



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년12월30일

(11) 등록번호 10-1581517

(24) 등록일자 2015년12월23일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C07K 16/22</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01)
 <i>A61P 3/10</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2013-7025929</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2013년03월28일
 심사청구일자 2013년10월01일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2013년10월01일</p> <p>(65) 공개번호 10-2013-0133274</p> <p>(43) 공개일자 2013년12월06일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2012/030802</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2012/138510
 국제공개일자 2012년10월11일</p> <p>(30) 우선권주장
 61/472,338 2011년04월06일 미국(US)</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
 W02010137654 A1</p> | <p>(73) 특허권자
 일라이 릴리 앤드 캄파니
 미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 릴리 코포
 레이트 센터</p> <p>(72) 발명자
 베이들러, 캐더린, 브로티감
 미국 인디애나 46206-6288 인디애나폴리스 피.오.
 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
 호이어, 조세프, 조지
 미국 인디애나 46206-6288 인디애나폴리스 피.오.
 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
 페트로반, 라모나, 주디타
 미국 인디애나 46206-6288 인디애나폴리스 피.오.
 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내</p> <p>(74) 대리인
 양영준, 김영</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 **TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하는 항체**

(57) 요약

본 발명은 인간 TGF-알파 및 인간 에피레굴린에 결합하며, 높은 친화도, 선택성 및 강한 중화 특성을 가짐을 특징으로 하는 항체를 제공한다. 항체는 당뇨병성 신장병증의 치료에 유용하다.

명세서

청구범위

청구항 1

경쇄 및 중쇄를 포함하며, 여기서 경쇄는 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하고, 중쇄는 중쇄 가변 영역 (HCVR)을 포함하고, LCVR은 아미노산 서열 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, HCVR은 아미노산 서열 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, LCDR1은 서열 4이고, LCDR2는 서열 5이고, LCDR3은 서열 6이고, HCDR1은 서열 1이고, HCDR2는 서열 2이고, HCDR3은 서열 3인, TGF-알파 및 에피레굴린(Epiregulin)에 결합하는 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, LCVR의 아미노산 서열이 서열 9 또는 서열 10이고 HCVR의 아미노산 서열이 서열 7인 항체.

청구항 3

제2항에 있어서, LCVR의 아미노산 서열이 서열 9이고, HCVR의 아미노산 서열이 서열 7인 항체.

청구항 4

제2항에 있어서, 경쇄의 아미노산 서열이 서열 13 또는 서열 14이고 중쇄의 아미노산 서열이 서열 12인 항체.

청구항 5

제4항에 있어서, 각각의 경쇄의 아미노산 서열이 서열 13인 2개의 경쇄, 및 각각의 중쇄의 아미노산 서열이 서열 12인 2개의 중쇄를 포함하는 항체.

청구항 6

제4항에 있어서, 각각의 경쇄의 아미노산 서열이 서열 14인 2개의 경쇄, 및 각각의 중쇄의 아미노산 서열이 서열 12인 2개의 중쇄를 포함하는 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 항체, 및 적어도 하나의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는, 당뇨병성 신장병증의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 항체를 포함하는, 환자에서 당뇨병성 신장병증의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 항체의 항원 결합 단편.

청구항 10

제9항에 따른 항원 결합 단편, 및 적어도 하나의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는, 당뇨병성 신장병증의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 11

제9항에 따른 항원 결합 단편을 포함하는, 환자에서 당뇨병성 신장병증의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 TGF-알파 및 에피레굴린(Epiregulin)에 결합하는 항체 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] TGF-알파 및 에피레굴린은 손상 후의 상처 치유에서 정상적으로 기능하는 표피 성장 인자 수용체 ("EGFR")의 7개 리간드 중의 2개이다. 당뇨병성 신장병증 ("DN")은 주요 당뇨 합병증이고, 말기 신장 질환 ("ESRD")의 주원인이다. 단백뇨는 DN에 수반되는 신장 기능 감소의 임상 마커이고, 질환 진행 및 증가된 심혈관 위험, 예컨대 심부전증, 혈관 질환, 부정맥과 연관된다. DN의 치료 표준은 단지 질환 진행만을 느리게 하고 상당한 위험이 계속 지속되는 ACE 억제제 및 안지오텐신 수용체 차단제 ("ARB")를 포함한다.

[0003] EGFR 차단은 신장 질환의 전임상 동물 모델에서 단백뇨뿐만 아니라 신장 병리상태를 약화시킨다. 그러나, EGFR 억제제, 예컨대 에르비투스(ERBITUX)®는 암에 대해 승인되었지만, 부작용, 예컨대 피부의 표적 억제와 연관된 얼굴 및 어깨 상의 심한 피부 발진과 연관된다. 따라서, DN의 대체 요법에 대한 필요성이 계속 존재한다. 추가로, DN에 대한 보다 효과적인 치료 요법에 대한 필요성이 존재한다.

[0004] TGF-알파에 결합하는 항체는 문헌에서 설명된 바 있다 (예를 들어, US 5190858 참조). 추가로, 에피레굴린에 결합하는 항체도 문헌에서 설명된 바 있다 (예를 들어, US 2009/0324491 참조).

발명의 내용

[0005] 본 발명은 DN의 치료를 위한 TGF-알파 및 에피레굴린에 대한 항체를 제공한다. 추가로, 본 발명은 생체내 표적에 결합하고, 후속적으로 질환 진행 및 심혈관 위험의 동반 감소와 함께 단백뇨의 감소를 야기하는 TGF-알파 및 에피레굴린에 대한 항체를 제공한다.

[0006] 본 발명은 많은 바람직한 특성을 갖는, TGF-알파 및 에피레굴린 둘 모두에 결합하는 치료상 유용한 항체를 제공한다. 본 발명의 항체는 인간 TGF-알파 및 인간 에피레굴린에 대한 높은 친화도를 갖고 선택적이며 완전한 중화 활성을 갖는다. 투여될 때, 본 발명의 항체는 또한 알부민뇨의 감소 및 생체내 관형 단백질, 간질 섬유증, 혈관간 기질 (mesangial matrix) 팽창, 및 골반 팽창에 대한 신장 병리상태의 감소를 유도한다. 추가로, 본 발명의 바람직한 항체는 완전한 EGFR 억제와 연관된 관찰된 피부 독성을 야기하지 않는다.

[0007] 본 발명은 경쇄 및 중쇄를 포함하며, 여기서 경쇄는 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하고, 중쇄는 중쇄 가변 영역 (HCVR)을 포함하고, LCVR은 아미노산 서열 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, HCVR은 아미노산 서열 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, LCDR1은 서열 4이고, LCDR2는 서열 5이고, LCDR3은 서열 6이고, HCDR1은 서열 1이고, HCDR2는 서열 2이고, HCDR3은 서열 3인, TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하는 항체를 제공한다.

[0008] 본 발명은 또한 본원에서 설명되는 본 발명의 항체, 및 적어도 하나의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

- [0009] 본 발명은 당뇨병성 신장병증의 치료에 사용하기 위한 본원에서 설명되는 본 발명의 항체를 제공한다.
- [0010] 본 개시내용 전체에서, 본원에서 설명되는 본 발명의 항체는 TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하고, 경쇄 및 중쇄를 포함하며, 여기서 경쇄는 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하고, 중쇄는 중쇄 가변 영역 (HCVR)을 포함하고, LCVR은 아미노산 서열 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, HCVR은 아미노산 서열 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, LCDR1은 서열 4이고, LCDR2는 서열 5이고, LCDR3은 서열 6이고, HCDR1은 서열 1이고, HCDR2는 서열 2이고, HCDR3은 서열 3이다.
- [0011] 본 발명은 본원에서 설명되는 항체를 제공하고, 여기서 항체는 인간 TGF-알파 및 인간 에피레굴린에 대해 선택적이다. 또한, 본 발명은 본원에서 설명되는 항체를 제공하고, 여기서 항체는 인간 TGF-알파 및 인간 에피레굴린에 대한 완전한 중화 활성을 갖는다. 추가의 바람직한 본 발명은 본원에서 설명되는 항체를 제공하고, 여기서 항체는 인간 TGF-알파 및 인간 에피레굴린에 대해 선택적이고 완전한 중화 활성을 갖는다.
- [0012] 본 발명은 본원에서 설명되는 항체를 제공하고, 여기서 인간 TGF-알파 (서열 18)에 대해 0.01×10^{-9} M 내지 1.0×10^{-9} M의 해리 평형 상수 (Kd)를 갖는다. 추가의 바람직한, 본원에서 설명되는 본 발명의 항체는 인간 TGF-알파에 대해 0.05×10^{-9} M 내지 0.8×10^{-9} M의 해리 평형 상수 (Kd)를 갖는다. Kd 값은 실시예 2에서 설명되는 바와 같이 25°C에서의 결합 평형에 의해 확립된다.
- [0013] 본 발명은 또한 본원에서 설명되는 항체를 제공하고, 여기서 항체는 met-인간 에피레굴린 (서열 22)에 대해 0.1×10^{-9} M 내지 30×10^{-9} M의 해리 평형 상수 (Kd)를 갖는다. 추가의 바람직한, 본원에서 설명되는 본 발명의 항체는 인간 에피레굴린에 대해 0.5×10^{-9} M 내지 10×10^{-9} M의 해리 평형 상수 (Kd)를 갖는다. Kd 값은 실시예 2에서 설명되는 바와 같이 25°C에서의 결합 평형에 의해 확립된다.
- [0014] 본 발명은 본원에서 설명되는 항체를 제공하고, 여기서 항체는 인간 TGF-알파 (서열 18)에 대해 0.01×10^{-9} M 내지 1.0×10^{-9} M의 해리 평형 상수 (Kd) 및 met-인간 에피레굴린 (서열 22)에 대해 0.1×10^{-9} M 내지 30×10^{-9} M의 Kd를 갖는다. 추가의 바람직한, 본원에서 설명되는 본 발명의 항체는 인간 TGF-알파에 대해 0.05×10^{-9} M 내지 0.8×10^{-9} M의 해리 평형 상수 (Kd) 및 인간 에피레굴린에 대해 0.5×10^{-9} M 내지 10×10^{-9} M의 Kd를 갖는다. Kd 값은 실시예 2에서 설명되는 바와 같이 25°C에서의 결합 평형에 의해 확립된다.
- [0015] 본 발명은 인간 TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하고 각각 실시예 5 및 실시예 6에서 설명되는 마우스 잔여 (remnant) 신장 모델 및 마우스 일측 신절제 (uninephrectomy) db/db 모델에서 알부민뇨의 용량-의존적 감소, 생체내 혈청 크레아티닌 및 혈액 우레아 질소 ("BUN")의 감소를 유도하는 항체를 제공한다.
- [0016] 본 발명은 인간 TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하고 각각 실시예 5 및 실시예 6에서 설명되는 마우스 잔여 신장 모델 및 마우스 일측 신절제 db/db 모델에서 관형 단백질 및 간질 섬유증에 대한 신장 병리상태의 감소 및 생체내 혈관간 기질 팽창 및 골반 팽창의 감소를 유도하는 항체를 제공한다.
- [0017] 본 발명은 인간 TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하고 인간에서 질환 진행 및 심혈관 위험의 동반 감소와 함께 단백뇨의 감소를 유도하는 것으로 생각되는 항체를 제공한다. 또한, 본 발명은 인간 TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하고 인간에서 당뇨병성 신장병증의 치료에 효과적인 것으로 생각되는 항체를 제공한다.
- [0018] 본 발명은 인간 TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하고 실시예 7에서 설명되는 바와 같이 시노몰거스 (cynomolgus) 원숭이에서의 독성 연구에서 관찰된 피부 독성을 유도하지 않는 항체를 제공한다.
- [0019] 본 발명은 경쇄 및 중쇄를 포함하는, TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 경쇄는 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하고, 중쇄는 중쇄 가변 영역 (HCVR)을 포함하고, LCVR은 아미노산 서열 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하고, HCVR은 아미노산 서열 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하고, LCDR1은 서열 4이고, LCDR2는 서열 5이고, LCDR3은 서열 6이고, HCDR1은 서열 1이고, HCDR2는 서열 2이고, HCDR3은 서열 3이다.
- [0020] 추가로, 본 발명은 경쇄 및 중쇄를 포함하는, TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 경쇄는 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하고, 중쇄는 중쇄 가변 영역 (HCVR)을 포함하고, LCVR의 아미노산 서열은 서열 9 또는 서열 10이다.
- [0021] 본 발명은 또한 경쇄 및 중쇄를 포함하는, TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 경쇄는

