(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0116952
(43) 공개일자 2020년10월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 38/47* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 47/68* (2017.01)
A61P 21/00 (2006.01) *C12N 9/24* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61K 38/47 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7024561
(22) 출원일자(국제) 2019년02월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년08월26일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2019/004123
(87) 국제공개번호 WO 2019/151539
국제공개일자 2019년08월08일
(30) 우선권주장
JP-P-2018-018652 2018년02월05일 일본(JP)

(71) 출원인
제이씨알 파마 가부시키가이샤
일본 효오고껭 아시야시 가스가쪼 3-19
(72) 발명자
다카하시 겐이치
일본 효고켄 고베시 니시쿠 무로타니 2-2-10 제이씨알 파마 가부시키가이샤 내
소노다 히로유키
일본 효고켄 고베시 니시쿠 무로타니 2-2-10 제이씨알 파마 가부시키가이샤 내
(74) 대리인
제일특허법인(유)

전체 청구항 수 : 총 47 항

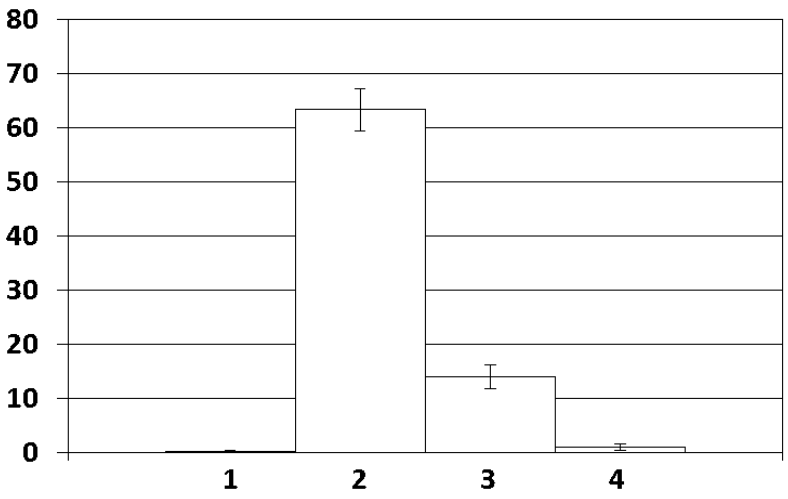
(54) 발명의 명칭 **약제를 근육에 송달하기 위한 방법**

(57) 요 약

[과제] 근 조직에서 기능시켜야 할 약제로서, 생체 내에 투여했을 때에, 그대로는 근 조직에 충분히 반입되지 않는 약제를, 근 조직, 특히 골격근 또는 심근에 의해 구성되는 근 조직에, 효율 좋게 반입시키기 위한 기술을 제공하는 것.

[해결수단] 항인간 트랜스페린 수용체 항체와 약제의 결합체로서, 해당 약제가 근 조직에서 기능을 발휘시켜야 할 생리 활성을 갖는 약제, 예를 들어, 산성 α-글루코시다제, α-갈락토시다제 A 등의 리소좀 효소인, 결합체.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/68 (2017.08)
A61P 21/00 (2018.01)
C12N 9/24 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

항인간 트랜스페린 수용체 항체와 약제의 결합체로서, 해당 약제가 근육에 있어서 기능을 발휘시켜야 할 생리 활성을 갖는 것인, 결합체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체가, Fab 항체, $F(ab')_2$ 항체, 또는 F(ab') 항체인, 결합체.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체가, scFab, scF(ab'), $scF(ab')_2$ 및 scFv로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1본쇄 항체인, 결합체.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

해당 1본쇄 항체가, 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 경쇄와 중쇄를 링커 서열을 개재시켜 결합시킨 것인, 결합체.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 경쇄와 중쇄를, 해당 경쇄의 C말단측에 있어서, 해당 링커 서열을 개재시켜 결합시킨 것인, 결합체.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 경쇄와 중쇄를, 해당 중쇄의 C말단측에 있어서, 해당 링커 서열을 개재시켜 결합시킨 것인, 결합체.

청구항 7

제 4 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

해당 링커 서열이, 8~50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 것인, 결합체.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

해당 링커 서열이, 아미노산 서열(Gly Ser), 아미노산 서열(Gly Gly Ser), 아미노산 서열(Gly Gly Gly), 서열 번호 3, 및 서열 번호 4로 나타나는 것으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하여 이루어지는 것인, 결합체.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

해당 링커 서열이, 서열 번호 4로 나타나는 아미노산 서열이 3회 연속하는 15개의 아미노산 잔기로 이루어지는 것인, 결합체.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체가, 경쇄의 가변 영역에 서열 번호 22로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는 것이고, 중쇄의 가변 영역에 서열 번호 23으로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 결합체.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

해당 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 22로 나타나는 아미노산 서열과 80% 이상의 동일성을 갖는 것이고, 해당 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 23으로 나타나는 아미노산 서열과 80% 이상의 동일성을 갖는 것인, 결합체.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

해당 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 22로 나타나는 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 것이고, 해당 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 23으로 나타나는 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 것인, 결합체.

청구항 13

제 10 항에 있어서,

해당 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 22로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~10개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 결합체.

청구항 14

제 10 항에 있어서,

해당 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 22로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 결합체.

청구항 15

제 10 항에 있어서,

해당 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 23으로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~10개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 결합체.

청구항 16

제 10 항에 있어서,

해당 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 23으로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 결합체.

청구항 17

제 10 항에 있어서,

해당 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 22로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~10개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것이고, 해당 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 23으로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~10개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 결합체.

청구항 18

제 10 항에 있어서,

해당 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 22로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것이고, 해당 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 23으로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 결합체.

청구항 19

제 10 항에 있어서,

해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체가, 경쇄에 서열 번호 24로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는 것이고, 중쇄에 서열 번호 25로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 결합체.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

해당 경쇄의 아미노산 서열이, 서열 번호 24로 나타나는 아미노산 서열과 80% 이상의 동일성을 갖는 것이고, 해당 중쇄의 아미노산 서열이, 서열 번호 25로 나타나는 아미노산 서열과 80% 이상의 동일성을 갖는 것인, 결합체.

청구항 21

제 19 항에 있어서,

해당 경쇄의 아미노산 서열이, 서열 번호 24로 나타나는 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 것이고, 해당 중쇄의 아미노산 서열이, 서열 번호 25로 나타나는 아미노산 서열과 90% 이상의 동일성을 갖는 것인, 결합체.

청구항 22

제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서,

약제가 펩티드 또는 단백질인, 결합체.

청구항 23

제 22 항에 있어서,

이하의 (1)~(4)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 결합체,

(1) 해당 단백질이, 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 경쇄의 C말단측에 펩티드 결합에 의해 결합한 것,

(2) 해당 단백질이, 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 경쇄의 N말단측에 펩티드 결합에 의해 결합한 것,

(3) 해당 단백질이, 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 중쇄의 C말단측에 펩티드 결합에 의해 결합한 것, 및

(4) 해당 단백질이, 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 중쇄의 N말단측에 펩티드 결합에 의해 결합한 것.

청구항 24

제 23 항에 있어서,

해당 단백질이, 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체에, 링커 서열을 개재시켜 결합한 것인, 결합체.

청구항 25

제 24 항에 있어서,

해당 링커 서열이, 1~50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 것인, 결합체.

청구항 26

제 25 항에 있어서,

해당 링커 서열이, 1개의 글라이신, 1개의 세린, 아미노산 서열(Gly Ser), 아미노산 서열(Gly Gly Ser), 서열 번호 3의 아미노산 서열, 서열 번호 4의 아미노산 서열, 및 이들 아미노산 서열이 1~10개 연속하여 이루어지는 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하여 이루어지는 것인, 결합체.

청구항 27

제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 있어서,

해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체가 인간화 항인간 트랜스페린 수용체 항체인, 결합체.

청구항 28

제 22 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항에 있어서,

해당 단백질이, 리소좀 효소인, 결합체.

청구항 29

제 28 항에 있어서,

해당 리소좀 효소가, 인간 α-갈락토시다제 A인, 결합체.

청구항 30

제 29 항에 있어서,

해당 인간화 항hTfR 항체의 경쇄가 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 것이고, 해당 인간화 항hTfR 항체의 중쇄가 그 C말단측에서, 링커 서열(Gly Ser)을 개재시켜, 해당 인간 α-갈락토시다제 A와 결합하고 있고, 전체로서 서열 번호 29로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 결합체.

청구항 31

제 28 항에 있어서,

해당 리소좀 효소가 인간 산성 α-글루코시다제인, 결합체.

청구항 32

제 31 항에 있어서,

해당 인간화 항hTfR 항체의 경쇄가 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 것이고, 해당 인간화 항hTfR 항체의 중쇄가 그 C말단측에서, 링커 서열(Gly Ser)을 개재시켜, 해당 인간 산성 α-글루코시다제와 결합하고 있고, 전체로서 서열 번호 27로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 결합체.

청구항 33

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 기재된 결합체를 함유하여 이루어지는, 근육의 기능을 개선하기 위한 의약 조성물.

청구항 34

제 28 항에 기재된 결합체를 함유하여 이루어지는, 리소좀병에 수반하는 근육의 기능 장애를 개선하기 위한, 의약 조성물.

청구항 35

제 29 항 또는 제 30 항에 기재된 결합체를 함유하여 이루어지는, 파브리병에 수반하는 근육의 기능 장애를 개선하기 위한, 의약 조성물.

청구항 36

제 31 항 또는 제 32 항에 기재된 결합체를 함유하여 이루어지는, 폼페병에 수반하는 근육의 기능 장애를 개선하기 위한, 의약 조성물.

청구항 37

제 33 항 내지 제 36 항 중 어느 한 항에 있어서,

해당 근육이, 골격근, 심근, 또는 평활근 중 어느 하나인, 의약 조성물.

청구항 38

리소좀병에 수반하는 근육의 기능 장애를 개선하기 위한 의약 조성물의 제조를 위한, 제 28 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 기재된 결합체의 사용.

청구항 39

파브리병에 수반하는 근육의 기능 장애를 개선하기 위한 의약 조성물의 제조를 위한, 제 29 항 또는 제 30 항에 기재된 결합체의 사용.

청구항 40

폼페병에 수반하는 근육의 기능 장애를 개선하기 위한 의약 조성물의 제조를 위한, 제 31 항 또는 제 32 항에 기재된 결합체의 사용.

청구항 41

제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 기재된 결합체의, 근육의 기능을 개선하기 위한 의약 조성물로서의 사용.

청구항 42

약제를 근육에 송달하기 위한 방법으로서, 해당 약제를 항인간 트랜스페린 수용체 항체와 결합시킨 결합체로서 제조하는 스텝, 및 해당 결합체를 개체에게 투여하는 스텝을 포함하는, 방법.

청구항 43

제 41 항에 있어서,

해당 결합체가, 제 1 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 기재된 결합체인, 방법.

청구항 44

제 42 항 또는 제 43 항에 있어서,

해당 결합체의 투여에 의해 해당 개체의 근육의 기능이 개선되는 스텝을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 45

제 42 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항에 있어서,

해당 개체가, 근육의 기능 장애를 갖는 것인, 방법.

청구항 46

제 42 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항에 있어서,

해당 개체가, 리소좀병에 수반하는 근육의 기능 장애를 갖는 것인, 방법.

청구항 47

제 46 항에 있어서,

해당 리소좀병이, 파브리병 또는 폼페병인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 근육에 있어서 생리 활성을 발휘시켜야 할 약제의 근육으로의 수송에 관한 것이고, 상세하게는, 원하는 약제를 항트랜스페린 항체와 결합시켜 이루어지는 결합체, 및 당해 결합체를 투여하는 것에 의해, 당해 원하는 약제의 생리 활성을 근육에 있어서 발휘시키는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 근년, 리소좀 효소의 기능 결손에 의해 발증하는 리소좀병에 대한 효소 보충 요법이 확립되어, 환자의 생명 예후 및 생활의 질(QOL)이 향상되고 있다. 효소 보충 요법에 이용되는 리소좀 효소를 유효 성분으로서 포함하는 의약품으로서는, 인간 산성 α-글루코시다제(hGAA)를 주제로 하는 당원병 2형(폼페병)의 치료약, 인간 이두론산-2-설파타제(hI2S)를 주제로 하는 뮤코다당증 2형(헌터병)의 치료약, 인간 α-갈락토시다제 A(hα-GalA)를 주제로 하는 파브리병의 치료약, 인간 글루코세레브로시다제를 주제로 하는 고셔병의 치료약 등이 판매되고 있다.

