다. 세포를 조안 (Jouan) CR422 원심분리기에서 1000 RPM으로 원심분리시키고 PBS에 재현탁시켰다. PBS로 2회 세척한 후, 세포를 최종적으로, 2% FBS, 각각 100 U/ml 및 100 µg/ml 하의 페니실린/스트렙토마이신 및 50 µM 베타-머캅토에탄올로 보충시킨 페놀 레드-프리 RPMI 1640으로 이루어진 검정용 배지 중에서 0.15×10^6 개 세포/ml로 재현탁시켰다. 96 웰 판의 각 웰에 검정용 배지 중의 세포 50 µl을 가하였다. 시험 mAb를 세포 생물 검정에 가하기 전에, 다양한 농도의 mAb를 300 pg/ml TGF-베타 1, TGF-베타 2, 또는 TGF-베타 3과 함께 (검정용 배지 중에서) 예비-향온 배양하였다. 30분간 향온 배양한 후, 50 µl의 TGF-베타/Fab 혼합물을 상기 세포에 가한 직후, 45 ng/ml 뮤린 IL-4 (15 ng/ml 최종)을 함유하는 검정용 배지 50 µl을 가하였다. 20 내지 48시간 동안 향온 배양한 후, 35 µl의 셀티터 (CellTiter) 96 수성 용액 (공급처: Promega Corp)을 가하였다. (흡수, 5% CO2 대기 중의 37°C에서) 2 내지 3시간 동안 더 향온 배양한 후, 셀티터 96[®] 비색 검정을 이용하여 490 nm 하의 ELISA 판 판독기 상에서 분석함으로써 상기 검정을 정량화하였다 (생성된 바와 같고 490 nm 흡광도 양으로써 측정된 바와 같은, 포르마잔 생성물의 양은 배양 중인 살아있는 세포 수와 정비례한다). 모델 데이터가 다음 표 2에 제시되었다.

[0227] [표 2]

[0228] HT-2 시험관내 세포 생물 검정:

HT-2 세포 증식 검정을 활용하여 본 발명의 Fab 및 mAb 결합성 조성물의 시험관내 효력을 결정하였다. HT-2 세포는 IL-4의 존재 하에서는 증식하지만, TGF-베타의 존재 하에서는 세포소멸을 진행한다. TGF-베타 유도된 세포 사멸은 TGF-베타 중화 조성물 (예를 들어, 본 발명의 Fab 또는 mAb)을 부가함으로써 방지시켰다. 뮤린 IgG1 Fab #2471과 비교하면, 본 발명의 결합성 조성물은 TGF-베타 유도된 세포 사멸을 예방하는데 있어서의 중화 효력이 최소한 100배 이상 더 큰 것으로 나타났다. mAb 조성물에 대한 IC50은 대략 0.1 내지 1.0 ng/ml의 범위이다 (mAb 2471의 IC50은 대략 0.1 µg/ml임).

항-TGF-β1 mAb 결합성 조성물	mAb2471과 비교한 IC50의 개선률
21D1	106.8 + 16.1
DM4	391.0 + 5.2
DM7	140.0 + 29.2
C27	401.0 + 132.3
23A3	234.2 + 37.9

[0229]

[0230] Fab에 대한 역학 상수 측정

[0231] KinExA 3000 기기 (공급처: Sapidyne Inst. Inc.)를 사용하여 결합 역학을 측정하였다. 간략하게 언급하면, 항원을 알작톤 (alzacotone) 비드과 공유 커플링시키고, 비드에 대한 본 발명의 자유 Fab 결합성 조성물의 결합을 상기 기기 상에서 탐지하였다. Kd를 측정하기 위해, 일련으로 희석시킨 항원 양을 감소시키면서 (0 내지 250 nM) 20 pM의 Fab (mAb의 경우 200 pM)을 함유하는 개개의 튜브를, 1% BSA, 0.02% 아지드 및 0.01% 트윈 20을 함유하는 PBS에서 25°C 하에 1 내지 6일 동안 향온 배양하였다. 향온 배양한 후, 평형시킨 각 샘플 중의 자유 Fab를 제조업자의 지시에 따라서 KinExA 3000 상에서 결정하였다. KinExA 3000 소프트웨어를 사용하여 Kd 값을 결정하였다.

[0232] k_{on} 을 측정하기 위하여, 2 nM 하의 개개의 Fab를 제조업자의 지시에 따라서 주사 방법을 이용하여 0 내지 240 nM의 항원과 혼합하고, 결합되지 않은 Fab를 탐지하였다. 이로써 생성된 데이터를 사용하여, KinExA 3000 소프트웨어로 k_{on} 을 계산하였다. 식 $K_d = k_{off}/k_{on}$ 을 사용함으로써 k_{off} 를 계산하였다.

[0233] Mab에 대한 역학 상수 측정

[0234] 역학 상수를 측정하는 또 다른 방법이 공지되어 있는데, 예를 들면 다음과 같다: 비아코어 (BIAcore®) 2000 기기를 사용하여, 인간 TGF-베타 1 (R&D Systems, Cat # 240-B/CF), TGF-베타 2 (RDI, Cat # RDI-1035) 및 TGF-베타 3 (RDI, Cat # RDI-1036/CF)에 대한 결합성 조성물의 친화도를 측정하였다. 비아코어®는 텍스트란 바이오센서 매트릭스 내에서 상호 작용하는 분자들의 단백질 농도 상의 변경을 탐지하기 위해 표면 플라스몬 공명의 광학 특성을 활용한다. 표기된 바와 같은 것을 제외하고는, 모든 시약과 재료를 다음 공급처 [BIAcore® AB (Uppsala, Sweden)]로부터 구입하였다. 모든 측정은 실온에서 수행하였다. 샘플을 HBS-EP 완충액 (150 mM 염화나트륨, 3 mM EDTA, 0.01% (w/v) 계면활성제 P-20, 및 10 mM HEPES, pH 7.4)에 용해시켰다. 제조항 단백질 A를 아민 커플링 키트를 이용하여 400 내지 450 반응 단위 (RU) 수준에서 CM4 센서 칩의 4개 모든 유동 세포 상에 고정화시켰다.