경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하고, 중쇄는 중쇄 가변 영역 (HCVR)을 포함하고, HCVR의 아미노산 서열은 서열 7이다.

[0022] 본 발명은 또한 경쇄 및 중쇄를 포함하는, TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 경쇄는 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하고, 중쇄는 중쇄 가변 영역 (HCVR)을 포함하고, LCVR의 아미노산 서열 및 HCVR의 아미노산 서열은 다음으로 이루어지는 군 중에서 선택된다:

[0023] (i) LCVR은 서열 9이고, HCVR은 서열 7이고;

[0024] (ii) LCVR은 서열 10이고, HCVR은 서열 7이다.

[0025] 본 발명은 경쇄 및 중쇄를 포함하는, TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 경쇄는 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하고, 중쇄는 중쇄 가변 영역 (HCVR)을 포함하고, LCVR의 아미노산 서열은 서열 9이고, HCVR의 아미노산 서열은 서열 7이다.

[0026] 본 발명은 경쇄 및 중쇄를 포함하는, TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 경쇄는 경쇄 가변 영역 (LCVR)을 포함하고, 중쇄는 중쇄 가변 영역 (HCVR)을 포함하고, LCVR의 아미노산 서열은 서열 10이고, HCVR의 아미노산 서열은 서열 7이다.

[0027] 추가로, 본 발명은 경쇄 및 중쇄를 포함하는, TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 경쇄의 아미노산 서열은 서열 13 또는 서열 14이다.

[0028] 본 발명은 또한 경쇄 및 중쇄를 포함하는, TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 중쇄의 아미노산 서열은 서열 12이다.

[0029] 추가로, 본 발명은 경쇄 및 중쇄를 포함하는, TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 중쇄의 아미노산 서열 및 경쇄의 아미노산 서열은 다음으로 이루어지는 군 중에서 선택된다:

[0030] (i) 중쇄는 서열 12이고, 경쇄는 서열 13이고,

[0031] (ii) 중쇄는 서열 12이고, 경쇄는 서열 14이다.

[0032] 본 발명은 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 포함하는, TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 각각의 경쇄의 아미노산 서열은 서열 13이고, 각각의 중쇄의 아미노산 서열은 서열 12이다.

[0033] 본 발명은 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄를 포함하는, TGF-알파 및 에피레굴린에 결합하는 항체를 제공하고, 여기서 각각의 경쇄의 아미노산 서열은 서열 14이고, 각각의 중쇄의 아미노산 서열은 서열 12이다.

[0034] 추가로, 본 발명은 본원에서 설명되는 항체의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0035] 본 발명은 또한 본원에서 설명되는 본 발명의 항체, 및 적어도 하나의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0036] 추가로, 본 발명은 적어도 하나의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 함께, 본원에서 설명되는 본 발명의 항체 및 임의로 다른 치료 성분을 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명은 또한 환자에게 본원에서 설명되는 본 발명의 항체를 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 당뇨병성 신장병증을 치료하는 방법을 제공한다.

[0038] 추가로, 본 발명은 요법에 사용하기 위한 본원에서 설명되는 본 발명의 항체를 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 당뇨병성 신장병증의 치료에 사용하기 위한 본원에서 설명되는 본 발명의 항체를 제공한다.

[0039] 추가로, 본 발명은 당뇨병성 신장병증의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 본원에서 설명되는 본 발명의 항체의 용도를 제공한다.

[0040] 본 발명은 또한 환자에게 본원에서 설명되는 본 발명의 항체를 치료 표준과 조합하여 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 당뇨병성 신장병증을 치료하는 방법을 제공한다.

[0041] 추가로, 본 발명은 항체가 치료 표준과 조합되어 동시에 또는 순차적으로 투여되는 요법에 사용하기 위한 본원에서 설명되는 본 발명의 항체를 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 항체가 치료 표준과 조합되어 동시에 또는 순차적으로 투여되는 당뇨병성 신장병증의 치료에 사용하기 위한 본원에서 설명되는 본 발명의 항체를 제공한다.

- [0042] 추가로, 본 발명은 항체가 치료 표준과 조합되어 동시에 또는 순차적으로 투여되는 당뇨병성 신장병증의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 본원에서 설명되는 본 발명의 항체의 용도를 제공한다.
- [0043] 본 발명은 또한 본원에서 설명되는 본 발명의 항체의 항원 결합 단편, 및 적어도 하나의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0044] 추가로, 본 발명은 적어도 하나의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 함께, 본원에서 설명되는 본 발명의 항체의 항원 결합 단편 및 임의로 다른 치료 성분을 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0045] 본 발명은 또한 환자에게 본원에서 설명되는 본 발명의 항체의 항원 결합 단편을 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 당뇨병성 신장병증을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0046] 추가로, 본 발명은 요법에 사용하기 위한 본원에서 설명되는 본 발명의 항체의 항원 결합 단편을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 당뇨병성 신장병증의 치료에 사용하기 위한 본원에서 설명되는 본 발명의 항체의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0047] 추가로, 본 발명은 당뇨병성 신장병증의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 본원에서 설명되는 본 발명의 항체의 항원 결합 단편의 용도를 제공한다.
- [0048] 본 발명은 또한 환자에게 본원에서 설명되는 본 발명의 항체의 항원 결합 단편을 치료 표준과 조합하여 동시에 또는 순차적으로 투여하는 것을 포함하는, 환자에서 당뇨병성 신장병증을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0049] 추가로, 본 발명은 항원 결합 단편이 치료 표준과 조합되어 동시에 또는 순차적으로 투여되는 요법에 사용하기 위한 본원에서 설명되는 본 발명의 항체의 항원 결합 단편을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명은 항원 결합 단편이 치료 표준과 조합되어 동시에 또는 순차적으로 투여되는 당뇨병성 신장병증의 치료에 사용하기 위한 본원에서 설명되는 본 발명의 항체의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0050] 추가로, 본 발명은 항원 결합 단편이 치료 표준과 조합되어 동시에 또는 순차적으로 투여되는 당뇨병성 신장병증의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 본원에서 설명되는 본 발명의 항체의 항원 결합 단편의 용도를 제공한다.
- [0051] DN의 치료 표준은 ACE 억제제 및 안지오텐신 수용체 차단제 (ARB)를 포함하고 이로 제한되지 않는다.
- [0052] "항체"의 일반적인 구조는 당업계에 매우 잘 알려져 있다. IgG형의 항체에 대해, 사슬내 및 사슬간 디설피드 결합을 통해 가교결합된 4개의 아미노산 사슬 (2개의 "중쇄" 및 2개의 "경쇄")이 존재한다. 특정 생물학적 시스템에서 발현될 때, 비변형된 인간 Fc 서열을 갖는 항체는 Fc 영역에서 글리코실화된다. 항체는 또한 다른 위치에서 글리코실화될 수 있다. 항체의 서브유닛 구조 및 3차원 입체형태는 당업계에 잘 공지되어 있다. 각각의 중쇄는 N-말단 중쇄 가변 영역 ("HCVR") 및 중쇄 불변 영역 ("HCCR")으로 이루어진다. 중쇄 불변 영역은 IgG, IgD, 및 IgA에 대해 3개의 도메인 (CH1, CH2, 및 CH3)으로; IgM 및 IgE에 대해 4개의 도메인 (CH1, CH2, CH3, 및 CH4)으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 ("LCVR") 및 경쇄 불변 영역 ("LCCR")으로 이루어진다.
- [0053] 각각의 경쇄/중쇄 쌍의 가변 영역은 항체 결합 부위를 형성한다. HCVR 및 LCVR 영역은 프레임워크 영역 ("FR")으로 명명된 보다 보존된 영역에 산재된 상보성 결정 영역 ("CDR")으로 명명된 초가변성 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 HCVR 및 LCVR은 아미노-말단으로부터 카르복시-말단으로 다음 순서로 정렬된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 본원에서, 중쇄의 3개의 CDR은 "CDRH1, CDRH2, 및 CDRH3"으로 언급되고, 경쇄의 3개의 CDR은 "CDRL1, CDRL2 및 CDRL3"으로 언급된다. CDR은 항원과 특이적 상호작용을 형성하는 대부분의 잔기를 함유한다. 각각의 도메인에 대한 아미노산의 배치는 공지된 규약에 따라 수행된다 (예를 들어, 문헌 [Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]).
- [0054] 본 발명의 항체는 임의의 면역글로불린 클래스 (IgA, IgD, IgG, IgM, 및 IgE)로부터 선택된 중쇄 불변 영역을 가질 수 있다. 추가로, 본 발명의 항체는 다른 IgG 하위형에 비해 보체 인자에 결합하는 그의 감소된 능력 때문에 인간 IgG4 Fc 영역으로부터 유래된 Fc 부분을 함유한다.
- [0055] 항체는 예를 들어 임의의 진핵, 원핵, 또는 파지 클론을 비롯한 단일 카피 또는 클론으로부터 유래될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체는 항체 분자의 균일한 또는 실질적으로 균일한 집단 내에 존재한다. 전장 항체는 Fc 영역을 포함하는 전장 또는 실질적으로 전장 불변 영역을 포함한다. 상기 항체의 "항원 결합 단편"은 항

원 결합 부분을 포함하고 항원 결합능을 보유하는, 전장 항체의 임의의 단축된 형태이다. 상기 단축된 형태는 예를 들어 개시된 항체의 CDR 또는 가변 영역을 포함하는 Fab 단편, Fab' 단편 또는 F(ab')₂ 단편을 포함한다. 추가로, 그러한 단축된 항체 형태는 LCVR 및 HCVR을 코딩하는 DNA를 링커 (linker) 서열과 연결함으로써 생산될 수 있는 단일쇄 Fv 단편일 수 있다 (문헌 [Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp 269-315, 1994] 참조). 용어 "항체"는 달리 나타내지 않으면 상기 단편을 포함하지 않는다. 본 발명의 항체는 당업계에 잘 공지된 기술, 예를 들어, 재조합 기술, 파지 디스플레이 기술, 합성 기술 또는 상기 기술의 조합 또는 당업계에 쉽게 공지된 다른 기술을 사용하여 생산할 수 있다.