[0003] 효소 보충 요법에서 환자에게 투여된 리소좀 효소는, 세포 내에 반입되어 그 기능을 발휘한다. 예를 들어, 인간 산성 α-글루코시다제(hGAA), 인간 이두론산-2-설파타제(hI2S) 및 인간 α-갈락토시다제 A(hα-GalA)는, 만노스-6-인산(M6P)을 포함하는 N형 당쇄에 의해 수식되어 있고, M6P와 M6P 수용체의 결합을 개재시켜 세포 내에 반입된다. 또한, 고셔병의 치료약인 인간 글루코세레브로시다제는, 환원 말단이 만노스인 N형 당쇄에 의해 수식되어 있고, 만노스와 만노스 수용체를 개재시켜 표적인 매크로파지 등 세망내피계의 세포에 반입된다. M6P와 M6P 수용체의 결합을 개재시킨 세포 내로의 반입에 대해 보면, 2개의 M6P를 포함하는 bis-phosphate형 당쇄는, 1개의 M6P를 포함하는 mono-phosphate형과 비교하여, M6P 수용체에 대한 친화성이 100배 이상 높아, 당쇄에 포함되는 M6P는 리소좀 효소의 세포 내로의 반입 효율에 크게 영향을 준다.

[0004] 효소 보충 요법에 이용되는 인간 리소좀 효소는, 유전자 재조합 기술을 이용하여 CHO 세포 등의 호스트 세포에 인간 리소좀 효소를 코딩하는 유전자를 도입하여 발현시키는 것에 의해 제조된 재조합 단백질이다. 재조합 단백질로서 제조된 재조합 인간 리소좀 효소는, 그 약효를 발휘하기 위해, 적절히 당쇄 수식될 필요가 있다. 즉, hGAA, hα-GalA 및 hI2S에 있어서는 만노스-6-인산을 포함하는 당쇄에 의해 수식되는 것이, 인간 글루코세레브로시다제에 있어서는 환원 말단이 만노스인 당쇄에 의해 적절히 수식되는 것이, 약효를 발휘하는 데 불가결하다.

[0005] 재조합 인간 산성 α-글루코시다제(rhGAA)의 경우, 약효를 발휘시켜야 할 주요한 표적 장기는 근육, 특히 골격근이다. 그러나, 효소 보충 요법에 이용되고 있는 rhGAA는, 당쇄에 포함되는 M6P의 수가, 1분자당 평균 1개 이하이고, 따라서 당쇄의 상당수는 mono-phosphate형으로, M6P에 의한 당쇄 수식이 충분하지는 않다(비특허문헌 1). 그 때문에, 표적 장기에 있어서의 rhGAA의 반입 효율이 낮고, 그의 1회당의 투여량은 20mg/kg으로 극히 다량이다. 환자의 증상 여하에 따라서는, 투여량은 40mg/kg까지 증량되지만, 그런데도 여전히, 투여된 효소의 기능이 충분히 발휘되고 있지 않다고 생각된다.

[0006] rhGAA를 효율 좋게 표적 장기에 반입시키는 방법으로서, M6P-M6P 수용체 이외의 리간드-수용체계를 이용하는 방법이 개발되고 있다. 예를 들어, 저밀도 리포단백질 수용체 패밀리(LDL 수용체)의 리간드인 RAP(receptor-associated protein)와 hGAA를 융합시킨 융합 단백질은, 배양 세포를 이용한 실험에 있어서, M6P 비의존적으로 세포 내로 반입됨이 알려져 있다(비특허문헌 2). 이 방법에 의하면, M6P를 포함하는 당쇄에 의한 수식이 충분하지는 않은 rhGAA여도, RAP와 그 수용체의 결합을 개재시켜, 세포 내에 반입시킬 수 있다고 여겨지고 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) Zhu Y. et al., Biochem J. 389, 619-28 (2005)

(비특허문헌 0002) Prince WS. et al., J Biol. Chem. 279, 35037-46 (2004)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은, 근육에서 기능시켜야 할 약제를, 생체 내에 투여했을 때에, 근육에 효율 좋게 반입시키는 방법 및 그 관련 기술을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 향한 연구에 있어서, 본 발명자들은, 예의 검토를 거듭한 결과, 근육에서 약효를 발휘해야 하지만, 그대로는 충분히 근육에 수송되는 경우가 없는 재조합 인간 산성 α-글루코시다제가, 항인간 트랜스페린 수용체와의 결합체로 하는 것에 의해 근육에 효율 좋게 수송됨을 발견하여, 본 발명을 완성했다. 즉, 본 발명은 이하를 포함하는 것이다.

[0010] 1. 항인간 트랜스페린 수용체 항체와 약제의 결합체로서, 해당 약제가 근육에 있어서 기능을 발휘시켜야 할 생리 활성을 갖는 것인, 결합체.

[0011] 2. 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체가, Fab 항체, $F(ab')_2$ 항체, 또는 F(ab') 항체인, 상기 1에 기재된 결합체.

[0012] 3. 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체가, scFab, scF(ab'), $scF(ab')_2$ 및 scFv로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1본쇄 항체인, 상기 1에 기재된 결합체.

[0013] 4. 해당 1본쇄 항체가, 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 경쇄와 중쇄를 링커 서열을 개재시켜 결합시킨 것인, 상기 3에 기재된 결합체.

[0014] 5. 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 경쇄와 중쇄를, 해당 경쇄의 C말단측에 있어서, 해당 링커 서열을 개재시켜 결합시킨 것인, 상기 4에 기재된 결합체.

[0015] 6. 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 경쇄와 중쇄를, 해당 중쇄의 C말단측에 있어서, 해당 링커 서열을 개재시켜 결합시킨 것인, 상기 4에 기재된 결합체.

[0016] 7. 해당 링커 서열이, 8~50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 것인, 상기 4~6 중 어느 하나에 기재된 결합체.

[0017] 8. 해당 링커 서열이, 아미노산 서열(Gly Ser), 아미노산 서열(Gly Gly Ser), 아미노산 서열(Gly Gly Gly), 서열 번호 3, 및 서열 번호 4로 나타나는 것으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하여 이루어지는 것인, 상기 7에 기재된 결합체.

[0018] 9. 해당 링커 서열이, 서열 번호 4로 나타나는 아미노산 서열이 3회 연속하는 15개의 아미노산 잔기로 이루어지는 것인, 상기 8에 기재된 결합체.

[0019] 10. 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체가, 경쇄의 가변 영역에 서열 번호 22로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는 것이고, 중쇄의 가변 영역에 서열 번호 23으로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 상기 1~9 중 어느 하나에 기재된 결합체.

[0020] 11. 해당 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 22로 나타나는 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 것이고, 해당 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 23으로 나타나는 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 것인, 상기 10에 기재된 결합체.

[0021] 12. 해당 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 22로 나타나는 아미노산 서열과 90% 이상의 상동성을 갖는 것이고, 해당 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 23으로 나타나는 아미노산 서열과 90% 이상의 상동성을 갖는 것인, 상기 10에 기재된 결합체.

[0022] 13. 해당 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 22로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~10개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 상기 10에 기재된 결합체.

[0023] 14. 해당 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 22로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 상기 10에 기재된 결합체.

[0024] 15. 해당 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 23으로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~10개

의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 상기 10에 기재된 결합체.

[0025] 16. 해당 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 23으로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 상기 10에 기재된 결합체.

[0026] 17. 해당 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 22로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~10개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것이고, 해당 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 23으로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~10개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 상기 10에 기재된 결합체.

[0027] 18. 해당 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 22로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것이고, 해당 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이, 서열 번호 23으로 나타나는 아미노산 서열을 구성하는 1~3개의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 상기 10에 기재된 결합체.

[0028] 19. 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체가, 경쇄에 서열 번호 24로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는 것이고, 중쇄에 서열 번호 25로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 상기 10에 기재된 결합체.

[0029] 20. 해당 경쇄의 아미노산 서열이, 서열 번호 24로 나타나는 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 것이고, 해당 중쇄의 아미노산 서열이, 서열 번호 25로 나타나는 아미노산 서열과 80% 이상의 상동성을 갖는 것인, 상기 19에 기재된 결합체.

[0030] 21. 해당 경쇄의 아미노산 서열이, 서열 번호 24로 나타나는 아미노산 서열과 90% 이상의 상동성을 갖는 것이고, 해당 중쇄의 아미노산 서열이, 서열 번호 25로 나타나는 아미노산 서열과 90% 이상의 상동성을 갖는 것인, 상기 19에 기재된 결합체.

[0031] 22. 약제가 펩티드 또는 단백질인, 상기 1~21 중 어느 하나에 기재된 결합체.

[0032] 23. 상기 22의 결합체로서, 이하의 (1)~(4)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것,

[0033] (1) 해당 단백질이, 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 경쇄의 C말단측에 펩티드 결합에 의해 결합한 것,

[0034] (2) 해당 단백질이, 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 경쇄의 N말단측에 펩티드 결합에 의해 결합한 것,

[0035] (3) 해당 단백질이, 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 중쇄의 C말단측에 펩티드 결합에 의해 결합한 것, 및

[0036] (4) 해당 단백질이, 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 중쇄의 N말단측에 펩티드 결합에 의해 결합한 것.

[0037] 24. 해당 단백질이, 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체에, 링커 서열을 개재시켜 결합한 것인, 상기 23에 기재된 결합체.

[0038] 25. 해당 링커 서열이, 1~50개의 아미노산 잔기로 이루어지는 것인, 상기 24에 기재된 결합체.

[0039] 26. 해당 링커 서열이, 1개의 글라이신, 1개의 세린, 아미노산 서열(Gly Ser), 아미노산 서열(Gly Gly Ser), 서열 번호 3의 아미노산 서열, 서열 번호 4의 아미노산 서열, 및 이들 아미노산 서열이 1~10개 연속하여 이루어지는 아미노산 서열로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하여 이루어지는 것인, 상기 25에 기재된 결합체.

[0040] 27. 해당 항인간 트랜스페린 수용체 항체가 인간화 항인간 트랜스페린 수용체 항체인, 상기 1~28 중 어느 하나의 결합체.

[0041] 28. 해당 단백질이, 리소좀 효소인, 상기 22~27 중 어느 하나에 기재된 결합체.

[0042] 29. 해당 리소좀 효소가, 인간 α-갈락토시다제 A인, 상기 28에 기재된 결합체.

[0043] 30. 해당 인간화 항hTfR 항체의 경쇄가 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 것이고, 해당 인간화 항hTfR 항체의 중쇄가 그 C말단측에서, 링커 서열(Gly Ser)을 개재시켜, 해당 인간 α-갈락토시다제 A와 결합하고 있고, 전체로서 서열 번호 29로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 상기 29에 기재된 결합체.

[0044] 31. 해당 리소좀 효소가 인간 산성 α-글루코시다제인, 상기 28에 기재된 결합체.

[0045] 32. 해당 인간화 항hTfR 항체의 경쇄가 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하는 것이고, 해당 인간화 항hTfR

항체의 중쇄가 그 C말단측에서, 링커 서열(Gly Ser)을 개재시켜, 해당 인간 산성 α-글루코시다제와 결합하고 있고, 전체로서 서열 번호 27로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는 것인, 상기 31에 기재된 결합체.

[0046] 33. 상기 1~32 중 어느 하나에 기재된 결합체를 함유하여 이루어지는, 근육의 기능을 개선하기 위한 의약 조성물.

[0047] 34. 상기 28에 기재된 결합체를 함유하여 이루어지는, 리소좀병에 수반하는 근육의 기능 장애를 개선하기 위한, 의약 조성물.

[0048] 35. 상기 29 또는 30에 기재된 결합체를 함유하여 이루어지는, 파브리병에 수반하는 근육의 기능 장애를 개선하기 위한, 의약 조성물.