[0235] 다중 분석 주기를 이용하여 결합도를 평가하였다. 각 주기는 50 μ l/분의 유속으로 수행하였고 다음 단계들로 이루어진다: 12 μ l의 항체 결합성 조성물을 0.5 μ g/ml로 주사하고, 250 μ l의 TGF-베타 1을 주사한 다음 (5 nM으로 시작하고, 각 주기 동안 2배 일련의 희석물을 사용하여 0.13 nM이 되도록 하는데, 각 농도에 대해 2회 주사한다), 해리시키기 위해 단시간 (5분) 또는 장시간 (120분) 지체시키며, 50 μ l의 10 mM 글리신 히드로클로라이드, pH 1.5를 2회 주사하여 재생시킨다. 각 주기에 대한 연합 및 해리 속도는 ClampXP (Center for Biomolecular Interaction Analysis, Univ. of Utah)를 사용하여, 이용되고 있는 바이오센서 데이터를 간단한 연합 모델에 피팅시킴으로써 결정하여 k_{on} 및 k_{off} 속도 상수를 추론하였는데; 평형 결합 상수 K_d 는 상관관계 $K_d = k_{off}/k_{on}$ 를 이용하여 계산하였다. 본 발명의 조성물에 대한 모델 데이터가 다음 표 3에 제시되었다.

표 3

본 발명의 Fabs 및 mAbs에 대한 결합 친화도 및 역학 측정치. 평형 (K_d) 및 역학 (k_{on}) 결합 파라미터는 Kinexa를 사용하여 결정하였다 (k_{off} 는 K_d 및 k_{on} 로부터 계산하였다). mAbs의 평형 및 역학 결합 특성은 비아코어를 이용하여 결정하였다. 평형 결합 상수 K_d 는 상기 결정된 k_{on} 및 k_{off} 로부터 계산하였다. 무인 IgG1 Fab #2471과 비교하였다. 극히 느린 해리로 인해, 21D1 및 DM7에 대한 k_{off} 는 탐지 가능한 상한치이고, 훨씬 더 느린 것으로 예상되므로, 계산된 K_d 값 또한 상한치이다. 수치는 반복 측정치의 평균이다 ($n=3-4$).

	Fab 결합 데이터(Kinexa)			Mab 결합 데이터(비아코어)		
	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) ($\times 10^{-6}$)	k_{off} (sec^{-1}), 계산치, ($\times 10^6$)	K_d (pM)	k_{on} ($M^{-1} s^{-1}$) ($\times 10^{-7}$)	k_{off} (sec^{-1}), ($\times 10^5$)	K_d (pM) (계산치)
2471	1.7	664	406	nd	nd	nd
21D1	4.0	3.4	0.9	1.3 ± 0.1	$< 0.6 \pm 0.6$	$< 0.5 \pm 0.5$
DM4	4.2	5.1	1.2	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.9	0.9 ± 0.4
DM7	4.5	2.3	0.5	1.3 ± 0.3	$< 0.7 \pm 0.4$	$< 0.5 \pm 0.4$
C27	4.1	17	4.2	1.3 ± 0.1	0.8 ± 0.5	0.6 ± 0.4
23A3	4.8	19	4.0	1.9 ± 0.4	1.0 ± 0.8	0.8 ± 0.6

[0236]

[0237] Mab 특이성 결정

[0238] 비아코어 방법을 사용하여 기타 실체, 특히 잠복 형태의 TGF-베타 1 또는 TGF-베타 3과 결합할 수 있는 본 발명의 mAb 조성물의 능력을 결정하였다. 모든 측정은 실온에서 수행하였다. 샘플을 HBS-EP 완충액 (150 mM 염화나트륨, 3 mM EDTA, 0.01% (w/v) 계면활성제 P-20, 및 10 mM HEPES, pH 7.4)에 용해시켰다. 제조항 단백질 A를 아민 커플링 키트를 이용하여 400 내지 450 반응 단위 (RU) 수준에서 CM4 센서 칩의 4개 모든 유동 세포 상에 고정화시켰다.

[0239] 다중 분석 주기를 이용하여 결합도를 평가하였다. 각 주기는 100 μ l/분의 유속으로 수행하였고 다음 단계들로 이루어진다: 15 μ l의 항체 결합성 조성물을 1 μ g/ml로 주사하고, 250 μ l의 5 nM TGF-베타 1, 5 nM 잠복성 TGF-베타 1, 또는 5 nM TGF-베타 3을 주사한 다음, 해리시키기 위해 단시간 (5분) 지체시키며, 50 μ l의 10 mM 글리신 히드로클로라이드, pH 1.5를 2회 주사하여 재생시킨다. 기기 제어 소프트웨어를 사용하여, 먼저 Mab를 포획한 다음 리간드를 포획한 후의 신호 양을 결정하였다. 이러한 신호는 포획된 단백질의 질량에 비례하기 때문에, 포획된 리간드의 화학량론을 용이하게 계산할 수 있다 (표 4).

표 4

Mab	리간드 결합의 화학량론		
	TGF-β1	잠복성 TGF-β1	TGF-β3
21D1	1.29	0.05	0.16
DM4	1.55	0.03	ND
DM7	1.23	0.04	0.54
C27	1.74	0.08	ND
23A3	1.63	0.07	1.26

Mabs에 대한 TGF-베타 1, 잠복성 TGF-베타 1, 및 TGF-베타 3의 결합도
(5 nM 리간드에서 시험함)

TGF-베타 1에 대한 특이도

비아코어 방법을 사용하여, TGF-β3에 대한 결합 조성물 mAb의 친화도를 결정하였다. 모든 측정은 실온에서 수행하였다. 샘플을 HBS-EP 완충액 (150 mM 염화나트륨, 3 mM EDTA, 0.01% (w/v) 계면활성제 P-20, 및 10 mM HEPES, pH 7.4)에 용해시켰다. 재조합 단백질 A를 아민 커플링 키트를 이용하여 400 내지 450 반응 단위 (RU) 수준에서 CM4 센서 칩의 4개 유동 세포 상에 고정화시켰다. 다중 분석 주기를 이용하여 결합도를 평가하였다. 각 주기는 100 μl/분의 유속으로 수행하였고 다음 단계들로 이루어진다: 15 μl의 항체 결합성 조성물을 0.5 μg/ml로 주사하고, 250 μl의 TGF-β3을 주사한 다음 (5 nM으로 시작하고, 각 주기 동안 2배 일련의 희석물을 사용하여 0.13 nM이 되도록 하는데, 각 농도에 대해 2회 주사한다), 해리시키기 위해 단시간 (5분) 지체시키며, 50 μl의 10 mM 글리신 히드로클로라이드, pH 1.5를 2회 주사하여 재생시킨다.

TGF-β3 주사 마지막 10초 동안의 평균 신호를 측정된 다음, 모든 TGF-β3 농도에서 생성된 신호를 SCRUBBER (Center for Biomolecular Interaction Analysis, Univ. of Utah) 중의 간단한 결합 평형 모델에 피팅함으로써 다양한 TGF-β3 농도에서 도달한 바와 같은 평형 신호를 근거로 하여 친화도를 결정하였다. 시험된 본 발명의 인간 mab 조성물에 대해 결정된, K_d 및 특이도의 모델 데이터 (이는 TGF-β3 결합에 대한 K_d 를 TGF-β1 결합 (본원)에 대한 K_d 로 나눔으로써 계산한다)가 다음 표 5에 제시되었다.