[0056] 본 발명의 항체는 인간 게놈 서열로부터 유래된 프레임워크 및 불변 영역과 동일한 또는 실질적으로 동일한 (실질적으로 인간의), 인간 기원의 프레임워크, 힌지 영역, 및 불변 영역을 갖도록 설계된 조작된 항체이다. 완전 인간 프레임워크, 힌지 영역, 및 불변 영역은 인간 생식계열 (germline) 서열 및 천연 생식 체세포 돌연변이를 갖는 서열 및 조작된 돌연변이를 갖는 서열이다. 본 발명의 항체는 그 내에 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 또는 부가를 함유하는, 완전 인간 프레임워크, 힌지, 또는 불변 영역으로부터 유래된 프레임워크, 힌지, 또는 불변 영역을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 인간에서 실질적으로 비-면역원성이다.

[0057] 다양한 상이한 인간 프레임워크 서열은 단독으로 또는 본 발명의 항체를 위한 기초로서 조합되어 사용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 항체의 프레임워크 영역은 인간 기원 또는 실질적으로 인간 (적어도 95%, 97% 또는 99%가 인간 기원임)의 것이다. 인간 기원의 프레임워크 영역의 서열은 문헌 [The Immunoglobulin Factsbook, by Marie-Paule Lafranc, Gerard Lefranc, Academic Press 2001, ISBN 012441351]으로부터 얻을 수 있다.

[0058] 본 발명의 항체에 대한 프레임워크 서열은 "공여자" 가변 프레임워크 영역로서 기능하고, 당업계에 공지된 방법을 사용하여 본원에서 특정된 동일한 CDR을 갖는 추가의 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 추가로, 본 발명의 항체에 대한 프레임워크 서열은 추가의 항체를 생성하기 위해 다른 공지의 인간 프레임워크 서열과 비교될 수 있다. 따라서, 상기 정보는 이들 위치에서 또 다른 선택된 상동성 인간 프레임워크 영역을 공여자 아미노산 잔기로 "역돌연변이 (back-mutate)" 시키기 위해 사용될 수 있다. 또한, 컨센서스 또는 공여자 아미노산 잔기가 관련 위치에서 사용될 수 있도록 임의의 "희귀 (rare)" 아미노산이 추가의 인간 프레임워크에서 검출될 수 있다.

[0059] "TGF-알파" 또는 "인간 TGF-알파"는 인간 TGF-알파 단백질 (서열 18)을 나타낸다.

[0060] "에피레굴린" 또는 "인간 에피레굴린"은 인간 에피레굴린 단백질 (서열 33)을 나타낸다. Met-인간 에피레굴린 (서열 22)이 본원의 시험관내 실험에서 사용된다. 인간 에피레굴린에 결합하거나 이를 중화하는 본원에서 설명되는 본 발명의 항체의 능력의 언급은 또한 시험관내 실험에서 인간 met-에피레굴린에 결합하고 중화하는 그들의 능력에도 관련된다.

[0061] "환자"는 포유동물, 바람직하게는 인간이다

[0062] 용어 "치료하는" (또는 "치료하다" 또는 "치료")는 증상, 장애, 병태, 또는 질환의 진행 또는 중증도의 둔화, 정지, 감소 또는 역전을 의미한다.

[0063] 용어 "치료 유효량"은 환자에게 단일 또는 다중 용량 투여시에 요구되는 치료를 제공하는 본 발명의 항체의 양 또는 용량을 의미한다.

[0064] 다음 실시예는 본질적으로 아래 설명된 바와 같이 수행할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0065] **실시예**

[0066] **실시예 1: 항체의 생산**

[0067] 항체 I 및 II는 다음과 같이 제조하고 정제할 수 있다. 적절한 숙주 세포, 예컨대 HEK 293 또는 CHO는 최적의 소정 HC:LC 벡터 비를 사용하여 항체를 분비하기 위한 발현 시스템, 또는 HC, 예컨대 서열 15, 및 LC, 예컨대 서열 16 또는 서열 17을 모두 코딩하는 단일 벡터 시스템으로 일시적으로 또는 안정적으로 형질감염시켰다. 항체가 분비된 맑은 배지는 임의의 많은 통상적으로 사용되는 기술을 사용하여 정제하였다. 예를 들어, 배지를 적합한 (compatible) 완충제, 예컨대 인산염 완충 염수 (pH 7.4)로 평형화된 단백질 A 또는 G 컬럼에 편리하게

적용할 수 있다. 컬럼을 세척하여 비특이적 결합 성분을 제거하였다. 결합된 항체는 예를 들어 pH 구배 (예컨대, 0.1 M 인산나트륨 완충제 (pH 6.8) 내지 0.1 M 시트르산나트륨 완충제 (pH 2.5))에 의해 용리하였다. 항체 분획은 예컨대 SDS-PAGE에 의해 검출된 후, 한데 모았다. 추가의 정제는 의도되는 용도에 따라 선택적이다. 항체는 통상적인 기술을 사용하여 농축 및/또는 멸균 여과될 수 있다. 가용성 응집체 및 다량체는 크기 배제, 소수성 상호작용, 이온 교환, 또는 히드록시아파타이트 크로마토그래피를 포함하는 통상적인 기술에 의해 효과적으로 제거될 수 있다. 이들 크로마토그래피 단계 후의 항체의 순도는 99% 초과이다. 생성물은 -70°C에서 즉시 동결될 수 있거나, 동결건조될 수 있다. 이들 항체에 대한 아미노산 서열을 아래에 제공한다.

서열 번호

항체	중쇄	경쇄	HCVR	LCVR
I	12	13	7	9
II	12	14	7	10
III	31	32	8	11

항체	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
I	1	2	3	4	5	6
II	1	2	3	4	5	6
III	1	2	3	4	5	6

[0068]

[0069]

실시예 2: 항체 I에 대한 표면 플라즈몬 공명 (비아코어 (BIAcore))에 의한 친화도 결합 측정

[0070]

비아코어 T2000 기기 (비아코어® AB, 스웨덴 우살라), 시약 및 비아코어 T2000 평가 소프트웨어 Ver 4.1을 표면 플라즈몬 공명 분석을 위해 사용하였다. CM5 칩은 제조사의 EDC/NHS 아민 결합 방법을 사용하여 제조하였다. 4개의 모든 유동 세포의 표면은 7분 동안 10 µl/분으로 EDC/NHS의 1:1 혼합물을 주입함으로써 활성화하였다. 염소 항-인간 Fcγ 특이적 항체를 10 mM 아세트산 (pH 4.0) 완충제 내에 50 µg/ml로 희석하고, 10 µl/분의 유량으로 7분 주사에 의해 4개의 모든 유동 세포 상에 대략 10000 RU로 고정시켰다. 비반응 부위는 10 µl/분으로 에탄올아민의 7분 주사에 의해 차단하였다. 30 µl/분으로 글리신 (pH 1.5)의 3 x 20초의 주사를 사용하여 비-공유 결합된 단백질을 제거하였다. 이동 완충제는 HBS-EP [10 mM HEPES, 150 mM 염화나트륨, 3 mM EDTA, 0.005% 폴리소르베이트 (Polysorbate) 20]이었다.

[0071]

연구 1에서, 항체 I은 이동 완충제 내에 50 µg/mL로 희석되고, 대략 400-600 RU가 유동셀 (flowcell) 2에 포획되었다. 인간 TGF-알파 (서열 18), 래트 TGF-알파 (서열 20), met-인간 에피레굴린 (서열 22), 및 시노몰거스 에피레굴린 (서열 24)을 이동 완충제 내에서 100 µg/mL로부터 200 nM로 희석한 후, 이동 완충제 내에서 6.25 nM로 2배 연속 희석하였다. 마우스 에피레굴린 (서열 23)은 이동 완충제 내에서 100 µg/mL로부터 4 µM로 희석한 후, 이동 완충제 내에서 125 nM로 2배 연속 희석하였다. 각각의 리간드 농도의 이중 주사액을 30 µl/분으로 300초 동안 주입한 후, 해리기가 이어졌다. 해리기는 인간 및 래트 TGF-알파에 대해 1800초, 인간 및 시노몰거스 에피레굴린에 대해 1200초, 마우스 에피레굴린에 대해 120초이었다. 재생은 10 mM 글리신 (pH 1.5)을 3 x 20초 동안 30 µl/분으로 모든 유동셀에 주입함으로써 수행하였다.

[0072]

연구 2에서, 항체 III은 이동 완충제 내에 100 µg/mL로 희석되고, 대략 400-600 RU가 유동셀 2에 포획되었다. 마우스 TGF-알파 (서열 19)를 이동 완충제 내에서 100 µg/mL로부터 200 nM로 희석한 후, 이동 완충제 내에서 6.25 nM로 2배 연속 희석하였다. 마우스 에피레굴린 (서열 23)은 이동 완충제 내에서 100 µg/mL로부터 4 µM로 희석한 후, 이동 완충제 내에서 125 nM로 2배 연속 희석하였다. 각각의 리간드 농도의 이중 주사액을 30 µl/분으로 300초 동안 주입한 후, 해리기가 이어졌다. 해리기는 마우스 TGF-알파에 대해 1800초, 마우스 에피레굴린에 대해 120초이었다. 재생은 10 mM 글리신 (pH 1.5)을 30초 동안 30 µl/분으로 모든 유동셀에 주입함으로써 수행하였다.