[0049] 36. 상기 31 또는 32에 기재된 결합체를 함유하여 이루어지는, 폼페병에 수반하는 근육의 기능 장애를 개선하기 위한, 의약 조성물.

[0050] 37. 해당 근육이, 골격근, 심근, 또는 평활근 중 어느 하나인, 상기 33~36 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0051] 38. 리소좀병에 수반하는 근육의 기능 장애를 개선하기 위한 의약 조성물의 제조를 위한, 상기 28~32 중 어느 하나에 기재된 결합체의 사용.

[0052] 39. 파브리병에 수반하는 근육의 기능 장애를 개선하기 위한 의약 조성물의 제조를 위한, 상기 29 또는 30에 기재된 결합체의 사용.

[0053] 40. 폼페병에 수반하는 근육의 기능 장애를 개선하기 위한 의약 조성물의 제조를 위한, 상기 31 또는 32에 기재된 결합체의 사용.

[0054] 41. 상기 1~32 중 어느 하나에 기재된 결합체의, 근육의 기능을 개선하기 위한 의약 조성물로서의 사용.

[0055] 42. 약제를 근육에 송달하기 위한 방법으로서, 해당 약제를 항인간 트랜스페린 수용체 항체와 결합시킨 결합체로서 제조하는 스텝, 및 해당 결합체를 개체에게 투여하는 스텝을 포함하는, 방법.

[0056] 43. 해당 결합체가, 상기 1~32 중 어느 하나에 기재된 결합체인, 상기 42에 기재된 방법.

[0057] 44. 해당 결합체의 투여에 의해 해당 개체의 근육의 기능이 개선되는 스텝을 추가로 포함하는, 상기 42 또는 43에 기재된 방법.

[0058] 45. 해당 개체가, 근육의 기능 장애를 갖는 것인, 상기 42~44 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0059] 46. 해당 개체가, 리소좀병에 수반하는 근육의 기능 장애를 갖는 것인, 상기 42~44 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0060] 47. 해당 리소좀병이, 파브리병 또는 폼페병인, 상기 46에 기재된 방법.

발명의 효과

[0061] 본 발명에 의하면, 근육에 있어서 기능시키려고 하는 약제, 특히 생리 활성을 갖는 펩티드 또는 단백질을, 항인간 트랜스페린 수용체와의 결합체로 하는 것에 의해, 생체 내에 투여했을 때에, 근육에 효율 좋게 송달시킬 수 있다. 즉, 약제를 인간 트랜스페린 수용체와의 결합체로 하는 것에 의해, 근육의 기능 장애를 수반하는 질환의 보다 효과적인 치료제를 제공하는 것이 가능해진다.

도면의 간단한 설명

[0062] [도 1] 심장에 포함되는 글리코겐의 정량 결과를 나타내는 도면. (1)은 야생형 컨트롤군, (2)는 KO 컨트롤군, (3)은 hGAA 투여군, (4)는 hGAA-항hTfR 항체 투여군의 정량 결과를 나타낸다. 세로 바는 SD치를 나타낸다. 세로축은 글리코겐 농도(mg/g 습조직 중량)를 나타낸다.

[도 2] 횡격막에 포함되는 글리코겐의 정량 결과를 나타내는 도면. (1)~(4), 세로 바 및 세로축에 대해서는 도 1과 마찬가지이다.

[도 3] 가자미근에 포함되는 글리코겐의 정량 결과를 나타내는 도면. (1)~(4), 세로 바 및 세로축에 대해서는 도 1과 마찬가지이다.

[도 4] 전경골근에 포함되는 글리코겐의 정량 결과를 나타내는 도면. (1)~(4), 세로 바 및 세로축에 대해서는 도 1과 마찬가지이다.

[도 5] 대퇴사두근에 포함되는 글리코겐의 정량 결과를 나타내는 도면. (1)~(4), 세로 바 및 세로축에 대해서는 도 1과 마찬가지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 본 발명에서 「근육」이라고 할 때는, 주로 골격근, 심근, 또는 평활근 중 어느 하나에 의해 구성되는 조직을 말하고, 특히, 주로 골격근에 의해 구성되는 조직 또는 심근에 의해 구성되는 조직을 말한다. 또한, 「근 조직」이라는 용어는, 근육과 동의라고 풀이된다.

[0064] 본 발명에 있어서, 근육에 있어서 생리 활성을 발휘시켜야 할 약제는, 그 약제를 그대로 혈중에 투여했을 때에는, 근육에 효율 좋게 수송되지 않기 때문에, 근육에 있어서 그의 생리 활성을 충분히 발휘시킬 수 없는 약제이다. 이러한 약제는 저분자 화합물이어도 되고, 펩티드, 또는 단백질이어도 된다. 여기에서, 펩티드는 근육에서 생리 활성을 발휘할 수 있는 것이지만(생리 활성 펩티드), 그것만으로는, 생체 내에 투여했을 때에 근육에 효율 좋게 수송되지 않는 것이고, 바람직하게는 2~100개의 아미노산 잔기로 이루어지는 것이며, 예를 들어, 2~50개, 5~100개의 아미노산 잔기로 이루어지는 것이다. 또한 여기에서, 단백질은 근육에서 생리 활성을 발휘할 수 있는 것이지만(생리 활성 단백질), 그것만으로는, 생체 내에 투여했을 때에 근육에 효율 좋게 수송되지 않는 것이고, 예를 들어, 산성 α-글루코시다제(GAA), α-갈락토시다제 A(α-GalA) 등의 리소좀 효소가 포함된다. 또한, 이러한 펩티드 및 단백질은, 인공적인 아미노산 서열을 갖는 것이어도 되고, 또한 동물의 유전자로 코딩되어 있는 아미노산 서열을 갖는 것이어도 된다. 여기에서, 펩티드 또는 단백질을 코딩하는 유전자의 동물종에 특별히 한정은 없지만, 바람직하게는 포유동물이며, 보다 바람직하게는, 인간, 원숭이, 쥐, 가축 동물(말, 돼지, 양 등), 애완 동물(고양이, 개 등)이며, 보다 바람직하게는 인간이다.

[0065] 리소좀병에 수반하는 근육의 기능 장애를 개선시키기 위한 의약으로서, 그 기능을 발휘시켜야 할 리소좀 효소에는, GAA, α-GalA 이외에, α-L-이두로니다제(IDUA), 이두론산-2-설파타제(IDS), 글루코세레브로시다제(GBA), β-갈락토시다제, GM2 활성화 단백질, β-헥소사미니다제 A, β-헥소사미니다제 B, N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스페라제, α-만노시다제(LAMAN), β-만노시다제, 갈락토실세라미다제(GALC), 사포신 C, 아릴설파타제 A(ARSA), α-L-푸코시다제(FUCA1), 아스파틸글루코사미니다제, α-N-아세틸갈락토사미니다제, 산성 스핑고미엘리나제(ASM), β-글루쿠로니다제(GUSB), 헤파란 N-설파타제(SGSH), α-N-아세틸글루코사미니다제(NAGLU), 아세틸 CoA α-글루코사미니드 N-아세틸트랜스페라제, N-아세틸글루코사민-6-황산 설파타제, 산성 세라미다제(AC), 아밀로-1,6-글루코시다제, 시알리다제, 아스파틸글루코사미니다제, 팔미토일 단백질 싸이오에스테라제-1(PPT-1), 트라이펩티딜펩티다제-1(TPP-1), 히알루로니다제-1, CLN1, CLN2 등이 있다. 이들 효소는, 항인간 트랜스페린 수용체 항체와의 결합체로 하는 것에 의해, 생체 내에 투여했을 때에, 보다 효율 좋게 근육에 송달시킬 수 있다. 따라서, 이들 결합체는, 리소좀병에 수반하는 근육의 기능 장애를 개선시키기 위한 의약으로서 이용할 수 있다.

[0066] 항hTfR 항체와 융합시킨 이두론산-2-설파타제(IDS)는 헌터 증후군에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, α-갈락토시다제 A는 파브리병에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, α-L-이두로니다제(IDUA)는 헐러 증후군 또는 헐러-샤이에 증후군에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, 글루코세레브로시다제(GBA)는 고셔병에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, β갈락토시다제는 GM1-강글리오시도시스 1~3형에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, GM2 활성화 단백질은 GM2-강글리오시도시스 AB이형에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, β-헥소사미니다제 A는 샌드호프병 및 테이삭스병에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, β-헥소사미니다제 B는 샌드호프병에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스페라제는 I-세포병에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, α-만노시다제(LAMAN)는 α-만노시도시스에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, β-만노시다제는 β-만노시도시스에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, 갈락토실세라미다제(GALC)는 크라베병에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, 사포신 C는 고셔병양 축적증에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, 아릴설파타제 A(ARSA)는 이염성 백질 변성증(이염성 백질 디스트로피)에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, α-L-푸코시다제(FUCA1)는 푸코시도시스에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, 아스파틸글루코사미니다제는 아스파틸글루코사민뇨증에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, α-N-아세틸갈락토사미니다제는 쉰들러병 및 가와사키병에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, 산성 스핑고미엘리나제(ASM)는 니만-픽병에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, β-글루쿠로니다제(GUSB)는 슬라이 증후군에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, 헤파란 N-설파타제(SGSH), α-N-아세틸글루코사미니다제(NAGLU), 아세틸

CoA α-글루코사미니드 N-아세틸트랜스페라제 및 N-아세틸글루코사민-6-황산 설파타제는 산필리포 증후군에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, 산성 세라미다제(AC)는 파버병에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, 아밀로-1,6-글루코시다제는 코리병(포브스-코리병)에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, 시알리다제는 시알리다제 결손증에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, 팔미토일 단백질 싸이오에스테라제-1(PPT-1)은, 신경 세로이드리포푸신증 또는 Santavuori-Haltia병에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, 트라이펩티딜펩티다제-1(TPP-1)은, 신경 세로이드리포푸신증 또는 Jansky-Bielschowsky병에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, 히알루로니다제-1은 히알루로니다제 결손증에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, 산성 α-글루코시다제(GAA)는 폼페병에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서, CLN1 및 2는 바텐병에 있어서의 근육의 기능 장애 치료제로서 사용할 수 있다. 특히, 본 발명의 항hTfR 항체는, 혈액뇌관문을 통과한 후에, 대뇌의 뇌실질, 해마의 신경양 세포, 소뇌의 푸르킨예 세포 등에 도달하고, 또한 대뇌의 선조체의 신경양 세포 및 중뇌의 흑질의 신경양 세포에도 도달한다고 예상되므로, 이들 조직 또는 세포에 있어서 약효를 기능시켜야 할 단백질과 융합시키는 것에 의해, 그 단백질의 약효를 강화할 수 있다. 단, 의약 용도는 이들 질환에 한정되는 것은 아니다.

[0067] 한편, 본 발명에 있어서, 「리소좀 효소」란 말, 혹은 개개의 리소좀 효소를 나타내는 말은, 특히 천연형의 아미노산 서열을 갖는 것을 의미하지만, 이것에 한정되지 않고, 리소좀 효소를 갖는 것인 한, 천연형의 리소좀 효소의 아미노산 서열에 치환, 결실, 부가 등의 변이를 가한 것도 리소좀 효소에 포함된다. 리소좀 효소의 아미노산 서열의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환시키는 경우, 치환시키는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~10개이고, 보다 바람직하게는 1~5개이며, 더 바람직하게는 1~3개이고, 보다 더 바람직하게는 1~2개이다. 리소좀 효소의 아미노산 서열 중의 아미노산을 결실시키는 경우, 결실시키는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~10개이고, 보다 바람직하게는 1~5개이며, 더 바람직하게는 1~3개이고, 보다 더 바람직하게는 1~2개이다. 또한, 이들 아미노산의 치환과 결실을 조합한 변이를 리소좀 효소에 가할 수도 있다. 리소좀 효소에 아미노산을 부가시키는 경우, 리소좀 효소의 아미노산 서열 중 혹은 N말단측 또는 C말단측에, 바람직하게는 1~10개, 보다 바람직하게는 1~5개, 더 바람직하게는 1~3개, 보다 더 바람직하게는 1~2개의 아미노산이 부가된다. 이들 아미노산의 부가, 치환 및 결실을 조합한 변이를 리소좀 효소에 가할 수도 있다. 변이를 가한 리소좀 효소의 아미노산 서열은, 원래의 리소좀 효소의 아미노산 서열과 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖고, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 나타내고, 더 바람직하게는, 95% 이상의 상동성을 나타낸다. 리소좀 효소 이외의 단백질, 펩티드에 대해서도 마찬가지이다.