표 5

Mab	K_d (TGF-β3), nM	특이도 ($K_{d, \beta3}/K_{d, \beta1}$)
21D1	4.90	9800
DM4	0.53 ± 0.01	621
DM7	1.16 ± 0.18	2320
C27	2.20	3670
23A3	0.66 ± 0.04	1050

TGF-베타 3 결합에 대한 시험된 결합성 조성물 mAbs의 친화도 및 상대 특이도.
제시된 경우의 오차는 다수의 반복 측정치 (n=3)로부터의 표준 편차를 나타낸다.

실시예 2: 간 섬유증 담관 결찰 생체내 모델

담관 결찰 모델을 문헌 [참고: Arias et al (BMC Gastroenterology 3(29), 2003)]에 보고된 바와 유사한 방식으로 활용하여 항-TGF-β1 요법의 생체내 효능을 평가하였다. 간략하게 설명하면, 스킷 스프라그 돌리 (Sprague Dawley) 랫트 (250-300 g)를 이소플루란 (2-3%) 흡입시켜 마취시켰다. 복부를 면도하고 베타딘 및 70% 에틸 알코올로 문질러 세정하였다. 멸균성 조건 하에, 중간선을 절개하고 (약 4 cm), 총담관을 분리하며, 이를 6-0 외과용 실크를 이용하여 대략 1 cm 떨어진 2개 위치에서 결찰시킨 다음, 결찰 사이를 횡절단하였다. 복벽을 4-0 실크 봉합사로 밀폐시키고, 피부를 함께 봉합하였다. 항-TGF-β1 조성물과 이소형 마우스 대조군 mAb (IgG)는 수술날에 투여하기 시작하여, 그 후 7일마다 투여하였다. 수술 후 4일 및 12일째에는, 랫트를 안락사시키고, 혈청 간 효소, 완전 혈액 계수, 및 간 조직 (삼색 및 H&E 염색)을 가공 처리하여 처치 효과를 결정하였다.

실시예 3: 폐 섬유증 생체내 모델

폐 섬유증에 대한 항-TGF-베타 조성물의 생체내 효능을 평가하는데 있어 수 많은 모델이 이용 가능하다. 예를 들어, 문헌 [참고: Pittet, et al (JCI 107, 1537-1544, (2001)]에 보고된 방식으로 적용된 블레오마이신 모델을 사용하여 항-TGF-베타 접근 방식에서의 개선을 평가하였다. 또 다른 모델은 호흡 레오바이러스 (reovirus) 1/L 모델 [참고: 예를 들어, Bellum et al., Am. J. Pathol, 150, 2243; or London et al, Clin. Immunol.

103, 284; and London et al, Exp.Mol.Pathol, 72, 24-36]이다. 간략하게 설명하면, 마우스를 사용하여 1일째에 1×10^7 pfu (총 30 μ l) 중의 레오바이러스 1/L을 콧구멍을 통하여 적용한 다음, 3, 7, 12일째에는 다양한 농도의 본 발명의 항-TGF-베타 결합성 조성물 또는 본원에 기재되거나 당해 분야에 공지된 바와 같은 이소형 대조군 mAb를 적용하였다. 호흡 곤란 징후, 체중 손실 및 사망률을 알아보기 위해 처치 동안 동물을 모니터링 하였다. 처치를 개시한지 14일 후에, 동물을 안락사시키고, 조직병리학적 검사 (H/E)용 폐 샘플을 준비하여 폐 질환의 발생 및/또는 진행을 평가하였다 (섬유증 측정을 위해 분석된 히드록시프로린 함량을 이용함).

[0249] 실시예 4: 항-Thy1.1 사구체신염 생체내 모델

[0250] 랫트 항-Thy1.1 모델은 널리 정립된 메산지움 증식성 사구체신염 모델인데 [참고: 예를 들어, Morita, et al., 1998 Am J Kidney Dis 31:559-73; Bagchus, et al., 1986 Lab. Invest. 55:680-7 and Yamamoto & Wilson 1987 Kidney Int. 32:514-25], 여기서는 혈관사이 세포 표면 상에 위치한 Thy 항원에 대하여 유도된 항체를 주사하면 메산지움 용해가 유도되고, 이어서 혈관사이 세포의 과대상성 증식기로 인해 뇨 단백질 수준이 상승하였다 (단백뇨). 항-Thy1.1 신염 모델은 많은 국면에 있어서 인간 IgA 신염 또는 헤노호-셴라인 (Henoch-Schonlein) 자반증과 유사하고 [참고: O'Donoghue, et al., 1991 J Clin Invest 88:1522-30], 이를 사용하여 단백뇨에서 용량 관련 저하를 이룰 수 있는 시험 조성물의 능력을 결정함으로써 신장 질환에 대한 잠재적 치료 접근 방식을 시험하였다 [참고: 예를 들어, Burg, et al., 1997 Lab Invest 76:505-16; Johnson, et al., 1995 Kidney Int 47:62-9].

[0251] 이러한 모델에서 본 발명의 결합성 조성물을 시험하기 위해, 개별적으로 표식된 숫컷 스프라그 돌리 랫트 (200-260 그램; 대략 9주생)를 처치하기 전 5일 동안 표준 식이에 근거하여 음식물과 물에 자유롭게 접근하도록 하면서 새환경에 적응시켰다. 처치하기 전 5일째에 예비-뇨 단백질 결정을 하였다. 랫트 꼬리를 색깔있는 표식제로 표식할 뿐만 아니라 눈뒤 출혈시키기에 앞서 귀를 태그화함으로써 랫트를 개별적으로 확인 (동정)하고, 1일째에 체중을 근거로 하여 5개 군으로 무작위 분류하였다.

[0252] 본 연구는 처리군에 대한 내용을 숨기고 실행하였으며, 연구가 끝날 무렵에 그 내용을 알게 하였다. 해당 군에게 1.25 mg의 항-Thy1.1 mAb 또는 대조군으로서의 PBS를 0일째에 음경 정맥을 통하여 주사하였다. 결합성 조성물을 표준 조건 하에 또는 본원에 기재된 바와 같이 제조하고 정제하였다. 대조군 마우스 IgG1 mAb (11513)는 PBS pH 7.2에 재현탁시킨 단백질 A 정제된 물질이고, 이는 다음 공급처 (Harlan Bioproducts for Science, Indianapolis, IN 46229-0176)로부터 구입하였다.