[0073]

참조물 공제 데이터는 Fc2-Fc1로서 수집하였다. 측정치는 25°C에서 얻었다. 각각의 리간드에 대한 온-레이트 (on-rate) (k_{on}) 및 오프-레이트 (off-rate) (k_{off})는 "1:1 (랭뮤어 (Langmuir)) 결합" 모델을 사용하여 평가하

였다. 친화도 (K_D)는 다음 관계식에 따라 결합 동역학으로부터 계산하였다: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

표 1

항체 I에 대한 결합 파라미터

리간드	종	온 레이트 (k_{on}) ($M^{-1}s^{-1}$) (\pm SD)	오프 레이트 (k_{off}) (s^{-1}) (\pm SD)	친화도 (K_D^a) (\pm SD)
TGF-알파	인간	$4.18 \pm 0.28 \times 10^5$	$4.09 \pm 0.96 \times 10^{-5}$	97.6 ± 20.6 pM
	랫트	$3.78 \pm 0.39 \times 10^5$	$2.66 \pm 0.74 \times 10^{-5}$	70.5 ± 19.4 pM
에피레굴린	인간	$4.91 \pm 0.42 \times 10^5$	$6.31 \pm 0.55 \times 10^{-4}$	1.29 ± 0.03 nM
	시노물거스	$6.73 \pm 0.71 \times 10^5$	$7.05 \pm 0.23 \times 10^{-4}$	1.05 ± 0.09 nM
	마우스	$4.10 \pm 1.15 \times 10^4$	$1.33 \pm 0.16 \times 10^{-2}$	342 ± 136 nM

^a $K_D = k_{off}/k_{on}$ 로서 계산됨

[0074]

표 2

항체 III에 대한 결합 파라미터

리간드	온 레이트 (k_{on}) ($M^{-1}s^{-1}$) (\pm SD)	오프 레이트 (k_{off}) (s^{-1}) (\pm SD)	친화도 (K_D^a) (\pm SD)
마우스 TGF-알파	$5.41 \pm 0.50 \times 10^5$	$2.02 \pm 0.54 \times 10^{-5}$	38.0 ± 13.6 pM
마우스 에피레굴린	$6.55 \pm 0.38 \times 10^4$	$1.41 \pm 0.09 \times 10^{-2}$	215 ± 15 nM

^a $K_D = k_{off}/k_{on}$ 로서 계산됨

[0075]

[0076]

항체 I은 각각 약 98 pM 및 1.3 nM의 친화도로 인간 TGF-알파 및 인간 에피레굴린에 결합하였다. 항체 I은 또한 각각 약 70 pM 및 340 nM의 친화도로 랫트 TGF-알파 및 마우스 에피레굴린에 결합하였다. 추가로, 항체 I은 약 1 nM의 친화도로 시노물거스 에피레굴린에 결합하였다. 항체 III은 각각 약 38 pM 및 220 nM의 친화도로 마우스 TGF-알파 및 마우스 에피레굴린에 결합하였다. 따라서, 본 발명의 항체 I 및 항체 III은 인간 TGF-알파 및 인간 에피레굴린에 높은 친화도로 결합하였다.

[0077]

실시예 3: 인간 결합 암종 세포주 HT-29에서 EGF 표적 리간드의 내재화

[0078]

알렉사 플루오르(Alexa Fluor)® 488의 항체에 대한 접합

[0079]

알렉사 플루오르® 488은 제조사의 프로토콜에 따라 항체 I 및 대조군 IgG에 접합하였다. 단백질을 PBS 내에 2 mg/mL로 희석하였다. 0.5 mL의 상기 2 mg/mL 용액에, 50 μ L의 1M 중탄산나트륨 (pH 9)을 첨가하였다. 이어서, 단백질 용액을 염료의 바이알에 옮기고, 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 표지된 단백질은 표지화 키트와 함께 포함된 바이오-라드 (Bio-Rad) BioGel P-30 수지를 사용하여 정제하였다.

[0080]

시험관내 내재화 검정

[0081]

연구 1에서, TGF-알파 및 에피레굴린을 발현하는 것으로 알려진 결합 선암종 세포주인 10,000개의 HT-29 세포를 96웰 플레이트의 웰마다 접종하고, 완전 배지 [L-글루타민, 10% 열-불활성화 태소 혈청 ("FBS"), 1x 항생제, 및 2.438 g/L 중탄산나트륨을 함유하는 돌베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (Ham) 배지 (1:1) ("DMEM/F12")) 내에서 밤새 인큐베이팅하였다. 다음날, 세포를 0.1% BSA를 함유하는 PBS로 세척한 후, 조직 배양 인큐베이터에서 2시간 동안 37°C에서 0 내지 88 μ g/mL의 농도로 0.1% BSA 함유 PBS로 알렉사 플루오르® 488 접합된 항체 I 또는 대조군 IgG와 함께 인큐베이팅하였다. 인큐베이팅 기간 후에, 세포를 0.1% BSA 함유 PBS 내에서 수차례 세척한 후, 분석을 위해 4% 포르말데히드로 고정하였다. 내재화의 정량은 다음과 같이 수행하였다: 500개 세포/웰을 셀로믹스 어레이스캔 (Cellomics Arrayscan) VTI (써모 사이언티픽 (Thermo Scientific))로 수집하였다. 영상 분석은 시스템의 "구획 분석 (Compartmental analysis)" 바이오어플리케이션스 (Bioapplications)를 사용하여 수행하였다. 세포 핵은 Hoechst (Hoechst) 염색 (청색)으로 확인하였다. 마스킹된 (masked) 영상으로부터 얻은 세포내 스팟 (spot) (적색) 및 총 초록 형광 (적색 및 청색 둘 모두)으로

부터 형광 신호를 수집하기 위해 2개의 관심있는 영역 (ROI)을 설정하였다. 각각의 스팟 및 세포로부터의 수, 영역 및 형광 강도를 계산하였다. 세포내 스팟 (적색)의 평균 스팟 총 강도가 항체 I 유도 내재화를 측정하기 위해 선택되었다.

[0082]

연구 2에서, 10,000개의 HT-29 세포를 이전에 설명된 바와 같이 제조하고, 0.1% BSA 함유 PBS 내의 알렉사 플루오르® 488 접합된 항체 I 또는 대조군 IgG를 세포에 40 µg/mL로 첨가하였다. 세포를 조직 배양 인큐베이터에서 0-120분의 다양한 시간 동안 37°C에서 인큐베이팅한 후, 0.1% BSA 함유 PBS로 수차례 세척하고, 분석을 위해 4% 포름알데히드로 고정하였다. 신호의 정량은 본질적으로 이전에 설명된 바와 같이 수행하였다.

표 3

표 3a
연구 1 - 형광의 평균 링스팟 (ringspot) 총 강도

용량 (ug/ml)	88	44	22	11	5.5
대조군 IgG	2440 ± 199	1808 ± 207	1763 ± 68	1391 ± 76	1357 ± 63
항체 I	24809 ± 4343	17451 ± 217	15135 ± 131	11516 ± 54	8474 ± 269
평균 ± SEM					

표 3b

연구 1 - 형광의 평균 링스팟 총 강도

용량 (ug/ml)	2.75	1.38	0.69	0.34	0
대조군 IgG	1570 ± 70	1473 ± 7	1483 ± 90	1407 ± 41	1630 ± 155
항체 I	6503 ± 262	4349 ± 186	3440 ± 96	2432 ± 62	1460 ± 84
평균 ± SEM					

[0083]

[0084]

연구 1의 영상 분석 결과는 형광 신호가 세포 내로 내재화되고 항체 I에 대해 용량 의존적이지만 대조군 IgG에 대해서는 그렇지 않았다고 결정하였다 (표 3a 및 표 3b).

표 4

연구 2 - 형광의 평균 링스팟 총 강도

첨가후 시간 (min)	120	60	30	15	5	0
대조군 IgG	177 ± 29	167 ± 23	124 ± 10	126 ± 18	116 ± 4	94 ± 11
항체 I	4449 ± 866	4131 ± 1688	1494 ± 66	717 ± 72	261 ± 17	89 ± 1
평균 ± SEM						

[0085]

[0086]

연구 2로부터의 결과는 항체 I이 신속하게 내재화되고, 내재화는 세포에 첨가한 지 2시간 후에 완전하였음을 입증하였다 (표 4). 항체 I은 시험관 내에서 HT-29 세포 상의 표적의 내재화를 시간 의존적 방식으로 유도하였다 (표 4).

[0087]

실시예 4: 근섬유모세포 세포주에서 EGFR 리간드 자극 세포 증식의 증화 측정

[0088]

EGFR 리간드의 증식 활성을 차단하는 본 발명의 항체의 능력을 시험하기 위해서 클론성 (clonal) 마우스 근섬유

모세포 세포주 ("Mfc7")를 사용하였다. EGFR을 활성화할 수 있는 7개의 리간드는 TGF-알파 (TGFA), 에피레굴린 (EREG), EGF, 헤파린-결합 EGF (HB-EGF), 에피겐 (Epigen) (EPGN), 암피레굴린 (AREG) 및 베타셀룰린 (Betacellulin) (BTC)이다. EGFR 리간드는 6개의 유사하게 이격된 보존된 시스테인 잔기에 의해 형성된 3개의 분자내 디설피드 결합을 특징으로 하는 구조적 모티프인 EGF-유사 도메인을 공유하였다. 증식 활성은 브로모데옥시우리딘 ("BrDU") 혼입에 의해 결정되고, 제조자의 지시에 따라 비색 BrDU ELISA 키트를 사용하여 측정하였다.

[0089] 먼저, 2,000개 Mfc7 세포/웰을 L-글루타민, 10% 열-불활성화된 FBS, 1x 항생제, 및 2.438 g/L 중탄산나트륨을 함유하는 0.1 mL의 돌베코 변형 이글 배지/F12 (Ham) 배지 (1:1) ("DMEM/F12")에 조직 배양액 처리된 96웰 마이크로플레이트 내에서 플레이팅하였다. 세포를 6시간 동안 부착시킨 후, 배지를 제거하고, 혈청 고갈 (starvation)을 위해 0.1% BSA를 함유하는 0.1 mL의 혈청 미함유 DMEM/F12로 밤새 교체하였다. 다음날, 0.001 내지 3000 ng/mL의 농도로부터 0.12 mL/웰의 부피로 96웰 폴리프로필렌 플레이트 내에서 0.1% BSA를 함유하는 혈청 미함유 배지를 사용하여 EGFR 리간드의 연속 희석액을 제조하였다. 희석 후에, 혈청 고갈 세포로부터 배지를 제거한 후, EGFR 리간드로 24 hr 동안 자극하였다. 자극 후에, 세포에 4 hr 동안 BrDU 펄스를 인가한 후, 제조자의 지시에 따라 비색 BrDU ELISA 키트를 사용하여 분석하였다.

