(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0099321
(43) 공개일자 2024년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) *A61P 25/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/70578 (2013.01)
A61P 25/04 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7016826
(22) 출원일자(국제) 2022년10월21일
심사청구일자 2024년05월21일
(85) 번역문제출일자 2024년05월21일
(86) 국제출원번호 PCT/GB2022/052692
(87) 국제공개번호 WO 2023/067358
국제공개일자 2023년04월27일
(30) 우선권주장
2115098.2 2021년10월21일 영국(GB)
17/506,876 2021년10월21일 미국(US)

(71) 출원인
펫메딕스 리미티드
영국 씨비22 3에프에이치 캠브릿지셔 캠브릿지 바브라함 바브라함 리서치 캠퍼스 빌딩 940 더 글렌 버지 빌딩
(72) 발명자
리, 멍 에이미
영국 씨비22 3에프에이치 캠브릿지셔 캠브릿지 바브라함 바브라함 리서치 캠퍼스 빌딩 940 더 글렌 버지 빌딩
바르델리, 마르코
영국 씨비22 3에프에이치 캠브릿지셔 캠브릿지 바브라함 바브라함 리서치 캠퍼스 빌딩 940 더 글렌 버지 빌딩
(74) 대리인
양영준, 이윤기

전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 **P75NTR의 세포외 도메인을 포함하는 단백질**

(57) 요 약

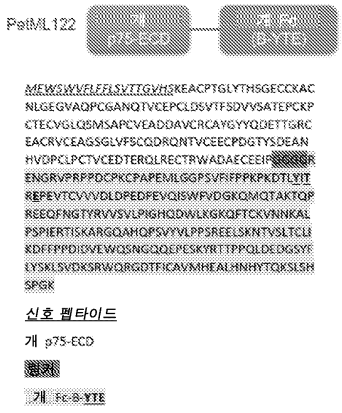
본 발명은 반려 동물의 효과적인 통증 요법에 관한 것이다. 특히, 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이를 포함하는 융합 단백질 또는 이의 일부가 고려된다. 단백질을 인코딩하는 핵산은 또한 본 발명뿐만 아니라 이를 사용하는 방법에도 포괄된다.

대 표 도 - 도1

도 1a



도 1b



(52) CPC특허분류
C07K 2319/30 (2013.01)
C07K 2319/32 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부.

청구항 2

제1항에 있어서, 반려 동물은 고양이, 개, 돼지, 소 또는 말인, 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부.

청구항 3

제2항에 있어서, 반려 동물은 개인, 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부.

청구항 4

제2항에 있어서, 반려 동물은 고양이인, 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부.

청구항 5

제3항에 있어서, 서열번호 1을 포함하는, 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부.

청구항 6

제4항에 있어서, 서열번호 3을 포함하는, 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, p75NTR 단백질 또는 이의 일부는 세포외 도메인 또는 이의 일부를 포함하는, 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부.

청구항 8

제7항에 있어서, 반려 동물은 개이고, p75NTR 세포외 도메인은 서열번호 7을 포함하는, 단리된 반려 동물 p75NTR 세포외 도메인.

청구항 9

제7항에 있어서, 반려 동물은 고양이이고, p75NTR 세포외 도메인은 서열번호 38을 포함하는, 단리된 반려 동물 p75NTR 세포외 도메인.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부를 인코딩하는 단리된 핵산.

청구항 11

제10항에 있어서, 반려 동물은 개이고, 핵산은 서열번호 2를 포함하는, 단리된 핵산.

청구항 12

제10항에 있어서, 반려 동물은 고양이이고, 핵산은 서열번호 4를 포함하는, 단리된 핵산.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 14

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 따른 핵산 또는 제13항에 따른 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 15

단리된 반려 동물 p75NTR 세포외 도메인 또는 이의 일부 및 반감기 연장 모이어티를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 16

제15항에 있어서, 반감기 연장 모이어티는 Fc 도메인, 혈청 알부민 결합제 또는 PEG로부터 선택되는, 융합 단백질.

청구항 17

제16항에 있어서, 반감기 연장 모이어티는 야생형 또는 돌연변이 Fc 도메인인, 융합 단백질.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 반감기 연장 모이어티는 Fc 도메인이고, p75NTR 세포외 도메인 또는 이의 일부 및 Fc 도메인은 링커로 연결되는, 융합 단백질.

청구항 19

제18항에 있어서, 링커는 펩타이드 링커인, 융합 단백질.

청구항 20

제19항에 있어서, 펩타이드 링커는 $(G_4S)_n$이고, 여기서 n은 1 내지 4인, 융합 단백질.

청구항 21

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 반려 동물은 고양이, 개 또는 말인, 융합 단백질.

청구항 22

제21항에 있어서, 반려 동물은 개인, 융합 단백질.

청구항 23

제22항에 있어서, p75NTR 세포외 도메인은 서열번호 7 또는 이의 일부 예컨대 서열번호 34를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 24

제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, Fc 도메인은 개과 Fc 도메인인, 융합 단백질.

청구항 25

제24항에 있어서, 서열번호 11 또는 13을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 26

제21항에 있어서, 반려 동물은 고양이인, 융합 단백질.

청구항 27

제26항에 있어서, p75NTR 세포외 도메인은 서열번호 38을 포함하는, 융합 단백질.

청구항 28

제27항에 있어서, 서열번호 39를 포함하는, 융합 단백질.

청구항 29

제15항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 인코딩하는, 핵산.

청구항 30

제29항에 따른 핵산을 포함하는, 벡터.

청구항 31

제29항에 따른 핵산 또는 제30항에 따른 벡터를 포함하는, 숙주 세포.

청구항 32

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질, 또는 제15항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 33

반려 동물의 NGF 관련 장애를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질, 제15항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질 또는 제32항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 34

반려 동물의 NGF 관련 장애의 치료에서의, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질, 제15항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질 또는 제32항의 약제학적 조성물의 용도.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, NGF 관련 장애는 심혈관 질환, 죽상동맥경화증, 비만, 2형 당뇨병, 대사 증후군, 통증 및 염증인, 방법 또는 용도.

청구항 36

제35항에 있어서, NGF 관련 장애는 통증 관련 장애인, 방법 또는 용도.

청구항 37

제36항에 있어서, 통증은 골관절염 통증, 류마티스성 관절염 통증, 수술 및 수술후 통증, 절개 통증, 전신 염증성 통증, 암 통증, 외상으로 인한 통증, 신경병증 통증, 신경통, 당뇨병성 신경병증 통증, 류마티스성 질환과 연관된 통증, 근골격 질환과 연관된 통증, 내장 통증, 및 위장 통증으로부터 선택되는, 방법 또는 용도.

청구항 38

반려 동물의 NGF 활성을 억제하는 방법으로서, 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질, 제15항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질 또는 제32항의 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 39

제36항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 통증을 치료하는 제2 화합물의 투여를 포함하는, 방법 또는 용도.

청구항 40

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질, 제15항 내지 제28항 중 어느 한 항에 따른 융합 단백질 또는 제32항의 약제학적 조성물 및 선택적으로 사용 지침을 포함하는, 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원 및 참조에 의한 포함**

[0002] 본원에 인용하거나 언급한 모든 문헌("본원에서 인용 문서") 및 본원에 인용된 문헌에서 언급되거나 참조된 모든 문헌은, 본원에 언급된 임의의 생성물 또는 본원에 참조로 포함된 임의의 문헌에 대한 임의의 제조자의 지시, 설명, 제품 사양 및 제품 시트와 함께 본원에 참조로 포함되고, 본 발명의 실시에 사용될 수 있다. 보다 구체적으로, 모든 참조 문서는 각 개별 문서가 참조로 포함되도록 구체적이고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 참조로 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 반려 동물의 효과적인 통증 요법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] **도입**

[0006] 특히 통증 완화를 위한 수의과 의약의 요법에 대한 수요가 크다.

[0007] 개를 위한 통증 완화 치료법은 현재 일반적으로 NSAID라고 불리는 비스테로이드성 항-염증성 약물과 골관절염과 연관된 통증 및 염증을 제어하는 데 도움이 되는 여러 가지 비스테로이드성 항-염증성 약물을 포함한다. 여러 NSAID가 FDA의 승인을 받았다. 그러나 부작용을 최소화하면서 반려 동물의 더욱 효과적인 통증 치료가 필요하다.

[0008] 신경 성장 인자(NGF)는 1950년대에 처음 발견되었다. 그 다음 NGF 단백질을 클로닝하여 뇌 유래 신경영양 인자(BDNF), 뉴로트로핀-3 및 4/5 (NT-3, NT-4-5)의 일부로 식별하였다. 이들 모두는 말초 신경계의 생존과 성장을 촉진하는 분비 단백질이다.

[0009] NGF는 온도나 캡사이신 존재 시 DRG 뉴런의 반응 증가로 예시되는 것처럼 시험관 내 및 생체 내에서 말초 감작을 유발한다. NGF는 또한 척수강 내 NGF 치료 후 BDNF의 상향 조절을 보여주는 면역염색에 의해 예시되는 것처럼 역행성 축삭 수송 후 전사 조절을 유도한다. 더욱이, NGF는 말초 구심성 신경이 병든 관절 및 암성 조직으로 생기게 할 수 있다(Denk 등, Annual Review of Neuroscience, Vol. 40:307-325, 2017).

[0010] NGF는 성인기에 낮은 수준으로 발현되지만 손상, 염증 또는 NGF의 방출은 염증 세포의 활성화를 유발한다. 이들 세포는 차례로 NGF를 생산하고 분비하며 이는 단기 및 장기 효과로 이어진다. NGF는 통각수용 과정에서 잘 알려져 있고 다기능적인 역할을 하지만, 통각을 중재하는 NGF 수용체 활성화 하류의 정확한 신호전달 경로는 복잡하고 완전히 이해되지 않는다. 통각과 만성 통증의 생성 및/또는 유지에서 NGF의 역할은 만성 통증 상태 치료를 위한 통증 치료제의 매력적인 표적이 되도록 하였다(Barker 등, Journal of Pain Research, 2020:13 1223-1241).

[0011] NGF에 대한 매우 낮은 용량의 단클론 항체(mAb)는 만성 통증을 줄일 수 있다. 그러나 인간을 대상으로 한 임상 동안, NGF에 대한 mAb로 치료된 환자의 작은 하위 세트에서 NSAID 치료와의 상호작용으로 인해 빠르게 진행되는 관절 퇴행이 발생하였다. 완전한 NGF 제거는 손상된 뼈와 연골 복구를 유발하는 것으로 나타났다(Denk 등, Annual Review of Neuroscience, Vol. 40:307-325, 2017). NGF를 표적으로 하는 종 특이적 mAb를 기반으로 한 개와 고양이에 사용하기 위한 치료법이 현재 골관절염(OA) 연련 통증 관리를 위해 개발되고 있다(Enomoto 등, Vet Rec. 2019년 1월 5일;184(1):23 및 WO2019177690). 그러나 인간의 임상 시험에서 나타난 부작용을 고려할 때, NGF를 표적으로 하는 대체 치료법의 개발이 필요하다.

[0012] 본 출원에서 어떤 문서의 인용이나 식별은 그러한 문서가 본 발명에 대한 선행 기술로 이용 가능하다는 것을 인정하는 것이 아니다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0013] **발명의 요약**

[0014] 본 발명은 반려 동물의 효과적인 통증 요법에 대한 필요성을 다룬다.

[0015] 본 발명은 항-NGF 항체 요법에 비해 부작용이 감소된 반려 동물용 통증 요법을 제공한다. 본 발명의 단백질은 통증 상태에서 상승된 수준의 NGF와 결합하므로, 과도한 NGF에 결합하여 NGF 신호전달을 완전히 차단하지 않고 정상적인 NGF 수준을 회복한다. 이론에 구애됨이 없이, 본 발명자들은 이것이 건강한 기능에 필요한 NGF 신호전달 수준을 보장하는 것으로 믿는다. 더욱이, 본 발명의 융합 단백질은 매우 낮은 용량에서도 작동할 수 있지만 매우 효과적인 것으로 여겨진다.

[0016] 본 발명자들은 순환 중인 NGF를 완전히 고갈시키지는 않지만 감소시키기 위해 진통 전략을 사용하였다. 이를 위해, p75 뉴로트로핀 수용체(p75NTR)의 세포외 도메인(ECD)을 사용하고 Fc에 융합시켜 반감기를 늘렸다. p75NTR은 NGF 및 다른 뇌 유래 신경영양 인자(NT3, NT4)와 결합하고 상이한 세포 활동을 중재한다.

[0017] 인간 p75의 사용은 인간의 통증 치료를 위해 기재되었다(WO2013136078).

[0018] 따라서, 제1 양태에서, 본 발명은 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부에 관한 것이다. 본 발명은 또한 단백질 또는 이의 일부를 인코딩하는 단리된 핵산에 관한 것이다.

[0019] 본 발명은 또한 상기에 기재된 바와 같은 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0020] 본 발명은 또한 상기에 기재된 바와 같은 핵산을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0021] 또 다른 양태에서, 본 발명은 단리된 반려 동물 p75NTR 세포외 도메인 또는 이의 일부 및 반감기 연장 모이어티을 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다.

[0022] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기에 기재된 바와 같은 융합 단백질을 인코딩하는 핵산에 관한 것이다.

[0023] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기에 기재된 바와 같은 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0024] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기에 기재된 바와 같은 핵산 또는 상기에 기재된 바와 같은 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0025] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 및 본원에 기재된 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질, 또는 상기 및 본원에 기재된 융합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0026] 또 다른 양태에서, 본 발명은 반려 동물에서 NGF 관련 장애를 치료하는 방법에 관한 것이고, 방법은 상기에 기재된 바와 같은 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질, 상기 및 본원에 기재된 융합 단백질 또는 상기 및 본원에 기재된 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0027] 또 다른 양태에서, 본 발명은 반려 동물의 NGF 관련 장애 치료에서 상기에 기재된 바와 같은 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질, 상기에 기재된 바와 같은 융합 단백질 또는 상기 및 본원에 기재된 약제학적 조성물의 용도에 관한 것이다.

[0028] 또 다른 양태에서, 본 발명은 반려 동물에서 NGF 활성을 억제하는 방법에 관한 것이고, 방법은 상기에 기재된 바와 같은 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질, 상기 및 본원에 기재된 융합 단백질 또는 상기 및 본원에 기재된 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0029] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기에 기재된 바와 같은 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질, 상기에 기재된 바와 같은 융합 단백질 또는 상기에 기재된 바와 같은 약제학적 조성물 및 선택적으로 사용 지침을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0030] 따라서, 본 발명의 목적은 이전에 알려진 생성물, 생성물을 제조하는 공정 또는 생성물을 사용하는 방법을 본 발명 내에 포함하지 않고 따라서 출원인이 권리를 보유하고 이에 따라 임의의 이전에 알려진 생성물, 공정, 또는 방법에 대한 면책 조항을 개시하도록 하는 것이다. 본 발명은 USPTO(35 U.S.C. §112, 첫 번째 단락) 또는 EPO(EPC 제83조)의 서면 설명 및 실행 요건을 충족하지 않는 임의의 생성물, 공정, 또는 생성물을 제조하는 공정 또는 생성물을 사용하는 방법을 본 발명의 범위 내에 포함하려는 의도가 없다는 점에 더 주목해야 하고, 따라서 출원인이 권리를 보유하고 이에 따라 임의의 이전에 알려진 생성물, 생성물을 제조하는 공정, 또는 생성물을 사용하는 방법에 대한 면책 조항을 개시하도록 하는 것이다. Art. 53(c) EPC 및 Rule 28(b) 및 (c) EPC를 준수하는 것이 본 발명의 실시에 있어서 유리할 수 있다. 이 출원의 계통에서 또는 임의의 다른 계통에서 또는 임의의 제3자가 이전에 제출한 출원에서 출원인에게 부여된 특허(들)의 대상이 되는 임의의 구현예를 명시적으로 부인할 수 있는 모든 권리는 명시적으로 보유된다. 본원의 어떤 내용도 약속으로 해석되어서는 안 된다.

[0031] 본 개시내용, 특히 청구범위 및/또는 단락에서 "포함하다(comprise)", "포함된", "포함하는" 등과 같은 용어는 미국 특허법에서 부여된 의미를 가질 수 있고; 예를 들어, "포함하다(include)", "포함된", "포함하는" 등을 의미할 수 있고; 그리고 "본질적으로 구성되는" 및 "본질적으로 구성되는"과 같은 용어는 미국 특허법에서 부여된 의미를 갖고, 예를 들어, 명시적으로 언급되지 않은 요소를 허용하지만, 선행 기술에서 발견되거나 본 발명의 기본적이거나 새로운 특성에 영향을 미치는 요소는 제외하는 것에 주목한다.

[0032] 이들 및 다른 구현예는 다음의 상세한 설명에 개시되거나 명백하고 이에 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0033] 본 발명은 다음의 비제한적인 도면에 기재되어 있다.

도 1. 예시적인 융합 단백질 (a) PetML119 및 (b) PetML122.

도 2. a) 본 발명의 융합 단백질에 사용된 p75NTR의 ECD 부분의 서열 정렬. 종들 사이에는 매우 높은 유사성이 있다:

개과(canine) 대 고양이과(feline): 1/164(99% 초과 동일);

개과 대 말과(equine): 4/164(97.6% 동일);

고양이과 대 말과: 5/164(97% 동일);

개과 대 소과(bovine): 2/164 (98.8% 동일)

b) 상이한 종/상이한 이소형으로부터의 Fc 영역(CH3, CH2 및 CH2-CH1 힌지 포함)의 서열 정렬.

도 3. 단리된 융합 단백질의 순도. a) H-SEC b) H-SCX. PetML119는 분석적 크기 배제 크로마토그래피에 따르면 매우 순도가 높은 것으로 보인다. b) 양이온 교환 크로마토그래피는 한 가지 주요 종(~80%) 및 두 가지 작은 전하 변이체의 존재를 보였다.

도 4. PetML119 안정성.

a) Tonset 분석.

b) 열적 및 화학적 스트레스.

c) 냉동 및 해동 스트레스.

d) 열 안정성.

e) 집계 분석.

도 5. 단백질 A 결합.

a) 및 b) PetML119 단백질 A 결합.

c) 및 d) PetML122 단백질 A 결합.

e) 베딘베트맙 단백질 A 결합. 베딘베트맙은 항-NGF IgG 대조군이다.

f) 동역학을 보여주는 표.

도 6. PetML119/122 개과 및 쥣과 FcRN 결합.

a) 개과 FcRN 결합 PetML119.

b) 쥣과 FcRN 결합 PetML119.

c) 개과 및 쥣과 결합 FcRN의 친화도 표.

d) 개과 FcRN 결합 PetML122.

e) 쥣과 FcRN 결합 PetML122.

f) 개 및 쥣과 FcRN 결합의 친화도 표.

도 7. NGF 결합.

a) 인간 NGF에 대한 PetML119 결합.

b) 랫트 NGF에 대한 PetML119.

c) 동역학 친화도 표.

d) 인간 NGF에 대한 베딘베트맙 결합.

e) 동역학 친화도 표.

도 8. TF-1 세포 증식 검정. 2.5uM 30' RT에서 CFSE 세포 트레이스(trace)으로 표지된 TF-1. 96웰 플레이트에 TF-1을 104개 세포/웰로 시딩하였다. 양성 대조군: RPMI 배지의 TF-1 세포 + 10% FBS + 10ng/mL hNGF 3 시점(t 2시간, t 4일 및 t 7일).

a) NGF의 활성: 2ng/mL EC50.

b) TF-1 세포 증식 검정 판독값.

c) PetML119, PetML122 및 베딘베트맙을 사용하여 판독한 TF-1 세포 증식 검정.

도 9. 생체 내 모델.

도 10. 생체 내 진통 효과.

a) IV 치료 후 2시간.

b) IV 치료 후 3일.

c) IV 치료 후 11일.

d) IV 치료 후 18일.

도 11. 관절 직경 및 체중.

a) 관절 직경 분석.

b) 체중 분석.

도 12. pk 분석 - 반감기.

a) 랫트 혈청의 PetML119에 대한 표준 곡선.

b) 랫트 혈청의 PetML122에 대한 표준 곡선.

c-f) 랫트 연구 pK 결과. 상이한 농도에서 PetML119의 계산된 반감기는 56 내지 70시간이다.

도 13. 개에서의 PetML119/PetML122의 안전성 분석.

a) 체중. 상단 표의 상단 행은 그룹 1의 개별 동물을 표시하고 상단 표의 하단 행은 그룹 2의 개별 동물을 표시한다. 그룹 1의 동물은 PetML119로 처리되었고, 그룹 2의 동물은 PetML122로 처리되었다(표 3 참조). 하단 표에는 평균값이 표시된다.

b) 항-약물 항체(ADA) 분석. 상단 패널 PetML119, 하단 패널 PetML120.

도 14. a 내지 d 개에서의 PetML119/PetML122의 효능 분석.

PetML119/PetML122의 힘판 분석 및 시각적 파행 분석.

도 15. pk 분석 - 개의 반감기.

상단 (a)는 혈청을 사용한 650nm 및 450nm에서의 종점 흡광도를 보여준다. 하단 (b)는 PetML119/PetML122의 반감기를 추정하기 위한 단상 감쇠 피팅을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] **상세한 설명**

[0035] 이제 본 발명을 추가로 기재할 것이다. 다음의 단락에서, 본 발명의 상이한 양태를 더 상세히 정의한다. 이렇게 정의된 각 양태는 반대로 명확하게 지시되지 않는 한 임의의 다른 양태 또는 양태들과 조합될 수 있다. 특히, 바람직하거나 유리한 것으로 나타낸 바와 같은 임의의 특징은 바람직하거나 유리한 것으로 나타낸 바와 같은 임의의 다른 특징 또는 특징들과 조합될 수 있다.

[0036] 일반적으로, 본원에 기재된 세포 및 조직 배양, 병리학, 종양학, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학, 및 혼성화와 관련하여 사용된 명명법 및 그 기술은 당업계에 잘 알려져 있고 일반적으로 사용되는 것들이다. 본 개시내용의 방법 및 기술은 달리 지시되지 않는 한, 본 명세서 전반에 걸쳐 인용 및 논의되는 다양한 일반적이고 보다 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같이 당업계에 널리 공지된 통상적인 방법에 따라 일반적으로 수행된다. 예를 들어, 문헌[Green 및 Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012); Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic, Zhiqiang An (Editor), Wiley, (2009); 및 Antibody Engineering, 2nd Ed., Vols. 1 및 2, Ontermann 및 Duebel, eds., Springer-Verlag, Heidelberg (2010)] 참조.

[0037] 효소적 반응 및 정제 기술은 당업계에서 일반적으로 달성되거나 본 명세서에 기재된 바와 같이 제조자의 사양에 따라 수행된다. 특별한 정의가 제공되지 않는 한, 본원에 기재된 분석 화학, 합성 유기 화학, 의약 및 약제학적 화학과 관련하여 사용되는 명명법, 실험실 절차 및 기술은 당업계에 잘 알려져 있고 일반적으로 사용되는 것들이다. 화학적 합성, 화학적 분석, 약제학적 제제, 제형 및 전달, 및 환자의 치료에는 표준 기술이 사용된다.

[0038] 본 발명은 수의적 용도를 위한 생물학적 치료제, 특히 개, 고양이, 소 또는 말과 같은 반려 동물의 치료에 사용하기 위한 융합 단백질을 제공한다.

[0039] 제1 양태에서, 본 발명은 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부에 관한 것이다.

[0040] 본원에서 사용된 바와 같이, p75NTR 단백질이라는 용어는 NGF 및/또는 다른 뉴로트로핀(BDNF, NT-3 및/또는 NT-4/5)과 결합하는 p75NTR 단백질을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 이는 단백질이 NGF에 결합할 수 있고 NGF 생물학적 활성 및/또는 NGF 신호전달에 의해 매개되는 하류 경로(들)를 억제할 수 있음을 의미한다. NGF 결합 단백질은 NGF 신호전달에 의해 매개되는 하류 경로를 포함하여 NGF 생물학적 활성을 감소시키고/시키거나 순환 중이며 수용체 trkA 및 NGFR(p75NTR)에 결합할 수 있는 NGF의 양을 감소시킨다.

[0041] 본원에 사용되는 반려 동물이라는 용어는 개, 고양이 또는 말을 지칭한다. 일 구현예에서, 반려 동물은 개이다. 다른 구현예에서, 치료될 동물은 소 또는 돼지일 수 있다.

[0042] "단리된" 단백질 또는 폴리펩타이드라는 용어는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 단백질 또는 폴리펩타이드가 실질적으로 없는 단백질 또는 폴리펩타이드를 지칭한다. 더욱이, 단백질 또는 폴리펩타이드에는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 단백질, 핵산 및 폴리펩타이드는 바람직하게는 단리된다. 따라서, 본원에 사용된 "단리된" 단백질 또는 폴리펩타이드는 천연 세포 배양 환경의 성분으로부터 식별되고 분리되고/되거나 회수된 단백질 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 자연 환경의 오염 성분은 단백질이나 폴리펩타이드의 진단 또는 치료 용도를 방해하고, 효소, 호르몬, 다른 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있는 물질이다.

[0043] 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 폴리머를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용되며, 최소 길이로 제한되지는 않는다. 펩타이드, 올리고펩타이드, 이량체, 다량체 등도 펩타이드 결합으로 연결된 선형으로 배열된 아미노산으로 구성되며, 생물학적으로든, 재조합으로든, 또는 합성으로든 생산되거나 자연 발생 또는 비천연 발생 아미노산으로 구성되는지 여부가 이 정의 내에서 포함된다. 전장 단백질과 이의 단편 모두가 정의에 의해 포괄된다. 이 용어는 또한 예를 들어 이황화 결합 형성, 글리코실화, 아세틸화, 인산화, 단백질분해 절단(예를 들어, 퓨린 또는 메탈로프로테아제 및 전구호르몬 전환효소 (PC)에 의한 절단)과 같은 폴리펩타이드의 번역 동시 및 번역 후 변형을 포함한다. 더욱이, 본 발명의 목적을 위해, "폴리펩타이드"는 단백질이 원하는 활성을 유지하는 한 천연 서열에 대한 결실, 첨가 및 치환(일반적으로 당업자에게 공지된 바와 같이 자연적으로 보존적임)과 같은 변형을 포함하는 단백질을 포괄한다. 이러한 변형은 부위 지정 돌연변이유발과 같이 의도적일 수도 있고 단백질을 생산하는 숙주의 돌연변이나 PCR 증폭 또는 다른 재조합 DNA 방법으로 인한 오류와 같이 우발적일 수도 있다. 폴리펩타이드 또는 단백질은 펩타이드 결합으로 연결된 선형으로 배열된 아미노산으로 구성되지만, 펩타이드와 달리 잘 정의된 형태를 가지고 있다.

[0044] 단백질은 펩타이드와 달리 일반적으로 50개 이상의 아미노산 사슬로 이루어진다. 본 발명의 목적을 위해, 본원에 사용된 용어 "펩타이드"는 전형적으로 D- 또는 L-아미노산의 단일 사슬 또는 펩타이드 결합에 의해 결합된

D- 및 L-아미노산의 혼합물로 구성된 아미노산 서열을 지칭한다. 일반적으로, 펩타이드는 적어도 2개의 아미노산 잔기를 함유하고 길이는 약 50개 미만의 아미노산이다.

[0045] 본원에서 "아미노산"이란 20개의 자연 발생 아미노산 중 하나 또는 특정하고 정의된 위치에 존재할 수 있는 임의의 비-천연 유사체를 의미한다. 아미노산은 자연 발생 및 합성 아미노산 모두 포괄한다. 대부분의 경우, 단백질을 재조합적으로 생산할 때는 자연적으로 발생하는 아미노산만 사용된다.

[0046] 일 구현예에서, 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질은 개과, 고양이과 또는 소과 p75NTR 단백질 또는 이의 일부 또는 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다. 따라서, 일 구현예에서, 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질은 서열번호 1, 3, 5 또는 36, 이의 일부 또는 변이체, 또는 일부의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0047] p75 뉴로트로핀 수용체 p75NTR은 천연 형태로 막관통 당단백질로 존재한다. 계열 구성원은 리간드 결합을 위한 다중 시스테인이 풍부한 도메인, 단일 막관통 서열 세포외 도메인(ECD) 및 비촉매 세포질 도메인을 특징으로 한다.

[0048] p75NTR의 내인성 용해성 ECD는 ECD의 막 접합부 근처에서 단백질을 절단하는 α-세크레타제 및 γ-세크레타제에 의한 조절된 단백질분해에 의해 생산된다. 이는 절단으로 인해 NGF 신호전달에 대한 천연 대항제로서 NGF에 자유롭게 결합하는 세포질 도메인이 방출된다.

[0049] 일 구현예에서, 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부는 세포외 도메인(ECD) 또는 이의 일부 또는 이의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다. 일 구현예에서, 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부는 세포외 도메인(ECD)을 포함하거나 이로 이루어진다. 일 구현예에서, 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부는 세포외 도메인(ECD) 및 ECD에 인접한 반려 동물 p75NTR 단백질의 추가적인 C-말단 아미노산을 포함한다. 예를 들어, 반려 동물 p75NTR 단백질의 일부는 ECD 및 적어도 1 내지 5 또는 5 내지 10개의 아미노산, 예를 들어 ECD에 인접한 반려 동물 p75NTR 단백질의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 C-말단 아미노산; 또는 ECD 및 ECD에 인접한 반려 동물 p75NTR 단백질의 적어도 10 내지 20개의 아미노산, 또는 ECD 및 적어도 20 내지 30개의 아미노산, 또는 ECD 및 적어도 30 내지 40개의 아미노산, 또는 ECD 및 적어도 40 내지 50개의 아미노산, 또는 ECD 및 적어도 50 내지 60개의 아미노산, 또는 ECD 및 적어도 60 내지 70개의 아미노산, 또는 ECD 및 적어도 70 내지 80개의 아미노산, 또는 ECD 및 적어도 80 내지 90개의 아미노산, 또는 ECD 및 적어도 90 내지 100개의 아미노산, 또는 ECD 및 적어도 100 내지 110개의 아미노산, 또는 ECD 및 적어도 110 내지 120개의 아미노산, 또는 ECD 및 적어도 120 내지 130개의 아미노산, 또는 ECD 및 적어도 130 내지 140개의 아미노산, 또는 ECD 및 적어도 140 내지 150개의 아미노산, 또는 ECD 및 적어도 150 내지 160개의 아미노산, 또는 ECD 및 적어도 160 내지 170개의 아미노산 또는 ECD 및 적어도 170 내지 180개의 아미노산 C-말단 아미노산을 포함할 수 있다.

[0050] 일 구현예에서, ECD 내의 α-세크레타제 및 γ-세크레타제 절단 부위가 제거된다. 일 구현예에서, 줄기 영역이 제거된다. 일 구현예에서, ECD 내의 줄기 영역과 α-세크레타제 및 γ-세크레타제 절단 부위가 제거된다.