[0068] 한편 여기에서, 리소좀 효소가 리소좀 효소 활성을 갖는다고 할 때는, 항hTfR 항체와 결합시켰을 때에, 천연형의 리소좀 효소가 본래 갖는 활성에 대해서, 3% 이상의 활성을 갖고 있음을 말한다. 단, 그 활성은, 천연형의 리소좀 효소가 본래 갖는 활성에 대해서, 10% 이상인 것이 바람직하고, 20% 이상인 것이 보다 바람직하고, 50% 이상인 것이 더 바람직하고, 80% 이상인 것이 보다 더 바람직하다. 항hTfR 항체와 결합시킨 리소좀 효소가 변이를 가한 것인 경우도 마찬가지이다. 또한, 리소좀 효소 이외의 단백질, 펩티드에 대해서도 마찬가지이다.

[0069] 한편, 펩티드 또는 단백질(리소좀 효소, 항체를 포함한다)의 아미노산 서열 중의 아미노산의 다른 아미노산에 의한 치환으로서는, 예를 들어, 방향족 아미노산(Phe, Trp, Tyr), 지방족 아미노산(Gly, Ala, Leu, Ile, Val), 아마이드형 아미노산(Gln, Asn), 염기성 아미노산(Lys, Arg, His), 산성 아미노산(Glu, Asp), 수산기를 갖는 아미노산(Ser, Thr), 분지 아미노산(Val, Leu, Ile), 측쇄가 작은 아미노산(Gly, Ala, Ser, Thr, Met), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산(Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met) 등의 동일 그룹으로 분류되는 아미노산끼리의 치환을 들 수 있다. 이와 같은 유사 아미노산에 의한 치환은, 단백질의 표현형에 변화를 가져오지 않을(즉, 보존적 아미노산 치환일) 것이 예측된다. 보존적 아미노산 치환의 구체예는 당해 기술 분야에서 주지이며, 여러 가지 문헌에 기재되어 있다(예를 들어, Bowie 등, Science, 247:1306-1310(1990)을 참조).

[0070] 또한, 본 발명에 있어서 「상동성」 또는 「동일성」이란, 상동성 계산 알고리즘을 이용하여 2개의 아미노산 서열을 비교했을 경우의, 최적인 얼라인먼트에 있어서의, 전체 아미노산 잔기에 대한 상동인 아미노산 잔기의 비율(%)을 의미한다. 2개의 아미노산 서열을 이러한 비율로 나타나는 상동성(또는 동일성)으로 비교하는 것은, 본 발명의 기술적 분야에 있어서 주지이며, 당업자에게 있어 용이하게 이해되는 것이다. 본 발명에 있어서, 원래의 단백질(항체를 포함한다)의 아미노산 서열과 변이를 가한 단백질의 아미노산 서열의 상동성을 산출하기 위한 상동성 계산 알고리즘으로서, BLAST(Altschul SF. J Mol. Biol. 215. 403-10, (1990)), Pearson 및 Lipman의 유사성 검색법(Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85. 2444 (1988)), Smith 및 Waterman의 국소 상동성 알고리즘(Adv. Appl. Math. 2. 482-9(1981)) 등이 주지이다. 또한, 미국 국립 위생연구소가 인터넷상에서 제공하는 BLAST 프로그램의 하나인 blastp는, 2개의 아미노산 서열의 상동성을 산출하기 위한 수단으로서 주지이다.

[0071] 이하, 리소좀 효소에 대해, 산성 α-글루코시다제와 α-갈락토시다제 A를 예로 채택하여 상술한다.

[0072] 산성 α-글루코시다제(GAA)는, 글리코겐을 분해하는 활성을 갖는 리소좀 효소이다. 폼페병(당원병 II형)은, 유전적으로 산성 α-글루코시다제 활성의 대부분 또는 전부를 결손하는 것에 의해, 세포의 라이소좀에 글리코겐이 대량으로 축적되는 질환이며, 심근 및 골격근의 기능 장애가 증상의 중심이 된다. 폼페병은, 유아형(乳兒型), 유아형(幼兒型), 성인형으로 분류된다. 유아형(乳兒型)은, 주로 유아기(乳兒期) 전반에 발증하고, 심근에의 글리코겐 축적 등에 의해, 구심성 심 비대에 의한 순환기 증상, 골격근 침습에 의한 근력 저하, 근 긴장 저하를 나타내고, 선천성 미오파시 증상을 특징으로 한다. 유아형(幼兒型)은, 골격근 증상이 주요하고, 유아기(乳兒期) 후반부터, 운동 발달 지연, 진행성의 근력 저하를 나타낸다. 성인형은 근력 저하가 주증상이다.

[0073] α-갈락토시다제 A(α-GalA)는, 당지질 및 당단백질의 말단 α-갈락토실 결합을 가수분해하는 활성을 갖는 라이소좀 효소이다. 트라이헥소실세라미드는, α-갈락토시다제 A의 기질의 하나이며, 그 말단 헥소스 부분에 있어서 당해 효소에 의한 가수분해를 받는다. 파브리병은, 유전적으로 α-GalA 활성의 대부분 또는 전부를 결손하는 것에 의해 야기되는 질환이다. 파브리병의 임상학적 특징은, 신부전, 각화 혈관종, 및 심혈관계 이상, 예를 들어 심실 비대 및 승모변 부전이다. 또한, 주로 심장이 장애되는 비전형적인 타입의 파브리병은, 특히 심 파브리병으로서 구별되는 경우가 있다.

[0074] 리소좀 효소를 결손하는 리소좀병 환자의 치료법으로서, 유전자 재조합 기술을 이용하여 제작한 리소좀 효소를 의약으로서 환자에게 투여하는 효소 보충 요법이 행해지고 있다. 예를 들어, 폼페병 환자에 대해서는, 유전자 재조합 기술에 의해 제작한 재조합 인간 산성 α-글루코시다제인 마이오자임(등록상표)을 이용한 효소 보충 요법이 행해지고 있다. 또한, 파브리병 환자에 대해서는, 유전자 재조합 기술에 의해 제작한 재조합 인간 α-갈락토시다제 A인 파브라자임 또는 리프레갈(등록상표)을 이용한 효소 보충 요법이 행해지고 있다. 이들 효소 보충 요법에서 의약으로서 이용되고 있는 리소좀 효소가 효과를 발휘해야 할 조직의 하나가 근육이다. 따라서, 근육으로의 리소좀 효소의 공급량을 증가시키는 것에 의해, 리소좀병에 수반하는 근육의 기능 장애를 보다 개선시킬 수 있을 가능성이 있다.

[0075] 한편, 본 발명에 있어서, 「인간 산성 α-글루코시다제」 또는 「hGAA」란 말은, 특히 천연형의 hGAA와 동일한 서열 번호 1로 나타나는 아미노산 서열을 갖는 hGAA를 의미하지만, 이것에 한정되지 않고, hGAA 활성을 갖는 것인 한, 천연형의 hGAA의 아미노산 서열에 치환, 결실, 부가 등의 변이를 가한 것도 hGAA에 포함된다. hGAA의 아미노산 서열의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환시키는 경우, 치환시키는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~10개이고, 보다 바람직하게는 1~5개이며, 더 바람직하게는 1~3개이고, 보다 더 바람직하게는 1~2개이다. hGAA의 아미노산 서열 중의 아미노산을 결실시키는 경우, 결실시키는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~10개이고, 보다 바람직하게는 1~5개이며, 더 바람직하게는 1~3개이고, 보다 더 바람직하게는 1~2개이다. 또한, 이들 아미노산의 치환과 결실을 조합한 변이를 hGAA에 가할 수도 있다. hGAA에 아미노산을 부가시키는 경우, hGAA의 아미노산 서열 중 혹은 N말단측 또는 C말단측에, 바람직하게는 1~10개, 보다 바람직하게는 1~5개, 더 바람직하게는 1~3개, 보다 더 바람직하게는 1~2개의 아미노산이 부가된다. 이들 아미노산의 부가, 치환 및 결실을 조합한 변이를 hGAA에 가할 수도 있다. 변이를 가한 hGAA의 아미노산 서열은, 원래의 hGAA의 아미노산 서열과 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖고, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 나타내고, 더 바람직하게는, 95% 이상의 상동성을 나타낸다.

[0076] 또한 여기에서, hGAA가 hGAA 활성을 갖는다고 할 때는, 항hTfR 항체와 결합시켰을 때에, 천연형의 hGAA가 본래 갖는 활성에 대해서, 3% 이상의 활성을 갖고 있음을 말한다. 단, 그 활성은, 천연형의 hGAA가 본래 갖는 활성에 대해서, 10% 이상인 것이 바람직하고, 20% 이상인 것이 보다 바람직하고, 50% 이상인 것이 더 바람직하고, 80% 이상인 것이 보다 더 바람직하다. 항hTfR 항체와 결합시킨 hGAA가 변이를 가한 것인 경우도 마찬가지이다.

[0077] 또한, 본 발명에 있어서, 「인간 α-갈락토시다제 A」 또는 「hα-GalA」란 말은, 특히 천연형의 hα-GalA와 동일한 서열 번호 2로 나타나는 아미노산 서열을 갖는 hα-GalA를 의미하지만, 이것에 한정하지 않고, hα-GalA 활성을 갖는 것인 한, 천연형의 hα-GalA의 아미노산 서열에 치환, 결실, 부가 등의 변이를 가한 것도 hα-GalA에 포함된다. hα-GalA의 아미노산 서열의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환시키는 경우, 치환시키는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~10개이고, 보다 바람직하게는 1~5개이며, 더 바람직하게는 1~3개이고, 보다 더 바람직하게는 1~2개이다. hα-GalA의 아미노산 서열 중의 아미노산을 결실시키는 경우, 결실시키는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~10개이고, 보다 바람직하게는 1~5개이며, 더 바람직하게는 1~3개이고, 보다 더 바람직하게는 1~2개이다. 또한, 이들 아미노산의 치환과 결실을 조합한 변이를 hα-GalA에 가할 수도 있다.

hα-GalA에 아미노산을 부가시키는 경우, hα-GalA의 아미노산 서열 중 혹은 N말단측 또는 C말단측에, 바람직하게는 1~10개, 보다 바람직하게는 1~5개, 더 바람직하게는 1~3개, 보다 더 바람직하게는 1~2개의 아미노산이 부가된다. 이들 아미노산의 부가, 치환 및 결실을 조합한 변이를 hα-GalA에 가할 수도 있다. 변이를 가한 hα-GalA의 아미노산 서열은, 원래의 hα-GalA의 아미노산 서열과 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖고, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 나타내고, 더 바람직하게는, 95% 이상의 상동성을 나타낸다.

[0078] 또한 여기에서, hα-GalA가 hα-GalA 활성을 갖는다고 할 때는, 이것을 항hTfR 항체와 결합시켰을 때에, 천연형의 hα-GalA가 본래 갖는 활성에 대해서, 3% 이상의 활성을 갖고 있음을 말한다. 단, 그 활성은, 천연형의 hα-GalA가 본래 갖는 활성에 대해서, 10% 이상인 것이 바람직하고, 20% 이상인 것이 보다 바람직하고, 50% 이상인 것이 더 바람직하고, 80% 이상인 것이 보다 더 바람직하다. 항hTfR 항체와 결합시킨 hα-GalA가 변이를 가한 것인 경우도 마찬가지이다.

[0079] 본 발명에 있어서, 「항체」란 말은, 주로 인간 항체, 마우스 항체, 인간화 항체, 인간 항체와 다른 포유동물의 항체의 키메라 항체, 및 마우스 항체와 다른 포유동물의 항체의 키메라 항체를 말하지만, 특정의 항원에 특이적으로 결합하는 성질을 갖는 것인 한, 이들에 한정되는 것은 아니고, 또한, 항체의 동물종에도 특별히 제한은 없다.