[0090] EGFR 리간드에 대한 항체 I의 특이성을 시험할 때, 3000 nM 내지 0.059 nM의 농도로부터 0.06 mL/웰의 부피로 96웰 폴리프로필렌 플레이트 내에서 항체의 2X 또는 3X의 연속 희석액을 제조하였다. 항체의 연속 희석 후에, 0.06 mL의 EGFR 리간드를 웰마다 첨가하였다. 이어서, 플레이트를 37°C에서 가습 조직 배양액 인큐베이터에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에, 웰당 0.1 mL의 용액을 세포에 전달하였다. 세포를 24시간 동안 자극하였다. 자극 후에, 세포에게 4시간 동안 BrDU 펄스를 인가한 후, 비색 BrDU ELISA 키트로 분석하였다. 흡광도 값 (450 nM - 690 nM)은 스펙트라맥스 (SpectraMax) 190 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이시스 (Molecular Devices))로 생성하고, 데이터를 분석하였다.

표 5

Mfc7 검정

EGFR 리간드	EC50 범위 (pM)	IC50 (nM) 항체 I	IC50 (nM) 항체 III
인간 TGF-알파 ^a	11-12	0.46 ± 0.03	0.52 ± 0.04
인간 에피레굴린	78-282	3.15 ± 1.04	1.12 ± 0.36
인간 에피겐	3797-18987	807 ± 577	nd ^b
인간 EGF	0.3-2.4	> 2000	nd ^b
인간 HBEGF	30-39	> 2000	nd ^b
인간 베타셀룰린	1.8-3.2	> 2000	nd ^b
인간 암피레굴린	273-2727	> 2000	nd ^b
랫 TGF-알파	13-13.8	0.19 ± 0.06	0.13 ± 0.01
마우스 에피레굴린	163-320	334 ± 41	214 ± 49
^a 인간 EGFR 리간드의 농도는 암피레굴린 (60 nM) 및 에피겐 (100 nM)을 제외하고 항체 I로 시험할 때 0.5 nM이었다.			
랫 TGF-알파 및 마우스 에피레굴린은 0.5 nM에서 사용되었다.			
^b nd, 결정되지 않음.			

[0091] [0092] 마우스 에피레굴린 및 랫 TGF-알파, 및 에피겐 및 암피레굴린을 제외한 모든 인간 EGFR 리간드는 검정에서 세포 증식의 효능있는 자극제로서 밝혀졌다 (표 5). 항체 I 및 항체 III은 인간 및 랫 TGF-알파에 대한 높은 친화도 및 인간 에피레굴린 활성을 갖는다 (표 5).

[0093] 표 5는 시험된 EGFR 리간드에 대한 계산된 EC50 값 및 리간드에 대한 항체의 절대 IC50 값을 요약한 것이다. 항체 I에 대해 계산된 평균 IC50은 인간 TGF-알파에 대해 0.46±0.03 nM 및 인간 에피레굴린에 대해 3.15±1.04 nM이었다. 항체 III에 대해 계산된 IC50 평균은 인간 TGF-알파에 대해 0.52±0.04 nM 및 인간 에피레굴린에 대해 1.12±0.36 nM이었다. 항체 III에 대해 계산된 평균 IC50 값은 랫 TGF-알파에 대해 0.13±0.01 nM 및 마우스 에피레굴린에 대해 214±49 nM이었다. 따라서, 항체 I 및 항체 III은 인간 TGF-알파 및 인간 에피레굴린에 대해 높은 친화도를 갖고 선택적이며 완전한 중화 활성을 갖는다.

[0094] 실시예 5: 고혈압 신장 질환의 마우스 잔여 신장 모델에서 신장 기능 및 병리상태

- [0095] 총 신장 질량의 75%의 수술에 의한 감소를 수반하는 마우스 잔여 신장 모델이 고혈압 신장 질환의 전임상 모델로서 사용된다 (문헌 [Ma LJ, Fogo AB. *Kidney Int.* 2003 Jul;64(1):350-5]). 신장 질량의 수술에 의한 감소 또는 모의 수술 (sham surgery)을 9-10주령의 수컷 129 Svej 마우스에서 수행하였다. 수술 2주 후에 뇨 알부민/크레아티닌 비 ("ACR") 및 체중에 의해 12마리 마우스의 군으로 무작위로 분류하였다. 이소형 대조군 IgG (10 mg/kg) 또는 항체 III (1 및 10 mg/kg)을 무작위 분류 후에 피하 투여하고, 수술 후 제16주까지 매주 1회 지속하였다. 연구에 대한 중점은 생존, 수축기 혈압, 알부민뇨, 혈청 크레아티닌, 혈청 BUN, 뇨 TGF-알파, 뇨 MIP-2 및 신장 병리상태이다.
- [0096] 연구 종료시에, 대조군 IgG 군에서 3마리가 죽었고 (25% 사망률), 항체 III 처리군에서는 죽은 마우스가 존재하지 않았다.
- [0097] **수축기 혈압의 측정**
- [0098] 혈압은 꼬리 가압대 (cuff) 방법에 의해 수술후 12주에 측정하였다. 실제 측정 3-5일 전에 각각의 군으로부터 선택된 마우스 (N = 3-4/군)를 꼬리 가압대를 매일 5분 동안 부착시키면서 마우스 홀더 (holder)에 둬으로써 속박 상태에 순응시켰다. 장치 실온은 혈압 수집 과정 동안 온기를 제공하기 위해서 24°C로 올렸다. 마우스를 마우스 속박기 (restrainer)에 두고, 꼬리 혈관계의 팽창을 제시하기 위해 가온 패드 유닛 (31-33°C) 상에 올렸다. 꼬리를 꼬리 가압대를 통과하도록 만들고, 각각의 마우스를 45분을 초과하지 않도록 하면서 약 30분 동안 속박하였다. 상기 시간은 초기 가온 및 압력 측정, 및 측정 직후의 일반적인 사육장으로서의 복귀를 포함하였다. 마취는 사용하지 않았다. 꼬리 가압대를 부풀게 만들어, 동맥 혈류를 순간적으로 방해하기에 충분히 강하게 꼬리를 압축한 후, 동맥과의 회복을 관찰하기 위해 공기를 뱉으로써 점진적으로 느슨하게 만들었다. 동맥과의 회복시에, 가압대에서 공기를 완전히 뱉었다.
- [0099] **알부민뇨의 측정**
- [0100] 소변을 24시간에 걸쳐서 날젠 메타볼릭 (Nalgene Metabolic) 케이지 유닛에서 4주마다 수집하였다. 각각의 마우스 (한 마리씩 사육장에 수용됨)에게 먹이 및 물을 24시간 수집 과정 동안 공급하였다. 24시간 종료시에, 수집된 소변을 얼음에 놓고, 원심분리하고, 알부민 및 크레아티닌 분석을 수행하였다. 알부민뇨는 뇨 알부민 대 크레아티닌의 비 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)로서 규정된다.
- [0101] **혈청 크레아티닌 및 BUN**
- [0102] 연구 종료에서, 심장 천자에 의해 얻어진 혈청을 BUN 및 크레아티닌에 대해 분석하였다.
- [0103] **TGF-알파 및 MIP-2 ELISA**
- [0104] 24시간 수집에 의해 얻은 소변을 14,000 x g에서 30분 동안 회전하는 3K MW 컷오프 (cutoff) 막을 사용하여 원심분리에 의해 5배 농축하였다. 마우스 TGF 알파에 대한 샌드위치-타입 효소-연결 면역흡착 검정 ("ELISA")이 확립되었다. 래트 TGF-알파를 표준물질로서 사용하였다. 폴리스티렌 96웰 플레이트를 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항체 III로 밤새 4°C에서 코팅하였다. 플레이트를 세척하고, 차단 완충제로 차단하고, 다시 세척한 후, 농축된 뇨 샘플을 첨가하였다. 실온에서 2시간 후에, 플레이트를 세척한 후에, 2차 비오틴화된 폴리클로날 항-hTGF 알파를 첨가하였다. 실온에서 2시간 둔 후, 플레이트를 세척하고, 스트렙타비딘-HRP와 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. TMB 기질을 사용하여 신호를 생성하고, 반응을 2 N H₂SO₄로 중지시켰다. 마우스 대식세포 염증성 단백질 2 (MIP-2, 인간 IL-8의 동등물)에 대한 시판되는 콰인틴 (Quantikine)® 샌드위치 ELISA 키트를 제조자의 지시에 따라 사용하여 뇨 MIP-2를 검출하였다. 두 ELISA 검정에 대한 흡광도 데이터는 스펙트라맥스 190 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이시스)로 얻고, 데이터를 분석하였다.
- [0105] **신장 병리상태**
- [0106] 잔여 신장을 연구 종료시에 제거하고, 포르말린 내에 고정하고, 표준 방법에 따라 파라핀 절편화를 위해 처리하였다. 신장의 절편은 병리학자에 의해 신장 병변에 대해 평가되었다. 관형 단백질, 증가된 혈관간 기질 및 간질 섬유증은 다음 척도를 이용하여 반-정성적으로 채점하였다: 없음 (0), 최소 (1), 경미 (2), 중등도 (3), 현저 (4) 및 심각 (5). 사구체 혈관간 기질 팽창 및 기저막 비후화는 헤마톡실린 및 에오신 ("H&E") 및 과요오드산-쉬프 (Schiff) ("PAS") 염색 절편을 사용하여 채점하였다. 신장의 마슨 (Masson) 트리크롬 염색 절편은 섬유증 (간질 및 사구체)의 정도를 결정하기 위해 평가하였다.
- [0107] **통계적 방법**

[0108]

모든 데이터는 JMP v.8.0 소프트웨어 (SAS 인스티튜트 (SAS Institute))를 사용하여 분석하였다. 병리상태 점수는 분할 (contingency) 분석 및 피셔 (Fisher) 정확 검정에 의해 통계적으로 평가하였다. 다른 모든 데이터는 로그 (log) 변환 데이터를 사용한 ANOVA 및 스튜던트 (Students) 비쌍체 (unpaired) t 검정에 의해 평가하였다. <0.05의 P 값은 통계상 유의한 것으로 간주된다.

표 6

시간에 따른 알부민뇨 진행

주	2	4	8	12	16
대조군 IgG (10 mg/kg)	1601 ± 269	3377 ± 860	5201 ± 907	6144 ± 1654	4863 ± 2170
항체 III (1 mg/kg)	1665 ± 305	3211 ± 343	3224 ± 518	3790 ± 857	5240 ± 2004
항체 III (10 mg/kg)	1626 ± 273	2245 ± 334	2399 ± 261 ^a	2749 ± 401 ^a	3254 ± 654
뇨 알부민 대 크레아티닌의 비 (µg/mg)에 대한 산술 평균 ± SEM					
^a 대조군 IgG에 비해 통계적으로 유의한 차이 (p<0.05)					

[0109]

[0110]

항체 III을 사용할 때 대조군 IgG 군에 비해 알부민뇨의 용량 의존적 감소가 존재하였다 (표 6). 10 mg/kg의 항체 III 처리는 대조군 IgG 군에 비해 수술 후 제8주 및 제12주에 알부민뇨의 유의한 감소를 야기하였지만, 제 2, 4, 또는 16주에는 그렇지 않았다 (표 6).