[0253] 마우스 항-Thy 1.1은 마우스 하이브리도마 2 x 10 L 배양액에서 생성되었다. 적응용 배지를 합하고, 18X로 농축시킨 다음 정제하였다. 대략 764 mLs의 상기 농축된 수거 상등액을 1.5 M 글리신/3.0 M NaCl pH 8.9과 혼합하고, 이를 1.5 M 글리신/3.0 M NaCl pH 8.9에서 예비-평형시킨 버진, 137 ml 단백질 A 세파로스 칼럼에 적용하였다. 이어서, 이러한 단백질 A 칼럼을 1.5 M 글리신/3.0 M NaCl pH 8.9으로 세척하였다. 이 칼럼을 100 mM 시트르산 pH 3.0으로 용출시켰다. IgG에 반응하는 용출물의 선별된 분획을 모으고, 1 M NaOH을 사용하여 pH 7.4로 조정한 다음, PBS, pH 7.4 염화나트륨에서 평형시킨 318 ml 파마시아 슈퍼덱스 (Pharmacia Superdex) 200 칼럼에 적용하였다. 크기 면에서 IgG에 반응하는 피크를 모으고, 등분한 다음, -20°C 하에 저장하였다.

[0254] 항-Thy1.1 mAb를 투여한지 1시간 후에, 동물에게 본 발명의 항-TGF-베타 1 항체 조성물 또는 이소형을 피하 투여하였다. 항체를 7일째에 다시 투여하고, 동물을 대상으로 하여 다음 4개 처리군에서 시험하였다:

[0255] 1) 모의; PBS 주사

[0256] 2) 항-thy1.1을 대략 12.5 mg/kg 또는 2.5 mg/1회분으로 이소형 대조군 항체와 함께 투여함

[0257] 3) 항-thy1.1을 대략 5 mg/kg 또는 1 mg/1회분으로 DM4 항체와 함께 투여함

[0258] 4) 항-thy1.1을 대략 12.5 mg/kg 또는 2.5 mg/1회분으로 DM7 항체와 함께 투여함

[0259] 5) 항-thy1.1을 대략 12.5 mg/kg 또는 2.5 mg/1회분으로 C27 항체와 함께 투여함.

[0260] 랫트를 -5일 및 13일째에 대사 우리 (metabolic cage)에 24시간 동안 놓아두었다. 14일째에, 랫트를 CO₂에 의해 희생시키고, 심장 천자를 통하여 출혈시켜 분석용 혈액을 수득하였다. 좌측 신장을 PBS 중의 4% 파라포름 알데히드로 고정시키고, 나중에 조직학적 분석을 위해 70% 에탄올에 저장하였다. 빈사 상태로 다 죽어가는 랫트가 있으면 이를 희생시키고 (CO₂) 처리하여 뇨 단백질과 혈중 뇨 질소 농도를 알아보았다. 뇨 단백질 농도와 혈중 뇨 질소 (BUN) 농도는 제조업자의 지시에 따라서 공급처 (Biorad)로부터의 대조군과 함께 HITACHI 911 자

동 분석기 상에서 분석하였다.

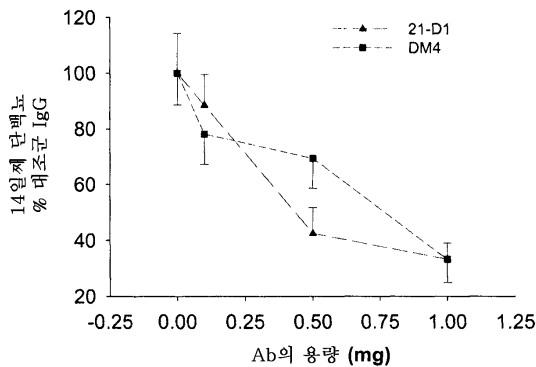
[0261]

다음 표 6의 모델 데이터는 본 발명의 결합성 조성물이 생체내 신 손상을 악화시킬 수 있고 항-Thy1.1 mAb 유도된 신 손상과 연관된 단백질 수준 상승을 저하시킬 수 있는 상당한 능력을 지니고 있다는 것을 보여준다.

표 6

랫트에게 2.5 mg/kg의 α-Thy1.1 mAb를 정맥내 주사한 다음, 30분 후에 21D1 및 DM4 연구를 위해 1 mg의 헤르셉틴 (Herceptin)을 주사하였다. 제2 용량의 항-TGF-베타 1 및 대조군 mAb를 7일 제에 투여하고, 동물을 14일 제에 안락사시켰다. 21D1 및 DM4 mAb 결합성 조성물 둘 다는 뇨 단백질 수준 (단백뇨)을 용량 의존적 방식으로 감소시켰다.

Thy1.1 Ab	Ab군	연구 번호	14일째 뇨 단백질(mg/24hrs)			대조군 IgG의 %	
			용량(mg)	평균	SE.	평균	SE.
			모	7.0	3.0		
2.5 mg/kg	21-D1	HS4606	0	73.4	9.5	100.0	14.3
	i.v.		0.1	65.7	7.3	88.5	11.1
			0.5	35.2	6.2	42.5	9.3
			1	29.1	3.8	33.3	5.8
			모	9.9	2.3		
2.5 mg/kg	DM4	HS4607	0	67.2	6.5	100.0	11.3
	i.v.		0.1	54.7	6.2	78.1	10.8
			0.5	49.7	6.2	69.4	10.7
			1	28.9	4.7	33.2	8.2



[0262]

실시예 5: TGF-β1 결합성 조성물의 에피토프 지도화

[0263]

H/Dex과 화학적 표지화의 조합을 이용하여 본 발명의 TGF-β1 결합성 조성물 (예를 들어, 항체)의 에피토프를 지도화하였다. H/D 교환과 화학적 변형 둘 다는 아미노산 잔기에 대한 용매 접근성에 좌우되기 때문에, 결합성 조성물:TGF 베타 1 복합체의 형성 후 용매 접근성에 있어서의 변화를 이용하여 항체 결합에 관여한 잔기를 확인할 수 있다. H/D 교환 또는 화학적 변형에 이어서, 예전에 결합된 항원의 펩티드 절단 단편으로의 단백질 분해적 분해로 인해, 단편들 간의 분자량을 비교할 수 있어 (LC/MS를 사용함), 결합성 복합체 형성 후 H/D 교환 또는 화학적 변형으로부터 어느 아미노산 잔기가 차단되는지를 결정할 수 있다.