[0080] 본 발명에 있어서, 「인간 항체」란 말은, 그 단백질 전체가 인간 유래의 유전자로 코딩되어 있는 항체를 말한다. 유전자의 발현 효율을 상승시키는 등의 목적으로, 원래의 인간의 유전자에, 원래의 아미노산 서열에 변화를 주지 않고 변이를 가한 유전자로 코딩되는 항체도, 「인간 항체」에 포함된다. 또한, 인간 항체를 코딩하는 2개 이상의 유전자를 조합하여, 어떤 인간 항체의 일부를, 다른 인간 항체의 일부로 치환한 항체도, 「인간 항체」에 포함된다. 인간 항체는, 면역글로불린 경쇄의 3개소의 상보성 결정 영역(CDR: complementary determining region의 약칭)과 면역글로불린 중쇄의 3개소의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는다. 면역글로불린 경쇄의 3개소의 CDR은, N말단측에 있는 것으로부터 순차로 CDR1, CDR2 및 CDR3이라고 한다. 면역글로불린 중쇄의 3개소의 CDR도, N말단측에 있는 것으로부터 순차로 CDR1, CDR2 및 CDR3이라고 한다. 어떤 인간 항체의 CDR을, 다른 인간 항체의 CDR로 치환하는 것에 의해, 인간 항체의 항원 특이성, 친화성 등을 개변한 항체도, 인간 항체에 포함된다.

[0081] 본 발명에 있어서, 원래의 인간 항체의 유전자를 개변하는 것에 의해, 원래의 항체의 아미노산 서열에 치환, 결실, 부가 등의 변이를 가한 항체도, 「인간 항체」에 포함된다. 원래의 항체의 아미노산 서열 중의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하는 경우, 치환하는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~20개이고, 보다 바람직하게는 1~5개이며, 더 바람직하게는 1~3개이다. 원래의 항체의 아미노산 서열 중의 아미노산을 결실시키는 경우, 결실시키는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~20개이고, 보다 바람직하게는 1~5개이며, 더 바람직하게는 1~3개이다. 또한, 이들 아미노산의 치환과 결실을 조합한 변이를 가한 항체도, 인간 항체이다. 아미노산을 부가시키는 경우, 원래의 항체의 아미노산 서열 중 혹은 N말단측 또는 C말단측에, 바람직하게는 1~20개, 보다 바람직하게는 1~5개, 더 바람직하게는 1~3개의 아미노산을 부가한다. 이들 아미노산의 부가, 치환 및 결실을 조합한 변이를 가한 항체도, 인간 항체이다. 변이를 가한 항체의 아미노산 서열은, 원래의 항체의 아미노산 서열과 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 나타내고, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 나타내고, 더 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 나타내고, 보다 더 바람직하게는 98% 이상의 상동성을 나타내는 것이다. 따라서, 본 발명에 있어서 「인간 유래의 유전자」라고 할 때는, 인간 유래의 원래의 유전자에 더하여, 이것에 개변을 가하는 것에 의해 얻어지는 유전자도 포함된다.

[0082] 또한, 「마우스 항체」라고 할 때는, 그 단백질 전체가 마우스 유래의 유전자로 코딩되는 항체와 동일한 아미노산 서열로 이루어지는 항체를 말한다. 따라서, 유전자의 발현 효율을 상승시키는 등의 목적으로, 원래의 마우스의 유전자에, 원래의 아미노산 서열에 변화를 주지 않고 변이를 가한 유전자로 코딩되는 항체도, 「마우스 항체」에 포함된다. 또한, 마우스 항체를 코딩하는 2개 이상의 유전자를 조합하여, 어떤 마우스 항체의 일부를, 다른 마우스 항체의 일부로 치환한 항체도, 마우스 항체에 포함된다. 마우스 항체는, 면역글로불린 경쇄의 3개소의 상보성 결정 영역(CDR)과 면역글로불린 중쇄의 3개소의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는다. 면역글로불린 경쇄의 3개소의 CDR은, N말단측에 있는 것으로부터 순차로 CDR1, CDR2 및 CDR3이라고 한다. 면역글로불린 중쇄의 3개소의 CDR도, N말단측에 있는 것으로부터 순차로 CDR1, CDR2 및 CDR3이라고 한다. 예를 들어, 어떤 마우스 항체의 CDR을, 다른 마우스 항체의 CDR로 치환하는 것에 의해, 마우스 항체의 항원 특이성, 친화성 등을 개변한 항체도, 마우스 항체에 포함된다.

[0083] 본 발명에 있어서, 원래의 마우스 항체의 유전자를 개변하는 것에 의해, 원래의 항체의 아미노산 서열에 치환,

결실, 부가 등의 변이를 가한 항체도, 「마우스 항체」에 포함된다. 원래의 항체의 아미노산 서열 중의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환하는 경우, 치환하는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~20개이고, 보다 바람직하게는 1~5개이며, 더 바람직하게는 1~3개이다. 원래의 항체의 아미노산 서열 중의 아미노산을 결실시키는 경우, 결실시키는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~20개이고, 보다 바람직하게는 1~5개이며, 더 바람직하게는 1~3개이다. 또한, 이들 아미노산의 치환과 결실을 조합한 변이를 가한 항체도, 마우스 항체이다. 아미노산을 부가하는 경우, 원래의 항체의 아미노산 서열 중 혹은 N말단측 또는 C말단측에, 바람직하게는 1~20개, 보다 바람직하게는 1~5개, 더 바람직하게는 1~3개의 아미노산을 부가한다. 이들 아미노산의 부가, 치환 및 결실을 조합한 변이를 가한 항체도, 마우스 항체이다. 변이를 가한 항체의 아미노산 서열은, 원래의 항체의 아미노산 서열과 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖고, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 나타내고, 더 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 나타내고, 보다 더 바람직하게는 98% 이상의 상동성을 나타내는 것이다. 따라서, 본 발명에 있어서 「마우스 유래의 유전자」라고 할 때는, 마우스 유래의 원래의 유전자에 더하여, 이것에 개변을 가하는 것에 의해 얻어지는 유전자도 포함된다.

[0084] 본 발명에 있어서, 「인간화 항체」란 말은, 가변 영역의 일부(예를 들어, 특히 CDR의 전부 또는 일부)의 아미노산 서열이 인간 이외의 포유동물 유래이며, 그 이외의 영역이 인간 유래인 항체를 말한다. 예를 들어, 인간화 항체로서, 인간 항체를 구성하는 면역글로불린 경쇄의 3개소의 상보성 결정 영역(CDR)과 면역글로불린 중쇄의 3개소의 상보성 결정 영역(CDR)을, 다른 포유동물의 CDR에 의해 치환하는 것에 의해 제작된 항체를 들 수 있다. 인간 항체의 적절한 위치에 이식되는 CDR의 유래가 되는 다른 포유동물의 생물종은, 인간 이외의 포유동물인 한 특별히 한정은 없지만, 바람직하게는, 마우스, 래트, 토끼, 말, 또는 인간 이외의 영장류이고, 보다 바람직하게는 마우스 및 래트이며, 예를 들어 마우스이다.

[0085] 본 발명에 있어서, 「키메라 항체」란 말은, 2개 이상의 상이한 종에서 유래하는, 2개 이상의 상이한 항체의 단편이 연결되어 이루어지는 항체를 말한다.

[0086] 인간 항체와 다른 포유동물의 항체의 키메라 항체란, 인간 항체의 일부가 인간 이외의 포유동물의 항체의 일부에 의해 치환된 항체이다. 항체는, Fc 영역, Fab 영역 및 힌지부로 이루어진다. 이와 같은 키메라 항체의 구체예로서, Fc 영역이 인간 항체에서 유래하는 한편으로 Fab 영역이 다른 포유동물의 항체에서 유래하는 키메라 항체를 들 수 있다. 힌지부는, 인간 항체 또는 다른 포유동물의 항체 중 어느 하나에서 유래한다. 반대로, Fc 영역이 다른 포유동물에서 유래하는 한편으로 Fab 영역이 인간 항체에서 유래하는 키메라 항체를 들 수 있다. 이 경우도 힌지부는, 인간 항체 또는 다른 포유동물의 항체 중 어느 것에서 유래해도 된다.

[0087] 또한, 항체는, 가변 영역과 정상 영역으로 이루어진다고 할 수도 있다. 키메라 항체의 다른 구체예로서, 중쇄의 정상 영역(C_H)과 경쇄의 정상 영역(C_L)이 인간 항체에서 유래하는 한편으로, 중쇄의 가변 영역(V_H) 및 경쇄의 가변 영역(V_L)이 다른 포유동물의 항체에서 유래하는 것, 반대로, 중쇄의 정상 영역(C_H)과 경쇄의 정상 영역(C_L)이 다른 포유동물의 항체에서 유래하는 한편으로, 중쇄의 가변 영역(V_H) 및 경쇄의 가변 영역(V_L)이 인간 항체에서 유래하는 것도 들 수 있다. 여기에서, 다른 포유동물의 생물종은, 인간 이외의 포유동물인 한 특별히 한정은 없지만, 바람직하게는, 마우스, 래트, 토끼, 말, 또는 인간 이외의 영장류이며, 보다 바람직하게는 마우스이다.

[0088] 마우스 항체와 다른 포유동물의 항체의 키메라 항체란, 마우스 항체의 일부가 마우스 이외의 포유동물의 항체의 일부로 치환된 항체이다. 이와 같은 키메라 항체의 구체예로서, Fc 영역이 마우스 항체에서 유래하는 한편으로 Fab 영역이 다른 포유동물의 항체에서 유래하는 키메라 항체나, 반대로, Fc 영역이 다른 포유동물에서 유래하는 한편으로 Fab 영역이 마우스 항체에서 유래하는 키메라 항체를 들 수 있다. 여기에서, 다른 포유동물의 생물종은, 마우스 이외의 포유동물인 한 특별히 한정은 없지만, 바람직하게는, 래트, 토끼, 말, 인간 이외의 영장류이다.

[0089] 인간 항체와 마우스 항체의 키메라 항체는, 특히, 「인간/마우스 키메라 항체」라고 한다. 인간/마우스 키메라 항체에는, Fc 영역이 인간 항체에서 유래하는 한편으로 Fab 영역이 마우스 항체에서 유래하는 키메라 항체나, 반대로, Fc 영역이 마우스 항체에서 유래하는 한편으로 Fab 영역이 인간 항체에서 유래하는 키메라 항체를 들 수 있다. 힌지부는, 인간 항체 또는 마우스 항체 중 어느 하나에서 유래한다. 인간/마우스 키메라 항체의 다른 구체예로서, 중쇄의 정상 영역(C_H)과 경쇄의 정상 영역(C_L)이 인간 항체에서 유래하는 한편으로, 중쇄의 가변 영역(V_H) 및 경쇄의 가변 영역(V_L)이 마우스 항체에서 유래하는 것, 반대로, 중쇄의 정상 영역(C_H)과 경쇄의 정상 영역(C_L)이 마우스 항체에서 유래하는 한편으로, 중쇄의 가변 영역(V_H) 및 경쇄의 가변 영역(V_L)이 인간 항체

에서 유래하는 것도 들 수 있다.

[0090] 항체는, 본래, 2본의 면역글로불린 경쇄와 2본의 면역글로불린 중쇄의 합계 4본의 폴리펩티드쇄로 이루어지는 기본 구조를 갖는다. 단, 본 발명에 있어서, 「항체」라고 할 때는, 이 기본 구조를 갖는 것에 더하여,

[0091] (1) 1본의 면역글로불린 경쇄와 1본의 면역글로불린 중쇄의 합계 2본의 폴리펩티드쇄로 이루어지는 것이나, 이하에 상술하는 바와 같이,

[0092] (2) 면역글로불린 경쇄의 C말단측에 링커 서열을, 그리고 추가로 그의 C말단측에 면역글로불린 중쇄를 결합시켜 이루어지는 것인 1본쇄 항체, 및

[0093] (3) 면역글로불린 중쇄의 C말단측에 링커 서열을, 그리고 추가로 그의 C말단측에 면역글로불린 경쇄를 결합시켜 이루어지는 것인 1본쇄 항체도 포함된다. 또한,

[0094] (4) 본래의 의미에서의 항체의 기본 구조로부터 Fc 영역이 결실된 것인 Fab 영역으로 이루어지는 것 및 Fab 영역과 힌지부의 전부 혹은 일부로 이루어지는 것(Fab, F(ab') 및 $F(ab')_2$를 포함한다)도,

[0095] 본 발명에 있어서의 「항체」에 포함된다.

