(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월25일
(11) 등록번호 10-2182523
(24) 등록일자 2020년11월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/65 (2006.01) *A61K 38/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/65 (2013.01)
A61K 38/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7018991
(22) 출원일자(국제) 2013년12월16일
심사청구일자 2018년11월27일
(85) 번역문제출일자 2015년07월15일
(65) 공개번호 10-2015-0095879
(43) 공개일자 2015년08월21일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2013/060985
(87) 국제공개번호 WO 2014/097116
국제공개일자 2014년06월26일
(30) 우선권주장
61/738,475 2012년12월18일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2000040612 A1*
WO2011011073 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35
(72) 발명자
포르나로, 마라
스위스 체하-4056 바젤 포룸 1 노파르티스 인스티튜츠 포 바이오메드. 리서치 노파르티스 파마 아게
후버, 토마스
스위스 체하-4056 바젤 포룸 1 노파르티스 인스티튜츠 포 바이오메드. 리서치 노파르티스 파마 아게
추리니, 마우로
스위스 체하-4056 바젤 포룸 1 노파르티스 인스티튜츠 포 바이오메드. 리서치 노파르티스 파마 아게
(74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 김경미

(54) 발명의 명칭 **안정화된 인슐린-유사 성장 인자 폴리펩티드**

(57) 요 약

본 발명은 IGF-1 변형의 분야에 속한다. 특히, 본 발명은 E-펩티드의 절단이 방지되는 변형된 IGF-폴리펩티드 및 변형된 IGF-1 전구체 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 발명은 또한 근육 질환 및 장애를 치료하기 위한 상기 폴리펩티드의 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
C07K 2319/30 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 IGF-1 단백질을 포함하며, 여기서 상기 IGF-1 단백질의 위치 42의 아미노산 글리신이 결실되거나 세린으로 돌연변이되고, 상기 인간 IGF-1 단백질의 아미노산의 넘버링이 서열 1에 상응하는 것인 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 인간 IGF-1 단백질이

a. 아미노산 E3이 결실되고,

b. 아미노산 G42가 세린으로 돌연변이되고,

c. 아미노산 R37이 알라닌으로 돌연변이되는

변형을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 인간 IGF-1 단백질이

a. 아미노산 G1, P2 및 E3이 결실되고,

b. 아미노산 G42가 세린으로 돌연변이되고,

c. 아미노산 R37이 알라닌으로 돌연변이되는

변형을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서, 인간 IGF-1 단백질이

a. 아미노산 G1, P2 및 E3이 결실되고,

b. 아미노산 G42가 세린으로 돌연변이되고,

c. 아미노산 R36이 글루타민으로 돌연변이되고,

d. 아미노산 R37이 알라닌으로 돌연변이되는

변형을 포함하는 것인 폴리펩티드.

청구항 5

위치 42의 아미노산 글리신이 아미노산 세린으로 치환되고,

(a) 아미노산 G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되거나;

(b) 아미노산 G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되거나;

(c) 아미노산 G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 치환 또는 결실되거나;

(d) 아미노산 G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되거나;

(e) 아미노산 G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌으로 치환되거나;

(f) 아미노산 G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되거나;

(g) 아미노산 G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 치환 또는 결실되거나;

(h) 아미노산 G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되거나;

(i) 아미노산 G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고 R37이 알라닌으로 치환된, 인간 IGF-1 단백질.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1) 변형의 분야에 속한다. 특히, 본 발명은 인간 이뮤노글로불린 Fc 영역에 연결된 변형된 IGF-1 폴리펩티드에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인슐린-유사 성장 인자 (IGF)는 세포가 그의 생리학적 환경과 소통하기 위해 이용하는 복합 시스템의 일부이다. 상기 복합 시스템 (종종 인슐린-유사 성장 인자 축으로 언급됨)은 2개의 세포-표면 수용체 (IGF-1R 및 IGF-2R), 2개의 리간드 (IGF-1 및 IGF-2), 6개의 고-친화도 IGF-결합 단백질 (IGFBP 1-6)의 패밀리, 및 회합된 IGFBP 분해 효소 (프로테아제)로 이루어진다. 상기 시스템은 정상 생리학의 조절뿐만 아니라 많은 병리학적 상태에도 중요하다 (Glass, Nat Cell Biol 5:87-90, 2003).

[0003] IGF 축은 세포 증식의 촉진 및 세포 사멸 (아폽토시스)의 억제에서 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다. IGF-1은 주로 인간 성장 호르몬 (hGH)에 의한 자극의 결과로서 간에 의해 분비된다. 인체의 거의 모든 세포, 특히 근육, 연골, 뼈, 간, 신장, 신경, 피부 및 폐 내의 세포는 IGF-1에 의해 영향받는다. 인슐린-유사 효과에 추가로, IGF-1은 또한 세포 성장을 조절할 수 있다. IGF-1 및 IGF-2는 IGF-결합 단백질로서 알려진 유전자 생성물의 패밀리에 의해 조절된다. 상기 단백질은 IGF 수용체에 대한 결합을 억제함으로써 IGF 작용을 억제하고 또한 수용체에 대한 전달을 돕고 혈류 내의 IGF 반감기를 증가시킴으로써 IGF 작용을 촉진하는 것을 수반하는 복잡한 방식으로 IGF 작용을 조절하는 것을 돕는다. 적어도 6개의 특성화된 결합 단백질 (IGFBP1-6)이 존재한다.

[0004] 인간 IGF-1 (소마토메딘으로도 불림)은 그의 성숙 형태에서, 배양물 내의 매우 광범한 세포의 성장을 촉진하는 것으로 밝혀진 70개 아미노산의 작은 단백질이다. IGF-1 단백질은 초기에 3개의 공지의 스플라이스 변이체 mRNA에 의해 코딩된다. 각각의 mRNA의 오픈 리딩 프레임은 70개 아미노산 IGF-1 (서열 1) 및 특정 IGF-1 mRNA에 따라 C-말단에 특정 E-펩티드를 함유하는 전구체 단백질을 코딩한다. 상기 E-펩티드는 Ea (rsvraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm; 서열 2), Eb (rsvraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgwpkthpggeqkegteaslqirgkkkeqrreigsrnaecrgkkgk; 서열 3) 및 Ec (rsvraqrhtdmpktqkyqppstnkntksqrrkgstfeerk; 서열 4) 펩티드로 명명되었고, 35 내지 87개 아미노산의 길이이고, N-말단에 공통적인 서열 영역 및 C-말단에 가변 서열 영역을 포함한다. 예를 들어, IGF-1-Ea에 대한 야생형 오픈 리딩 프레임은 리더 서열을 포함하는 135개 아미노산의 폴리펩티드 및 리더 서열이 없는 105개 아미노산의 폴리펩티드 (gpetlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssrrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksarsvraqrhtdmpktqkevhlknasrgsagnknyrm; 서열 5)를 코딩한다. 생리학적 발현시에, E-펩티드는 내인성 프로테아제에 의해 전구체로부터 절단되어 성숙 70개 아미노산 IGF-1을 생성한다. 인간 혈청 내의 IGF-1의 이용가능성 및 반감기는 주로 프로테아제 및 IGF-1 결합 단백질 (IGFBP)에 의해 영향을 받고 조절된다. IGFBP는 IGF-1 활성을 억제하거나 증가시킬 수 있다 (Oh Y, et al., Characterization of the affinities of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins 1-4 for IGF-I, IGF-II, IGF-I/insulin hybrid, and IGF-I analogs. Endocrinology. 1993 Mar; 132(3): 1337-44). IGF-1의 반감기를 증가시키기 위한 전략은 선행 기술에서 설명된 바 있다. 고려되는 전략은 다음과 같다:

[0005] (i) 세린 프로테아제에 의한 인간 혈청 내의 IGF-1의 절단을 방지하거나, 또는 IGF-1의 이용가능성 또는 혈청 반감기에 대한 IGF-1 결합 단백질의 부정적인 영향을 감소시키는 것을 목적으로 하는 특이적 돌연변이를 포함하는 IGF-1 변이체의 생산 (WO200040613, WO05033134, WO2006074390, WO2007/146689);

[0006] (ii) 성숙 IGF-1 단백질이 인간 이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합된 IGF-1 융합 단백질의 생산 (WO2005033134, WO200040613);

[0007] (iii) 프로테아제에 의한 IGF-1로부터의 E-펩티드의 절단이 전구체 단백질의 변형에 의해 감소되는, IGF-1 전구체 단백질의 사용 (WO2007146689);

[0008] (iv) 상기한 전략의 조합 ((i)/(ii) WO05033134, (i)/(ii) WO200040613, (i)/(iii) WO2007146689).

[0009] 상기 기재된 전략에도 불구하고, 인간 이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합된 IGF-1 전구체 변이체는 주로 다음과 같은 2개의 이유 때문에 계속 불량한 약물 후보가 되고 있다: (i) 포유동물 생산 시스템에서 낮은 생산 수율, 및 (ii) 치료상 유해 사건인 저혈당증을 야기할 수 있는, 비변형된 인간 야생형 IGF-1에 비해 인슐린 수용체 (InsR)에 대한 증가된 결합 친화도.

[0010] 따라서, 상기 기재된 선행 기술의 문제를 극복하는 기술이 필요하다. 본 발명은 많은 측면에서 상기 필요성을 해결한다.

발명의 내용

[0011] 본 개시내용의 제1 주제는 인간 IGF-1 (hIGF-1) 단백질을 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이고, 여기서 상기 hIGF-1 단백질의 위치 42의 아미노산 글리신은 결실 또는 치환되고, 아미노산의 넘버링은 서열 1에 상응한다.

[0012] 본 개시내용의 추가의 실시양태는 인간 IgG의 이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합된 인간 IGF-1 단백질을 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이고, 여기서 인간 IGF-1 단백질의 위치 42의 아미노산 글리신은 결실 또는 치환되고, 아미노산의 넘버링은 서열 1에 상응한다.

[0013] 본 개시내용의 또 다른 주제는 인간 IGF-1 전구체 단백질을 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이고, 여기서 상기 인간 IGF-1 전구체 단백질의 위치 42의 아미노산 글리신은 결실 또는 치환되고, 아미노산의 넘버링은 서열 5에 상응한다.

[0014] 본 개시내용의 추가의 실시양태는 인간 IgG의 이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합된 인간 IGF-1 전구체 단백질을 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이고, 여기서 인간 IGF-1 전구체 단백질의 위치 42의 아미노산 글리신은 결실 또는 치환되고, 아미노산의 넘버링은 서열 5에 상응한다.

[0015] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 위치 42의 아미노산 글리신이 결실되거나 세린에 의해 치환된 상기 기재된 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0016] 추가의 실시양태에서, 상기 언급된 인간 IGF-1 단백질은 아미노산 G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69 및/또는 A70에 추가의 결실 또는 돌연변이를 포함한다.

[0017] 추가의 실시양태에서, 상기 언급된 인간 IGF-1 전구체 단백질은 Ea-펩티드 및 아미노산 G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69, A70, R71, S72, R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 및/또는 M105의 추가의 결실 또는 돌연변이를 포함한다.

[0018] 본 개시내용의 선행 실시양태와 조합될 수 있는 또 다른 실시양태에서, 인간 IGF-1 전구체 단백질 및 Fc 영역은 펩티드 힌지 영역에 의해 분리된다.

[0019] 따라서, 본 개시내용은 또한 펩티드 힌지 영역이 펩티드 힌지 1 (서열 22), 힌지 2 (서열 23) 및 힌지 3 (서열 24)으로 이루어진 군으로부터 선택된 상기 기재된 인간 IGF-1 전구체 단백질에 관한 것이다.

[0020] 특정 실시양태에서, 상기 기재된 인간 IGF-1 전구체 단백질은 아미노산 R74, R77 및/또는 R104에서 Ea-펩티드에서 돌연변이될 때, 상기 아미노산 R74, R77 및 R104는 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0021] 폴리펩티드는 상기 기재된 인간 IGF-1 단백질 또는 인간 IGF-1 전구체 단백질을 포함하거나 이로 이루어지고, 여기서

[0022] a. 아미노산 E3, R71 및 S72는 결실되고,

[0023] b. 아미노산 G42는 결실되거나 또는 세린에 의해 치환되고,

[0024] c. 아미노산 R37은 알라닌으로 돌연변이되고, 아미노산의 넘버링은 서열 5에 상응한다.

[0025] 본 개시내용의 또 다른 특정 실시양태는 상기 기재된 인간 IGF-1 전구체 단백질에 관한 것이고, 여기서 E-펩티드는 Ea-펩티드이고,

[0026] a. 아미노산 G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71 및 S72는 결실되고,

[0027] b. 아미노산 G42는 결실되거나 또는 세린으로 돌연변이되고,

[0028] c. 아미노산 R36, R74, R77 및 R104는 글루타민으로 돌연변이되고,

[0029] d. 아미노산 R37은 알라닌으로 돌연변이되고, 아미노산의 넘버링은 서열 5에 상응한다.

[0030] 본 개시내용의 또 다른 특정 실시양태는 상기 기재된 인간 IGF-1 전구체 단백질에 관한 것이고, 여기서 E-펩티드는 Ea-펩티드이고,

[0031] a. 아미노산 G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71, S72, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 및/또는 M105는 결실되고,

[0032] b. 아미노산 G42는 결실되거나 또는 세린으로 돌연변이되고,

[0033] c. 아미노산 R36, R74 및 R77은 글루타민으로 돌연변이되고,

[0034] d. 아미노산 R37은 알라닌으로 돌연변이되고, 아미노산의 넘버링은 서열 5에 상응한다.

[0035] 유사하게, 본 개시내용은 상기 기재된 인간 IGF-1 전구체 단백질에 관한 것이고, 여기서 E-펩티드는 Ea-펩티드이고,

[0036] a. 아미노산 G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71 및 S72는 결실되고,

[0037] b. 아미노산 G42는 결실되거나 또는 세린으로 돌연변이되고,

[0038] c. 아미노산 R74, R77 및 R104는 글루타민으로 돌연변이되고,

[0039] d. 아미노산 R37은 글루탐산으로 돌연변이되고, 아미노산의 넘버링은 서열 5에 상응한다.

[0040] 유사하게, 본 개시내용은 상기 기재된 인간 IGF-1 전구체 단백질에 관한 것이고, 여기서 E-펩티드는 Ea-펩티드이고,

[0041] a. 아미노산 G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71, S72, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 및/또는 M105는 결실되고,

[0042] b. 아미노산 G42는 결실되거나 또는 세린으로 돌연변이되고,

[0043] c. 아미노산 R74 및 R77은 글루타민으로 돌연변이되고,

[0044] d. 아미노산 R37은 글루탐산으로 돌연변이되고, 아미노산의 넘버링은 서열 5에 상응한다.

[0045] 추가의 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 상기 기재된 인간 IGF-1 전구체 Fc 융합 단백질에 관한 것이고, 여기서 E-펩티드는 Ea-펩티드이고,

[0046] a. 아미노산 G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71 및 S72는 결실되고,

[0047] b. 아미노산 G42는 결실되거나 또는 세린으로 돌연변이되고,

[0048] c. 아미노산 R36, R74, R77 및 R104는 글루타민으로 돌연변이되고,

[0049] d. 아미노산 R37은 알라닌으로 돌연변이되고, 여기서 아미노산의 넘버링은 서열 5에 상응하고,

[0050] e. IGF-1 전구체 단백질 및 Fc 영역은 힌지 펩티드 힌지 1 (서열 22)에 의해 분리된다.

[0051] 추가로, 본 개시내용은 상기 기재된 인간 IGF-1 전구체 Fc 융합 단백질에 관한 것이고, 여기서 E-펩티드는 Ea-펩티드이고,

[0052] a. 아미노산 G1, P2, E3, K68, S69, A70, R71 및 S72는 결실되고,

[0053] b. 아미노산 G42는 결실되거나 또는 세린으로 돌연변이되고,

[0054] c. 아미노산 R74, R77 및 R104는 글루타민으로 돌연변이되고,

[0055] d. 아미노산 R37은 글루탐산으로 돌연변이되고, 여기서 아미노산의 넘버링은 서열 5에 상응하고,

[0056] e. IGF-1 전구체 단백질 및 Fc 영역은 힌지 펩티드 힌지 3 (서열 24)에 의해 분리된다.

[0057] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 상기 기재된 폴리펩티드에 관한 것이고, 여기서 Fc 영역은 Fc 수용체에 대한 그의 결합을 조절하도록 변형된다.

[0058] 따라서, 본 개시내용은 상기 기재된 인간 IGF-1 전구체 Fc 융합 단백질에 관한 것이고, 여기서 Fc 영역은

[0059] I. Fc 수용체에 대한 그의 친화도를 감소시키거나;

[0060] II. ADCC 활성을 감소시키거나;

[0061] III. ADCC 활성을 방지하도록 변형된다.

[0062] 본 개시내용의 또 다른 특정 실시양태는 서열 8, 또는 서열 9, 또는 서열 10, 또는 서열 11, 또는 서열 12, 또는 서열 13, 또는 서열 14, 또는 서열 27을 포함하는 상기 기재된 인간 IGF-1 전구체 Fc 융합 단백질에 관한 것이다.

[0063] 본 개시내용의 선행 실시양태와 조합될 수 있는 특정 실시양태에서, 인간 IGF-1 전구체 Fc 융합 단백질은 글리코실화된다.

[0064] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 상기 기재된 인간 IGF-1 전구체 Fc 융합 단백질을 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 따라서, 본 개시내용은 서열 15 또는 서열 16 또는 서열 17 또는 서열 18 또는 서열 19 또는 서열 20 또는 서열 21에 제시된 바와 같은 핵산 분자를 포함하는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다.

[0065] 본 개시내용은 또한 요법에 사용하기 위한 상기 개시된 인간 IGF-1 전구체 단백질 중 임의의 하나를 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.

[0066] 본 개시내용의 또 다른 실시양태에서, 상기 언급된 치료 용도는 근육 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서의 근육 장애의 치료이다. 본 개시내용의 특정 실시양태에서, 치료 용도는 제지방 체질량(lean body mass)의 감소 및/또는 근육 소모를 겪는 화상 환자의 치료, 또는 COPD 환자의 치료, 또는 케네디병(Kennedy disease) 환자의 치료, 또는 만성 신장 질환 환자의 치료이다.

[0067] 본 개시내용의 추가의 실시양태에서, 상기 기재된 근육 장애는 근육 위축이다. 따라서, 본 개시내용의 몇몇 측면에서, 치료 용도는 비만-연관 근육감소증, 근육감소증 및 당뇨병-연관 근육 위축이다.

[0068] 본 개시내용은 추가로 치료 유효량의 본 발명의 상기 기재된 인간 IGF-1 전구체 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 근육 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서 근육 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0069] 따라서, 한 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 제지방 체질량의 감소 및/또는 근육 소모를 겪는 화상 환자를 치료하는 방법, 또는 COPD 환자를 치료하는 방법, 또는 케네디병 환자를 치료하는 방법, 또는 만성 신장 질환 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0070] 또한, 본 개시내용은 근육 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서 근육 장애를 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 근육 장애는 비만-연관 근육감소증, 근육감소증 및 당뇨병-연관 근육 위축으로 이루어진 군으로부터 선택된 근육 위축이다.

[0071] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 상기 기재된 IGF-1 폴리펩티드 또는 IGF-1 전구체 폴리펩티드에 관한 것이고, 여기서 위치 42의 아미노산 글리신은 결실된다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 상기 기재된 IGF-1 폴리펩티드 또는 IGF-1 전구체 폴리펩티드에 관한 것이고, 여기서 상기 단백질은 PEG화된다.

도면의 간단한 설명

[0072] 도 1: IGF-1R에 대한 결합 친화도

hIGF-1 및 IGF-1 변이체의 rhIGF1R에 대한 고친화도 결합은 표면 플라스몬 공명 (비아코어(Biacore))을 사용하여 측정하였다.

도 2 (A-D): NIH3T3-IGF-1R 세포 형질감염체에서 IGF-1R의 인산화

인간 IGF-1 수용체를 과다발현하는 NIH3T3 세포 (NIH3T3-IGF-1R)를 24시간 동안 성장 배지에서 배양하고, 18시간 동안 무혈청 배지에서 굶기고, 10 min 동안 37℃에서 등몰 농도의 지시된 펩티드로 자극하였다. IGF-1R 인산화 수준은 ELISA에 의해 분석하였다. 수용체 인산화는 대조군의 % ± 표준편차 (SD)로 표시한다 (NIH 3T3 마우스 배아 섬유모세포 세포는 뉴욕 유니버시티(New York University School of Medicine Department of Pathology)에서 1962년도에 단리되고 개시된 세포주로부터 유래함; [Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. J. Cell Biol. 17: 299-313, 1963]).

도 3 (A-D): NIH3T3-InsR 세포 형질감염체에서 InsR의 인산화

인간 인슐린 수용체를 과다발현하는 NIH3T3 세포 (NIH3T3-InsR)를 24시간 동안 성장 배지에서 배양하고, 18시간 동안 무혈청 배지에서 굶기고, 10 min 동안 37℃에서 등몰 농도의 지시된 펩티드로 자극하였다. InsR 인산화 수준은 ELISA에 의해 분석하였다. 수용체 인산화는 임의 단위 ± 표준편차 (SD)로 표시한다.

도 4 (A-C): 인간 및 시노몰구스 일차 근육모세포에서 IGF-1R의 인산화

세포를 성장 배지에서 배양하고, 4시간 동안 굶기고, 15 min 동안 37℃에서 hIGF-1 또는 hIGF-1 변이체로 자극

하였다. IGF-1R 인산화 수준은 듀오셋(DuoSet) IC 인간 포스포르-IGF-1R을 사용하는 ELISA에 의해 분석하였다. 수용체 인산화는 대조군의 % ± 표준편차 (SD)로 표시한다.

도 5 (A-D): 마우스 근관 및 지방세포에서 글루코스 흡수

3T3-L1 지방세포 (B 및 D) 및 C2C12 마우스 근관 (A 및 C) 세포를 24-웰 플레이트 상에 시딩하고, 무혈청 DMEM에서 4시간 동안 배양하였다. 이어서, 무혈청 DMEM을 3T3-L1 지방세포 및 C2C12에 대해 각각 KRP 완충제 또는 HBS로 대체하였다. 세포를 37℃에서 1시간 동안 명시된 펩티드로 처리하였다. 글루코스 흡수는 실온에서 10분 (지방세포) 또는 5분 (C2C12) 동안 0.4 μCi (지방세포) 또는 0.8 μCi (C2C12)의 [^{3}H] 2-데옥시-D-글루코스 및 0.1 mM (지방세포) 또는 0.01 mM (C2C12) 2-데옥시-D-글루코스를 첨가함으로써 측정하였다. 방사능을 섬광 계수에 의해 분석하였다.

도 6: 글루코스 흡수: 지방세포에서 시간 경로

3T3-L1 지방세포를 24-웰 플레이트 상에 시딩하고, 무혈청 DMEM (둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium))에서 4시간 동안 배양하였다. 이어서, 무혈청 DMEM을 KRP 완충제로 대체하고, 세포를 37℃에서 15, 60, 90 및 120분 동안 명시된 펩티드로 처리하였다. 글루코스 흡수는 실온에서 10분 동안 0.4 μCi의 [^{3}H] 2-데옥시-D-글루코스 및 0.1 mM 2-데옥시-D-글루코스를 첨가함으로써 측정하였다. 방사능을 섬광 계수에 의해 분석하였다. 3T3-L1은 지방 조직에 대한 생물학적 연구에 사용되는 3T3 세포로부터 유래된 세포주이다 (Green H, Kehinde O (1975). "An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion". Cell 5(1): 19-27).

도 7 (A-B):

성체 수컷 래트 (n=3/군)에게 hIGF-1-Ea-Fc_mut 13/2_A 또는 hIGF-1-Ea-Fc_mut 04/2_E를 10 mg/kg으로 정맥내 (i.v.) 볼루스 또는 피하 (s.c.) 주사에 의해 투여하였다. 연속 혈액 표본을 시험 물질의 투여 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 168 및 336시간 후에 수집하였다. 재조합 단백질의 혈청 농도는 ELISA에 의해 결정하였다.

도 8 (A-C): 덱사메타손-유도된 근육 위축에 대한 hIGF-1-Ea-Fc_돌연변이체의 효과.

군 (A) 비히클, (B) Dex, (C) Dex + hIGF-1 (3.8 mg/kg/일) s.c. 미니펌프 주입, (D) Dex + hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A (3 mg/kg/일) s.c. eod, (E) Dex + hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A (10 mg/kg/일) s.c. eod, 및 (F) Dex + hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A (3 mg/kg/일) s.c. eod의 체중 (A), 및 근육 질량 (B 및 C) 변화. 값은 평균 ± SEM (n=4-6)로 표시한다. *: P < 0.05, **: P < 0.01, **: P < 0.001 vs 군 B, $^{###}$ P < 0.001 vs 군 A (ANOVA에 이은 던넷(Dunnett) 다중 비교 검정).

도 9: HEK293 세포에서 상이한 G42 돌연변이를 갖는 IGF-1 변이체의 생산.

FuGene으로 형질감염된 100 ml 규모 HEK293F 배양물으로부터의 생산 데이터. 역가는 맑은 세포 배양 상청액으로부터 분석적 단백질 A HPLC에 의해 측정하였다. 농도는 단백질 A 정제 후에 측정하였다. 정제된 단백질의 수준은 SEC-MALS로 측정하였다.

도 10: 2개의 상이한 CHO 세포주로부터 발현된 hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc (서열 6) (진회색) 및 hIGF1-Ea-hFc_mut13/2_A (서열 9) (연회색)의 클립핑된 물질의 비율. 클립핑된 물질의 비율은 형질감염된 CHOK1 유래 세포 및 CHO-DUX11 유래 세포의 정제된 단백질 (단백질 A 크로마토그래피)로부터 결정되었다. 클립핑의 비율은 역상 LC-MS 분석을 통해 결정하였다. 클립핑된 물질의 비율은 두 세포주 모두에서 hIGF1-Ea-hFc_mut13/2_A에 대해 유의하게 더 낮다.

도 11: 생물반응기 실행에서 재조합 항체를 발현하는 CHO-K1 유래 세포 (굵은 선) 및 hIGF-1Ea 3mut (서열 27)를 발현하는 CHO-K1 유래 세포 (점선)의 세포 성장. B: 생물반응기 실행에서 생존 세포의 비율 (굵은 선 항체 생산 CHO-K1 유래 클론, 점선 hIGF-1Ea 3mut 발현 클론).

도 12: 생존 세포 수: 실선은 CHO-K1 유래 세포의 세포 성장을 보여준다. 야생형 IGF-1 또는 hIGF-1Ea 3mut와의 동시-배양 동안, 세포 성장은 억제된다 (각각 점선 및 파선). 3개의 생물학적 반복시험체의 평균이 제시된다. IGF-1/hIGF-1Ea 3mut를 제2일에 스파이킹하였다 (스파이크-인 실험). B: 세포 생존율: 실선은 CHO-K1 유래 세포의 세포 생존율을 보여주고, 점선 및 파선은 각각 IGF-1/hIGF-1Ea 3mut 스파이크-인 후에 감소된 세포 생존율을 보여준다. 세포 생존율은 세포를 IGF-1/hIGF-1Ea 3mut와 동시-인큐베이션할 경우 2일 더 일찍 감소한

다. 세포 성장 또는 세포 생존율에서 IGF-1과 hIGF-1Ea 3mut 사이에 어떠한 차이도 검출되지 않았다.

도 13: CHO-DUXB11 유래 세포의 세포 성장 (굵은 선) 및 IGF-1Ea 3mut와의 동시-배양 동안 감소된 세포 성장 (점선)이 제시된다. IGF-1R 티로신 키나제 억제제 NVPAEW541 첨가 후 (별표가 있는 굵은 선), 세포 성장은 경미하게 감소한다. IGF-1Ea 3mut와의 동시-배양 및 IGF-1R 티로신 키나제 억제제 첨가는 추가의 세포 성장 억제를 야기하지 않았다 (별표가 있는 점선).

도 14: 굵은 선에서 야생형 (WT) CHO-K1 유래 세포의 세포 성장이, 원이 있는 굵은 선에서 IGF-1과의 동시-배양 동안 감소된 세포 성장이 제시된다. 점선에서, 3개의 IGF-1R KO 클론의 세포 성장이 제시된다. 세포 성장은 야생형 CHO-K1 유래 세포에 비해 경미하게 개선된다. IGF-1과의 동시-배양은 단지 경미한 세포 성장 억제만을 유도하였고, 세포 성장은 IGF-1 동시-배양을 실시하지 않은 야생형 CHO-K1 유래 세포와 유사하다.

도 15: 14일 배치 배양물의 IGF-1-Fc 융합 단백질 역가가 제시된다 (풀 수준). 5개의 상이한 세포주에서 7개의 상이한 IGF-1-Fc 융합 단백질의 발현이 강조된다. IGF-1-Fc 융합 단백질의 발현은 CHO-K1 또는 CHO-DUXB11 유래 야생형 세포주에 비해 CHO-K1 유래 IGF-1R-KO 세포주, CHO-DUXB11 유래 IGF-1R-KO 세포주 및 CHO-DUXB11 유래 shRNA (IGF-1R 및 INSR의 감소된 발현) 세포주에서 5-20배 증가하였다.

도 16: 50 ml 진탕 플라스크 내에서 14일 배치 배양물의 IGF-1-Fc 융합체 역가. IGF-1-Fc 융합 단백질 15개의 최상의 CHO-DUXB11 유래 IGF-1R-KO 클론에서 hIGF-1-Ea-fc_mut 13/2_A의 역가는 CHO-DUXB11 유래 야생형 세포 클론에서 IGF-1-Fc 융합 단백질 hIGF-1-Ea-Δ1-3, R37A, Δ71-72, R77Q-fc 도메인의 역가에 비해 약 6-7배 더 높다.

도 17: HEK293F 세포에서 IGF-1 변이체의 생산 및 단백질 시험접종.

PEI로 형질감염된 100 ml 규모 HEK293T 배양물으로부터의 생산 데이터. 1 L 배양물 부피로 외삽된 단백질 A 정제 후의 수율. 응집은 단백질 A 정제 후에 SEC-MALS에 의해 측정하였다. 정제된 단백질은 CHOK1 유래된 세포 (5일 동안) 및 CHODUXB11 유래된 세포 (20일 동안)로부터의 조건화 CHO 배지와 함께 인큐베이션하였다. 잔류하는 전장 단백질의 비율이 제시된다. 방법은 실시예 2에 기재되어 있다.

도 18: NIH3T3-InsR 세포 형질감염체에서 InsR의 인산화

인간 인슐린 수용체를 과다발현하는 NIH3T3 세포 (NIH3T3-InsR)를 24시간 동안 성장 배지에서 배양하고, 18시간 동안 무혈청 배지에서 굶기고, 10 min 동안 37℃에서 등몰 농도의 지시된 펩티드로 자극하였다. InsR 인산화 수준은 ELISA에 의해 분석하였다. 수용체 인산화는 임의 단위 ± 표준편차 (SD)로 표시한다.

도 19: 마우스 근관 및 지방세포에서 글루코스 흡수

3T3-L1 지방세포 (A) 및 C2C12 마우스 근관 (B) 세포를 24-웰 플레이트 상에 시딩하고, 무혈청 DMEM에서 4시간 동안 배양하였다. 이어서, 무혈청 DMEM을 각각 3T3-L1 지방세포 및 C2C12에 대해 KRP 완충제 또는 HBS로 대체하였다. 세포를 37℃에서 1시간 동안 명시된 펩티드로 처리하였다. 글루코스 흡수는 실온에서 10분 (지방세포) 또는 5분 (C2C12) 동안 0.4 μCi (지방세포) 또는 0.8 μCi (C2C12)의 [^{3}H] 2-데옥시-D-글루코스 및 0.1 mM (지방세포) 또는 0.01 mM (C2C12)의 2-데옥시-D-글루코스를 첨가함으로써 측정하였다. 방사능을 섬광 계수에 의해 분석하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0073] **일반적인 정의**

[0074] 본 발명을 보다 쉽게 이해할 수 있기 위해서, 특정 용어를 먼저 규정한다. 추가의 정의는 상세한 설명 전체에 걸쳐 제시된다.

[0075] 포함하는: 용어 "포함하는"은 "망라하는"을 의미하고, 예를 들어 X를 "포함하는" 조성물은 X로만 이루어질 수 있거나 또는 추가의 것, 예를 들어 X + Y를 포함할 수 있다.

[0076] 기호 "Δ" 또는 문자 "d" 또는 "D": 단백질 설명 (예를 들어 "hIGF-1-Ea-Δ1-3, R37A, Δ71-72, R77Q-fc 도메인" 또는 "hIGF-1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-fc 도메인")의 맥락에서 아미노산 결실을 의미한다. 예로서, 용어 "D71-72, 77" (단백질 hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc의 맥락에서)은 아미노산 71, 72 및 77이 결실되었다는 사실을 설명한다.