[0051] 일 구현예에서, 단리된 반려 동물 p75NTR 세포외 도메인은 개과이고 서열번호 7 또는 이의 변이체 또는 이의 일부, 예를 들어 서열번호 34를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0052] 다른 구현예에서, 단리된 반려 동물 p75NTR 세포외 도메인은 고양이과이고 서열번호 38 또는 이의 변이체 또는 이의 일부를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0053] p75NTR의 ECD는 O-글리코실화가 발생하기 쉬운 줄기 영역(예를 들어 서열번호 9, 개과 줄기 영역)을 가지고 있다. 단백질의 글리코실화는 제조에 어려움을 초래할 수 있다. 따라서, 일 구현예에서, 단리된 반려 동물 ECD는 줄기 영역 내의 결실을 포함하여 줄기 영역 내의 O-글리코실화 부위의 수를 감소시켜 예를 들어 말단절단된 줄기 영역을 형성할 수 있다. 말단 절단된 줄기 영역은 줄기 영역의 임의의 수의 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 줄기 영역은 1 내지 10, 1 내지 20, 1 내지 30개의 아미노산을 포함할 수 있다. 줄기 영역은 본원에 기재된 융합 단백질의 구현예에서 제거될 수 있다. 따라서, 본원에 사용된 ECD의 일부는 줄기 영역 및 3' 서열 α-세크레타제 및 γ-세크레타제 절단 부위(예를 들어 개과 서열 서열번호 34)가 없는 ECD일 수 있다.

[0054] 따라서, 일 구현예에서, 단리된 반려 동물 p75NTR은 O-글리코실화 줄기 영역이 제거된 말단절단된 단백질이다.

[0055] 일 구현예에서, 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질은 야생형 단백질과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 야생형 단백질의 변이체일 수 있다. 변형은 아미노산의 치환, 결실 또는 첨가일 수 있다.

[0056] 본원에서 "변이체" 또는 "돌연변이체"이란 적어도 하나의 아미노산 변형으로 인해 야생형 서열과 다른 폴리펩타이드 서열을 의미한다. 본원에 기재된 바와 같은 단백질 또는 폴리펩타이드의 아미노산 서열에서 "아미노산 잔

기의 또 다른 아미노산 잔기로의 치환"은 "아미노산 잔기를 또 다른 아미노산 잔기로 교체하는 것"과 동일하며, 원래(예를 들어 야생형/생식계열) 아미노산 서열의 특정 위치에 있는 특정 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 잔기로 교체(또는 대체)되었음을 나타낸다. 이는 당업자가 이용할 수 있는 표준 기술, 예를 들어 재조합 DNA 기술을 사용하여 수행될 수 있다. 아미노산은 야생형(wt)에서 자연에서 발견되는 천연(야생형/생식계열) 서열에 비해 변화되지만, 천연 서열에 비해 다른 변화를 함유하는 IgG 분자에서 만들어질 수도 있다.

[0057] 본원에 사용된 p75NTR 단백질의 변이체 또는 이의 일부는 NGF에 결합하는 야생형 단백질의 생물학적 기능을 유지한다.

[0058] 일반적으로 아미노산 변형은 치환, 삽입 및 결실을 의미하고 포함하며, 많은 경우 전자가 바람직하다. 본 발명의 변이체는 아미노산 치환을 포함하며, 본원에 기재된 바와 같이 단백질의 기능이 여전히 존재하는 한 임의의 수의 추가 변형을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 변형이 일반적으로 활용되는데, 이는 종종 목표가 최소한의 변형으로 기능을 변경하는 것이기 때문이다. 변이체 폴리펩타이드 서열은 바람직하게는 야생형 서열 또는 모 서열에 대해 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95% 또는 최대 98% 또는 99% 동일성을 보유할 것이다. 서열의 크기에 따라, 동일성 백분율은 아미노산의 수에 따라 달라질 것이라는 점에 유의해야 한다. 변이체에는 인간 서열이 포함되지 않는다.

[0059] 본원에 사용된 바와 같이, "단백질 변이체" 또는 "변이체 단백질"이란 적어도 하나의 아미노산 변형으로 인해 야생형 단백질과 상이한 단백질을 의미한다. 모(parent) 폴리펩타이드는 자연 발생 또는 야생형(WT) 폴리펩타이드일 수 있거나 WT 폴리펩타이드의 변형된 버전일 수 있다. 변이체 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 자체, 폴리펩타이드를 포함하는 조성물, 또는 이를 인코딩하는 아미노 서열을 지칭할 수 있다. 바람직하게는, 변이체 폴리펩타이드는 모 폴리펩타이드와 비교하여 적어도 하나의 아미노산 변형, 예를 들어, 모 폴리펩타이드와 비교하여 약 1 내지 약 10개의 아미노산 변형, 바람직하게는 1 내지 약 5개의 아미노산 변형을 갖는다. 본원의 변이체 폴리펩타이드 서열은 바람직하게는 모 폴리펩타이드 서열과 적어도 약 80% 동일성, 가장 바람직하게는 적어도 약 90% 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 약 95% 동일성을 보유할 것이다. 변이체에는 인간 서열이 포함되지 않는다.

[0060] 본원에 사용된 "모 폴리펩타이드", "모 단백질"은 변이체를 생성하기 위해 후속적으로 변형되는 비변형된 폴리펩타이드를 의미한다. 상기 모 폴리펩타이드는 자연 발생 폴리펩타이드, 또는 자연 발생 폴리펩타이드의 변이체 또는 조작된 버전일 수도 있다. 모 폴리펩타이드는 폴리펩타이드 자체, 모 폴리펩타이드를 포함하는 조성물, 또는 이를 인코딩하는 아미노산 서열을 지칭할 수 있다.

[0061] 본원에서 "야생형" 또는 "WT", "wt" 또는 "천연"은 대립유전자 변이를 포함하여 자연에서 발견되는 아미노산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. WT 단백질, 폴리펩타이드, Fc 도메인, 면역글로불린 등은 의도적으로 변형되지 않은 아미노산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열을 갖는다.

[0062] 또 다른 양태에서, 본 발명은 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 예를 들어 ECD 또는 이의 일부 또는 변이체를 인코딩하는 단리된 핵산에 관한 것이다. 본원에 사용된 바와 같이, p75NTR의 일부 또는 p75NTR의 ECD의 일부는 적어도 하나의 뉴로트로핀 결합 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 반려 동물은 개이다. 예를 들어, 단리된 핵산은 서열번호 2, 4, 6, 8 또는 37 또는 이의 변이체 또는 그의 일부를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0063] "단리된 핵산 분자"는 폴리뉴클레오타이드의 전부 또는 일부와 연관되지 않은 게놈, mRNA, cDNA 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA 또는 이들의 일부 조합을 의미하고, 여기서 단리된 폴리뉴클레오타이드가 자연에서 발견되거나 자연에서 연결되지 않은 폴리뉴클레오타이드에 연결된다.

[0064] 또 다른 양태에서, 본 발명은 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 예를 들어 상기에 기재된 바와 같은 ECD 또는 이의 일부를 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터, 플라스미드, 전사, 발현 카세트 또는 핵산 작제물에 관한 것이다.

[0065] 작제물은 적합한 선도 서열을 포함할 수 있다. 선도 서열이라는 용어는 신호 서열과 상호 교환적으로 사용된다. 따라서, 일부 구현예에서, 융합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열/핵산 작제물은 또한 선도 서열을 포함할 수 있다. 선도 서열은 단백질의 일부로 만들어진 다음, 단백질이 분비될 때 절단된다. 예를 들어 관련 종(예를 들어 개, 말, 고양이, 소)의 내인성 p75 리더, 상이한 종 예를 들어 인간, 개, 말, 고양이, 소 또는 마우스 IgG 리더의 내인성 p75 리더 또는 당업계에 공지된 또 다른 리더 서열, 예를 들어 Campath 선도 서열 (US 8,362,208 B2 참조) 또는 인공 서열을 포함하는 임의의 적합한 선도 서열이 사용될 수 있다. 이러한 선도 서열은 단백질 발현을 강화하는 데 도움이 될 수 있다.

[0066] 또 다른 양태에서, 본 발명은 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 예를 들어 ECD를 인코딩하는 핵산, 또는 상기에 기재된 바와 같은 벡터, 플라스미드, 벡터, 전사, 발현 카세트 또는 작제물을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다.

[0067] 본 발명에 사용되는 발현 벡터는 시작 벡터 예컨대 상업적으로 입수 가능한 벡터로부터 작제될 수 있다. 벡터가 작제되고 핵산 분자가 벡터의 적절한 부위에 삽입된 후, 완성된 벡터는 증폭 및/또는 폴리펩타이드 발현을 위해 적합한 숙주 세포에 삽입될 수 있다.

[0068] "벡터"라는 용어는 숙주 세포에서 하나 이상의 관심 유전자(들) 또는 서열(들)을 전달하고 일부 양태에서 발현할 수 있는 작제물을 의미한다. 벡터의 예는 바이러스 벡터, 네이키드 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드 또는 파아지 벡터, 양이온 축합제와 연관된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포솜에 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 및 특정 진핵 세포, 예컨대 생산자 세포을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0069] 본 발명은 또한 상기에 기재된 바와 같은 하나 이상의 핵산 분자 플라스미드, 벡터, 전사 또는 발현 카세트를 포함하는 단리된 재조합 숙주 세포에 관한 것이다. 선택된 숙주 세포로의 발현 벡터의 형질전환은 형질감염, 감염, 인산칼슘 공동침전, 전기천공, 미세주입, 리포펙션, DEAE-덱스트란 매개 형질감염 또는 다른 공지 기술을 포함하는 잘 알려진 방법에 의해 달성될 수 있다. 선택된 방법은 부분적으로 사용될 숙주 세포의 유형의 기능일 수 있다.

[0070] 숙주 세포는 진핵 또는 원핵, 예를 들어 박테리아, 바이러스, 식물, 진균, 포유류 또는 다른 적합한 숙주 세포일 수 있다. 일 구현예에서, 세포는 E. 콜라이 세포이다. 다른 구현예에서, 세포는 효모 세포이다. 다른 구현예에서, 세포는 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포, HeLa 세포 또는 당업자에게 명백한 다른 세포이다. 발현을 위한 숙주로 이용가능한 포유류 세포주는 당업계에 잘 알려져 있고, 미국 종균 협회 (ATCC) 로부터 이용가능한 불멸화 세포주를 포함하지만 이에 제한되지 않고, 당업계에 공지된 발현 시스템에 사용되는 임의의 세포주는 본 발명의 재조합 폴리펩타이드를 제조하는데 사용될 수 있다.

[0071] 일반적으로, 숙주 세포는 단백질을 인코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 발현 벡터로 형질전환된다. 이용될 수 있는 숙주 세포 중에는, 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵 세포가 있다. 원핵생물은 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 예를 들어 E. 콜라이 또는 바실러스을 포함한다. 고등 진핵 세포에는 곤충 세포와 포유류 기원의 확립된 세포주가 포함된다. 적합한 포유류 숙주 세포주의 예는 COS-7 세포, L 세포, CI27 세포, 3T3 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 이의 유도체 및 무혈청 배지에서 성장하는 관련 세포주, HeLa 세포, BHK 세포주, CVIIEBNA 세포주, 인간 배아 신장 세포 예컨대 293, 293 EBNA 또는 MSR 293, 인간 표피 A431 세포, 인간 Colo205 세포, 다른 형질전환된 영장류 세포주, 정상 이배체 세포, 일차 조직의 시험관 배양에서 유래된 세포주, 일차 외식편, HL-60, U937, HaK 또는 주르카트(Jurkat) 세포를 포함한다. 선택적으로, 포유류 세포주 예컨대 HepG2/3B, KB, NIH 3T3 또는 S49는 예를 들어 다양한 신호 전달 또는 리포터 검정에서 폴리펩타이드를 사용하는 것이 바람직할 때 폴리펩타이드의 발현을 위해 사용될 수 있다.

[0072] 다른 적합한 숙주 세포에는 곤충 세포, 식물 세포, 형질전환 식물 및 형질전환 동물에서 배큘로바이러스와 같은 발현 시스템을 사용하고 바이러스 및 핵산 벡터에 의한 곤충 세포가 포함된다.

[0073] 대안적으로, 진균 세포주 및 효모와 같은 하등 진핵생물 또는 박테리아와 같은 원핵생물에서 폴리펩타이드를 생산하는 것이 가능하다. 적합한 효모는 S. 세레비지아에(*S. cerevisiae*), S. 폼베(*S. pombe*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 균주, 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*), 칸디다에(*Candida*), 또는 이종 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 임의의 효모 균주가 포함된다. 적합한 박테리아 균주에는 E. 콜라이(*E. coli*), B. 서브틸리스(*B. subtilis*), S. 타이피뮤리움(*S. typhimurium*), 또는 이종 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 임의의 박테리아 균주가 포함된다. 단백질이 효모 또는 박테리아에서 만들어진 경우, 기능성 제품을 얻기 위해 예를 들어 적절한 부위의 인산화 또는 글리코실화에 의해 그 안에서 생산된 제품을 변형하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 공유 부착은 공지된 화학적 또는 효소적 방법을 사용하여 달성될 수 있다.

[0074] 적절한 조건에서 배양될 때 숙주 세포는 배양 배지로부터(숙주 세포가 이를 배지로 분비하는 경우) 이후에 수집될 수 있거나 이를 생산하는 숙주 세포로부터(분비되지 않은 경우) 직접 수집될 수 있는 단백질을 발현하는 데 사용될 수 있다. 적절한 숙주 세포의 선택은 원하는 발현 수준, 활성(글리코실화 또는 인산화와 같은)에 바람직하거나 필요한 폴리펩타이드 변형 및 생물학적 활성 분자로의 접힘 용이성과 같은 다양한 인자에 따라 달라질 것이다.

[0075] 또 다른 양태에서, 본 발명은 또한 다른 모이어티, 예를 들어 아래에 더 자세히 설명되는 반감기 연장 모이어티

와의 융합 단백질에서 상기에 기재된 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부의 용도에 관한 것이다. 따라서, p75NTR 단백질 또는 이의 일부는 반감기 연장 모이어티에 공유적으로 연결되거나 커플링되어 제공될 수 있다. 대안적으로, 리포솜에 삽입되어 제공될 수도 있다. 본 발명은 또한 요법에 사용하기 위한 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부에 관한 것이다. 또한, 통증 관련 질환의 치료에 사용하기 위한 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부가 제공된다. 이러한 질환은 아래에서 더 자세히 기재된다.

[0076] 일부 구현예에서, 약동학적(PK) 특성을 개선하기 위해 p75NTR 단백질의 반감기가 연장된다.

[0077] ***융합 단백질***

[0078] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은 단리된 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 예를 들어 전술한 세포외 도메인 및 또 다른 모이어티를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다.

[0079] 예를 들어, 다른 모이어티는 반감기 연장 모이어티일 수 있다. 따라서, p75NTR 단백질 또는 이의 일부는 반감기 연장 모이어티에 커플링된다. 전술한 바와 같이, p75NTR 단백질 또는 이의 일부는 개과, 고양이과 또는 말과일 수 있다. 따라서 융합 단백질에 사용되는 p75NTR 단백질 또는 이의 일부는 서열번호 1, 3, 5, 7, 34, 36 또는 38 또는 이의 일부 또는 변이체로부터 선택된 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 개과 p75NTR 단백질 또는 일부의 일 구현예에서, 줄기 영역(예를 들어 서열번호 9)이 제거된다.

[0080] 반감기 연장 모이어티는 기재되었다. 예를 들어, 반감기 연장 모이어티는 다음의 비제한적인 목록으로부터 선택될 수 있다: 반려 동물 면역글로불린 Fc 도메인, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), PEG 유도체, 단순 지질, 지질 디카복실산, 추가 모이어티를 갖는 지질, 반려 동물 혈청 알부민 결합제, 예를 들어 반려 동물 혈청 알부민, 반려 동물 혈청 알부민, 또는 연쇄상구균 단백질 G의 알부민 결합 도메인 (ABD)에 결합하는 소분자 결합제 또는 항체/항체 단편. 지질의 예는 글루카곤 유사 펩타이드 1(GLP-1), 유사체 GLP-1 리라글루타이드 및 세마글루타이드 또는 콜레스테롤을 포함한다. 유리하게는, 면역글로불린 Fc 도메인을 사용하면 단백질의 정제가 용이해진다. 특히, 단백질 A에 결합하는 Fc는 정제 절차에 사용될 수 있다. 면역글로불린 Fc 도메인의 존재는 또한 융합 단백질의 전반적인 폴딩(folding)을 안정화할 수 있을 뿐만 아니라 반감기를 연장할 수도 있다.

[0081] 반감기 연장 모이어티가 반려 동물 Fc 도메인, 반려 동물 혈청 알부민 결합제 또는 반려 동물 혈청 알부민인 일 구현예에서, p75NTR 단백질 또는 일부 및 반감기 연장 모이어티는 동일한 반려 동물로부터의 것이고/그에 특이적이다. 예를 들어, 일 구현예에서, 반감기 연장 모이어티는 해당 반려 동물의 반려 동물 Fc 도메인이다. 예를 들어, p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 예를 들어 세포외 도메인은 개과이라면, Fc 도메인은 개과이다. p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 예를 들어 세포외 도메인이 고양이과인 경우, Fc 도메인은 고양이과이다. p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 예를 들어 세포외 도메인이 말과인 경우, Fc 도메인은 말과이다. p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 예를 들어 세포외 도메인이 솟과인 경우, Fc 도메인은 솟과이다.

[0082] 그러나, 반려 동물 p75 단백질 사이의 높은 서열 유사성을 고려하면, 또 다른 구현예에서, 반감기 연장 모이어티가 반려 동물 Fc 도메인, 반려 동물 혈청 알부민 결합제 또는 반려 동물 혈청 알부민인 경우, p75NTR 단백질 또는 일부 및 반감기 연장 모이어티는 동일한 반려 동물로부터의 것이 아니고/그에 특이적이지 않다. 예를 들어, 일 구현예에서, 반감기 연장 모이어티는 상응하는 반려 동물의 반려 동물 Fc 도메인이지만, p75 단백질 또는 이의 일부는 상이한 반려 동물의 것이다. 예를 들어, 개 치료의 경우, Fc 도메인이 개과인 경우, p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 예를 들어 세포외 도메인은 상이한 동물, 예를 들어 고양이, 말 또는 소로부터의 것일 수 있다. 예를 들어, 고양이과 치료의 경우, Fc 도메인이 고양이과인 경우, p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 예를 들어 세포외 도메인은 상이한 동물, 예를 들어 개, 소 또는 말로부터의 것일 수 있다. 예를 들어, 말과 치료의 경우, Fc 도메인이 고양이과인 경우, p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 예를 들어 세포외 도메인은 상이한 동물, 예를 들어 고양이, 소 또는 개로부터의 것일 수 있다. 또 다른 구현예에서, 반려 동물 Fc에 융합된 인간 p75 또는 이의 일부가 사용될 수 있다.

[0083] 반려 동물 혈청 알부민 결합제, 예를 들어 항체 또는 이의 단편은 개과 또는 개과화, 고양이과 또는 고양이과화, 말과 또는 말과화일 수 있다. 반려 동물 혈청 알부민 결합제는 개과, 고양이과 또는 말과 혈청 알부민에 결합할 수 있다.

[0084] 일 구현예에서, 반감기 연장 모이어티는 야생형 또는 변이체 Fc 도메인이다. 변이체라는 용어는 상기에 정의된 바와 같다. 예를 들어, Fc 도메인 변이체는 야생형 Fc 도메인에 비해 변형된 반감기를 가질 수 있다. 일 구현예에서, Fc 도메인은 개과 Fc 도메인, 즉 야생형 도메인 또는 이의 변이체이다. 변이체 Fc 도메인은 예를 들어 WO2020/142625에 기재되어 있다.

[0085] 본원에 사용된 "Fc" 또는 "Fc 영역" 또는 "Fc 도메인"이란 제1 불변 영역 면역글로불린 도메인(CH1)을 제외한 항체의 불변 영역 및 일부 경우에는 힌지의 일부를 포함하는 폴리펩타이드를 의미한다. 일 구현예에서, Fc 도메인은 불변 영역 면역글로불린 도메인 CH2, CH3 및 CH1과 CH2 사이의 힌지 영역 또는 힌지 영역의 일부를 포함한다.

[0086] 항체의 단백질분해 소화는 Fv(단편 가변), Fab(단편 항원 결합) 및 Fc(단편 결정화)라고 불리는 상이한 단편을 방출한다. Fc 단편은 이황화물에 의해 함께 결합된 두 H 사슬의 카복시 말단 부분을 포함한다. Fc 단편의 불변 도메인은 항체의 이펙터 기능을 매개하는 역할을 담당한다.

[0087] 개과에서, A, B, C 및 D라고 하는 4개의 IgG 중쇄가 있다. 이 중쇄는 IgG-A, IgG-B, IgG-C 및 IgG-D라고 하는 개 IgG의 4가지 하위 클래스를 나타낸다. 이들 4개의 중쇄의 DNA 및 아미노산 서열은 문헌[Tang 등 (Vet. Immunol. Immunopathol. 80: 259-270 (2001))]에 의해 먼저 식별되었다. 이들 중쇄에 대한 예시적인 아미노산 및 DNA 서열은 GenBank 데이터 염기 (IgGA: 등록 번호 AAL35301.1, IgGB: 등록 번호 AAL35302.1, IgGC: 등록 번호 AAL35303.1, IgGD: 등록 번호 AAL35304.1)에서도 이용 가능하다. 본 발명자들에 의해 사용되고 본 발명의 양태 및 구현예에 따른 IgG-A, IgG-B, IgG-C 및 IgG-D에 대한 아미노산 서열은 서열번호 15, 16, 17, 18)로 제공된다.

[0088] 인간에서, Fc는 IgA, IgD 및 IgG의 마지막 2개 불변 영역 면역글로불린 도메인, IgE 및 IgM의 마지막 3개 불변 영역 면역글로불린 도메인 및 이들 도메인의 가요성 힌지 N-말단을 지칭한다. IgA 및 IgM의 경우, Fc는 J 사슬을 포함할 수 있다. IgG의 경우, Fc 도메인은 면역글로불린 도메인 CH2 및 CH3과 CH1과 CH2 사이의 하부 힌지 영역을 포함한다. Fc 영역의 경계는 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 카복실 말단에 잔기 C226 또는 P230을 포함하는 것으로 정의되며, 여기서 넘버링은 카밧(Kabat)에서와 같이 EU 지표에 따른 것이다.

[0089] 본원에 사용된 Fc는 본원에 기재된 바와 같이 단리된 Fc 영역, 또는 Fc 융합("융합 조성물" 또는 "융합 작제물") 문맥의 영역을 지칭할 수 있다. Fc 도메인은 Fc 영역의 전부 또는 일부를 포함하며; 즉, 기능에 영향을 미치지 않는 한 N- 또는 C- 말단 서열은 야생형 또는 변이체 Fc 도메인으로부터 제거될 수 있다.

[0090] 간략하게, IgG 기능은 일반적으로 Ig의 Fc 영역과 Fcɣ 수용체(FcɣR) 또는 다른 결합 분자 사이, 때로는 이펙터 세포 사이의 상호작용을 통해 달성된다. 이는 이펙터 세포가 항체가 가변(V) 영역을 통해 결합된 표적 세포를 죽이도록 유발할 수 있다. 또한 용해성 항원에 대한 항체는 FcɣR을 표적으로 하는 면역 복합체를 형성하여 면역 복합체를 흡수(옵소닌화)하거나 이펙터 세포를 촉발하고 사이토카인을 방출할 수 있다.

[0091] 본원에 사용된 "Fc 감마 수용체", "FcɣR" 또는 "Fc감마R"은 IgG 항체 Fc 영역에 결합하고 FcɣR 유전자에 의해 인코딩되는 단백질 계열의 임의의 구성원을 의미한다.

[0092] 인간에서, FcɣR의 세 가지 클래스가 특성화되어 있지만 상황은 다중 수용체 형태의 발생으로 인해 더욱 복잡해진다. 세 가지 클래스는 다음과 같다:

[0093] (i) 이소형 FcɣRIa, FcɣRIb 및 FcɣRIc를 포함하는 FcɣRI(CD64)는 모노머성 IgG와 고친화도로 결합하고 대식세포, 단핵구, 때로는 호중구 및 호산구에서 발현되고;

[0094] (ii) FcɣRII(CD32)는 복합화된 IgG에 중간 내지 낮은 친화도로 결합하며 널리 발현된다. 이들 수용체는 FcɣRIIa와 FcɣRIIb라는 두 가지 중요한 유형으로 나눌 수 있다. 수용체의 'a' 형태는 살해에 관여하는 많은 세포(예를 들어 대식세포, 단핵구, 호중구)에서 발견되며 살해 과정을 활성화할 수 있는 것으로 보이며 두 개의 대체 대립유전자로 발생한다. 'b' 형태는 억제 과정에서 역할을 하는 것으로 보이며 B-세포, 대식세포, 비만 세포 및 호산구에서 발견된다. B-세포에서는, 추가 면역글로불린 생산과 IgE 클래스로의 이소형 전환을 억제하는 기능을 하는 것으로 보인다. 대식세포에서, b형은 FcɣRIIa를 통해 매개되는 식균작용을 억제하는 역할을 한다. 호산구와 비만 세포에서, b 형태는 IgE가 별도의 수용체에 결합하여 이들 세포의 활성화를 억제하는 데 도움이 될 수 있고 그리고

[0095] (iii) FcɣRIII(CD16)은 중간 내지 낮은 친화도로 IgG와 결합하며 두 가지 유형으로 존재한다. FcɣRIIIa는 NK 세포, 대식세포, 호산구 및 일부 단핵구와 T 세포에서 발견되며 ADCC를 매개한다.

[0096] FcɣRIIIb는 호중구에서 고도로 발현된다. 두 유형 모두 상이한 동형이형 형태를 가지고 있다.

[0097] 개과 Fc 수용체는 문헌[Bergeron 등 L.M. Bergeron 등; Veterinary Immunology and Immunopathology 157

(2014) 31-41]에 기재되어 있다. 개과에는 RI, RIIb, RIII이 있지만 Riia는 없다.

[0098] FcɣR에 결합할 뿐만 아니라 IgG 항체는 보체를 활성화할 수 있으며 이는 또한 세포 용해, 옵소닌화 또는 사이토카인 방출 및 염증을 초래할 수 있다. Fc 영역은 또한 IgG의 신생아로의 수송(소위 "FcRn"을 통해), 증가된 반감기(또한 FcRn 유형 수용체를 통해 영향을 받는 것으로 여겨짐) 및 자가 응집과 같은 특성을 매개한다. Fc-영역은 또한 단백질 A 및 단백질 G와의 상호작용(이 상호작용은 FcRn의 결합과 유사한 것으로 나타남)을 담당한다.

[0099] 본원에 사용된 "이펙터 기능"은 항체 Fc 영역과 Fc 수용체 또는 리간드와의 상호작용으로부터 발생하는 생화학적 이벤트를 의미한다. 이펙터 기능은 항체 의존성 세포 매개 세포독성 (ADCC), 항체 의존성 세포 매개 식균작용 (ADCP) 및 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0100] 일 구현예에서, 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 예를 들어 세포외 도메인, 및 다른 모이어티는 링커 모이어티와 연결되거나 달리 접합되거나 부착되거나 공유 또는 비공유적으로 결합된다. 적합한 링커는 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 링커는 펩타이드 링커, 예컨대 글리신 및/또는 알라닌 및/또는 트레오닌 및/또는 세린 풍부 링커 예를 들어 글리신-세린 링커이고, 예컨대 $(G_4S)_n$ (여기서 n은 1 내지 4임)이다.

[0101] 다른 구현예에서, 링커는 절단 가능할 수 있다.

[0102] 일 구현예에서, 반려 동물 p75NTR 단백질 또는 이의 일부는 개과 p75NTR ECD 또는 이의 일부를 포함하거나 이로 이루어진다. 일 구현예에서, ECD는 서열번호 7 또는 이의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0103] 따라서, 일 구현예에서, 본 발명은 개과 Fc 도메인에 연결된 개과 p75NTR ECD를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다. 일 구현예에서, ECD는 서열번호 7 또는 이의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다.

[0104] 일 구현예에서, 본 발명의 융합 단백질은 바람직하게는 약 1 pM 내지 약 100 nM 사이의 결합 친화도(Kd)로 NGF, BDNF, NT3 또는 NT4/5 중 임의의 하나 이상에 결합한다. 일부 바람직한 구현예에서, 결합 친화도(Kd)는 본원에 기재된 바와 같은 NGF, BDNF, NT3 또는 NT4/5에 대한 시험관내 결합 검정에서 측정된 바와 같이, 약 5pM 내지 약 10 pM, 20pM, 40pM, 50pM I00pM, 0.2nM, 0.5nM, lnM 1.5nM 2 nM, 2.5 nM, 3 nM, 3.5 nM, 4 nM, 4.5 nM, 5 nM, 5.5 nM, 6 nM, 6.5 nM, 7 nM, 7.5 nM, 8 nM, 8.5 nM, 9 nM, 9.5 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 30 nM, 35 nM, 40 nM, 45 nM, 50 nM 또는 100 nM 중 임의의 것이다. 서브나노몰 범위가 바람직하다.

[0105] 일 구현예에서, 융합 단백질은 서열번호 11 또는 13 또는 이의 변이체를 포함하거나 이로 이루어진다. 이러한 융합 단백질은 도 1에 나타낸 바와 같이 개과 Fc 도메인에 작동 가능하게 연결된 p75 ECD를 포함한다. 서열번호 11의 작제물 내 Fc 도메인은 야생형 개과 Fc 도메인이다. 서열번호 13의 작제물 내 Fc 도메인은 반감기를 증가시키도록 변형된 변이체 개과 Fc 도메인이다. 이 도메인에서는, 돌연변이 YTE가 EU 넘버링을 사용하여 wt Fc 도메인의 잔기 Y252 -T254 -에 도입되었다.

[0106] 다른 구현예에서, 융합 단백질은 서열번호 39를 포함하거나 이로 이루어진다. 이러한 융합 단백질은 고양이과 Fc 도메인에 작동 가능하게 연결된 p75 ECD를 포함한다. 서열번호 39의 작제물 내 Fc 도메인은 야생형 고양이과 Fc 도메인이다.

[0107] 따라서, 이러한 돌연변이를 포함하는 변형된 반려 동물 Fc 도메인, 예를 들어 개과, 고양이과 또는 말과 Fc 도메인은 본 발명의 융합 단백질에 사용될 수 있다. 당업자는 반감기를 증가시키는 임의의 다른 공지된 돌연변이가 또한 Fc 도메인에 도입될 수 있음을 알 것이다.