[0096] 여기에서 Fab란, 가변 영역과 C_L 영역(경쇄의 정상 영역)을 포함하는 1본의 경쇄와, 가변 영역과 C_H1 영역(중쇄의 정상 영역의 부분 1)을 포함하는 1본의 중쇄가, 각각 존재하는 시스테인 잔기끼리로 다이설파이드 결합에 의해 결합한 분자를 말한다. Fab에 있어서, 중쇄는, 가변 영역과 C_H1 영역(중쇄의 정상 영역의 부분 1)에 더하여, 추가로 힌지부의 일부를 포함해도 되지만, 이 경우의 힌지부는, 힌지부에 존재하여 항체의 중쇄끼리를 결합하는 시스테인 잔기를 결여하는 것이다. Fab에 있어서, 경쇄와 중쇄는, 경쇄의 정상 영역(C_L 영역)에 존재하는 시스테인 잔기와, 중쇄의 정상 영역(C_H1 영역) 또는 힌지부에 존재하는 시스테인 잔기의 사이에 형성되는 다이설파이드 결합에 의해 결합한다. Fab는, 힌지부에 존재하여 항체의 중쇄끼리를 결합하는 시스테인 잔기를 결여하고 있으므로, 1본의 경쇄와 1본의 중쇄로 이루어진다. Fab를 구성하는 경쇄는, 가변 영역과 C_L 영역을 포함한다. Fab를 구성하는 중쇄는, 가변 영역과 C_H1 영역으로 이루어지는 것이어도 되고, 가변 영역, C_H1 영역에 더하여 힌지부의 일부를 포함하는 것이어도 된다. 단 이 경우, 힌지부에서 2본의 중쇄의 사이에서 다이설파이드 결합이 형성되지 않도록, 힌지부는 중쇄 사이를 결합하는 시스테인 잔기를 포함하지 않도록 선택된다. F(ab')에 있어서는, 그 중쇄는 가변 영역과 C_H1 영역에 더하여, 중쇄끼리를 결합하는 시스테인 잔기를 포함하는 힌지부의 전부 또는 일부를 포함한다. $F(ab')_2$는 2개의 F(ab')가 서로의 힌지부에 존재하는 시스테인 잔기끼리로 다이설파이드 결합에 의해 결합한 분자를 말한다. 또한, 복수의 항체가 직접 또는 링커를 개재시켜 결합하여 이루어지는 2량체, 3량체 등의 중합체도, 항체이다. 더욱이, 이들에 한정하지 않고, 면역글로불린 분자의 일부를 포함하고, 또한 항원에 특이적으로 결합하는 성질을 갖는 것은 어느 것도, 본 발명에서 말하는 「항체」에 포함된다. 즉, 본 발명에 있어서 면역글로불린 경쇄라고 할 때는, 면역글로불린 경쇄에서 유래하고, 그 가변 영역의 모두 또는 일부의 아미노산 서열을 갖는 것이 포함된다. 또한, 면역글로불린 중쇄라고 할 때는, 면역글로불린 중쇄에서 유래하고, 그 가변 영역의 모두 또는 일부의 아미노산 서열을 갖는 것이 포함된다. 따라서, 가변 영역의 모두 또는 일부의 아미노산 서열을 갖는 한, 예를 들어, Fc 영역이 결실된 것도, 면역글로불린 중쇄이다.

[0097] 또한, 여기에서 Fc 또는 Fc 영역이란, 항체 분자 중의, C_H2 영역(중쇄의 정상 영역의 부분 2), 및 C_H3 영역(중쇄의 정상 영역의 부분 3)으로 이루어지는 단편을 포함하는 영역을 말한다.

[0098] 더욱이, 본 발명에 있어서, 「항체」라고 할 때는,

[0099] (5) 상기 (4)에서 나타낸 Fab, F(ab') 또는 $F(ab')_2$를 구성하는 경쇄와 중쇄를, 링커 서열을 개재시켜 결합시켜, 각각 1본쇄 항체로 한 scFab, scF(ab'), 및 $scF(ab')_2$도 포함된다. 여기에서, scFab, scF(ab'), 및 $scF(ab')_2$에 있어서는, 경쇄의 C말단측에 링커 서열을, 그리고 추가로 그의 C말단측에 중쇄를 결합시켜 이루어지는 것이어도 되고, 또한, 중쇄의 C말단측에 링커 서열을, 그리고 추가로 그의 C말단측에 경쇄를 결합시켜 이루어지는 것이어도 된다. 더욱이, 경쇄의 가변 영역과 중쇄의 가변 영역을 링커 서열을 개재시켜 결합시켜 1본쇄 항체로 한 scFv도, 본 발명에 있어서의 항체에 포함된다. scFv에 있어서는, 경쇄의 가변 영역의 C말단측에 링커 서열을, 그리고 추가로 그의 C말단측에 중쇄의 가변 영역을 결합시켜 이루어지는 것이어도 되고, 또한, 중

쇄의 가변 영역의 C말단측에 링커 서열을, 그리고 추가로 그의 C말단측에 경쇄의 가변 영역을 결합시켜 이루어지는 것이어도 된다.

[0100] 본 발명에 있어서, 「1본쇄 항체」라고 할 때는, 면역글로불린 경쇄의 가변 영역의 모두 또는 일부를 포함하는 아미노산 서열의 C말단측에 링커 서열이 결합하고, 추가로 그의 C말단측에 면역글로불린 중쇄의 가변 영역의 모두 또는 일부를 포함하는 아미노산 서열이 결합하여 이루어지며, 특정의 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질을 말한다. 예를 들어, 상기 (2), (3) 및 (5)에 나타나는 것은 1본쇄 항체에 포함된다. 또한, 면역글로불린 중쇄의 가변 영역의 모두 또는 일부를 포함하는 아미노산 서열의 C말단측에 링커 서열이 결합하고, 추가로 그의 C말단측에 면역글로불린 경쇄의 가변 영역의 모두 또는 일부를 포함하는 아미노산 서열이 결합하여 이루어지며, 특정의 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질도, 본 발명에 있어서의 「1본쇄 항체」이다. 면역글로불린 중쇄의 C말단측에 링커 서열을 개재시켜 면역글로불린 경쇄가 결합한 1본쇄 항체에 있어서는, 통상, 면역글로불린 중쇄는, Fc 영역이 결실되어 있다. 면역글로불린 경쇄의 가변 영역은, 항체의 항원 특이성에 관여하는 상보성 결정 영역(CDR)을 3개 갖고 있다. 마찬가지로, 면역글로불린 중쇄의 가변 영역도, CDR을 3개 갖고 있다. 이들 CDR은, 항체의 항원 특이성을 결정하는 주된 영역이다. 따라서, 1본쇄 항체에는, 면역글로불린 중쇄의 3개의 CDR의 모두와, 면역글로불린 경쇄의 3개의 CDR의 모두가 포함되는 것이 바람직하다. 단, 항체의 항원 특이적인 친화성이 유지되는 한, CDR의 1개 또는 복수개를 결실시킨 1본쇄 항체로 할 수도 있다.

[0101] 1본쇄 항체에 있어서, 면역글로불린의 경쇄와 중쇄의 사이에 배치되는 링커 서열은, 바람직하게는 2~50개, 보다 바람직하게는 8~50개, 더 바람직하게는 10~30개, 보다 더 바람직하게는 12~18개 또는 15~25개, 예를 들어 15개 혹은 25개의 아미노산 잔기로 구성되는 펩티드쇄이다. 그와 같은 링커 서열은, 이것에 의해 양 쇄가 연결되어 이루어지는 항hTfR 항체가 hTfR에 대한 친화성을 유지하는 한, 그 아미노산 서열에 한정은 없지만, 바람직하게는, 글라이신만 또는 글라이신과 세린으로 구성되는 것이고, 예를 들어, 아미노산 서열 Gly-Ser, 아미노산 서열 Gly-Gly-Ser, 아미노산 서열 Gly-Gly-Gly, 아미노산 서열 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호 3), 아미노산 서열 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호 4), 또는 이들 아미노산 서열이 2~10회, 혹은 2~5회 반복된 서열을 갖는 것이다. 예를 들어, 면역글로불린 중쇄의 가변 영역의 전 영역으로 이루어지는 아미노산 서열의 C말단측에, 링커 서열을 개재시켜 면역글로불린 경쇄의 가변 영역을 결합시키는 경우, 아미노산 서열 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호 3)의 3개가 연속한 것에 상당하는 합계 15개의 아미노산으로 이루어지는 링커 서열이 적합하다.

[0102] 본 발명에 있어서, 「인간 트랜스페린 수용체」 또는 「hTfR」이란 말은, 서열 번호 5에 나타나는 아미노산 서열을 갖는 막단백질을 말한다. 본 발명의 항hTfR 항체는, 그의 일 실시태양에 있어서, 서열 번호 5로 나타나는 아미노산 서열 중 N말단측으로부터 89번째의 시스테인 잔기로부터 C말단의 페닐알라닌까지의 부분(hTfR의 세포외 영역)에 대해서 특이적으로 결합하는 것이지만, 이것에 한정되지 않는다. 또한, 본 발명에 있어서 「원숭이 트랜스페린 수용체」 또는 「원숭이 TfR」이란 말은, 특히, 필리핀원숭이(Macaca fascicularis) 유래의 서열 번호 6에 나타나는 아미노산 서열을 갖는 막단백질이다. 본 발명의 항hTfR 항체는, 그의 일 실시태양에 있어서, 서열 번호 6으로 나타나는 아미노산 서열 중 N말단측으로부터 89번째의 시스테인 잔기로부터 C말단의 페닐알라닌까지의 부분(원숭이 TfR의 세포외 영역)에 대해서도 결합하는 것이지만, 이것에 한정되지 않는다.

[0103] hTfR에 대한 항체의 제작 방법으로서는, hTfR 유전자를 짜넣은 발현 벡터를 도입한 세포를 이용하여, 재조합 인간 트랜스페린 수용체(rhTfR)를 제작하고, 이 rhTfR을 이용하여 마우스 등의 동물을 면역하여 얻는 방법이 일반적이다. 면역 후의 동물로부터 hTfR에 대한 항체 산생 세포를 취출하고, 이것과 미엘로마 세포를 융합시키는 것에 의해, 항체 산생능을 갖는 하이브리도마 세포를 제작할 수 있다.

[0104] 또한, 마우스 등의 동물로부터 얻은 면역계 세포를 체외 면역법에 의해 rhTfR로 면역하는 것에 의해서도, hTfR에 대한 항체를 산생하는 세포를 취득할 수 있다. 체외 면역법을 이용하는 경우, 그 면역계 세포가 유래하는 동물종에 특별히 한정은 없지만, 바람직하게는, 마우스, 래트, 토끼, 모르모트, 개, 고양이, 말, 및 인간을 포함하는 영장류이고, 보다 바람직하게는, 마우스, 래트 및 인간이며, 더 바람직하게는 마우스 및 인간이다. 마우스의 면역계 세포로서는, 예를 들어, 마우스의 비장으로부터 조제한 비세포를 이용할 수 있다. 인간의 면역계 세포로서는, 인간의 말초혈, 골수, 비장 등으로부터 조제한 세포를 이용할 수 있다. 인간의 면역계 세포를 체외 면역법에 의해 면역했을 경우, hTfR에 대한 인간 항체를 얻을 수 있다.