[0077] 인슐린 유사 성장 인자 1 단백질 또는 그의 변이체: 문구 "인슐린 유사 성장 인자 1 단백질 또는 그의 변이체"는 인슐린 유사 성장 인자 1 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 의미하고, 특히 바람직하게는 인간 인슐린 유사 성장 인자 1 (hIGF-1) 단백질 및 그의 변이체이다. IGF-1 단백질 변이체는 적어도 하나의 아미노산이 IGF-1 야생형 서열과 상이한 단백질이고, 여기서 용어 "야생형 서열"은 적어도 하나의 천연 생성 유기체에서 이용가능한 폴리펩티드 또는 유전자 서열 또는 변경되거나, 돌연변이되거나, 인간에 의해 달리 조작되지 않은 폴리펩티드 또는 유전자 서열을 의미한다. 용어 IGF-1 변이체 및 IGF-1 모방체는 명세서에서 교환가능하게 사용된다. IGF-1 변이체는 또한 펩티드 리더 서열을 포함하는 IGF-1 전구체 단백질 또는 프로-IGF-1 단백질이다. IGF-1 변이체는 또한 IGF-1 단백질을 포함하는 융합 단백질, 예를 들어 이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합된 IGF-1 단백질을 포함하는 단백질이다. IGF-1 변이체의 예는 특히 국제 특허 출원 공개 WO05033134 (이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합된 안정화된 IGF-1 단백질) 및 WO2007146689 (안정화된 IGF-1 전구체 단백질)에 개시되어 있다. 상기 기재된 바와 같은 IGF-1 변이체는 상기 단백질이 야생형 IGF-1의 기능적 동등물로 간주될 수 있다는 의미에서 그의 생물학적 활성을 보유한다.

[0078] IGF-1 단백질에 대한 기능적 동등물은 천연 또는 인공 돌연변이를 포함하는 IGF-1 단백질로서 이해되어야 한다. 돌연변이는 IGF-1 단백질의 생물학적 활성을 감소시키지 않는 하나 이상의 핵산의 삽입, 결실 또는 치환일 수 있다. 기능적 동등물은 IGF-1 야생형 단백질, 예를 들어 인간 IGF-1 단백질 서열 1에 대해 적어도 80%, 바람직하게는 85%, 보다 바람직하게는 90%, 가장 바람직하게는 95% 초과, 특히 바람직하게는 적어도 98% 동일성 - 그러나 100% 미만의 동일성을 갖는다. 상기 기재된 바와 같은 융합 단백질의 경우에, 100% 동일성은 상기 융합 단백질의 IGF-1 부분을 기초로 하여서만 규정될 것이다.

[0079] 인슐린 유사 성장 인자 (IGF)는 세포가 그의 생리학적 환경과 소통하기 위해 이용하는 복합 시스템의 일부이다. 상기 복합 시스템 (종종 인슐린-유사 성장 인자 축으로 불림)은 2개의 세포-표면 수용체 (IGF-1R 및 IGF-2R), 2개의 리간드 (IGF-1 및 IGF-2), 6개의 고-친화도 IGF-결합 단백질 (IGFBP 1-6)의 패밀리, 및 회합된 IGFBP 분해 효소 (프로테아제)로 이루어진다. 상기 시스템은 정상 생리학의 조절뿐만 아니라 많은 병리학적 상태에도 중요하다 (Glass, Nat Cell Biol 5:87-90, 2003). IGF 축은 세포 증식의 촉진 및 세포 사멸 (아폽토시스)의 억제에서 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다. IGF-1은 주로 인간 성장 호르몬 (hGH)에 의한 자극의 결과로서 간에 의해 분비된다. 인체의 거의 모든 세포, 특히 근육, 연골, 뼈, 간, 신장, 신경, 피부 및 폐 내의 세포는 IGF-1에 의해 영향받는다. 인슐린-유사 효과에 추가로, IGF-1은 또한 세포 성장을 조절할 수 있다. IGF-1 및 IGF-2는 IGF-결합 단백질로서 알려진 유전자 생성물의 패밀리에 의해 조절된다. 상기 단백질은 IGF 수용체에 대한 결합을 억제함으로써 IGF 작용을 억제하고 또한 수용체에 대한 전달을 돕고 혈류 내의 IGF 반감기를 증가시킴으로써 IGF 작용을 촉진하는 것을 수반하는 복잡한 방식으로 IGF 작용을 조절하는 것을 돕는다. 적어도 6개의 특성화된 결합 단백질 (IGFBP1-6)이 존재한다. IGF-1은 광범한 치료 용도에서 사용된다. 메카세르민 (상표명 인크렐렉스(Increlex)™)은 성장 부전의 치료를 위해 승인된 IGF-1의 합성 유사체이다. 몇몇 회사는 1형 당뇨병, 2형 당뇨병, 근위축성 측삭 경화증, 중증 화상 및 근긴장성 근육 이영양증을 비롯한 다양한 추가의 적응증에 대해 임상 시험에서 IGF-1을 평가하였다. 명료성 및 일관성을 위해, 본원 명세서 및 청구의 범위 전체에 걸쳐서 IGF-1 전구체 또는 성숙 단백질 내의 아미노산의 잔기의 넘버링은 신호 펩티드가 없는 인간 인슐린-유사 성장 인자 1 (소마토메딘 C), 이소형 CRA_c (등록 번호 EAW97697) (즉, 서열 5)의 야생형 전구체 단백질 서열 넘버링을 기초로 한다.

[0080] 포유동물 세포: 개시된 방법의 맥락에서 용어 "포유동물 세포"는 산업적 제조 규모의 단백질 생산에 적합한 포유동물 세포를 의미한다. 이들 세포는 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 예를 들어 크리세툴루스 그리세우스(*Cricetulus griseus*), 세르코피테쿠스 아에티옵스(*Cercopithecus aethiops*), 호모 사피엔스(*Homo sapiens*), 메소크리세투스 아우라투스(*Mesocricetus auratus*), 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*) 및 클로로세부스(*Chlorocebus*) 종으로부터 유래한다. 각각의 세포주는 CHO-세포 (차이니즈 햄스터 난소), COS-세포 (원숭이 신장으로부터 유래된 세포주 (아프리카 녹색 원숭이)), Vero-세포 (아프리카 녹색 원숭이로부터 추출된 신장 상피세포), Hela-세포 (세포주는 헨리에타 랙스(Henrietta Lacks)로부터 채취한 자궁경부암 세포로부터 유래됨), BHK-세포 (베이비 햄스터 신장 세포), HEK-세포 (인간 배아 신장), NSO-세포 (뮤린 흑색종 세포주), C127-세포 (비종양원성 마우스 세포주), PerC6®-세포 (인간 세포주, 크루셀(Crucell)), CAP-세포 (CEVEC의 양수세포 생산) 및 Sp-2/0-세포 (마우스 흑색종 세포)로 알려져 있다.

[0081] 본원의 맥락에서 용어 "안정화된 IGF-1 선행 기술의 단백질의 수용체 특이성"은 또한 치료상 유해 사건인 저혈당증을 유도할 위험을 감소시키는, 선행 기술의 IGF-1 변이체에 비해 본 발명의 IGF-1 분자의 인슐린 수용체 인산화를 유도하는 감소된 능력 (감소된 효력 및/또는 효능)을 의미한다.

[0082] 전구체: 다음에서, 용어 "전구체"는 본 발명의 문맥에서 사용할 때, 신호 펩티드가 없지만 각각 Ea, Eb 및 Ec 펩티드를 포함하는 성숙 인간 IGF-1 단백질의 전구체를 의미한다.

[0083] **발명의 상세한 설명**

[0084] 단백질 잔기 G1, P2, E3, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R77이 결실되거나 또는 글루타민으로 치환되고, R37 아미노산이 알라닌으로 치환된, 이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합된 Ea-펩티드를 포함하는 분자 (hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72, 77-fc 도메인 (서열 6) 및 hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72, R77Q-fc 도메인 (서열 7))을 생산하고 시험하였다. 포유동물 세포 시스템에서 hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72del71-72, 77-fc 도메인 (서열 6)의 발현은 응집 및 분해 문제 때문에 (90% 초과의 생산된 단백질이 분해됨; 도 10 참조) 불가능하였다.

[0085] 또한, hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72del71-72, 77-fc 도메인 (서열 6) 단백질은 NIH3T3 InsR 인산화 검정에서 비변형된 성숙 IGF-1에 비해 수용체 특이성의 감소를 보였다 (도 3 참조).

[0086] 따라서, 인간 이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합된 IGF-1 전구체 변이체는 다음과 같은 이유 때문에 불량한 약물 후보이다: (i) 포유동물 생산 시스템에서 낮은 생산 수율, 및 (ii) 치료상 유해 사건인 저혈당증을 야기할 수 있는, 비변형된 인간 야생형 IGF-1에 비해 인슐린 수용체 (InsR)에 대한 증가된 결합 친화도.

[0087] 본 발명은 (1) 포유동물 세포 생산 시스템에서 생산 수율 및 (2) 천연 IGF-1 단백질 또는 안정화된 IGF-1 선행 기술의 단백질의 수용체 특이성이 추가의 특이적인 아미노산 돌연변이에 의해 개선될 수 있다는 놀라운 관찰을 기초로 하고, 여기서 상이한 돌연변이가 상이한 문제를 해결하고, 상기 돌연변이는 생산 수율, 효능 및/또는 수용체 특이성에 관련된 다수의 문제를 처리하기 위해 조합될 수 있다.

[0088] 놀라운 특정 결과는 위치 G42에서 돌연변이 (G42S 치환)된 인간 IGF-1 단백질 (서열 1)이 비변형된 인간 야생형 IGF-1에 비해 C2C12 근관 및 지방세포 (3T3-L1) 시험관내 시스템에서 보다 낮은 글루코스 흡수를 유도한다는 관찰이었고, 이것은 생체내 IGF-1 처리의 저혈당증 위험을 감소시킬 수 있다 (도 18).

[0089] 추가의 놀라운 특정 결과는 위치 G42에서 돌연변이 (결실 또는 특정 치환)된 인간 IGF-1 전구체 선행 기술의 단백질이 비변형된 인간 야생형 IGF-1과 유사한 인슐린 수용체 (InsR) 인산화를 자극하는 능력을 보인다는 관찰이고, 이것은 선행 기술의 IGF-1 변이체의 저혈당증 위험을 감소시킨다 (도 3). 훨씬 더 놀라운 것은 G42S 돌연변이가 포유동물 세포에서 이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합된 인간 IGF-1 전구체 선행 기술의 단백질의 생산 수율에 대해 추가의 긍정적인 영향을 갖고 (도 10/17), 즉, 생산 수율에 부정적인 영향을 주는 응집체의 형성이 G42S 돌연변이의 도입에 의해 크게 감소될 수 있다 (도 9/17)는 관찰이었다. 따라서, 본 발명은 어느 정도는, 인간 IGF-1 단백질 또는 인간 IGF-1 전구체 그의 변이체 내의 아미노산 글리신 42를 조작함으로써, 치료 IGF-1 변이체의 개발에 있어서 2개의 주요 기술적 장애를 극복할 수 있다는 놀라운 발견을 기초로 한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 IgG의 이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합된 선행 기술의 IGF-1 전구체 단백질이 포유동물 세포 프로테아제에 의해 쉽게 분해되기 때문에, 상기 융합 단백질이 포유동물 세포에서 산업적 규모로 생산될 수 없다는 문제에 대한 해결책을 제공한다. 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 IGF-1Ea-펩티드 전구체 변이체 내의 특정 아미노산을 조작함으로써 치료 IGF-1 전구체 변이체의 개발에 있어서 추가의 주요 기술적 장애를 극복할 수 있었다는 놀라운 발견을 기초로 한다.

[0090] 상기 분자의 예는 다음 폴리펩티드를 포함하고 이로 제한되지 않는다:

[0091] 아미노산 G42가 결실된 인간 IGF-1 단백질 (서열 1).

[0092] 아미노산 G42가 아미노산 세린에 의해 치환된 인간 IGF-1 단백질 (서열 1).

[0093] 아미노산 G42가 아미노산 세린에 의해 치환되고, 아미노산(들)

[0094] (a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되거나; 또는

[0095] (b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되거나; 또는

[0096] (c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 치환 또는 결실되거나; 또는

[0097] (d) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되거나; 또는

[0098] (e) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌으로 치환되거나; 또는

[0099] (f) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되거나; 또는

[0100] (g) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 치환된 또는 결실되거나; 또는

[0101] (h) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되거나; 또는

[0102] (i) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고 R37이 알라닌으로 치환된 인간 IGF-1 단백질 (서열 1).

[0103] 아미노산 G42가 아미노산 세린으로 치환되고 아미노산 E3이 결실되고 아미노산 R37이 알라닌으로 치환된 인간 IGF-1 단백질 (서열 1).

[0104] 이뮤노글로불린 Fc 영역, 특히 변형된 Fc 영역, 특히 아래에서 설명되는 바와 같이 Fc 수용체에 대한 그의 결합을 조절하도록 변형된 Fc 영역에 융합된, 아미노산 G42가 아미노산 세린에 의해 치환되고 아미노산 E3이 결실되고 아미노산 R37이 알라닌으로 치환된 인간 IGF-1 단백질 (서열 1).

[0105] 본 발명의 또 다른 폴리펩티드는 서열 117의 인간 IGF-1 단백질이다.

[0106] 본 발명의 또 다른 폴리펩티드는 서열 118의 인간 IGF-1 전구체 단백질이다.

[0107] 상기한 선행 기술의 IGF-1Ea 펩티드 전구체 단백질의 아미노산 R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 및/또는 M105의 돌연변이 또는 결실은 포유동물 세포에 의해 발현될 때 보다 높은 수율의 비-분해된 단백질을 생성하는 것으로 밝혀졌다. 또한, 위치 R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 및/또는 M105의 언급된 돌연변이/결실의 조합은 상승작용 효과를 일으키는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 한 실시양태에서, R74, R77, G96, S97, A98, G99, N100, K101, N102, Y103, Q104 및/또는 M105는 변형된 IGF-1 단백질이 Ea-펩티드 (서열 2)를 포함하면, 본원에 개시된 변형된 IGF-1 전구체 단백질에서 결실 또는 돌연변이된다. 한 실시양태에서, R74, R77 및/또는 R104는 본원에 개시된 IGF-1 전구체 단백질에서 Q로 돌연변이된다. 추가의 실시양태에서, K68, S69, A70, R71 및/또는 R72는 본원에 개시된 변형된 IGF-1 전구체 단백질에서 추가로 결실 또는 돌연변이될 수 있다.

[0108] 따라서, 본 발명은 인간 IGF-1 전구체 단백질을 함유하는, 즉, 인간 IGF-1로부터의 Ea-펩티드를 포함하는 폴리펩티드를 제공하고, 여기서 위치 42의 아미노산 글리신은 결실되거나 또 다른 아미노산으로 치환되고, 아미노산의 넘버링은 서열 5에 상응한다. E-펩티드는 Ea, Eb, 또는 Ec 펩티드 (서열 2-4)일 수 있다. 특정 실시양태에서, 위치 42의 아미노산 글리신은 결실되거나 아미노산 또는 세린으로 치환된다.

[0109] 한 실시양태에서, 상기 기재된 바와 같이 위치 G42에서 돌연변이된 (결실되거나 세린으로 돌연변이된) 상기 기재된 인간 IGF-1Ea-펩티드 전구체 단백질은 아미노산 G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69, A70, R71, S72, R74, R77, G96, S97, A98, G99, N 100, K101, N102, Y103, Q104 및/또는 M105에서 추가의 결실 및/또는 돌연변이를 포함하고, 여기서 아미노산의 넘버링은 서열 5에 상응한다.

[0110] 상기 분자의 예는 다음 폴리펩티드를 포함하고 이로 제한되지 않는다:

[0111] 인간 IGF-1 Ea-펩티드 전구체 단백질을 포함하는 폴리펩티드 - 여기서 아미노산 G42는 아미노산 세린으로 치환되고, 아미노산(들)

[0112] (1) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0113] (2) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0114] (3) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 치환 또는 결실되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0115] (4) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0116] (5) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0117] (6) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0118] (7) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 치환 또는 결실되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0119] (8) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0120] (9) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0121] (10) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0122] (11) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0123] (12) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 Q104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0124] (13) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0125] (14) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0126] (15) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0127] (16) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0128] (17) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77은 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0129] (18) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0130] (19) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0131] (20) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77은 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0132] (21) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민으로 돌연변이된다.

[0133] (22) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0134] (23) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0135] (24) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104는 글루타민으로 돌연변이된다.

[0136] (25) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0137] (26) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0138] (27) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0139] (28) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0140] (29) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0141] (1a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0142] (2a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0143] (3a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 치환 또는 결실되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0144] (4a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0145] (5a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0146] (6a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0147] (7a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 치환 또는 결실되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0148] (8a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0149] (9a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0150] (10a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0151] (11a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0152] (12a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 Q104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0153] (13a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0154] (14a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0155] (15a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0156] (16a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0157] (17a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0158] (18a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0159] (19a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0160] (20a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0161] (21a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민으로 돌연변이된다.

[0162] (22a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0163] (23a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0164] (24a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민으로 돌연변이된다.

[0165] (25a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0166] (26a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77은 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0167] (27a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77은 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0168] (28a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0169] (29a) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0170] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 폴리펩티드 (1)-(29a)를 포함하는 상기 기재된 단백질에 관한 것이고, 여기서 상기 분자는 위치 1-3에서 돌연변이되는 대신에 단지 아미노산 E3만이 결실된다 (예를 들어 분자 (28a)는 또한 인간 IGF-1 Ea-펩티드 전구체 단백질을 포함하는 폴리펩티드를 의미할 수 있고, 여기서 아미노산 G42는 아미노산 세린으로 치환되고, 아미노산 E3은 결실되고, 아미노산 R36 및 R37은 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72는 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104는 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다).

[0171] 추가로, 본 개시내용은 이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합된, 인간 IGF-1 전구체 단백질을 함유하는, 즉, 인간 IGF-1로부터의 Ea-펩티드를 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이고, 여기서 위치 42의 아미노산 글리신은 또 다른 아미노산으로 치환되고, 상기 단백질의 IGF-1 부분의 아미노산의 넘버링은 서열 5에 상응한다. E-펩티드는 Ea, Eb, 또는 Ec 펩티드일 수 있고, 위치 42의 글리신을 치환하는 아미노산은 세린이다.

[0172] 따라서, 한 실시양태에서, 본 개시내용은 (a) 아미노산 G42는 결실되거나 아미노산 세린으로 치환되고; (b) 이뮤노글로불린 Fc 영역, 특히 변형된 Fc 영역, 특히 Fc 수용체에 대한 그의 결합을 조절하도록 변형된 Fc 영역에 연결된 인간 IGF-1 전구체 단백질을 포함하는 폴리펩티드에 관한 것이다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산은 Fc 영역이 Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분에 대해 변경된 친화도를 갖도록 상이한 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 소위 침묵화된 이뮤노글로불린 Fc 영역은 선행 기술에 설명되어 있다: LALA 및 N297A (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20(6):685-691); 및 D265A ([Baudino et al., 2008, J. Immunol. 181: 6664-69]; [Strohl, W., 상기 문헌]). 침묵 Fc IgG1 항체의 예는 소위 IgG1 Fc 아미노산 서열에 L234A 및 L235A 돌연변이를 포함하는 LALA 돌연변이체를 포함한다. 침묵 IgG1 항체의 또 다른 예는 D265A 돌연변이를 포함한다. 또 다른 침묵 IgG1 항체는 무글리코실화된/비-글리코실화된 항체를 유도하는 N297A 돌연변이를 포함한다.

[0173] 상기 언급된 LALA 방법은 US5,624,821 및 US5,648,260 (모두 윈터(Winter) 등)에 추가로 상세하게 설명되어 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 개시된 hIGF-1 전구체 단백질은 L234A 및 L235A 돌연변이 또는 D265A 돌연변이 또는 N297A 돌연변이를 포함하는 Fc 영역에 융합된다. 상기 Fc LALA, D265A 또는 N297A 구축물은 감소된 ADCC 활성을 갖는다.

[0174] 한 실시양태에서, 위치 42의 아미노산 글리신이 아미노산 세린으로 치환된, 이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합된 인간 IGF-1Ea-펩티드 전구체 단백질을 함유하는 폴리펩티드는 아미노산 G1, P2, E3, R36, R37, K68, S69, A70, R71, S72, R74, R77 및/또는 R104에 추가의 결실 및/또는 돌연변이를 포함한다.

[0175] 상기 분자의 예는 다음 폴리펩티드를 포함하고 이로 제한되지 않는다:

[0176] 이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합된 인간 IGF-1 Ea-펩티드 전구체 단백질을 포함하는 폴리펩티드 - 여기서 위치 42의 아미노산 글리신은 아미노산 세린으로 치환되고, 상기 단백질의 IGF-1 부분의 아미노산의 넘버링은 서열 5에 상응하고, 아미노산(들)

[0177] (1b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0178] (2b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0179] (3b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 치환 또는 결실되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0180] (4b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0181] (5b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0182] (6b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0183] (7b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 치환 또는 결실되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0184] (8b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0185] (9b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0186] (10b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0187] (11b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77은 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0188] (12b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 Q104는 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0189] (13b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0190] (14b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77은 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0191] (15b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104는 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0192] (16b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0193] (17b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77은 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0194] (18b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104는 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0195] (19b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0196] (20b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77은 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0197] (21b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104는 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0198] (22b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0199] (23b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0200] (24b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0201] (25b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0202] (26b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0203] (27b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0204] (28b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0205] (29b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0206] (1c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0207] (2c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0208] (3c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 치환 또는 결실되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0209] (4c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0210] (5c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0211] (6c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0212] (7c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 치환 또는 결실되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0213] (8c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0214] (9c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

[0215] (10c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0216] (11c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0217] (12c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 치환 또는 결실되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 Q104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0218] (13c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0219] (14c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0220] (15c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0221] (16c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0222] (17c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0223] (18c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0224] (19c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0225] (20c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0226] (21c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민으로 돌연변이된다.

[0227] (22c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0228] (23c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0229] (24c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0230] (25c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0231] (26c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0232] (27c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0233] (28c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0234] (29c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0235] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 상기 기재된 폴리펩티드 (1b)-(29c)를 포함하는 단백질에 관한 것이고, 여기서 상기 분자는 위치 1-3에서 돌연변이되는 대신에 단지 아미노산 E3만이 결실된다 (예를 들어 분자 (28c)는 또한 이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합된 인간 IGF-1 전구체 단백질을 포함하는 폴리펩티드를 의미할 수 있고, 여기서 아미노산 G42는 아미노산 세린으로 치환되고, 아미노산(들) E3은 결실되고, 아미노산 R36 및 R37은 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72는 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104는 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다).

[0236] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 다음 아미노산으로 이루어진 돌연변이된 E-펩티드를 포함하는 상기 기재된 폴리펩티드 (예를 들어 폴리펩티드 1-29c)에 관한 것이다:

[0237] a) VQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASG (서열 25),

[0238] b) VQAQQHTDMPKTQKYQPPATNKNTKSQRRKGS (서열 26) 또는

[0239] c) VQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM (서열 115).

[0240] 추가의 실시양태에서, 본 개시내용은 Fc 영역에 융합된 상기 기재된 IGF-1 전구체 단백질을 제공하고, 여기서 Fc 영역은 변형된 IGF-1 전구체 폴리펩티드에 직접 융합될 수 있거나 또는 관련 기술분야에 잘 알려진 재조합 DNA 기술을 사용하여 힌지 영역에 의해 연결될 수 있다. DNA 힌지 영역이 사용되는 경우에, Fc 영역은 변형된 IGF-1 전구체 폴리펩티드의 임의의 부분에 연결될 수 있다. 하나의 실시양태에서, Fc 영역은 변형된 IGF-1 전구체 폴리펩티드의 C-말단에 직접 융합된다. 또 다른 실시양태에서, Fc 영역은 Gly Ser (-GS-) 링커에 의해 변형된 IGF-1 전구체 폴리펩티드의 C-말단에 연결된다.

[0241] DNA 링커는 조작 용이성을 위해 성분 사이에 제한 부위를 제공하기 위해 사용될 수 있다. 링커는 또한 숙주 세포로부터 폴리펩티드의 발현을 향상시키기 위해, 상기 성분이 그의 최적 삼차 또는 사차 구조를 취하고/취하거나 그의 표적 분자와 적절하게 상호작용할 수 있도록 입체 장애를 감소시키기 위해 제공될 수 있다. 링커 및 바람직한 스페이서의 확인 방법에 대해서는 예를 들어, 문헌 [George et al. (2003) Protein Engineering 15:871-879]을 참조한다.

[0242] 링커 서열은 수용체 성분에 천연적으로 연결된 하나 이상의 아미노산을 포함할 수 있거나, 또는 융합 단백질의 발현을 향상시키기 위해, 특이적으로 요구되는 관심있는 부위를 제공하여 성분 도메인이 최적 삼차 구조를 형성하는 것을 허용하기 위해 및/또는 성분의 그의 표적 분자와의 상호작용을 향상시키기 위해 사용되는 부가되는 서열일 수 있다. 한 실시양태에서, 링커는 1-100개 아미노산, 바람직하게는 1-25개 아미노산 길이의 하나 이상의 펩티드 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 링커는 1-5개 아미노산 길이이다. 한 실시양태에서, 링커는 3개 아미노산 서열이고; 보다 구체적으로, Gly Pro Gly의 3개 아미노산 서열이다. 또 다른 실시양태에서, 링커는 Gly Ser이다.

[0243] 상기 힌지 분자의 예는 다음 폴리펩티드를 포함하고 이로 제한되지 않는다:

[0244] 힌지 1: CPPCPA (서열 22)

[0245] 힌지 2: DKTHTCPPCPA (서열 23)

[0246] 힌지 3: EPKSCDKTHTCPPCPA (서열 24)

[0247] 따라서, 본원은 이뮤노글로불린 Fc 영역, 특히 변형된 Fc 영역, 특히 Fc 수용체에 대한 그의 결합을 조절하도록, 바람직하게는 아미노산 234 및 235 중 하나 또는 둘 다를 상기 기재된 바와 같이 알라닌으로 치환함으로써 변형된 Fc 영역에 융합된 인간 IGF-1 Ea-펩티드 전구체 단백질을 함유하는 폴리펩티드에 관한 것이고, 여기서 위치 42의 아미노산 글리신은 세린으로 치환되고, 아미노산의 넘버링은 서열 5에 상응하고, 이뮤노글로불린 Fc 영역은 힌지 영역을 통해 IGF-1 전구체 단백질에 융합된다.

[0248] 상기 분자의 예는 다음 폴리펩티드를 포함하고 이로 제한되지 않는다:

[0249] hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E (서열 8)

[0250] hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A (서열 9)

[0251] hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C (서열 10)

[0252] hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F (서열 11)

[0253] hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E (서열 12)

[0254] hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A (서열 13)

[0255] hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F (서열 14)

[0256] 한 특정 실시양태에서, 상기 기재된 IGF-1 전구체 단백질의 아미노산 R71 및 S72는 다음과 같이 돌연변이될 수 있다:

[0257] (1) R71 및 S72 중 하나 또는 둘 다의 결실, 및/또는

[0258] (2) R71 및 S72 중 하나 또는 둘 다의 비-염기성 아미노산, 예컨대 알라닌으로의 돌연변이, 및/또는

[0259] (3) R71과 S72 사이에 하나 이상의 비-염기성 아미노산의 삽입, 및/또는

[0260] (4) 글리코실화 부위를 프로테아제 부위를 차폐하기에 충분하도록 R71 및 S72 근처에 배치, 및/또는

[0261] (5) R71 또는 S72의 비-천연 아미노산으로의 대체, 또는 R71 및 S72 근처 또는 그 사이에 비-천연 아미노산의 삽입을 사용한 부위 지정 PEG화(pegylation).

[0262] 부위 지정 돌연변이유발, 글리코실화 부위의 도입 또는 부위 지정 PEG화와 같은 단백질 변형 방법은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다.

[0263] 한 실시양태에서, Fc 영역은 Fc 수용체에 대한 그의 결합을 조절하도록 변형된다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 Fc 수용체에 대한 그의 친화도를 감소시키도록 변형된다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 ADCC 활성을 감소시키도

록 변형된다. 한 실시양태에서, Fc 영역은 ADCC 활성을 방지하도록 변형된다.

[0264] 한 실시양태에서, 본 발명은 서열 8을 포함하는 폴리펩티드 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E)를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 서열 9를 포함하는 폴리펩티드 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A)를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 서열 10을 포함하는 폴리펩티드 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C)를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 서열 11을 포함하는 폴리펩티드 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F)를 제공한다.

[0265] 한 실시양태에서, 본 발명은 서열 12를 포함하는 폴리펩티드 (hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E)를 제공한다.

[0266] 한 실시양태에서, 본 발명은 서열 13을 포함하는 폴리펩티드 (hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A)를 제공한다.

[0267] 한 실시양태에서, 본 발명은 서열 14를 포함하는 폴리펩티드 (hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F)를 제공한다.

[0268] 한 실시양태에서, 본 발명은 서열 8, 9, 10, 11, 12, 13 또는 14로 이루어진 폴리펩티드를 제공한다.

[0269] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 서열 8에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 폴리펩티드를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 서열 9에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 폴리펩티드를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 서열 10에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 폴리펩티드를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 서열 11에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 폴리펩티드를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 서열 12에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 폴리펩티드를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 서열 13에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 폴리펩티드를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 서열 14에 대해 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일한 폴리펩티드를 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩티드는 글리코실화된다.

[0270] ***아미노산 돌연변이***

[0271] 상기 언급한 바와 같이, 다양한 아미노산이 또 다른 아미노산으로 돌연변이될 수 있다. 일반적으로, 아미노산은 알라닌 잔기로 대체된다. 그러나, 다른 아미노산, 예컨대 비-천연 아미노산 또는 또 다른 군 (즉, 극성, 산성, 염기성 또는 비-극성)으로부터의 천연 아미노산이 사용될 수 있다. 단백질의 아미노산 내로 돌연변이를 도입하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌 [Ausubel (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1994)]; [T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]을 참조한다. 방법은 돌연변이유발 프라이머를 사용하여 수행한 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의한 폴리펩티드 기능적 활성 변이체 또는 그의 단편을 코딩하는 DNA의 증폭 및 필요한 경우 조립 PCR에 의한 단편의 조립 또는 상업상 이용가능한 키트, 예컨대 "퀵체인지(QuikChange)™ 부위 지정 돌연변이유발 키트" (스트라타젠(Stratagene))를 사용한 돌연변이의 도입을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌 [Ausubel (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1994)]; [T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)]을 참조한다. 또한, 돌연변이된 서열은 상업적 회사 (예를 들어 진아트(Geneart), 라이프 테크놀로지(Life Technology))에 의해 제공되는 서비스를 통한 합성 유전자 합성에 의해 얻을 수 있다. 폴리펩티드의 기능에 영향을 주지 않는 아미노산의 대체에 의한 폴리펩티드 기능적 활성 변이체 또는 유도체의 생성은 통상의 기술자에 의해 수행될 수 있다.

[0272] ***이뮤노글로불린 Fc 영역***

[0273] 한 실시양태에서, Fc 영역은 IgG, IgM 또는 IgA로부터 유래하는 것이다. 하나의 실시양태에서, Fc 영역은 IgG로부터 유래한다. IgG의 Fc 도메인은 이소형 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4, 및 각각의 이소형 군 내의 임의의 동종이형으로부터 선택될 수 있다. 하나의 실시양태에서, Fc 영역은 인간 Fc 영역이다.

[0274] Fc 영역은 Fc 영역의 이펙터 기능을 변경하기 위해 적어도 하나의 아미노산 잔기를 상이한 아미노산 잔기로 대체함으로써 변경될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 아미노산은 Fc 영역이 Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분에 대한 변경된 친화도를 갖도록 상이한 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 상기 방법은 US5,624,821 및 US5,648,260 (둘 다 윈터 등)에 추가로 상세하게 설명되어 있다. 특히, 잔기 234 및 235가 돌연변이될 수 있다. 특히, 이들 돌연변이는 알라닌으로의 돌연변이일 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 아미노

산 234 및 235 중 하나 또는 둘 다에서 Fc 영역 내에 돌연변이를 갖는다. 또 다른 실시양태에서, 아미노산 234 및 235 중 하나 또는 둘 다는 알라닌으로 치환될 수 있다. 잔기 234 및 235가 알라닌으로 치환된 상기 Fc 변이체는 통상 "LALA"으로 언급된다. 상기 Fc LALA 구축물은 감소된 ADCC 활성을 갖는다. 한 실시양태에서, IGF-1 전구체 단백질은 IgG1 LALA Fc에 연결된다.

[0275] ***연결***

[0276] 이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합된/연결된 개시된 단백질의 맥락에서 "에 융합된" 또는 "에 연결된"은 본원에서 사용되는 바와 같이 동일한 폴리펩티드에 천연적으로 존재하지 않는 2개의 폴리펩티드의 조합을 의미한다.

[0277] 이뮤노글로불린 Fc 영역은 변형된 IGF-1 폴리펩티드에 직접 융합될 수 있거나 또는 관련 기술분야에 잘 알려진 재조합 DNA 기술을 사용하여 링커에 의해 연결될 수 있다. DNA 링커가 사용되는 경우에, Fc 영역은 변형된 IGF-1 폴리펩티드의 임의의 부분에 연결될 수 있다. 하나의 실시양태에서, Fc 영역은 변형된 IGF-1 폴리펩티드의 C-말단에 직접 융합된다. 또 다른 실시양태에서, Fc 영역은 예컨대 hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E (서열 8), hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A (서열 9), hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C (서열 10), hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F (서열 11), hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E (서열 12), hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A (서열 13) 또는 hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F (서열 14)에서, Gly Ser (-GS-) 링커 및/또는 힌지 영역 (서열 22 내지 24)에 의해 변형된 IGF-1 폴리펩티드의 C-말단에 연결된다.