표 7

수축기 혈압, 혈청 크레아티닌 및 BUN

종점	제12주 수축기 혈압 (mm Hg)	제16주 혈청 크레아티닌 (mg/dL)	제16주 혈청 BUN (mg/dL)
모의군	nd	0.17 ± 0.01	31.5 ± 2.5
대조군 IgG (10 mg/kg)	139.6 ± 4.0	0.31 ± 0.04 ^a	64.0 ± 12.5 ^a
항체 III (1 mg/kg)	147.5 ± 8.2	0.29 ± 0.01 ^a	47.6 ± 1.7
항체 III (10 mg/kg)	157.3 ± 4.5	0.23 ± 0.01 ^b	44.8 ± 1.5 ^b
산술 평균 ± SEM			
^a 모의군에 비해 통계적으로 유의함 (p<0.05)			
^b 대조군 IgG 군에 비해 통계적으로 유의한 차이 (p<0.05)			
nd, 결정되지 않음			

[0111]

[0112]

항체 III은 모든 군이 수술 후 제12주에 고혈압을 보였기 때문에 수축기 혈압에 대해 효과를 보이지 않았다 (표 7). 추가로, 10 mg/kg의 항체 III 처리는 대조군 IgG 군에 비해 혈청 크레아티닌 및 BUN의 유의한 감소에 의해 제시되는 바와 같은 신장 기능의 개선을 유도하였다 (표 7).

표 8

노 TGF-알파, 노 MIP-2 및 신장 병리상태 점수

종점	제8주 노 TGF-알파 대 크레아티닌 (pg/mg)	제12주 노 MIP-2 대 크레아티닌 (pg/mg)	제16주 병리상태 관형 단백질 점수 (1-5)	제16주 병리상태 혈관간 기질 점수 (1-5)	제16주 병리상태 간질 섬유증 점수 (1-5)
모의군	115 ± 4	검출될 수 없음	0 ± 0	0 ± 0	0.25 ± 0.25
대조군 IgG (10 mg/kg)	102 ± 53	22.8 ± 7.4	2.55 ± 0.16	1.91 ± 0.28	2.09 ± 0.16
항체 III (1 mg/kg)	74 ± 18	nd	2.17 ± 0.11	1.58 ± 0.15	1.83 ± 0.21
항체 III (10 mg/kg)	19 ± 5 ^a	5.6 ± 0.9 ^a	2.08 ± 0.08 ^a	**1.42 ± 0.15	1.42 ± 0.15 ^a
산술 평균 ± SEM					
^a 대조군 IgG 군에 비해 통계적으로 유의한 차이 (p<0.05)					
nd, 결정되지 않음					

[0113]

[0114]

대조군 IgG 군에 비해 10 mg/kg 항체 III 용량에서 수술 후 제8주 및 제12주에 노 TGF-알파 및 노 MIP-2의 통계상 유의한 감소가 존재하였다 (표 8). 추가로, 대조군 IgG에 비해 항체 III의 10 mg/kg 용량에서 관형 단백질 및 간질 섬유증에 대한 신장 병리상태의 통계상 유의한 감소 및 혈관간 기질 팽창의 감소가 존재하였다 (표 8).

[0115]

실시예 6: 당뇨병성 신장 질환의 마우스 일측 신절제 db/db 모델에서 알부민뇨 및 신장 병리상태

[0116]

일측 신절제된 db/db 마우스 모델은 당뇨병성 신장병증의 모델을 제시한다 (문헌 [Ninichuk et al., Eur J Med Res. 2007 Aug 16;12(8):351-5]). 일측 신절제된 db/db 모델을 사용하여 당뇨병에 의한 신장 질환 파라미터에 대한 항체 III의 효과를 결정하였다. C57BLKS/J 배경의 db/db 마우스에 대한 일측 신절제 ("UniNx") 수술은 4주령에서 수행하여 우측 신장을 제거하였다. 8주령에서 노 ACR, 혈당 및 체중에 의해 12마리 마우스의 군으로 무작위로 분류하였다. 모든 마우스는 각각의 연구 시작시에 고혈당증을 보였다. 이소형 대조군 IgG 또는 항체 III을 9주령에 피하 투여하고, 25주령까지 매주 1회 지속하였다. 연구 1은 항체 III의 0.3 및 10 mg/kg 용량 및 이소형 대조군 IgG의 10 mg/kg 용량에서 수행하였다. 연구 1에 대한 종점은 생존, % HbA1c, 알부민뇨, 노 TGF-알파, 신장 중량 및 신장 병리상태이다. 연구 2는 이소형 대조군 IgG의 30 mg/kg 용량과 함께 항체 III의 30, 10, 3 및 0.3 mg/kg의 용량군을 포함하였다. 연구 2에 대한 종점은 생존 및 알부민뇨이다.

[0117]

연구 1에서는 대조군 IgG 군에서 단지 한 마리의 사망만이 존재하였다. 연구 2에서는 사망이 존재하지 않았다.

[0118]

노 수집 및 알부민뇨의 측정

[0119]

2-4시간에 걸쳐 소변을 수집하기 위해 스팟 수집 방법에 의해 소변을 수집하였다. 개개의 마우스를 96웰 폴리프로필렌 마이크로플레이트 위에 두고, 호흡은 가능하지만 먹이 또는 물에는 접근할 수 없는 구멍이 있는 플렉시글라스 (Plexiglas) 챔버로 덮었다. 시간 종료시에, 소변을 마이크로피펫으로 플레이트로부터 제거하고, 얼음 상에 놓고, 원심분리하고, 알부민 및 크레아티닌 분석을 수행하였다. 알부민뇨는 노 알부민 대 크레아티닌의 비 (μg/mg)로서 규정된다.

[0120]

% HbA1c의 결정

[0121]

% HbA1c를 연구 종료시에 고혈당증의 척도로서 사용하였다. EDTA 혈장은 심장 천자에 의해 부검시에 얻었다. 혈액 샘플을 2000 g에서 20분 동안 원심분리하여 혈액 세포를 제거하고 혈장을 얻었다. 혈장 샘플을 헤모글로빈 A1c 및 총 헤모글로빈에 대해 분석하였다. 이들 데이터로부터, % HbA1c를 계산하였다.

[0122]

신장 중량

[0123] 중량을 얻기 위해 부검시에 신장을 제거하였다.

[0124] **ELISA에 의한 뇨 TGF-알파의 결정**

[0125] 스팟 수집에 의해 얻은 소변을 울트라셀 (ultracel) 3K MW 컷오프 막을 포함하는 0.5 mL 아미콘 (Amicon) 초 (Ultra) 원심분리 필터로 5배 농축하였다. 장치를 14,000 x g에서 30분 동안 회전시킨 후, 농축된 뇨 샘플을 수집하였다. 마우스 TGF 알파에 대한 샌드위치-타입 ELISA가 확립되었다. 래트 TGF-알파를 TGF-알파 ELISA에 대한 표준물질로 사용하였다. 폴리스티렌 96웰 플레이트를 3 µg/mL의 항체 III로 밤새 4°C에서 코팅하였다. 플레이트를 세척하고, 차단 완충제로 차단하고, 다시 세척한 후, 농축된 뇨 샘플을 첨가하였다. 실온에서 2시간 후에, 플레이트를 세척한 후에, 2차 비오틴화된 폴리클로날 항-hTGF 알파를 첨가하였다. 실온에서 2시간 둔 후, 플레이트를 세척하고, 스트렙타비딘-HRP와 함께 30분 동안 인큐베이팅하였다. TMB 기질을 사용하여 신호를 생성하고, 반응을 2 N H₂SO₄로 중지시켰다. 흡광도 데이터는 스펙트라맥스 190 플레이트 판독기 (몰레큘라 디바이스즈)로 얻고, 데이터를 분석을 위해 마이크로소프트 엑셀 (Microsoft Excel) 2007 및 시그마플롯 (Sigmaplot) v.9.01에 입력하였다.

[0126] **신장 병리상태**

[0127] 신장을 연구 종료시에 제거하고, 피막을 제거한 후 포르말린 내에 고정하고, 표준 방법에 따라 파라핀 절편화를 위해 처리하였다. 신장의 절편은 병리학자에 의해 신장 병변에 대해 평가되었다. 혈관간 기질, 골반 팽창 및 사구체 섬유증은 다음 척도를 이용하여 반-정성적으로 채점하였다: 없음 (0), 최소 (1), 경미 (2), 중등도 (3), 현저 (4) 및 심각 (5). 사구체 혈관간 기질 팽창 및 기저막 비후화는 H&E 및 PAS 염색 절편을 사용하여 채점하였다. 신장의 마스 트리크롬 염색 절편은 섬유증 (사구체)의 정도를 결정하기 위해 평가하였다.

[0128] **통계적 방법**

[0129] 모든 데이터는 JMP v.8.0 소프트웨어 (SAS 인스티튜트)를 사용하여 분석하였다. 병리상태 점수는 분할 분석 및 피셔 정확 검정에 의해 통계적으로 평가하였다. 알부민뇨 (ACR)의 통계적 분석은 비변환된 데이터 및 공변량으로서 제8주에서의 기준선 ACR을 사용하여 피트 (Fit) 모델에 의해 수행하였다. ACR 진행은 ANOVA 및 스튜던트 비쌍체 t 검정에 의해 각각의 군 내의 제24주 데이터를 제16주 데이터와 비교함으로써 분석하였다. 군에 걸쳐 제16주로부터 제24주까지의 ACR 변화는 ANOVA 및 스튜던트 비쌍체 t 검정에 의해 분석하였다. <0.05의 P 값은 통계상 유의한 것으로 간주된다. 다른 모든 데이터는 로그 변환 데이터를 사용한 ANOVA 및 스튜던트 비쌍체 t 검정에 의해 평가하였다.

표 9

연구 1 - 알부민뇨 진행

나이(주령)	8	12	16	20	24	Wk 16-24 ACR 변화 (ug/mg)	Wk 16-24 ACR 변화 (%)
건강한 마른 군	nd	15 ± 2	19 ± 3	13 ± 3	12 ± 2	nd	nd
Db/db 대조군 IgG @ 10 mg/kg	273 ± 59 ^a	903 ± 125 ^a	1551 ± 180 ^a	2384 ± 257 ^a	3228 ± 488 ^{ac}	1677 ± 419	108 ± 27
Db/db 항체 III @ 0.3 mg/kg	299 ± 63 ^a	913 ± 174 ^a	1573 ± 209 ^a	1911 ± 222 ^a	2248 ± 417 ^{ab}	675 ± 332 ^b	43 ± 21
Db/db 항체 III @ 10 mg/kg	291 ± 55 ^a	1002 ± 107 ^a	965 ± 141 ^a	1433 ± 190 ^{ab}	1426 ± 230 ^{ab}	461 ± 219 ^b	48 ± 23
산술 평균 ± SEM							
^a 건강한 마른 군에 비해 통계적으로 유의함 (p<0.05)							
^b 대조군 IgG 군에 비해 통계적으로 유의한 차이 (p<0.05)							
^c 군 내의 제16주 시점에 비해 통계적으로 유의함 (p<0.05)							

[0130]

[0131] 연구 1에서, 항체 III을 사용할 때 대조군 IgG 군에 비해 알부민뇨의 용량 의존적 감소가 존재하였다 (표 9).