[0264]

단백질 표면 화학적 표지화. 4 mM HCl 용액 중의 15 μg 분취량의 1 mg/ml TGF-β1을 플라스틱 바이알에 옮기고, 이에 180 μg의 대조군 또는 본 발명의 TGF-β1 항체 조성물을 가하였다 (TGF-β1/항체 = 1/2 몰 비). 인산염 완충 식염수 (PBS)를 각 바이알에 가하여 최종 용적 150 μl로 만들고, 용액을 주위 온도에서 10분 이상 동안 항은 배양한 다음 (결합성 복합체를 형성할 수 있도록 하기 위함), 단백질을 표면 표지화하였다. 화학적 표지화를 위해, 7.5 μl의 5 mg/ml 아세트산 히드록실석신이미드 에스테르 (AHSE) 용액을 각 복합 바이알에 가한 다음, 혼합물을 주위 온도에서 항은 배양하였다 (AHSE/항체 = 200/1 몰 비). 다양한 시점에 (예를 들어, 10, 20, 및 60분), 50 μl의 혼합물 용액을 0.1 M 트리스 완충액, pH 8.0 중의 50 μl의 1 mg/mL K와 혼합함으로써 켄칭하였다. 이 용액을 LC/MS에 의해 직접 분석하였다 (본원에 기재된 바와 같음). 각 샘플의 나머지 용액을 3 내지 5 μl의 50 mg/mL DTT 용액으로 37°C 하에 처리하여 (10 내지 15분) 성숙한 TGF-β1의 디설파이드 결합을 저하시켰다.

[0265]

연속해서, 이로써 저하시킨 단백질 용액을 3 μl의 0.1 mg/mL 키모트립신 용액으로 37°C 하에 2 내지 3시간 동안 처리한 다음, 1 μl의 0.25 mg/mL Glu-C 용액으로 37°C 하에 2 내지 3시간 더 처리하였다. 0.5 μl의 빙초산을 부가함으로써 상기 반응물을 켄칭한 다음, 워터스 (Waters) 2795 HPLC 및 마이크로매스 (Micromass) LTC 프리미어 질량 분광계를 사용하여 LC/MS함으로써 분석하였다. 이러한 HPLC는 주위 온도에서 조르박스 (Zorbax), SB

[0266]

C18, 2.1 x 50 mm을 사용하였고, 단백질과 펩티드를 0.15% 포름산 중의 아세트니트릴 구배를 이용하여 용출시켰는데; 본래 단백질에 대해서는 14분의 수행 시간이 사용되었고, 단백질 분해적 분해물에 대해서는 75분의 수행 시간이 사용되었다

[0267] TGF-β1 표면 상의, 또는 에피토프 내의 또는 에피토프와 구조적으로 근처의 리신 (K) 잔기에 대해서는, 시험 조성물이 TGF-β1과 결합한 후에 K 아미노기의 아세틸화를 차단시켰다 (부분적 또는 전부). 복합체를 형성한 샘플 (TGF-β1 + TGF-β1과 결합하는 항체) 또는 복합체를 형성하지 않은 샘플 (TGF-β1 + TGF-β1과 결합하지 않는 대조군 항체)로부터의 펩티드 간의 아세틸화 정도를 비교함으로써, 결합성 복합체의 형성에 의해 아세틸화로부터 차단된 아미노산 잔기를 확인할 수 있게 된다. 이러한 LC/MS 분석 하에 수득한 아세틸화 데이터의 한 가지 모델이 다음 표 7에 제시되었다.

표 7

에피토프 지도화를 위해 LC/MS에 의해 수득한 펩티드 몰당 아세틸화 아미노기의 몰수

아세틸화 시간	복합체	아세틸화 몰/펩티드 몰													100-112
		1-6	9-21	22-30	22-32	31-39	33-43	51-62	53-62	66-90	91-112	91-99			
10분	TGF β 1+대조군	0.97	0.10	0.07	0.94	0.74	0.22	0.64	0.60	0.00	1.09	1.28			0.03
	TGF β 1+21D1	0.95	0.09	0.07	0.95	0.78	0.26	0.50	0.45	0.00	0.49	0.71			0.02
	TGFβ1+DM4														
	*	0.91	0.10	0.04	0.88	0.56	0.05	0.31	0.29	0.00	0.35	0.59			0.02
	#	0.91	0.07	0.06	0.92	0.62	0.13	0.30	0.28	0.00	0.39	0.66			0.02
20분	TGF β 1+대조군	1.00	0.25	0.14	0.99	0.89	0.35	0.82	0.79	0.00	1.32	1.57			0.05
	TGF β 1+21D1	1.00	0.27	0.15	1.00	0.95	0.42	0.76	0.71	0.00	1.01	0.96			0.04
	TGFβ1+DM4														
	*	1.00	0.23	0.06	0.95	0.76	0.09	0.52	0.51	0.00	0.55	0.81			0.03
	#	1.00	0.21	0.12	0.97	0.85	0.22	0.59	0.58	0.00	0.63	0.88			0.04
60분	TGFβ1+대조군	0.97	0.67	0.30	1.03	1.03	0.56	0.87	0.82	0.00	1.68	1.85			0.10
	TGF β 1+21D1	0.97	0.79	0.36	1.08	1.21	0.73	0.93	0.92	0.00	1.24	1.39			0.08
	TGF β 1+DM4														
	*	0.91	0.80	0.16	0.99	0.95	0.26	0.85	0.80	0.00	0.91	1.13			0.08
	#	0.99	0.66	0.36	1.06	1.10	0.51	0.93	0.91	0.00	1.14	1.25			0.09

* 및 #는 DM4 항체의 2개의 상이한 몫이 별개로 정상 확인된다는 것을 나타낸다.

[0268]

[0269] 이러한 모델 데이터가 제공된다면, TGF-β1: 항체 복합체와 대조군 간의 차이는 특히 단기간 (예를 들어, 10분) 의 아세틸화 동안 보여준 바와 같이, 몇 가지 TGF-β1 펩티드 단편에 대해 식별 가능하다. 잔기 31-39, 33-43, 53-62 및 91-112를 포괄하는 단편은 이러한 식별 가능한 차이를 입증해준다. 양 단편 31-39와 33-43은 K37 잔기를 포함한다. K26 & K31을 포함하는 단편 22-32는 대조군에 비해 상당한 차이를 전혀 나타내지 않으므로, 단편 31-39의 아세틸화 차이는 항원:항체 복합체 형성 후 K37이 아세틸화되지 못하게 막는데 일조할 수 있다.

[0270] 단편 53-62 및 91-112는 시험된 범위 전반에 걸쳐 그리고 시험된 각 항체에 대해 연속적인 차이를 나타낸다. 단편 53-62는 아세틸화 상부 범위 (60분)에서는 감소된 차이를 보이지만, 보다 낮은 AHSE/항체 비 조건 하에서는 이러한 차이가 해당 범위 전반에 걸쳐 변하지 않은 채로 있다. 특정 이론에 얽매는 것은 아니지만, 이러한 데이터에 관한 한 가지 가능한 해석은 K60이 항원:항체 결합에 직접 관여하는 것은 아니지만, K60 잔기에 대한 AHSE의 접근 가능성을 차단시키기에 충분한 정도로 결합성 복합체에 근접하여 위치하므로, 아세틸화를 차단시킨다는 것이다. 그러나, 또 다른 한편으로 K60이 시험된 항체에 의해 규정된 에피토프를 포함할 수 있다.