[0278] DNA 링커는 조작 용이성을 위해 성분 사이에 제한 부위를 제공하기 위해 사용될 수 있다. 링커는 또한 숙주 세포로부터 폴리펩티드의 발현을 향상시키기 위해, 상기 성분이 그의 최적 삼차 또는 사차 구조를 취하고/취하거나 그의 표적 분자와 적절하게 상호작용할 수 있도록 입체 장애를 감소시키기 위해 제공될 수 있다. 링커 및 바람직한 스페이서의 확인 방법에 대해서는 예를 들어, 문헌 [George et al. (2003) Protein Engineering 15:871-879]을 참조한다.

[0279] 링커 서열은 수용체 성분에 천연적으로 연결된 하나 이상의 아미노산을 포함할 수 있거나, 또는 융합 단백질의 발현을 향상시키기 위해, 특이적으로 요구되는 관심있는 부위를 제공하여 성분 도메인이 최적 삼차 구조를 형성하는 것을 허용하기 위해 및/또는 성분의 그의 표적 분자와의 상호작용을 향상시키기 위해 사용되는 부가되는 서열일 수 있다. 한 실시양태에서, 링커는 1-100개 아미노산, 바람직하게는 1-25개 아미노산 길이의 하나 이상의 펩티드 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 링커는 1-5개 아미노산 길이이다. 한 실시양태에서, 링커는 3개 아미노산 서열이고; 보다 구체적으로, Gly Pro Gly의 3개 아미노산 서열이다. 또 다른 실시양태에서, 링커는 Gly Ser이다.

[0280] ***핵산***

[0281] 본 발명은 또한 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 바람직한 핵산 서열은 hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E, hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A, hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C, hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F, hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E, hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A 또는 hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F (서열 15-21)를 코딩하는 것이다. 본 발명의 핵산 분자는 RNA의 형태, 예컨대 mRNA, 또는 예를 들어 cDNA 또는 합성 DNA를 포함하는 DNA의 형태일 수 있다. 핵산 분자는 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있다. 단일 가닥 DNA는 센스 가닥으로도 알려진 코딩 가닥일 수 있거나, 또는 안티센스 가닥으로도 언급되는 비-코딩 가닥일 수 있다.

[0282] 유전자 코드의 축중성은 잘 알려져 있다. 따라서, 2개 이상의 상이한 핵산 서열이 동일한 폴리펩티드 서열을 코딩할 수 있다. 상기 변이체 핵산 서열은 본원의 범위 내에 포함된다. 실제로, 본 발명의 폴리펩티드의 발현을 개선하기 위해 핵산 서열에 보존적 변형을 도입하는 것이 바람직할 수 있다.

[0283] 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터를 추가로 제공한다. 벡터는 클로닝 또는 발현 벡터일 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산은 관련 기술분야에서 통상의 기술자에게 잘 알려져 있는 효율적인 발현을 위해 필요한 요소를 보유하는 발현 벡터 내에 포함될 수 있다. 그 요소는 예를 들어 프로모터, 예컨대 예를 들어 시토메갈로바이러스 (CMV) 인핸서-프로모터, 분비를 위한 신호 서열, 예컨대 분비를 용이하게 하는 것으로 알려진 천연 또는 임의의 다른 서열, 예를 들어 소 성장 호르몬 (BGH) 유전자로부터 유래된 폴리아데닐화 신호 및 전사 종결자, 에피솜 복제 및 원핵세포에서의 복제를 허용하는 요소 (예를 들어 SV40 기점 및 ColE1 또는 관련 기술분야에 알려진 다른 요소) 및 선택을 허용하는 요소, 예컨대 암피실린 내성 유전자 및 제오신 또는 히그로마이신 마커를 포함한다.

[0284] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된

핵산 분자를 제공한다:

[0285] a) 서열 15에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그의 상보체;

[0286] b) 서열 15에 제시된 서열 전체에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열;

[0287] c) 서열 16에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그의 상보체;

[0288] d) 서열 16에 제시된 서열 전체에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열;

[0289] e) 서열 17에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그의 상보체;

[0290] f) 서열 17에 제시된 서열 전체에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열;

[0291] g) 서열 18에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그의 상보체;

[0292] h) 서열 18에 제시된 서열 전체에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열;

[0293] i) 서열 19에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그의 상보체;

[0294] j) 서열 19에 제시된 서열 전체에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열;

[0295] k) 서열 20에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그의 상보체;

[0296] l) 서열 20에 제시된 서열 전체에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열;

[0297] m) 서열 21에 제시된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 그의 상보체;

[0298] n) 서열 21에 제시된 서열 전체에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열.

[0299] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 상기 인간 IGF-1 전구체 단백질이 PEG화된 상기 기재된 IGF-1 변이체 폴리펩티드에 관한 것이다. PEG화는 인간 IgG의 이뮤노글로불린 Fc 영역에 융합되지 않은 IGF-1 전구체 단백질에 대해 특히 바람직하다. 폴리(에틸렌 글리콜) (PEG; PEG화)에 대한 접합은 치료 단백질 약물의 반감기를 연장시키는데 유익한 것으로 증명되었다. 본 발명의 IGF 전구체 폴리펩티드의 PEG화는 제약상 유사한 이점을 제공할 수 있을 것으로 예상된다. IGF-1의 PEG화의 방법은 관련 기술분야에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 리신-모노PEG화된 IGF-1의 유익한 특성을 설명하고 있는 US 특허 출원 공개 2006/0154865를 참조한다. 상기 리신-모노PEG화는 본 발명의 전구체 IGF 폴리펩티드에 대해 변경될 수 있다. 또한, PEG화는 비천연 아미노산의 도입에 의해 본 발명의 폴리펩티드의 임의의 부분에서 달성될 수 있다. 특정 비천연 아미노산는 문헌 [Deiters et al., J Am Chem Soc 125:11782-11783, 2003]; [Wang and Schultz, Science 301:964-967, 2003]; [Wang et al., Science 292:498-500, 2001]; [Zhang et al., Science 303:371-373, 2004] 또는 US 특허 7,083,970에 설명된 기술에 의해 도입될 수 있다. 간단히 설명하면, 몇몇의 이들 발현 시스템은 넌센스 코돈, 예컨대 앰버 TAG를 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임 내로 도입하기 위한 부위-지정 돌연변이유발을 수반한다. 이어서, 상기 발현 벡터는 도입된 넌센스 코돈에 특이적인 tRNA를 이용할 수 있는 숙주 내로 도입되고, 선택된 비천연 아미노산으로 채워진다. 모이어티를 본 발명의 폴리펩티드에 접합하기 위해 유익한 특정 비천연 아미노산은 아세틸렌 및 아지도 측쇄를 갖는 것을 포함한다. 상기 신규한 아미노산을 함유하는 IGF 전구체 폴리펩티드는 이어서 단백질 내의 상기 선택된 부위에서 PEG화될 수 있다. 또한, E-펩티드가 없는 상기 PEG화된 IGF 분자도 치료제로서 유용하다.

[0300] ***포유동물 세포에서 본 발명의 IGF-1 변이체의 생산***

[0301] 원핵 발현 시스템에서 천연 인간 IGF-1의 생산은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다. 진핵 세포, 특히 포유동물 숙주 세포에서의 발현이 때때로 바람직하고, 그 이유는 상기 진핵 세포가 원핵 세포보다 적절하게 폴딩되고 면역학적 활성을 갖는 단백질을 조립하고 분리할 가능성이 더 높기 때문이다.

[0302] 본 발명의 재조합 항체를 발현하기 위한 포유동물 숙주 세포는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO 세포) (예를 들어 문헌 [R.J. Kaufman and P.A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621]에 기재된 DHFR 선택가능 마커와 함께 사용되는 문헌 [Urlaub and Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220]에 기재된 dhfr- CHO 세포 포함), HEK293 세포 (인간 배아 신장 293 세포), NSO 뮤린 흑색종 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다. 바람직한 숙주 세포는 CHO K1 유래 세포이다. 그러나, CHO 세포주에서 재조합 IGF-1의 발현은 세포 성장 억제 및 낮은 역가를 유발한다 (도 11/12 참조). "아연 핑거 뉴클레아제" 기술을 사용한 CHO 세포에서 IGF-1-R의 안정한 녹다운/녹아웃은 개선된 세포 성장 및 보다 높은 IGF-1 단백질 역가를 유도하였다 (도 14, 15, 16). IGF-1을 코딩하는 플라스미드로 안정하게 형질감염된 IGF-1-R (si/shRNA 녹다운)의 감소된 발현을 보이는 CHO 세포는 안정한 형질감염된 야생형 CHO 세포에 비해 약 5배 더 높은 풀 역가를 생성하였다. 훨씬 더 높은 풀 역가는 IGF-1-R 녹아웃 세포주의 안정한 형질감염 후에 검출될 수 있었다. 야생형 CHO 세포주에 비해 재조합 IGF-1의 5-20배 역가 증가가 검출될 수 있었다. 요약하면, 이들 데이터는 포유동물 세포주에서 IGF-1 수용체 유전자의 녹다운 또는 녹아웃이 IGF-1 및 그의 변이체의 생산을 유의하게 개선할 수 있음을 보여준다.

[0303] 따라서, 기능적 인슐린 유사 성장 인자 1 수용체 (IGF-1R)의 발현이 결핍된 포유동물 세포, 예를 들어 CHO 세포에서 재조합 IGF-1 또는 그의 변이체의 생산에 적합한 방법은

[0304] a. 인슐린 유사 성장 인자 1 수용체의 발현이 결핍된 포유동물 세포를 생산하고;

[0305] b. IGF-1 또는 그의 변이체를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터로 단계 a의 세포를 형질전환시키고;

[0306] c. 형질전환된 단계 b의 세포를 선택하고;

[0307] d. 단계 c에서 선택된 세포를 IGF-1 또는 그의 변이체의 발현을 허용하는 조건 하에 배양하고;

[0308] e. IGF-1 또는 그의 변이체를 단계 d에서 배양된 포유동물 세포로부터 수거하는

[0309] 단계를 포함하고, 여기서 별법으로 단계 a 및 b의 순서는 뒤바뀔 수 있거나 두 단계 모두 동시에 수행될 수 있다.

[0310] 통상의 기술자는 유전적으로 변형된 포유동물 세포, 예를 들어 CHO 세포, 예를 들어 CHO-K1 유래 세포, CHO-DUXB11 유래 세포 또는 CHO-DG44 세포의 형질전환, 선택 및 배양 방법을 알고 있다. 선택 프로토콜이 요구되는 치료 단백질, 예를 들어 성장 인자, 예를 들어 IGF-1을 코딩하는 재조합 DNA를 통합한 가능성이 있는 세포의 선택을 용이하게 하기 위해 통상적으로 사용된다. 형질전환 벡터 상에 동시 통합된 유전자에 의해 부여되는 항생제 내성 또는 영양 선택 배지에서 성장하는 능력이 통상적으로 사용된다 ([Weber, W. and Fussenegger, M. (2003) Inducible gene expression in mammalian cells, in Gene transfer and expression in mammalian cells, (Makrides, S.C., Ed.), Elsevier: Amsterdam, pp. 589-604] 참조) (Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector: Niwa Hitoshi, Yamamura Ken-ichi, Miyazaki Jun-ichi). 재조합 단백질 생산을 위한 2개의 가장 통상적인 CHO 발현 시스템은 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR)-기반 메토트렉세이트 (MTX) 선택 또는 글루타민 신테타제 (GS)-기반 메티오닌 술폭시민 (MSX) 선택을 이용한다 (Rita Costa A, Elisa Rodrigues M, Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. Eur J Pharm Biopharm. 2010 Feb; 74(2): 127-38. Epub 2009 Oct 22. Guidelines to cell engineering for monoclonal antibody production).

[0311] 포유동물 세포, 특히 설치류 세포, 예컨대 CHO 및 DHFR 유전자 결함 CHO 세포에서 폴리펩티드를 생산하기에 특히 적합한 벡터는 국제 특허 출원 공개 WO09080720A에 개시되어 있다. 발현 벡터를 포유동물 숙주 세포 내로 도입하기 위한 몇몇의 적절한 방법이 선행 기술에 공지되어 있다. 각각의 방법은 인산칼슘 형질감염, 전기천공, 리포펙션, 유전자총- 및 중합체-매개 유전자 전달을 포함하고, 이로 제한되지 않는다. 적합한 숙주 세포는 상기 설명되어 있다. 발현 벡터 핵산을 숙주 세포(들) 내로 도입한 후, 얻어진 형질전환체를 발현 카세트 (MSM)에 봉입된 포유동물 선택가능 마커 유전자의 발현을 검정하기에 적합한 선택 조건 하에 배양한다. 이것은 예를 들어 포유동물 선택가능 마커 유전자가 항생제 내성 유전자일 때, 형질전환체를 포유동물 세포에서 활성인 상응하는 항생체를 함유하는 배지에서 배양하고, 상기 조건 하에서 생존하여 마커 유전자를 발현하고 따라서 벡터를 통합한 형질전환체의 획득을 가능하게 하는 형질전환체를 선택함을 의미한다. 추가로, 제2 선택 단계는 발현 카세트 (MASM)에 포함된 증폭가능, 선택가능 마커 유전자를 선택하기 위해 변형된 선택 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 수행될 수 있다. 예를 들어, DHFR이 증폭가능, 선택가능 마커 유전자로서 사용되는 경우에, 형질전환체는 DHFR 억제제의 존재 하에 뉴클레오티드 또는 퓨린-미함유 배지에서 배양될 수 있다. 유도가능 프로모터가 적어도 하나의 발현 카세트에 사용되는 경우, 상응하는 유도 신호가 폴리펩티드의 발현을 시

작하기 위해 제공되어야 한다. DHFR 선택/증폭 시스템을 이용하기 위해, 상기 숙주 세포는 DHFR 억제제의 존재 하에 배양될 수 있다. 적합한 DHFR 억제제는 항폴레이트제, 예컨대 예를 들어 MTX이다. 사용된 항폴레이트제/MTX의 농도는 숙주 세포 및 벡터에 통합된 DHFR 변이체에 따라 결정된다. 농도 범위는 DHFR" 숙주 세포에서 다단계 증폭 절차를 위해, 예를 들어 약 5 nM - 20 nM의 값, 이차 또는 추가의 증폭 단계에 대해 500 nM 내지 1000 nM 또는 훨씬 더 높은 값에서 선택될 수 있다. DHFR+ 세포에 대해, 출발 농도는 대체로 100 nM 내지 750 nM, 바람직하게는 제1 단계의 500 nM 및 추가의 증폭 단계의 500 nM 내지 1000 nM 및 그 초과 범위로 더 높다. 적합한 DHFR 변이체는 상기 설명되어 있다.

[0312] GS 선택/증폭 시스템을 이용하기 위해, 상기 숙주 세포는 예를 들어 MSX의 존재 하에 배양될 수 있다. 사용된 MSX의 농도는 숙주 세포에 따라 결정된다. 농도 범위는 약 15 내지 150 마이크로몰, 20 내지 100 마이크로몰 및 25 내지 50 마이크로몰에서 선택될 수 있다. 상기 범위는 NSO 및 CHO 세포에 특히 적합하다.

[0313] ***제약 조성물***

[0314] 또 다른 측면에서, 본 발명은 조성물, 예를 들어 제약상 허용되는 담체와 함께 제제화된, 상기 기재된 IGF-1 변이체의 하나 또는 조합물을 함유하는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명의 제약 조성물은 또한 조합 요법으로 투여되고, 즉, 다른 작용제와 조합될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 IGF-1 변이체는 적어도 하나의 근육 질량/세기 증가제, 예를 들어 항-ActRIIB 항체, IGF-2 또는 변이체 IGF-2, 항-미오스타틴 항체, 미오스타틴 프로펩티드, ActRIIB에 결합하지만 이를 활성화하지 않는 미오스타틴 디코이 단백질, 베타 2 효능제, 그렐린(Ghrelin) 효능제, SARM, GH 효능제/모방체 또는 폴리스타틴과 조합될 수 있다. 조합 요법으로 사용할 수 있는 치료제의 예는 아래의 본 발명의 IGF-1 변이체의 용도에 대한 섹션에서 보다 상세히 설명되어 있다.

[0315] 용어 "제약상 허용되는"은 미국 연방 정부 또는 주 정부 당국에 의해 승인되거나 미국 약전 또는 동물, 보다 특히 인간에서 사용하기 위한 다른 일반적으로 인정되는 약전에 나열된 것임을 의미한다. 용어 "담체"는 치료제가 그와 함께 투여되는 희석제, 아주반트, 부형제, 또는 비히클에 관련된다. 상기 제약 담체는 멸균 액체, 예컨대 물 및 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것을 비롯한 오일, 예컨대 땅콩 오일, 대두 오일, 미네랄 오일, 참깨 오일 등일 수 있다. 적합한 제약 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 벼, 밀가루, 백악, 실리카겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 조성물은 요구되는 경우, 소량의 습윤 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 또한 함유할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 에멀젼, 정제, 환제, 캡슐, 분말, 지속 방출 제제 등의 형태를 취할 수 있다. 조성물은 전통적인 결합제 및 담체, 예컨대 트리글리세라이드와 함께 좌제로 제제화될 수 있다. 경구 제제는 표준 담체, 예컨대 제약 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산마그네슘, 사카린나트륨, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등을 포함할 수 있다. 적합한 제약 담체의 예는 문헌 [E. W. Martin, "Remington's Pharmaceutical Sciences"]에 기재되어 있다.

[0316] 바람직한 실시양태에서, 조성물은 인간에 대한 정맥내 투여를 위해 제약 조성물로서 통상적인 절차에 따라 제제화된다. 필요한 경우, 조성물은 또한 가용화제 및 주사 부위의 통증을 완화하기 위한 국소 마취제, 예컨대 리도카인을 포함할 수 있다. 조성물이 주입에 의해 투여될 경우, 이것은 멸균 제약 등급 물 또는 염수를 함유하는 주입 병을 사용하여 분배될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 성분을 투여 전에 혼합할 수 있도록 주사용 멸균수 또는 염수의 앰플이 제공될 수 있다.

[0317] 제약상 허용되는 담체는 생리학상 적합성인 임의의 및 모든 용매, 분산매, 코팅, 항균 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 표피 투여 (예를 들어 주사 또는 주입에 의한)에 적합하여야 한다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물, 즉, 항체, 면역접합체, 또는 이중특이적 분자는 산의 작용 및 화합물을 불활성화할 수 있는 다른 천연 조건으로부터 화합물을 보호하는 물질로 코팅할 수 있다.

[0318] 본 발명의 제약 조성물은 또한 제약상 허용되는 항산화제를 포함할 수 있다. 제약상 허용되는 항산화제의 예는 다음을 포함한다: 수용성 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 염산염, 중황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등; 지용성 항산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 금속 킬레이트화제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등. 본 발명의 제약 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올 (예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 그의 적합한 혼합물, 식물 오일, 예컨대 올리브 오일, 및 주사가능 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트를 포함한다. 적절한 유동성은 예를 들어 코팅 물질, 예컨대 레시틴의 사용에 의

해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.

[0319] 상기 조성물은 또한 아주반트, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제를 함유할 수 있다. 미생물의 존재 방지는 상기 멸균 절차에 의해 및 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등을 포함시켜 달성할 수 있다. 또한, 당, 염화나트륨 등과 같은 등장화제를 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 주사가능한 제약 형태의 지속적인 흡수는 모노스테아르산알루미늄 및 젤라틴과 같이 흡수를 지연시키는 작용제를 포함시켜 달성할 수 있다.

[0320] 제약상 허용되는 담체는 멸균 주사가능 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 제약 활성 물질에 대한 상기 매질 및 작용제는 관련 기술분야에 알려져 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 활성 화합물과 비상용성인 경우를 제외하고, 본 발명의 제약 조성물에서 그의 사용이 고려된다. 보충 활성 화합물이 또한 조성물 내에 혼입될 수 있다.

[0321] 치료 조성물은 일반적으로 멸균되고, 제조 및 보관 조건 하에 안정하여야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀젼, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 규칙적인 구조로 제제화될 수 있다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 그의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산매일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어 코팅, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에, 조성물 내에 등장제, 예를 들어 당, 다가알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 포함할 수 있다. 주사가능 조성물의 연장된 흡수는 흡수 지연제, 예를 들어 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 달성될 수 있다. 멸균 주사가능 용액은 필요한 경우 상기 나열된 물질의 하나 또는 이들의 조합물과 함께 적절한 용매 내에 필요한 양의 활성 화합물을 혼입한 후, 멸균 미세 여과에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본적인 분산매 및 상기 나열된 것으로부터 필요한 다른 물질을 함유하는 멸균 비히클 내로 혼입함으로써 제조된다. 멸균 주사가능 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 제조 방법은 그의 사전에 멸균-여과된 용액으로부터의 활성제 + 임의의 추가의 요구되는 물질의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결건조이다.

[0322] 단위 투여 형태를 생산하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성제의 양은 치료되는 대상체, 및 특정 투여 방식에 따라 상이할 것이다. 단위 투여 형태를 생산하기 위해 담체 물질과 조합될 수 있는 활성제의 양은 일반적으로 치료 효과를 생성하는 조성물의 양일 것이다. 일반적으로, 100% 중에서, 상기 양은 제약상 허용되는 담체와 조합된 약 0.01% 내지 약 99%의 활성제, 약 0.1% 내지 약 70%, 또는 약 1% 내지 약 30%의 활성제일 것이다.

[0323] 투여 요법은 요구되는 최적 반응 (예를 들어 치료 반응)을 제공하도록 조절된다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 수 회의 분할 용량이 시간에 걸쳐 투여될 수 있거나, 용량은 치료 상황의 필요에 따라 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다. 비경구 조성물을 투여 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 단위 투여 형태로 제제화하는 것이 특히 유리하다. 단위 투여 형태는 본원에서 사용되는 바와 같이, 치료되는 대상체에 대해 단일 용량으로서 적합한 물리적으로 분리된 단위를 의미하고, 각각의 단위는 요구되는 제약상 담체와 함께 요구되는 치료 효과를 생성하기 위해 계산된 소정량의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 단위 투여 형태의 상세 사항은 활성 화합물의 독특한 특징 및 달성되는 특정 치료 효과, 및 개체의 감수성의 치료를 위한 상기 활성 화합물의 배합 기술에 고유한 제한에 의해 좌우되고 직접 의존한다.

[0324] 본 개시내용의 IGF-1 변이체 또는 상기 IGF-1 변이체를 포함하는 조성물의 투여 맥락에서 폴리펩티드의 치료 유효량은 약 0.001 내지 100 mg/kg, 또는 0.01 내지 30 mg/kg, 및 보다 대체로 0.1 내지 10 mg/kg (숙주 체중)이다. 예를 들어, 투여량은 약 0.1 mg/kg (체중), 약 0.2 mg/kg (체중), 약 0.3 mg/kg (체중), 약 1 mg/kg (체중), 약 3 mg/kg (체중), 약 5 mg/kg (체중) 또는 약 10 mg/kg (체중)일 수 있다. 통상의 기술자는 적합한 효과적인 용량을 확인하는 것을 방법을 알고 있고, 이것은 투여 경로 (예를 들어 정맥내 또는 피하)에 따라 상이할 것이다. 예시적인 치료 요법은 1일 1회, 매주 1회, 2주 1회, 3주 1회, 4주 1회 또는 매월 1회 투여를 수반한다. 그러한 투여는 정맥내 또는 피하로 수행될 수 있다. 본 발명의 IGF-1 변이체의 투여 요법은 정맥내 투여에 의한 0.1 mg/kg (체중) 또는 0.2 mg/kg (체중) 또는 0.3 mg/kg (체중) 또는 0.5 mg/kg (체중) 또는 1 mg/kg (체중) 또는 3 mg/kg (체중) 또는 10 mg/kg (체중)을 포함한다. 별법으로, 조성물은 지속 방출 제제일 수 있고, 이 경우에 덜 빈번한 투여가 요구된다. 투여량 및 빈도는 환자에서 항체의 반감기에 따라 상이하다. 투여량 및 투여 빈도는 치료가 예방적인지 치료적인지에 따라 상이할 수 있다. 예방 용도에서, 비교적 적은 투여량이 긴 시간에 걸쳐 비교적 드문 간격으로 투여된다. 몇몇 환자는 그 생애의 나머지 동안 계속 치료받는다. 치료 용도에서, 비교적 짧은 간격의 비교적 많은 투여량이 때때로 질환의 진행이 저하되거나 종료될 때까지 또

는 환자가 질환의 증상의 부분적 또는 완전한 개선을 보일 때까지 필요하다. 이후에, 환자는 예방 요법으로 투여될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물 내의 활성제의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성을 보이지 않으면서 특정 환자, 조성물, 및 투여 방식에서 요구되는 치료 반응을 달성하기에 효과적인 활성제의 양을 얻기 위해 변할 수 있다. 선택된 투여량 수준은 사용되는 본 발명의 특정 조성물, 또는 그의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용되는 특정 화합물의 배출 속도, 치료 지속 시간, 사용되는 특정 조성물과 조합 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료받는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 전반적인 건강 및 이전 의료 병력을 포함하는 다양한 약동학적 인자, 및 의료 분야에 잘 알려진 유사한 인자에 따라 결정될 것이다.

[0325] 본 발명의 조성물에 포함되는 치료 유효 용량의 IGF-1 변이체의 투여는 질환 증상의 중증도 감소, 질환 무증상 기간의 빈도 및 지속 시간 증가, 또는 질환의 고통에 의한 손상 또는 장애의 억제, 즉, 화상 환자에서 근육 질량 및/또는 기능의 증가 또는 상처 영역의 감소/저하를 유도할 수 있다.

[0326] 환자에게 폴리펩티드 활성 성분의 유효량, 즉 문제되는 질환 또는 장애의 검출, 치료, 개선 또는 예방에 충분한 양을 투여할 것이다. 치료 효과는 또한 신체 증상의 감소를 포함할 수 있다. 임의의 특정 대상체에 대한 치료 단백질의 최적 유효량 및 농도는 환자의 연령, 크기, 건강 및/또는 성별, 병태의 특성 및 정도, 특정 치료 단백질의 활성, 신체에 의한 그의 클리어런스 속도, 및 또한 치료 단백질과 조합 투여되는 임의의 가능한 추가의 치료제(들)을 비롯한 다양한 인자에 따라 결정될 것이다. 제시된 상황에 대해 전달되는 유효량은 통상적인 실험에 의해 결정될 수 있고, 임상의의 판단에 따라 결정된다. 투여는 단일 투여 일정 또는 다중 투여 일정에 의해 시행될 수 있다.

[0327] 본 발명의 조성물은 관련 기술분야에 공지된 하나 이상의 다양한 방법을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 통상의 기술자에게 이해되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 목적하는 결과에 따라 상이할 것이다. 본 발명의 치료 단백질에 대한 투여 경로는 예를 들어 주사 또는 주입에 의한 정맥내, 근육내, 피부내, 복강내, 피하, 척수 또는 다른 비경구 투여 경로를 포함한다. "비경구 투여"는 본원에서 사용되는 바와 같이 장내 및 국소 투여 이외의 다른, 대체로 주사에 의한 투여 방식을 의미하고, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 낭내, 안와내, 심장내, 피부내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 낭하, 거미막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 하나의 실시양태에서, 항체 포함 조성물은 정맥내로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 피하 투여된다.

[0328] 별법으로, 본 발명의 IGF-1 변이체 포함 조성물은 비-비경구 경로를 통해, 예컨대 국소, 표피 또는 점막 투여 경로, 예를 들어 비내, 경구, 질, 직장, 설하 또는 국소 투여될 수 있다.

[0329] 활성 화합물은 임플란트, 경피용 패치 및 미세캡슐화 전달 시스템을 포함하여, 조절 방출 제제와 같이 급속한 방출에 대해 화합물을 보호하는 담체와 함께 제조될 수 있다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예를 들어 에틸렌 비닐 아세테이트, 다중무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산을 사용할 수 있다. 상기 제제를 제조하는 많은 방법이 특허를 받거나 일반적으로 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 알려져 있다. 예를 들어, 문헌 [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조한다.

[0330] 치료 조성물은 또한 관련 기술분야에 공지된 의약 장치를 사용하여 투여할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 본 발명의 치료 조성물은, 예를 들어 미국 특허 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 또는 4,596,556에 개시된 장치와 같은 무침 피하 주사 장치를 사용하여 투여할 수 있다. 본 발명에 유용한 공지의 임플란트 및 모듈의 예로는 다음 특허들에 개시된 것들이 포함된다: 조절된 속도로 약물을 분배하기 위한 이식가능한 미세주입 펌프를 개시하고 있는 미국 특허 4,487,603; 피부를 통해 약제를 투여하기 위한 치료 장치를 보여주는 미국 특허 4,486,194; 정확한 주입 속도로 약물을 전달하기 위한 약물 주입 펌프를 보여주는 미국 특허 4,447,233; 연속적인 약물 전달을 위한 가변성 유동 이식가능 주입 장치를 보여주는 미국 특허 4,447,224; 다중-챔버 구획을 갖는 삼투성 약물 전달 시스템을 보여주는 미국 특허 4,439,196; 및 삼투성 약물 전달 시스템을 보여주는 미국 특허 4,475,196. 많은 다른 상기 임플란트, 전달 시스템 및 모듈이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 알려져 있고, 마이크로칩스(MicroCHIPS)™ (미국 매사추세츠주 베드포드)에 의해 제조된 것을 포함한다.

[0331] 특정 실시양태에서, 본 발명의 인간 IGF-1 변이체 포함 조성물은 적절한 생체내 분포를 보장하기 위해 제제화될 수 있다. 예를 들어, 혈액-뇌 장벽(BBB)은 매우 친수성인 많은 화합물을 차단한다. 본 발명의 치료 화합물이 BBB (요구되는 경우)를 횡단하도록 하기 위해, 상기 화합물들은 예를 들어 리포솜 중에 제제화될 수 있다. 리포솜을 제조하는 방법에 대해서는, 예를 들어 미국 특허 4,522,811; 5,374,548; 및 5,399,331를 참조한다. 리

포솜은 특정 세포 또는 장기로 선택적으로 수송되는 하나 이상의 모이어티를 포함하여, 표적화된 약물 전달을 향상시킬 수 있다 (예를 들어, 문헌 [V.V. Ranade, 1989 J. Clin, Pharmacol., 29:685] 참조). 예시적인 표적화 잔기는 폴레이트 또는 비오틴 (예를 들어, 미국 특허 5,416,016 참조); 만노사이드 (Umezawa et al., 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun., 153:1038); 항체 ([P.G. Bloeman et al., 1995 FEBS Lett. 357: 140]; [M. Owais et al., 1995 Antimicrob. Agents Chemother. 39:180]); 계면활성제 단백질 A 수용체 (Briscoe et al., 1995 Am. J. Physiol.1233:134); p120 (Schreier et al., 1994 J. Biol. Chem. 269:9090); (또한, 문헌 [K. Keinanen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBSLett. 346: 123]; [J.J. Killion; I.J. Fidler, 1994 Imrnunomethods 4:273] 참조)를 포함한다.

[0332] ***표적 질환 및 장애***

[0333] 본 발명은 요법에 사용하기 위한 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 또는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 추가로 병리학적 장애의 치료에 사용하기 위한 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 또는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 병리학적 장애의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 또는 제약 조성물의 용도를 제공한다. 본 발명은 병리학적 장애를 앓고 있는 환자에게 치료 유효량의 본 발명의 폴리펩티드, 핵산 또는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 상기 환자의 치료 방법을 추가로 제공한다.

[0334] 병리학적 장애는 근골격 질환 또는 장애, 예컨대 근육 위축일 수 있다. 글루코코르티코이드, 예컨대 코르티솔, 덱사메타손, 베타메타손, 프레드니손, 메틸프레드니솔론, 또는 프레드니솔론을 사용한 치료의 결과를 비롯하여 근육 위축의 많은 원인이 존재한다. 근육 위축은 또한 신경 외상에 의한 신경제거의 결과 또는 퇴행성, 대사성, 또는 염증성 신경병증 (예를 들어, 길랑-바레(Guillian-Barre) 증후군, 말초 신경병증, 또는 환경 독소 또는 약물에 대한 노출)의 결과일 수 있다.

[0335] 또한, 근육 위축은 근병증, 예컨대 근긴장증; 선천성 근병증, 예를 들어 네말린 근병증, 다발성/미세코어 근병증 및 근세관성 (중심핵성) 근병증; 미토콘드리아 근병증; 가족성 주기성 마비; 염증성 근병증; 예컨대 글리코겐 또는 지질 축적 질환에 의해 야기되는 대사성 근병증; 피부근염; 다발근염; 봉입체 근염; 골화성 근육염; 횡문근융해증 및 미오글로빈뇨의 결과일 수 있다.

[0336] 본 개시내용의 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 케네디병 또는 만성 신장 질환의 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0337] 근병증은 근육 이영양증 증후군, 예컨대 뒤시엔느(Duchenne), 베커(Becker), 근긴장성, 안면견갑상완, 에머리-드레이푸스(Emery-Dreifuss), 안인두, 견갑상완, 지대, 후쿠야마(Fukuyama), 선천성 근육 이영양증, 또는 유전성 원위 근병증에 의해 야기될 수 있다. 근골격 질환은 또한 골다공증, 골절, 저신장, 또는 왜소증일 수 있다.

[0338] 또한, 근육 위축은 성인 운동 뉴런 질환, 예컨대 근위축성 측삭 경화증; 유아 척수성 근육 위축, 소아 척수성 근육 위축, 다초점 전도 차단을 동반한 자가면역 운동 신경병증, 졸중 또는 척수 손상에 의한 마비, 외상에 의한 골격 고정화, 장기간 침상 안정, 수의적 무활동, 불수의적 무활동, 대사성 스트레스 또는 영양 부족, 암, AIDS, 단식, 갑상선 또는 부신 또는 뇌하수체 장애, 당뇨병, 양성 선천성 저긴장증, 중심핵병, 간 질환 (예컨대 섬유증, 간경변증), 패혈증, 신부전, 울혈성 심부전, 노화, 우주 여행 또는 무중력 환경에서 보낸 시간의 결과일 수 있다.