[0108] 본 발명에 따르면, 융합 단백질은 개선된 용해도, 안정성 및/또는 개선된 혈청 반감기를 포함하는 유리한 생물학적 특성을 입증한다. 개선된 용해도 및 안정성은 예를 들어 실시예 4 및 9에서 입증된다. 이러한 예는 기재된 분자가 온도와 화학적 스트레스 모두에서 매우 안정적이라는 것을 보여주고, 이는 Tm1은 약 67℃이고 최대 95℃까지 응집 없이 70℃ 초과의 온도에서 인큐베이션한 경우에만 전개(unfolding)을 보여준다. 개선된 반감기는 예를 들어 실시예 11 및 12에서 입증된다. 반감기가 개선되어 투약 빈도가 줄어든다(매일 투여해야 하는 기존 치료법에 비해 단회 투여). 이 효과는 강력한 진통 효과를 나타내면서 입증된다. 일 구현예에서, 본 발명의 융합 단백질은 2, 4, 6, 8,10, 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, 102, 104, 106, 108, 1 10, 1 12, 1 14, 1 16, 1 18, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152,154, 156, 158, 160, 62, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208 또는 210 시간 +/- 1 시간 중

임의의 하나 이상의 생체내 반감기를 가지며, 더욱 바람직하게는 본 발명의 p75NTR(NBP)-Fc 융합 단백질은 약 24시간 이상의 생체내 반감기를 갖는다.

[0109] 또 다른 구현예에서, 본 발명의 융합 단백질은 2, 4, 6, 8,10, 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, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152,154, 156, 158, 160, 62, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208 또는 210 일 +/- 1 일 중 어느 하나 이상의 시험관 내 반감기를 가지며, 추가로 융합 단백질의 반감기는 약 6일 이상 또는 1개월 초과의 시험관 내 반감기를 갖는다. 일 구현예에서, 반감기는 14일이다.

[0110] 전술한 바람직한 구현예에 따르면, 생체내 반감기는 랫트 또는 상응하는 반려 동물, 예를 들어 개에서의 반감기일 수 있다.

[0111] 본 발명의 융합 단백질은 매우 낮은 용량에서도 작동할 수 있지만 매우 효과적이다. 이는 예를 들어, 랫트와 개에서 PetML119 및 PetML122의 투여가 기존 치료법을 능가하는 실시예 11 및 12에서 입증된다.

[0112] 본 발명에 따르면, 융합 단백질은 우수한 안전성 프로파일을 나타낸다. 이는 예를 들어 실시예 12에서 입증되는데, 여기서 동물은 정상적인 체중과 혈액학적 매개변수를 유지하고 융합 단백질 투여 후 항약물 항체를 생성하지 않는다. 투여 후 정상 체중의 유지는 예를 들어 실시예 11에서도 입증된다. 이는 시간이 지남에 따라 체중을 감소시키는 덱사메타손 투여와 대조된다.

[0113] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기에 기재된 바와 같은 융합 단백질, 예를 들어 서열번호 11, 13 또는 39를 인코딩하는 융합 단백질을 인코딩하는 단리된 핵산에 관한 것이다. 일 구현예에서, 핵산은 서열번호 12, 14 또는 40으로부터 선택된다.

[0114] 또 다른 양태에서, 본 발명은 전술한 핵산을 포함하는 벡터, 플라스미드, 벡터, 전사, 발현 카세트 또는 작제물에 관한 것이다.

[0115] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기에 기재된 바와 같은 핵산 벡터, 플라스미드, 벡터, 전사, 발현 카세트 또는 작제물을 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 적합한 숙주 세포는 본원의 다른 곳에 기재되어 있다.

[0116] 다른 구현예에서, P75NTR 단백질, 이의 일부 또는 융합 단백질은 검출 가능하거나 기능적인 표지로 표지된다. 표지는 형광단, 형광물질, 방사성표지, 효소, 화학발광물질, 핵자기공명 활성 표지 또는 광감작제를 포함하지만 이에 제한되지 않는 신호를 생성하거나 생성하도록 유도될 수 있는 임의의 분자일 수 있다. 따라서, 결합은 형광 또는 발광, 방사능, 효소 활성 또는 흡광도를 검출함으로써 검출 및/또는 측정될 수 있다.

[0117] 또 다른 양태에서, p75NTR 단백질 또는 이의 일부 또는 본 발명의 융합 단백질을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 본원에 기재된 융합 단백질 또는 약제학적 조성물은 경구, 국소, 비경구, 설하, 직장, 질, 안구, 비강내, 폐, 진피내, 유리체내, 종양내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 대뇌내, 경피, 경점막, 흡입에 의해, 또는 국소, 특히 귀, 눈, 또는 피부를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 편리한 경로에 의해 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 다른 구현예에서, 전달은 약물을 인코딩하는 핵산으로부터의 것이며, 예를 들어 본 발명의 분자를 인코딩하는 핵산이 전달된다.

[0118] 비경구 투여는 예를 들어, 정맥내, 근육내, 동맥내, 복강내, 비강내, 직장, 방광내, 진피내, 국소, 관절내 또는 피하 투여를 포함한다. 바람직하게는, 조성물은 비경구적으로 투여된다.

[0119] 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 비히클은 미립자일 수 있으므로, 조성물은 예를 들어 정제 또는 분말 형태일 수 있다. "담체"라는 용어는 본 발명의 약물 항체 접합체와 함께 투여되는 희석제, 보조제 또는 부형제를 지칭한다. 이러한 약제학적 담체는 물과 같은 액체 및 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 기원을 포함하는 오일, 예를 들어 땅콩 오일, 대두 오일, 미네랄 오일, 참깨 오일 등일 수 있다. 담체는 식염수, 아카시아검, 젤라틴, 전분 페이스트, 탈크, 케라틴, 콜로이드성 실리카, 우레아 등일 수 있다. 또한 보조제, 안정화제, 증점제, 윤활제 및 착색제를 사용할 수 있다. 일 구현예에서, 동물에게 투여될 때, 본 발명의 폴리펩타이드 또는 조성물 및 약제학적으로 허용 가능한 담체는 멸균된다. 본 발명의 약물 항체 접합체가 정맥내로 투여될 때 물이 바람직한 담체이다. 식염수, 덱스트로스 및 글리세롤 수용액은 특히 주사용 용액의 경우 액체 담체로 사용할 수도 있다. 적합한 약제학적 부형제는 부형제 예컨대 전분, 글루오스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 가루, 백악, 실리카겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌, 글

리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 원하는 경우, 본 조성물은 또한 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다.

[0120] 약제학적 조성물은 액체, 예를 들어 용액, 시럽, 용액, 에멀젼 또는 현탁액의 형태일 수 있다. 액체는 경구 투여 또는 주사, 주입(예를 들어 IV 주입) 또는 피하 전달에 유용할 수 있다.

[0121] 경구 투여용으로 의도된 경우, 조성물은 고체 또는 액체 형태일 수 있으며, 여기서 반고체, 반액체, 현탁액 및 겔 형태는 본원에서 고체 또는 액체로 간주되는 형태에 포함된다.

[0122] 경구 투여용 고형 조성물로서, 조성물은 분말, 과립, 압축 정제, 환제, 캡슐, 츄잉검, 웨이퍼 등의 형태로 제형화될 수 있다. 이러한 고체 조성물은 전형적으로 하나 이상의 불활성 희석제를 함유한다. 또한, 다음 중 하나 이상이 존재할 수 있다: 결합제 예컨대 카복시메틸셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 미세결정질 셀룰로오스, 또는 젤라틴; 부형제 예컨대 전분, 락토스 또는 덱스트린, 붕해제 예컨대 알긴산, 알긴산나트륨, 옥수수 전분 등; 윤활제 예컨대 스테아르산마그네슘; 활택제 예컨대 콜로이드성 이산화규소; 감미제 예컨대 수크로스 또는 사카린; 향미제 예컨대 박하, 메틸 살리실레이트 또는 오렌지 향미제; 및 착색제. 조성물이 캡슐(예를 들어 젤라틴 캡슐) 형태인 경우, 이는 상기 유형의 물질 이외에 폴리에틸렌 글리콜, 사이클로덱스트린 또는 지방유와 같은 액체 담체를 함유할 수 있다.

[0123] 경구 투여용으로 의도된 경우, 조성물은 감미제, 보존제, 염료/착색제 및 향미 강화제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 주사 투여용 조성물에서, 계면활성제, 보존제, 습윤제, 분산제, 현탁화제, 완충제, 안정화제 및 등장화제 중 하나 이상이 포함될 수도 있다.

[0124] 조성물은 하나 이상의 투약 단위 형태를 취할 수 있다.

[0125] 특정 구현예에서, 치료가 필요한 부위에 국소적으로 조성물을 투여하거나, 정맥내 주사 또는 주입에 의해 투여하는 것이 바람직할 수 있다.

[0126] 특정 질환 또는 병태의 치료에 효과적/활성인 본원에 기재된 폴리펩타이드, Fc 도메인 또는 약제학적 조성물의 양은 질환 또는 병태의 성질에 따라 달라질 것이며 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다. 또한 최적의 투약 범위를 식별하는 데 도움이 되도록 시험관 내 또는 생체 내 검정을 선택적으로 사용할 수 있다. 조성물에 이용되는 정밀한 용량은 투여 경로, 질환이나 장애의 중증도에 따라 달라지며, 종사자의 판단과 각 환자의 상황에 따라 결정되어야 한다. 연령, 체중, 성별, 식이, 투여 시간, 배설 속도, 숙주의 상태, 약물 조합, 반응 민감도 및 질환의 중증도와 같은 인자를 고려해야 한다.

[0127] 전형적으로, 양은 조성물의 중량을 기준으로 본 발명의 폴리펩타이드의 적어도 약 0.01%이다. 경구 투여용으로 의도된 경우, 이 양은 조성물의 중량으로 약 0.1% 내지 약 80% 범위로 변할 수 있다. 바람직한 경구용 조성물은 조성물의 중량을 기준으로 약 4% 내지 약 50%의 본 발명의 폴리펩타이드를 포함할 수 있다.

[0128] 비경구 투약 단위가 본 발명의 폴리펩타이드의 중량으로 약 0.01% 내지 약 2%를 함유하도록 조성물을 제조할 수 있다.

[0129] 주사 투여를 위해, 조성물은 약 전형적으로 약 0.1 mg/kg 내지 약 250 mg/동물 체중 kg, 바람직하게는, 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/동물 체중 kg, 및 더 바람직하게는 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/동물 체중 kg을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 조성물은 약 1 내지 30 mg/kg, 예를 들어, 약 5 내지 25 mg/kg, 약 10 내지 20 mg/kg, 약 1 내지 5 mg/kg, 또는 약 3 mg/kg의 용량으로 투여된다. 투약 일정은 예를 들어, 1주 1회 내지 2, 3, 또는 4주마다 또는 그 초과 1회로 변할 수 있다.

[0130] 치료는 예를 들어 매월 또는 격월에 1회일 수 있다. 이는 순응도를 개선하고 동물에 대한 스트레스를 최소화하므로 매일 투여하는 것보다 유리하다.

[0131] 본원에 사용된 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 질환 또는 장애를 억제하거나 완화하는 것을 의미한다. 예를 들어, 치료는 질환 또는 장애와 연관된 증상의 발생 연기 및/또는 해당 질환과 함께 발생할 것으로 예상되거나 발생할 것으로 예상되는 증상의 중증도 감소를 포함할 수 있다. 이 용어에는 기존 증상의 개선, 추가 증상의 예방, 해당 증상의 근본 원인을 개선하거나 예방하는 것을 포함한다. 따라서, 이 용어는 치료받는 포유동물, 예를 들어 개과 환자 중 적어도 일부에 유익한 결과가 부여되고 있음을 나타낸다. 많은 의료 치료는 치료를 받는 일부 환자에게 효과적이지만 전부는 아니다.

[0132] "대상체" 또는 "환자"라는 용어는 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 동물, 적합하게는 반려 동물, 구체적으로는

개과 또는 고양이과를 지칭한다.

[0133] 또 다른 양태에서, 본 발명은 질환의 치료 또는 예방에 있어서 본원에 기재된 p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 융합 단백질 또는 약제학적 조성물의 용도에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 나열된 질환의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조에 있어서 본원에 기재된 폴리펩타이드, Fc 도메인 또는 약제학적 조성물의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩타이드, Fc 도메인 또는 약제학적 조성물의 유효량을 포함하는, 대상체에서 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0134] 예를 들어, 질환은 NGF 관련 장애이다.

[0135] 일 구현예에서, NGF 관련 장애는 심혈관 질환, 죽상동맥경화증, 비만, 2형 당뇨병, 대사 증후군, 통증 및 염증으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 구현예에서, NGF 관련 장애는 통증을 포함한다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 통증 치료에 사용된다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 통증 치료를 위해 사용되며, 통증의 유형은 골관절염 통증, 류마티스성 관절염 통증, 수술 및 수술후 통증, 절개 통증, 전신 염증성 통증, 암 통증, 외상으로 인한 통증, 신경병증 통증, 신경통, 당뇨병성 신경병증 통증, 류마티스성 질환과 연관된 통증, 근골격 질환과 연관된 통증, 내장 통증, 및 위장 통증으로부터 선택된다. 일 구현예에서, 통증은 골관절염 통증을 포함한다. 일 구현예에서, 통증은 수술 및 수술후 통증을 포함한다. 일 구현예에서, 통증은 암 통증을 포함한다.

[0136] 하나 이상의 구현예에서, 본 발명의 p75NTR 단백질 또는 그의 일부, 융합 단백질 또는 약제학적 조성물은 개과에 사용하기 위한 것이다. 하나 이상의 구현예에서, 본 발명의 p75NTR 단백질 또는 그의 일부, 융합 단백질 또는 약제학적 조성물은 고양이과에 사용하기 위한 것이다. 하나 이상의 구현예에서, 본 발명의 p75NTR 단백질 또는 그의 일부, 융합 단백질 또는 약제학적 조성물은 말과에 사용하기 위한 것이다.

[0137] 일 구현예에서, 본 발명의 p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 융합 단백질 또는 약제학적 조성물은 하나 이상의 치료제, 예를 들어 통증 치료용 치료제와 함께 투여된다.

[0138] 폴리펩타이드, p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 융합 단백질 또는 약제학적 조성물은 다른 요법 또는 치료 화합물 또는 요법과 동시에 또는 상이한 시간에, 예를 들어 동시에, 별도로 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0139] 본 발명은 또한 본 발명의 p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 융합 단백질 또는 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 반려 동물에서 NGF 활성을 억제하는 시험관내 또는 생체내 방법을 제공한다.

[0140] 하나 이상의 양태에서, 본 발명은 융합 단백질의 생산을 초래하는 조건 하에서 본 발명의 숙주 세포를 배양하고 이어서 숙주 세포 또는 숙주 세포의 배양 배지로부터 융합 단백질을 단리함으로써 본 발명의 융합 단백질을 생산하는 방법을 제공한다.

[0141] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명의 p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 융합 단백질 또는 약제학적 조성물을 포함하는, 질환의 치료 또는 예방, 진단, 예후 또는 모니터링용 키트를 제공한다. 이러한 키트에는 다른 구성품, 포장 및/또는 지침이 포함될 수 있다.

[0142] 또 다른 양태에서 본 발명은 동결건조된 형태로 포장되거나 수성 매질에 포장된 본 발명의 p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 융합 단백질 또는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0143] 또 다른 양태에서, 본원에 기재된 본 발명의 p75NTR 단백질 또는 이의 일부, 융합 단백질 또는 약제학적 조성물은 진단 테스트 및 검정과 같은 비-치료 목적으로 사용된다. 따라서, 본 발명은 또한 NGF 관련 장애가 있는 것으로 알려져 있거나 의심되는 종, 특히 개과 고양이과에서 NGF를 검출하기 위한 진단 방법에 사용하기 위한 상기 p75NTR 단백질 및 융합 단백질을 제공한다. NGF 관련 장애가 있는 것으로 알려지거나 의심되는 종, 특히 개과 고양이과에서 NGF를 검출하는 방법은 동물로부터의 샘플을 본 발명의 표지된 단백질에 노출시키는 단계 및 상기 표지된 단백질을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 샘플 내 NGF를 정량적 또는 정성적으로 검출하거나 NGF를 발현하는 세포의 존재를 검출하는 데 사용될 수 있다.

[0144] 본 발명의 추가 양태 및 구현예는 다음의 실험적 예시를 포함하는 본 개시내용이 주어지면 당업자에게 명백할 것이다.

[0145] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 개시내용과 관련하여 사용되는 과학 및 기술 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 전술한 개시 내용은 본 발명을 제조하고 사용하는 방법 및 최선의 모드를 포함하여 본 발명의 범위 내에 포함되는 요지에 대한 일반적인 설명을 제공하지만, 다음 실시예는 당업자가 본 발명을 실시하고 이에 대한 완전한 서면 설명을 제공할 수 있도록 제공된다. 그러나, 당업자는 이들 실시예의

특정 사항이 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 되며, 그 범위는 본 개시내용에 첨부된 청구범위 및 그 등가물로부터 파악되어야 함을 이해할 것이다. 본 발명의 다양한 추가 양태 및 구현예는 본 개시 내용을 고려하여 당업자에게 명백할 것이다.

[0146] 본 명세서에 언급된 모든 문서는 유전자 등록 번호에 대한 임의의 참조 및 특허 공개에 대한 참조를 포함하여 전체 내용이 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0147] 본원에 사용된 "및/또는"은 다른 두 가지가 있거나 없는 2개의 지정된 특징 또는 구성요소 각각의 특정 개시로 간주되어야 한다. 예를 들어, "A 및/또는 B"는 마치 각각이 본 명세서에서 개별적으로 기재된 것처럼 (i) A, (ii) B, (iii) A 및 B 각각의 특정 개시내용으로 간주되어야 한다. 문맥상 달리 지시하지 않는 한, 위에서 제시한 특징의 설명 및 정의는 본 발명의 임의의 특정 양태 또는 구현예에 제한되지 않으며 기재된 모든 양태 및 구현예에 동일하게 적용된다.

[0148] 본 발명은 비제한적인 실시예에서 추가로 기재된다.

[0149] **실시예**

[0150] 방법:

[0151] **1. 단백질 작제물 및 CHO-s 형질감염/발현(도 1)**

[0152] 단백질 생산을 위해, 예측된 O-글리코실화 풍부 줄기 영역 및 α- 및 γ-세크레타제 부위이 결여된 개과 p75의 세포외 도메인에 융합된 선택된 개과 IgG 불변 영역(힌지와 C-말단 사이)을 포함하는 키메라 Fc 융합 단백질을 인코딩하기 위해 DNA 작제물을 생성하였다.

[0153] PetML119(서열번호: 11) 및 PetML122(서열번호: 13)에 대한 아미노산 서열은 도 1에 제시되어 있다. 개과, 고양이과, 소 및 말과 p75 서열 부분의 정렬이 도 2에 제공된다.

[0154] 개과 IgG-B Fc 도메인과 p75 세포외 도메인(UniProtKB - J9PAM0로부터의 res 31-194)은 모두 GeneArt(Thermo Fisher)에 의해 코돈 최적화되고 합성되었다. 두 유전자 모두 Q5 고충실도 DNA 중합효소(조립을 허용하는 중첩 영역을 포함하는 특정 프라이머 사용)를 사용하여 PCR 증폭되었으며 NEBuilder HIFI DNA Assembly(New England Biolabs)를 사용하여 포유류 발현 벡터 PetML119(Fc-Bwt) 및 PetML122(EU 넘버링을 사용하여 돌연변이된 잔기 Y252 - T254 - E256을 갖는 Fc-B-YTE)로 조립되었다. 발현 벡터에서, 융합 단백질 사슬 및 항생제 내성 유전자 발현 단위는 DNA 트랜스포존 piggyBac 말단 역전 반복부에 의해 측접하여 piggyBac 트랜스포사제의 존재 하에 숙주 세포로의 안정적인 통합을 중재한다. 두 발현 벡터는 또한 안정적인 통합을 위한 선택을 용이하게 하기 위해 piggyBac 말단 반복부 내에 위치하는 퓨로마이신 내성 카세트를 포함한다. 안정적인 발현 세포주를 생성하기 위해, PetML119 또는 PetMl122를 PiggyBac 트랜스포사제와 함께 CHO 세포와 같은 적합한 포유류 세포주에 형질감염시킨 다음 적어도 8 내지 10일 동안 10 내지 30μg/ml의 퓨로마이신 선택을 수행하였다. 융합 단백질 생산을 위해, 1 X 10^6/mL의 선택된 CHO 세포를 800mL 인큐베이션 배지(F17 + 4mM l-Gln + 0.3%P188 + 1:500 ACA)에 시딩하고 130rpm에서 진탕하면서 32℃, 8% CO_2에서 인큐베이션한다. 2% HyClone Cell Boost 7a 보충물 + 0.2% HyClone Cell Boost 7b 보충물 2mM 글루코스를 과잉 생산 4일째부터 매일 배지에 첨가한다. 배양 상층액을 10일째에 수집하고 단백질 A 칩(Biacore 8K, Cytiva Life Sciences)을 사용하여 표면 플라즈몬 공명을 사용하여 단백질 농도를 결정한다. 전형적으로 PetML119/122는 생산 10일째에 약 70mg/L에 달하는 발현 최고치를 나타내었다.

[0155] **2. PetML119-122 정제**

[0156] 적어도 7일 동안 기재된 대로 인큐베이션된 PetML119 및 PetML122 안정한 형질감염 클론으로부터의 세포 현탁액을 Sartoclear Dynamics® Lab V(SDLV-0500-20C-E)와 함께 10분간 인큐베이션한 후 0.22um 필터를 사용하여 여과하였다. 제거된 상층액을 PBS로 사전 평형화된 Mabselect Sure LX 사전 포장 20mL 컬럼(17547402)에 로딩하였다. 컬럼을 40mL의 PBS(2CV)로 세척한 다음, 융합 단백질을 0.1M 글리신 pH2.7의 구배(2CV에서 0-100%)를 사용하여 용출하였다. 융합 단백질을 함유하는 분획물을 함께 풀링하고 100mM TRIS pH8(최종 농도)로 중화하였다.

[0157] 중화된 융합 단백질 풀링된 분획을 5mL까지 농축하고 두 번째 단계 정제로서 사전 평형화된 PBS HiLoad 16/600 Superdex 200pg(28989335)에 로딩하였다. (이전에 분석된 단백질 표준의 체류 시간을 기준으로 한) 모노머 분획을 모으고 NanoDrop™ One(Thermo Scientific™)을 사용하여 단백질 농도를 평가하였다.

[0158] 상기 언급한 프로토콜에 따라 약 30mg/L의 정제된 생성물을 얻었다.

[0159] PetML119는 2단계 정제(표준 프로토콜 및 완충액을 사용하여 허용되는 내독소 및 HCP 사용) 후 34mg/L의 최종 회수율을 보여주었다.

[0160] PetML122는 2단계 정제(표준 프로토콜 및 완충액을 사용하여 허용되는 내독소 및 HCP 사용) 후 28mg/L의 최종 회수율을 보여주었다.

[0161] **3. HPLC 분석 크로마토그래피(도 3)**

[0162] 정제된 물질 순도는 올리고머화 분석을 위한 크기 배제 크로마토그래피(SEC)와 전하 변이체 분석을 위한 양이온 교환 크로마토그래피(SCX)를 모두 사용하여 평가되었다.

[0163] HPLC-SEC 크로마토그래피(컬럼: BioResolve SEC mAb 200A, 2.5um 컬럼 WATERS)는 등용매 0.575mL/분 유량으로 이동상으로 PBS를 사용하는 WATERS로부터의 ACQUITY H-클래스 Bio를 사용하여 수행되었다.

[0164] HPLC-SCX 크로마토그래피(컬럼: BioResolve SCX mAb 컬럼, 3μm, 4.6mm x 100mm)는 MES pH5를 이동상으로 사용하고 0.9mL/분 유량에서 전하 변이체를 분리하는 데 사용되는 염 구배를 사용하는 WATERS로부터의 ACQUITY H-클래스 Bio를 사용하여 수행되었다.

[0165] 전술한 프로토콜을 사용하여 각 샘플 10uL를 H-SEC/H-SCX 모두에 주입하였다. 각 분자에 대해 모노머 종의 백분율과 면적(단백질 농도를 나타냄)을 결정하였다.

[0166] PetML119/122는 모두 HSEC에 의해 매우 높은 순도(99% 초과)를 나타냈으며 HSCX에 의해 전하 변이체(잠재적으로 다른 글리코형에 해당)가 거의 관찰되지 않았다.

[0167] **4. 스트레스 테스트(도 4)**

[0168] 냉동 및 해동 테스트:

[0169] PBS 중 5mg/mL의 PetML119 50uL 분취량을 준비하고 밀봉된 PCR 튜브에 4℃(분자당 1분취량) 또는 -80℃(분자당 3분취량)에서 보관하였다. -80℃ 분취량을 실온에서 5분 만에 해동하고 1개 분취량을 남기고 -80℃에서 다시 보관하였다(1회 냉동 및 해동). 이를 2번 더 반복한 다음(2회 및 3회 냉동 및 해동 주기), 10uL의 각 샘플(4℃ 대조군 포함)을 상기와 동일한 방법을 사용하여 H-SEC에 주입하였다. 각 분자/냉동 및 해동 주기에 대해 모노머 종의 백분율 및 면적(단백질 농도를 나타냄)을 결정하고 참조 실행(4℃에 보관된 샘플)과 비교하였다.

[0170] PetML119는 냉동 및 해동에 대한 우수한 저항성을 보였으며 3주기 동안 단백질 손실은 미미하였다.

[0171] 열 및 화학적 스트레스:

[0172] PBS 또는 PBS+100mM DTT 중 5mg/mL의 PetML119 50uL 분취량을 준비하고 상이한 온도(25℃, 37℃, 60℃, 70℃ 및 95℃)에서 30분 동안 인큐베이션하였다.

[0173] 40uL의 각 조건을 10uL의 NuPAGE™ LDS 샘플 완충액(NP0007)로 희석하였다. 10uL을 NuPAGE™ 10%, Bis-Tris, 1.0mm, 미니 단백질 겔, 12-웰(NP0302BOX)에 로딩하고 120V에서 45분 동안 실행하였다. 겔을 InstantBlue® Coomassie Protein Stain(ISB1L)(ab119211)으로 10분 동안 염색하고 ddH2O에서 1시간 동안 탈염색하였다. 그 다음 SDS-PAGE는 표준 트랜스조명장치 장비를 사용하여 획득되었다.

[0174] 결과에 따르면 PetML119는 온도와 화학적 스트레스 모두에서 매우 안정적이며, 이는 70℃ 초과의 온도에서 인큐베이션할 때만 전개를 보여준다.

[0175] **5. 단백질 A 결합 친화성 검증**(도 5)

[0176] PBS 중 정제된 융합 단백질(PetML119 및 PetML122)을 원심 농축기(Sartorious - VS02H22)를 사용하여 5mg/mL로 농축하였다. 단백질 농도를 NanoDrop™ One(Thermo Scientific™)을 사용하여 280nm에서 UV 흡광도를 사용하여 평가하였다.

[0177] 단백질 A에 대한 융합 단백질의 결합 친화도는 Biacore 8K(Cytiva)를 사용하여 평가되었다.

[0178] 간략하게, 센서 칩 단백질 A(Cytiva)를 Biacore 8K에 도킹하고 RT에서 30분 동안 평형화한 다음, 실행 완충액(10mM HEPES pH7.4 150mM NaCl 3mM EDTA 및 0.005% Tween20)을 SPR 칩 표면에 적용하였다.

[0179] 융합 단백질 희석액은 PetML119/122를 실행 완충액에서 1uM에서 4nM(1:3 희석으로 6가지 농도)로 희석하여 제조되었고, 동역학은 단일 주기 동역학 방법(Biacore Assay Handbook, Cytiva)을 사용하여 평가되었다. 동역학 및/또는 친화도 정량화는 표준 분석 방법에 따라 Biacore Insight를 사용하여 수행되었다.

[0180] 결과는 PetML122에 대한 단백질 A 결합이 도입된 YTE 돌연변이에 의해 약간 영향을 받고 PetML119에 비해 더 빠른 해리가 관찰된다는 것을 보여준다. 이로 인해 단백질의 품질은 비슷하지만 단백질 A 정제 후 수율이 낮아진다.

[0181] **6. FcRn 결합 친화성 검증(도 6)**

[0182] PBS 중 정제된 융합 단백질(PetML119 및 PetML122)을 원심 농축기(Sartorious - VS02H22)를 사용하여 5mg/mL로 농축하였다. 단백질 농도를 NanoDrop™ One(Thermo Scientific™)을 사용하여 280nm에서 UV 흡광도를 사용하여 평가하였다.

[0183] Fc 신생아 수용체에 대한 융합 단백질의 결합 친화도는 Biacore 8K(Cytiva)를 사용하여 평가되었다.

[0184] 간략하게, CM5 센서 칩(Cytiva)를 Biacore 8K에 도킹하고 RT에서 30분 동안 평형화한 다음, 실행 완충액(10mM HEPES pH6 150mM NaCl 3mM EDTA 및 0.005% Tween20)을 SPR 칩 표면에 적용하였다.

[0185] 개과 쥣 FcRn-B2M 재조합 단백질(Immunitrack, ITF12 - ITF08)을 4nM(스톡에서 1:2000 희석)으로 10mM 아세테이트 완충액 pH4.5에 희석하고 표준 아민 커플링 반응을 사용하여 고정화하였다.

[0186] 융합 단백질 희석액은 실행 완충액에서 3uM 내지 37nM(1:3 희석의 5가지 농도)로 제조되었으며 동역학은 다중 주기 동역학 방법(120초 결합 - 300초 해리)을 사용하여 평가되었다. 동역학 및/또는 친화도 정량화는 표준 분석 방법에 따라 Biacore Insight를 사용하여 수행되었다.

[0187] PetML122의 경우 FcRn에 대한 결합 친화도가 10배 증가한 것으로 나타났으며, 이는 삼중 돌연변이 YTE가 개과 및 쥐의 신생아 수용체 모두에 대한 결합에 긍정적인 영향을 미쳤음을 확인시켜 준다. 특히, 확장된 해리 속도가 관찰되었다.

[0188] **7. 인간 및 랫트 신경 성장 인자 (h-rNGF) 결합 친화도 결정** (도 7)

[0189] PBS 중 정제된 융합 단백질 (PetML119)을 원심 농축기(Sartorious - VS02H22)를 사용하여 5mg/mL로 농축하였다. 단백질 농도를 NanoDrop™ One(Thermo Scientific™)을 사용하여 280nm에서 UV 흡광도를 사용하여 평가하였다.

[0190] 인간 및 랫트 NGF에 대한 융합 단백질의 결합 친화도는 Biacore 8K(Cytiva)를 사용하여 평가되었다.