[0271] 단편 91-112는 시험된 범위 전반에 걸쳐 아세틸화 차이를 보여주는데, 이는 이러한 단편의 3개 리신 잔기 (K95, K97 또는 K110) 중의 하나 이상이 결합 조성물:TGF 베타 1 복합체에 참여한다는 것을 제안하고 있다. 관여한 리신 잔기(들)를 확인하기 위해, 키모트립신성 분해물을 Glu-G로 추가로 처리하여 2개의 부가 단편, 즉 91-99와 100-112를 생성시켰다. 후자 단편 (100-112)은 K110을 함유하고 있지만, 상당한 아세틸화 차이를 전혀 나타내지 않는데, 이는 이것이 용매나 화학물질 변형에 도달하기 어렵다는 것을 제안하고 있다.

[0272] K95와 K97을 함유하는 전자 단편 (91-99)은 AHSE 및 MS/MS 분석으로 처리시킨, 복합체를 형성하지 않은 TGF-β 1을 사용하여 추가로 시험하여 단일-아세틸화 종의 용출 시간을 결정하고 K95 또는 K97 아세틸화 정도를 정량화하였다 (이러한 조건 하에서의 모델 데이터가 다음 표 8에 제시되었다). 이러한 데이터는 K97의 아세틸화는 복합체 형성을 수반하거나 수반하지 않으면서 여전히 변하지 않은 채로 있지만, 본 발명의 항체 조성물의 존재는 K95 아세틸화에 상당한 영향을 미쳤는데, 이는 K95가 결합성 복합체 형성에 직접 관여한다는 지표이다.

표 8

K95 & K97의 아세틸화

아세틸화 시간	TGFβ1 & 항체 복합체	아세틸화 (%)	
		K97	K95
10 분	TGF-β1+대조군	54	73
	TGF-β1+LA307-21D1	51	20
	TGF-β1+LA307-DM4*	44	16
	TGF-β1+LA307-DM4#	46	18
20 분	TGF-β1+대조군	71	86
	TGF-β1+LA307-21D1	66	27
	TGF-β1+LA307-DM4*	59	22
	TGF-β1+LA307-DM4#	63	25
60 분	TGF-β1+대조군	87	95
	TGF-β1+LA307-21D1	86	53
	TGF-β1+LA307-DM4*	75	38
	TGF-β1+LA307-DM4#	82	42

* 및 #는 DM4 항체의 2개의 상이한 띠가 별개로 성장 확인된다는 것을 나타낸다.

[0273]

[0274]

H/D 교환

[0275]

에피토프 지도화에서는, 이중 수소/수소 (H/D) 교환 기술이 단백질 표면 표지화/MS와 유사하지만, H/D 교환은 잔기-특이적이지 아니므로, 모든 아미노산 잔기 상의 변화를 탐지할 수 있다. 결합성 조성물:TGF 베타 1 복합체를, 복합체를 형성하지 않은 성숙한 TGF-β 1 단백질과 비교하는데 있어서, 복합체를 형성한 단백질의 분자량은 복합체를 형성하지 않은 TGF-β 1보다 약 20 Da (또는 100% D₂O 하에서는 30 Da) 더 낮았으므로, 복합체를 형성한 TGF-β 1과 복합체를 형성하지 않은 TGF-β 1 간의 D₂O 중량 차이를 계산함으로써, 성숙한 TGF-β 1 이량체 중의 대략 30개 아미노산 잔기가 본 발명의 결합성 복합체를 형성하는데 참여할 수 있다는 것을 알 수 있다.

[0276]

120 μg 분취액 (약 140 또는 280 μl)의 항체 용액을, 마이크로콘 (Microcon; 30 kD) 한외여과 단백질 농축기 (공급처: Millipore)를 사용하여 연속적으로 농축 및 희석시킴으로써 PBS와 완충제 교환하였다. PBS를 이용하여 2회 연속해서 농축 및 희석시킨 후, 항체 용액을 농축시키고, 제거한 다음, PBS를 사용하여 최종 용적이 70 μl이 되도록 조정하였다. 이어서, 4 mM HCl 용액 중의 10 μl의 1 mg/mL TGF-β 1과 2 μl의 1 M 트리스 완충제, pH 8.0을 각 항체 바이알에 가하여 TGF-β 1:항체 복합체를 형성하였다. 70 μl의 1xPBS, 4 mM HCl 용액 중의 20 μl의 TGF-β 1 및 2 μl의 1 M 트리스 완충제, pH 8.0을 혼합함으로써, TGF-β 1 대조군 샘플을 제조하였다. 그 후, 9 μl의 TGF-β 1 또는 TGF-β 1 항체 복합체를 마이크로 플라스틱 바이알에 옮긴 다음, 21 μl의 100% D₂O를 가하여 70% D₂O 용액을 형성시켰다. 이 용액을 주위 온도에서 10분 동안 항온 배양한 다음, 0℃에서 1분 동안 항온 배양하였다.

[0277]

항온 배양한 후, H/D 교환물을 켄칭하고, 15 μl의 1% 포름산 용액 (0℃하) 및 4 μl의 2 mg/mL 펩신 용액 (0℃하)을 가함으로써 단백질을 분해시킨 다음, 0℃에서 5분 동안 항온 배양하였다. 이 분해물을 수동으로 LC/MS 분석하기 위한 칼럼 상으로 즉시 주입하였다 (상기 정의된 바와 같으나, 단 튜빙과 HPLC 칼럼은 빙수 욕에 담겼다).

[0278]

성숙한 TGF-β 1은 낮은 pH (약 2.5) 및 저온 (0℃)에서 디설파이드 결합 형성으로 인해 펩신 분해에 저항한다. 그 결과, 분해 펩티드가 거의 생성되지 않으며, 대부분의 TGF-β 1은 보다 긴 분해 시간과 보다 높은 효소:단백질 농도에도 불구하고 본래 상태를 유지하였다. 확인 가능한 TGF-β 1 단백질분해적 단편은 전형적으로, 이러한 단백질의 C-말단 영역과 중간 영역에서 생성되었다 (예를 들어, 단편 58-64 또는 61-64). 이러한 단편을 사용하여 D/H 교환 후 질량 상의 변화 (델타 질량)에 대한 모델 데이터가 다음 표 9에 제시되었다. 단편 61-64에 대한 델타 질량은 대략 제로인 반면, 단편 58-64에 대한 델타 질량은 약 1 Da인데, 이는 이중 수소 교환으로부

터 보호된 영역 (본 발명의 결합성 조성물과 복합체 형성 후)은 아미노산 잔기 58-61을 포함하고 있다는 것을 제안하고 있다.