[0339] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 제지방 체질량의 감소 및/또는 근육 소모를 겪는 성인 및 소아 화상을 포함하는 화상 환자의 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0340] 치료될 수 있는 연령-관련 병태의 예는 근육감소증, 피부 위축, 근육 소모, 뇌 위축, 아테롬성동맥경화증, 동맥경화증, 폐기종, 골다공증, 골관절염, 면역 부전, 고혈압, 치매, 헌팅톤병, 알츠하이머병, 백내장, 연령-관련 황반 변성, 전립선암, 졸중, 기대 수명 감소, 노쇠, 기억 상실, 주름, 신장 기능 장애, 및 연령-관련 청각 상실; 대사 장애, 예를 들어 II형 당뇨병, 대사 증후군, 고혈당증, 및 비만을 포함한다.

[0341] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD) 환자의 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0342] 본 개시내용의 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 근육 위축의 치료를 위해 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 근육 위축 치료를 위한 본 발명의 제약 조성물의 용도에 관련되고, 여기서 위축 군은 비만-연관 근육감소증, 근육감소증 및 당뇨병-연관 근육 위축으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0343] 치료될 수 있는 다른 병태는 급성 및/또는 만성 신질환 또는 신부전, 간 섬유증 또는 간경변증, 암, 예컨대 췌장, 위장 (식도, 위, 및 결장 포함), 폐, 전립선, 림프종, 또는 유방암; 파킨슨병; 뉴런 사멸과 연관된 병태,

예컨대 ALS (근위축성 측삭 경화증), 뇌 위축, 또는 치매 및 빈혈; 만성 감염, 예컨대 미코박테리움 투베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)에 의해 또는 비정형 미코박테리아에 의해 야기되는 결핵; 만성 진균 감염; 및 의인성 또는 AIDS에 의한 면역 억제 상황에서의 기회 감염을 포함한다.

[0344] 추가의 병태는 악액질, 류마티스 관절염과 연관된 악액질 및 암과 연관된 악액질을 포함한다.

[0345] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 상기 기재된 치료 유효량의 본 발명의 폴리펩티드를 투여하는 것을 포함하는, 근육 장애의 치료 방법에 관한 것이다. 근육 질량을 증가시키기 위해 개시된 폴리펩티드 또는 이를 포함하는 조성물을 사용한 치료 필요성은 상기한 병태 중의 하나에 의해, 특히 근골격 질환 또는 장애, 예컨대 근육 위축의 결과로서 발생할 수 있고, 여기서 근육 장애는 비만-연관 근육감소증, 근육감소증 및 당뇨병-연관 근육 위축으로 이루어진 군으로부터 선택되는 근육 위축이다.

[0346] 추가로, 본 개시내용은 상기 기재된 치료 유효량의 본 발명의 폴리펩티드를 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 화상, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 연령 관련 병태, 예를 들어 근육감소증, 케네디병, 또는 만성 신장 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

[0347] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 근육 질량을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 근육 질량을 증가시키는 것을 필요로 하는 환장에서 근육 질량을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 근육 질량의 증가 필요성은 상기한 병태 중의 하나에 의해, 특히 근골격 질환 또는 장애, 예컨대 근육 위축의 결과로서 발생할 수 있다. 근육 질량의 증가 필요성은 화상, 만성 폐쇄성 폐 질환 (COPD), 연령 관련 병태, 예를 들어 근육감소증, 케네디병, 또는 만성 신장 질환에 의해 발생할 수 있다.

[0348] ***환자 투여***

[0349] 본 발명의 제약 조성물은 환자에게 투여될 수 있다. 투여는 일반적으로 시린지를 통해 이루어질 것이다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 제약 조성물을 포함하는 전달 장치 (예를 들어 시린지)를 제공한다.

[0350] 다양한 전달 시스템이 공지되어 있고, 본 발명의 폴리펩티드를 투여하기 위해 사용될 수 있다 (예를 들어, 리포솜 내 캡슐화, 미세입자, 미세캡슐, 단백질을 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체-매개 세포내이입 (예를 들어, 문헌 [Wu and Wu, J Biol Chem 262:4429-4432, 1987] 참조), 레트로바이러스, 아데노-연관 바이러스, 아데노바이러스, 폭스바이러스 (예를 들어, 조류 폭스바이러스, 특히 계두바이러스) 또는 다른 벡터의 일부로서 핵산의 구축 등). 도입 방법은 장관 또는 비경구일 수 있고, 피내, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 폐, 코안, 안내, 경막외, 및 경구 경로를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 폴리펩티드는 임의의 편리한 경로, 예를 들어 주입 또는 볼루스 주사, 상피 또는 피부점막 내층 (예를 들어, 구강 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고, 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국소 투여일 수 있다. 또한, 본 발명의 제약 조성물은 뇌실내 및 경막내 주사를 비롯한 임의의 적합한 경로에 의해 중추신경계 내로 도입하는 것이 바람직할 수 있고; 뇌실내 주사는 예를 들어 저장기, 예컨대 옴마야(Ommaya) 저장기에 부착된 뇌실내 카테터에 의해 용이해질 수 있다. 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물을 치료를 필요로 하는 영역에 국소 투여하는 것이 바람직할 수 있고; 이것은 비제한적인 예를 들어 수술 동안 국소 주입, 국소 적용, 예를 들어 주사, 카테터, 또는 임플란트에 의해 수행될 수 있고, 여기서 임플란트는 막, 예컨대 실라스틱 막, 섬유, 또는 시판되는 피부 대체물을 포함하는 다공성, 비-다공성, 또는 젤라틴 물질이다.

[0351] 또 다른 실시양태에서, 제약 조성물은 소포, 특히 리포솜으로 전달될 수 있다 (Langer, Science 249: 1527-1533, 1990 참조). 또 다른 실시양태에서, 활성제는 제어 방출 시스템으로 전달될 수 있다. 한 실시양태에서, 펌프를 사용할 수 있다.

[0352] ***환자 군***

[0353] 제안된 치료로부터 효과를 볼 수 있는 환자는 집중 치료 또는 입원 연장 (1주 초과)을 필요로 하는 급성 또는 중대 질병으로부터 회복하는 환자; 근육감소증이 있는 노쇠한 노인 환자; 심각한 외상, 예컨대 자동차 사고, 중증도 화상, 전투 부상, 및 다른 외상성 손상으로부터 회복하는 청소년; 상기 나열된 바와 같은 악액질을 유발하는 것으로 알려진 만성 질환의 환자; 및 상기 나열된 바와 같은 근육 질환의 환자를 포함한다. 근육 감소는 중증이거나 장기 지속되는 대부분의 질병의 공통적인 합병증이기 때문에, 근육 소모의 반전은 근육 상실의 근본적인 원인과 무관하게 근육 상실을 경험하는 환자의 회복 및 기능 회복을 촉진할 것으로 예상된다.

[0354] ***조합 요법***

[0355] 상기 치료는 근육 소모 과정의 일차 원인을 목표로 하는 임의의 치료와 조합될 수 있다. 상기 조합은 코르티코

스테로이드, 면역억제제, 항-시토카인제, 항암 약물; 성장 인자, 예컨대 에리트로포이에틴, G-CSF, GM-CSF 등; 당뇨병 치료에 사용되는 약물 (인슐린 및 경구 혈당강하제), 항-결핵 약물, 및 항생제를 포함할 수 있다. 조합은 소분자 및 생체분자 작용제를 둘 다 포함할 수 있다.

[0356] 본 발명의 제약 조성물은 유일한 활성제로서, 또는 예를 들어 다른 약물, 예를 들어 ActRIIB 항체, ActRIIA 항체, 가용성 ActRIIB 디코이 모방체, 항-미오스타틴 항체, 미오스타틴 프로펩티드, ActRIIB에 결합하지만 이를 활성화하지 않는 미오스타틴 디코이 단백질, 베타 2 효능제, 그렐린 효능제, SARM, GH 효능제/모방체 또는 폴리스타틴에 대한 아주반트로서 또는 이와 조합하여 함께 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약물은 WO2010125003에 개시된 바와 같이 ActRIIB 항체와 조합 사용될 수 있다.

[0357] ***서열***

서열 번호	DNA/ PROT.	설명	서열
1	PROT.	리더 서열이 없는 hIGF-1	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCA PLKPAKSA
2	PROT.	Ea 펩티드	RSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
3	PROT.	Eb 펩티드	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNTKSQRRKGWPKTHPGGEQKEGTEASLQIRGKKKEQ RREIGSRNAECRGKKGK
4	PROT.	Ec 펩티드	RSVRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNTKSQRRKGSTFEERK
5	PROT.	리더 서열이 없는 야생형 IGF-1-Ea	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCA PLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
6	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc 도메인	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVRAQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRMGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
7	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-fc 도메인	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVRAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRMGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQMDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
9	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQMCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
10	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASGCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
11	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK

[0358]

12	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQMDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
13	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQMCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
14	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
15	DNA	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E	acgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggcttttatttcaacaagcccacagggtatggctc cagcagtcaggcggcgcctcagacaagcatcgtggatgagtgctgcttccggagctgtgatctaaggaggctggagatgtattgcg cacccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacaccgacatgcccaagacccagaaggaagtacatttgaagaacgcaagt agagggagtgcaggaaacaagaactaccagatggacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagcagcgggg ggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggac gtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggga ggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtg caaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgt acaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacat cgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctc ctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaa ccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
16	DNA	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A	acgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggcttttatttcaacaagcccacagggtatggctc cagcagtcaggcggcgcctcagacaagcatcgtggatgagtgctgcttccggagctgtgatctaaggaggctggagatgtattgcg cacccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacaccgacatgcccaagacccagaaggaagtacatttgaagaacgcaagt agagggagtgcaggaaacaagaactaccagatgtgcccaccgtgcccagcacctgaagcagcgggggggaccgtcagtcttcct cttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacag cacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaa gccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatc ccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggga gagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctcctctacagcaagctca ccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaa gagcctctccctgtctccgggtaaa
17	DNA	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C	acgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggcttttatttcaacaagcccacagggtatggctc cagcagtcaggcggcgcctcagacaagcatcgtggatgagtgctgcttccggagctgtgatctaaggaggctggagatgtattgcg caccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacaccgacatgcccaagacccagaaggaagtacatttgaagaacgcaagt gggtgcccaccgtgcccagcacctgaagcagcgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatga tctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggc gtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctg caccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctcc aaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagc ctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaag accacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggga acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
18	DNA	hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F	acgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggcttttatttcaacaagcccacagggtatggctc cagcagtcaggcggcgcctcagacaagcatcgtggatgagtgctgcttccggagctgtgatctaaggaggctggagatgtattgcg caccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacaccgacatgcccaagacccagaaggaagtacatttgaagaacgcaagt ggggacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagcagcgggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccc aaggacaccctcatgatctcccggaccccgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttca actggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtc agcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccca tcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgac caagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagcc ggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctcctctacagcaagctcaccgtggacaagagca ggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc cgggtaaa
19	DNA	hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E	acgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggcttttatttcaacaagcccacagggtatggctc cagcagtcgggaggcgcctcagacaagcatcgtggatgagtgctgcttccggagctgtgatctaaggaggctggagatgtattgcg caccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacaccgacatgcccaagacccagaaggaagtacatttgaagaacgcaagt agagggagtgcaggaaacaagaactaccagatggacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagcagcgggg ggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggac gtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaa ggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtg caaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgt acaccctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacat cgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctc ctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaa ccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa

[0359]

20	DNA	hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A	acgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggcttttatttcaacaagcccacagggtatggctc cagcagtcgggaggcgcctcagacaagcatcgtggatgagtgctgcttccggagctgtgatctaaggaggctggagatgtattgcg caccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacaccgacatgcccaagacccagaaggaagtacatttgaagaacgcaagt agagggagtgcaggaaacaagaactaccagatgtgcccaccgtgcccagcacctgaagcagcgggggggaccgtcagtcttcct cttccccccaaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagac cctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacag cacgtaccgggtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaa gccctcccagccccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatc ccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtggga gagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctttcctctacagcaagctca ccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaa gagcctctccctgtctccgggtaaa	
21	DNA	hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F	acgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggcttttatttcaacaagcccacagggtatggctc cagcagtcgggaggcgcctcagacaagcatcgtggatgagtgctgcttccggagctgtgatctaaggaggctggagatgtattgcg caccctcaagcctgccgtccaggcccagcagcacaccgacatgcccaagacccagaaggaagtacatttgaagaacgcaagt ggggacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaagcagcgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaaccc aaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttca actggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtc agcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccca tcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggaggagatgac caagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagcc ggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagca ggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc cgggtaaa	
22	PROT.	힌지 1	CPPCPA
23	PROT.	힌지 2	DKTHTCPPCPA
24	PROT.	힌지 3	EPKSCDKTHTCPPCPA
25	PROT.	돌연변이된 Ea-펩티드 1	VQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASG
26	PROT.	돌연변이된 E-펩티드	VQAQQHTDMPKTQKYQPPATNKNTKSQRRKGS
27	PROT.	hIGF1-Ea-mut 03	GPTLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAP LKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
28	DNA	hIGF1-Ea-mut 03	ggaccgacgctctgcggggctgagctggtggatgctcttcagttcgtgtgtggagacaggggcttttatttcaacaagcccacagggt atggctccagcagtcgggcggcgcctcagacaggcatcgtggatgagtgctgcttccggagctgtgatctaaggaggctggagatg tattgcgcaccctcaagcctgccaagtcagctgtccgtgcccagcgccacaccgacatgcccaagacccagaaggaagtacattt gaagaacgcaagtagagggagtgcaggaaacaagaactacaggatg
29	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 02	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQMGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 04	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQMGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
31	PROT.	hIgF1-Ea-Fc_mut 13	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQMGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32	PROT.	실시예 8	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
33	PROT.	실시예 9	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
34	PROT.	실시예 10	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
35	PROT.	실시예 11	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
36	PROT.	실시예 12	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
37	PROT.	실시예 13	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
38	PROT.	실시예 14	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
39	PROT.	실시예 15	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
40	PROT.	실시예 16	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM

[0360]

41	PROT.	실시예 17	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVRAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
42	PROT.	실시예 18	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
43	PROT.	실시예 19	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
44	PROT.	실시예 20	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
45	PROT.	실시예 21	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
46	PROT.	실시예 22	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
47	PROT.	실시예 23	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
48	PROT.	실시예 24	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
49	PROT.	실시예 25	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
50	PROT.	실시예 26	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
51	PROT.	실시예 27	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
52	PROT.	실시예 28	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
53	PROT.	실시예 29	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
54	PROT.	실시예 30	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
55	PROT.	실시예 31	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
56	PROT.	실시예 32	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
57	PROT.	실시예 33	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
58	PROT.	실시예 34	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
59	PROT.	실시예 35	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAQVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
60	PROT.	실시예 36	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
61	PROT.	실시예 37	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
62	PROT.	실시예 38	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
63	PROT.	실시예 39	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
64	PROT.	실시예 40	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
65	PROT.	실시예 41	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
66	PROT.	실시예 42	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
67	PROT.	실시예 43	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
68	PROT.	실시예 44	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
69	PROT.	실시예 45	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
70	PROT.	실시예 46	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
71	PROT.	실시예 47	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM

[0361]

72	PROT.	실시예 48	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRPAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
73	PROT.	실시예 49	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
74	PROT.	실시예 50	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
75	PROT.	실시예 51	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
76	PROT.	실시예 52	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQQAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
77	PROT.	실시예 53	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
78	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
79	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42A, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTAIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
80	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTQIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
81	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42P, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTPIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
82	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42K, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTKIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
83	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42E, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTEIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
84	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42I, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTIIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKP AVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
85	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Y, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTYIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
86	PROT.	hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D42, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKP AVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
87	PROT.	hIGF1-Ea (delGPE, R37A)	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM
88	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut2 정방향 프라이머	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
89	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut2 역방향 프라이머	TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGCTTGTCTGAGGCGCCGCCC
90	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut3 정방향 프라이머	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
91	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut3 역방향 프라이머	TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGGGTGTCTGAGGCGCCGCCC

[0362]

92	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut4 정방향 프라이머	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
93	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut4 역방향 프라이머	TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGCCTGTCTGAGGCGCMNNCCGACTGCT GGAGCCATACCCTGTGG
94	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut12 정방향 프라이머	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
95	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut12 역방향 프라이머	TGTCTGAGGCGCCCGCGCACTGCTGGAGCCATACCCTGTGGGC
96	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut13 정방향 프라이머	TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC
97	DNA	hIGF1-Ea-hFc_mut13 역방향 프라이머	TGTCTGAGGCGCCGCCTGACTGCTGGAGCCATACCCTGTGG
98	DNA	G42 돌연변이 프라이머	CGGTACGTGCTGGCGTACTGCTCCTCCCGCGGCTTTG
99	DNA	CHOK1 유래 를론 1: 카피 Δ2	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACAC CTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGC CTGCCTGCCCACCTGGCACCTAC(Δag)GTTCGAGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTT CTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTCATCCACGATGG CGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGG CTCTTGTTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCACCCA GAGGTTCATCCAG
100	DNA	CHOK1 유래 녹아웃 를론 2: 카피 Δ5	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACAC CTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGC CTGCCTGCCCACCTGGCACCTACAG(Δgttcg)AGGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTC TGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGC GAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCT CTTGTTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCACCCAGA GGTTCATCCAG
101	DNA	CHOK1 유래 녹아웃 를론 3: 카피 Δ2	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACAC CTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGC CTGCCTGCCCACCTGGC(Δacctacaggttcgagggctggc)GCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGC CTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGC GAGTG CATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGT CTCTTGTTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCACCCA GAGGTTCATCCAG
102	DNA	CHOK1 유래 녹아웃 를론 2: 카피 Δ22	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACAC CTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGC CTGCCTGCCCACCTGGC(Δacctacaggttcgagggctggc)GCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGC CAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGCGAGTG CATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGT TCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCACCCAGAGGTTC ATCCAG
103	DNA	CHOK1 유래 녹아웃 를론 1: 카피 14 개 뉴클레오티드 대체 및 18 개 부가	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACAC CTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGC CTGCCTGCCCACCTGGtgaggtataggacagtattatagaggtggggcAGGGCTGGCGCTGTGTGGACC GCGATTTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTCATCC ACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGG TCAGTGGCTCTTGTTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAA CCACCCAGAGGTTCATCCAG
104	DNA	CHOK1 유래 녹아웃 를론 3: 카피 Δ114	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGC(Δctaggcagctgccatacacctgacga caacacaacctgtgtggcctgccgacactactactacaaaggcgtgtgtgtgcctgcctgcccacctggcacctacaggttcgaggg c)TGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACT CAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCC GCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCAT ATTCCATGATTGTAGGAACCACCCAGAGGTTCATCCAG
105	DNA	CHO-DUXB11 유래 녹아웃 를론: 서열 Δ22	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACAC CTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGC CTGCCTGCCCACCTGG(Δcacctacaggttcgagggctgg)CGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGC CAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGCGAGTG CATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGT TCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCACCCAGAGGTTC ATCCAG
106	DNA	CHO-DUXB11 유래 녹아웃 를론: 서열 Δ7	AGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACAC CTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGC CTGCCTGCCCACCTGGCACCTACA(Δggttcga)GGGCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCT GCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGC GAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGCACCCAGAGGTCAGTGGCT CTTGTTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGATTGTAGGAACCACCCAGA GGTTCATCCAG
107	DNA	CHO IGF1R 아연 핑거 뉴클레아제 인식 부위 및 절단 부위	CCCACCTGGCACCTACAGGT/TCGAGGGCTGGCGCTGTGTGG

[0363]

108	DNA	CHO IGF1R 정방향 서열분석 프라이머 (인트론 2-3 내)	CTAGCCTGTCTCTGGGACAC
109	DNA	CHO IGF1R 역방향 서열분석 프라이머 (인트론 3-4 내)	CTGGATGAACCTCTGGGTGG
110	DNA	CHO IGF1R 엑손 3	TGTGCCCAAGTGTGTGCGGAAAGCGAGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCA GAGTGCCTAGGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACA CTACTACTACAAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCCACCTGGCACCTACAGGT/TCGAGG GCTGGCGCTGTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGAC TCAGATGGCTTTGTCATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATC CGCAACAGCACCCAGAG
111	DNA	CHO IGF1R 엑손 3 및 **폴랭킹 인트론**	AAACTTAACGGCACATCCCATAGCAAACCATTTCATAAGAAAGGACTTGGCATGTGTTGTG TCCTTTCCCAGTGTGGGCTTCACAGATGGTATTACCTGTGCAGATTTCAGAGAAAGTGTGT TTTTCCTAGCCTGTCTCTGGGACACCATTTAGTGCTGGTTGTGGCAGCAGATGACCCTGG GGAGGCTGTGTAGTCTCTTCATCTCACCACCTCCTCCCCCTGTTCCCACAGTGTGCCCAA GTGTGTGCGGAAAGCGAGCGTGCACCGAGAACAACGAATGCTGCCACCCAGAGTGCCTA GGCAGCTGCCATACACCTGACGACAACACAACCTGTGTGGCCTGCCGACACTACTACTAC AAAGGCGTGTGTGTGCCTGCCTGCCCACCTGGCACCTACAGGT/TCGAGGGCTGGCGCT GTGTGGACCGCGATTTCTGCGCCAACATCCCCAACGCTGAGAGCAGTGACTCAGATGGC TTTGTCATCCACGATGGCGAGTGCATGCAAGAATGTCCCTCAGGCTTCATCCGCAACAGC ACCCAGAGGTCAGTGGCTCTTGTTCCCCATCCAGGAGGTGAATCTTGTTCATATTCCATGA TTGTAGGAACCACCCAGAGGTTCATCCAGATGGGGAGGCTGTTGGAGGGTGCTGACTAA GCTTGTTTTTATGAGAATCTTGGAATGGCTGGTCTGTTCATTTCTTTGTTTGTTGGCTTGCT TTGTTGTCTTTGAAAGTGCCTTGCTAGCCCTAGAGAGGAAGAATTAGCCTGCTG
112	DNA	코작(Kozak) 서열	CCCGCCCGCCCACC
113	Prot.	hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72, R74Q, R77Q, R104Q-fc	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQMGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
114	Prot.	hIGF1-Ea-hFc_mut03	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTPIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQMGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
115	PROT.	돌연변이원 Ea-펩티드 1	VQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQM
116	PROT	hIGF1-Ea-hFc_mut 12	TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSARAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PAKSAVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQMGSDKTHTCPPCPAPEAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
117	PROT	IGF-1 (G42S)	GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCA PLKPAKSA
118	PROT	hIGF1-Ea-mut 03-G42S	GPTLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAP LKPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM

[0364]

[0365] **본 발명을 실행하기 위한 방식**

[0366] 본 발명은 단지 예에 의해 설명되고, 본 발명의 범위 및 취지 내에 남아있으면서 변형이 이루어질 수 있음이 이해될 것이다.

[0367] **실시예**

[0368] 본원에 개시된 재조합 IGF-1 변이체는 야생형 단백질 유사 수용체 친화도 (도 1)를 갖지만, 야생형 IGF-1보다 더 우수한 약동학적 생체내 프로파일을 보이고 (도 7), 덜 빈번한 투여로 근육 위축을 예방하기 위해 사용될 수 있다 (도 8). 인슐린 수용체 (InsR) 인산화를 자극하여 저혈당증의 위험을 야기하는 일부 선행 기술의 IGF-1 변이체와 반대로, 위치 G42에서 돌연변이 (결실 또는 특이적 치환)된 본원의 인간 IGF-1 전구체 단백질은 인슐린 수용체 (InsR) 인산화를 자극하는 야생형 유사 능력을 보이고, 이것은 상기 저혈당증 위험을 감소시킨다 (도 5/6/19). 또한, 야생형 hIGF-1 또는 그의 일부 선행 기술의 변이체와 반대로, 본원에 개시된 IGF-1 변이체는 포유동물 세포 시스템 내에서 분해없이 고역가로 생산할 수 있어서, 산업적 규모 생산을 허용한다.

[0369] **파트 A: 일반적인 방법론**

[0370] **A1. 시약**

[0371] 재조합 인간 IGF-1는 노파르티스 아게(Novartis AG)로부터 입수하고, 재조합 인간 인슐린은 프로모셀(Promocell, #C-60212)로부터 구입하였다.

[0372] **A2. 벡터 구축**

[0373] 본 발명의 교시내용에 따른 몇몇 벡터 조립이 실현가능하다. 벡터의 개별 요소들은 선행 기술에 공지되어 있으므로, 적합한 벡터는 예를 들어, 목적하는 배향으로 기본 유전적 요소 및 발현 카세트의 서열분석 또는 증폭 및 적절한 클로닝에 의해 조립될 수 있다. 각각의 클로닝 방법은 최신 기술이고, 또한 상기 기재된 유전적 요소의 서열은 선행 기술에 설명되어 있다. 후속적으로, 벡터 구축물의 생성을 예로서 설명한다. 그러나, 각각의 벡터를 얻기 위한 몇몇 다른 실시양태 및 방식이 적합하고 쉽게 이용가능함을 통상의 기술자는 이해할 것이다. 본 섹션에 설명된 모든 포유동물 발현 벡터 (예를 들어 pBW679)는 WO2009080720에 설명된 포유동물 발현 벡터에 기반한 것이다. WO2009080720의 실시예 섹션, 특히 도 1, 표 1 및 실시예 섹션 II: 벡터 구축 (페이지 21-31)을 본원에 참조로 포함시킨다.

[0374] 5'코작 (CCCGCCCGCCCACC) (서열 112)이 플랭킹되는 hIGF1-Ea-delGPE-R37A (서열 87)의 드 노보 합성은 더 블루 헤론 바이오테크(The Blue Heron Biotech)에서 주문하였고, 5'HindIII/BamHI 및 3'EcoRI 제한 부위를 블루 헤론 pUC 벡터 내에 전달하였다. pcDNA3.1 벡터 (인비트로젠(Invitrogen), 라이프 테크놀로지스)) 내로 재클로닝은 적합성 5' BamHI 및 3'EcoRI 클로닝 부위와의 라이게이션 반응에 의해 완료하였다. 구축물은 T7 및 BGHA 특이적 프라이머를 사용하여 완전히 서열 제어하였다. 이어서, 부위 지정 돌연변이유발 (퀵 체인지(Quick Change) II 부위 지정 돌연변이유발 키트, 스트라타젠)을 수행하여 선행 구축물 hIGF1-Ea-delGPE-R37A/pCDNA3.1을 이용하여 2개의 잔기 R71 및 S72를 제거하였다. 생성되는 구축물 hIGF1-Ea-delGPE-R37A-delRS를 사용하여 hIGF1-Ea (delGPE, R37A, delRS)를 포유동물 발현 벡터 pRS5a (노파르티스 소유 벡터, NPL000961) 내로 재클로닝하였다.

[0375] PRS5a는 CMV 프로모터, BGH 유전자 (소 성장 호르몬)로부터 폴리아데닐화 부위 및 암피실린 내성 하의 포유동물 발현 벡터이다. hIGF1-Ea (delGPE, R37A, delRS)/pRS5a는 NPL009759 (노파르티스 소유 벡터)로서 보관되었다.

[0376] hIGF1-Ea (delGPE, R37A, delRS)은 NPL009759로부터 증폭되었다. PCR 산물을 5'HindIII/3'BamHI로 소화시키고, pRS5a-hIgG1 LALA 벡터 (NPL012935, 노파르티스 소유 벡터) 내로 클로닝하였다. 상기 기재된 바와 같이 수 라운드의 부위 지정 돌연변이유발을 수행하여, hIGF1-Ea (delGPE, R37A, delRS)-[R74Q-R78Q-R104Q] (NPL017580, 노파르티스 소유 벡터)를 위한 플라스미드를 전달하였다. 상기 플라스미드를 아래 설명된 추가의 클로닝을 위한 기초로서 사용하였다.

[0377] **hIGF1-Ea-hFc_mut2의 플라스미드**: G42S 돌연변이를 함유하는 PCR 단편을, 돌연변이유발 올리고 (5' TGACACTATAGAATAACATC CACTTTGCC 3') (서열 88) 및 (5' TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACG ATGCTTGTCTGAGGCGCCGCCC 3') (서열 89)를 사용하여 NPL017580으로부터 증폭하였다. BlpI 및 BspEI 엔도뉴클레아제 제한 부위를 사용하여, 생성된 PCR 단편을 NPL017580 내로 다시 클로닝하였다.

[0378] **hIGF1-Ea-hFc_mut3의 플라스미드**: G42P 돌연변이를 함유하는 PCR 단편을, 돌연변이유발 올리고 (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (서열 90) 및 (5' TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGGGTGTCTGAGGCGCCGCCC 3') (서열 91)를 사용하여 NPL017580으로부터 증폭하였다. BlpI 및 BspEI 엔도뉴클레아제 제한 부위를 사용하여, 생성된 PCR 단편을 NPL017580 내로 다시 클로닝하였다.

[0379] **hIGF1-Ea-hFc_mut4의 플라스미드**: A37E 돌연변이를 함유하는 PCR 단편을, 돌연변이유발 올리고 (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (서열 92) 및 (5' TCACAGCTCCGGAAGCAGCACTCATCCACGATGCCTGTCTGAGGCGCMNNCCGACTGCTGGAGCCATACCCTGTGG) (서열 93)를 사용하여 NPL017580으로부터 증폭하였다. 동요 코돈은 IUPAC 명명법에 제시되어 있고, 여기서 M은 염기 A 또는 C를 의미하고, N은 염기 A, C, G 또는 T를 의미한다. 후자의 올리고는 위치 37에서 동요 코돈을 보유할 것이다. BlpI 및 BspEI 엔도뉴클레아제 제한 부위를 사용하여, 생성된 PCR 단편을 NPL017580 내로 다시 클로닝하였다. A37E 치환은 서열분석에 의해 선택하였다.

[0380] **hIGF1-Ea-hFc_mut12의 플라스미드**: R36A-A37R 돌연변이를 함유하는 PCR 단편을, 돌연변이유발 올리고 (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (서열 94) 및 (5' TGTCTGAGGCGCCCGCGCACTGCTGGAGCCATACCCTGTGGGC 3') (서열 95)를 사용하여 NPL017580으로부터 증폭하였다. BlpI 및 SfoI 엔도뉴클레아제 제한 부위를 사용하여, 생성된 PCR 단편을 NPL017580 내로 다시 클로닝하였다.

[0381] **hIGF1-Ea-hFc_mut13의 플라스미드**: R36Q 돌연변이를 함유하는 PCR 단편을, 돌연변이유발 올리고 (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (서열 96) 및 (5' TGTCTGAGGCGCCGCCTGACTGCTGGAGCCATACCCTGTGG 3') (서열 97)을 사용하여 NPL017580 (노파르티스 소유 벡터)으로부터 증폭하였다. BlpI 및 SfoI 엔도뉴클레아제 제한 부

위를 사용하여, 생성된 PCR 단편을 NPL017580 내로 다시 클로닝하였다.

[0382] 변이체 hIGF1-Ea-hFc mut4 및 mut13은 상이한 링커 (즉, 서열 22 및 23)을 도입하기 위해 추가로 변형시켰다: BspEI 엔도뉴클레아제 제한 부위 (잔기 IGF1 F49-R50에 상응하는)로부터 AleI (Fc 부분 내에)까지 이어지는 링커 서열은 진아트에서 주문하였다. 링커를 표준 절단 및 부착 (cut and paste)에 의해 클로닝하여 hIGF1-Ea-hFc_mut4_E, hIGF1-Ea-hFc_mut13_E 및 hIGF1-Ea-hFc_mut13_A에 대한 플라스미드를 얻었다. 다음 단계에서, 돌연변이 G42S를 도입하였다.

[0383] **hIGF1-Ea-hFc_mut4/2_E 및 hIGF1-Ea-hFc_mut13/2_E의 플라스미드**: G42S 돌연변이를 함유하는 PCR 단편을, 올리고 (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (서열 88) 및 (5' CGGTACGTGCTGGCGTACTGCTCCTCCCGCGGCTTTG 3') (서열 98)을 사용하여 hIGF1-Ea-hFc_mut2의 플라스미드로부터 증폭하였다. BspEI 및 SfoI 엔도뉴클레아제 제한 부위를 사용하여, 생성된 PCR 단편을 hIGF1-Ea-hFc_mut4_E 및 hIGF1-Ea-hFc_mut13_E의 플라스미드 내로 클로닝하였다.

[0384] **hIGF1-Ea-hFc_mut13/2_A의 플라스미드**: G42S-R36Q 돌연변이를 함유하는 PCR 단편을, 올리고 (5' TGACACTATAGAATAACATCCACTTTGCC 3') (서열 88) 및 (5' CGGTACGTGCTGGCGTACTGCTCCTCCCGCGGCTTTG 3') (서열 98)을 사용하여 hIGF1-Ea-hFc_mut13/2_E의 플라스미드로부터 증폭하였다. BspEI 및 SfoI 엔도뉴클레아제 제한 부위를 사용하여, 생성된 PCR 단편을 hIGF1-Ea-hFc_mut13_A의 플라스미드 내로 클로닝하였다.

[0385] **A3. 재조합 단백질의 생산**

[0386] 소규모 생산:

[0387] IGF1-Fc 변이체를 생산하기 위해 2가지 상이한 형질감염 방법 (FuGene 및 폴리에틸렌이민 (PEI) 기반)을 사용하였다.