마지막 2개월 동안, 두 항체 III 군에서 대조군 IgG 군에 비해 알부민뇨의 진행이 더 작았다. 연구의 마지막 2개월에 걸친 군 내의 알부민뇨의 변화는 대조군 IgG 군에서 제16주로부터 제24주까지 유의하게 증가한 반면에, 항체 III 군에서는 그렇지 않음을 나타내었다 (표 9). 연구 2에서, 항체 III을 사용할 때 대조군 IgG 군에 비해 알부민뇨 진행의 용량 의존적 감소가 존재하였다 (표 9).

표 10

연구 2 - 알부민뇨 진행

나이(주령)	8	12	16	20	24	Wk 16-24 ACR 변화 (ug/mg)	Wk 16-24 ACR 변화 (%)
건강한 마른 군	nd	13 ± 0	15 ± 0	9 ± 0	9 ± 0	nd	nd
Db/db 대조군 IgG @ 30 mg/kg	358 ± 76 ^a	1325 ± 271 ^a	1621 ± 350 ^a	2219 ± 320 ^a	2397 ± 242 ^a	776 ± 379	48 ± 23
Db/db 항체 III @ 0.3 mg/kg	356 ± 60 ^a	1200 ± 213 ^a	2410 ± 393 ^a	2286 ± 416 ^a	2086 ± 394 ^a	-323 ± 279 ^b	-13 ± 12 ^b
Db/db 항체 III @ 3 mg/kg	367 ± 77 ^a	1122 ± 248 ^a	1670 ± 193 ^a	1427 ± 204 ^a	1544 ± 264 ^{ab}	-126 ± 208 ^b	-8 ± 12 ^b
Db/db 항체 III @ 10 mg/kg	326 ± 77 ^a	1107 ± 304 ^a	1659 ± 286 ^a	1202 ± 189 ^{ab}	1171 ± 252 ^{ab}	-489 ± 275 ^b	-29 ± 17 ^b
Db/db 항체 III @ 30 mg/kg	308 ± 68 ^a	1155 ± 179 ^a	1669 ± 223 ^a	1334 ± 237 ^a	950 ± 132 ^{ac}	-719 ± 230 ^b	-43 ± 14 ^b
산술 평균 ± SEM							
^a 건강한 마른 군에 비해 통계적으로 유의한 차이 (p<0.05)							
^b 대조군 IgG 군에 비해 통계적으로 유의한 차이 (p<0.05)							
^c 군 내의 제16주 시점에 비해 통계적으로 유의함 (p<0.05)							

[0132]

[0133]

연구 2의 마지막 2개월에 걸친 알부민뇨의 변화는 30 mg/kg 항체 III이 연구의 마지막 2개월에 걸쳐 알부민뇨의 유의한 감소를 유발한 반면에, 대조군 IgG는 동일한 시간에 걸쳐 알부민뇨를 증가시켰음을 보여주었다 (표 10).

표 11

HbA1c, 신장 중량, 뇨 TGF 알파 및 신장 병리상태 점수

종점	HbA1c (%)	신장 중량 (mgs)	Wk8 뇨 TGF 알파 (pg/mg)	Wk24 뇨 TGF 알파 (pg/mg)	병리상태 혈관간 기질 점수 (1-5)	병리상태 골반 팽창 점수 (1-5)
건강한 마른 군	4.1 ± 0.0	138 ± 4	nd	nd	0 ± 0	0 ± 0
Db/db 대조군 IgG @ 10 mg/kg	11.1 ± 0.3 ^a	396 ± 13 ^a	215 ± 17	199 ± 18	1.92 ± 0.08 ^a	1.67 ± 0.14 ^a
Db/db 항체 III @ 0.3 mg/kg	11.2 ± 0.4 ^a	375 ± 14 ^a	208 ± 17	145 ± 30 ^b	1.64 ± 0.15 ^a	0.45 ± 0.16 ^{ab}
Db/db 항체 III @ 10 mg/kg	10.7 ± 0.4 ^a	359 ± 12 ^{ab}	193 ± 16	3 ± 1 ^b	1.17 ± 0.11 ^{ab}	0.25 ± 0.13 ^{ab}
산술 평균 ± SEM						
^a 건강한 마른 군에 비해 통계적으로 유의한 차이 (p<0.05)						
^b 대조군 IgG 군에 비해 통계적으로 유의한 차이 (p<0.05)						

[0134]

[0135] 좌측 신장 중량은 10 mg/kg 대조군 IgG 및 0.3 mg/kg 항체 III 군에 비해 10 mg/kg 항체 III 군에서 유의하게 더 낮았다 (표 11). 항체 III 10 mg/kg 용량군에서 연구 과정에 걸쳐 노 TGF-알파의 유의한 감소가 존재하였다 (표 11). 추가로, 모든 처리군에서 % HbA1c는 대조군 마른 마우스보다 유의하게 상승하였다 (표 11). 항체 III 처리는 대조군 IgG 군에 비해 % HbA1c에 영향을 주지 않았다 (표 11). 추가로, 대조군 IgG에 비해 10 mg/kg의 항체 III 사용시에 혈관간 기질 팽창 및 골반 팽창에 대한 신장 병리상태 점수의 유의한 감소가 존재하였다 (표 11).

[0136] **실시에 7: 6주 동안 매주 정맥내 볼러스 주사가 실시된 시노플거스 원숭이에서 독성 및 독성역학적 연구**

[0137] TGF-알파 및 에피레굴린의 억제가 피부 독성을 일으키는지 평가하기 위해 6주 독성 연구를 원숭이에서 실시하였다. 원숭이에게 비히클, 10 또는 100 mg/kg의 항체 I를 6주 동안 매주 정맥내 주사 (IV)로 투여하였다. 주사 부위는 우측 및 좌측 복재 정맥 사이에서 번갈아 존재하였다. 먹이는 매일 2회 제공하였다 (아침에 1회 및 오후에 1회). 아침 먹이 공급량은 투여일에 투여 직후에 제공하였다. 칼슘이 풍부한 보충제 및 치료제는 연구 동안 주지 않았다. 아동용 멀티비타민을 토요일에 매주 1회 주었다 (적용가능한 경우, 투여 96시간 후의 혈액 수집 후에).

[0138] 원숭이를 연구 내내 "분할된 쌍 (divided pair)" 스테인레스 스틸 슬랫 (slat)/메쉬 (mesh) 케이지에 수용하였다. 처음 3주 동안, 동물을 한 마리씩 수용하였다. 나머지 연구 기간 동안, 사회화를 위한 추가의 기회를 제공하기 위해 각각 오후에 시작하여 다음날 아침까지 동물을 처리군 내에 한 쌍씩 수용하였다.

[0139] 본 연구에 대한 유해 효과가 관찰되지 않는 수준 ("NOAEL")은 100 mg/kg의 항체 I이었다. 처리된 동물에서 피부 변화는 관찰되지 않았다. 다른 병리상태 변화도 관찰되지 않았다.

[0140] **서열 목록**

중쇄 CDR

서열 1	GYTFTDAYIN
서열 2	WIWPGPVITYYNPKFKG
서열 3	REVLSPFAY

경쇄 CDR

서열 4	RSSQSIVHSTGNTYLE
서열 5	KVSNRFS
서열 6	FHGTHVPYT

중쇄 가변 영역

서열 7 (항체 I 및 항체 II)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFTDAYINWVRQAPGQGLEWMGWIW
PGPVITYYNPKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARREVLSPFAY
WGQGTTVTVSS

서열 8 (항체 III)

QVQLQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDAYINWVKQRPGQGLEWIGWIWPG
PVITYYNPKFKGKATLTVDKSSSTAYMLLSSLTSEDSAFYFCARREVLSPFAYWG
QGTLVTVSA

경쇄 가변 영역

서열 9 (항체 I)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSIVHSTGNTYLEWYQQKPGQPPKLLIYKV
SNRFGVPPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCFHGTHVPYTFGGGTKVEIK

[0141]

서열 10 (항체 II)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSIHSTGNTYLEWYQQKPGKAPKLLIYKV
SNRFGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFHGTHVPTYFGGGTKVEIK

서열 11 (항체 III)

DVLMQTPLSLPVSGLDQASISCRSSQSIHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV
SNRFGVPSRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFHGTHVPTYFGGGTKLEIK

완전 중쇄

서열 12 (항체 I 및 항체 II)

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFTDAYINWVRQAPGQGLEWMGWIW
PGPVITYYNPKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARREVLSPFAY
WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG
ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRV
SKYGPCCPCPEAAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQF
NWIYDGVVFNHAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
LPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYT
QKSLSLSLG

완전 경쇄

서열 13 (항체 I)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSIHSTGNTYLEWYQQKPGQPPKLLIYKV
SNRFGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCFHGTHVPTYFGGGTKVEIK
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDESTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

서열 14 (항체 II)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQSIHSTGNTYLEWYQQKPGKAPKLLIYKV
SNRFGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFHGTHVPTYFGGGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV
TEQDSKDESTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0142]

뉴클레오티드 서열
중쇄 가변 영역

서열 15

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCAG
TGAAGGTTTCCTGCAAGGCATCTGGCTACACCTTCACTGACGCGTATATAAAC
TGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGGATTTGGC
CTGGACCCGTTATTACTTACTACAATCCGAAGTTCAAGGGCAGAGTCACCATT
ACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGAT
CTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAAGGGAAGTACTATCCCCGTT
TGCTTACTGGGGCCAAGGAACCACGGTCACCGTCTCCTCA

뉴클레오티드 서열
경쇄 가변 영역

서열 16

GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAG
GGCCACCATCAACTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTACTGGAAAC
ACCTATTTAG AATGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCA
TTTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCTGACCGATTCACTGGCAGC
GGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATG
TGCCAGTTTATTACTGTTTTACGGCACTCATGTTCCGTACACGTTCCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

서열 17

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAG
AGTCACCATCACTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTACTGGAAAC
ACCTATTTAG AATGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCTAAGCTCCTGA
TCTATAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCATCAAGGTTCACTGGCAGT
GGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTT
TGCAACTTACTACTGTTTTACGGCACTCATGTTCCGTACACGTTCCGGCGGAG
GGACCAAGGTGGAGATCAAA