표 9

D/H 교환 후 TGF-베타 1의 확인된 펩신분해 펩티드의 델타 질량

델타 질량 (100 % D ₂ O)*	TGF-β1의 펩신분해 펩티드					
	61-64	59-64	58-64	58-61	91-104	90-104
DM4에 대한 평균 (n=3)	0.04	-0.87	-1.02	-0.30	-1.85	-1.87
DM4에 대한 SD (n=3)	0.01	0.11	0.21	0.05	0.30	0.30
21D1에 대한 수치 (n=1)	0.01	-0.34	-0.99	-0.18	-1.90	-1.51

TGF 베타 1 돌연변이 유발

1 50
TGFβ1(정상) (1) ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPY
TGFβ1(돌연변이 단백질) (1) ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPY

51 100
TGFβ1(정상) (51) IWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQ
TGFβ1(돌연변이 단백질) (51) IWSLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLTILYYVGRTPKVEQ

101 113
TGFβ1(정상) (101) LSNMIVRSCKCS-[서열: 1]
TGFβ1(돌연변이 단백질) (101) LSNMIVRSCKCS-[서열: 144]

[0279]

[0280]

본 발명의 결합성 조성물에 대한 에피토프를 추가로 규정하기 위해, 전통적인 돌연변이 유발 기술을 사용하여 본 발명의 조성물과 결합성 복합체를 형성하는데 있어 결정적인 TGF 베타 1 잔기를 확인하였다. TGF 베타 3/TGF 베타 RII 복합체의 결정 구조 [참고: 2002 Nat Struct Biol. 3:203-8]를, 중요한 TGF 베�타 1 단백질 돌연변이 유발 부위 - R25K, K26R, V33I, P87T, V89L, 및 K95T (상기 제시됨)를 규정하기 위한 모델로서 사용하였다.

[0281]

TGF 베타 1이 그의 동족 수용체 (TGF 베타 RII)와 결합하는 것을 방지시키는 시판용 mAb (1D11 및 240; 공급처: R&D Systems) 및 TGF 베타 이소형에 대해 특이적인 결합성 조성물을 사용하여, TGF 베타 1 돌연변이 단백질과 결합할 수 있는 능력을 시험하였다. 시험은 레이저-유도형 비형 탈착/이온화 시간 질량 분광계 분석으로 수행하였다. TGF 베타 1과 특이적으로 결합하는 시험용 mAb, 예를 들어 mAb 3821 및 2471 (PCT/US2004/018921; US 60/485,820에 기재됨)과, 3가지 TGF 베타 이소형 모두와 결합하는 대조군, 예를 들어 mAb 1D11을 혼합하고 [TGF 베타 1 단백질 (돌연변이 단백질 또는 야생형)과 복합체를 형성할 기회를 제공하기 위해], 탐지용 칩 상에 고정화시키며, 잠시 뒤 다음, 제조품 조건 (공급처: CIPHERGEN Diagnostic) 하에 표준화 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0282]

모델 결과는 TGF 베타 1/TGF 베타 RII의 결합 표면에 있는 독특한 일부 아미노산 잔기가 기타 TGF 베타 이소형 (TGF 베타 2 및 TGF 베타 3)과 상이하다는 것을 보여준다. 시험용 mAb #2471 (TGF 베타 1에 대한 특이적 결합 친화성을 지님)은 TGF 베타 1 돌연변이 단백질보다 5배 정도 더 큰 비율로 야생형 TGF 베타 1과 결합하는 반면, mAb 3821, 및 1D11은 야생형 TGF 베타 1보다 2배 반 정도 덜한 비율로 TGF 베타 1 돌연변이 단백질과 결합한다.

[0283]

서열 목록

[0284]

서열 1은 호모 사피엔스 (homo sapiens) 성숙한 TGF 베타 1 아미노산 서열이다.

[0285]

서열 2 및 141은 인공 VHCDR1 아미노산 서열이다.

[0286]

서열 3 및 142는 인공 VHCDR2 아미노산 서열이다.

[0287]

서열 4 및 143은 인공 VHCDR3 아미노산 서열이다.

[0288]

서열 5 및 138은 인공 VLCDR1 아미노산 서열이다.

[0289]

서열 6 및 139는 인공 VLCDR2 아미노산 서열이다.

[0290]

서열 7 및 140은 인공 VLCDR3 아미노산 서열이다.

[0291]

서열 8은 호모 사피엔스 HCVR FR1 골격 아미노산 서열이다.

[0292]

서열 9는 호모 사피엔스 HCVR FR2 골격 아미노산 서열이다.

- [0293] 서열 10은 호모 사피엔스 HCVR FR3 골격 아미노산 서열이다.
- [0294] 서열 11은 호모 사피엔스 HCVR FR4 골격 아미노산 서열이다.
- [0295] 서열 12는 호모 사피엔스 LCVR FR1 골격 아미노산 서열이다.
- [0296] 서열 13-36은 호모 사피엔스 LCVR FR2 골격 아미노산 서열이다.
- [0297] 서열 37은 호모 사피엔스 LCVR FR3 골격 아미노산 서열이다.
- [0298] 서열 38은 호모 사피엔스 LCVR FR4 골격 아미노산 서열이다.
- [0299] 서열 39는 호모 사피엔스 IgG1 중쇄 불변 영역 아미노산 서열이다.
- [0300] 서열 40은 호모 사피엔스 IgG4 중쇄 불변 영역 아미노산 서열이다.
- [0301] 서열 41은 호모 사피엔스 카파 쇠 불변 영역 아미노산 서열이다.
- [0302] 서열 42-86은 인공 경쇄 가변 영역 아미노산 서열이다.
- [0303] 서열 87-125는 인공 HCVR 아미노산 서열이다.
- 서열 136 및 137은 본 발명의 mAb의 에피토프의 호모 사피엔스 아미노산 서열이다.
- 서열 144는 인공 TGF 베타 1 아미노산 서열이다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly & Company

<120> BINDING COMPOSITIONS; RELATED REAGENTS

<130> X-16598

<140> PCT/US2006/014943

<141> 2006-04-06

<150> US 60/674082

<151> 2005-04-22

<160> 145

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp
20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys
35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu
50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro
65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys Pro
85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
100 105 110

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (5)..(5)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>

<221> misc_feature
 <222> (9)..(10)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 2