[0388] 100 ml의 HEK 293F 배양물을 다음과 같이 PEI로 형질감염시켰다: 물 중 100 μg의 플라스미드 DNA를 7 ml의 프리스타일(Freestyle) 발현 배지 (깁코(GIBCO), Cat. 12338026) 내에 10 min 동안 실온에서 희석하였다. 300 μg의 PEI (1 mg/mL PEI 원액으로부터)를 7 ml 프리스타일 발현 배지 내에 실온에서 희석하였다. 이어서, DNA 및 PEI 용액을 함께 혼합하고 15 min 동안 인큐베이션한 후, 500 ml 진탕 플라스크 내에서 36 ml의 HEK 293F 세포 배양물에 약 $1.4x10^6$개 세포/mL의 밀도로 첨가하였다. 배양물을 6일 동안 100 rpm, 6% CO2 및 37℃로 설정된 퀴너-세이커(Kuehner-Shaker) ISF1-X (퀴너(Kuehner)) 내에서 인큐베이션하였다. 이어서, IGF1-Fc 변이체를 AKTA 아반트(Avant) (지이 헬스케어(GE Healthcare)) 상에서 하이트랩 맙셀렉트 슈어(HiTrap MabSelect Sure) 1 ml 칼럼 (지이 헬스케어)을 사용하는 단백질 A 크로마토그래피에 의해 맑은 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다. PBS를 사용한 기준선 세척 후에, 결합된 물질을 50 mM 시트레이트, pH 3.0, 150 mM NaCl로 용리하고 즉시 중화시켰다.

[0389] 100 ml의 HEK 293F 배양물을 다음과 같이 FuGENE HD 형질감염 시약 (로슈(Roche))으로 형질감염시켰다: 물 중 100 μg의 플라스미드 DNA를 실온에서 유지한 1 ml의 프리스타일 발현 배지 (깁코, Cat. 12338026) 내에 희석하였다. 400 μℓ의 FuGENE을 희석시킨 DNA에 첨가하고, 혼합물을 15 min 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 이어서, 1.4 ml의 DNA-FuGENE 혼합물을 약 $0.5x10^6$개 세포/mL의 세포 밀도를 갖는, 500 ml 플라스크 내의 98.6 ml의 HEK 293F (인비트로젠) 세포 배양물에 첨가하였다. 배양물을 7일 동안 100 rpm, 6% CO2 및 37℃로 설정된 퀴너-세이커 ISF1-X (퀴너) 내에서 인큐베이션하였다. 이어서, IGF1-Fc 변이체를 AKTA 아반트 (지이 헬스케어) 상에서 하이트랩 맙셀렉트 슈어 1 ml 칼럼 (지이 헬스케어)을 사용하는 단백질 A 크로마토그래피에 의해 맑은 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다. PBS를 사용한 기준선 세척 후에, 결합된 물질을 50 mM 시트레이트, pH 3.0, 150 mM NaCl로 용리하고 즉시 중화시켰다.

[0390] 중간 규모 생산:

[0391] 9.5 L의 HEK 293 배양물을 다음과 같이 폴리에틸렌이민 (PEI)으로 형질감염시켰다: TE 완충제 중의 10 mg의 플라스미드 DNA를 250 ml 실온 OptiMEM1 배지 [깁코 Cat. No #11058-021] 내에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 20 mg의 폴리에틸렌이민 PEI (1 mg/mL PEI 원액으로부터)을 250 ml 실온 OptiMEM1 배지 (깁코 Cat.no# 11058-021)에 첨가하였다. 이어서, DNA 및 PEI 용액을 함께 혼합하고, 15분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 500 ml의 DNA-PEI 혼합물을 9.5 L HEK 배양물에 $0.75x10^6$개 세포/mL 내지 $1.25x10^6$개 세포/mL의 밀도로 첨가하였다. 형질감염된 세포를 37℃에서 20 L 웨이브 셀백(Wave Cellbag) (지이 헬스케어, # CB0020L10-03) 내에 접종하였다. 셀백을 25 rpm, 7° 진동각, 7% CO2, 0.50 lpm 공기, 및 37℃로 설정된 웨이브 시스템(Wave System)

20/50 EHT 상에 놓았다. Fc 융합 구축물을 농축 배양 상청액으로부터 단백질 A 크로마토그래피에 의해 포획하였다. PBS를 사용한 기준선 세척 후에, 결합된 물질을 50 mM 시트레이트, pH 2.7, 140 mM NaCl로 용리하고 즉시 중화시켰다. 이어서, 중화된 분획을 한외여과에 의해 농축시키고, PBS 중의 슈퍼덱스(Superdex) 200 위로 체질하여 일부 오염 응집체를 제거하였다. SDS-PAGE 및 LC-MS 분석 모두에 의해 판단할 때 물질의 순도는 >95%이었다.

[0392] **A4. SEC-MALS에 의한 응집 수준의 평가**

[0393] 단백질 A 정제된 IGF-1-Fc 변이체를 다각 광 산란 검출기에 연결된 크기-배제 크로마토그래피 (SEC-MALS)에 의해 응집 수준에 대해 시험하였다. 측정은 3각 광 산란 검출기 (미니도운 트레오스(miniDAWN Treos), 와이어트 테크놀로지(Wyatt Technology, 미국 캘리포니아주 산타바바라))에 연결된 애질런트(Agilent) 1200 HPLC 시스템(애질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies)) 상에서 수행하였다. 샘플의 농도는 0.186 ml/g의 비굴절률 증가 (dn/dc) 값을 이용하는 시차 굴절계 (옵티랩(Optilab) rEX, 와이어트 테크놀로지)를 사용하여 온라인으로 추적하였다. 50 ㎕의 샘플 부피를 슈퍼덱스 200 10/300 GL 칼럼 (지이 헬스케어) 상에 주입하였다. 데이터를 기록하고, ASTRA V 소프트웨어 (와이어트 테크놀로지)를 사용하여 처리하였다. MALS 검출기에 대한 표준화 계수 및 검출기 지연 부피를 결정하기 위해, BSA 샘플 (시그마(Sigma), A8531))을 참조물로서 사용하였다. 디스파이킹(despiking) 및 밴드 확장 교정은 모두 적용되지 않았다.

[0394] **A5. 세포 배양**

[0395] 인간 골격근 (skMC) 세포를 캠브렉스(Cambrex; #CC-2561)로부터 입수하였다. 인간 일차 근육모세포를 성장 배지 [20% 태소 혈청 (FBS, #2-01F40-1, 아미메드(Amimed)) 및 0.1% 겐타마이신을 함유하는 SkGM] 내에서 배양하였다. 4-5일 (37℃, 5% CO2 및 95% 습도에서) 후에, 세포를 성장 배지 내에 150,000개 세포/웰의 밀도로 시딩하고, 성장시켰다 (37℃, 5% CO2 및 95% 습도에서). 시딩 후 제3일에, skMC 근육모세포를 신호전달 실험에 사용하였다. NIH3T3-IGF-1R 및 NIH3T3-InsR을 10% FBS, 100U/ml 페니실린, 및 100 ㎍/ml 스트렙토마이신을 함유하는 D-MEM 내에 유지하였다. 일차 시노몰구스 근육모세포를 시노몰구스 원숭이 마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*)의 비복근으로부터 단리하였다. 세포를 20% 태소 혈청 (FBS, #2-01F40-1, 아미메드) 및 0.1% 겐타마이신 (라이프 테크놀로지스, #15750-037)을 함유하는 SkBM 내에서 배양하였다. 3T3-L1 지방세포 및 C2C12 세포는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture collection: 각각 ATCC-CL-173 및 ATCC #91031101)로부터 입수하였다. 3T3-L1 지방세포를 DMEM, 고 글루코스, 1.5 g/리터 NaHCO3 (ATTC #30-2002) 내에 유지하고, 10% FCS, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 0.5 mM IBMX, 1 μM 덱사메타손을 함유하는 DMEM의 첨가에 의해 분화를 개시하였다. C2C12 근육모세포를 시딩 후 제3일에 분화시켰다. 이를 위해, 세포를 2% 열 불활성화 말 혈청 (HS; #US 14-403F, 캠브렉스), 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 1% 글루타민을 보충한 DMEM으로 이루어지는 분화 배지 (DM)으로 1회 세척한 후, DM 내에서 72시간 동안 37℃, 5% CO2 및 95% 습도에서 인큐베이션하였다.

[0396] **A6. 비아코어**

[0397] 결합 특성을 25℃에서 비아코어 T200 기기를 사용하는 SPR에 의해 특성화하였다. 3개의 CM5 칩 (GE, BR-1005-30)은 표준 아민 커플링 절차를 적용함으로써 제조하였다. 유동 셀 1은 참조물 역할을 하는 고정된 블랭크인 반면, IGF-1 및 hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A를 측정 유동 셀 2 및 3 상에 고정시켰다. 고정화 수준을 개별 상호작용에 대해 조절하였고, 20 - 143 RU (IGF-1) 및 32 - 113 RU (hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A) 범위였다. 연속 희석물의 재조합 인간 IGF-1R (알앤디 시스템즈(R&D Systems), 391-GR)을 진행 완충제 (30 mM 시트레이트 및 0.05% BSA를 함유하는 1x HBS-EP+ (테크노바(Teknova), H8022)) 내에 제조하고, 칩 상에 50 ㎕/min의 유속으로 주입하였다. 분석물 농도 범위를 개별 상호작용에 대해 조절하였고, 1000 - 3.9 nM (IGF-1R) 범위였다. 리간드는 Ag/Ab 용리 완충제 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific), 21027)를 90 sec 동안 50 ㎕/min로 부드럽게 주입함으로써 재생시켰다. 운동 속도 상수 및 KD는 이중 참조 센소그램을 1:1 결합 모델에 피팅함으로써 계산하였다.

[0398] **A7. ELISA**

[0399] IGF-1R 인산화의 분석을 위해, 6-웰 플레이트 상에 플레이팅된 세포를 성장 배지 내에서 24 (NIH3T3-IGF-1R) 또는 72시간 (인간 및 시노몰구스 일차 근육모세포) 동안 배양하였다. 세포를 24시간 (NIH3T3-IGF-1R) 또는 4시간 (인간 및 시노몰구스 일차 근육모세포) 동안 굶긴 후, 15 min 동안 37℃에서 지시된 펩티드로 자극하였다. 세포를 다양한 프로테아제 억제제를 함유하는 포스포세이프(PhosphoSafe) 완충제 (셀 시그널링(Cell Signaling))로 용해시키고, 14,000 x g에서 15분 동안 4℃에서 원심분리에 의해 청정화하고, IGF-1R 인산화 수

준을 듀오셋 IC 인간 포스포르-IGF-1R 키트 (알앤디 시스템즈)를 사용하는 ELISA에 의해 분석하였다.

[0400] 인슐린 수용체 인산화의 분석을 위해, NIH3T3-InsR 세포를 $0.2x10^6$개 세포/웰의 밀도로 6-웰 플레이트에 플레이팅하고, 성장 배지 내에서 24시간 동안 배양하였다. 세포를 18시간 동안 무혈청 배지에서 굶기고, 37℃에서 10 min 동안 상이한 리간드로 자극하였다. 세포를 상기 기재된 바와 같이 용해시키고, InsR 인산화 수준을 듀오셋 IC 인간 포스포르-InsR ELISA 키트 (알앤디 시스템즈)를 사용하는 ELISA에 의해 분석하였다.

[0401] **A8. 글루코스 흡수**

[0402] 글루코스 흡수를 측정하기 위해, 3T3-L1 지방세포 및 C2C12 마우스 근관 세포를 24-웰 플레이트 상에 시딩하고, 무혈청 DMEM 내에서 4시간 동안 배양하였다. 이어서, 무혈청 DMEM를 3T3-L1 지방세포 및 C2C12에 대해 각각 KRP 완충제 (130 mM NaCl, 1.3 mM MgSO4, 1.3 mM CaCl, 5 mM KCl 및 10 mM Na2HPO4) 또는 HBS (140 mM NaCl, 2.5 mM MgSO4, 1.0 mM CaCl, 5 mM KCl 및 10 mM Hepes)로 대체하였다. 세포를 37℃에서 1시간 동안 명시된 펩티드로 처리하였다. 글루코스 흡수는 실온에서 10분 (지방세포) 또는 5분 (C2C12) 동안 0.4 μCi (지방세포) 또는 0.8 μCi (C2C12)의 [3H] 2-데옥시-D-글루코스 및 0.1 mM (지방세포) 또는 0.01 mM (C2C12)의 2-데옥시-D-글루코스를 첨가함으로써 측정하였다. 배지를 흡인시키고, 1 μM 사이토칼라신 B를 함유하는 KRP 또는 HBS 완충제를 첨가함으로써 검정을 종료시켰다. 이어서, 세포를 빙냉 PBS로 세척하고, 0.2 M NaOH를 사용하여 용해시키고, 섬광 계수에 의해 방사능을 분석하였다 (도 5/6 참조).

[0403] **A9. 약동학 프로파일**

[0404] 성체 수컷 래트 (n=3/군)에게 10 mg/kg의 hIGF-1-Ea-Fc_mut 13/2_A 또는 hIGF-1-Ea-Fc_mut 04/2_E, 또는 hIGF-1 (1 mg/kg)을 정맥내 (i.v.) 볼루스 또는 피하 주사에 의해 투여하였다. 연속 혈액 표본을 IGF-1 변이체 투여의 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 168 및 336시간 후에, 또는 hIGF-1 투여의 0.083, 0.25, 0.5, 2, 4, 8 및 24시간 후에 수집하였다. 재조합 단백질의 혈청 농도는 ELISA에 의해 결정하였다.

[0405] **A10. 덱사메타손-유도된 근육 위축에 대한 hIGF-1-Ea-Fc mut_13/2_A의 효과**.

[0406] 28일 동안 알제트(Alzet) 모델 2ML2를 사용하여 0.075 mg/kg/일의 용량을 달성하도록 덱사메타손 (Dex)을 PBS 내에 용해시켰다. C에서 Dex를 군 미니펌프에서 3.8 mg/kg/일의 용량의 hIGF-1과 조합하였다. 군 D, E 및 F에서 각각 Dex 처리를 3, 10 및 30 mg/kg의 용량으로 hIGF1-Ea-Fc_13/2_A의 격일 피하 처리와 조합하였다. 펌프를 용액으로 채우고, 수술적 이식까지 수시간 동안 37℃에서 PBS 내에서 유지하였다. 래트를 수술의 적어도 30분 전에 1 mℓ/kg의 부피로 0.02 mg/kg의 용량의 템게직(Temgesic)으로 피하 처리한 후, 상기 지시된 용액을 채운 펌프를 3% 농도의 이소플루란 마취 하에 래트의 등 내에 피하 이식하였다. 수술의 24 h 및 48 h 후에 템게직을 래트에 피하 투여하였다. A, B 및 C군의 래트를 PBS의 매일 피하 주사로 처리하였다. 체중을 매주 2회 측정하였다. 처리 4주 후에 래트를 CO2로 안락사시키고, 근육을 절개하고, 칭량하였다.

[0407] **파트 B: 작업 실시예**

[0408] Ea-펩티드를 포함하는 선행 기술의 분자 (여기서 단백질 잔기 E3, R71 및 S72는 결실되고, R37 아미노산은 알라닌으로 치환된다 (hIGF1-Ea-Fc-mut3) (서열 27))를 생산하고 시험하였다.

[0409] 실시예 1: DNA 발현 벡터의 제조

[0410] 1.1 다음 변형을 포함하는 hIGF-1-Ea 전구체 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 발현 벡터를 상기 기재된 바와 같이 구축하였다: hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A (이펙터 기능 침묵화 돌연변이 L234A L235A를 보유하는 hIgG1로부터 Fc 부분 ("LALA") (서열 9)을 포함함); 여기서 G1, P2, E3은 결실되고, 아미노산 R36은 글루타민 (Q)로 치환되고, R37은 알라닌으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72는 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104는 글루타민 (Q)로 돌연변이되고; 이것은 IgG1 LALA Fc 영역에 연결된다.

[0411] 이것은 다음과 같은 분비된 단백질 서열을 생성한다:

[0412] (서열 9)

TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSQAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKP
AVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQMCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

[0413]

[0414] 1.2 다음 변형을 포함하는 hIGF-1-Ea 전구체 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 발현 벡터를 상기 상기 섹션 A2에 설명된 바와 같이 구축하였다:

[0415] hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E (hIgG1 LALA Fc 영역을 포함함): 인간 IGF-1 전구체 단백질, 여기서 G1, P2, E3은 결실되고, 아미노산 R37은 글루탐산 (E)로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72는 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104는 글루타민 (Q)로 돌연변이되고; 이것은 IgG1 LALA Fc 영역에 연결된다.

[0416] 이것은 다음과 같은 분비된 단백질 서열을 생성한다:

[0417] (서열 12)

TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSREAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKP
AVQAQQHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYQMDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0418]

[0419] 상기 개략한 원리에 기반하여, 다음과 같은 추가의 단백질을 생산하였다:

[0420] 실시예 54 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E; 서열 8)

[0421] 실시예 56 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C; 서열 10)

[0422] 실시예 50 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F; 서열 11)

[0423] 실시예 58 (hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A; 서열 13)

[0424] 실시예 59 (hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F; 서열 14)

[0425] 1.3 다음 변형을 포함하는 hIGF-1 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 발현 벡터를 관련 기술분야에 공지된 DNA 벡터 구축/DNA 조작 방법을 이용하여 구축하였다: hIgF1 G42S (서열 117);

[0426] 이것은 다음과 같은 단백질 서열을 생성한다:

[0427] (서열 117)

GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAP
LKPAKSA

[0428]

[0429] 1.4 다음 변형을 포함하는 hIGF-1 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 발현 벡터를 관련 기술분야에 공지된 DNA 벡터 구축/DNA 조작 방법을 이용하여 구축하였다: hIGF1-Ea-mut 03-G42S (서열 118);

[0430] 이것은 다음과 같은 단백질 서열을 생성한다:

[0431] (서열 118)

GPTLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAAPQTSIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPL
KPAKSAVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM

[0432]

[0433] 실시예 2: IGF-1-Fc 변이체의 프로테아제 시험접종

[0434] 예를 들어 CHO와 같은 포유동물 세포 발현 시스템 내에서 생산된 단백질은 발현 동안 단백질 분해를 받을 수 있다. 표준화된 방식의 생산 동안 잠재적인 프로테아제 감수성을 효과적으로 평가하기 위해, 본 발명자들은 CHO

세포 배양물으로부터 정제된 단백질 및 조건화된 배지를 사용하는 프로테아제 시험접종 검정을 개발하였다. CHO 세포에서 생산된 IGF-1-Fc 변이체에 대해 관찰된 절단 패턴에 대한 상기 검정의 비교로 검정 확인을 제공하였다. 간단히 설명하면, CHO 세포를 CHODM122 배지 내에서 (37℃, 6% CO2, 85% 상대 습도, 90-150 rpm) 2E5 세포/ml 내지 1E7 세포/ml까지 밀도로 배양하였다. 맑은 상청액은 검정에 사용하기 위한 조건화된 배지를 제공하였다. IGF-1-Fc 변이체를 상기 기재된 바와 같이 (A3) 정제하고, 조건화된 배지 또는 대조군으로서 PBS 내에 100 ㎍/ml의 농도로 스파이킹하였다. 멸균 여과 후에, 샘플을 37℃에서 20일까지 인큐베이션하고, 다양한 시점에 분석할 샘플을 취하였다. 상이한 분해 산물은 표준 SDS-PAGE 기술 (NuPAGE Bis-Tris, 인비트로젠)에 의해 잘 단리될 수 있었고, 분해 밴드의 강도를 밀도계로 정량하였다. 결과를 도 17에 제시한다.

[0435] 실시예 3: 재조합 인간 IGF-1R에 대한 hIGF-1 및 유사체의 고친화도 결합

[0436] rhIGF1R에 대한 hIGF-1 및 IGF-1 변이체의 고친화도 결합을 표면 플라스몬 공명 (비아코어)를 이용하여 측정하였다. 직접 결합 검정을 수행하였다. 인간 IGF-1-Ea_Fc_Mut_13/2_A 및 hIGF-1을 칩 상에 고정시켰고, IGF-1 수용체는 용액 내의 분석물로서 역할을 하였다. 생성되는 센소그램을 1:1 상호작용 모델에 피팅시켜 평균 해리 상수 (KD)를 계산하였다. 결과는 IGF-1R에 대한 hIGF-1-Ea_Fc_Mut_13/2_A의 결합이 hIGF-1에 필적함을 보여준다 (도 1).

[0437] 실시예 4: IGF-1R 인산화의 유도

[0438] IGF-1R의 인산화를 자극하는 hIGF-1 및 hIGF-1 변이체의 능력을 먼저 ELISA에 의해 인간 IGF-1R을 과발현하는 NIH3T3 세포 (NIH3T3-IGF-1R)에서 평가하였다. 이들 세포 내에서, IGF-1R 인산화는 모든 시험된 펩티드에 의해 농도-의존 방식으로 유도되었다. 평균한 ELISA 데이터의 로지스틱 곡선 피팅은 hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-Fc 및 hIGF1-Ea-Fc_mut_04/2_E의 효력 (EC_{50})이 hIGF-1에 비해 감소되었음을 보여준다 (도 2A-B). 그러나, 평균한 ELISA 데이터의 로지스틱 곡선 피팅은 모든 시험된 펩티드에 대해 매우 비슷한 최대 반응 값을 생성시켰다 (도 2C-D). 내인성 IGF-1R의 인산화를 자극하는 hIGF-1 변이체 및 hIGF-1의 능력을 일차 인간 근육모세포 및 시노몰구스 근육모세포에서 평가하였다. 이들 세포 내에서, IGF-1R 인산화는 모든 시험된 펩티드에 의해 농도-의존 방식으로 유도되었다 (도 4B-C). 평균한 ELISA 데이터의 로지스틱 곡선 피팅은 hIGF-1 변이체의 효력 (EC_{50})이 hIGF-1에 비해 감소되었음을 보여준다 (도 4A). 그러나, 평균한 ELISA 데이터의 로지스틱 곡선 피팅은 모든 시험된 펩티드에 대해 매우 비슷한 최대 반응 값을 생성시켰다 (도 4).

[0439] 실시예 5: 인슐린 수용체에 대한 특이성

[0440] IGF-1 변이체의 아미노산 변형이 수용체 특이성에 영향을 미치는지 여부를 시험하기 위해, InsR 인산화에 대한 IGF-1 변이체 펩티드의 효과를 ELISA에 의해 인간 InsR을 과발현하는 NIH3T3에서 분석하였다. 본 발명자들은 상이한 농도의 IGF-1 변이체, hIGF-1 및 인슐린을 사용하여 NIH3T3-InsR 세포 형질감염체를 시험하였다. 등몰 농도의 지시된 펩티드를 사용하였다. 이들 실험의 결과를 도 3/18에 제시한다. 변형은 대부분의 IGF-1 변이체의 수용체 특이성에 영향을 미치지 않았지만, 단, 수용체 특이성을 유지하고, 심지어 인슐린이 최대 반응을 낼 농도에서도 InsR 인산화의 약한 유도제인 것으로 나타난 G42S 돌연변이를 보유하는 변이체 (hIGF1-Ea-Fc_mut_02, hIGF1-Ea-Fc_mut_03, hIGF1-Ea-Fc_mut_04/2_E 및 hIGF1-Ea-Fc_mut_13/2_A)는 예외였다. 놀랍게도, hIGF1-Ea Fc_mut_13/2_A 및 hIGF1-Ea Fc_mut_04/2_E는 도 5B 및 D와 도 6에 제시된 바와 같이, 빠른 인슐린 수용체 결합에 의해 유도된 이펙터 기능에 대해 IGF-1보다 유의하게 덜 강력한 것으로 나타났다 (예를 들어, 분화된 지방세포에서 글루코스 흡수). 이와 반대로, hIGF1-Ea Fc_mut_13/2_A 및 hIGF1-Ea Fc_mut_04/2_E 및 hIGF-1은 IGF-1R-매개 기능, 예컨대 C2C12 근관에서 글루코스 흡수에 대해 동등한 효력을 보였다 (도 5A 및 C). G42S 돌연변이를 IGF-1 단백질 내로 (서열 117의 IGF-1 G42S 변이체를 생성함) 및 hIGF1-Ea-mut 03 단백질 내로 (서열 118의 hIGF1-Ea-mut 03-G42S 변이체를 생성함)에 도입하면 NIH3T3-InsR 세포에서 InsR 인산화를 감소시켰다 (도 18). 또한, 상기 돌연변이는 지방세포 및 C2C12 근관에서 글루코스 흡수에 각각 영향을 미친다 (도 19).

[0441] 실시예 6: 혈청 농도의 결정

[0442] 수컷 피셔(Fischer) 래트 (n=3)에서 단일 i.v. 및 s.c. 용량 투여 후 hIGF1-Ea-Fc-mut_13/2_A 및 hIGF1-Ea-Fc_mut_04/2_E의 혈청 농도를 hIGF-1Ea 3mut에 특이적인 ELISA에 의해 결정하였다 (상세한 내용에 대해서는 상기 A5를 참조한다). 이들 실험의 결과를 도 7-A 및 7-B에 제시한다. 최종 반감기는 각각 약 75.3 및 50.1시간이었다. 최대 농도는 각각 s.c. 용량 투여의 8 및 24시간 후 (Tmax) 도달하였다. 이와 반대로, hIGF-1 (1.0 mg/kg)의 정맥내 투여 이후, hIGF-1의 수준은 0-8시간의 범위에 걸쳐 정량가능하였다. Tmax (0.083 h)에 도달

한 후에, 펩티드의 혈청 농도의 급격한 저하가 관찰되었고, 여기서 겉보기 최종 반감기는 1.81 h이었다. hIGF-1 (1.0 mg/kg)의 피하 투여 이후, 혈청 수준은 투여 후 8 h까지 정량가능하였고, 최대 농도는 투여 후 0.5 h에 관찰되었다. 따라서, IGF-1 유사체는 인간 IGF-1에 비해 훨씬 개선된 약동학 프로파일을 보여준다.

[0443] 실시예 7: 덱사메타손-유도된 근육 위축에 대한 hIGF-1-Ea-Fc_mut_13/2_A의 효과

[0444] IGF-1은 골격근에서 단백질 합성을 자극하고 단백질 분해를 억제하는 것으로 나타났으므로, 본 발명자들은 덱사메타손 처리 래트에서 hIGF-1-Ea_Fc_mut_13/2_A의 투여가 근육 위축을 예방할 것이지 여부를 시험하였다. 수컷 위스타(Wistar) 래트에게 알제트 펌프를 통해 75 ㎍의 덱사메타손/kg/일을 단독으로 또는 비히클 (PBS) 또는 hIGF-1과 함께 연속 주입하였다. 상기 설명한 바와 같이 덱사메타손을 주입한 추가의 동물 군에 hIGF-1-Ea_Fc_mut_13/2_A를 격일 s.c. 주사하였다. 모든 동물을 28일 동안 처리한 후 희생시켰다. 체중을 실험 출발에 및 이어서 주사 후 제28일에 모니터링하였다.

[0445] 비히클 대조군에 비해 덱사메타손 처리 래트에서 체중 및 근육 중량에서 예상된 유의한 감소가 관찰되었다 (도 8). hIGF-1-Ea_Fc_mut_13/2_A의 주사는 체중 및 근육 중량의 감소를 유의하게 감소시켰다 (도 8).

[0446] 상기 기재된 hIGF-1-Ea 전구체 폴리펩티드 변이체에 추가로, 본 발명에 따라 다음의 추가의 단백질 변이체를 생산하고 사용할 수 있다:

[0447] 실시예 8

[0448] (2b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0449] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkna srgsagnknyrm (서열 32).

[0450] 실시예 9

[0451] (4b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0452] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkna srgsagnknyrm (서열 33).

[0453] 실시예 10

[0454] (5b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0455] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkna srgsagnknyrm (서열 34).

[0456] 실시예 11

[0457] (6b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0458] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkna srgsagnknyrm (서열 35).

[0459] 실시예 12

[0460] (8b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0461] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyrm (서열 36).

[0462] 실시예 13

[0463] (9b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실된다.

[0464] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqaapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqrhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyrm (서열 37).

[0465] 실시예 14

[0466] (13b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0467] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqrhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyrm (서열 38).

[0468] 실시예 15

[0469] (14b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0470] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyrm (서열 39).

[0471] 실시예 16

[0472] (15b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0473] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyqm (서열 40).

[0474] 실시예 17

[0475] (16b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0476] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavraqqhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyrm (서열 41).

[0477] 실시예 18

[0478] (17b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0479] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyrm (서열 42).

[0480] 실시예 19

[0481] (18b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0482] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyqm (서열 43).

[0483] 실시예 20

[0484] (19b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0485] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqrhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyrm (서열 44).

[0486] 실시예 21

[0487] (20b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0488] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyrm (서열 45).

[0489] 실시예 22

[0490] (21b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0491] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyqm (서열 46).

[0492] 실시예 23

[0493] (22b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0494] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqrhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyrm (서열 47).

[0495] 실시예 24

[0496] (23b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0497] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyrm (서열 48).

[0498] 실시예 25

[0499] (24b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0500] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyqm (서열 49).

[0501] 실시예 26

[0502] (25b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqrhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyrm (서열 50).

[0503]

[0504] 실시예 27

[0505] (26b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyrm (서열 51).

[0506]

[0507] 실시예 28

[0508] (27b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqaapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyrm (서열 52).

[0509]

[0510] 실시예 29

[0511] (28b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyqm (서열 53).

[0512]

[0513] 실시예 30

[0514] (29b) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqaapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaksavqaqqhtdmpktqkevhlkn asrgsagnknyqm (서열 54).

[0515]

[0516] 실시예 31

[0517] (2c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraqrhtdmpktqkevhlknasrg sagnknyrm (서열 55).

[0518]

[0519] 실시예 32

[0520] (4c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraqrhtdmpktqkevhlknasrg sagnknyrm (서열 56).

[0521]

[0522] 실시예 33

[0523] (5c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68,

S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraqrhtdmpktqkevhlknasrg sagnknyrm (서열 57).

[0524]

[0525] 실시예 34

[0526] (6c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraqrhtdmpktqkevhlknasrg sagnknyrm (서열 58).

[0527]

[0528] 실시예 35

[0529] (8c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpaqvraqrhtdmpktqkevhlknasr gsagnknyrm (서열 59).

[0530]

[0531] 실시예 36

[0532] (9c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqaapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavraqrhtdmpktqkevhlknasrg sagnknyrm (서열 60).

[0533]

[0534] 실시예 37

[0535] (13c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqrhtdmpktqkevhlknasrg sagnknyrm (서열 61).

[0536]

[0537] 실시예 38

[0538] (14c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasr gsagnknyrm (서열 62).

[0539]

[0540] 실시예 39

[0541] (15c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqrapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasr gsagnknyqm (서열 63).

[0542]

[0543] 실시예 40

[0544] (16c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산

K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqrhtdmpktqkevhlknasrg sagnknyrm (서열 64).

[0545]

[0546] 실시예 41

[0547] (17c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasr gsagnknyrm (서열 65).

[0548]

[0549] 실시예 42

[0550] (18c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 글루탐산 (E)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssreapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasr gsagnknyqm (서열 66).

[0551]

[0552] 실시예 43

[0553] (19c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqrhtdmpktqkevhlknasrg sagnknyrm (서열 67).

[0554]

[0555] 실시예 44

[0556] (20c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasr gsagnknyrm (서열 68).

[0557]

[0558] 실시예 45

[0559] (21c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 알라닌 (A)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssraapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasr gsagnknyqm (서열 69).

[0560]

[0561] 실시예 46

[0562] (22c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqrhtdmpktqkevhlknasrg sagnknyrm (서열 70).

[0563]

[0564] 실시예 47

[0565] (23c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0566] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasr gsagnknyrm (서열 71).

[0567] 실시예 48

[0568] (24c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R37이 프롤린 (P)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0569] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssrpapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasr gsagnknyqm (서열 72).

[0570] 실시예 49

[0571] (25c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0572] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqrhtdmpktqkevhlknasr gsagnknyrm (서열 73).

[0573] 실시예 50

[0574] (26c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0575] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasr gsagnknyrm (서열 74).

[0576] 실시예 51

[0577] (27c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74 및 R77이 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0578] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqaapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasr gsagnknyrm (서열 75).

[0579] 실시예 52

[0580] (28c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36 및 R37이 둘 다 글루타민 (Q)으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0581] tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqqapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasr gsagnknyqm (서열 76).

[0582] 실시예 53

[0583] (29c) G1, P2, E3이 결실되고, 아미노산 R36이 글루타민 (Q)으로 치환되고, R37이 알라닌으로 치환되고, G42가 세린으로 치환되고, 아미노산 K68, S69, A70, R71 및 S72가 결실되고, 아미노산 R74, R77 및 R104가 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

tlcgaelvdalqfvcgdrgfyfnkptgygsssqaapqtsivdeccfrscdlrrlemycaplkpavqaqqhtdmpktqkevhlknasr gsagnknyqm (서열 77).

[0584]

[0585] 실시예 54: CHO IGF-1 수용체 결핍 세포주에서 재조합 IGF-1의 발현.