[0191] 간략하게, 단백질 A 센서 칩(Cytiva)를 Biacore 8K에 도킹하고 RT에서 30분 동안 평형화한 다음, 실행 완충액(10mM HEPES pH7.4 150mM NaCl 3mM EDTA 및 0.005% Tween20)을 SPR 칩 표면에 적용하였다.

[0192] PetML119를 6nM 농도의 실행 완충액으로 희석하였다. 이들은 캡처 단계로 10uL/분의 90초 결합을 사용하여 고정화된 다음, 실행 완충액을 주입하여 임의의 비결합된 생성물을 제거하였다.

[0193] 인간 및 랫트 NGF(Bio-Techne Ltd - 556-NG/CF/256-GF-100/CF)를 실행 완충액에서 100nM로 희석하고 1:2로 추가 희석하여 4.68nM까지 낮추었다. 동역학은 포획 단계 방법(30초 결합 - 120초 해리)에 이어, 재생 단계(0.1M 글리신 pH2.2 접촉 시간 60초 FR 30uL/분)을 갖는 다중 주기 동역학을 사용하여 평가되었다. 동역학 정량화는 표준 분석 방법에 따라 Biacore Insight를 사용하여 수행되었다.

[0194] 결과는 PetML119를 사용하여 인간 및 랫트 NGF 모두에 대해 나노몰 미만의 KD를 보여주었다.

[0195] **8. 온전한 질량 분석**

[0196] PBS 중 정제된 융합 단백질(PetML119 및 PetML122)을 원심 농축기(Sartorious - VS02H22)를 사용하여 1mg/mL로 농축하였다. 단백질 농도를 NanoDrop™ One(Thermo Scientific™)을 사용하여 280nm에서 UV 흡광도를 사용하여 평가하였다.

[0197] LC-MS 분석은 BioResolve RP mAb 폴리페닐 컬럼, 450Å, 2.7μm, 2.1 x 50mm 및 WATERS의 ACQUITY UPLC® I-Class Plus를 사용하여 BioAccord에서 수행되었다.

[0198] 간략하게, 각 융합 단백질 3pmol(LC-MS 등급 H2O로 희석)을 RP 컬럼에 주입하고 용출액 피크를 MS로 분석하였다. 온전한 질량 분석은 H-SCX에서 관찰한 것과 일관되게 상이한 정도의 글리코실화에 해당하는 여러 종의 존재를 보여주었다.

[0199] 온전한 분자는 종의 혼합물인 것으로 보인다. 관찰된 질량은 96158-97836 Da이다. 기본 종의 질량(96158Da)은 분자에서 예상되는 글리코실화 부위의 총 수와 일치하는 Fc 융합 aa 20-241 + 4 글리칸의 이량체와 일치한다. 추가 종은 글리칸의 추가 장식과 일치한다.

[0200] **9. 전개 및 올리고머화 결정(도 4)**

[0201] PBS 중 정제된 융합 단백질 (PetML119)을 원심 농축기(Sartorious - VS02H22)를 사용하여 3mg/mL로 농축하였다. 단백질 농도를 NanoDrop™ One(Thermo Scientific™)을 사용하여 280nm에서 UV 흡광도를 사용하여 평가하였다.

[0202] Tm 및 Tagg 분석은 표준 프로토콜을 사용하여 Unchained 실험실의 UnCle에서 수행되었다.

[0203] 간략하게, 10uL의 융합 단백질이 온도 상승(25℃에서 95℃까지) 동안 전개 및 응집 이벤트를 결정하는 데 사용되었다. 이전 결과에서 예상한 대로, PetML119는 Tm1이 67℃ 부근에서 최대 95℃까지 응집을 나타내지 않았다.

[0204] **10. 시험관 내 NGF 억제 검정(도 8)**

[0205] p75 융합 단백질의 생물학적 활성을 평가하기 위해, NGF 의존성(세포주 TF-1 세포주)을 사용하였다. 세포는 장기간 성장을 위해 인터루킨 3(IL-3) 또는 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)에 전적으로 의존한다. 세포는 인터루킨 5(IL-5)에 반응하지 않는다. TF-1 세포는 다양한 다른 림포카인 및 사이토카인 예컨대 인터류킨 1 (IL-1), 인터류킨 4 (IL-4), 인터류킨 6 (IL-6), 인터류킨 9 (IL-9), 인터류킨 11 (IL-11), 인터류킨 13 (IL-13), 줄기 세포 인자 (SCF), 백혈병 억제 인자 (LIF) 및 신경 성장 인자 (NGF)에 반응한다.

[0206] 융합 단백질에 의한 NGF의 능숙한 격리는 대조군에 비해 증식이 느려지게 된다.

[0207] TF-1 세포주는 ATCC(CRL-2003)에서 구입하고 완전 RPMI(10% FBS + 2mM l-Gln + 10ng/mL hNGF)를 사용하는 표준 무균 방법을 사용하여 배양에서 유지되었다.

[0208] 200만 개의 TF-1 세포를 1mL의 RPMI 중 2.5uM CFSE 세포 트레이스(Invitrogen - C34554)으로 암실에서 실온에서 30분 동안만 표지하였다. 그 다음 세포를 완전한 RPMI 배지에서 2회 세척하고 다시 계수하고, 24-웰 플레이트에 10000세포/mL(웰당 총 부피 1mL)로 시딩하였다.

[0209] PetML119/122 또는 대조군의 희석(베딘베트맙 - 항-NGF IgG 대조군, 관련 없는 융합 단백질 및 음성 대조군으로서 NGF가 없는 RPMI, WHO Drug Information, Vol. 32, No. 4, 2018 -pg568)는 3uM 농도에서 91.25nM까지 100uL의 RPMI 배지에 희석되었다. 100uL의 단백질 희석액을 각 웰에 첨가하였다. 간략하게, 중쇄 및 경쇄 모두에 대해 공개된 베딘베트맙 aa 서열을 사용하여 (CHO 발현을 위해) 최적화된 코돈 cDNA를 생성하였다. HC와 LC cDNA 모두 표준 peggy-bac 플라스미드를 사용하여 프레임에 클로닝되었다. CHO는 위와 같이 안정적으로 형질감염되었다.

[0210] 플레이트를 3일 후에 분석하였다. 간략하게, 1mL 세포 현탁액을 300g RT에서 5' 원심분리하고, FACS 완충액(PBS + 3% FBS + 3mM EDTA)으로 2회 세척하고, 최종적으로 100uL의 FACS 완충액에 재현탁시켰다. 다음 매개변수(FSC:20; SSC:50; FITC:1; 역치: 1313131)를 사용하여 CytoFLEX 유동 세포측정기를 사용하여 세포를 획득하였다. 세포는 FITC 형광(더 많은 형광성, 더 적은 증식)을 기준으로 게이팅되었고, NGF 없이 RPMI에서 배양된 100% 억제 TF-1 세포 및 완전 RPMI 배지와 함께 배양된 0% 억제 세포를 고려하여 증식 억제 %를 계산하였다. 그래프 패드를 사용하여 IC50 값을 계산하였다.

[0211] PetML119/122와 베딘베트맙은 모두 용량 의존 방식으로 TF-1 증식을 억제할 수 있었다.

표 1

	PetML119	PetML122	베딘베트맙
IC50 (nM)	15.25	5.91	1.645

[0212]

[0213] 11. 랫트의 MIA 유도 OA(효능 및 pK) - 도 9 내지 12)

[0214] PetML119/122의 효능 및 반감기는 OA 랫트 모델을 사용하여 분석되었다. 자세한 프로토콜은 아래와 같다. 모델은 도 9에 보여진다.

[0215] **관절염 유도**

[0216] 골관절염은 이소플루란 마취 하에 랫트의 오른쪽 뒷다리 무릎 관절에 3 mg의 모노나트륨-요오도아세테이트(MIA)(25 μL 식염수 중)을 관절 내(I.A.) 주사하여 화학적으로 유발되었다. 마취 하에, 안과 연고를 양쪽 눈에 도포하였다. MIA의 I.A. 주사는 0일차로 계수되었다.

[0217] **치료군에 대한 할당**

[0218] 모든 랫트에 대해 기본 동적 체중 지탱(DWB)를 측정하였다. 동시에 체중(BW)도 측정되었다. 랫트를 마취시키고 경골에 대략 수직인 무릅뼈 힘줄의 중간을 통해 오른쪽 무릎 관절에 MIA를 주입하였다(관절내(I.A.)). MIA의 I.A. 주사에 대한 용량 수준은 설치류에 대한 이전 문헌 보고서를 기반으로 선택되었다(문헌[Bove 등: Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. Osteoarthritis Cartilage. 2003 Nov;11(11):821-830]). MIA 주사된 사지(오른쪽)와 건강한 사지(왼쪽) 사이에 상당한 체중 지탱 차이를 보이는 동물은 연구에 할당되었다. 무작위화는 기준선 DWB와 BW(2개 변수 무작위화)를 기반으로 수행되었다.

[0219] **동적 체중 지탱(DWB) 평가**

[0220] 동적 체중 지탱는 제조업체 매뉴얼에 따라 BioSeb® 자동화 DWB 시스템을 사용하여 평가되었다. 각 랫트에 대해 2분간의 녹음이 이루어졌다. 동적 체중 지탱 데이터 분석은 BioSeb® 소프트웨어를 사용하여 오프라인으로 수행되었다. 시스템은 각 사지와 꼬리가 지탱하는 중량을 자동으로 계산된다. 각 테스트 시간 동안 DWB 직전에 각 랫트의 체중을 측정하였다. DWB 측정은 연구 설계의 일정에 따라 상이한 시점에서 수행되었다. DWB 데이터 분석 중에 총 이동 거리도 기록되었다.

[0221] **테스트 항목으로 투약**

[0222] 아래 표에 묘사된 대로 3일째에 지정된 용량으로 테스트 항목과 함께 그룹 1-2 랫트는 비히클의 정맥내 (IV) 주사제를 받았고 그룹 3-7 랫트는 IV 주사를 받았다. 그룹 8 랫트는 아래 표에 묘사된 대로 3일 내지 21일째에 1일 1회 덱사메타손을 경구 위관영양법 투약 받았다.

[0223] **PETML119/122를 사용하는** 모노나트륨-요오도아세테이트 **(MIA) 유도 OA 랫트 연구**

[0224] **연구 설계**

표 2

*Gr.	그룹 치료	TI 용량 수준	TI 경로, 부피	TI 투약 일정	DWB 테스팅	N
1	나이브/ 비히클 PBS	0	IV, 5mL/kg	3일째, QD	1일째 (기준), 3, 6, 14, 21일째	10
2	3mg MIA/ 비히클 PBS	0	IV, 5mL/kg	3일째, QD	1일째 (기준), 3, 6, 14, 21일째	10
3	3mg MIA/ 샘플 1 (PetML119), 저용량	0.5 mg/kg	IV, 5mL/kg	3일째, QD	1일째 (기준), 3, 6, 14, 21일째	10
4	3mg MIA/ 샘플 1 (PetML119), 중간 용량	1.5 mg/kg	IV, 5mL/kg	3일째, QD	1일째 (기준), 3, 6, 14, 21일째	10
5	3mg MIA/ 샘플 1 (PetML119), 고용량	5 mg/kg	IV, 5mL/kg	3일째, QD	1일째 (기준), 3, 6, 14, 21일째	10
6	3mg MIA/ 샘플 2 (PetML122)	5 mg/kg	IV, 5mL/kg	3일째, QD	1일째 (기준), 3, 6, 14, 21일째	10
7	3mg MIA/ 샘플 3 (베딘베트맙)	5 mg/kg	IV, 5mL/kg	3일째, QD	1일째 (기준), 3, 6, 14, 21일째	10
8	3mg MIA/ 덱사메타손	1 내지 7일째로부터의 1 mg/kg 및 8 내지 21일째로부터의 0.3mg/kg	PO, 10ml/kg	3 내지 21일째 QD	1일째 (기준), 3, 6, 14, 21일째	10

*그룹 2 내지 8의 동물 및 예비 동물은 MIA(3mg/25뮤기호L 식염수)를 단일 관절내(IA) 주사하고 **MIA 주사일은** (오른쪽 무릎 관절에서) **0일째로 간주된다**.

IV: 정맥내 (꼬리 정맥); PO: 경구 위관영양법; QD-1일 1회

[0225]

[0226] 연구 동안 치료된 동물에서 임의의 임상 징후가 관찰되었다. DWB는 3, 6, 14 및 21일째에 분석되었다. 관절 직경은 3, 6, 14 및 21일째에 오른쪽 무릎 관절(중앙-외측)의 캘리퍼를 사용하여 측정되었다.

[0227] 간략하게, PetML119(상이한 용량)와 122(단회 용량) 모두 항-NGF 벤치마크(베딘베트맙)를 능가하는 우수한 진통 효과를 보여주었다(도 10). 또한 NSAID의 부작용을 나타내지 않으면서 덱사메타손을 매일 투여하는 것과 유사한 활성을 보여주었다(체중 감소 - 도 11).

[0228] 대체 일에 표준 절차를 사용하여 그룹당 5마리의 랫트로부터 PK 채혈을 수행하였다.

[0229] **혈청 pk 분석(도 12)**

[0230] 융합 단백질의 혈청 수준을 정량화하기 위한 샌드위치 ELISA는 다음과 같이 설정되었다:

[0231] · PBS + 0.1M 중탄산나트륨에 희석한 2ug/mL 포획 항체(마우스 항-개과 p75 Ab --> MAB367-SP (Novus Bio)) 30uL를 4℃에서 밤새 절반 영역 ELISA 플레이트 (마이크로플레이트, 96 WELL, PS, 절반 AREA, CLEAR, 항목 번호: 675061)에 고정시켰다.

[0232] · 플레이트를 200uL 차단 용액(PBS + 5%DNFM + 0.2% Tween20)으로 2회 세척하고 모든 웰에 150uL의 차단 용액을 사용하여 실온에서 3시간 동안 차단을 수행하였다.

[0233] · 랫트 연구의 상이한 시점/그룹의 혈청을 차단 용액(2uL 혈청 + 198uL 차단 용액)에 100배 희석하고 30uL를 관련 웰에 첨가하였다. PetML119/122의 표준은 융합 단백질을 1:5 희석으로 100ug/mL에서 1ng/mL까지 랫트 혈청

으로 희석하여 제조되었다. 그 다음 표준을 차단 용액에 100배 희석하고 30uL를 관련 웰에 추가하였다.

[0234] · 혈청을 450rpm 진탕하면서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0235] · 플레이트를 200uL 차단 용액으로 2회 세척하였고; 검출 항체(SA5-10309(ThermoFisher))를 차단 용액에 1:40000으로 희석하고 30uL를 각 웰에 첨가하고 450rpm 진탕하면서 실온에서 30분 방치하였다.

[0236] · 플레이트를 200uL 차단 용액으로 2회 세척하였고; 개발 중인 HRP 접합 항체(A16035(ThermoFisher))를 차단 용액에 1:10000으로 희석하고 30uL를 각 웰에 첨가하고, 450rpm 진탕하면서 실온에서 30분 방치하였다.

[0237] · 플레이트를 200uL 차단 용액으로 2회 세척한 다음, 200uL의 PBS + 0.2% Tween20으로 2회 세척하고 마지막으로 50uL의 TMB(TMB 색원체 용액(ELISA용) --> 002023)를 각 웰에 첨가하였다. 10분 후, 표준 곡선이 처음 두 지점에서 포화를 보여준 경우, 50uL의 1M 황산을 첨가하여 반응을 중단하였다.

[0238] · 모든 웰은 650nm 및 450nm에서 종점 흡광도를 사용하여 CLARIOstar Plus(BMG LABTECH)로 판독되었다. 그래프 패드에서 값을 가져왔고 단상 감쇠 피팅을 적용하여 이들의 반감기를 추정하였다.

[0239] 상이한 용량의 PetML119는 유사한 반감기(약 70시간)를 보인 반면, PetML122는 연장된 반감기(약 10.5일)를 보여주었으며 도 12를 참조한다.

[0240] **12. 개에서 OA 유도 후 PetML119 및 PetML122의 약동학 및 약력학 연구**

[0241] PetML119 및 PetML122의 안전성 프로파일, 약동학 및 약력학 매개변수는 OA 유도 후 개에게 1.5 mg/kg의 단일 정맥내 투여 후 평가되었다(요산염 결정 모델). 연구는 문헌[Toutian 등, J. vet. Pharmacol. Therap. 24, 43-55, 2001]에서 프로토콜과 유사하게 수행되었다.

[0242] 본 연구는 2-그룹, 4-기간, 4-치료, 및 3순서에 따라 진행되었다. 10마리의 개를 사용하였다.

[0243] 4가지 치료법이 테스트되었다:

[0244] A. 양성 대조군(Meloxicam) Per Os.

[0245] B. 음성 대조군(비히클) 정맥내 주입.

[0246] C. PetML119(1.5mg/kg) 정맥내 주입.

[0247] D. PetML122(1.5mg/kg) 정맥내 주입

표 3

[0248]

그룹 번호	기간 1	기간 2	기간 3	기간 4
1	A	B	C	/
2	B	A	D	/

[0249] 가역적 요산염 결정 윤활막염 모델을 사용하여 실험적 급성 윤활막염을 유도하였다. 요산나트륨 결정 현탁액을 10mg/mL의 농도로 제조하였다. 프로포폴을 관절내 주사를 통해 전신 마취를 유도하였다. 각 기간마다 대체 무릎 관절이 사용되었다.

[0250] 비히클 및 테스트 항목(PetML119/PetML122) 치료 투여(정맥내 전달에 의해)는 급성 윤활막염 유도 3일 전(3일째)에 수행되었다. 멜록시캄 치료 투여는 급성 윤활막염 유도 직전(T-0.5h)에 수행되었다. 치료 투여는 파행이 최대로 유도된 시점(즉, 급성 윤활막염 유도 후 2시간 내지 3시간)에 최대 치료 효과를 얻도록 설계되었다.

표 4

기간	연구 일	이벤트
기간 1	-4일째 내지 -1일째 2022년 1월 13일에서 16일	- 효능 평가. 사전 유도 (시각적 파행 점수 및 최고치 수직력의 측정) - **비히클 투여 (윤활막염 유도 3일 전) 그룹 2** - 밤새 공복 (적어도 12시간)
	0일째 2022년 1월 17일	동물 칭량 - **멜록시캄 투여 (윤활막염 유도 30분 전) 그룹 1** - 윤활막염 유도 (T0) - 효능 평가: 요산염 결정 유도 후 T1.5h, T2.75h - 식품 분포 (T2.75 h 평가 후) - 효능 평가: 요산염 결정 유도 후 T4h, T5.25h, T6.5h
기간 2	-4일째 내지 -1일째 2022년 1월 27일에서 30일	- 효능 평가. 사전 유도 (시각적 파행 점수 및 최고치 수직력의 측정) - **비히클 투여 (윤활막염 유도 3일 전) 그룹 1** - 밤새 공복 (적어도 12시간)
	0일째 2022년 1월 31일	- 동물 칭량 - **멜록시캄 투여 (윤활막염 유도 30분 전) 그룹.** - 윤활막염 유도 (T0) - 효능 평가: 요산염 결정 유도 후 T1.5h, T2.75h - 식품 분포 (T2.75 h 평가 후) - 효능 평가: 요산염 결정 유도 후 T4h, T5.25h, T6.5h
기간 3	-4일째 2022년 2월 10일	- 테스트 항목 투여 전의 혈액학 생화학 및 혈장 바이오마커 T-24h를 위한 혈액 샘플링 - 효능 평가 사전 유도 (시각적 파행 점수 및 최고치 수직력의 측정)
	-3일째 2022년 2월 11일	- 사전 용량 혈액 샘플링 - **테스트 항목 투여 (윤활막염 유도 3일 전) 모든 그룹** - 밤새 공복 (적어도 12시간)
	-2일째 2022년 2월 12일	- 테스트 항목 투여 후의 혈액 샘플링 T24h.
	-1일째 2022년 2월 13일	- 테스트 항목 투여 후의 혈액 샘플링 T48h.
	0일째 2022년 2월 14일	- 테스트 항목 투여 후의 혈액 샘플링 T72h. - 동물 칭량 - 윤활막염 유도 (T0) - 효능 평가: 요산염 결정 유도 후 T1.5h, T2.75h - 식품 분포 (T2.75 h 평가 후) - 효능 평가: 요산염 결정 유도 후 T4h, T5.25h, T6.5h
	4일째	- 테스트 항목 투여 후의 혈액 샘플링 T168h.

[0251]

	2022년 2월 18일	
	11일째 2022년 2월 25일	- 테스트 항목 투여 후의 혈액 샘플링 T336h. - 테스트 항목 후의 혈액학 생화학 T336h에 대한 혈액 샘플링 투여
	18일째 2022년 3월 04일	테스트 항목 투여 후의 혈액 샘플링 T504h.
기간 4	-1일째 2022년 3월 10일	- 효능 평가 사전 유도 (시각적 파행 점수 및 최고치 수직력의 측정) - 밤새 공복 (적어도 12시간)
	0일째 2022년 3월 11일	테스트 항목 투여 후의 혈액 샘플링 T672h. 동물 칭량 윤활막염 유도 (T0) 효능 평가: 요산염 결정 유도 후 T1.5h, T2.75h 식품 분포 (T2.75 h 평가 후) 효능 평가: 요산염 결정 유도 후 T4h T5.25h, T6.5h
동물 추적	2022년 3월 28일	테스트 항목 투여 후의 혈액 샘플링 T1080h (45일째)
	2022년 4월 12일	테스트 항목 투여 후의 혈액 샘플링 T1440h (60일째)

[0252]

[0253] **안전성**

[0254] 각 동물은 매일 적어도 1회 관찰되었으며 비정상적인 발견은 보고되지 않았다. 혈액학적 매개변수를 수집하고 표 4에 표시된 시점에 동물을 칭량하였다. 혈액 샘플은 교대 부위의 경정맥 또는 두부 정맥에서 채취되었다.

[0255] 생체 내 융합 단백질 처리 후 생성된 혈청에서 잠재적인 항-약물 항체(ADA)를 식별하기 위한 샌드위치 ELISA는 다음과 같이 설정되었다:

[0256] · PBS + 0.1M 중탄산나트륨에 희석한 2ug/mL PetML119 또는 PetML122 (2개의 플레이트) 30uL를 4℃에서 밤새 절반 영역 ELISA 플레이트 (마이크로플레이트, 96 WELL, PS, 절반 AREA, CLEAR, 항목 번호: 675061)에 고정시켰다.

[0257] · 플레이트를 200uL 차단 용액(PBS + 5%DNFM + 0.2% Tween20)으로 2회 세척하고 모든 웰에 150uL의 차단 용액을 사용하여 실온에서 3시간 동안 차단을 수행하였다.

[0258] · 랫트/개 연구의 상이한 시점/그룹의 혈청을 차단 용액(2uL 혈청 + 198uL 차단 용액)에 100배 희석하고 30uL를 관련 웰에 첨가하였다. 표준 표준 항 PetML119/122 Ab(1ng/mL의 MAB367)는 20uL의 쥐/개 혈청 + Ab로 제조된 다음 1:2 희석으로 희석되었다. 그 다음 표준을 차단 용액에 100배 희석하고 30uL를 관련 웰에 추가하였다.

[0259] · 혈청을 450rpm 진탕하면서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다.

[0260] · 플레이트를 200uL 차단 용액으로 2회 세척하였고; 검출 항체(SA5-10309(ThermoFisher))를 차단 용액에 1:20000으로 희석하고 30uL를 각 웰에 첨가하고 450rpm 진탕하면서 실온에서 30분 방치하였다.

[0261] · 플레이트를 200uL 차단 용액으로 2회 세척하였고; 개발 중인 HRP 접합 항체(A16035(ThermoFisher))를 차단 용액에 1:10000으로 희석하고 30uL를 각 웰에 첨가하고, 450rpm 진탕하면서 실온에서 30분 방치하였다.

[0262] · 플레이트를 200uL 차단 용액으로 2회 세척한 다음, 200uL의 PBS + 0.2% Tween20으로 2회 세척하고 마지막으로 50uL의 TMB(TMB 색원체 용액(ELISA용) --> 002023)를 각 웰에 첨가하였다. 10분 후, 표준 곡선이 처음 두 지점에서 포화를 보여준 경우, 50uL의 1M 황산을 첨가하여 반응을 중단하였다.

[0263] · 모든 웰은 650nm 및 450nm에서 종점 흡광도를 사용하여 CLARIOstar Plus(BMG LABTECH)로 판독되었다. 그래프 패드에서 값을 가져왔고 단상 감쇠 피팅을 적용하여 이들의 반감기를 추정하였다.

[0264] **결과**

[0265] PetML119/PetML122 투여 후 체중(도 13a) 및 혈액학적 매개변수는 변경되지 않았다.

[0266] ADA 분석(도 13b)의 경우, PetML119/PetML122로 처리된 동물의 두 혈청 모두 사전 용량 대조군과 비슷한 기본 신호를 나타냈는데, 이는 실험 기간 동안 항-약물 항체가 생성되지 않았음을 나타낸다.

[0267] **효능**

[0268] 테스트 항목의 항염증 및 진통 효능을 평가하기 위해 두 가지 매개변수를 조사하였다: 시각적 파행 점수(VLS, 평점 체계를 사용하여 결정) 및 힘판으로 측정된 뒷다리의 지면에 가해지는 수직력(VF, 뉴턴으로 표시). 힘판은 디지털 아날로그 획득 카드와 신호 처리 소프트웨어가 장착된 컴퓨터에 연결되었다. 힘판(8개의 비늘로 제작)을 폭 50cm 및 길이 약 5m의 경로에 삽입하여 개들이 일정하고 유사한 속도로 리드(lead) 위에서 걷도록 훈련시켰다. 최대 치료 효과 및 최대 유발 파행을 기준으로, 효능 평가를 유도 전 및 유도 후 1.5시간, 2.75시간, 4시간, 5.25시간 및 6.5시간(시점당 ± 10분)에 수행하였다.

[0269] *파행 비율*

[0270] VF 값은 사지가 힘판에 놓일 때 얻어졌다. 개는 뒷다리에 대해 해석 가능한 3가지 값을 얻고 사지의 평균 힘을 계산하기 위해 힘판 경로를 적어도 5회 통과하였다. 치료 후 가해지는 힘과 동일한 뒷다리의 사전 용량에 가해지는 힘(기준 힘)의 비율을 '파행 비율'로 지칭하였다. 이 매개변수는 염증이 없을 때 적용되는 힘과 관련하여 유도된 사지에 의해 적용되는 힘을 기재한다. 보행 단계에서 체중 지탱 없이 심한 파행이 관찰되는 경우, 수직력을 측정하지 않고 파행 비율을 0으로 간주하였다.

[0271] *시각적 파행 점수*

[0272] 다음과 같이 자세히 설명된 반정량 척도에 따라 개는 기립 동안과 보행 동안(평점 전 약 1분 동안) 파행에 대해 점수를 매겼다:

[0273] 표 5

보행 동안 관찰	점수
전체 체중 지탱(지면에 있는 모든 디지털 패드 접촉)	0
부분 체중 지탱(지면에 디지털 패드의 일부만 접촉)	1
발가락 접촉에 체중이 지탱되지 않음	2

[0274] 표 6

보행 동안 관찰	점수
완전한 체중 지탱, 파행 없음	0
부분적인 체중 지탱으로 인한 약간의 파행: 거의 인지할 수 없는 파행	1
부분적인 체중 지탱을 동반한 중간 정도의 파행: 동물은 사지를 지면에 약간 얹는다	2
체중 지탱이 없는 심각한 파행: 동물이 사지를 사용하지만 사지에 체중을 싣지 않고/거나 사지를 지면에 놓는 것을 피한다	3

[0275] 파행 시각적 점수를 합쳐서 기립 단계와 보행 단계 점수의 합으로 간주하였다.

[0276] 결과

[0277] 치료 후, PetML119와 PetML122는 모두 급성 통증에 대한 최적 표준인 멜록시캄에 비해 개선된 효능을 나타내었다(도 14). 더욱이, PetML119와 PetML122는 장기간의 통증 완화를 위해 단회 용량만으로 충분하다는 추가적인 이점을 가지고 있다. 대조적으로, 멜록시캄 또는 다른 기존 치료법은 매일 투여해야 하므로 순응도가 떨어지고 동물에 대한 스트레스가 증가한다.

[0278] **혈청 pk 분석**

[0279] 혈액 샘플은 기간 3 이전과 기간 동안 다음 목표 시점에 수집되었다:

[0280] T24h, T48h, T72h, (사전 유도 기간 3) 및 T168h, T336h, T504h (사전 유도 기간 4) 및 T672h 투약 후 정맥내

테스트 항목 투여 후. 투약 후 45일 및 60일에 추가 혈액 샘플을 수집하였다.

[0281] pK 값을 측정하기 위한 샌드위치 ELISA는 상기 실시예 11에 기재된 바와 같다.

[0282] 결과

[0283] PetML122는 PetML119의 반감기(약 4일)에 비해 연장된 반감기(약 19일)를 보여주었다(도 15 참조).