Gly Tyr Xaa Phe Xaa Asp Tyr Asn Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(2)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 3

Xaa Xaa Tyr Pro Tyr Asp Gly Xaa Thr Gly Xaa Asn Xaa Lys Xaa Lys
1 5 10 15

Ser

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(6)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 4

Gly Tyr Arg Xaa Xaa Xaa Tyr
1 5

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(5)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 5

Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Val Xaa Tyr Met His
 1 5 10

<210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 6

Ala Thr Ser Asn Xaa Ala Xaa
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(7)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 7

Xaa Gln Trp Asp Xaa Xaa Xaa Pro Ala
 1 5

<210> 8
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25

<210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10

<210> 10
 <211> 32
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
1			5					10						15	

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

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
1			5					10		

<210> 12

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
		20				

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

1 5 10 15

<210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 22
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23

Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 26
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Trp	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Trp	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 28
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Trp	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Trp	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Trp	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Trp	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 34
 <211> 15

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 35
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Trp	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Glu	Lys	Ala	Pro	Lys	Ser	Trp	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 37
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10						15

Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

<210> 38
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 39
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 39

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 1 5 10 15

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

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 35 40 45

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

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 65 70 75 80

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 85 90 95

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 100 105 110

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
115 120 125

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
145 150 155 160

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
165 170 175

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
180 185 190

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
195 200 205

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
210 215 220

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
225 230 235 240

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
275 280 285

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

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 40
<211> 326
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

<210> 41
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 42
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 42

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 43

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 43

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

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

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 44
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 44

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser

50

55

60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 45
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 45

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala

85

90

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 46

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 46

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 47

<211> 106

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 47

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 48
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 48

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 49
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 49

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Asn Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 50
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Met Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 51
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 51

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 52
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 52

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Phe Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 53
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 53

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Asp Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 54

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 54

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Arg Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 55
<211> 106
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

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

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 56

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 56

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

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

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 57
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 57

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Pro Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 58
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 58

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 59

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 59

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 60
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 60

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 61
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 61

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 62
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 62

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 63
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 63

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 64
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 64

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 65

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 65

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 66
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 66

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

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

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

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

50

55

60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 67
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 67

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

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

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala

85

90

95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 68

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 68

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Tyr Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 69

<211> 106

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 69

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 70
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 70

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 71
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 71

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 72
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 72

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 73
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 73

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 74
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 74

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 75
<211> 106
<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 75

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 76

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 76

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 77
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 77

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

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

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

35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 78
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 78

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Arg Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 79
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 79

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Pro Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 80
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 80

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 81
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 81

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

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

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Phe Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 82

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 82

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

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

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 83
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 83

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

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

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Leu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 84
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 84

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

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

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala His Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 85
<211> 106
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 85

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

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

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
35 40 45

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 86
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 86

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

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

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 35 40 45

Ala Thr Ser Asn Pro Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 87
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 87

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 88

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 88

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 89
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 89

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

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

20 25 30

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

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

Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 90
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 90

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 91
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 91

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 92
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 92

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 93
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 93

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 94
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 94

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 95
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 95

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 96
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 96

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 97
 <211> 116
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 97

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

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

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

Gly Tyr Val Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 98

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 98

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

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

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

Gly Gln Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 99

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 99

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 100
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 100

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

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

20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Thr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 101
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 101

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

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

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

35

40

45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly His Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 102
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 102

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Leu Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 103
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 103

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Lys Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210>	104
<211>	116
<212>	PRT
<213>	Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 104

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Ile Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

85

90

95

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 105
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 105

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 106
<211> 115
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 106

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

Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr Asp Tyr Asn
20 25 30

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

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

Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 107
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 107

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 108
 <211> 116
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 108

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 109

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 109

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 110

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 110

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 111
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 111

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

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

20

25

30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Pro Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 112
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 112

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

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

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

35

40

45

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 113
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 113

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

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

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

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

50

55

60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 114
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 114

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210>	115
<211>	116
<212>	PRT
<213>	Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 115

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Val Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

85

90

95

Ala Arg Gly Tyr Arg Ala Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 116
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 116

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 117
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 117

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 118
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 118

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 119
 <211> 116

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 119

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 120
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 120

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Ser Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 121

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 121

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Tyr
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 122
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 122

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

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

20 25 30

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 123
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 123

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

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

35

40

45

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 124
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 124

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Glu Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe

50

55

60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 125
<211> 116
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 125

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Glu Thr Gly Tyr Asn Pro Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

$\langle 210 \rangle$	126
$\langle 211 \rangle$	9
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	Unknown

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 126

Gln Gln Trp Asn Gly Asn Pro Pro Ala
1 5

$\langle 210 \rangle$	127
$\langle 211 \rangle$	9
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	Unknown

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 127

Gln Gln Trp Asp Ser Asn Pro Pro Ala
1 5

$\langle 210 \rangle$	128
$\langle 211 \rangle$	17
$\langle 212 \rangle$	PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 128

Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Gly	Asp	Thr	Gly	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10					15	

Ser

<210> 129

<211> 10

<212> PRT

<213> Unknown

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 129

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Thr	Met	His
1				5				10	

<210> 130

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 130

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

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

20 25 30

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

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 131
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 131

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

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Pro Tyr Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

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

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

130

135

140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

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

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

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

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260 265 270

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

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

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

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

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

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 132
<211> 213
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 132

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

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

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

Ala Thr Ser Asn Pro Ala Tyr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 133
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 133

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

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

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

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

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

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

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
260 265 270

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

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

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

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

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

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

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

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 134
<211> 442
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Synthetic construct

<400> 134

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

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

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

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

Lys Ser Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Tyr Arg Trp Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

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

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

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

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

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

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 260 265 270

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

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335

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

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

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

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

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

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

420

425

430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440

<210> 135

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Synthetic construct

<400> 135

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

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

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

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
85 90 95

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

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

115

120

125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 136
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 136

Tyr Tyr Val Gly Arg Lys
1 5

<210> 137
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 137

Tyr Val Gly Arg Lys

1 5

<210> 138
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 138

Glu Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10

<210> 139
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 139

Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

<210> 140
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 140

Gln Gln Trp Asp Leu Asn Pro Pro Ala
 1 5

<210> 141
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 141

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Asn	Met	His
1				5					10

<210> 142
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 142

Tyr	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Gly	Asp	Thr	Gly	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys
1				5					10						15

Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Asn	Met	His
			20					25		

<210> 143
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 143

Gly	Tyr	Arg	Trp	Phe	Ala	Tyr
1				5		

<210> 144
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Synthetic construct

<400> 144

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys
 1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp
 20 25 30

Val His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys
 35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu
 50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro
 65 70 75 80

Gln Ala Leu Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr Pro
 85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser
 100 105 110

<210> 145
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 145

Tyr Ser Lys Val
1