[0105] 체외 면역법에 의해 면역계 세포를 면역한 후, 세포를 미엘로마 세포와 융합시키는 것에 의해, 항체 산생능을 갖는 하이브리도마 세포를 제작할 수 있다. 또한, 면역 후의 세포로부터 mRNA를 추출하여 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 주형으로 하여 PCR 반응에 의해 면역글로불린의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 유전자를 포함하는 DNA 단편을

증폭하고, 이들을 이용하여 인공적으로 항체 유전자를 재구축할 수도 있다.

[0106] 상기 방법에 의해 얻어진 그대로의 하이브리도마 세포에는, hTfR 이외의 단백질을 항원으로서 인식하는 항체를 산생하는 세포도 포함된다. 또한, 항hTfR 항체를 산생하는 하이브리도마 세포의 모두가, hTfR에 대해서 원하는 친화성을 나타내는 항hTfR 항체를 산생한다고도 할 수 없다.

[0107] 마찬가지로, 인공적으로 재구축한 항체 유전자에는, hTfR 이외의 단백질을 항원으로서 인식하는 항체를 코딩하는 유전자도 포함된다. 또한, 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자의 모두가, hTfR에 대해서 원하는 친화성을 나타내는 항hTfR 항체를 코딩하는 등의 원하는 특성을 갖춘다고도 할 수 없다.

[0108] 따라서, 상기에서 얻어진 그대로의 하이브리도마 세포로부터, 원하는 특성(hTfR에 대한 고친화성 등)을 갖는 항체를 산생하는 하이브리도마 세포를 선택하는 스텝이 필요해진다. 또한, 인공적으로 재구축한 항체 유전자에 있어서는, 당해 항체 유전자로부터, 원하는 특성(hTfR에 대한 고친화성 등)을 갖는 항체를 코딩하는 유전자를 선택하는 스텝이 필요해진다.

[0109] 예를 들어, 항hTfR 항체에 대해서 고친화성의 항체를 산생하는 하이브리도마 세포를 선택하는 경우, 재조합 hTfR을 플레이트에 첨가하여 이것에 보지(保持)시킨 후, 하이브리도마 세포의 배양 상청을 첨가하고, 그 다음에 재조합 hTfR과 결합하고 있지 않는 항체를 플레이트로부터 제거하고, 플레이트에 보지된 항체의 양을 측정하는 방법이 이용된다. 이 방법에 의하면, 플레이트에 첨가한 하이브리도마 세포의 배양 상청에 포함되는 항체의 hTfR에 대한 친화성이 높을수록, 플레이트에 보지되는 항체의 양이 많아진다. 따라서, 플레이트에 보지된 항체의 양을 측정하여, 보다 많은 항체가 보지된 플레이트에 대응하는 하이브리도마 세포를, hTfR에 대해서 상대적으로 높은 친화성을 갖는 항hTfR 항체를 산생하는 세포주로서 선택할 수 있다. 이와 같이 하여 선택된 세포주로부터, mRNA를 추출하여 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 주형으로 하여, 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자를 포함하는 DNA 단편을, PCR법을 이용하여 증폭하는 것에 의해, 고친화성 항체를 코딩하는 유전자를 단리할 수도 있다.

[0110] 상기의 인공적으로 재구축한 항체 유전자로부터, 고친화성을 갖는 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자를 선택하는 경우는, 일단, 인공적으로 재구축한 항체 유전자를 발현 벡터에 짜넣고, 이 발현 벡터를 호스트 세포에 도입한다. 이 때, 호스트 세포로서 이용하는 세포로서는, 인공적으로 재구축한 항체 유전자를 짜넣은 발현 벡터를 도입하는 것에 의해 항체 유전자를 발현시킬 수 있는 세포이면 원핵세포, 진핵세포를 불문하고 특별히 한정은 없지만, 인간, 마우스, 차이니즈 햄스터 등의 포유동물 유래의 세포가 바람직하고, 특히 차이니즈 햄스터 난소 유래의 CHO 세포, 또는 마우스 골수종에서 유래하는 NS/0 세포가 바람직하다. 또한, 항체 유전자를 코딩하는 유전자를 짜넣어 발현시키기 위해서 이용하는 발현 벡터는, 포유동물 세포 내에 도입시켰을 때에, 해당 유전자를 발현시킬 수 있는 것이면 특별히 한정 없이 이용할 수 있다. 발현 벡터에 짜넣어진 해당 유전자는, 포유동물 세포 내에서 유전자의 전사의 빈도를 조절할 수 있는 DNA 서열(유전자 발현 제어 부위)의 하류에 배치된다. 본 발명에 있어서 이용할 수 있는 유전자 발현 제어 부위로서는, 예를 들어, 사이토메갈로바이러스 유래의 프로모터, SV40 초기 프로모터, 인간 신장 인자-1 알파(EF-1α) 프로모터, 인간 유비키틴 C 프로모터 등을 들 수 있다.

[0111] 이와 같은 발현 벡터가 도입된 포유동물 세포는, 발현 벡터에 짜넣어진 전술한 인공적으로 재구축한 유전자로 코딩되는 항체를 발현하게 된다. 이와 같이 하여 얻은, 인공적으로 재구축한 항체를 발현하는 세포로부터, 항hTfR 항체에 대해서 고친화성을 갖는 항체를 산생하는 세포를 선택하는 경우, 재조합 hTfR을 플레이트에 첨가하여 이것에 보지시킨 후, 재조합 hTfR에 세포의 배양 상청을 접촉시키고, 그 다음에, 재조합 hTfR과 결합하고 있지 않는 항체를 플레이트로부터 제거하고, 플레이트에 보지된 항체의 양을 측정하는 방법이 이용된다. 이 방법에 의하면, 세포의 배양 상청에 포함되는 항체의 hTfR에 대한 친화성이 높을수록, 플레이트에 보지된 항체의 양이 많아진다. 따라서, 플레이트에 보지된 항체의 양을 측정하여, 보다 많은 항체가 보지된 플레이트에 대응하는 세포를, hTfR에 대해서 상대적으로 높은 친화성을 갖는 항hTfR 항체를 산생하는 세포주로서 선택할 수 있고, 나아가서는, hTfR에 대해서 고친화성을 갖는 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자를 선택할 수 있다. 이와 같이 하여 선택된 세포주로부터, 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자를 포함하는 DNA 단편을, PCR법을 이용하여 증폭하는 것에 의해, 고친화성 항체를 코딩하는 유전자를 단리할 수 있다.

[0112] 상기의 인공적으로 재구축한 항체 유전자로부터의, 고친화성을 갖는 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자의 선택은, 인공적으로 재구축한 항체 유전자를 발현 벡터에 짜넣고, 이 발현 벡터를 대장균에 도입하고, 이 대장균을 배양하여 얻은 배양 상청 또는 대장균을 용해시켜 얻은 항체를 포함하는 용액을 이용하여, 전술한 하이브리도마 세포를 선택하는 경우와 마찬가지의 방법으로, 원하는 유전자를 갖는 대장균을 선택하는 것에 의해서도 할 수 있다. 선택된 대장균주는, hTfR에 대해서 상대적으로 높은 친화성을 갖는 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자를 발현

하는 것이다. 이 대장균주로부터, hTfR에 대해서 상대적으로 높은 친화성을 갖는 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자를 단리할 수 있다. 대장균의 배양 상청 중에 항체를 분비시키는 경우에는, N말단측에 분비 시그널 서열이 결합하도록 항체 유전자를 발현 벡터에 짜넣으면 된다.

[0113] 고친화성을 갖는 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자를 선택하는 다른 방법으로서, 전술한 인공적으로 재구축한 항체 유전자로 코딩된 항체를 파지 입자 상에 보지시켜 발현시키는 방법이 있다. 이 때, 항체 유전자는, 1본쇄 항체를 코딩하는 유전자로서 재구축된다. 항체를 파지 입자 상에 보지하는 방법은, 국제 공개 공보(WO1997/09436, WO1995/11317) 등에 기재되어 있어 주지이다. 인공적으로 재구축한 항체 유전자로 코딩된 항체를 보지하는 파지로부터, 항hTfR 항체에 대해서 고친화성을 갖는 항체를 보지하는 파지를 선택하는 경우, 재조합 hTfR을, 플레이트에 첨가하여 보지시킨 후, 파지와 접촉시키고, 그 다음에 플레이트로부터 재조합 hTfR과 결합하고 있지 않는 파지를 제거하고, 플레이트에 보지된 파지의 양을 측정하는 방법이 이용된다. 이 방법에 의하면, 파지 입자 상에 보지된 항체의 hTfR에 대한 친화성이 높을수록, 플레이트에 보지된 파지의 양이 많아진다. 따라서, 플레이트에 보지된 파지의 양을 측정하여, 보다 많은 파지가 보지된 플레이트에 대응하는 파지 입자를, hTfR에 대해서 상대적으로 높은 친화성을 갖는 항hTfR 항체를 산생하는 파지 입자로서 선택할 수 있고, 나아가서는, hTfR에 대해서 고친화성을 갖는 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자를 선택할 수 있다. 이와 같이 하여 선택된 파지 입자로부터, 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자를 포함하는 DNA 단편을, PCR법을 이용하여 증폭하는 것에 의해, 고친화성 항체를 코딩하는 유전자를 단리할 수 있다.

[0114] 상기의 항hTfR 항체에 대해서 고친화성을 갖는 항체를 산생하는 하이브리도마 세포 등의 세포, 또는 항hTfR 항체에 대해서 고친화성을 갖는 항체를 갖는 파지 입자로부터, cDNA 또는 파지 DNA를 조제하고, 이것을 주형으로 하여, 항hTfR 항체의 경쇄, 항hTfR 항체의 중쇄, 또는 항hTfR 항체인 1본쇄 항체의, 모두 또는 그 일부를 코딩하는 유전자를 포함하는 DNA 단편을, PCR법 등에 의해 증폭하여 단리할 수 있다. 마찬가지로 하여, 항hTfR 항체의 경쇄의 가변 영역의 모두 또는 그 일부를 코딩하는 유전자를 포함하는 DNA 단편, 항hTfR 항체의 중쇄의 가변 영역의 모두 또는 그 일부를 코딩하는 유전자를 포함하는 DNA 단편을, PCR법 등에 의해 증폭하여 단리할 수도 있다.

[0115] 이 고친화성을 갖는 항hTfR 항체의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 유전자의 모두 또는 그 일부를 발현 벡터에 짜넣고, 이 발현 벡터를 이용하여 포유동물 세포 등의 호스트 세포를 형질 전환하고, 얻어진 형질 전환 세포를 배양하는 것에 의해, 고친화성을 갖는 항hTfR 항체를 산생시킬 수 있다. 단리된 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자의 염기 서열로부터 항hTfR 항체의 아미노산 서열을 번역하여, 이 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 단편을 인공적으로 합성할 수도 있다. DNA 단편을 인공적으로 합성하는 경우, 적절한 코돈을 선택하는 것에 의해, 호스트 세포에 있어서의 항hTfR 항체의 발현량을 증가시킬 수 있다.

[0116] 원래의 항hTfR 항체의 아미노산 서열에 치환, 결실, 부가 등의 변이를 가하기 위해서, 단리된 DNA 단편에 포함되는 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자에, 적절히 변이를 가할 수도 있다. 변이를 가한 후의 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자는, 원래의 유전자와 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖는 것이고, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 갖는 것이지만, hTfR에 대한 친화성이 없어지지 않는 한, 상동성에 특별히 제한은 없다. 아미노산 서열에 변이를 가하는 것에 의해, 항hTfR 항체와 결합하는 당쇄의 수, 당쇄의 종류를 개변하여, 생체 내에 있어서의 항hTfR 항체의 안정성을 증가시키는 것 등도 할 수 있다.