[0586] CHO 세포주에서 재조합 IGF-1의 발현은 세포 성장 억제 및 낮은 역가를 야기하였다. 도 11에서, 생물반응기 공정 동안 hIGF-1Ea 3mut (서열 27)의 역가 측정치를 제시한다. hIGF-1Ea 3mut의 최대 역가 측정치는 8 μg/ml이고, 이것은 100 mg/L의 항체 역가 (몰 질량 기반)에 상응한다. 생물반응기 공정에서 재조합 항체의 평균 역가 측정치는 약 3 g/L이었다. IGF-1의 낮은 역가의 하나의 원인은 IGF-1 발현 세포의 감소된 세포 성장 및 낮은 세포 생존율이다. 항체 발현 공정 동안, CHO-K1 유래 세포는 2-2.5 x 10^7개 세포/ml까지 성장하고, 세포 생존율은 제1 230-260 h 배양 시간 동안 97% 초과였다. 이와 반대로, IGF-1을 발현하는 CHO-K1 유래 세포는 단지 0.5-0.9 x 10^7 개 세포/ml까지 성장하고, 세포 생존율은 이미 80 h 후에 97% 미만으로 하락하였다 (도 11 참조).

[0587] 감소된 세포 성장은 또한 비-형질감염된 CHO-K1 유래 세포와 IGF-1의 동시-배양 동안 검출될 수 있었다. 도 12는 모 CHO-K1 유래 세포가 2.5 x 10^7개 세포/ml까지 성장함을 보여준다. CHO-K1 유래 세포와 야생형 IGF-1 또는 hIGF-1Ea 3mut (50 mg/L)의 동시-배양 동안, 세포 성장이 또한 유의하게 억제되었다 (0.9 x 10^7개 세포/ml).

[0588] 다음 단계에서, 특이적 IGF-1R 티로신 키나제 억제제 NVPAEW541 (In vivo antitumor activity of NVPAEW541 - A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-1R kinase; Carlos Garcia-Echeverria et al.; Cancer Cell; Published Online February 26, 2004 DOI: 10.1016/S1535610804000510)을 CHO-DUXB11 유래 세포 내에서 IGF-1 동시-배양 실험 동안 첨가하였다. 세포 성장 억제는 방지될 수 있었다 (도 13 참조). 이것은 IGF-1-R이 세포 내로 신호를 촉발하여 세포 성장 억제를 일으키는 것을 확인한다.

[0589] 다음 단계에서, 아연 핑거 뉴클레아제 기술 (ZFN)을 이용하는 IGF-1R의 녹아웃을 CHO-K1 유래 세포 및 CHO-DUXB11 유래 세포주에서 수행하였다. IGF-1R의 엑손 3의 영역에 특이적 결합을 하는 ZFN을 설계하였다. 2개의 플라스미드 (이들은 각각 IGF-1R 특이적 ZFN의 하나의 하위단위에 대해 코딩함)를 CHO-K1 유래 세포 또는 CHO-DUXB11 유래 세포 내에서 동시-형질감염시켰다. 각각의 ZFN 하위단위는 특이적 18개 염기쌍 긴 서열에 결합하고; 따라서 전체 36 bp 서열이 특이적으로 인지된다 (게놈의 다른 위치에서 무작위 절단을 회피함). FokI의 엔도뉴클레아제 도메인은 DNA를 절단하기 위해 이종이량체로서만 기능을 하도록 재조작된다. ZFN 이량체는 IGF-1R의 엑손 3에서 표적화된 이중 가닥 절단부를 생성한다. 비상동성 단부 연결의 오류 유발 세포성 과정을 통해, 상기 이중 가닥 절단부는 DNA 서열의 변형을 일으키고, 따라서 표적화된 유전자의 기능적 녹아웃을 생성할 수 있다. CHO-K1 유래 세포에 대해, 3개의 녹아웃 클론이 생성되었다 (두 대립유전자에서 녹아웃 및 프레임시프트 돌연변이): 클론 1: Δ2 (서열 99), 클론 2: Δ5 (서열 100) 및 클론 3: Δ2 (서열 101), 클론 1: +18 (및 14 bp 치환) (서열 103), 클론 2: Δ22 (서열 102) 및 클론 3: Δ114 (서열 104).

[0590] CHO-DUXB11 유래 세포주는 CHO-K1 유래 세포와 반대로, IGF-1R의 녹아웃을 어렵게 만드는 폴리클로날 및 배수성이다 (2개 초과의 IGF-1R 카피/게놈이 녹아웃되어야 한다). 본 발명자들은 프레임 시프트 돌연변이를 갖는 몇몇 독특한 녹아웃 클론을 생성하였고, TOPO 클로닝 및 서열분석으로 이들 중 2개를 확인하였다. 클론 12: Δ7 (50%) (서열 106)/Δ22 (50%) (서열 105), 클론 19: Δ7 (14.5%)/Δ16 (44%)/Δ22 (18%)/Δ22mut (15%). 괄호 안의 백분율은 32개의 서열 결정된 박테리아 콜로니 중에서 상기 돌연변이가 발생하는 빈도에 기반한 것이다. 클론 19에 대해, 6개의 IGF-1R 대립유전자가 존재하는 것으로 가정할 수 있다 (3 x Δ16, 1 x Δ7, 1 x Δ22, 1 x Δ22mut). 3개의 생성된 CHO-K1 유래 세포 IGF-1R KO 클론을 IGF-1과 동시-배양하였고, 세포 성장 억제는 검출할 수 없었다 (도 14 참조).

[0591] 2개의 생성된 IGF-1R KO CHO-DUXB11 유래 클론을 또한 IGF-1의 존재/부재 하에 배양하였다. CHO-K1 IGF-1R KO 클론과 유사하게, 야생형 CHO-DUXB11 유래 세포에 비해 KO 클론에 대해 개선된 세포 성장을 검출할 수 있었다 (도 15 참조). KO 클론 중 하나는 IGF-1의 존재 하에 세포 성장 억제를 보이지 않았고, 다른 KO 클론은 IGF-1의 존재 하에, IGF-1 동시-배양을 하지 않은 CHO-DUXB11 유래 세포와 유사한 최대 생존 세포 계수를 가졌다.

[0592] 벡터 pBW806 (hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A)의 클로닝 전략.

[0593] hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A를 코딩하는 벡터 pBW806을 2개 연속 클로닝 단계에 따라 제조하였다. 제1 단계에서, 플라스미드 11AARNSC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (노파르티스 소유 벡터)를 XbaI 및 AscI로 소화시켜, 드

노보 합성된 Fc 영역을 추출하였다. 병행하여, pBW679 (노파르티스 소유 벡터)를 AscI 및 XbaI로 소화시켜, 전사 및 번역 조절 요소와 G418/DHFR 선택/증폭 마커를 보유하는 상응하는 골격 단편을 생성하였다. 두 소화된 요소들을 적합성 단부에 의해 라이게이션하여, 중간체 벡터 pBW805를 생성하였다. 제2 단계에서, 플라스미드 11AARNUC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A_pMA-T (노파르티스 소유 벡터)를 XbaI 및 Sse232I로 소화시켜, hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A 융합 단백질의 n-말단 영역을 추출하였다. 병행하여, 중간체 벡터 pBW805를 후속적으로 Sse232I 및 XbaI로 소화시켜, 목적하는 골격 분획을 전달하고, 이를 최종적으로 11AARNUC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A_pMA-T 단편과 라이게이션시켜, 최종 발현 벡터 pBW806을 생성하였다.

[0594] 벡터 pBW807 (hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C)의 클로닝 전략.

[0595] hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C를 코딩하는 벡터 pBW807을 2개 연속 클로닝 단계에 따라 제조하였다. 제1 단계에서, 플라스미드 11AARNSC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (노파르티스 소유 벡터)를 XbaI 및 AscI로 소화시켜, 드 노보 합성된 Fc 영역을 추출하였다. 병행하여, pBW679 (노파르티스 소유 벡터)를 AscI 및 XbaI로 소화시켜, 전사 및 번역 조절 요소와 G418/DHFR 선택/증폭 마커를 보유하는 상응하는 골격 단편을 생성하였다. 두 소화된 요소들을 적합성 단부에 의해 라이게이션하여, 중간체 벡터 pBW805를 생성하였다. 제2 단계에서, 플라스미드 11AARNWC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C_pMA-T (노파르티스 소유 벡터)를 XbaI 및 Sse232I로 소화시켜, hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C 융합 단백질의 n-말단 영역을 추출하였다. 병행하여, 중간체 벡터 pBW805를 후속적으로 Sse232I 및 XbaI로 소화시켜, 목적하는 골격 분획을 전달하고, 이를 최종적으로 11AARNUC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_C_pMA-T (노파르티스 소유 벡터) 단편과 라이게이션시켜, 최종 발현 벡터 pBW807을 생성하였다.

[0596] 벡터 pBW808 (hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F)의 클로닝 전략.

[0597] hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F를 코딩하는 벡터 pBW808 (노파르티스 소유 벡터)를 2개 연속 클로닝 단계에 따라 제조하였다. 제1 단계에서, 플라스미드 11AARNSC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (노파르티스 소유 벡터)를 XbaI 및 AscI로 소화시켜, 드 노보 합성된 Fc 영역을 추출하였다. 병행하여, pBW679 (노파르티스 소유 벡터)를 AscI 및 XbaI로 소화시켜, 전사 및 번역 조절 요소와 G418/DHFR 선택/증폭 마커를 보유하는 상응하는 골격 단편을 생성하였다. 두 소화된 요소들을 적합성 단부에 의해 라이게이션하여, 중간체 벡터 pBW805를 생성하였다. 제2 단계에서, 플라스미드 11AARNYC_hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F_pMA-T (노파르티스 소유 벡터)를 XbaI 및 Sse232I로 소화시켜, hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_Fc 융합 단백질의 n-말단 영역을 추출하였다. 병행하여, 중간체 벡터 pBW805를 후속적으로 Sse232I 및 XbaI로 소화시켜, 목적하는 골격 분획을 전달하고, 이를 최종적으로 11AARNUC_hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F_pMA-T (노파르티스 소유 벡터) 단편과 라이게이션시켜, 최종 발현 벡터 pBW808을 생성하였다.

[0598] 벡터 pBW809 (hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E)의 클로닝 전략.

[0599] HIGF1-EA-FC_MUT 04/2_E Fc 융합 서열을 코딩하는 벡터 pBW809를 2개 연속 클로닝 단계에 따라 제조하였다. 제1 단계에서, 플라스미드 11AARNSC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (노파르티스 소유 벡터)를 XbaI 및 AscI로 소화시켜, 드 노보 합성된 Fc 영역을 추출하였다. 병행하여, pBW679 (노파르티스 소유 벡터)를 AscI 및 XbaI로 소화시켜, 전사 및 번역 조절 요소와 G418/DHFR 선택/증폭 마커를 보유하는 상응하는 골격 단편을 생성하였다. 두 소화된 요소들을 적합성 단부에 의해 라이게이션하여, 중간체 벡터 pBW805를 생성하였다. 제2 단계에서, 플라스미드 11AARN2C_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E_pMA-T (노파르티스 소유 벡터)를 XbaI 및 Sse232I로 소화시켜, hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E 융합 단백질의 n-말단 영역을 추출하였다. 병행하여, 중간체 벡터 pBW805를 후속적으로 Sse232I 및 XbaI로 소화시켜, 목적하는 골격 분획을 전달하고, 이를 최종적으로 11AARNUC_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E_pMA-T (노파르티스 소유 벡터) 단편과 라이게이션시켜, 최종 발현 벡터 pBW809를 생성하였다.

[0600] 벡터 pBW810 (hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A)의 클로닝 전략.

[0601] hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A를 코딩하는 벡터 pBW810을 2개 연속 클로닝 단계에 따라 제조하였다. 제1 단계에서, 플라스미드 11AARNSC_hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_E_pMA-T (노파르티스 소유 벡터)를 XbaI 및 AscI로 소화시켜, 드 노보 합성된 Fc 영역을 추출하였다. 병행하여, pBW679 (노파르티스 소유 벡터)를 AscI 및 XbaI로 소화시켜, 전사 및 번역 조절 요소와 G418/DHFR 선택/증폭 마커를 보유하는 상응하는 골격 단편을 생성하였다. 두 소화된 요소들을 적합성 단부에 의해 라이게이션하여, 중간체 벡터 pBW805를 생성하였다. 제2 단계에서, 플라스미드 11AARN2C_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A_pMA-T (노파르티스 소유 벡터)를 XbaI 및 Sse232I로 소화시켜, hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A 융합 단백질의 n-말단 영역을 추출하였다. 병행하여, 중간체 벡터 pBW805를 후속적으로 Sse232I 및 XbaI로 소화시켜, 목적하는 골격 분획을 전달하고, 이를 최종적으로 11AARNUC_hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_A_pMA-T (노파르티스 소유 벡터) 단편과 라이게이션시켜, 최종 발현 벡터 pBW810을 생성하였다.

[0602] 벡터 pBW410 (hIGF-1Ea 3mut)의 클로닝 전략.

[0603] hIGF-1Ea 3mut 서열을 코딩하는 벡터 0610900pGA4 (노파르티스 소유 벡터)를 XbaI 및 MluI로 소화시켜, 드 노보 합성된 코딩 IGF 서열을 추출하였다. 병행하여, pBW165 (노파르티스 소유 벡터)를 MluI 및 XbaI로 소화시켜, 전사 및 번역 조절 요소와 G418/DHFR 선택/증폭 마커를 보유하는 상응하는 골격 단편을 생성하였다. 두 소화된 요소들을 적합성 단부에 의해 라이게이션하여, 최종 발현 벡터 pBW410을 생성하였다.

[0604] 벡터 pBW664 (hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc 도메인)의 클로닝 전략.

[0605] hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc 도메인 서열을 코딩하는 벡터 0905915 (노파르티스 소유 벡터)를 XbaI 및 AscI로 소화시켜, 드 노보 합성된 코딩 IGF 서열을 추출하였다. 병행하여, pBW596 (노파르티스 소유 벡터)을 AscI 및 XbaI로 소화시켜, 전사 및 번역 조절 요소와 G418/DHFR 선택/증폭 마커를 보유하는 상응하는 골격 단편을 생성하였다. 두 소화된 요소들을 적합성 단부에 의해 라이게이션하여, 최종 발현 벡터 pBW664를 생성하였다.

[0606] 벡터 pBW666 (hIGF1-Ea-Δ1-3, R37A, Δ71-72, R77Q-fc 도메인)의 클로닝 전략.

[0607] hIGF1-Ea-Δ1-3, R37A, Δ71-72, R77Q-fc 도메인 서열을 코딩하는 벡터 0950919 (노파르티스 소유 벡터)를 XbaI 및 AscI로 소화시켜, 드 노보 합성된 코딩 IGF 서열을 추출하였다. 병행하여, pBW596 (노파르티스 소유 벡터)을 AscI 및 XbaI로 소화시켜, 전사 및 번역 조절 요소와 G418/DHFR 선택/증폭 마커를 보유하는 상응하는 골격 단편을 생성하였다. 두 소화된 요소들을 적합성 단부에 의해 라이게이션하여, 최종 발현 벡터 pBW666을 생성하였다.

[0608] Δ5/Δ22 CHO-K1 유래 세포 IGF-1R KO 클론 및 Δ7/Δ22 CHO-DUXB11 세포 유래 IGF-1R KO 클론을 5개의 상이한 IGF-1-FC 융합 후보로 형질감염시켰다 (도 15 참조). 재조합 IGF-1-FC 단백질의 5-17배 역가 증가가, 상이한 IGF-1-FC 융합 후보로 형질감염된 야생형 CHO-K1 유래 세포/CHO-DUXB11 세포 유래 세포주에 비해 풀 수준에서 검출될 수 있었다.

[0609] CHO-K1 유래 세포 IGF1R-KO 또는 CHO-DUXB11 유래 IGF1R-KO 세포주에서 발현된 IGF-1-FC 융합 후보 중 2개 (hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A 및 hIGF1-Ea-fc_mut 04/2_E)를 100 L 웨이브 생물반응기에서 배양하였다 (유가식 공정 및 온도 이동). hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A/4를 발현하는 CHO-K1 유래 세포 IGF1RKO 풀은 3 x 10^7개 세포/ml의 최대 생존 세포 밀도까지 성장하였고, 이것은 평균 AB 공정보다 더 높다 (평균 세포 밀도는 2.2 x 10^7개 세포/ml이다). IGF-1을 발현하는 CHO-K1 유래 야생형 세포에 비해, 이것은 생존 세포 수의 3-6배 증가이다 (도 11 참조). hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A/4를 발현하는 CHO-DUXB11 유래 IGF1RKO 세포는 1.5-2 x 10^7개 세포/ml의 최대 세포 밀도까지 성장하였고, 이것은 야생형 CHO-DUXB11 유래 세포주에 비해 더 큰 최대 세포 밀도이다.

[0610] hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A를 발현하는 CHO-DUXB11 유래 IGF1R KO 세포를 단일 세포 분류하였고, 24 웰 및 50 ml 배치 배양물 내에서 배치 역가를 결정하였다. 도 15에서, CHO-DUXB11 유래 IGF-1R KO 클론 중에서 30개의 최상의 hIGF1-Ea-fc_mut 13/2_A 클론, 및 야생형 CHO-DUXB11 유래 클론을 발현하는 30개의 최상의 hIGF-1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc 도메인의 24 웰 역가를 제시하고; 도 16에서 각각의 군으로부터 15개의 최상의 클론의 진탕 플라스크를 제시한다. 종합하면, CHO-DUXB11 세포 유래 IGF-1R KO 클론은 8배 더 높은 24 웰 역가 및 7배 더 높은 진탕 플라스크 역가를 가졌다.

[0611] 실시예 55: 생물반응기 내에서 IGF-1을 발현하는 형질전환된 CHO 세포의 배양.

[0612] 생물반응기 내에서 IGF-1을 발현하는 형질전환된 세포의 배양을 위해, 유가식 공정을 적용하였다. 공급 개시 및 온도 이동과 같은 공정 이벤트는 세포 성장을 지지하고, 생존율을 유지함으로써 생산기를 연장하도록 시기를 맞추었다 (Niraj Kumar, Patrick Gammell, Martin Clynes (2007) Proliferation control strategies to improve productivity and survival during CHO based production culture; Cytotechnology (2007) 53:33-46).

[0613] 실시예 56: CHO 세포로부터 IGF-1의 수거

[0614] 수거 절차로서, 심층 여과에 이어 멸균 여과를 이용하는 표준 세포 분리 기술을 적용하였다. CHO 세포를 통상의 기술자에게 공지된 표준 방법에 따라 배양하고 수거하였다 (예를 들어 [Curr. Protoc. Protein Sci. 2001 May; Chapter 5: Unit 5.10. Production of recombinant proteins in mammalian cells. Chen S, Gray D, Ma J, Subramanian S; (Mahesh Prashada, Klaus Tarrach (2006) Depth filtration: Cell clarification of

bioreactor offloads, Filtration & Separation Volume 43, Issue 7, September 2006, Pages 28-30]).

[0615] 실시예 57: IGF-1R의 엑손 3에 특이적인 ZFN의 설계/생산 및 사용:

[0616] IGF-1R의 엑손 3 및 측면 인트론을 본 발명자들의 CHO 세포주에서 서열분석하였다 (서열 110/111). 먼저, 엑손 3을, IGF-1R 유전자의 마우스 서열 및 엑손 3을 포함하는 IGF-1R cDNA의 부분을 포괄하는 햄스터 DNA 콘티그를 사용하여 서열분석하였다. PCR 프라이머를 보존된 부분 상에 설계하고, 생성되는 PCR 산물을 서열분석하였다. 얻어진 엑손 3 서열을 시그마에 제공하여 엑손 3 측면 인트론을 서열분석하고, IGF-1R 엑손 3을 표적으로 하는 2개의 조작된 ZFN을 설계하도록 하였다. 각각의 ZFN은 역방향 (5' 상의) 및 정방향 (3' 상의) DNA 가닥 상의 18개 뉴클레오티드를 표적화하고 결합한다. 2개의 결합 부위는 절단 부위의 5개의 뉴클레오티드 (서열 107)에 의해 분리된다. 제품 설명 및 방법은 시그마에서 문서 '74188 CompoZr Custom ZFN Tech Bulletin'로 이용가능하다. 시그마에서는 또한 gDNA에서 IGF-1R 엑손 3을 증폭하여, 501 bp PCR 산물을 생성하기 위해, 둘러싸는 인트론 서열 내에 정방향 및 역방향 PCR 프라이머 (서열 108 및 109)를 설계하였다. 시그마에서는 각각 역방향 (pZFN1) 및 정방향 (pZFN2) 가닥-인지 조작된 ZFN을 코딩하는, 20-25 ㎍의 2개의 DNA 벡터를 포함하는 키트 CompoZrTM (주문형 아연 핑거 뉴클레아제, 제품 번호 CSTZFN-1KT, 로트 번호 08021019MN)를 제공하였다.

[0617] 이. 콜라이(*E. Coli*)를 두 벡터로 - 잘 공지된 형질전환 프로토콜에 따라 - 형질전환시키고, 25 ㎍/ml 카나마이신 함유 아가로스 플레이트 상에 스프레딩하였다. 각각의 벡터에 대해, 4 박테리아 콜로니를 집어서 확장시켰다. 각각의 pZFN의 4개의 정제된 DNA 플라스미드 샘플의 ZFN 서열은 T7 정방향 및 BHG 역방향 프라이머를 사용하여 확인하였고 모았다. 환상 pZFN1 및 pZFN2 벡터의 6 ㎍ 또는 10 ㎍의 균질 혼합물을 각각의 용량에 대해 3회 CHO-K1 유래 세포 및 CHO-DUXB11 유래 모 세포 내에 형질감염시켜, 각각의 세포주를 사용하여 6개의 풀을 생성시켰다 (+ 형질감염의 음성 대조군). 풀 내에서 ZFN의 절단 효율을 측정하기 위해, 시그마에서 제공된 신뢰되는 프로토콜에 설명된 바와 같이 서베이어(Surveyor) 돌연변이 검출 검정 (트랜스게노믹스(Transgenomics), 카탈로그 706025)을 형질감염 (제0일로서 계수함) 후 제3일 및 제10일에 사용하였다. 풀의 게놈 DNA를 젠엘루트(GenElute) 포유동물 게놈 DNA 미니프렙(Miniprep) 키트 (시그마, 카탈로그 G1N70-1KT)를 사용하여 단리하였고, 엑손 3을 측면 인트론 서열 내에 놓인 IGF-1R의 정방향 및 역방향 서열분석 프라이머를 사용하여 PCR 반응으로 증폭하였다. 이어서, PCR 산물을 고온 하에 변성시켰다. 온도를 점차 저하시킬 때, 몇몇 야생형 및 돌연변이된 산물이 혼성화하여 절단 부위 주위이 미스매치를 갖는 이중 가닥 DNA를 형성하였고, 이를 서베이어®로 불리는 효소에 의해 절단하였다. 최종 산물을 lab901로 불리는 겔 전기영동 시스템을 이용하여 분석하였다. 모든 6개의 형질감염된 풀에 대해, 501 bp 완전 매치 PCR 산물에 추가로, 약 277 bp 및 224 bp의 2개의 보다 작은 밴드가 검출되었고, 이것은 절단 부위의 양 측면 상의 단편에 상응하고, 따라서 본 발명자들의 세포 내에서 ZFN 활성을 입증한다. 형질감염 7일 후에, 풀을 10 x 96 웰 플레이트에서 단일 세포 클로닝하였다.

[0618] pZFN-형질감염된 CHO-K1 유래 세포주에서, 507개 클론을 96-웰 플레이트 내에서 성장시키고, 상기 기재된 서베이어 돌연변이 검출 검정을 이용하여 돌연변이에 대해 평가하였다 (클론의 게놈 DNA를 96-웰 플레이트 내에서 엑스트랙트-엔-앰프(Extract-N-Amp) 혈액 PCR 키트 (시그마, 카탈로그 XNAB2)를 사용하여 추출하였다). 42개 클론이 양성이었고 (2개의 보다 작은 밴드가 검출됨), 이것은 그들의 게놈이 적어도 하나의 엑손 3의 돌연변이된 카피를 함유하는 것을 의미하고, 그들의 PCR 증폭된 IGF-1R 엑손 3을 서열분석하였다. 가성-이배체 CHO-K1 유래 세포주로부터 생성된 클론에 대해 예상된 바와 같이, DNA 서열분석 크로마토그램은 최대치에서 동일한 강도의 2개의 오버레잉 신호를 보여주었고, 이것은 표적 서열의 2개의 카피를 나타낸다. 6개의 클론은 두 카피 모두에 돌연변이를 가졌고, 이들 중에서 3개의 클론은 두 카피에서 인근 중지 코돈 (서열 99 및 100), 또는 하나의 카피에서 인근 중지 코돈 및 다른 것에서 큰 결실 (서열 101)을 촉발하는 돌연변이를 가졌다. 이들 3개의 클론 내의 2개의 카피의 서열은 TOPO 클로닝 (TA 클로닝 키트, 인비트로젠, cat. K4575-40; 6개의 박테리아 콜로니를 집었다)에 의해 확인하였다. 모든 3개의 K.O. 클론은 모 세포보다 유의하게 더 높은 세포 밀도로 성장하였고, IGF-1 ('hIGF-1Ea 3mut' (서열 27))을 표준 배지 내에 50 mg/L로 스파이킹할 때, 표준 배지 내에서 모 세포와 유사한 밀도로 성장하였다 (도 8). 유전자형 Δ5/Δ22 (서열 100/102)를 갖는 클론을 인슐린 유사 성장 인자 1 단백질, 예를 들어 인간 IGF-1 (서열 1 또는 5) 또는 그의 변이체 (예를 들어 서열 8-14)을 사용한 형질감염을 위해 선택하였다.

[0619] pZFN-형질감염된 CHO-DUXB11 유래 세포주에서, 단지 117개 클론을 96-웰 플레이트에서 성장시키고, 서베이어 검정을 이용하여 돌연변이에 대해 평가하였다. 28개의 클론은 적어도 하나의 엑손 3의 돌연변이된 카피를 가졌지만 (2개의 보다 작은 밴드가 검출됨), 서열분석은 모든 클론이 여전히 야생형 카피를 가졌음을 나타내고; 야생형 서열은 서열분석 크로마토그램에서 돌연변이된 서열보다 더 높은 강도를 가졌다. CHO-DUXB11 유래 세포주는 돌연변이되고 폴리클로날이고; 핵형은 몇몇 세포 내에서 8개까지의 염색체의 카피를 보여주고, 이것은 예상된

유전자의 카피수 추정을 어렵게 만든다. 2개의 클론 (여기서 검출된 돌연변이된 서열 (Δ22 또는 Δ16)은 인근 중지 코돈을 촉발하였다)을 pZFN을 사용하는 제2 라운드의 형질감염을 위해 선택하였고; 10 ㎍의 혼합 pZFN을 사용하여 원래의 클론당 3개의 풀이 생성되었다. 형질감염 7일 후에, 풀을 6 x 96 웰 플레이트 내에서 FACS 클로닝하였다. 379개의 클론을 성장시켰고, 그로부터 211개를 IGF-1R 엑손 3에 대해 서열분석하였고 (이미 돌연변이된 서열로서 서베이어 검정은 더이상 가능하지 않았다), 겹치는 서열은 크로마토그램 상에서 시각적으로 분석하였다. 대부분의 서열분석된 클론은 야생형 및 예상된 돌연변이된 서열 (Δ22 또는 Δ16)과 이형접합성이고; ~20%의 클론은 야생형 및 2개의 돌연변이된 서열을 가졌고 (대부분 절단 부위 주위에 결실을 가졌다); 2개의 클론에서, 4개의 상이한 서열이 검출되었고 (TOPO 클로닝으로 확인되었지만, 서열 중 하나는 야생형 또는 단지 1개의 뉴클레오티드 삽입이었다); 2개의 클론은 K.O. 클론이었고, 둘 다 검출된 2개의 서열 (Δ16/Δ22 및 Δ16/Δ5)을 가졌지만, IGF-1의 존재 하에 이들의 성장은 모 CHO-DUXB11 유래 세포주보다 너무 적게 우수하였다. 따라서, 유전자형 Δ22/Δ7/야생형, Δ16/Δ7/야생형 및 Δ16/Δ22/야생형을 갖는 3개의 클론을 pZFN을 사용하는 제3 라운드의 형질감염을 위해 선택하였다 (그들의 서열은 TOPO 클로닝에 의해 확인되었고, 클론당 32개의 박테리아 콜로니를 집어서 서열분석하였다). 3개의 클론을 각각 8 ㎍ pZFN으로 2회 형질감염시켰다. 일단 각각의 클론으로부터 2개의 풀이 회수되면 (생존율 >91%, 7-9일 후), 이들을 모으고 50 mg/l IGF-1의 존재 하에 약 6-8주 동시-배양하였다 (보다 저항성 세포를 선택하기 위해). FACS 클로닝의 2일 전에, 이들을 IGF-1 없이 분리시켰다 (IGF-1-Cy5의 결합을 허용하고, 5% 더 적은 형광 세포를 선택하기 위해). 3개의 풀을 총 9 x 96 웰 플레이트에서 FACS 클로닝하였다.

[0620] 돌연변이된 클론의 효율적인 스크리닝을 허용하는, IGF-1R 엑손 3에서 야생형 절단 부위 서열에 결합하는 PCR 프라이머를 설계하였다. IGF-1R에 대한 정방향 서열분석 프라이머를 사용하여 PCR을 함께 수행하였고; PCR이 항상 작동하는 것으로 가정하면, 클론이 PCR 음성인 경우에, 야생형 서열이 없거나, 클론이 잘 성장하지 않았다 (너무 적은 DNA가 추출되어, 세포가 거의 성장하지 않았다). 이렇게 스크리닝된 389개의 성장한 클론으로부터, 58개는 음성이었고 서열분석하였다. 이들 클론 중 30개에서, 야생형 서열이 검출되지 않았고, 22개의 클론에 대해 돌연변이가 프레임 시프트되었다 (클론 Δ22/Δ7/야생형으로부터, 2개의 서열 Δ22/Δ7을 갖는 13개의 클론). 50 mg/l IGF-1의 존재 및 부재 하에 그들의 성장을 평가하였고, 서열 Δ22/Δ7을 갖는 (TOPO 클로닝에 의해 확인함), IGF-1의 존재 하에 최상의 성장하는 클론 (또한 IGF-1의 부재 하에 최상의 성장하는 클론 중에서)을 서열 8-14의 단백질을 코딩하는 DNA 구축물을 사용한 형질감염을 위해 선택하였다.