[0284] **서열**

[0285] **서열번호 1 개과 p75NTR 단백질**

KEACPTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTE
CVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDRQNTVCEE
CPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPGRWITRSTPSEDSDST
APSTEEPELPPDQEIIASTMADVVTTVMGSSQPVVTRGTADNLIPVYCSILAAVVVGLVA
YIAFKRWNSCKQNKQGANSRPVNQTPPPEGEKLHSDSGISVDSQSLHDQQPHTQTAAGQA
LKGDGGLYSSLPPAKREEVEKLLNGSAGDTWRHLAGELGYQPEHIDSFTHEACPARALLA
[0286] SWAAQDSATLDALLAALRRIQRADIVESLCSESTATSPV

[0287] ECD에 밑줄이 그어져 있다

[0288] **서열번호 2 개과 p75NTR 핵산 서열**

ATGGACGGGCCGCGCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTCCTGGGGGGTGTCCCTTGGAGGTGCC
AAGGAGGCATGTCCCACTGGCCTGTACACCCACAGCGGCGAGTGCTGCAAAGCCTGCAATCTGG
GTGAGGGGGTGGCCCAGCCTTGCGGAGCCAACCAGACCGTGTGTGAGCCCTGCCTGGACAGCG
TGACCTTCTCGGACGTGGTGAGCGCCACCGAGCCGTGCAAGCCGTGCACCGAGTGCGTGGGGC
TGCAGAGCATGTCGGCGCCGTGCGTGGAGGCGGACGACGCCGTGTGCCGCTGCGCCTACGGC
TACTACCAGGACGAGACGACGGGCCGCTGCGAGGCGTGCCGCGTGTGCGAGGCGGGCTCGGG
GCTCGTGTTCTCGTGCCAGGACAGGCAGAACACCGTGTGCGAGGAGTGTCCCGACGGCACGTA
CTCCGACGAGGCCAACCACGTGGACCCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCGAGCG
CCAGCTGCGCGAGTGCACGCGCTGGGCCGACGCCGAGTGCGAGGAGATCCCTGGCCGTTGGA
TTACCCGGTCCACACCCTCAGAGGACTCGGACAGCACCGCCCCCAGCACAGAGGAGCCAGAGC
TACCTCCAGATCAAGAAATCATAGCCAGCACCATGGCAGATGTGGTGACCACAGTGATGGGCAG
CTCTCAGCCTGTAGTGACCCGAGGAACCGCTGACAACCTCATCCCTGTCTACTGCTCCATCCTGG
CCGCCGTGGTTGTGGGCTTAGTGGCCTACATTGCCTTCAAGAGGTGGAACAGCTGCAAGCAGAA
CAAGCAAGGAGCCAACAGCCGGCCCGTGAACCAGACGCCTCCGCCGGAGGGAGAAAAGCTCCA
CAGTGACAGTGGCATCTCTGTGGACAGCCAGAGCCTGCATGACCAGCAGCCCCACACACAGACG
GCCGCAGGCCAGGCCCTCAAGGGGGATGGAGGTCTCTACAGCAGCCTGCCACCAGCCAAGCGG
GAGGAGGTGGAGAAGCTGCTCAATGGCTCTGCGGGGGACACCTGGCGGCACCTGGCAGGTGA
GCTGGGCTACCAGCCTGAGCACATAGACTCCTTCACCCACGAGGCCTGCCCAGCCCGAGCCCT
GCTTGCCAGCTGGGCCGCCCAGGACAGCGCGACGCTCGACGCCCTCCTGGCTGCTCTGCGCCG
CATCCAGCGAGCCGACATCGTGGAGAGCCTGTGTAGCGAGTCCACGGCCACGTCTCCAGTGTG
[0289] A

[0290] 선도 서열에 밑줄이 그어져 있다

[0291] **서열번호 3 고양이과 p75NTR 단백질**

KEACPTGLFTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTE
CVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDRQNTVCEE
CPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPGRWITRSTPSEGSDST
APSTEEPEVPPEQDLIASTVADVVTTVMGSSQPVVTRGTADNLIPVYCSILAAVVVGLVA
YIAFKRWNSCKQDKQGANSRPVNQTPPPEGEKLHSDSGISVDSQSLHDQQSHTQTAAGQA
LKGDGGLYSSLPSAKREEVEKLLNGSAGDTWRHLAGELGYQPEHIDSFTREACPARALLA
[0292] SWAAQDSATLDALLAALRRIQRADIVESLCSESTATSPV

[0293] ECD에 밑줄이 그어져 있다

[0294] **서열번호 4 고양이과 p75NTR 핵산 서열**

ATGGACGGGCCGCGCCCGCTGCTGCTGCTGTTGCCGCTGCTCCTGGGGGTGTCCCTTGGAGGT
GCCAAGGAGGCATGTCCCACGGGCCTGTTCACCCACAGCGGCGAGTGCTGTAAAGCCTGCAAC
CTGGGAGAGGGCGTAGCCCAGCCTTGCGGAGCCAACCAGACCGTGTGTGAGCCCTGCCTGGAC
AGCGTGACCTTCTCGGACGTGGTGAGCGCCACGGAGCCGTGCAAGCCGTGCACCGAGTGCGTG
GGCCTGCAGAGCATGTCGGCGCCGTGCGTGGAGGCCGACGACGCCGTGTGTCGCTGCGCCTA
CGGCTACTACCAGGACGAGACGACGGGCCGCTGCGAGGCGTGCCGCGTGTGCGAGGCGGGCT
CCGGCCTGGTGTTCTCGTGCCAGGACCGGCAGAATACCGTGTGCGAGGAGTGTCCCGACGGCA
CGTACTCGGACGAGGCCAACCACGTGGACCCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCG
AGCGCCAGCTGCGCGAGTGCACGCGCTGGGCCGACGCCGAGTGCGAGGAGATCCCTGGCCGT
TGGATTACTCGGTCTACACCTTCGGAGGGCTCGGACAGCACCGCCCCCAGCACGGAGGAGCCA
GAGGTACCTCCAGAGCAAGACCTCATAGCCAGCACGGTGGCAGATGTGGTGACCACAGTGATGG
GCAGCTCTCAGCCCGTAGTGACCCGAGGCACCGCCGACAACCTCATCCCTGTCTATTGTTCCAT
CCTGGCCGCTGTGGTTGTGGGCCTGGTGGCCTACATTGCCTTCAAGAGGTGGAACAGCTGCAAA
CAGGACAAGCAAGGCGCCAACAGCCGGCCCGTGAACCAGACGCCCCCGCCCGAGGGAGAAAA
GCTCCACAGTGACAGTGGCATCTCTGTGGACAGCCAGAGCCTGCATGACCAGCAGTCCCACACG
CAGACGGCCGCCGGCCAGGCCCTCAAGGGGGACGGAGGTCTCTACAGCAGCCTGCCGTCAGC
CAAGCGGGAGGAGGTAGAGAAACTGCTCAACGGCTCTGCGGGGGACACGTGGCGGCACCTGG
CGGGCGAGCTGGGCTACCAGCCTGAGCACATAGACTCCTTCACCCGCGAGGCCTGCCCAGCCC
GGGCCCTGCTCGCCAGCTGGGCCGCCCAGGACAGCGCGACGCTCGACGCCCTCCTGGCCGCC
CTGCGCCGCATCCAGCGGGCCGACATCGTCGAGAGCCTGTGCAGCGAGTCCACGGCCACGTCC
[0295] CCGGTGTGA

[0296] 선도 서열에 밑줄이 그어져 있다

[0297] **서열번호 5 말과 p75NTR 단백질**

KEVCPTDLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTE
CVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACQVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEE
CPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPSRWITRATPPEGSDST
APSTQEPEGPPEKDLVASTVADVVTTVMGSSQPVVTRGTTDNLIPVYCSILAAVVVGLVA
YIAFKRWNSCKQNKQGANSRPVNQTPPPEGEKLHSDSGISVDSQSLHDQQPHTQTAAGQA
LKGDGGLYSSLPLAKREEVEKLLNGSAGDTWRHLAGLVGQGLLRLELVSVFQGPAHGGML
[0298] PPATPSLQAPVWLGPEGCSEKWDQRGNAARRAGLRVWPMEGLSQV

[0299] ECD에 밑줄이 그어져 있다

[0300] **서열번호 6 말과 p75NTR 핵산 서열**

ATGAGGGCAGGTGCCGCCGACTGCGCCATGGACGGACCGCGCCTTCTGCTGCTGCTTCTGCTC
[0301] TTGGGGGTGTGCCTGCTGGGAGGTGCCAAGGAGGTGTGCCCCACAGACCTGTACACCCACAGC

GGCGAGTGCTGCAAAGCCTGCAACCTGGGCGAGGGTGTGGCCCAGCCTTGCGGAGCCAACCAG
ACTGTGTGTGAACCCTGCCTGGACAGCGTGACGTTCTCGGACGTGGTGAGCGCCACAGAGCCAT
GTAAGCCGTGCACCGAGTGCGTGGGCCTGCAGAGCATGTCGGCGCCATGCGTGGAGGCCGAC
GACGCGGTGTGCCGCTGCGCCTATGGCTACTACCAGGACGAGACGACGGGCCGCTGCGAGGC
GTGCCAGGTGTGCGAGGCGGGCTCGGGCCTCGTGTTCTCGTGCCAGGACAAGCAGAACACCGT
GTGCGAGGAATGCCCCGACGGCACGTACTCCGACGAGGCCAACCACGTGGACCCGTGCCTGCC
CTGCACCGTGTGCGAGGACACCGAGCGCCAGCTGCGAGAGTGCACGCGCTGGGCCGACGCCG
AGTGCGAGGAGATCCCCAGCCGTTGGATTACACGGGCCACGCCGCCGGAGGGCTCAGACAGCA
CTGCCCCCAGCACCCAGGAGCCCGAGGGACCTCCAGAGAAAGACCTTGTAGCCAGCACGGTGG
CGGATGTGGTGACCACAGTGATGGGCAGCTCTCAGCCCGTGGTGACCCGAGGCACCACGGACA
ACCTCATCCCCGTCTATTGCTCCATCCTGGCCGCTGTGGTTGTGGGCCTTGTGGCCTACATCGC
CTTCAAGAGGTGGAACAGCTGCAAGCAGAACAAGCAAGGAGCCAACAGCCGACCCGTGAACCA
GACACCACCACCCGAGGGAGAAAAACTCCACAGCGACAGCGGCATCTCTGTGGACAGCCAGAG
CCTGCATGACCAGCAGCCTCACACACAGACAGCCGCAGGCCAGGCCCTCAAGGGAGATGGAGG
CCTCTACAGCAGCCTGCCACTGGCCAAGAGGGAAGAGGTGGAGAAGCTACTCAATGGCTCCGCA
GGGGACACCTGGCGGCACCTGGCGGGTGAGCTGGGCTACCAGCCCGAGCACATAGACTCCTTC
ACCCACGAGGCCTGCCCCGTCCGCGCCCTGCTTGCCAGCTGGGCCGCCCAGGACAGTGCGACA
TTCGATGCCCTCCTGACCGCCCTGCGCCGCATCCAGCGAGCCGACATTGTCGAGAGCCTGTGCA
[0302] GCGAGTCCACCGCCACATCCCCGGTGTGA

[0303] 선도 서열에 밑줄이 그어져 있다

[0304] **서열번호 7 개과 p75NTR 단백질 ECD**

KEACPTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQS
MSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDRQNTVCEECPDGTYSDEAN
HVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPGRWITRSTPSEDSDSTAPSTEEPELPPDQEIIAST
[0305] MADVVTTVM**GSSQPVVTRGTADN**

[0306] Wt ECD 영역은 줄기 영역(밑줄)과 줄기 영역(굵은 글씨)의 알파 및 감마 세크레타제 절단 3'을 포함한다

[0307] **서열번호 8 개과 p75NTR ECD 핵산 서열**

AAGGAGGCATGTCCCACTGGCCTGTACACCCACAGCGGCGAGTGCTGCAAAGCCTGCAATCTGG
GTGAGGGGGTGGCCCAGCCTTGCGGAGCCAACCAGACCGTGTGTGAGCCCTGCCTGGACAGCG
TGACCTTCTCGGACGTGGTGAGCGCCACCGAGCCGTGCAAGCCGTGCACCGAGTGCGTGGGGC
TGCAGAGCATGTCGGCGCCGTGCGTGGAGGCGGACGACGCCGTGTGCCGCTGCGCCTACGGC
[0308] TACTACCAGGACGAGACGACGGGCCGCTGCGAGGCGTGCCGCGTGTGCGAGGCGGGCTCGGG

GCTCGTGTTCTCGTGCCAGGACAGGCAGAACACCGTGTGCGAGGAGTGTCCCGACGGCACGTA
CTCCGACGAGGCCAACCACGTGGACCCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCGAGCG
CCAGCTGCGCGAGTGCACGCGCTGGGCCGACGCCGAGTGCGAGGAGATCCCTGGCCGTTGGA
TTACCCGGTCCACACCCTCAGAGGACTCGGACAGCACCGCCCCCAGCACAGAGGAGCCAGAGC
TACCTCCAGATCAAGAAATCATAGCCAGCACCATGGCAGATGTGGTGACCACAGTGATGGGCAG
[0309] CTCTCAGCCTGTAGTGACCCGAGGAACCGCTGACAAC

[0310] **서열번호 9 p75NTR 줄기 영역 단백질의 개과 ECD**

[0311] WITRSTPSEDSDSTAPSTEEPELPPDQEIIASTMADVVTTVM

[0312] **서열번호 10 p75NTR 줄기 영역 핵산 서열의 개과 ECD**

TGGATTACCCGGTCCACACCCTCAGAGGACTCGGACAGCACCGCCCCCAGCACAGAGGAGCCA
[0313] GAGCTACCTCCAGATCAAGAAATCATAGCCAGCACCATGGCAGATGTGGTGACCACAGTGATG

[0314] **서열번호 11 개과 p75NTR ECD - 개과 IgGB wt Fc 단백질 융합**

*MEWSWVFLFFLSVTTGVHS*KEACPTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSD
VVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQD
RQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIP**GGGG**RENGRVPRP
PDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQP
REEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELS
KNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFIC
AVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK

[0315]

[0316] *신호 펩타이드*

[0317] *개과 p75-ECD*

[0318] **링커 GGGG**

[0319] 개과 Fc-B wt

[0320] **서열번호 12 개과 p75NTR ECD- 개과 IgGB wt Fc 핵산 서열**

ATGGAATGGTCCTGGGTGTTCCTGTTCTTCCTGTCCGTGACCACCGGCGTGCACTCCAAAGAGG
CTTGTCCTACCGGCCTGTACACCCACTCTGGCGAGTGTTGCAAGGCCTGTAATCTCGGCGAAGG
CGTGGCACAACCTTGTGGCGCTAATCAGACAGTGTGCGAGCCTTGCCTGGACTCCGTGACCTTC
TCTGATGTGGTGTCTGCCACCGAGCCATGCAAGCCTTGTACCGAGTGTGTGGGCCTGCAGTCCA
TGTCTGCCCCTTGTGTGGAAGCCGACGACGCCGTGTGTAGATGTGCCTACGGCTACTACCAGGA
CGAGACAACCGGAAGATGCGAGGCCTGCAGAGTGTGTGAAGCTGGCTCTGGACTGGTGTTCTCC

[0321]

TGCCAAGACAGACAGAACACCGTGTGCGAGGAATGCCCTGACGGCACCTACTCTGATGAGGCCA
ATCACGTGGACCCCTGCCTGCCTTGTACTGTGTGCGAAGATACCGAGCGGCAGCTGCGCGAGTG
TACCAGATGGGCTGATGCCGAGTGCGAAGAGATCCCTGGAGGTGGCGGACGCGAGAATGGCAG
AGTGCCTAGACCTCCTGACTGCCCTAAGTGCCCTGCTCCTGAAATGCTCGGCGGACCCTCCGTG
TTCATCTTCCCACCTAAGCCTAAGGACACCCTGCTGATCGCTCGGACCCCTGAAGTGACATGCGT
GGTGGTGGATCTGGACCCCGAGGATCCTGAGGTGCAGATCAGTTGGTTCGTGGACGGCAAGCA
GATGCAGACCGCTAAGACCCAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACGGCACCTACAGAGTGGTGTCT
GTGCTGCCTATCGGCCACCAGGATTGGCTGAAGGGCAAGCAGTTTACCTGCAAAGTGAACAACA
AGGCCCTGCCTTCTCCAATCGAGCGGACCATCTCTAAGGCCAGAGGCCAGGCTCATCAGCCTTC
CGTGTATGTCCTGCCACCTAGCCGCGAGGAACTGTCCAAGAACACCGTGTCTCTGACCTGCCTG
ATCAAGGACTTCTTCCCTCCTGACATCGACGTGGAATGGCAGTCCAACGGCCAGCAAGAGCCCG
AGTCTAAGTACCGGACAACCCCTCCACAGCTGGACGAGGACGGCTCCTACTTCCTGTACTCCAA
GCTGTCCGTGGACAAGTCTCGGTGGCAGAGAGGCGACACCTTCATCTGTGCTGTGATGCACGAG
GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCACTCCCCTGGCAAGTGA

[0322]

[0323] 선도 서열에 밑줄이 그어져 있다

[0324] **서열번호 13 개과 p75NTR ECD - 개과 Fc YTE 단백질 융합**

*MEWSWVFLFFLSVTTGVHS*KEACPTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCL
DSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVC
EAGSGLVFSCQDRQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAE
CEEIP**GGGG**RENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTL**Y**I**T**R**E**PEVTCVVVDL
DPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNK
ALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQE
PESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK

[0325]

[0326] *신호 펩타이드*

[0327] *개과 p75-ECD*

[0328] **링커 GGGG**

[0329] 개과 Fc-B-**YTE**

[0330] **서열번호 14 개과 p75NTR ECD - Fc YTE 핵산 서열**

[0331]
ATGGAATGGTCCTGGGTGTTCCTGTTCTTCCTGTCCGTGACCACCGGCGTGCACTCCAAAGAGG
CTTGTCCTACCGGCCTGTACACCCACTCTGGCGAGTGTTGCAAGGCCTGTAATCTCGGCGAAGG
CGTGGCACAACCTTGTGGCGCTAATCAGACAGTGTGCGAGCCTTGCCTGGACTCCGTGACCTTC
TCTGATGTGGTGTCTGCCACCGAGCCATGCAAGCCTTGTACCGAGTGTGTGGGCCTGCAGTCCA

[0332]
TGTCTGCCCCTTGTGTGGAAGCCGACGACGCCGTGTGTAGATGTGCCTACGGCTACTACCAGGA
CGAGACAACCGGAAGATGCGAGGCCTGCAGAGTGTGTGAAGCTGGCTCTGGACTGGTGTTCTCC
TGCCAAGACAGACAGAACACCGTGTGCGAGGAATGCCCTGACGGCACCTACTCTGATGAGGCCA
ATCACGTGGACCCCTGCCTGCCTTGTACTGTGTGCGAAGATACCGAGCGGCAGCTGCGCGAGTG
TACCAGATGGGCTGATGCCGAGTGCGAAGAGATCCCTGGAGGTGGCGGACGCGAGAATGGCAG
AGTGCCTAGACCTCCTGACTGCCCTAAGTGCCCTGCTCCTGAAATGCTCGGCGGACCCTCCGTG
TTCATCTTCCCACCTAAGCCTAAGGACACCCTGTATATCACTCGGGAACCTGAAGTGACATGCGT
GGTGGTGGATCTGGACCCCGAGGATCCTGAGGTGCAGATCAGTTGGTTCGTGGACGGCAAGCA
GATGCAGACCGCTAAGACCCAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACGGCACCTACAGAGTGGTGTCT
GTGCTGCCTATCGGCCACCAGGATTGGCTGAAGGGCAAGCAGTTTACCTGCAAAGTGAACAACA
AGGCCCTGCCTTCTCCAATCGAGCGGACCATCTCTAAGGCCAGAGGCCAGGCTCATCAGCCTTC
CGTGTATGTCCTGCCACCTAGCCGCGAGGAACTGTCCAAGAACACCGTGTCTCTGACCTGCCTG
ATCAAGGACTTCTTCCCTCCTGACATCGACGTGGAATGGCAGTCCAACGGCCAGCAAGAGCCCG
AGTCTAAGTACCGGACAACCCCTCCACAGCTGGACGAGGACGGCTCCTACTTCCTGTACTCCAA
GCTGTCCGTGGACAAGTCTCGGTGGCAGAGAGGCGACACCTTCATCTGTGCTGTGATGCACGAG
GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCACTCCCCTGGCAAGTGA

[0333] 선도 서열에 밑줄이 그어져 있다

[0334] **서열번호 15 IgG-A**

[0335]
MEFVLGWVFLVAILQGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVASGFTFSNNAMNWVRQAPGKGLQ
WVAGINSGGSTASADAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLTAEDTAVYYCAKVIGNWIATSDLDYWGQ
GTLVIVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSS
GLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVVHPASNTKVDKPVFNECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPK
PKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWL
TGKEFKCRVNHIDLPSPIERTISKARGRAHKPSVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQS
NGQQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNHYTDLSLSHSPG
K

[0336] **서열번호 16 IgG-B**

[0337]
MEFVLGWVFLVAILQGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVASGFTFSNNAMNWVRQAPGKGLQ
WVAGINSGGSTASADAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLTAEDTAVYYCAKVIGNWIATSDLDYWGQ
GTLVIVSSASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSS
GLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSV
FIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIG
HQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDID

VEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLS
[0338] HSPGK

[0339] 서열번호 17 IgG-C

MEFVLGWVFLVAILQGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVASGFTFSNNAMNWVRQAPGKGLQ
WVAGINSGGSTASADAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLTAEDTAVYYCAKVIGNWIATSDLDYWGQ
GTLVIVSSASTTAPSVFPLAPSCGSQSGSTVALACLVSGYIPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSILQSSG
LYSLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPATNTKVDKPVVKECECKCNCNNCPCPGCGLLGGPSVFIFP
PKPKDILVTARTPTVTCVVVDLDPENPEVQISWFVDSKQVQTANTQPREEQSNGTYRVVSVLPIGHQD
WLSGKQFKCKVNNKALPSPIEEIISKTPGQAHQPNVYVLPPSRDEMSKNTVTLTCLVKDFFPPEIDVE
WQSNGQQEPESKYRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSH
[0340] SPGK

[0341] 서열번호 18 IgG-D

MEFVLGWVFLVAILQGVQGEVQLVESGGDLVKPAGSLRLSCVASGFTFSNNAMNWVRQAPGKGLQ
WVAGINSGGSTASADAVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLTAEDTAVYYCAKVIGNWIATSDLDYWGQ
GTLVIVSSASSTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLKSS
GLYSLSSMVTVPSSRLPSETFTCNVVHPATNTKVDKPVPKESTCKCISPCPVPESLGGPSVFIFPPKPK
DILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQPREQQFNSTYRVVSVLPIEHQDWLTG
KEFKCRVNHIGLPSPIERTISKARGQAHQPGVYVLPPSPKELSSSDTVTLTCLIKDFFPPEIDVEWQSN
[0342] GQPEPESKYHTTAPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHEALQNHYTDLSLSHSPGK

[0343] 서열번호 19

[0344] DOGA 불변 영역

FNECRCTDTPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHT
AKTQSREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIDLPSPIERTISKARGRAHKPSVYVLPPS
PKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNGQQEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQ
[0345] QGDPFTCAVMHETLQNHYTDLSLSHSPGK

[0346] 서열번호 20

[0347] DOGB 불변 영역

RENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGK
QMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVY
VLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKS
[0348] RWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK

[0349] 서열번호 21

[0350] DOGB-YTE 불변 영역

RENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGK
QMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVY
VLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKS
[0351] RWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK

[0352] 서열번호 22

[0353] DOGC 불변 영역

[0354] ECECKCNCNNCPCPGCGLLGGPSVFIFPPKPKDILVTARTPTVTCVVVDLDPENPEVQISWFVDSKQV
QTANTQPREEQSNGTYRVVSVLPIGHQDWLSGKQFKCKVNNKALPSPIEEIISKTPGQAHQPNVYVLP
PSRDEMSKNTVTLTCLVKDFFPPEIDVEWQSNGQQEPESKYRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSR
WQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHSPGK

[0355] **서열번호 23**

[0356] DOGD 불변 영역

[0357] ESTCKCISPCPVPESLGGPSVFIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKT
QPREQQFNSTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIGLPSPIERTISKARGQAHQPGVYVLPPSPKE
LSSSDTVTLTCLIKDFFPPEIDVEWQSNGQPEPESKYHTTAPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGD
PFTCAVMHEALQNHYTDLSLSHSPGK

[0358] **서열번호 24**

[0359] 고양이_IGG1V1 불변 영역

[0360] TDHPPGPKPCDCPKCPPPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSDVQITWFVDNT
QVYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISKAKGQPHEPQVYV
LPPAQEELSRNKVSVTCLIKSFHPPDIAVEWEITGQPEPENNYRTTPPQLDSDGTYFVYSKLSVDRSH
WQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK

[0361] **서열번호 25**

[0362] 고양이_IGG1V2 불변 영역

[0363] TDHPPGPKPCDCPKCPPPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSDVQITWFVDNT
QVYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPIERTISKAKGQPHEPQVYV
LPPAQEELSRNKVSVTCLIKSFHPPDIAVEWEITGQPEPENNYRTTPPQLDSDGTYFVYSKLSVDRSH
WQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK

[0364] **서열번호 26**

[0365] 고양이_IGG2 불변 영역

[0366] KTASTIESKTGEGPKCPVPEIPGAPSVFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSNVQITWFVDNTE
MHTAKTRPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSAMERTISKAKGQPHEPQVYV

[0367] LPPTQEELSENKVSVTCLIKGFHPPDIAVEWEITGQPEPENNYQTTPPQLDSDGTYFLYSRLSVDRSH
WQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK

[0368] **서열번호 27**

[0369] 말_IGHG1 불변 영역

[0370] VIKECNGGCPAECLQVGPSVFIFPPKPKDVLMISRTPTVTCVVVDVGHDFPDVQFNWYVDGVETHTA
TTEPKQEQFNSTYRVVSVLPIQHKDWLSGKEFKCKVNNKALPAPVERTISKPTGQPREPQVYVLAPH
RDELSKNKVSVTCLVKDFYPTDIDIEWKSNGQPEPETKYSTTPAQLDSDGSYFLYSKLTVETNRWQQ
GTTFTCAVMHEALHNHYTEKSVSKSPGK

[0371] **서열번호 28**

[0372] 말_IGHG2 불변 영역

CVLSAEGVIPIPSVPKPQCPPYTHSKFLGGPSVFIFPPNPKDALMISRTPVVTCVVVNLSDQYPDVQFS
WYVDNTEVHSAITKQREAQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLSGKEFKCSVTNVGVPQPISRAISRGKGPS
RVPQVYVLPPHPDELAKSKVSVTCLVKDFYPPDISVEWQSNRWPELEGKYSTTPAQLDGDGSYFLYS
[0373] KLSLETSRWQQVESFTCAVMHEALHNHFTKTDISESLGK

[0374] **서열번호 29**

HORSE_IGHG3
TTPPCPCECPKCPAPELLGGPSVFIFPPKPKDVLMITRTPEVTCLVVDVSHDSSDVLFTWYVDGTEVK
TAKTMPNEEQNNSTYRVVSVLRIQHQDWLNGKKFKCKVNNQALPAPVERTISKATGQTRVPQVYVLA
PHPDELSKNKVSVTCLVKDFLPTDITVEWQSNEHPEPEGKYRTTEAQKDSDGSYFLYSKLTVETDRW
[0375] QQGTTFTCVVMHEALHNHVMQKNVSHSPGK

[0376] **서열번호 30**

[0377] 말_IGHG4 불변 영역

VIKECNGGCPAECLQVGPSVFIFPPKPKDVLMISRTPTVTCVVVDVGHDFPDVQFNWYVDGVETHTA
TTEPKQEQFNSTYRVVSVLPIQHKDWLSGKEFKCKVNNKALPAPVERTISKPTGQPREPQVYVLAPH
RDELSKNKVSVTCLVKDFYPTDIDIEWKSNGQPEPETKYSTTPAQLDSDGSYFLYSKLTVETNRWQQ
[0378] GTTFTCAVMHEALHNHYTEKSVSKSPGK

[0379] **서열번호 31**

[0380] 말_IGHG5 불변 영역

VVKGSPCPKCPAPELPGGPSVFIFPPKPKDVLKISRKPEVTCVVVDLGHDDPDVQFTWFVDGVETHT
ATTEPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLSGKEFKCSVTNKALPAPVERTTSKAKGQLRVPQVYVLAP
HPDELAKNTVSVTCLVKDFYPPEIDVEWQSNEHPEPEGKYSTTPAQLNSDGSYFLYSKLSVETSRWK
[0381] QGESFTCGVMHEAVENHYTQKNVSHSPGK

[0382] **서열번호 32**

[0383] >말_IGHG6 불변 영역

KEPCCCPKCPGRPSVFIFPPNPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQENPDVKFNWYVDGVEAHTATTKAK
EKQDNSTYRVVSVLPIQHQDWRRGKEFKCKVNNRALPAPVERTITKAKGELQDPKVYILAPHREEVTK
NTVSVTCLVKDFYPPDINVEWQSNEEPEPEVKYSTTPAQLDGDGSYFLYSKLTVETDRWEQGESFTC
[0384] VVMHEAIRHTYRQKSITNFPGK

[0385] **서열번호 33**

[0386] 말_IGHG7 불변 영역

VIKECGGCPTCPECLSVGPSVFIFPPKPKDVLMISRTPTVTCVVVDVGHDFPDVQFNWYVDGVETHTA
TTEPKQEQNNSTYRVVSILAIQHKDWLSGKEFKCKVNNQALPAPVQKTISKPTGQPREPQVYVLAPHR
DELSKNKVSVTCLVKDFYPTDIDIEWKSNGQPEPETKYSTTPAQLDSDGSYFLYSKLTVETNRWQQG
[0387] TTFTCAVMHEALHNHYTEKSVSKSPGK

[0388] **서열번호 34 융합 작제물에 사용되는 개과 ECD의 부분(줄기 없음 및 줄기 영역의 알파 및 감마 세크레타제 절단 3' 없음)**

KEACPTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTE
CVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDRQNTVCEE
CPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPKEACPTGLYTHSGECCKACNLG
EGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQ
DETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDRQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECT
RWADAECEEIP

[0389]

[0390] 서열번호 35 융합 작제물에 사용되는 개과 p75NTR ECD 핵산 서열 (줄기 없음 및 줄기 영역의 알파 및 감마 세크레타제 절단 3' 없음)

AAGGAGGCATGTCCCACTGGCCTGTACACCCACAGCGGCGAGTGCTGCAAAGCCTGCAATCTGG
GTGAGGGGGTGGCCCAGCCTTGCGGAGCCAACCAGACCGTGTGTGAGCCCTGCCTGGACAGCG
TGACCTTCTCGGACGTGGTGAGCGCCACCGAGCCGTGCAAGCCGTGCACCGAGTGCGTGGGGC
TGCAGAGCATGTCGGCGCCGTGCGTGGAGGCGGACGACGCCGTGTGCCGCTGCGCCTACGGC
TACTACCAGGACGAGACGACGGGCCGCTGCGAGGCGTGCCGCGTGTGCGAGGCGGGCTCGGG
GCTCGTGTTCTCGTGCCAGGACAGGCAGAACACCGTGTGCGAGGAGTGTCCCGACGGCACGTA
CTCCGACGAGGCCAACCACGTGGACCCGTGCCTGCCCTGCACCGTGTGCGAGGACACCGAGCG
CCAGCTGCGCGAGTGCACGCGCTGGGCCGACGCCGAGTGCGAGGAGATCCCTGGCCGT

[0391]

[0392] 서열번호 36 소과 p75 NTR 단백질

KEACLTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTECVGLQS
MSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEECPDGTYSDEAN
HVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPGRWITRATPPEGSDSTDPSTQEPEVPPEQDLVTS

[0393]

TVSDVVTTVMGSSQPVVTRGTADNLIPVYCSILAAVVVGLVAYIAFKRWNSCKQNKQGANSRPVNQT
PPPEGEKLHSDSGISVDSQSLHDQQPHTQTAAGQALKGDGGLYSSLPLAKREEVEKLLNGSAGDTW
RHLAGELGYQPEHIDSFTHEACPARALLASWAAQDSATLDTLLAALRRIQRADLVESLCSESTATSPV

[0394]