성숙 인간 TGF 알파

서열 18

VVSHFNDCPDSHTQFCFHGTCTRFLVQEDKPACVCHSGYVVGARCEHADLLA

[0143]

성숙 마우스 (무스 무스쿨루스) TGF 알파

서열 19

VVSHFNKCPDSHTQYCFHGTCRFLVQEEKPACVCHSGYVGVRCEHADLLA

성숙 래트 (라투스 노르베기쿠스 (Rattus norvegicus)) TGF 알파

서열 20

VVSHFNKCPDSHTQYCFHGTCRFLVQEEKPACVCHSGYVGVRCEHADLLA

성숙 시노 (마카카 파시쿨라리스 (Macaca fascicularis)) TGF 알파

서열 21

VVSHFNDCPSHTQFCFHGTCRFLVQEDKPACVCHSGYVGARCEHADLLA

성숙 인간 에피레굴린 - N-말단 메티오닌의 부가

서열 22

MVSITKCSSDMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFLL

성숙 마우스 (무스 무스쿨루스) 에피레굴린 - N-말단 메티오닌의 부가

서열 23

MVQITKCSSDMNGYCLHGQCIYLVDMREKFCRCEVGYTGRLRCEHFLL

성숙 시노 (마카카 파시쿨라리스) 에피레굴린

서열 24

VSITKCNDSMNGYCLHGQCIYLVDMSQNYCRCEVGYTGVRCEHFYL

[0144]

성숙 인간 에피제

서열 25

AVTVTPPITAQQADNIEGPIALKFSHLCLLEDHNSYCINGACAFHHELEKAICRCFT
GYTGERCEHLTLTSYA

성숙 마우스 (무스 무스쿨루스) 에피제

서열 26

LKFSHPCLEDHNSYCINGACAFHHELKQAICRCFTGYTGQRCEHLTLTSYA

성숙 인간 EGF - N-말단 메티오닌의 부가

서열 27

MNSDSECLSHDGYCLHDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWE
LR

성숙 인간 HBEGF

서열 28

DLQEADLDLLRVTLSSKPQALATPNKEEHGKRKKKGGKGLGKKRDPCLRKYKDF
CIHGECKYVKELRAPSCICHPGYHGERCHGLSL

성숙 인간 베타셀룰린

서열 29

DGNSTRSPETNGLLCGDPEENCAATTTQSKRKGHFSRCPKQYKHYCIKGRCRFV
VAEQTPSCVCEGYIGARCERVDLFY

성숙 인간 암피레굴린

서열 30

SVRVEQVVKPPQNKTESENTSDKPKRKKKGGKNGKNRRNRKKNPCNAEFQNF
CIHGECKYIEHLEAVTCKCQEQYFGERCGEKSMKTHSMIDSSLSK

완전 중쇄 항체 III - 마우스 항체

서열 31

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDAYINWVKQRPGGLEWIGWIWPG
PVITYYNPKFKGKATLTVDKSSSTAYMLLSSLTSEDSAFYFCARREVLSPFAYWG
QGTLVTVSAAKTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTVWNSGS
LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWVPSSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRD
CGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDD
VEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIS
KTKGRPKAPQVYTIPTPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENY
KNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQSWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSP
GK

완전 경쇄 항체 III - 마우스 항체

서열 32

DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIHSTGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV
SNRFGVDPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDLGVYYCFHGTHVPYTFGGGTGLEIK
RADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNS
WTDQDSKSDSTYSMSSTLTLTDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK

성숙 인간 에피레굴린

서열 33

VSITKCSSDMNGYCLHGQCIYLVDMSONYCRCEVGYTGVRCEHFFL

[0145]

[0146]

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company

<120> Antibodies that bind TGF-alpha and Epregrulin

<130> X18890

<150> 61/472338

<151> 2011-04-06

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Ala Tyr Ile Asn

1 5 10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

Trp Ile Trp Pro Gly Pro Val Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 3

Arg Glu Val Leu Ser Pro Phe Ala Tyr

1 5

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

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

1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 6

Phe His Gly Thr His Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 7

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

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

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

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 8

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

 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Leu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Phe Tyr Phe Cys

85 90 95
 Ala Arg Arg Glu Val Leu Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 9

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

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

Thr Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
 35 40 45

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

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

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

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 10

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

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

<210> 11

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 11

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

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe His Gly
 85 90 95
 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

<210> 13

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 13

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

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

180 185 190

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

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

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

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

<210> 15

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 15

caggtgcagc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc agtgaaggtt 60
 tcttgcagg catctggcta caccttcact gacgcgtata taaactgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atttggcctg gacccttat tacttactac 180
 aatccgaagt tcaagggcag agtcaccatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccctgt attactgtgc gagaagggaa 300
 gtactatccc cgtttgetta ctggggccaa ggaaccacgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 16

<211> 336

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 16

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca gatctagtca gagcattgta catagtactg gaaacaccta tttagaatgg 120
 taccagcaga aaccaggaca gcctcctaag ctgctcattt acaaagtttc caaccgattt 180
 tctggggtcc ctgaccgatt cagtggcagc gggctctggga cagatttcac tctcaccatc 240
 agcagcctgc aggctgaaga tgtggcagtt tattactgtt ttcacggcac tcatgttccg 300
 tacacgttcg gcggaggac caaggtggag atcaaa 336

<210> 17

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 17

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctct ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgca gatctagtc gagcattgta catagtactg gaaacaccta tttagaatgg      120
tatcagcaga aaccagggaa agcccctaag ctctgatct ataaagtttc caaccgattt      180
tctgggtcc catcaaggtt cagtggcagt ggatctggga cagatttcac tctcaccatc      240
agcagtctgc aacctgaaga ttttgcaact tactactgtt ttcacggcac tcatgttccg      300
tacacgttcg gcgaggagac caaggtggag atcaaa                                336
    
```

<210> 18

<211> 50

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

```

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

<210> 19

<211> 50

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

```

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


<220><223> Mature Human Epiregulin with addition of N-terminal methionine

<400> 22

Met Val Ser Ile Thr Lys Cys Ser Ser Asp Met Asn Gly Tyr Cys Leu

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

<210> 23

<211> 47

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mature Mouse (*Mus musculus*) Epiregulin with addition of
 N-terminal methionine

<400> 23

Met Val Gln Ile Thr Lys Cys Ser Ser Asp Met Asp Gly Tyr Cys Leu

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

<210> 24

<211> 46

<212> PRT

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 24

Val Ser Ile Thr Lys Cys Asn Ser Asp Met Asn Gly Tyr Cys Leu His

1 5 10 15

 Gly Gln Cys Ile Tyr Leu Val Asp Met Ser Gln Asn Tyr Cys Arg Cys
 20 25 30
 Glu Val Gly Tyr Thr Gly Val Arg Cys Glu His Phe Tyr Leu
 35 40 45

<210> 25

<211> 72

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

1 5 10 15

Glu Gly Pro Ile Ala Leu Lys Phe Ser His Leu Cys Leu Glu Asp His

20

25

30

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

35

40

45

Lys Ala Ile Cys Arg Cys Phe Thr Gly Tyr Thr Gly Glu Arg Cys Glu

50

55

60

His Leu Thr Leu Thr Ser Tyr Ala

65

70

<210> 26

<211> 51

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Leu Lys Phe Ser His Pro Cys Leu Glu Asp His Asn Ser Tyr Cys Ile

1

5

10

15

Asn Gly Ala Cys Ala Phe His His Glu Leu Lys Gln Ala Ile Cys Arg

20

25

30

Cys Phe Thr Gly Tyr Thr Gly Gln Arg Cys Glu His Leu Thr Leu Thr

35

40

45

Ser Tyr Ala

50

<210> 27

<211> 54

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mature Human EGF with addition of N-terminal methionine

<400> 27

Met Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu

1 5 10 15

His Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys

20 25 30

Asn Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu

35 40 45

Lys Trp Trp Glu Leu Arg

50

<210> 28

<211> 86

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

1 5 10 15

Lys Pro Gln Ala Leu Ala Thr Pro Asn Lys Glu Glu His Gly Lys Arg

20 25 30

Lys Lys Lys Gly Lys Gly Leu Gly Lys Lys Arg Asp Pro Cys Leu Arg

35 40 45

Lys Tyr Lys Asp Phe Cys Ile His Gly Glu Cys Lys Tyr Val Lys Glu

50 55 60

Leu Arg Ala Pro Ser Cys Ile Cys His Pro Gly Tyr His Gly Glu Arg

65 70 75 80

Cys His Gly Leu Ser Leu

85

<210> 29

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

1 5 10 15
 Asp Pro Glu Glu Asn Cys Ala Ala Thr Thr Thr Gln Ser Lys Arg Lys

 20 25 30
 Gly His Phe Ser Arg Cys Pro Lys Gln Tyr Lys His Tyr Cys Ile Lys

 35 40 45
 Gly Arg Cys Arg Phe Val Val Ala Glu Gln Thr Pro Ser Cys Val Cys

 50 55 60
 Asp Glu Gly Tyr Ile Gly Ala Arg Cys Glu Arg Val Asp Leu Phe Tyr

65 70 75 80

<210> 30

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

1 5 10 15

Ser Glu Asn Thr Ser Asp Lys Pro Lys Arg Lys Lys Lys Gly Gly Lys

 20 25 30

Asn Gly Lys Asn Arg Arg Asn Arg Lys Lys Lys Asn Pro Cys Asn Ala

 35 40 45

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

 50 55 60

Leu Glu Ala Val Thr Cys Lys Cys Gln Gln Glu Tyr Phe Gly Glu Arg

65 70 75 80

Cys Gly Glu Lys Ser Met Lys Thr His Ser Met Ile Asp Ser Ser Leu

 85 90 95

Ser Lys

<210> 31

<211> 442

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 31

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

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

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

Gly Trp Ile Trp Pro Gly Pro Val Ile Thr Tyr Tyr Asn Pro Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

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

Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
145 150 155 160

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

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr
 180 185 190

Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro
 210 215 220

Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

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

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

 Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe
 355 360 365
 Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu
 370 375 380
 Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe
 385 390 395 400
 Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn
 405 410 415

 Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
 420 425 430
 Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

 <210> 32
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Construct

<400> 32

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

 145 150 155 160
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190
 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 33

<211> 46

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Val Ser Ile Thr Lys Cys Ser Ser Asp Met Asn Gly Tyr Cys Leu His

1 5 10 15

Gly Gln Cys Ile Tyr Leu Val Asp Met Ser Gln Asn Tyr Cys Arg Cys

 20 25 30

Glu Val Gly Tyr Thr Gly Val Arg Cys Glu His Phe Phe Leu

 35 40 45