도면

도면1

K_D (nM)	hIGF1-Ea-Fc_mut_13/2_A	hIGF-1
IGF-1R	373	204

도면2i

A

리간드	EC_{50} nM ± SEM
hIGF-1	1.8 ± 0.1
hIGF1-Ea-Fc_mut_02	2.7*
hIGF1-Ea-Fc_mut_03	9.8**
hIGF1-Ea-Fc_mut_04	3.04*
hIGF1-Ea-Fc_mut_12	3.81*
hIGF1-Ea-Fc_mut_13	4.17*
hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-Fc	5.26 ± 0.7#

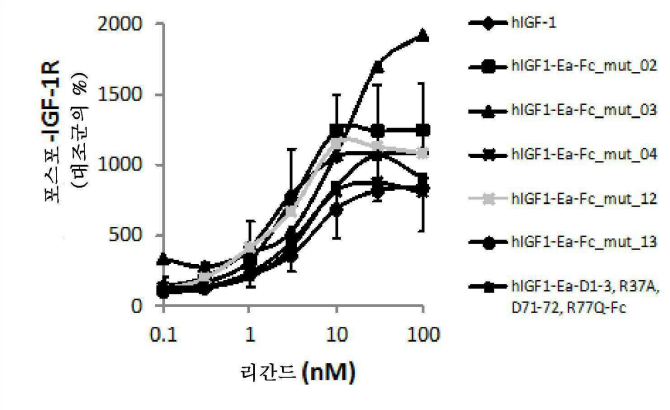
*n=2; **n=1; #P<0.0001 vs hIGF-1, t-검정

B

리간드	EC_{50} nM ± SEM
hIGF-1	1.8 ± 0.1
hIGF1-Ea-Fc_mut_04/2_E	7.4 ± 1.3#
hIGF1-Ea-Fc_mut_04_E	5.5*
hIGF1-Ea-Fc_mut_13/2_A	5.7*
hIGF1_Ea-Fc_mut_13_A	4.1*

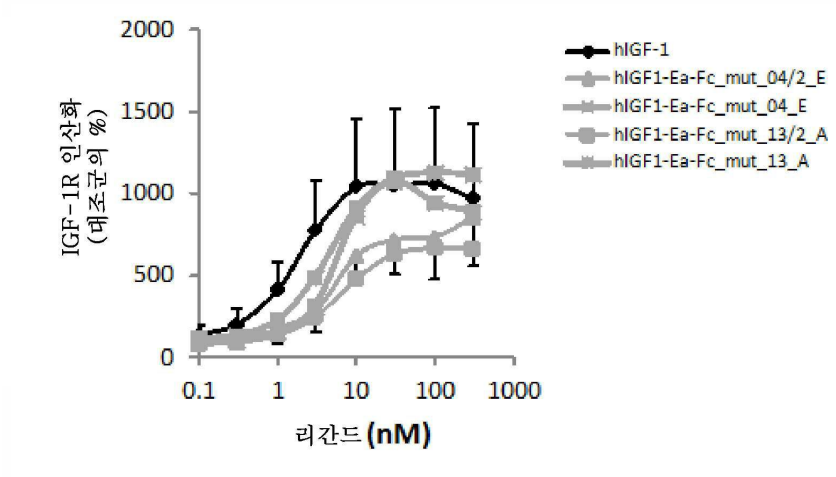
*n=2; #P<0.0001 vs hIGF-1, t-검정

C



도면2ii

D



도면3i

A

리간드	평균 최대 증가 배수 vs 대조군 ± SD
인슐린	20.8 ± 6.1
hIGF-1	3.9 ± 0.8#
hIGF1-Ea -Fc_mut_02	5.9 ± 1.1#;$
hIGF1-Ea -Fc_mut_03	8.6*
hIGF1-Ea -Fc_mut_04	12.5*
hIGF1-Ea -Fc_mut_12	21.9*
hIGF1-Ea -Fc_mut_13	15.2*
hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-Fc	18.8 ± 3.4

*n=2; #P<0.001 vs 인슐린; $$P$<0.05 vs GF-1

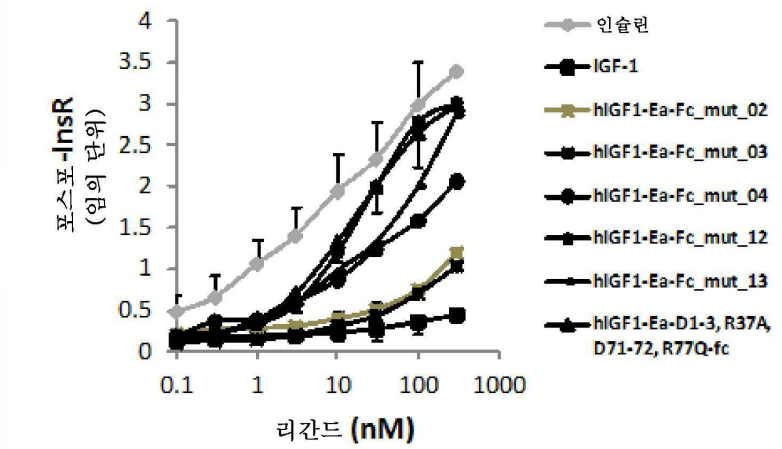
B

리간드	평균 최대 증가 배수 vs 대조군 ± SD
인슐린	20.8 ± 6.1
hIGF-1	3.9 ± 0.8#
hIGF1-Ea -Fc_mut_04/2_E	5.2*
hIGF1-Ea -Fc_mut_04_E	9.4*
hIGF1-Ea -Fc_mut_13/2_A	5.4*
hIGF1-Ea -Fc_mut_13_A	12.4*

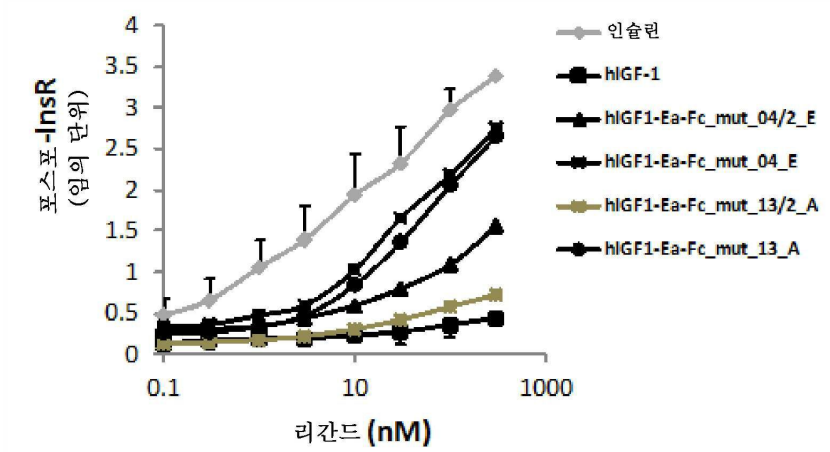
*n=2; ; #P<0.001 vs 인슐린

도면3ii

C


포스포-InsR
(임의 단위)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0.1
1
10
100
1000
리간드 (nM)
인슐린
IGF-1
hIGF1-Ea-Fc_mut_02
hIGF1-Ea-Fc_mut_03
hIGF1-Ea-Fc_mut_04
hIGF1-Ea-Fc_mut_12
hIGF1-Ea-Fc_mut_13
hIGF1-Ea-D1-3, R37A,
D71-72, R77Q-fc

D


포스포-InsR
(임의 단위)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0.1
10
1000
리간드 (nM)
인슐린
hIGF-1
hIGF1-Ea-Fc_mut_04/2_E
hIGF1-Ea-Fc_mut_04_E
hIGF1-Ea-Fc_mut_13/2_A
hIGF1-Ea-Fc_mut_13_A

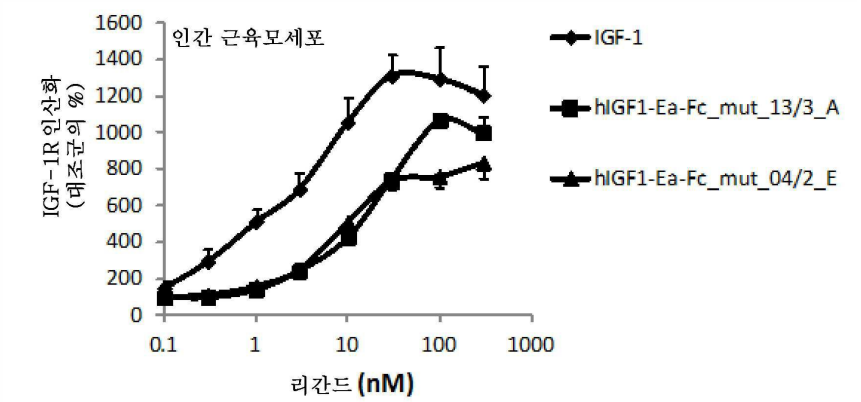
도면4

A

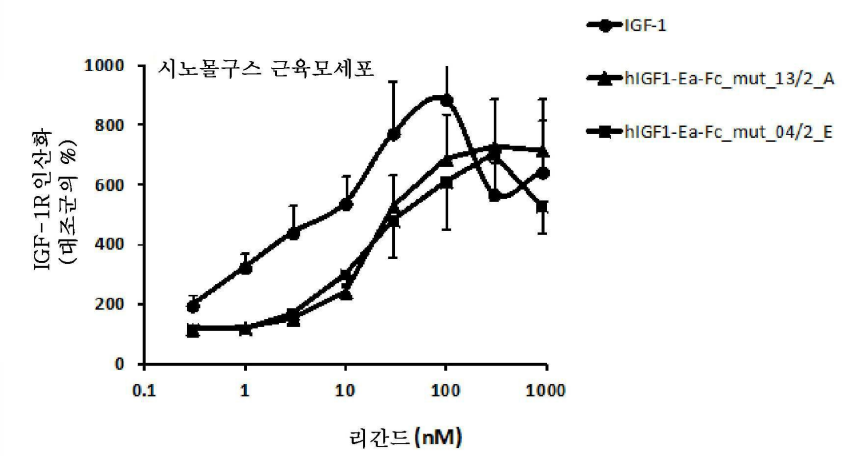
	인간 근육모세포		시노몰구스 근육모세포	
펩티드	EC_{50} (nM) ± SEM	Emax (대조군의 %) ± SEM	EC_{50} (nM) ± SEM	Emax (대조군의 %) ± SEM
hIGF-1	4.1 ± 1.4	1309 ± 119	5.1 ± 0.7	786 ± 182
hIGF1-Ea-Fc_mut_13/2_A	16.8 ± 3.1*	1069 ± 28	25.4 ± 4.0#	779 ± 145
hIGF1-Ea-Fc_mut_04/2_E	10.6 ± 2.4	834 ± 83*	23.8 ± 2.0#	724 ± 152

*P <0.05 vs hIGF-1로 처리한 인간 근육모세포. #P < 0.05 vs hIGF-1로 처리한 시노몰구스 근육모세포. ANOVA. 터키(Tukey) 검정

B



C



도면5

A

리간드	EC50 (nM) ± SD	대조군의 최대 증가 배수 ± SD
인슐린	11.5± 5.6**	1.37 ± 0.08
hIGF-1	1.3 ± 0.9	1.32 ± 0.06
hIGF1-Ea Fc_mut_13/2_A	4.3 ± 2.0	1.31 ± 0.11
hIGF1-Ea Fc_mut_04/2_E	3.7 ± 1.1	1.37 ± 0.10

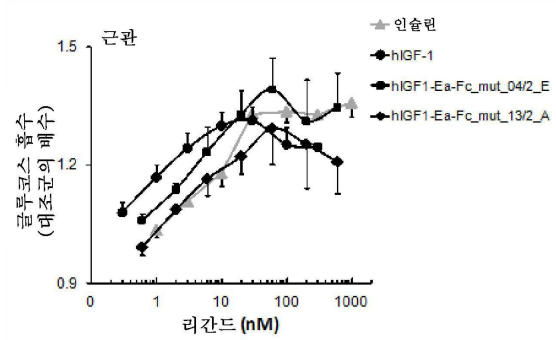
**P <0.001 vs IGF-1, ANOVA, 터키 검정

B

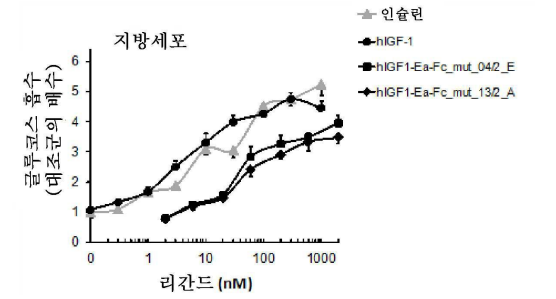
리간드	EC50 (nM) ± SD	대조군의 최대 증가 배수 ± SD
인슐린	9.1 ± 3.7	5.2 ± 1.00
hIGF-1	5.0 ± 1.4	4.6 ± 0.68
hIGF1-Ea Fc_mut_13/2_A	49.9 ± 4.6**;***	3.2 ± 0.25#
hIGF1-Ea Fc_mut_04/2_E	49.0 ± 28.4**;***	4.0 ± 0.47

# P <0.05 및**P <0.01 vs 인슐린 ; ***P <0.001 vs IGF-1 ANOVA, 터키 검정

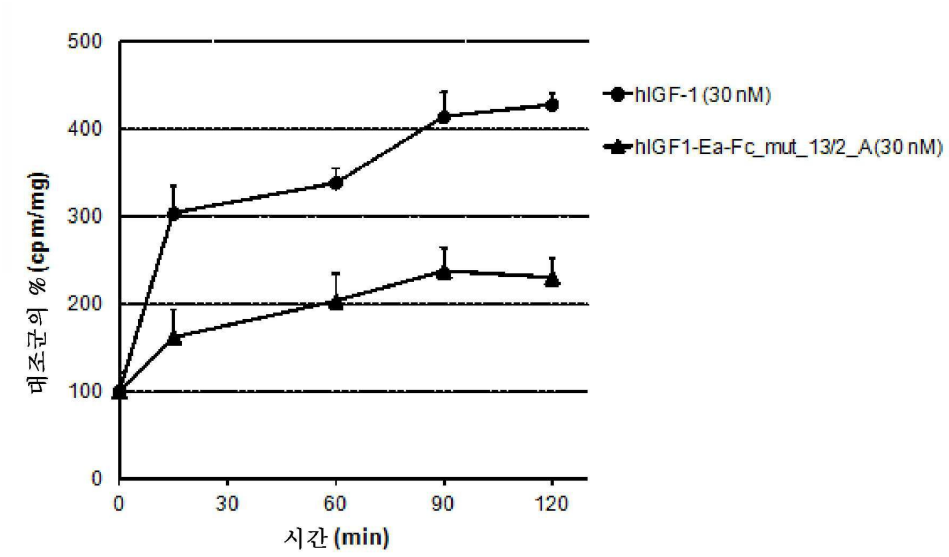
C



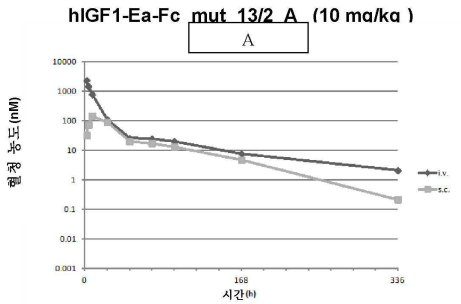
D



도면6

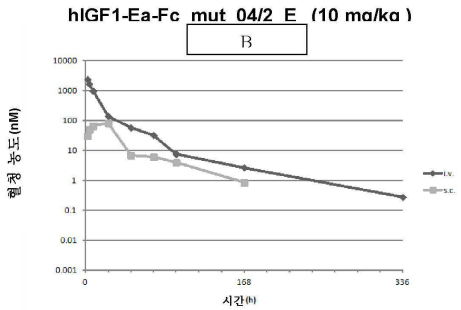


도면7



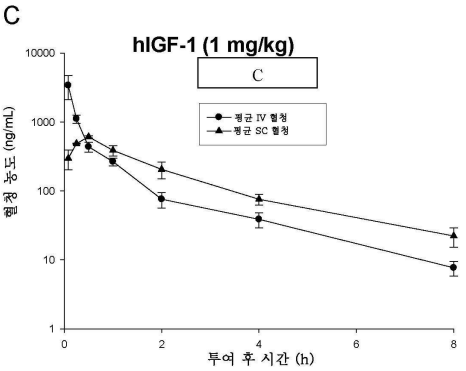
경로	Tmax (hr)	Cmax (nM)	반감기 (hr)
i.v	2	2300	75.3
s.c.	8	145	39.8

용량 및 경로당 3마리의 래트의 평균



경로	Tmax (hr)	Cmax (nM)	반감기 (hr)
i.v	2	2360	50.1
s.c.	24	81	33.7

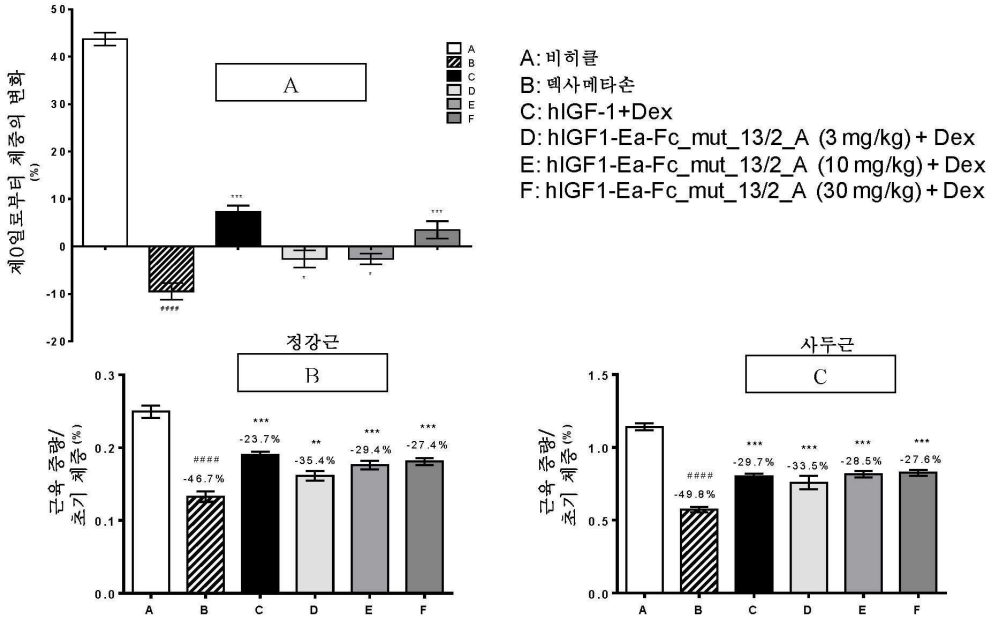
용량 및 경로당 3마리의 래트의 평균



경로	Tmax (hr)	반감기 (hr)
i.v	0.83	1.8
s.c.	0.5	1.9

용량 및 경로당 3마리의 래트의 평균

도면8

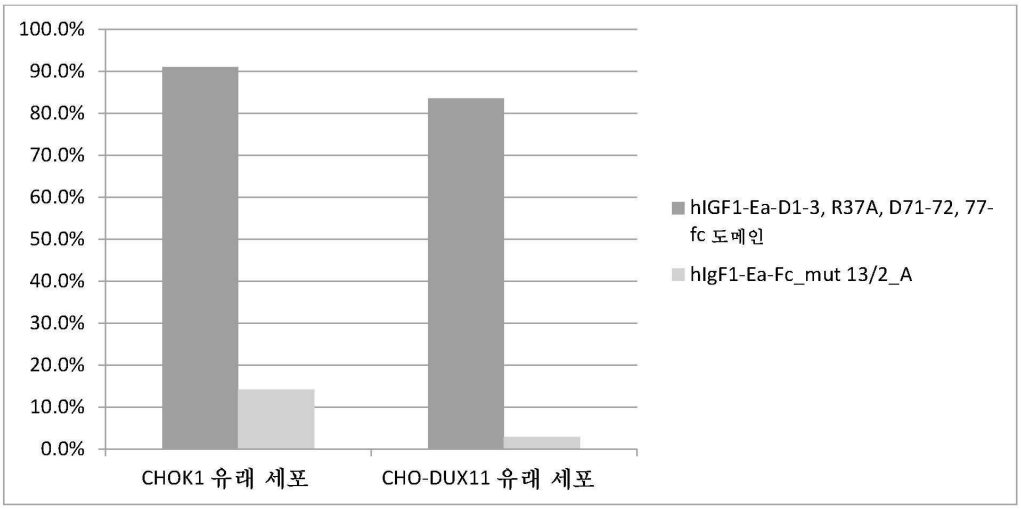


도면9

명칭	상청액 내 역가 (mg/l)	농도 (mg/ml)	응집물 (%)
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인 (서열 78)	33	0.88	37.0
hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A: 서열9	83.1	1.65	9.8
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42A, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인 (서열 79)	11.79	0.49	37.4
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인 (서열 80)	16.98	0.61	43.2
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42P, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인 (서열 81)	18.57	0.54	71.9
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42K, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인 (서열 82)	21.6	0.56	53.8
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42E, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인 (서열 83)	26.97	0.84	49.4
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42I, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인 (서열 84)	8.7	0.4	85.5
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Y, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인 (서열 85)	13.38	0.41	48.5
hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D42, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc 도메인 (서열 86)	78.6	1.96	21.0

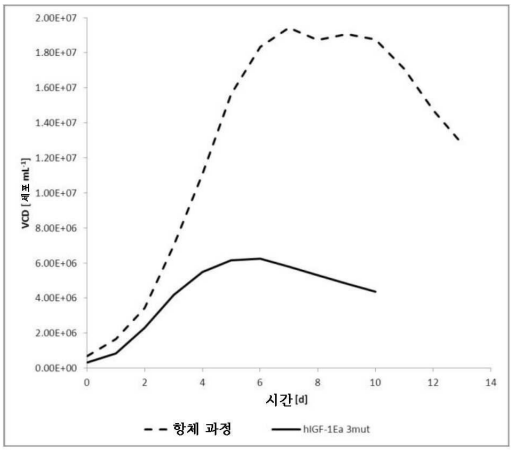
D: 결실; fc 도메인: hIgG1로부터의 Fc 부분

도면10

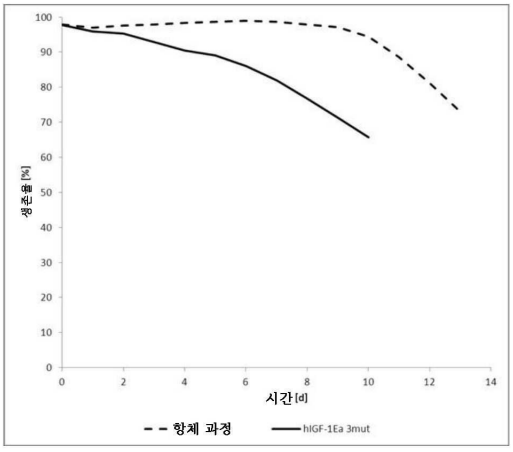

100.0%
90.0%
80.0%
70.0%
60.0%
50.0%
40.0%
30.0%
20.0%
10.0%
0.0%
CHOK1 유래 세포
CHO-DUX11 유래 세포
hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc 도메인
hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A

도면11

A)

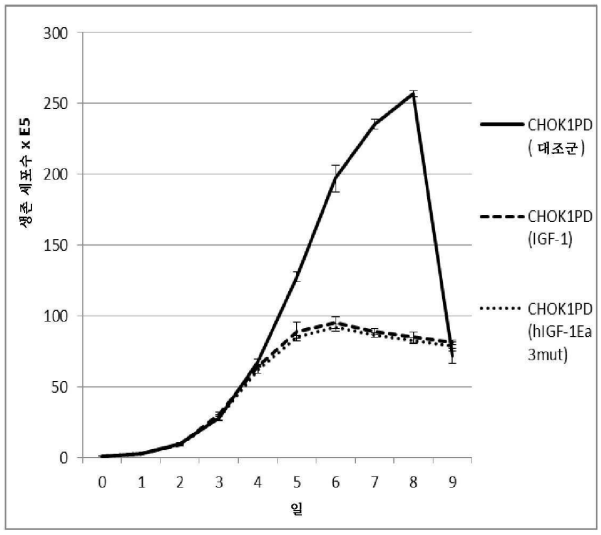

VCD [세포 mL-1]
시간 [d]
항체 과정
hIGF-1Ea 3mut

B)

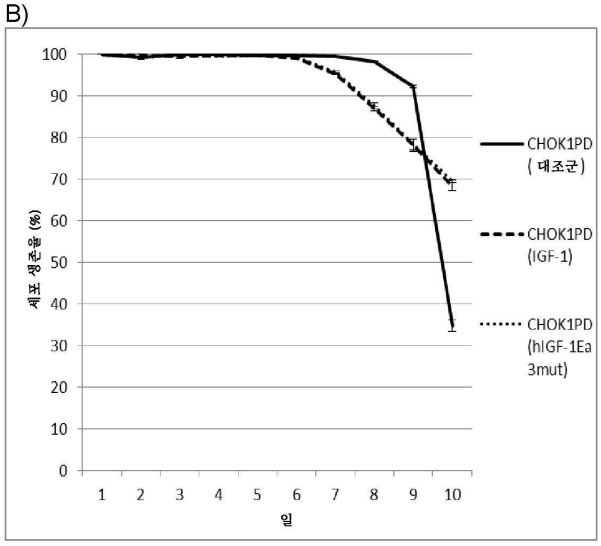

생존율 [%]
시간 [d]
항체 과정
hIGF-1Ea 3mut

도면12

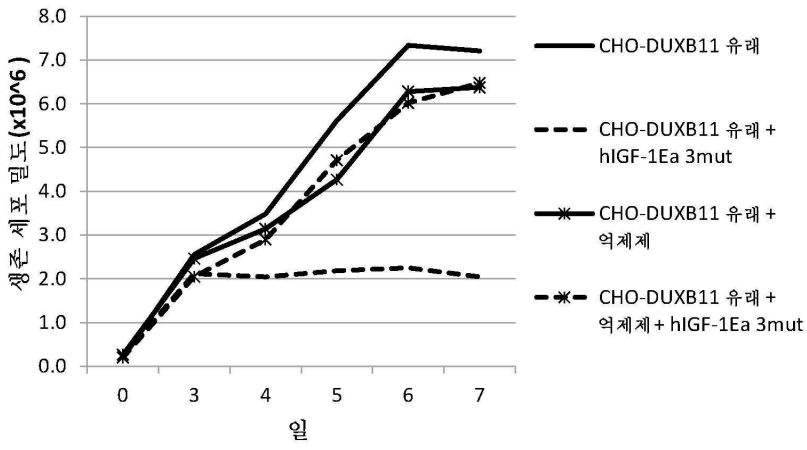
A)


300
250
200
150
100
50
0
생존 세포수 x E5
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
일
CHOK1PD (대조군)
CHOK1PD (IGF-1)
CHOK1PD (hIGF-1Ea 3mut)

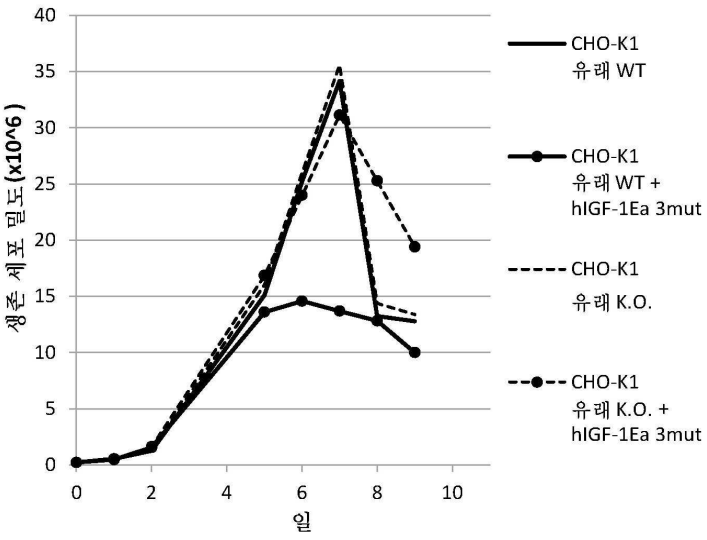
B)


100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
세포 생존율 (%)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
일
CHOK1PD (대조군)
CHOK1PD (IGF-1)
CHOK1PD (hIGF-1Ea 3mut)

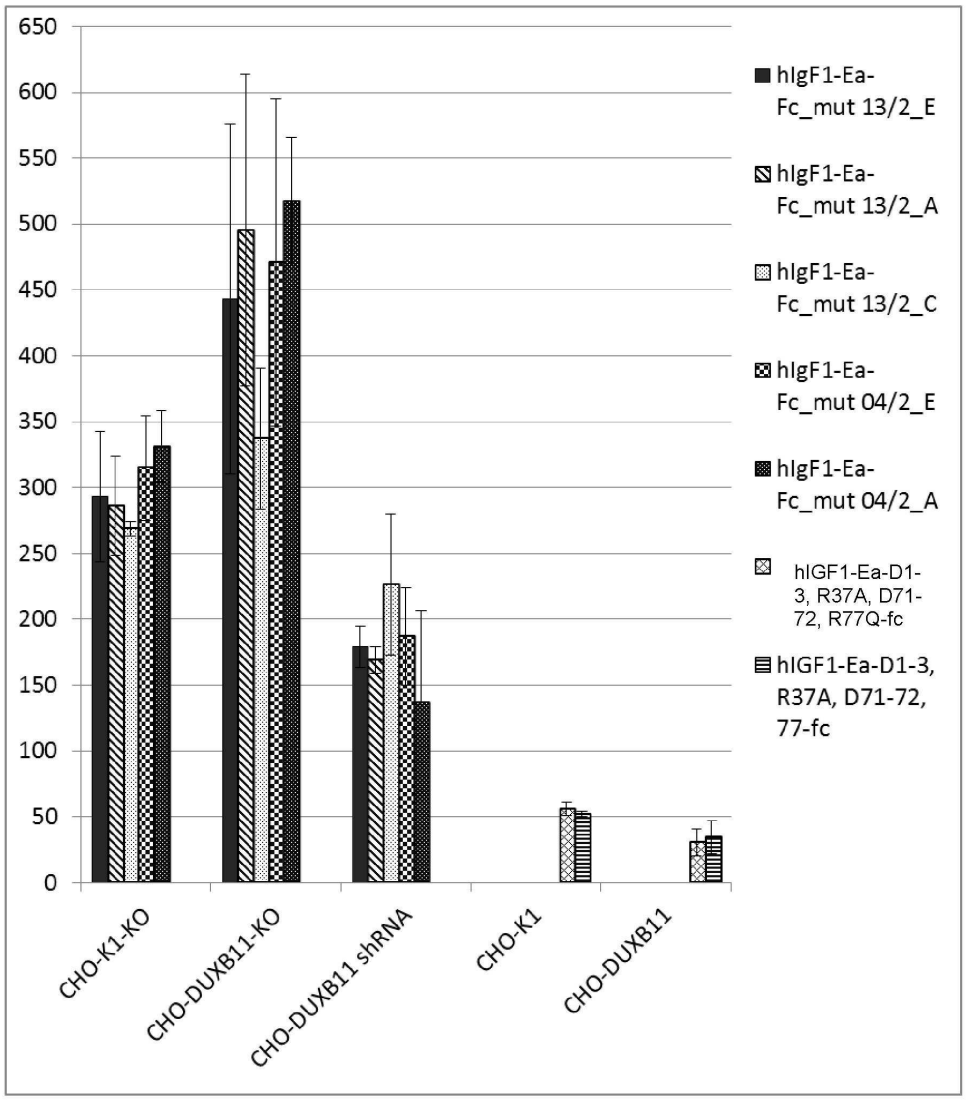
도면13


8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
생존 세포 밀도 (x10^6)
0 3 4 5 6 7
일
CHO-DUXB11 유래
CHO-DUXB11 유래 + hIGF-1Ea 3mut
CHO-DUXB11 유래 + 억제제
CHO-DUXB11 유래 + 억제제 + hIGF-1Ea 3mut

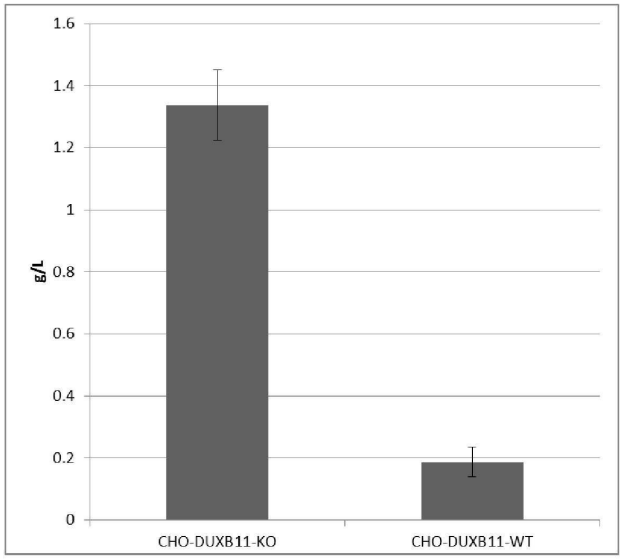
도면14


40
35
30
25
20
15
10
5
0
생존 세포 밀도(x10^6)
0
2
4
6
8
10
일
CHO-K1
유래 WT
CHO-K1
유래 WT +
hIGF-1Ea 3mut
CHO-K1
유래 K.O.
CHO-K1
유래 K.O. +
hIGF-1Ea 3mut

도면15


650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
CHO-K1-KO
CHO-DUXB11-KO
CHO-DUXB11 shRNA
CHO-K1
CHO-DUXB11
hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E
hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A
hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C
hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E
hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A
hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-fc
hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc

도면16



도면17

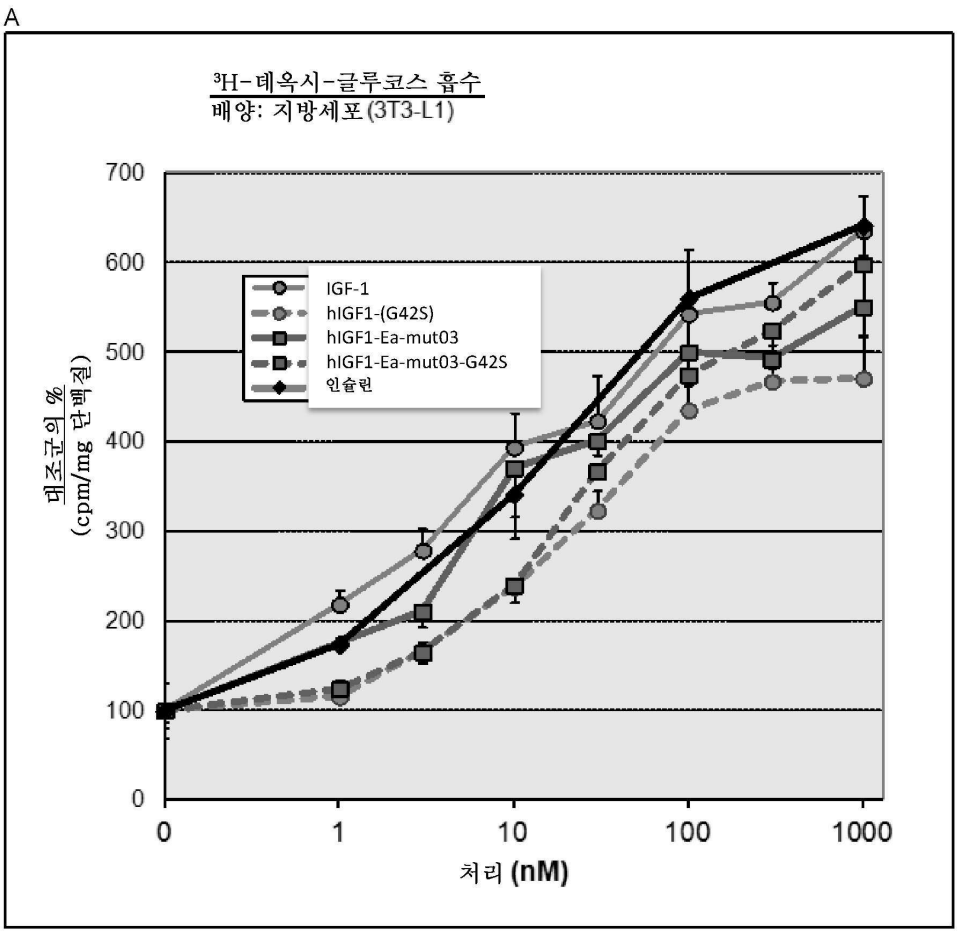
일반명	위치 42의 아미노산	수율 mg/L	응집 %	시험접종 후 전장 단백질 % (CHOK1 유래 세포)	시험접종 후 전장 단백질 % (CHO-DUXB11 유래 세포)
hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72, R74Q, R77Q, R104Q-fc (서열 113) (배치 1)	글리신	11.33	18.3	21.6% ± 13.4% (n=4)	27.06%
hIGF1-Ea-hFc_mut02 (서열 29)	세린	13.64	5.8	9.6% ± 13.9% (n=3)	N/A
hIGF1-Ea-hFc_mut03 (서열 114)	글리신	5.17	41.8	44.9% ± 12.1% (n=3)	N/A
hIGF1-Ea-hFc_mut04 (서열 30)	글리신	10.34	21.1	60.2% ± 12.2% (n=4)	73.6 %
hIGF1-Ea-hFc_mut12 (서열 116)	글리신	8.46	17.7	44.3% ± 15.1% (n=3)	67.9%
hIGF1-Ea-hFc_mut13 (서열 31)	글리신	10.18	24.0	64.2% ± 11.5% (n=4)	80.0%
hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E (서열 08)	세린	11.62	7.4	95.4% ± 4.4% (n=3)	97.3%± 3.4% (n=2)
hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A (서열 09)	세린	11.72	8.6	93.4%	95.3%
hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E (서열 12)	세린	11.51	7.3	95.0% ± 4.6% (n=3)	98.7%± 1.9% (n=2)