[0395] ECD에 밑줄이 그어져 있다

[0396] 서열번호 37 소과 p75 NTR 핵산

ATGGGGTCAGGTGCCGCCGGCCGCGCCATGGACGGGCCGCGCCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
GCTCCTGGGGGGTGTCCCTTGGAGGTGCCAAGGAAGCATGCCTCACGGGCCTGTACACCCACAG
CGGAGAGTGCTGCAAAGCCTGCAACCTGGGCGAGGGTGTGGCCCAGCCTTGTGGAGCCAACCA
GACCGTGTGTGAACCCTGCCTGGACAGCGTGACCTTCTCGGACGTGGTGAGCGCCACGGAGCC
GTGTAAGCCGTGCACGGAGTGCGTGGGACTGCAGAGCATGTCGGCGCCCTGCGTGGAGGCCGA
CGACGCCGTGTGCCGCTGCGCCTACGGCTATTACCAGGACGAGACGACCGGCCGCTGCGAGGC
GTGCCGCGTGTGCGAGGCGGGCTCGGGGCTCGTGTTCTCGTGCCAGGACAAGCAGAACACCGT
CTGCGAGGAGTGCCCCGACGGCACGTACTCCGACGAGGCCAACCACGTGGACCCCTGCCTGCC
CTGCACGGTGTGCGAGGACACGGAGCGCCAGCTGCGCGAGTGCACGCGCTGGGCCGACGCCG
AGTGCGAGGAGATCCCTGGACGTTGGATTACACGGGCCACGCCCCCTGAGGGCTCCGACAGCA
CAGACCCCAGCACCCAGGAGCCCGAGGTACCTCCAGAGCAAGATCTGGTAACCAGCACTGTGTC
AGATGTGGTGACCACGGTGATGGGCAGCTCCCAGCCTGTGGTGACCCGAGGTACCGCCGACAA
CCTCATCCCTGTCTATTGCTCCATCCTGGCTGCTGTGGTTGTGGGCCTTGTGGCCTACATCGCCT
TCAAGAGGTGGAACAGCTGCAAGCAGAACAAGCAAGGAGCCAACAGCCGACCTGTGAACCAGAC
ACCCCCACCAGAGGGGGAAAAGCTACACAGCGATAGCGGCATCTCTGTGGACAGCCAGAGCCT
GCATGACCAGCAGCCCCACACGCAGACTGCCGCAGGCCAGGCCCTCAAGGGTGATGGAGGCCT
CTACAGCAGCCTGCCGCTGGCCAAGCGGGAGGAGGTGGAGAAGCTGCTCAACGGCTCTGCGGG
GGACACCTGGCGGCATCTGGCAGGCGAGTTGGGTTACCAGCCTGAGCACATAGACTCCTTCACC
CACGAGGCCTGCCCAGCCCGCGCCCTGCTGGCCAGCTGGGCTGCCCAGGACAGCGCCACGCT
CGACACCCTCCTTGCGGCCCTGCGCCGCATCCAGCGCGCCGACATCGTGGAGAGCCTGTGCAG
CGAGTCCACGGCCACGTCCCCCGTGTGA

[0397]

[0398] 서열번호 38 고양이과 p75NTR 단백질 ECD

KEACPTGLFTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTE
CVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDRQNTVCEE
CPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPGRWITRSTPSEGSDST
APSTEEPEVPPEQDLIASTVADVVTTVMGSSQPVVTRGTADN

[0399]

[0400] 서열번호 39 고양이과 p75NTR ECD - 고양이과 IgG1 wt Fc 단백질 융합

*MDGPRPLLLLLPLLLGVSLGGA*KEACPTGLFTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTF
SDVVSATEPCKPCTECVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSC
QDRQNTVCEECPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIPGR**GGGG**VPKTA

[0401]

STIESKTCDCPKCPVPEIPGAPSVFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSNVQITWFVDNTEMHT
AKTRPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSAMERTISKAKGQPHEPQVYVLPPT
QEELSENKVSVTCLIKGFHPPDIAVEWEITGQPEPENNYQTTPPQLDSDGTYFLYSRLSVDRSHWQR
GNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK

[0402]

[0403] *신호 펩타이드*

[0404] *고양이과 p75-ECD*

[0405] **링커 GGGG**

[0406] 고양이과 Fc-IgG1

[0407] 서열번호 40 고양이과 p75NTR ECD- 고양이과 IgG1 wt Fc 핵산 서열

ATGGATGGACCTAGACCTCTGCTGCTGCTCCTGCCTCTGCTGTTGGGAGTTTCTCTCGGCGGAG
CCAAAGAGGCTTGTCCTACCGGCCTGTTTACCCACTCTGGCGAGTGTTGCAAGGCCTGTAATCTC
GGCGAAGGCGTGGCACAACCTTGTGGCGCTAATCAGACAGTGTGCGAGCCTTGCCTGGACTCC
GTGACCTTCTCTGATGTGGTGTCTGCCACCGAGCCATGCAAGCCTTGTACCGAGTGTGTGGGCC
TGCAGTCCATGTCTGCCCCTTGTGTGGAAGCCGACGACGCCGTGTGTAGATGTGCCTACGGCTA
CTACCAGGACGAGACAACCGGAAGATGCGAGGCCTGCAGAGTGTGTGAAGCTGGCTCTGGACT
GGTGTTCTCCTGCCAAGACAGACAGAACACCGTGTGCGAGGAATGCCCTGACGGCACCTACTCT
GATGAGGCCAATCACGTGGACCCCTGCCTGCCTTGTACTGTGTGCGAAGATACCGAGCGGCAGC
TGCGCGAGTGTACCAGATGGGCTGATGCCGAGTGCGAAGAGATCCCTGGAAGAGGCGGAGGCG
GAGTGCCTAAGACCGCTTCTACCATCGAGTCCAAGACCTGCGACTGCCCTAAGTGCCCTGTGCC
TGAAATTCCTGGCGCTCCCTCCGTGTTCATCTTCCCACCTAAGCCTAAGGACACCCTGTCCATCT
CTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCCTGGTGGTTGATCTGGGCCCTGACGACTCCAACGTGCAGAT
CACTTGGTTTGTGGACAACACCGAGATGCACACCGCCAAGACCAGACCTAGAGAGGAACAGTTC
AACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGCCCATCCTGCACCAGGATTGGCTGAAGGGCAAAG
AATTCAAGTGCAAAGTGAACTCCAAGAGCCTGCCTTCCGCCATGGAACGGACCATCTCTAAGGCT
AAGGGCCAGCCTCATGAGCCCCAGGTGTACGTTCTGCCTCCTACACAAGAGGAACTGTCCGAGA
ACAAAGTGTCCGTGACATGCCTGATCAAGGGCTTTCACCCTCCTGATATCGCCGTGGAATGGGA
GATCACCGGACAGCCTGAGCCTGAGAACAACTACCAGACCACACCTCCTCAGCTGGACAGCGAC
GGAACCTACTTCCTGTACTCCCGGCTGTCCGTGGACAGATCCCATTGGCAGAGAGGCAACACCT
ACACCTGTTCCGTGTCTCACGAGGCCCTGCACTCTCATCACACCCAGAAGTCCCTGACACAGTCC
[0408] CCTGGCAAG

[0409] 서열번호: 41 고양이과 IgG3

LPPCKCPKCPVPEIPGGPSVFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLGPDDSNVQITWFVDNTEMHTAKT
RPREEQFNSTYRVVSVLPIVHQDWLTGKEFKCKVNSKALPSAIERTISKAKGQPHEPQVYVLPPAQEE
LSENKVCVTCLIKGFYPPDIAVEWEITGQPEPENNYRTTPPQLDSDGTYFVYSRLSMDRSRWQSGNT
[0410] YTCSVSHEALHSHHTQKSLTQSPGK

[0411] * * *

[0412] 본 발명의 바람직한 구현예를 상세히 기재하지만, 본 발명의 사상 또는 범위를 벗어나지 않고 많은 명백한 변형이 가능하기 때문에, 상기 단락에 의해 정의된 본 발명은 상기 설명에 제시된 특정 세부사항으로 제한되지 않는다는 것이 이해되어야 한다.

도면

도면1

도 1a



도 1b



도면2a

a.

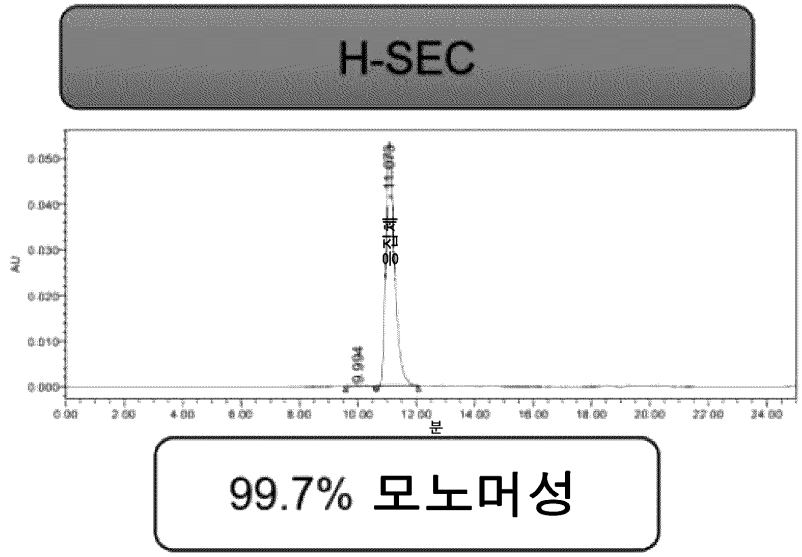
```
말          KEVCPTDLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTE    60
소          KEACLTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTE    60
개          KEACPTGLYTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTE    60
고양이      KEACPTGLFTHSGECCKACNLGEGVAQPCGANQTVCEPCLDSVTFSDVVSATEPCKPCTE    60
            **.* *.*:**************************************************

말          CVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACQVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEE    120
소          CVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDKQNTVCEE    120
개          CVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDRQNTVCEE    120
고양이      CVGLQSMSAPCVEADDAVCRCAYGYYQDETTGRCEACRVCEAGSGLVFSCQDRQNTVCEE    120
            ************************************:**************:*******

말          CPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIP    164
소          CPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIP    164
개          CPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIP    164
고양이      CPDGTYSDEANHVDPCLPCTVCEDTERQLRECTRWADAECEEIP    164
            *******************************************
```

도면2b

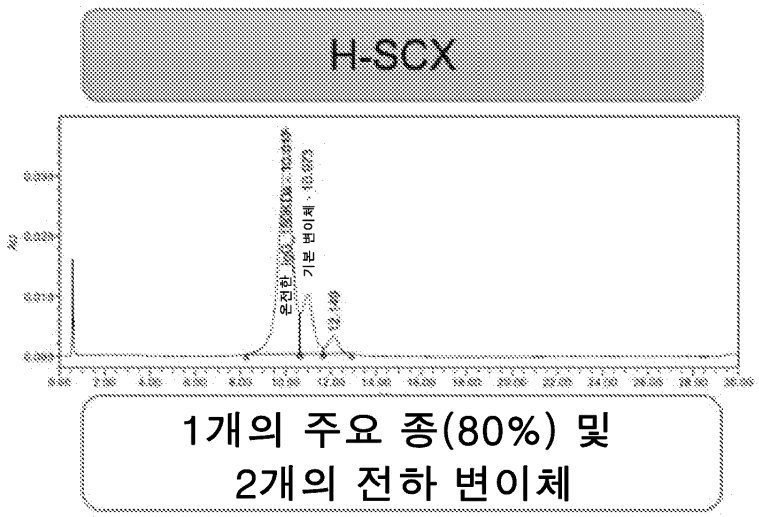
b.

```
고양이_IGG1V1      ------TDHPPGPKPCDC--PKCPPPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLG      53
고양이_IGG1V2      ------TDHPPGPKPCDC--PKCPPPEMLGGPSIFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLG      53
고양이_IGG2        -----KTASTIESKTGFG--PKCPVPEIPGAPSVFIFPPKPKDTLSISRTPEVTCLVVDLG      54
DOGA               --------FN--ECRCTD--TPPCPVPEPLGGPSVLIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLG      50
DOGD               ----------ESTCKC-ISPCPVPESLGGPSVFIFPPKPKDILRITRTPEVTCVVLDLG      48
DOGC               ---------ECECKCNCNNCPCPGCGLLGGPSVFIFPPKPKDILVTARTPTVTCVVVDLD      51
DOGB               ------RENGRVPRPPDCPK--CPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLD      53
DOGB-YTE           ------RENGRVPRPPDCPK--CPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDLD      53
말_IGHG2           CVLSAEGVIPIPSVPKPQCPPYTHSKFLGGPSVFIFPPNPKDALMISRTPVVTCVVVNLS      60
말_IGHG6           ----------K---EPCCCPKCP-----GRPSVFIFPPNPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS      42
말_IGHG3           -------TTPP---CPCPCPKCPAPELLGGPSVFIFPPKPKDVLMITRTPEVTCLVVDVS      50
말_IGHG5           ---------VV---KGSPCPKCPAPELPGGPSVFIFPPKPKDVLKISRKPEVTCVVVDLG      48
말_IGHG1           --------VIKE---CNGGCP---AE--CLQVGPSVFIFPPKPKDVLMISRTPTVTCVVVDVG      47
말_IGHG4           --------VIKE---CNGGCP---AE-CLQVGPSVFIFPPKPKDVLMISRTPTVTCVVVDVG      47
말_IGHG7           --------VIKE---CG-GCPTCPE--CLSVGPSVFIFPPKPKDVLMISRTPTVTCVVVDVG      48
                                                **:.****:*** *  :* * ***:*:::.

고양이_IGG1V1      PDDSDVQITWFVDNTQVYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKS      113
고양이_IGG1V2      PDDSDVQITWFVDNTQVYTAKTSPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKS      113
고양이_IGG2        PDDSNVQITWFVDNTEMHTAKTRPREEQFNSTYRVVSVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKS      114
DOGA               REDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQPREQQFNGTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHID      110
DOGD               REDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQPREQQFNSTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNHIG      108
DOGC               PENPEVQISWFVDSKQVQTANTQPREEQSNGTYRVVSVLPIGHQDWLSGKQFKCKVNNKA      111
DOGB               PEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKA      113
DOGB-YTE           PEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKA      113
말_IGHG2           DQVPDVQFSWYVDNTEVHSAITKQREAQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLSGKEFKCSVTNVG      120
말_IGHG6           QENPDVKFNWYVDGVEAHTATTKAKEKQDNSTYRVVSVLPIQHQDWRRGKEFKCKVNNRA      102
말_IGHG3           HDSSDVLFTWYVDGTEVKTAKTMPNEEQNNSTYRVVSVLRIQHQDWLNGKKFKCKVNNQA      110
말_IGHG5           HDDPDVQFTWFVDGVETHTATTEPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLSGKEFKCSVTNKA      108
말_IGHG1           HDFPDVQFNWYVDGVETHTATTEPKQEQFNSTYRVVSVLPIQHKDWLSGKEFKCKVNNKA      107
말_IGHG4           HDFPDVQFNWYVDGVETHTATTEPKQEQFNSTYRVVSVLPIQHKDWLSGKEFKCKVNNKA      107
말_IGHG7           HDFPDVQFNWYVDGVETHTATTEPKQEQNNSTYRVVSILAIQHKDWLSGKEFKCKVNNQA      108
                    :  :* :.*:**. :  :* *  .: * *.******:* * *:**  **:*.* *.

고양이_IGG1V1      LPSPIERTISKAKGQPHEPQVYVLPPAQEELS-RNKVSVTCLIKSFHPPDIAVEWEITGQ      172
고양이_IGG1V2      LPSPIERTISKAKGQPHEPQVYVLPPAQEELS-RNKVSVTCLIKSFHPPDIAVEWEITGQ      172
고양이_IGG2        LPSAMERTISKAKGQPHEPQVYVLPPTQEELS-ENKVSVTCLIKGFHPPDIAVEWEITGQ      173
DOGA               LPSPIERTISKARGRAHXPSVYVLPPSPKELSSSDTVSITCLIKDFYPPDIDVEWQSNGQ      170
DOGD               LPSPIERTISKARGQAHQPGVYVLPPSPKELSSSDTVTITCLIKDFFPPEIDVEWQSNGQ      168
DOGC               LPSPIEEIISKTPGQAHQPNVYVLPPSRDEMS-KNTVTLTCLVKDFFPPEIDVEWQSNGQ      170
DOGB               LPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELS-KNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNGQ      172
DOGB-YTE           LPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELS-KNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNGQ      172
말_IGHG2           VPQPISRAISRGKGPSRVPQVYVLPPHPDELA-KSKVSVTCLVKDFYPPDISVEWQSNRW      179
말_IGHG6           LPAPVERTITKAKGELQDPKVYILAPHREEVT-KNTVSVTCLVKDFYPPDINVEWQSNEE      161
말_IGHG3           LPAPVERTISKATGQTRVPQVYVLAPHPDELS-KNKVSVTCLVKDFLPTDITVEWQSNEH      169
말_IGHG5           LPAPVERTTSKAKGQLRVPQVYVLAPHPDELA-KNTVSVTCLVKDFYPPEIDVEWQSNEH      167
말_IGHG1           LPAPVERTISKPTGQPREPQVYVLAPHRDELS-KNKVSVTCLVKDFYPTDIDIEWKSNGQ      166
말_IGHG4           LPAPVERTISKPTGQPREPQVYVLAPHRDELS-KNKVSVTCLVKDFYPTDIDIEWKSNGQ      166
말_IGHG7           LPAPVQKTISKPTGQPREPQVYVLAPHRDELS-KNKVSVTCLVKDFYPTDIDIEWKSNGQ      167
                   :*  :..  ::  *  : * **:* *  .*::  ..*::***:*.* * :* :**: .

고양이_IGG1V1      PEPENNYRTTPPQLDSDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQS      232
고양이_IGG1V2      PEPENNYRTTPPQLDSDGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQS      232
고양이_IGG2        PEPENNYQTTPPQLDSDGTYFLYSRLSVDRSHWQRGNTYTCSVSHEALHSHHTQKSLTQS      233
DOGA               QEPERKHRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHETLQNHYTDLSLSHS      230
DOGD               PEPESKYHTTAPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHEALQNHYTDLSLSHS      228
DOGC               QEPESKYRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHS      230
DOGB               QEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHS      232
DOGB-YTE           QEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQKSLSHS      232
말_IGHG2           PELEGKYSTTPAQLDGDGSYFLYSKLSLETSRWQQVESFTCAVMHEALHNHFTKTDISES      239
말_IGHG6           PEPEVKYSTTPAQLDGDGSYFLYSKLTVETDRWEQGESFTCVVMHEAIRHTYRQKSITNF      221
말_IGHG3           PEPEGKYRTTEAQKDSDGSYFLYSKLTVETDRWQQGTTFTCVVMHEALHNHVMQKNVSHS      229
말_IGHG5           PEPEGKYSTTPAQLNSDGSYFLYSKLSVETSRWKQGESFTCGVMHEAVENHYTQKNVSHS      227
말_IGHG1           PEPETKYSTTPAQLDSDGSYFLYSKLTVETNRWQQGTTFTCAVMHEALHNHYTEKSVSKS      226
말_IGHG4           PEPETKYSTTPAQLDSDGSYFLYSKLTVETNRWQQGTTFTCAVMHEALHNHYTEKSVSKS      226
말_IGHG7           PEPETKYSTTPAQLDSDGSYFLYSKLTVETNRWQQGTTFTCAVMHEALHNHYTEKSVSKS      227
                    * * ::  *  * : **:**:**:*::: .:*::   : * * **::.    . .::.

고양이_IGG1V1      PGK        235
고양이_IGG1V2      PGK        235
고양이_IGG2        PGK        236
DOGA               PGK        233
DOGD               PGK        231
DOGC               PGK        233
DOGB               PGK        235
DOGB-YTE           PGK        235
말_IGHG2           LGK        242
말_IGHG6           PGK        224
말_IGHG3           PGK        232
말_IGHG5           PGK        230
말_IGHG1           PGK        229
말_IGHG4           PGK        229
말_IGHG7           PGK        230
                    **
```

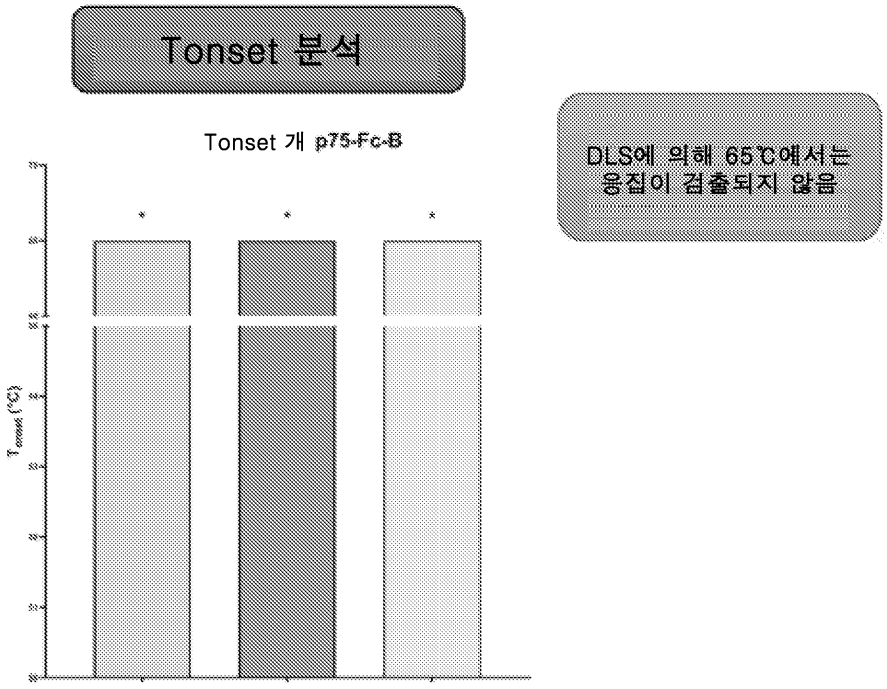
도면3a



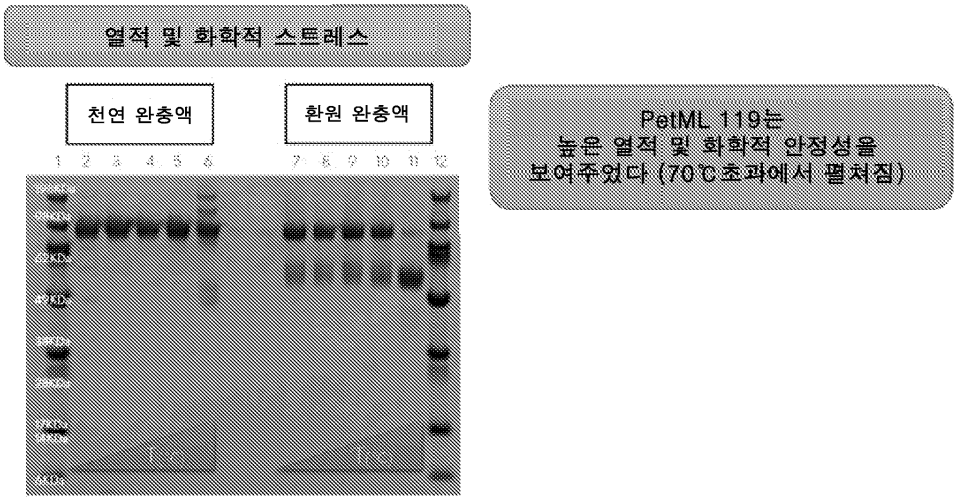
도면3b



도면4a


Tonset 분석
Tonset 개 p75-Fc-B
DLS에 의해 65℃에서는
응집이 검출되지 않음

도면4b


열적 및 화학적 스트레스
천연 완충액
환원 완충액
PetML 119는
높은 열적 및 화학적 안정성을
보여주었다 (70℃초과에서 펼쳐짐)

도면4c

냉동 및 해동 스트레스

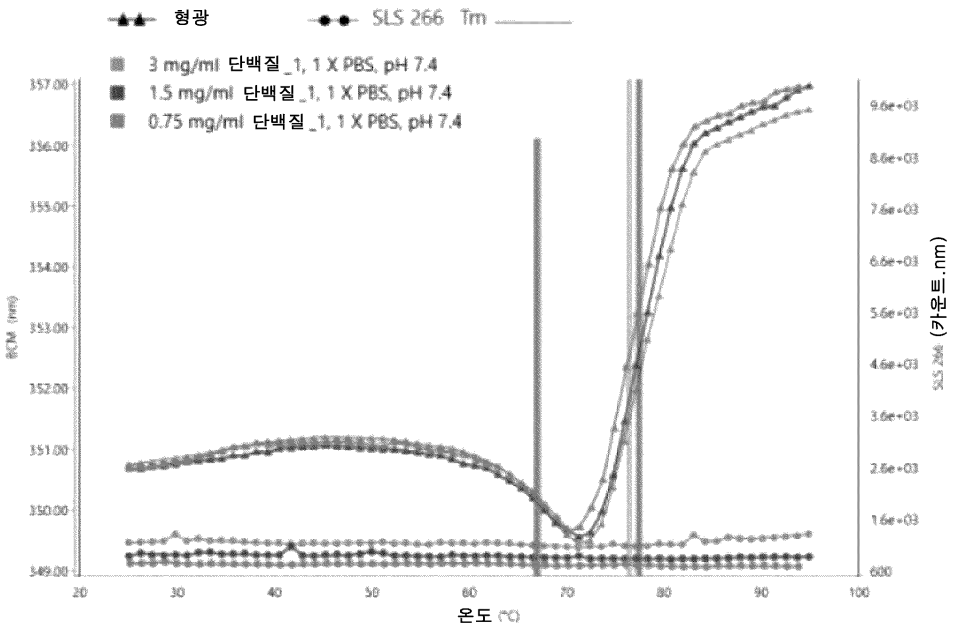
샘플	순도 %	면적	FT 후 Δ농도
PetML119	99.39	333981	0
PetML119 1FT	99.39	322675	-3.38522
PetML119 2FT	99.42	311886	-6.61565

PetML 119는 2FT 이후에
우수한 안정성을 보였으며,
작은 단백질 손실(~5%)만 있는
올리고머화에는 변화가 없었다

도면4d

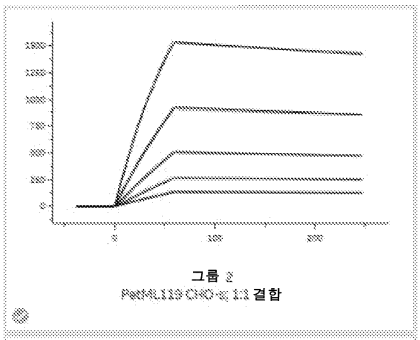
#	샘플 명칭	예측 MW	측정 농도	완충액 유형	pH	T_{m1} (°C)	%CV	T_{m2} (°C)	%CV
1	Protein_1*	92 kDa	3 mg/ml	PBS	7.4	**67.4**	0.34	**77.4**	0.25
2	Protein_1*	92 kDa	1.5 mg/ml	PBS	7.4	**67.1**	0.31	**77**	0.71
3	Protein_1*	92 kDa	0.75 mg/ml	PBS	7.4	**66.9**	0.06	**76.6**	0.22

도면4e

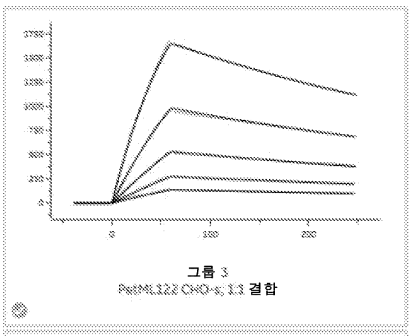


도면5

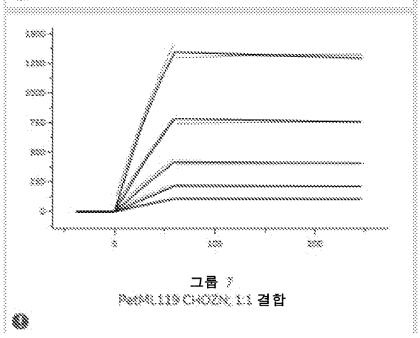
(a)



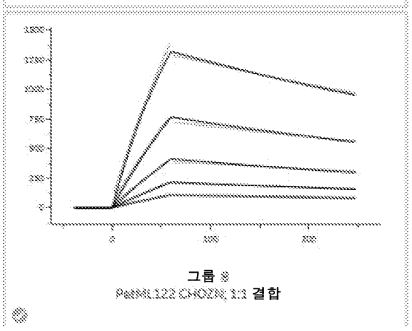
(c)



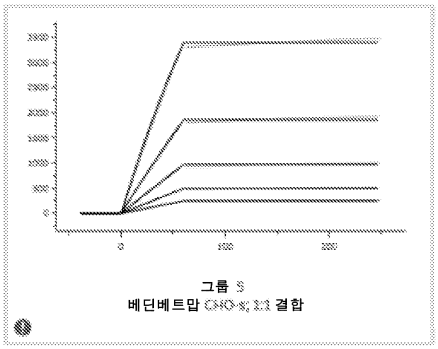
(b)



(d)



(e)

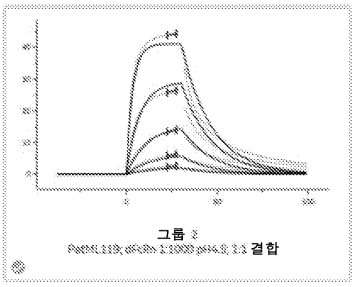


(f)

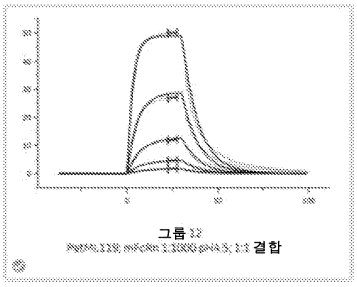
샘플	동역학 친화도 KD (nM)
베딘베트맙 : ProtA	0.01
PetML119 (CHO-s) : ProtA	2.8
PetML119 (CHOZN) : ProtA	1.3
PetML122 (CHO-s) : ProtA	10.6
PetML122 (CHOZN) : ProtA	15

도면6

(a)



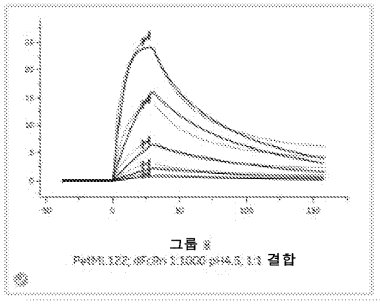
(b)



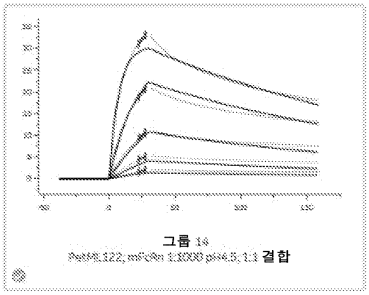
(c)