도면18

리간드	평균 최대 증가 배수 vs 대조군 ± SD
인슐린	21.0 ± 6.9
IGF-1	3.7 ± 0.8
IGF-1 G42S	3.3 ± 1.1
hIGF1-Ea-mut 03	5.6 ± 2.0
hIGF1-Ea-mut 03-G42S	2.2 ± 0.5*

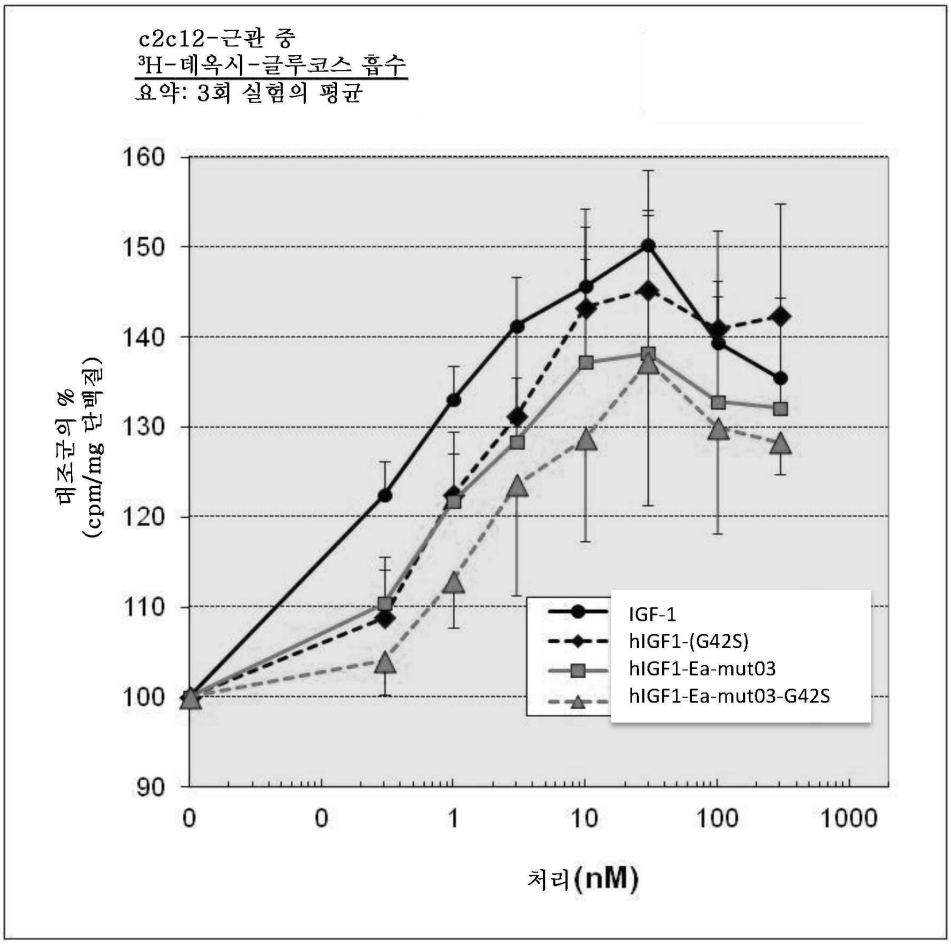
*P <0.05 vs BVS855

도면19i



도면19ii

B



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Novartis AG

<120> STABILIZED INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR POLYPEPTIDES

<130> PAT054095

<140> US 61/738475

<141> 2012-12-18

<160> 118

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 1

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

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
20 25 30

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

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
50 55 60

Lys Pro Ala Lys Ser Ala
65 70

<210> 2

<211> 35

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys
1 5 10 15

Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn
20 25 30

Tyr Arg Met
35

<210> 3

<211> 77

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 3

Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys
1 5 10 15

Tyr Gln Pro Pro Ser Thr Asn Lys Asn Thr Lys Ser Gln Arg Arg Lys
20 25 30

Gly Trp Pro Lys Thr His Pro Gly Gly Glu Gln Lys Glu Gly Thr Glu

35 40 45

Ala Ser Leu Gln Ile Arg Gly Lys Lys Lys Glu Gln Arg Arg Glu Ile

50 55 60

Gly Ser Arg Asn Ala Glu Cys Arg Gly Lys Lys Gly Lys

65 70 75

<210> 4

<211> 40

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 4

Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Ser Thr Phe Glu Glu Arg Lys

35 40

<210> 5

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 5

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe

1 5 10 15

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly

20 25 30

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys

35 40 45

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu

50 55 60

Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp

65 70 75 80

Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly

85 90 95

Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg Met
100 105

<210> 6
<211> 328
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, 77-fc domain
<400> 6
Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15
Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30
Arg Ala Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
35 40 45

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

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
115 120 125
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
130 135 140
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
145 150 155 160
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 7

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-D1-3, R37A, D71-72, R77Q-fc domain

<400> 7

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys

85 90 95

Asn Tyr Arg Met Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 8

<211> 324

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E

<400> 8

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln
85 90 95

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
100 105 110

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
115 120 125

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

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

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
165 170 175
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
180 185 190

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

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

Ser Pro Gly Lys

<210> 9
<211> 319
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A
<400> 9
Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15
Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
115 120 125
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
130 135 140
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
145 150 155 160
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
165 170 175

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

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
245 250 255
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
260 265 270
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315

<210> 10

<211> 309

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C

<400> 10

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Gly Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

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

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
290 295 300
Leu Ser Pro Gly Lys
305

<210> 11
<211> 314
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F
<400> 11
Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15
Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30
Gln Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60
Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80
His Leu Lys Asn Ala Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

85 90 95
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
100 105 110
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
115 120 125
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
130 135 140
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

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

210 215 220
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
225 230 235 240
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
245 250 255
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
260 265 270
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

275 280 285
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

290 295 300

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

305 310

<210> 12

<211> 324

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E

<400> 12

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85 90 95

Met Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

180 185 190

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro

195 200 205

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

290 295 300

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

305 310 315 320

Ser Pro Gly Lys

<210> 13

<211> 319

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A

<400> 13

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

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

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

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

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

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
305 310 315

<210> 14
<211> 314
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F
<400> 14
Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15
Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30
Arg Glu Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
35 40 45

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

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
115 120 125
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
130 135 140
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
145 150 155 160
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

305 310

<210> 15

<211> 972

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding a mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_E

<400> 15

acgctctgcg gggctgagct ggtggatgct cttcagttcg tgtgtggaga caggggcttt 60

tatttcaaca agcccacagg gtatggctcc agcagtcagg cggcgcctca gacaagcatc 120

gtggatgagt gctgcttccg gagctgtgat ctaaggaggc tggagatgta ttgcgcaccc 180

ctcaagcctg ccgtccaggc ccagcagcac accgacatgc ccaagaccca gaaggaagta 240

catttgaaga acgcaagtag agggagtgca ggaaacaaga actaccagat ggacaaaact 300

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa gcagcggggg gaccgtcagt cttcctcttc 360

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 420

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 480

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgggtggtc 540

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 600

tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 660

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 720

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 780

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 840

ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 900

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 960

tctccgggta aa 972

<210> 16

<211> 957

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding a mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_A

<400> 16

acgctctgcg gggctgagct ggtggatgct cttcagttcg tgtgtggaga caggggcttt 60

tatttcaaca agcccacagg gtatggctcc agcagtcagg cggcgcctca gacaagcatc 120

gtggatgagt gctgcttccg gagctgtgat ctaaggaggc tggagatgta ttgcgcaccc 180

ctcaagcctg ccgtccaggc ccagcagcac accgacatgc ccaagaccca gaaggaagta 240

catttgaaga acgcaagtag agggagtgca ggaaacaaga actaccagat gtgcccaccg 300

tgcccagcac ctgaagcagc ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 360

gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac 420

gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 480

acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccggg tggtcagcgt cctcaccgtc 540

ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 600

ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 660

tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 720

gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 780

aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 840

aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 900

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 957

<210> 17

<211> 927

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding a mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_C

<400> 17

acgctctgcg gggctgagct ggtggatgct cttcagttcg tgtgtggaga caggggcttt 60

tatttcaaca agcccacagg gtatggctcc agcagtcagg cggcgcctca gacaagcatc 120

gtggatgagt gctgcttccg gagctgtgat ctaaggaggc tggagatgta ttgcgcaccc 180

ctcaagcctg ccgtccaggc ccagcagcac accgacatgc ccaagaccca gaaggaagta 240

catttgaaga acgcaagtgg gtgcccaccg tgcccagcac ctgaagcagc ggggggaccg 300

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 360

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 420

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 480

acgtaccggg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 540

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 600

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg 660

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 720

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 780

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 840

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 900

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 927

<210> 18

<211> 942

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding a mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 13/2_F

<400> 18

acgctctgcg gggctgagct ggtggatgct cttcagttcg tgtgtggaga caggggcttt 60

tatttcaaca agcccacagg gtatggctcc agcagtcagg cggcgcctca gacaagcatc 120

gtggatgagt gctgcttccg gagctgtgat ctaaggaggc tggagatgta ttgcgcaccc 180

ctcaagcctg ccgtccaggc ccagcagcac accgacatgc ccaagaccca gaaggaagta 240

catttgaaga acgcaagtgg ggacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 300

gcagcggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 360

tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 420

aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 480

gagcagtaca acagcacgta ccgggtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 540

ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 600

aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 660

tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 720

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 780

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 840

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 900

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 942

<210> 19

<211> 972

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding a mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_E

<400> 19

acgctctgcg gggctgagct ggtggatgct cttcagttcg tgtgtggaga caggggcttt 60

tatttcaaca agcccacagg gtatggctcc agcagtcggg aggcgcctca gacaagcatc 120

gtggatgagt gctgcttccg gagctgtgat ctaaggaggc tggagatgta ttgcgcaccc 180

ctcaagcctg ccgtccaggc ccagcagcac accgacatgc ccaagaccca gaaggaagta 240

catttgaaga acgcaagtag agggagtgca ggaaacaaga actaccagat ggacaaaact 300

cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa gcagcggggg gaccgtcagt cttcctcttc 360

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg 420

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 480

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgggtggtc 540

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 600

tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 660

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc 720

agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 780

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 840

ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 900

tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 960

tctccgggta aa 972

<210> 20

<211> 957

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding a mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_A

<400> 20

acgctctgcg gggctgagct ggtggatgct cttcagttcg tgtgtggaga caggggcttt 60

tatttcaaca agcccacagg gtatggctcc agcagtcggg aggcgcctca gacaagcatc 120

gtggatgagt gctgcttccg gagctgtgat ctaaggaggc tggagatgta ttgcgcaccc 180

ctcaagcctg ccgtccaggc ccagcagcac accgacatgc ccaagaccca gaaggaagta 240

catttgaaga acgcaagtag agggagtgca ggaaacaaga actaccagat gtgcccaccg 300

tgcccagcac ctgaagcagc ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag 360

gacaccctca tgatctcccg gacccctgag gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac 420

gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 480

acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccggg tggtcagcgt cctcaccgtc 540

ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc 600

ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 660

tacaccctgc ccccatcccg ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 720

gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 780

aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 840

aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 900

catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaa 957

<210> 21

<211> 942

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding a mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 04/2_F

<400> 21

acgctctgcg gggctgagct ggtggatgct cttcagttcg tgtgtggaga caggggcttt 60

tatttcaaca agcccacagg gtatggctcc agcagtcggg aggcgcctca gacaagcatc 120

gtggatgagt gctgcttccg gagctgtgat ctaaggaggc tggagatgta ttgcgcaccc 180

ctcaagcctg ccgtccaggc ccagcagcac accgacatgc ccaagaccca gaaggaagta 240

catttgaaga acgcaagtgg ggacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa 300

gcagcggggg gaccgtcagt cttcctcttc cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 360

tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc 420

aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 480

gagcagtaca acagcacgta ccgggtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 540

ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag 600

aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca 660

tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat 720

cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 780

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct caccgtggac 840

aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac 900

aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aa 942

<210> 22

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial peptide hinge region

<400> 22

Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial peptide hinge region

<400> 23

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala

1 5 10

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial peptide hinge region

<400> 24

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

1 5 10 15

<210> 25

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated human IGF-1 Ea peptide

<400> 25

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

1 5 10 15

His Leu Lys Asn Ala Ser Gly

20

<210> 26

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated human IGF-1 E peptide

<400> 26

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Tyr Gln

1 5 10 15

Pro Pro Ala Thr Asn Lys Asn Thr Lys Ser Gln Arg Arg Lys Gly Ser

20 25 30

<210> 27

<211> 102

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-mut 03

<400> 27

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

Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser
20 25 30

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

Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys
50 55 60

Pro Ala Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys
65 70 75 80

Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly
85 90 95

Asn Lys Asn Tyr Arg Met
100

<210> 28

<211> 306

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DNA encoding the mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-mut 03

<400> 28

Gly Gly Ala Cys Cys Gly Ala Cys Gly Cys Thr Cys Thr Gly Cys Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Cys Thr Gly Ala Gly Cys Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala
20 25 30

Thr Gly Cys Thr Cys Thr Thr Cys Ala Gly Thr Thr Cys Gly Thr Gly

35 40 45

Thr Gly Thr Gly Gly Ala Gly Ala Cys Ala Gly Gly Gly Gly Cys Thr

50 55 60

Thr Thr Thr Ala Thr Thr Thr Cys Ala Ala Cys Ala Ala Gly Cys Cys

65 70 75 80

Cys Ala Cys Ala Gly Gly Gly Thr Ala Thr Gly Gly Cys Thr Cys Cys

85 90 95

Ala Gly Cys Ala Gly Thr Cys Gly Gly Gly Cys Gly Gly Cys Gly Cys

100 105 110

Cys Thr Cys Ala Gly Ala Cys Ala Gly Gly Cys Ala Thr Cys Gly Thr

115 120 125

Gly Gly Ala Thr Gly Ala Gly Thr Gly Cys Thr Gly Cys Thr Thr Cys

130 135 140

Cys Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Thr Gly Ala Thr Cys Thr Ala Ala

145 150 155 160

Gly Gly Ala Gly Gly Cys Thr Gly Gly Ala Gly Ala Thr Gly Thr Ala

165 170 175

Thr Thr Gly Cys Gly Cys Ala Cys Cys Cys Cys Thr Cys Ala Ala Gly

180 185 190

Cys Cys Thr Gly Cys Cys Ala Ala Gly Thr Cys Ala Gly Cys Thr Gly

195 200 205

Thr Cys Cys Gly Thr Gly Cys Cys Cys Ala Gly Cys Gly Cys Cys Ala

210 215 220

Cys Ala Cys Cys Gly Ala Cys Ala Thr Gly Cys Cys Cys Ala Ala Gly

225 230 235 240

Ala Cys Cys Cys Ala Gly Ala Ala Gly Gly Ala Ala Gly Thr Ala Cys

245 250 255

Ala Thr Thr Thr Gly Ala Ala Gly Ala Ala Cys Gly Cys Ala Ala Gly

260 265 270

Thr Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Thr Gly Cys Ala Gly Gly Ala

275 280 285

Ala Ala Cys Ala Ala Gly Ala Ala Cys Thr Ala Cys Ala Gly Gly Ala
290 295 300

Thr Gly
305

<210> 29

<211> 329

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 02

<400> 29

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys
85 90 95

Asn Tyr Gln Met Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
100 105 110

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

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

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

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

165 170 175

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

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

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
305 310 315 320
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 30
<211> 329
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 04
<400> 30
Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15
Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

85 90 95
Asn Tyr Gln Met Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
100 105 110
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
115 120 125
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
130 135 140
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

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

210 215 220
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
225 230 235 240
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
245 250 255
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
260 265 270
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 31

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIgF1-Ea-Fc_mut 13

<400> 31

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys

85 90 95

Asn Tyr Gln Met Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 32

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 8

<400> 32

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys

85 90 95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 33

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 9

<400> 33

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys

85 90 95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 34

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 10

<400> 34

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys
85 90 95

Asn Tyr Arg Met
100

<210> 35

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 11

<400> 35

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys
85 90 95

Asn Tyr Arg Met
100

<210> 36

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 12

<400> 36

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys
85 90 95

Asn Tyr Arg Met
100

<210> 37

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 13

<400> 37

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys
85 90 95

Asn Tyr Arg Met
100

<210> 38

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 14

<400> 38

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys

85 90 95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 39

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 15

<400> 39

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys

85 90 95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 40

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 16

<400> 40

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

Asn Tyr Gln Met
100

<210> 41
<211> 100
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 17
<400> 41
Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15
Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30
Arg Glu Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
35 40 45

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

<210> 42

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 18

<400> 42

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys
85 90 95

Asn Tyr Arg Met
100

<210> 43

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 19

<400> 43

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys
85 90 95

Asn Tyr Gln Met
100

<210> 44

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 20

<400> 44

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys
85 90 95

Asn Tyr Arg Met
100

<210> 45

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 21

<400> 45

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys
85 90 95

Asn Tyr Arg Met
100

<210> 46

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 22

<400> 46

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys

85 90 95

Asn Tyr Gln Met

100

<210> 47

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 23

<400> 47

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys

85 90 95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 48

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 24

<400> 48

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

Asn Tyr Arg Met
100

<210> 49
<211> 100
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 25
<400> 49
Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15
Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30
Arg Pro Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
35 40 45

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

<210> 50

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 26

<400> 50

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys
85 90 95

Asn Tyr Arg Met
100

<210> 51

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 27

<400> 51

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys

85 90 95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 52

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 28

<400> 52

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys

85 90 95

Asn Tyr Arg Met

100

<210> 53

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 29

<400> 53

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys
85 90 95

Asn Tyr Gln Met
100

<210> 54

<211> 100

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 30

<400> 54

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys

85 90 95

Asn Tyr Gln Met

100

<210> 55

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 31

<400> 55

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85 90 95

Met

<210> 56

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 32

<400> 56

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

Met

<210> 57
<211> 97
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 33
<400> 57
Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15
Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30
Arg Ala Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
35 40 45

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

<210> 58

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 34

<400> 58

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg
85 90 95

Met

<210> 59

<211> 98

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 35

<400> 59

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Gln Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu
65 70 75 80

Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr
85 90 95

Arg Met

<210> 60

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 36

<400> 60

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg
85 90 95

Met

<210> 61

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 37

<400> 61

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

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

<210> 62

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 38

<400> 62

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

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80
His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85 90 95

Met

<210> 63

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 39

<400> 63

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln
85 90 95

Met

<210> 64

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 40

<400> 64

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

Met

<210> 65
<211> 97
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 41
<400> 65
Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15
Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30
Arg Glu Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
35 40 45

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

<210> 66

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 42

<400> 66

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln
85 90 95

Met

<210> 67

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 43

<400> 67

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85 90 95

Met

<210> 68

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 44

<400> 68

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85 90 95

Met

<210> 69

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 45

<400> 69

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

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

<210> 70

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 46

<400> 70

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

Val Gln Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80
His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85 90 95

Met

<210> 71

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 47

<400> 71

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg
85 90 95

Met

<210> 72

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 48

<400> 72

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

Met

<210> 73
<211> 97
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 49
<400> 73
Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15
Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30
Gln Gln Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
35 40 45

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

<210> 74

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 50

<400> 74

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg
85 90 95

Met

<210> 75

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 51

<400> 75

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg

85 90 95

Met

<210> 76

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 52

<400> 76

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85 90 95

Met

<210> 77

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: Example 53

<400> 77

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

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

<210> 78

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D68-72, R74Q,

R77Q, R104Q -fc domain

<400> 78

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

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85 90 95

Met

<210> 79

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42A, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc domain

<400> 79

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85 90 95

Met

<210> 80

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Q, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc domain

<400> 80

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

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

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln
85 90 95
Met

<210> 81
<211> 97
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42P, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc domain
<400> 81
Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15
Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

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

85 90 95

Met

<210> 82

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42K, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc domain

<400> 82

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Lys Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln
85 90 95

Met

<210> 83

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42E, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc domain

<400> 83

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85 90 95

Met

<210> 84

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42I, D68-72, R74Q, R77Q, R104Q -fc domain

<400> 84

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val

65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln

85 90 95

Met

<210> 85

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, G42Y, D68-72,

R74Q, R77Q, R104Q -fc domain

<400> 85

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

Gln Ala Ala Pro Gln Thr Tyr Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser
35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
65 70 75 80

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln
85 90 95

Met

<210> 86

<211> 96

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-D1-3, R36Q, D42, D68-72,

R74Q, R77Q, R104Q -fc domain

<400> 86

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala Val

50 55 60

Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val His

65 70 75 80

Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln Met

85 90 95

<210> 87

<211> 102

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea (delGPE, R37A)

<400> 87

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

Arg Ala Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys Phe Arg Ser

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys

65 70 75 80

Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly

85 90 95

Asn Lys Asn Tyr Arg Met

100

<210> 88

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 88

tgacactata gaataacatc cactttgcc 29

<210> 89

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 89

tcacagctcc ggaagcagca ctcatccacg atgcttgtct gaggcgccgc cc 52

<210> 90

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 90

tgacactata gaataacatc cactttgcc 29

<210> 91

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 91

tcacagctcc ggaagcagca ctcatccacg atgggtgtct gaggcgccgc cc 52

<210> 92

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 92

tgacactata gaataacatc cactttgcc 29

<210> 93

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer: hIGF1-Ea-hFc_mut4 reverse primer

<220><221> misc_feature

<222> (49)..(50)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 93

tcacagctcc ggaagcagca ctcatccacg atgcctgtct gaggcgcmnn ccgactgctg 60

gagccatacc ctgtgg 76

<210> 94

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 94

tgacactata gaataacatc cactttgcc 29

<210> 95

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 95

tgtctgaggc gcccgcgcac tgctggagcc ataccctgtg ggc 43

<210> 96

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 96

tgacactata gaataacatc cactttgcc 29

<210> 97

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 97

tgtctgaggc gccgcctgac tgctggagcc ataccctgtg g 41

<210> 98

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer

<400> 98

cggtacgtgc tggcgtactg ctcctcccgc ggctttg 37

<210> 99

<211> 368

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated chinese hamster IGF1-Receptor gene fragment: CHOK1 derivative clone 1: copy delta2

<400> 99

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgcca cccagagtgc ctaggcagct gccatacacc 60

tgacgacaac acaacctgtg tggcctgccg acactactac tacaaaggcg tgtgtgtgcc 120

tgcctgccca cctggcacct acgttcgagg gctggcgctg tgtggaccgc gatttctgcg 180

ccaacatccc caacgctgag agcagtgact cagatggctt tgtcatccac gatggcgagt 240

gcatgcaaga atgtccctca ggcttcatcc gcaacagcac ccagaggtca gtggctcttg 300

ttccccatcc aggaggtgaa tcttgttcat attccatgat tgtaggaacc acccagaggt 360

tcatccag 368

<210> 100

<211> 365

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated chinese hamster IGF1-Receptor gene fragment: CHOK1 derivative knock out clone 2: copy delta5

<400> 100

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgcca cccagagtgc ctaggcagct gccatacacc 60

tgacgacaac acaacctgtg tggcctgccg acactactac tacaaaggcg tgtgtgtgcc 120

tgcctgccca cctggcacct acagagggct ggcgctgtgt ggaccgcgat ttctgcgcca 180

acatccccaa cgctgagagc agtgactcag atggctttgt catccacgat ggcgagtgca 240

tgcaagaatg tccctcaggc ttcatccgca acagcaccca gaggtcagtg gctcttgttc 300

cccatccagg aggtgaatct tgttcatatt ccatgattgt aggaaccacc cagaggttca 360

tccag 365

<210> 101

<211> 368

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated chinese hamster IGF1-Receptor gene fragment: CHOK1 derivative knock out clone 3: copy delta2

<400> 101

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgcca cccagagtgc ctaggcagct gccatacacc 60

tgacgacaac acaacctgtg tggcctgccg acactactac tacaaaggcg tgtgtgtgcc 120

tgcctgccca cctggcacct acgttcgagg gctggcgctg tgtggaccgc gatttctgcg 180

ccaacatccc caacgctgag agcagtgact cagatggctt tgtcatccac gatggcgagt 240

gcatgcaaga atgtccctca ggcttcatcc gcaacagcac ccagaggtca gtggctcttg 300

ttccccatcc aggaggtgaa tcttgttcat attccatgat tgtaggaacc acccagaggt 360

tcatccag 368

<210> 102

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated chinese hamster IGF1-Receptor gene fragment: CHOK1 derivative knock out clone 2: copy delta22

<400> 102

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgcca cccagagtgc ctaggcagct gccatacacc 60

tgacgacaac acaacctgtg tggcctgccg acactactac tacaaaggcg tgtgtgtgcc 120

tgcctgccca cctggcgctg tgtggaccgc gatttctgcg ccaacatccc caacgctgag 180

agcagtgact cagatggctt tgtcatccac gatggcgagt gcatgcaaga atgtccctca 240

ggcttcatcc gcaacagcac ccagaggtca gtggctcttg ttccccatcc aggaggtgaa 300

tcttgttcat attccatgat tgtaggaacc acccagaggt tcatccag 348

<210> 103

<211> 388

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated chinese hamster IGF1-Receptor gene fragment: CHOK1 derivative knock out clone 1: copy 14 nucleotides replaced and 18 added

<400> 103

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgcca cccagagtgc ctaggcagct gccatacacc 60

tgacgacaac acaacctgtg tggcctgccg acactactac tacaaaggcg tgtgtgtgcc 120

tgcctgccca cctggtgagg tataggacag tattatagag gtggggcagg gctggcgctg 180

tgtggaccgc gatttctgcg ccaacatccc caacgctgag agcagtgact cagatggctt 240

tgtcatccac gatggcgagt gcatgcaaga atgtccctca ggcttcatcc gcaacagcac 300

ccagaggtca gtggctcttg ttccccatcc aggaggtgaa tcttgttcat attccatgat 360

tgtaggaacc acccagaggt tcatccag 388

<210> 104

<211> 256

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated chinese hamster IGF1-Receptor gene fragment: CHOK1 derivative knock out clone 3: copy delta114

<400> 104

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgcca cccagagtgc tggcgctgtg tggaccgcga 60

tttctgcgcc aacatcccca acgctgagag cagtgactca gatggctttg tcatccacga 120

tggcgagtgc atgcaagaat gtccctcagg cttcatccgc aacagcaccc agaggtcagt 180

ggctcttgtt ccccatccag gaggtgaatc ttgttcatat tccatgattg taggaaccac 240

ccagaggttc atccag 256

<210> 105

<211> 348

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated chinese hamster IGF1-Receptor gene fragment: CHO-DUXB11
derivative knock out clone: sequence delta22

<400> 105

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgcca cccagagtgc ctaggcagct gccatacacc 60

tgacgacaac acaacctgtg tggcctgccg acactactac tacaaaggcg tgtgtgtgcc 120

tgcctgccca cctggcgctg tgtggaccgc gatttctgcg ccaacatccc caacgctgag 180

agcagtgact cagatggctt tgtcatccac gatggcgagt gcatgcaaga atgtccctca 240

ggcttcatcc gcaacagcac ccagaggtca gtggctcttg ttccccatcc aggaggtgaa 300

tcttgttcat attccatgat tgtaggaacc acccagaggt tcatccag 348

<210> 106

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated chinese hamster IGF1-Receptor gene fragment: CHO-DUXB11

derivative knock out clone: sequence delta7

<400> 106

agcgtgcacc gagaacaacg aatgctgcca cccagagtgc ctaggcagct gccatacacc 60

tgacgacaac acaacctgtg tggcctgccg acactactac tacaaaggcg tgtgtgtgcc 120

tgcctgccca cctggcacct acagggctgg cgctgtgtgg accgcgattt ctgcgccaac 180

atccccaacg ctgagagcag tgactcagat ggctttgtca tccacgatgg cgagtgcatg 240

caagaatgtc cctcaggctt catccgcaac agcacccaga ggtcagtggc tcttgttccc 300

catccaggag gtgaatcttg ttcatattcc atgattgtag gaaccaccca gaggttcatc 360

cag 363

<210> 107

<211> 41

<212> DNA

<213> Chinese Hamster

<400> 107

cccacctggc acctacaggt tcgagggctg gcgctgtgtg g 41

<210> 108

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer: CHO IGF1R forward sequencing primer (in intron 2-3)

<400> 108

ctagcctgtc tctgggacac 20

<210> 109

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PCR Primer: CHO IGF1R reverse sequencing primer (in intron 3-4)

<400> 109

ctggatgaac ctctgggtgg 20

<210> 110

<211> 313

<212> DNA

<213> Chinese Hamster

<400> 110

tgtgcccaag tgtgtgcgga aagcgagcgt gcaccgagaa caacgaatgc tgccacccag 60

agtgcctagg cagctgccat acacctgacg acaacacaac ctgtgtggcc tgccgacact 120

actactacaa aggcgtgtgt gtgcctgcct gcccacctgg cacctacagg ttcgagggct 180

ggcgctgtgt ggaccgcgat ttctgcgcca acatccccaa cgctgagagc agtgactcag 240

atggctttgt catccacgat ggcgagtgca tgcaagaatg tccctcaggc ttcatccgca 300

acagcaccca gag 313

<210> 111

<211> 774

<212> DNA

<213> Chinese Hamster

<400> 111

aaacttaacg gcacatccca tagcaaacca tttcataaga aaggacttgg catgtgttgt 60

gtcctttccc agtgtgggct tcacagatgg tattacctgt gcagatttca gagaaagtgt 120

gtttttccta gcctgtctct gggacaccat ttagtgctgg ttgtggcagc agatgaccct 180

ggggaggctg tgtagtctct tcatctcacc acctcctccc cctgttccca cagtgtgccc 240

aagtgtgtgc ggaaagcgag cgtgcaccga gaacaacgaa tgctgccacc cagagtgcct 300

aggcagctgc catacacctg acgacaacac aacctgtgtg gcctgccgac actactacta 360

caaaggcgtg tgtgtgcctg cctgcccacc tggcacctac aggttcgagg gctggcgctg 420

tgtggaccgc gatttctgcg ccaacatccc caacgctgag agcagtgact cagatggctt 480

tgtcatccac gatggcgagt gcatgcaaga atgtccctca ggcttcatcc gcaacagcac 540

ccagaggtca gtggctcttg ttccccatcc aggaggtgaa tcttgttcat attccatgat 600

tgtaggaacc acccagaggt tcatccagat ggggaggctg ttggagggtg ctgactaagc 660

ttgtttttat gagaatcttg gaatggctgg tctgttcatt tctttgtttg ttggcttgct 720

ttgttgtctt tgaaagtgcc ttgctagccc tagagaggaa gaattagcct gctg 774

<210> 112

<211> 14

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Kozak sequence

<400> 112

cccgcccgcc cacc 14

<210> 113

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-del1-3, R37A, del71-72, R74Q, R77Q, R104Q-fc

<400> 113

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys

85 90 95

Asn Tyr Gln Met Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 114

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-hFc_mut03

<400> 114

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly

1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser

20 25 30

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

35 40 45

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala

50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln

65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys

85 90 95

Asn Tyr Gln Met Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

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

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

225 230 235 240

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

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

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

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

290 295 300

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 115

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mutated human IGF-1 Ea peptide

<400> 115

Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val
1 5 10 15

His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Gln
20 25 30

Met

<210> 116

<211> 329

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-hFc_mut 12

<400> 116

Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser Ser Ser
20 25 30

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

Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys Pro Ala
50 55 60

Lys Ser Ala Val Gln Ala Gln Gln His Thr Asp Met Pro Lys Thr Gln
65 70 75 80

Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly Asn Lys
85 90 95

Asn Tyr Gln Met Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

210 215 220

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

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

<210> 117
<211> 70
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Mutated human IGF-1 protein: IGF-1 (G42S)
<400> 117
Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe

1 5 10 15
Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
20 25 30
Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Ser Ile Val Asp Glu Cys Cys
35 40 45
Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
50 55 60
Lys Pro Ala Lys Ser Ala
65 70

<210> 118

<211> 102

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mutated human IGF-1 protein: hIGF1-Ea-mut 03-G42S

<400> 118

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

Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly Ser
20 25 30

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

Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu Lys
50 55 60

Pro Ala Lys Ser Ala Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp Met Pro Lys
65 70 75 80

Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly Ser Ala Gly
85 90 95

Asn Lys Asn Tyr Arg Met
100