샘플	정상 상태 친화도 KD (μM)
PetML119 : 개 FcRn	6
PetML119 : 마우스 FcRn	2

(d)



(e)

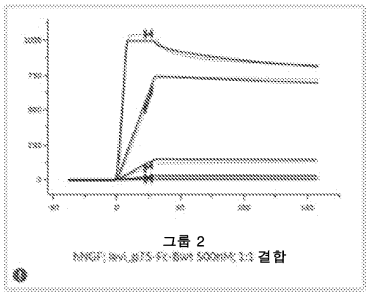


(f)

샘플	정상 상태 친화도 KD (μM)
PetML122 : 개 FcRn	0.4
PetML122 : 마우스 FcRn	0.09

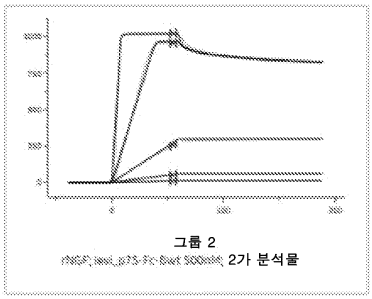
도면7

(a)



그룹 2

(b)

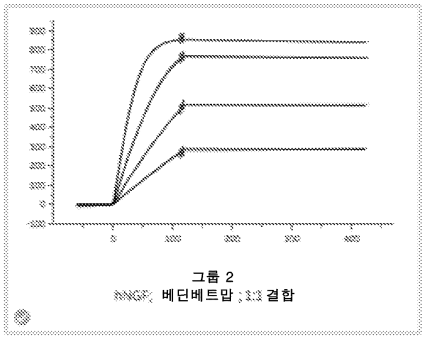


그룹 2

(c)

샘플	동역학 친화도 KD (nM)
PetML119 : 인간 NGF	0.12
PetML119 : 랫트 NGF	0.12

(d)

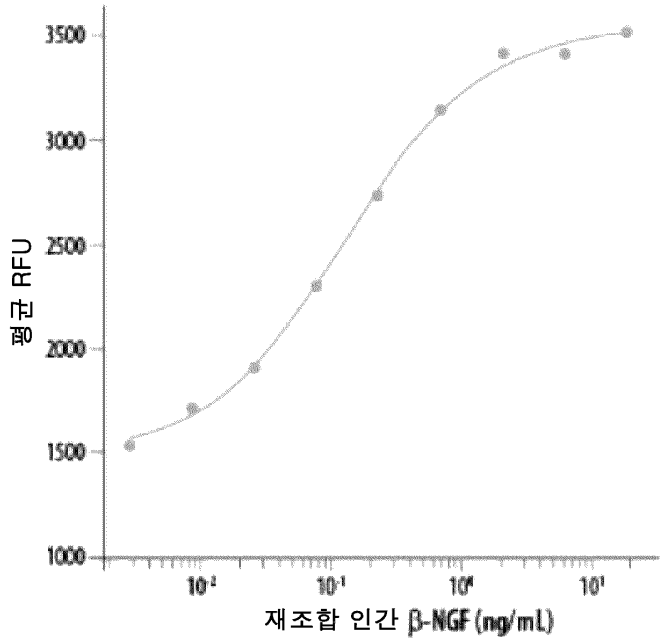


그룹 2

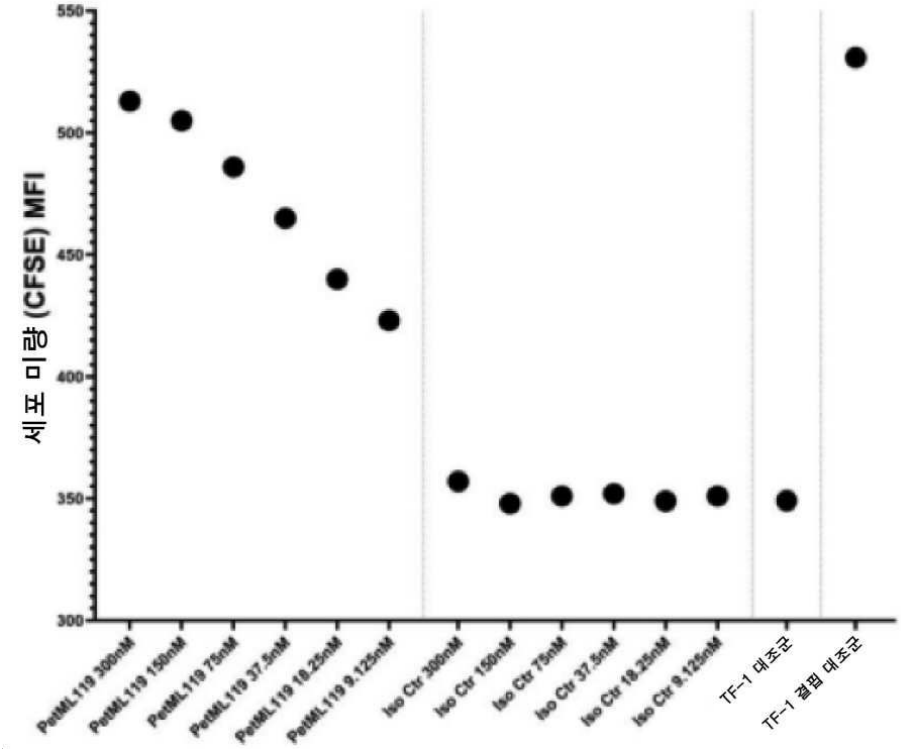
(e)

샘플	동역학 친화도 KD (nM)
베딘베트맙: 인간 NGF	0.073

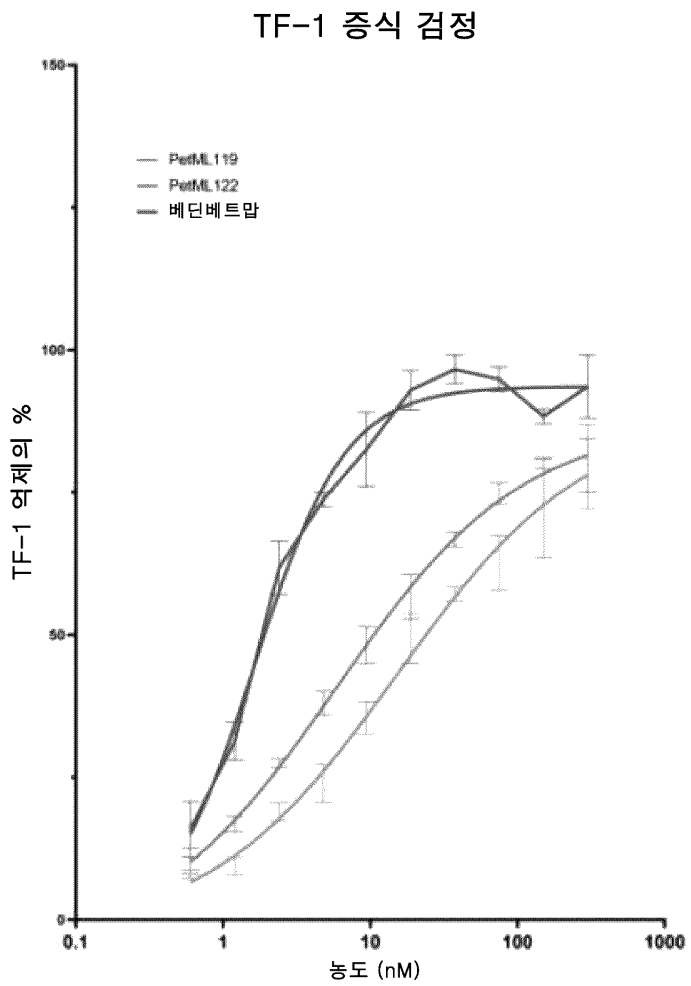
도면8a


3500
3000
2500
2000
1500
1000
평균 RFU
재조합 인간 β-NGF (ng/mL)

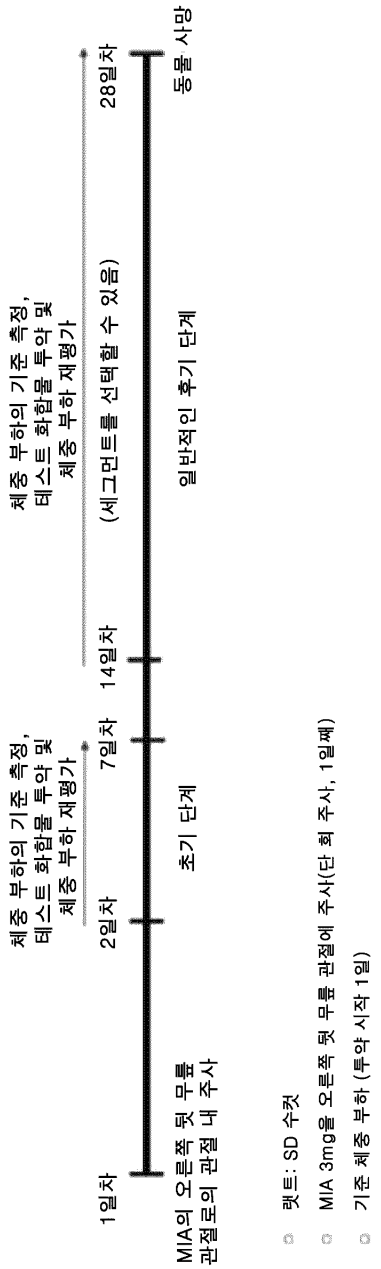
도면8b


550
500
450
400
350
300
세포 미량 (CFSE) MFI
PetML119 300nM
PetML119 150nM
PetML119 75nM
PetML119 37.5nM
PetML119 18.25nM
PetML119 9.125nM
Iso Ctr 300nM
Iso Ctr 150nM
Iso Ctr 75nM
Iso Ctr 37.5nM
Iso Ctr 18.25nM
Iso Ctr 9.125nM
TF-1 대조군
TF-1 결핍 대조군

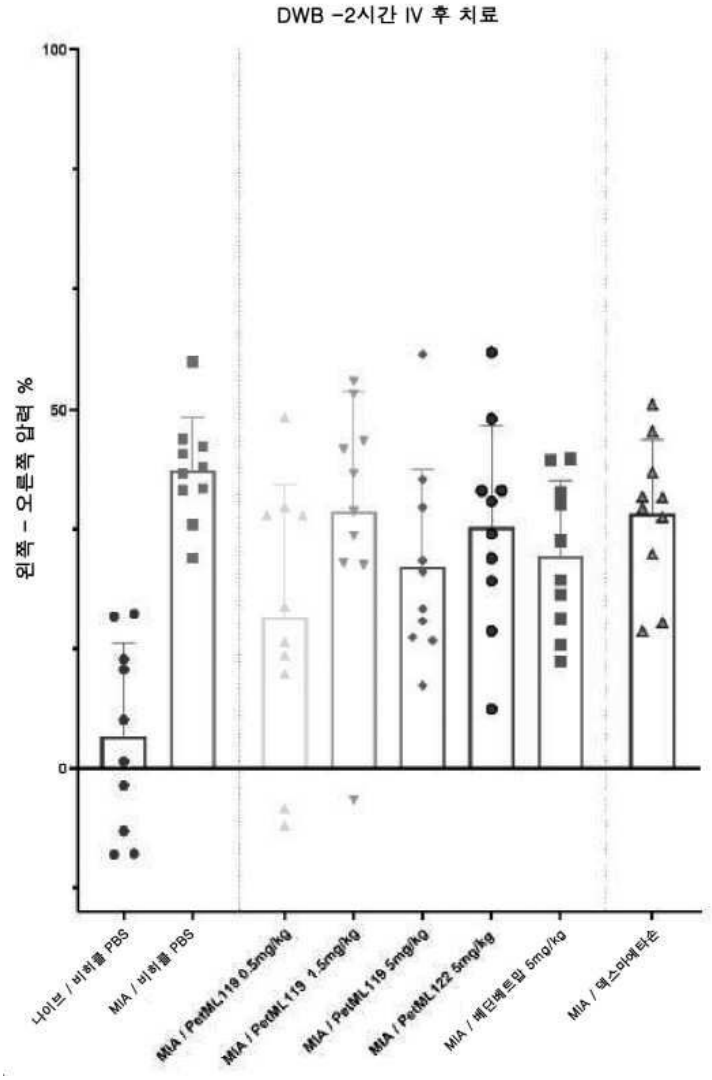
도면8c


TF-1 증식 검정
PetML119
PetML122
베딘베트맙
TF-1 억제의 %
150
100
50
0
0.1
1
10
100
1000
농도 (nM)

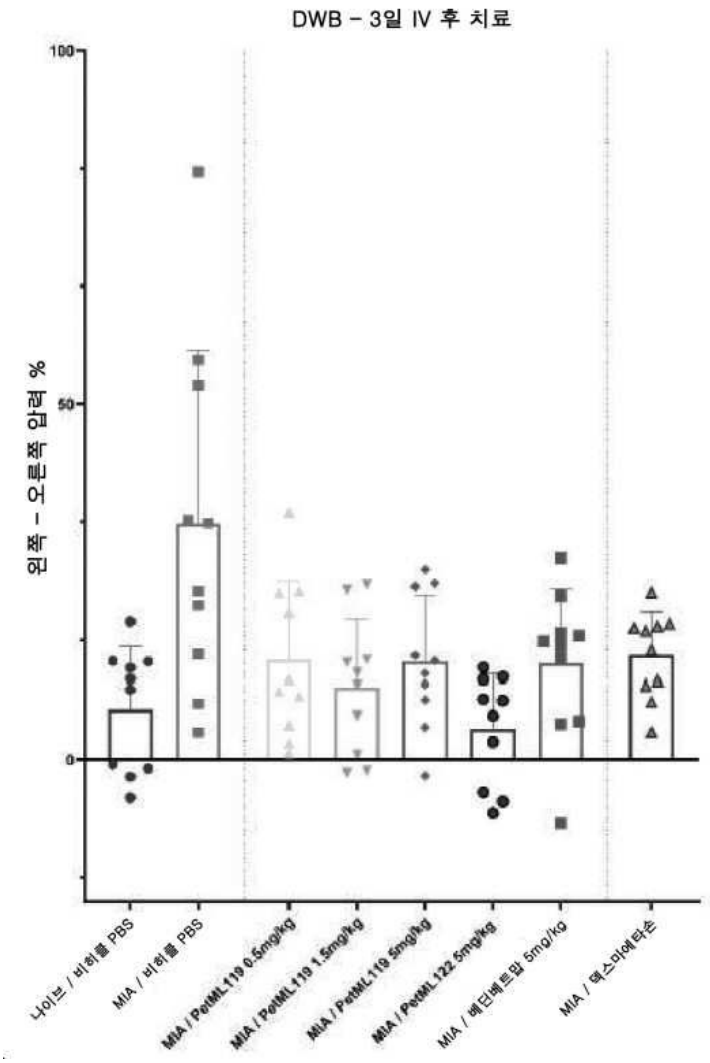
도면9


체중 부하의 기준 측정,
테스트 화합물 투약 및
체중 부하 재평가
체중 부하의 기준 측정,
테스트 화합물 투약 및
체중 부하 재평가
1일차
2일차
7일차
14일차
(세그먼트를 선택할 수 있음)
28일차
동물 사망
MIA의 오른쪽 뒷 무릎
관절로의 관절 내 주사
초기 단계
일반적인 후기 단계
랫트: SD 수컷
MIA 3mg을 오른쪽 뒷 무릎 관절에 주사(단 회 주사, 1일째)
기준 체중 부하 (투약 시작 1일)

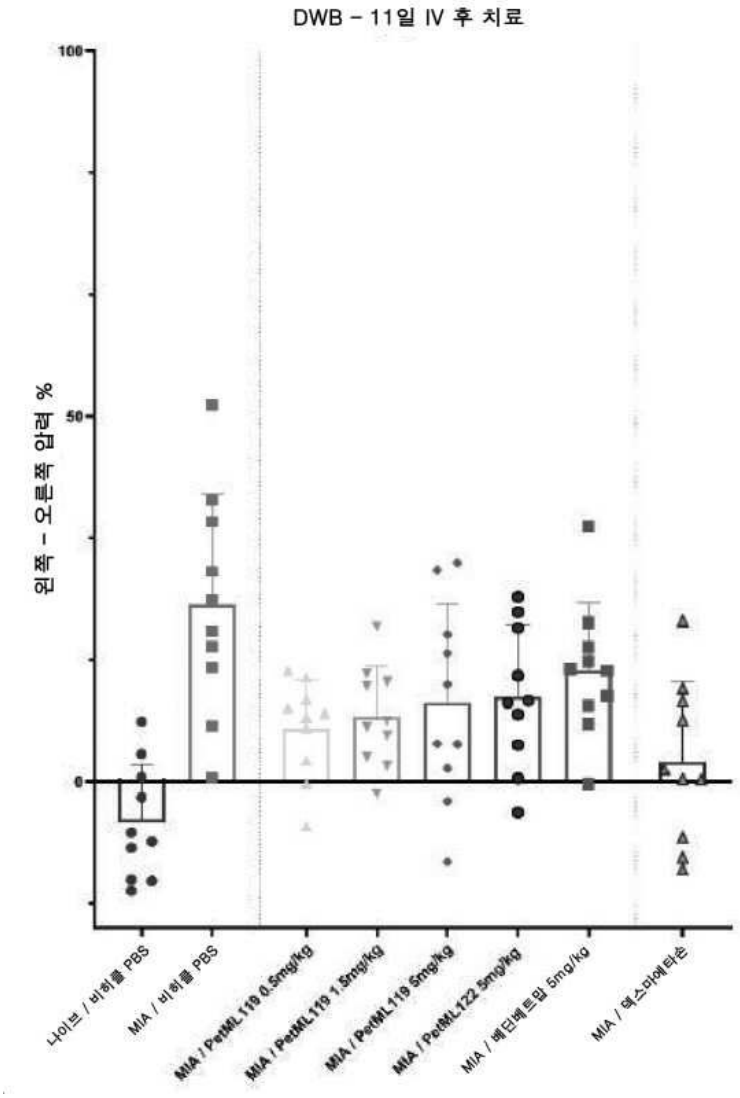
도면10a


DWB -2시간 IV 후 치료
왼쪽 - 오른쪽 압력 %
100
50
0
나이브 / 비히클 PBS
MIA / 비히클 PBS
MIA / PetML119 0.5mg/kg
MIA / PetML119 1.5mg/kg
MIA / PetML119 5mg/kg
MIA / PetML122 5mg/kg
MIA / 베타베트맙 5mg/kg
MIA / 덱스메데토미딘

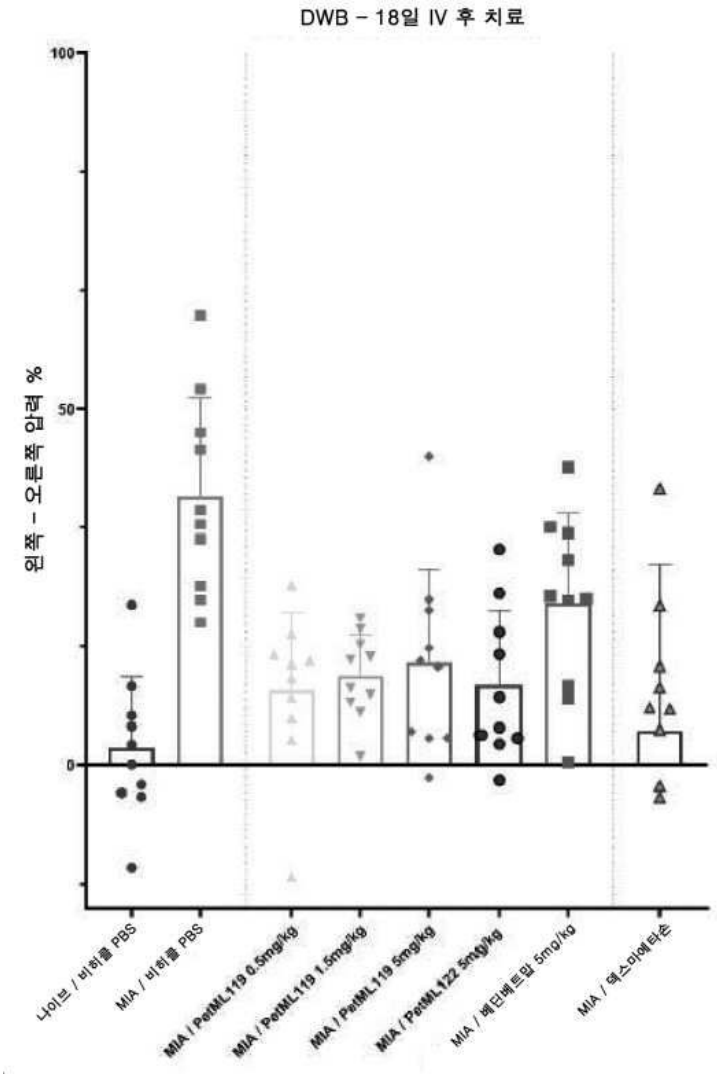
도면10b


DWB – 3일 IV 후 치료
왼쪽 – 오른쪽 압력 %
100
50
0
나이브 / 비히클 PBS
MIA / 비히클 PBS
MIA / PetML119 0.5mg/kg
MIA / PetML119 1.5mg/kg
MIA / PetML119 5mg/kg
MIA / PetML122 5mg/kg
MIA / 베타메타손 5mg/kg
MIA / 덱스메데토미딘

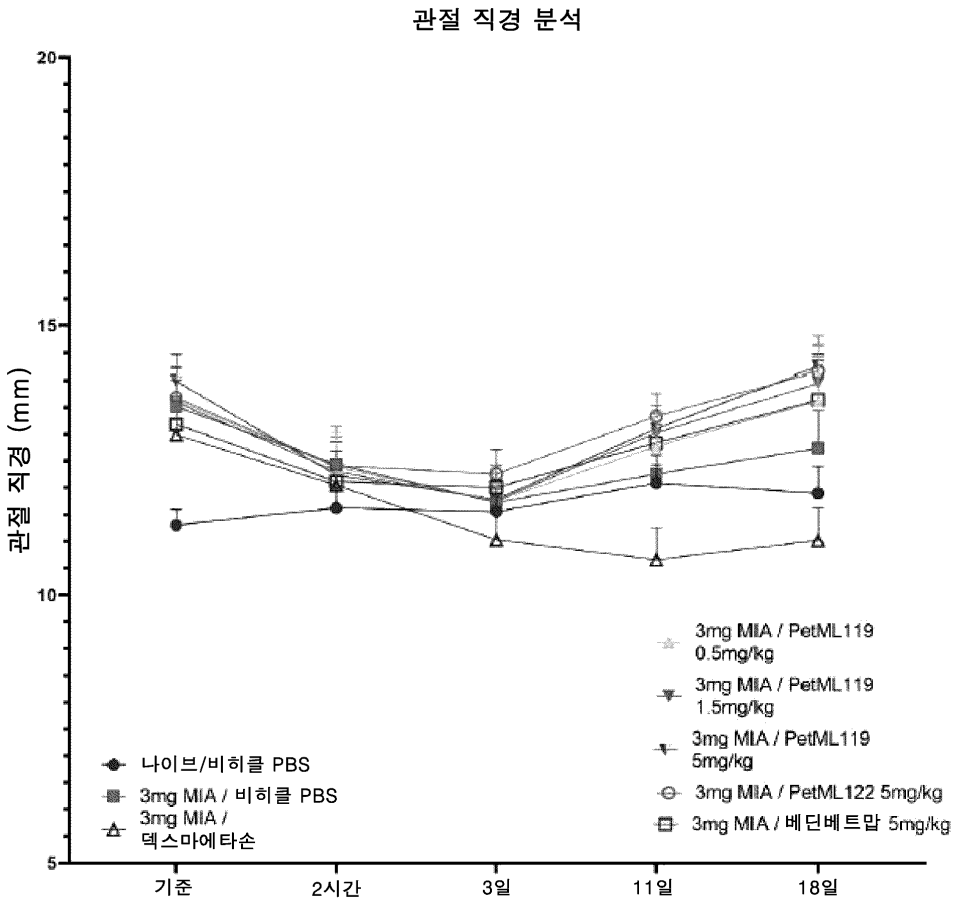
도면10c


DWB – 11일 IV 후 치료
왼쪽 – 오른쪽 압력 %
100
50
0
나이브 / 비히클 PBS
MIA / 비히클 PBS
MIA / PetML119 0.5mg/kg
MIA / PetML119 1.5mg/kg
MIA / PetML119 5mg/kg
MIA / PetML122 5mg/kg
MIA / 베더넥트맙 5mg/kg
MIA / 덱스메데토미딘

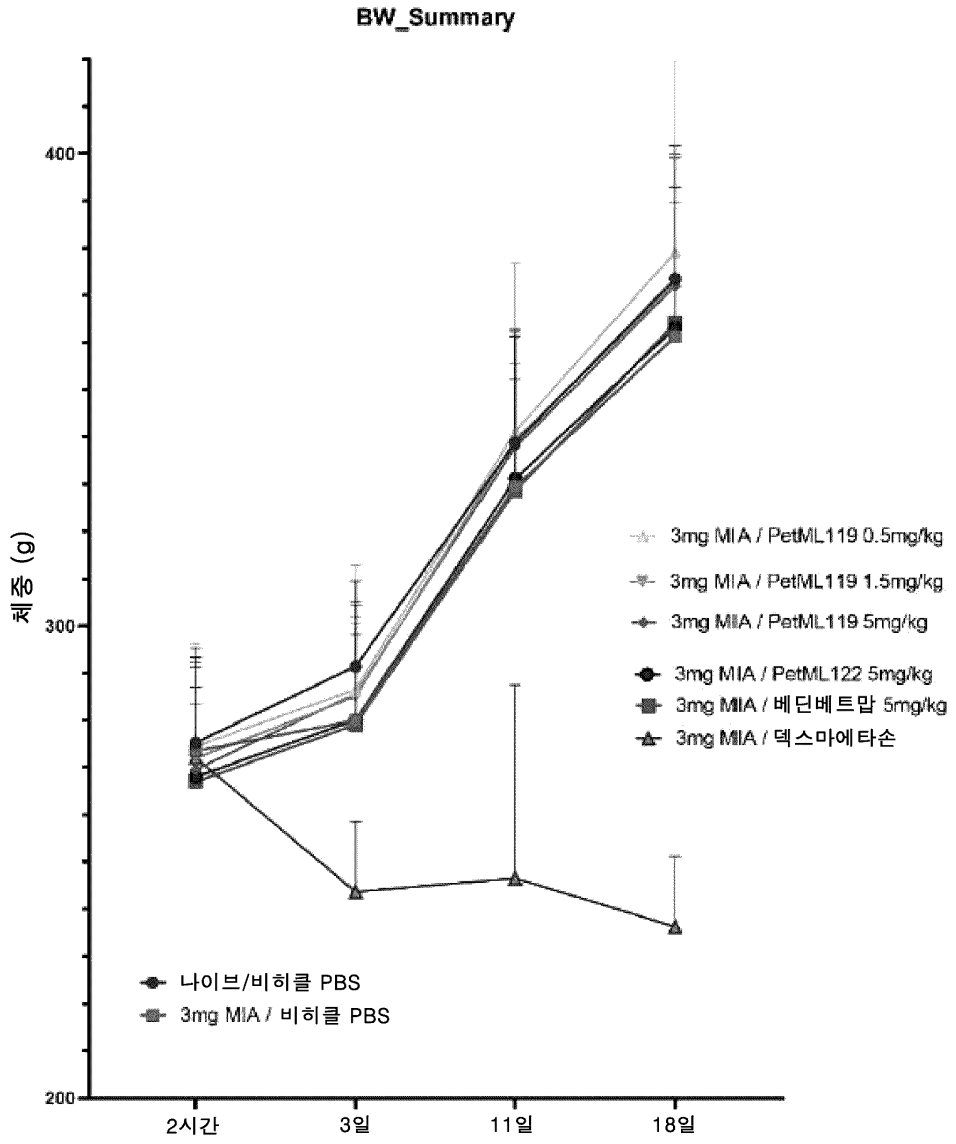
도면10d


DWB – 18일 IV 후 치료
왼쪽 – 오른쪽 압력 %
100
50
0
나이브 / 비히클 PBS
MIA / 비히클 PBS
MIA / PotML119 0.5mg/kg
MIA / PotML119 1.5mg/kg
MIA / PotML119 5mg/kg
MIA / PotML122 5mg/kg
MIA / 베타베트맙 5mg/kg
MIA / 덱스메데토미딘

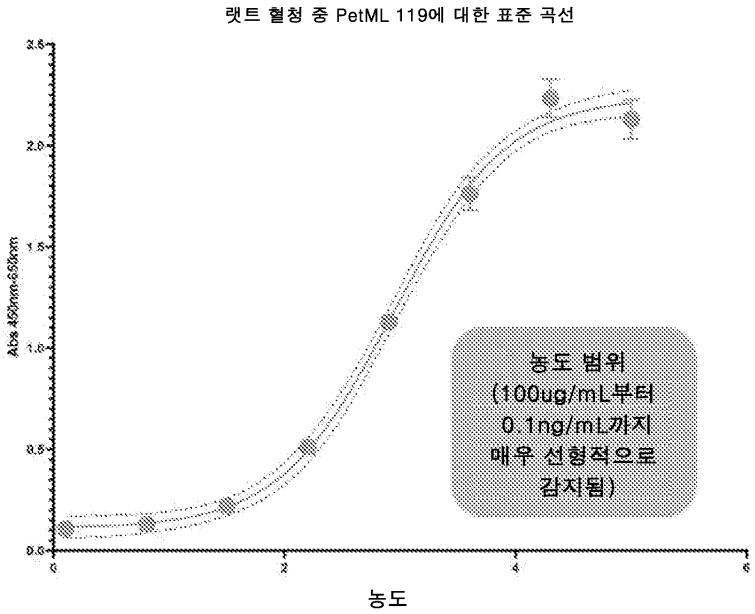
도면11a


관절 직경 분석
관절 직경 (mm)
20
15
10
5
기준
2시간
3일
11일
18일
나이브/비히클 PBS
3mg MIA / 비히클 PBS
3mg MIA / 덱스마에타손
3mg MIA / PetML119 0.5mg/kg
3mg MIA / PetML119 1.5mg/kg
3mg MIA / PetML119 5mg/kg
3mg MIA / PetML122 5mg/kg
3mg MIA / 베딘베트맙 5mg/kg

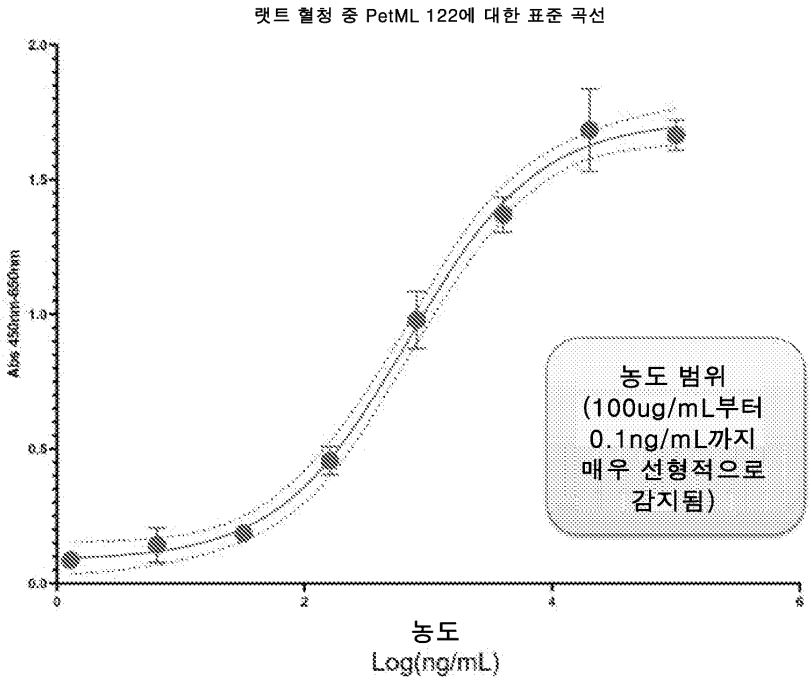
도면11b


BW_Summary
체중 (g)
400
300
200
2시간
3일
11일
18일
3mg MIA / PetML119 0.5mg/kg
3mg MIA / PetML119 1.5mg/kg
3mg MIA / PetML119 5mg/kg
3mg MIA / PetML122 5mg/kg
3mg MIA / 베딘베트맙 5mg/kg
3mg MIA / 덱스마에타손
나이브/비히클 PBS
3mg MIA / 비히클 PBS

도면12a

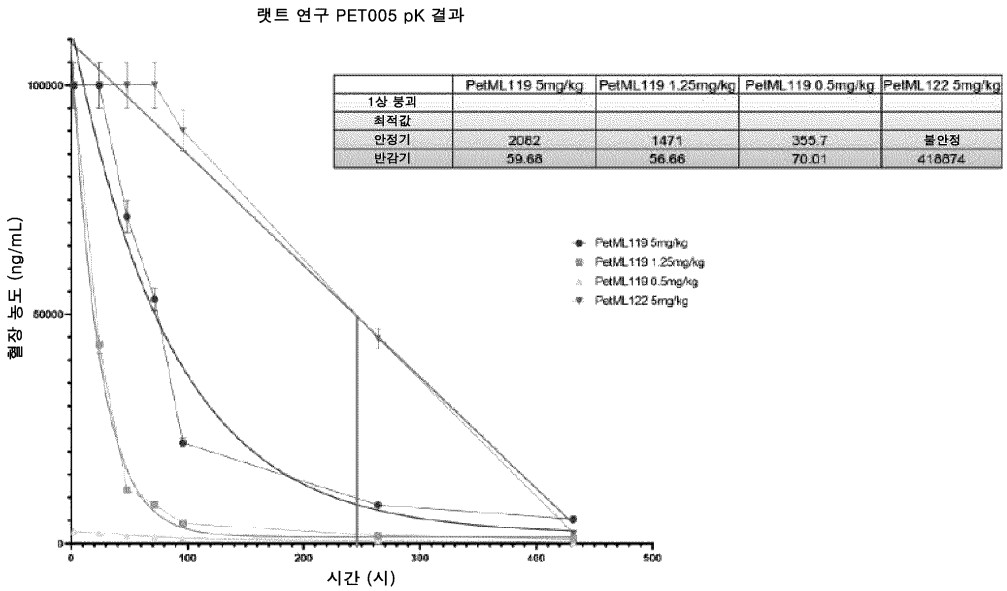

랫트 혈청 중 PetML 119에 대한 표준 곡선
Abs 450nm-650nm
농도
농도 범위
(100ug/mL부터
0.1ng/mL까지
매우 선형적으로
감지됨)

도면12b


랫트 혈청 중 PetML 122에 대한 표준 곡선
Abs 450nm-650nm
농도
Log(ng/mL)
농도 범위
(100ug/mL부터
0.1ng/mL까지
매우 선형적으로
감지됨)

도면12c

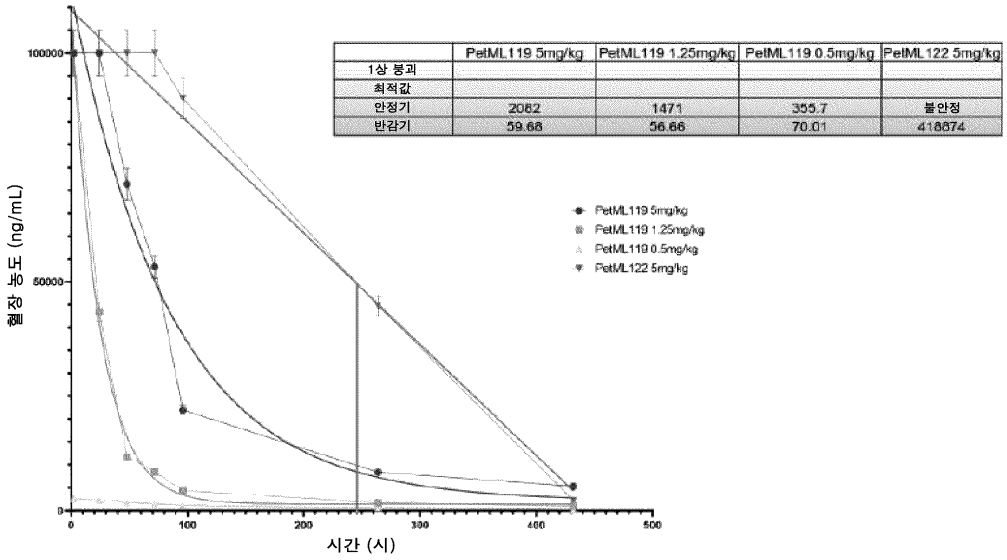
(c) (d)



	PetML119 5mg/kg	PetML119 1.25mg/kg	PetML119 0.5mg/kg	PetML122 5mg/kg
1상 봉괴				
최적값				
안정기	2082	1471	355.7	불안정
반감기	59.68	56.66	70.01	418874

도면12d

(c) (d)

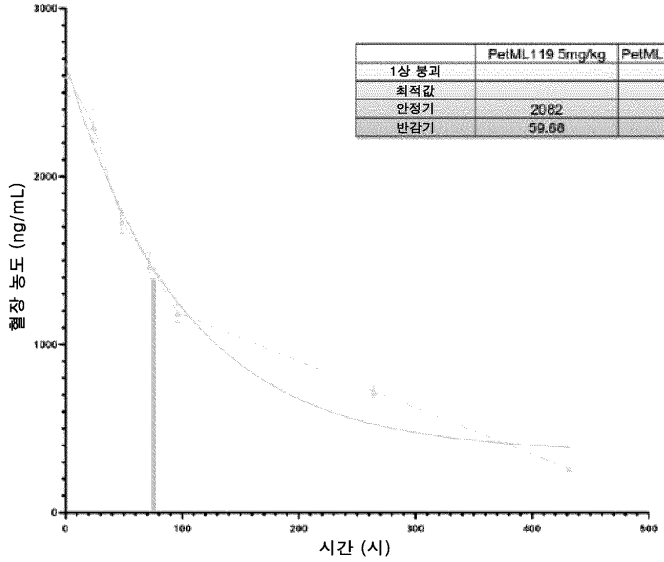


	PetML119 5mg/kg	PetML119 1.25mg/kg	PetML119 0.5mg/kg	PetML122 5mg/kg
1상 봉괴				
최적값				
안정기	2082	1471	355.7	불안정
반감기	59.68	56.66	70.01	418874

도면12e

(e) (f)

랫트 연구 PET005 pK 결과

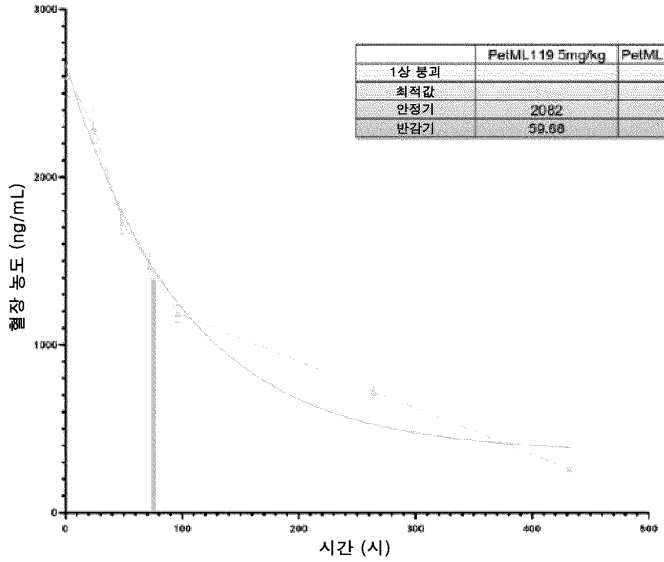


	PetML119 5mg/kg	PetML119 1.25mg/kg	PetML119 0.5mg/kg	PetML122 5mg/kg
1상 붕괴				
최적값				
안정기	2082	1471	355.7	불안정
반감기	59.66	56.66	70.01	418674

도면12f

(e) (f)

랫트 연구 PET005 pK 결과

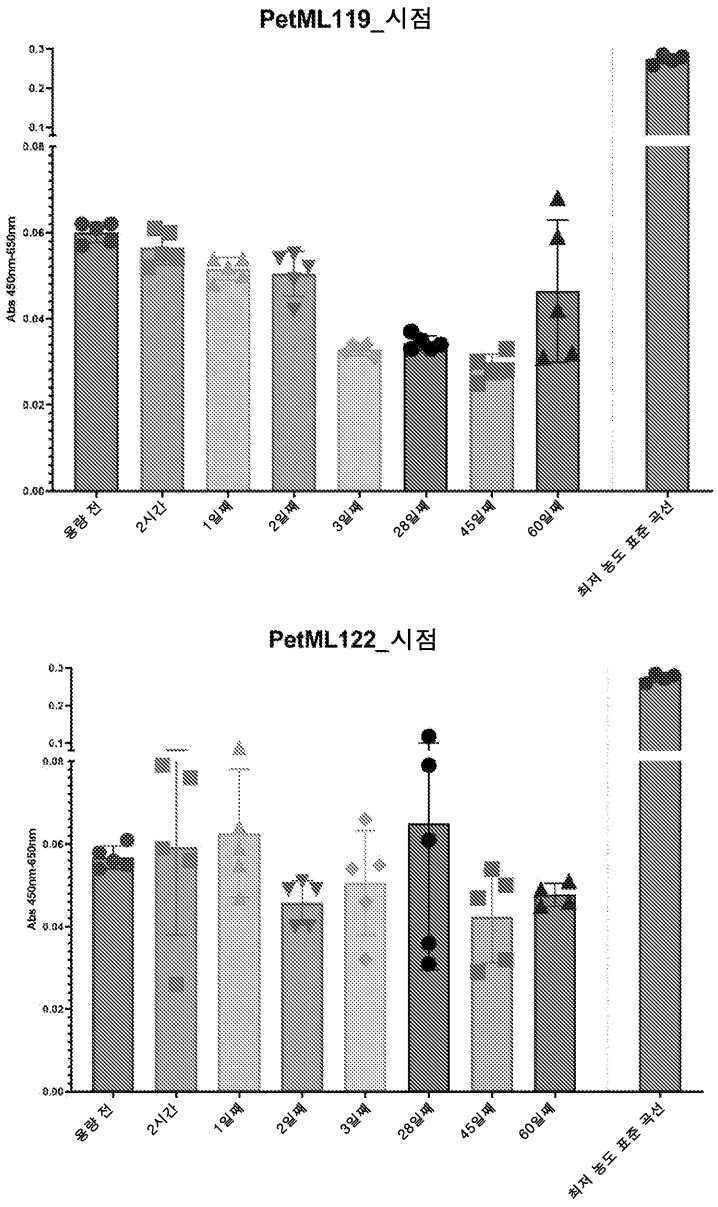


	PetML119 5mg/kg	PetML119 1.25mg/kg	PetML119 0.5mg/kg	PetML122 5mg/kg
1상 붕괴				
최적값				
안정기	2082	1471	355.7	불안정
반감기	59.66	56.66	70.01	418674

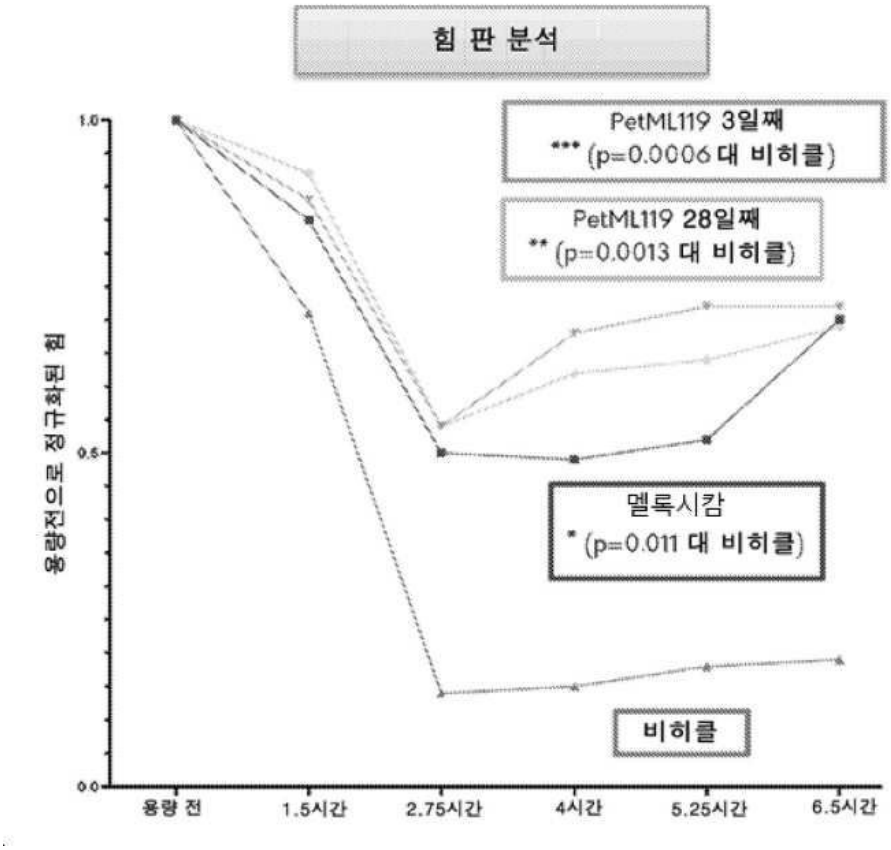
도면13a

동물 ID		체중 (kg)						
작업 번호	주문번호	2022년 1월 14일	2022년 1월 17일	2022년 1월 28일	2022년 1월 31일	2022년 2월 11일	2022년 2월 14일	2022년 3월 11일
469045	1	-	10.657	11.066	10.731	10.918	10.824	10.909
008438	2	-	11.044	11.423	10.950	11.261	11.069	10.647
008373	3	-	10.498	10.748	10.379	10.485	10.471	10.605
008423	4	-	10.660	11.015	10.597	10.692	10.832	10.834
430040	5	-	10.111	10.659	9.985	10.029	10.118	9.882
430031	6	11.178	10.851	-	10.760	10.740	10.781	10.685
430022	7	10.361	10.099	-	10.080	10.337	10.180	10.163
839431	8	11.035	10.914	-	10.708	10.584	10.558	10.703
840259	9	10.745	10.767	-	10.797	10.634	10.732	10.746
839425	10	10.324	9.947	-	10.121	10.136	10.219	10.169
총	평균	NA	10.555	NA	10.511	10.582	10.578	10.534
	SD	NA	0.380	NA	0.344	0.363	0.323	0.340
그룹 1	평균	NA	10.594	10.982	10.528	10.677	10.663	10.575
	SD	NA	0.337	0.301	0.368	0.463	0.372	0.408
그룹 2	평균	10.729	10.516	NA	10.493	10.486	10.494	10.493
	SD	0.386	0.456	NA	0.360	0.245	0.282	0.300

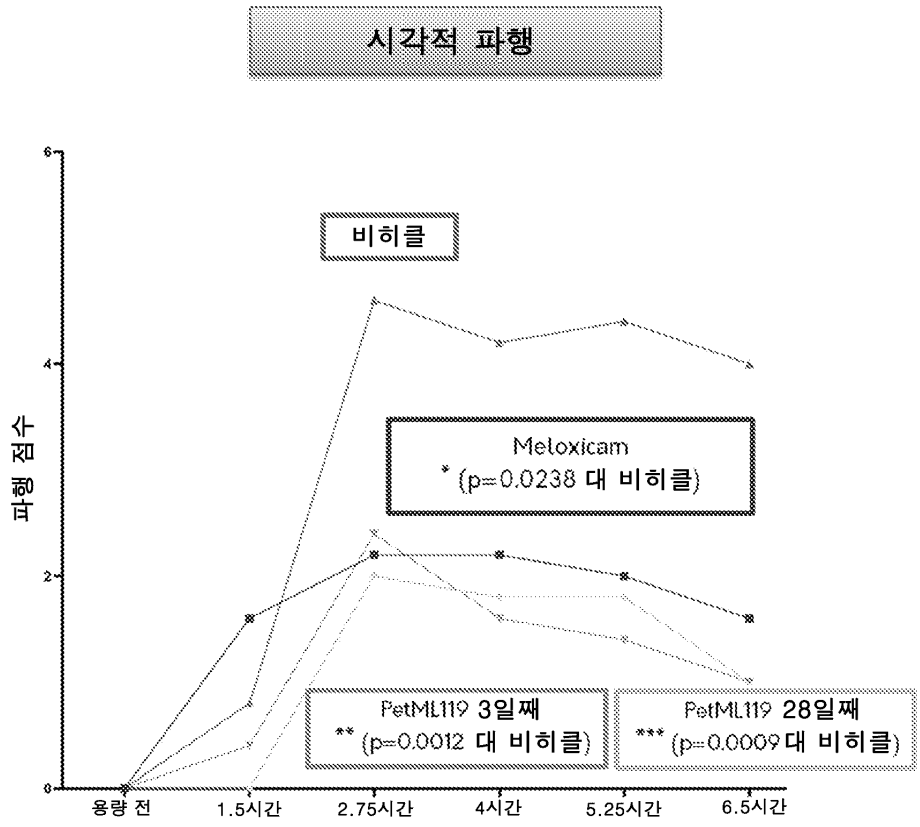
도면13b


PetML119_시점
Abs 450nm-650nm
0.3
0.2
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
용량 전
2시간
1일째
2일째
3일째
28일째
45일째
60일째
최저 농도 표준 곡선
PetML122_시점
Abs 450nm-650nm
0.3
0.2
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
용량 전
2시간
1일째
2일째
3일째
28일째
45일째
60일째
최저 농도 표준 곡선

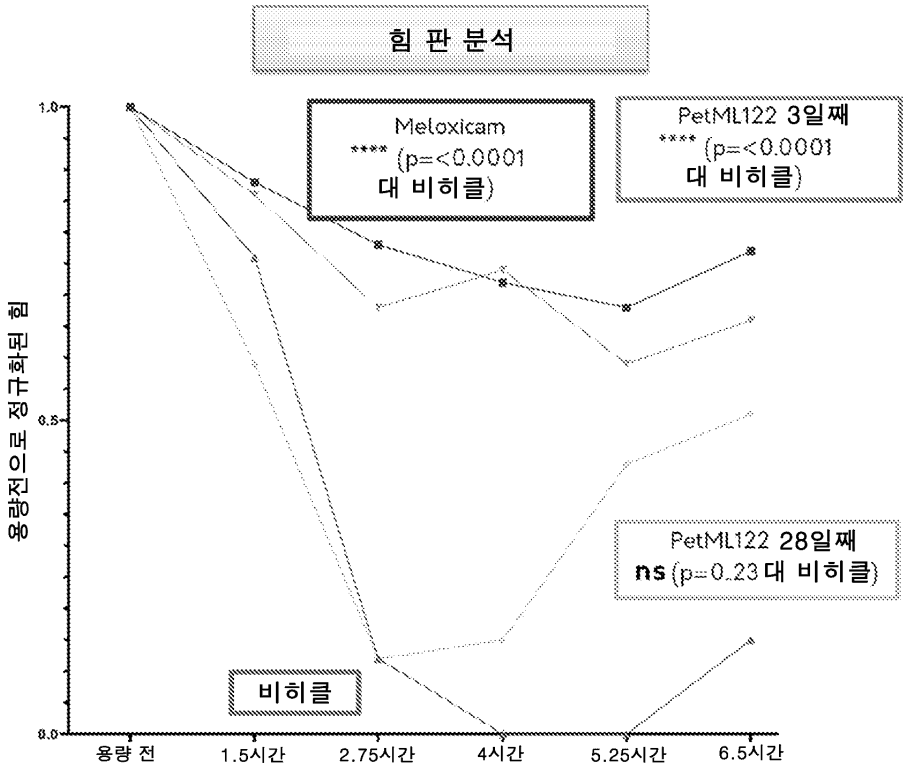
도면14a


힘 판 분석
PetML119 3일째
*** (p=0.0006 대 비히클)
PetML119 28일째
** (p=0.0013 대 비히클)
멜록시캄
* (p=0.011 대 비히클)
비히클
용량전으로 정규화된 힘
1.0
0.5
0.0
용량 전
1.5시간
2.75시간
4시간
5.25시간
6.5시간

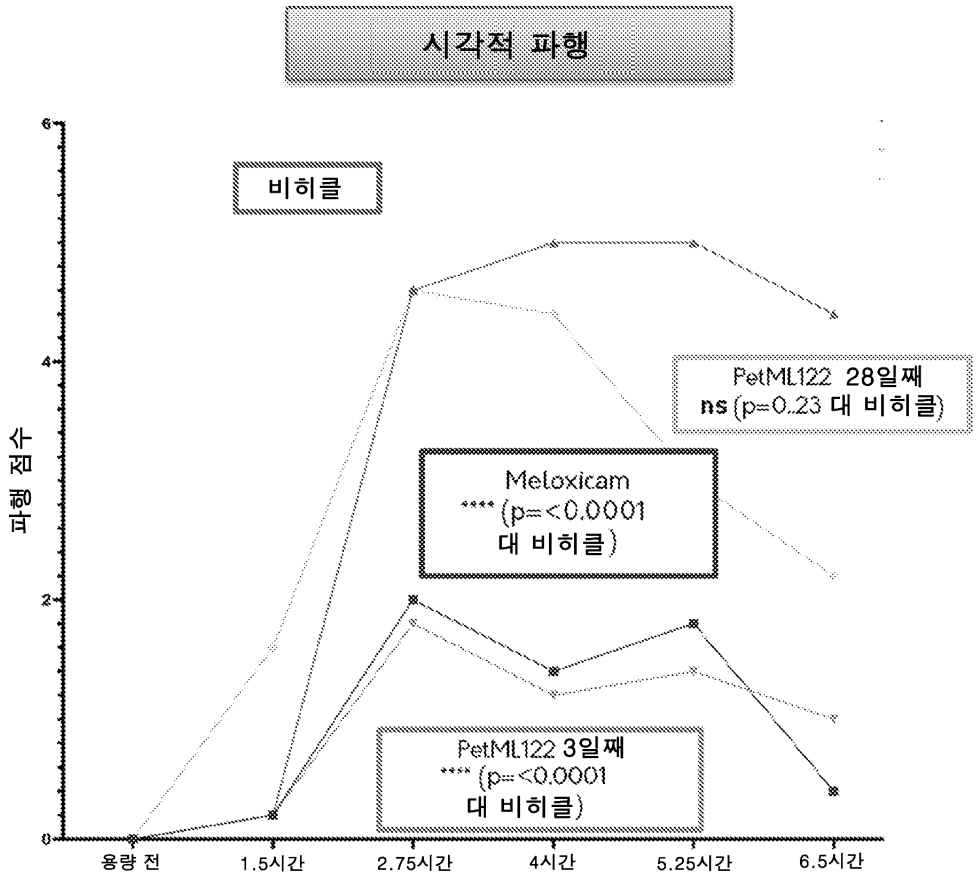
도면14b


시각적 파행
비히클
Meloxicam
* (p=0.0238 대 비히클)
PetML119 3일째
** (p=0.0012 대 비히클)
PetML119 28일째
*** (p=0.0009 대 비히클)
파행 점수
0
2
4
6
용량 전
1.5시간
2.75시간
4시간
5.25시간
6.5시간

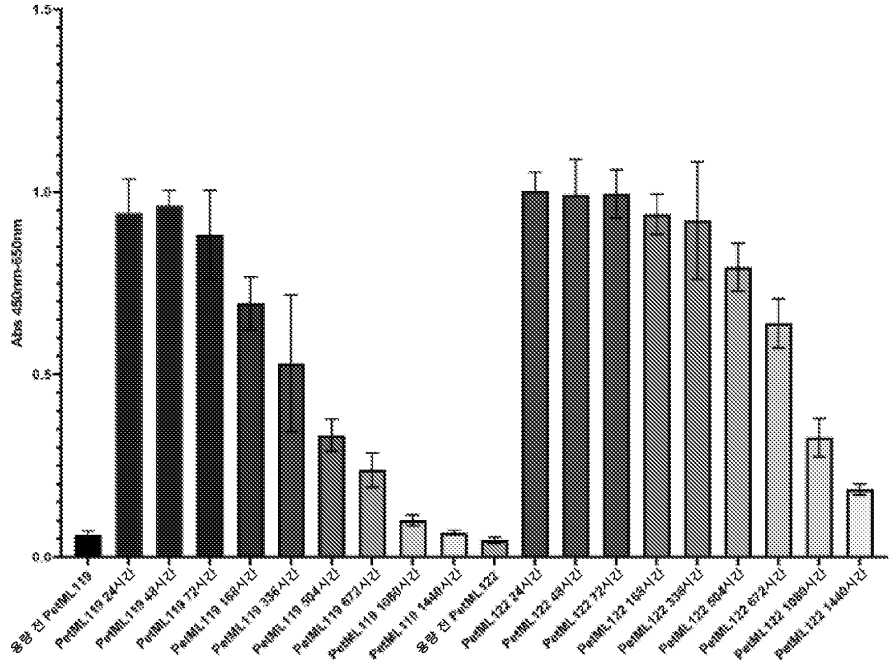
도면14c


힘 판 분석
Meloxicam
**** (p=<0.0001
대 비히클)
PetML122 3일째
**** (p=<0.0001
대 비히클)
PetML122 28일째
ns (p=0.23 대 비히클)
비히클
용량전으로 정규화된 힘
1.0
0.5
0.0
용량 전
1.5시간
2.75시간
4시간
5.25시간
6.5시간

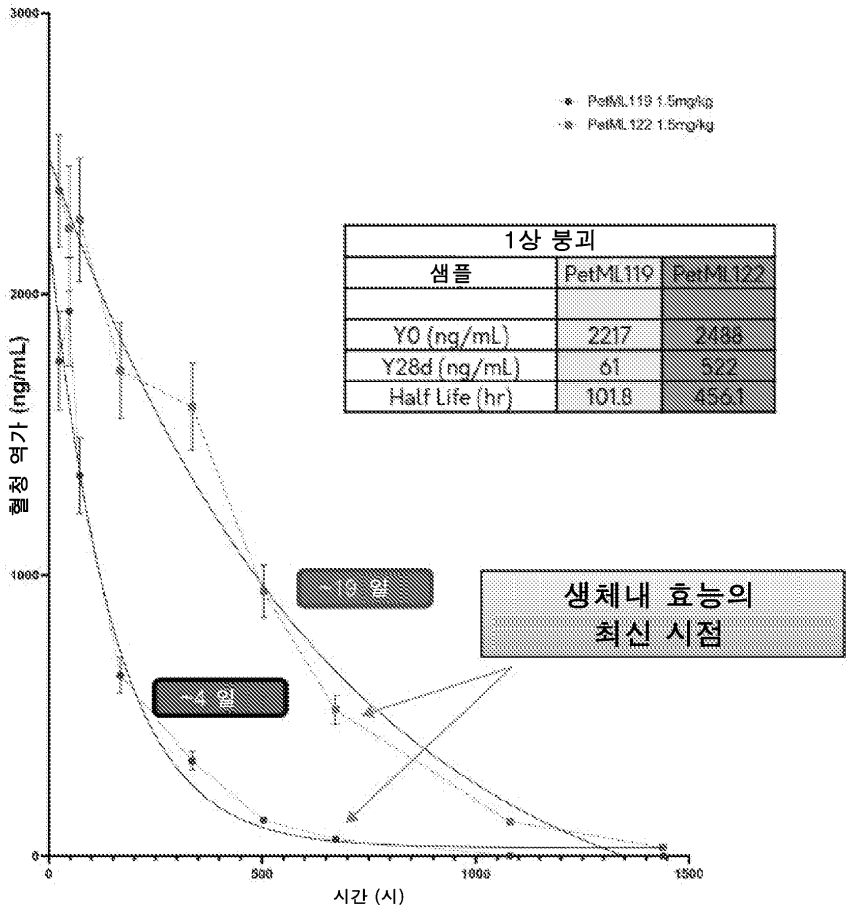
도면14d


시각적 파행
비히클
PetML122 28일째
ns (p=0.23 대 비히클)
Meloxicam
**** (p=<0.0001
대 비히클)
PetML122 3일째
**** (p=<0.0001
대 비히클)
파행 점수
0
2
4
6
용량 전
1.5시간
2.75시간
4시간
5.25시간
6.5시간

도면15a


Abs 450nm-650nm
0.0
0.5
1.0
1.5
용량 전 PetML119
PetML119 24시간
PetML119 48시간
PetML119 72시간
PetML119 168시간
PetML119 336시간
PetML119 504시간
PetML119 672시간
PetML119 1080시간
PetML119 1440시간
용량 전 PetML122
PetML122 24시간
PetML122 48시간
PetML122 72시간
PetML122 168시간
PetML122 336시간
PetML122 504시간
PetML122 672시간
PetML122 1080시간
PetML122 1440시간

도면15b


PetML119 1.5mg/kg
PetML122 1.5mg/kg
1상 붕괴
샘플 | PetML119 | PetML122
Y0 (ng/mL) | 2217 | 2486
Y28d (ng/mL) | 61 | 522
Half Life (hr) | 101.8 | 456.1
생체내 효능의 최신 시점
혈청 역가 (ng/mL)
시간 (시)
0
500
1000
1500
2000
3000