[0117] 항hTfR 항체의 경쇄의 가변 영역의 모두 또는 그 일부를 코딩하는 유전자에 변이를 가하는 경우에 있어서는, 변이를 가한 후의 유전자는, 원래의 유전자와 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖는 것이고, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 갖는 것이지만, hTfR에 대한 친화성이 없어지지 않는 한, 상동성에 특별히 제한은 없다. 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환시키는 경우, 치환시키는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~10개이고, 보다 바람직하게는 1~5개이며, 더 바람직하게는 1~3개이고, 보다 더 바람직하게는 1~2개이다. 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열 중의 아미노산을 결실시키는 경우, 결실시키는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~10개이고, 보다 바람직하게는 1~5개이며, 더 바람직하게는 1~3개이고, 보다 더 바람직하게는 1~2개이다. 또한, 이들 아미노산의 치환과 결실을 조합한 변이를 가할 수도 있다. 경쇄의 가변 영역에 아미노산을 부가시키는 경우, 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열 중 혹은 N말단측 또는 C말단측에, 바람직하게는 1~10개, 보다 바람직하게는 1~5개, 더 바람직하게는 1~3개, 보다 더 바람직하게는 1~2개의 아미노산이 부가된다. 이들 아미노산의 부가, 치환 및 결실을 조합한 변이를 가할 수도 있다. 변이를 가한 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열은, 원래의 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열과 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖고, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 나타내고, 더 바람직하게는, 95% 이상의 상동성을 나타낸다. 특히, CDR의 아미노산 서열의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환시키는 경우, 치환시키는 아미노산의 개수는,

바람직하게는 1~5개이고, 보다 바람직하게는 1~3개이며, 더 바람직하게는 1~2개이다. CDR의 아미노산 서열 중의 아미노산을 결실시키는 경우, 결실시키는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~5개이고, 보다 바람직하게는 1~3개이며, 더 바람직하게는 1~2개이다. 또한, 이들 아미노산의 치환과 결실을 조합한 변이를 가할 수도 있다. 아미노산을 부가시키는 경우, 당해 아미노산 서열 중 혹은 N말단측 또는 C말단측에, 바람직하게는 1~5개, 보다 바람직하게는 1~3개, 더 바람직하게는 1~2개의 아미노산이 부가된다. 이들 아미노산의 부가, 치환 및 결실을 조합한 변이를 가할 수도 있다. 변이를 가한 각 CDR의 각각의 아미노산 서열은, 원래의 각 CDR의 아미노산 서열과 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖고, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 나타내고, 더 바람직하게는, 95% 이상의 상동성을 나타낸다.

[0118] 항hTfR 항체의 중쇄의 가변 영역의 모두 또는 그 일부를 코딩하는 유전자에 변이를 가하는 경우에 있어서는, 변이를 가한 후의 유전자는, 원래의 유전자와 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖는 것이고, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 갖는 것이지만, hTfR에 대한 친화성이 없어지지 않는 한, 상동성에 특별히 제한은 없다. 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환시키는 경우, 치환시키는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~10개이고, 보다 바람직하게는 1~5개이며, 더 바람직하게는 1~3개이고, 보다 더 바람직하게는 1~2개이다. 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열 중의 아미노산을 결실시키는 경우, 결실시키는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~10개이고, 보다 바람직하게는 1~5개이며, 더 바람직하게는 1~3개이고, 보다 더 바람직하게는 1~2개이다. 또한, 이들 아미노산의 치환과 결실을 조합한 변이를 가할 수도 있다. 중쇄의 가변 영역에 아미노산을 부가시키는 경우, 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열 중 혹은 N말단측 또는 C말단측에, 바람직하게는 1~10개, 보다 바람직하게는 1~5개, 더 바람직하게는 1~3개, 보다 더 바람직하게는 1~2개의 아미노산이 부가된다. 이들 아미노산의 부가, 치환 및 결실을 조합한 변이를 가할 수도 있다. 변이를 가한 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열은, 원래의 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열과 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖고, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 나타내고, 더 바람직하게는, 95% 이상의 상동성을 나타낸다. 특히, CDR의 아미노산 서열의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환시키는 경우, 치환시키는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~5개이고, 보다 바람직하게는 1~3개이며, 더 바람직하게는 1~2개이다. CDR의 아미노산 서열 중의 아미노산을 결실시키는 경우, 결실시키는 아미노산의 개수는, 바람직하게는 1~5개이고, 보다 바람직하게는 1~3개이며, 더 바람직하게는 1~2개이다. 또한, 이들 아미노산의 치환과 결실을 조합한 변이를 가할 수도 있다. 아미노산을 부가시키는 경우, 당해 아미노산 서열 중 혹은 N말단측 또는 C말단측에, 바람직하게는 1~5개, 보다 바람직하게는 1~3개, 더 바람직하게는 1~2개의 아미노산이 부가된다. 이들 아미노산의 부가, 치환 및 결실을 조합한 변이를 가할 수도 있다. 변이를 가한 각 CDR의 각각의 아미노산 서열은, 원래의 각 CDR의 아미노산 서열과 바람직하게는 80% 이상의 상동성을 갖고, 보다 바람직하게는 90% 이상의 상동성을 나타내고, 더 바람직하게는, 95% 이상의 상동성을 나타낸다.

[0119] 상기의 항hTfR 항체의 경쇄의 가변 영역으로의 변이와, 상기의 항hTfR 항체의 중쇄의 가변 영역으로의 변이를 조합하여, 항hTfR 항체의 경쇄와 중쇄의 가변 영역의 양쪽에 변이를 가할 수도 있다.

[0120] 상기의 항hTfR 항체의 경쇄 및 중쇄의 아미노산 서열 중의 아미노산의 다른 아미노산으로의 치환으로서는, 예를 들어, 방향족 아미노산(Phe, Trp, Tyr), 지방족 아미노산(Gly, Ala, Leu, Ile, Val), 아마이드형 아미노산(Gln, Asn), 염기성 아미노산(Lys, Arg, His), 산성 아미노산(Glu, Asp), 수산기를 갖는 아미노산(Ser, Thr), 분지 아미노산(Val, Leu, Ile), 측쇄가 작은 아미노산(Gly, Ala, Ser, Thr, Met), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산(Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Met) 등의 동일한 그룹으로 분류되는 아미노산끼리의 치환을 들 수 있다. 이와 같은 유사 아미노산에 의한 치환은, 단백질의 표현형에 변화를 가져오지 않을(즉, 보존적 아미노산 치환일) 것이 예측된다. 보존적 아미노산 치환의 구체예는 당해 기술 분야에서 주지이며, 여러 가지 문헌에 기재되어 있다(예를 들어, Bowie 등, Science, 247:1306-1310(1990)을 참조).

[0121] 한편, 항hTfR 항체에 변이를 가하여 C말단 또는 N말단에 아미노산을 부가했을 경우에 있어서, 당해 아미노산을 개재시켜 항hTfR 항체와 근육에 있어서 기능시켜야 할 약제(생리 활성 단백질을 포함한다)를 결합시켰을 때는, 당해 아미노산은, 결합체에 있어서 항hTfR 항체의 일부를 구성하는 것으로 한다.

[0122] 상기의 방법 등에 의해 선택된 hTfR에 대해서 비교적 높은 친화성을 갖는 항hTfR 항체를 산생하는 세포를 배양하여 얻어지는 항hTfR 항체, 및 고친화성을 갖는 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자를 발현시켜 얻어지는 항hTfR 항체는, 그 아미노산 서열에 치환, 결실, 부가 등의 변이를 도입하는 것에 의해 원하는 특성을 갖는 항체로 개변시킬 수도 있다. 항hTfR 항체의 아미노산 서열로의 변이의 도입은, 그 아미노산 서열에 대응하는 유전자에 변이를 가하는 것에 의해 행해진다.

[0123] 항hTfR 항체는, 그 항체의 가변 영역의 아미노산 서열에 치환, 결실, 부가 등의 변이를 가하는 것에 의해, 항체의 hTfR에 대한 친화성을 적절히 조정할 수 있다. 예를 들어, 항체와 항원의 친화성이 높고, 수성액 중에서의 해리 상수가 현저히 낮은 경우, 이것을 생체 내에 투여했을 때에, 항체가 항원과 해리되지 않고, 그 결과, 기능상의 문제가 생길 가능성이 있다. 이와 같은 경우에, 항체의 가변 영역에 변이를 도입하는 것에 의해, 해리 상수를, 원래의 항체의 2~5배, 5~10배, 10~100배 등으로 단계적으로 조정하여, 목적에 합치한 가장 바람직한 항체를 획득 할 수 있다. 반대로, 당해 변이의 도입에 의해, 해리 상수를, 원래의 항체의 1/2~1/5배, 1/5~1/10배, 1/10~1/100배 등으로 단계적으로 조정할 수도 있다.

[0124] 항hTfR 항체의 아미노산 서열로의 치환, 결실, 부가 등의 변이의 도입은, 예를 들어, 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자를 주형으로 하여, PCR 등의 방법에 의해, 유전자의 염기 서열의 특정의 부위에 변이를 도입하거나, 또는 랜덤으로 변이를 도입하는 것에 의해 행할 수 있다.

[0125] 항체와 hTfR의 친화성의 조정을 목적으로 한, 항hTfR 항체의 아미노산 서열로의 변이의 도입은, 예를 들어, 1본쇄 항체인 항hTfR 항체를 코딩하는 유전자를 파지미드에 짜넣고, 이 파지미드를 이용하여 캡시드 표면 상에 1본쇄 항체를 발현시킨 파지를 제작하고, 변이원 등을 작용시키는 것에 의해 1본쇄 항체를 코딩하는 유전자 상에 변이를 도입시키면서 파지를 증식시키고, 증식시킨 파지로부터, 원하는 해리 상수를 갖는 1본쇄 항체를 발현하는 파지를, 전술한 방법에 의해 선택하거나, 또는 일정 조건하에서 항원 컬럼을 이용하여 정제하는 것에 의해, 얻을 수 있다.

[0126] 상기의 고친화성 항체를 산생하는 세포를 선택하는 방법에 의해 얻어진, hTfR에 대해서 상대적으로 높은 친화성을 갖는 항체는, 인간 이외의 동물의 항체인 경우, 인간화 항체로 할 수 있다. 인간화 항체란, 항원에 대한 특이성을 유지하면서, 인간 이외의 동물의 항체의 가변 영역의 일부(예를 들어, 특히 CDR의 전부 또는 일부)의 아미노산 서열에 의해 인간 항체의 적절한 영역을 치환하여(이식하여) 얻어지는 항체이다. 예를 들어, 인간화 항체로서, 인간 항체를 구성하는 면역글로불린 경쇄의 3개소의 상보성 결정 영역(CDR)과 면역글로불린 중쇄의 3개소의 상보성 결정 영역(CDR)을, 다른 포유동물의 CDR로 치환한 항체를 들 수 있다. 인간 항체에 짜넣어지는 CDR이 유래하는 생물종은, 인간 이외의 포유동물인 한 특별히 한정은 없지만, 바람직하게는, 마우스, 래트, 토끼, 말, 인간 이외의 영장류이고, 보다 바람직하게는 마우스 및 래트이며, 더 바람직하게는 마우스이다. 여기에서, 비인간 포유동물의 항체의 CDR뿐만 아니라, CDR의 구조 유지 혹은 항원과의 결합에 관여하고 있는 CDR 외의 영역의 아미노산 서열에 의해, 억셉터가 되는 인간 항체의 대응하는 개소를 치환하는 것이, 도너 항체가 가지는 본래의 활성을 재현하기 위해서 필요한 경우가 있음도 주지이다. CDR 외의 영역은, 프레임워크 영역(FR)이라고도 한다. 즉, 인간화 항체의 제작은, 인간 항체의 가변 영역의 CDR(과 경우에 따라 그 주변의 FR) 대신에, 비인간 포유동물의 항체의 CDR(과 경우에 따라 그 주변의 FR)을 이식하는 작업을 포함한다.

[0127] 이상과 같이, 인간화 항체에 있어서, 원래의 인간 항체의 가변 영역에 이식되는 비인간 포유동물의 항체의 영역은, 일반적으로, CDR 그 자체, 또는 CDR과 그 주변의 FR을 포함한다. 단, CDR과 함께 이식되는 FR도, CDR의 구조 유지 혹은 항원과의 결합에 관여하고 있어, 실질적으로 항체의 상보성을 결정하는 기능을 갖는다고 생각되므로, 본 발명에 있어서 「CDR」이란 말은, 인간화 항체를 제작하는 경우에, 비인간 포유동물의 항체로부터 인간화 항체에 이식되거나, 또는 이식될 수 있는 영역을 말한다. 즉, 일반적으로 FR로 여겨지는 영역이어도, 그것이 CDR의 구조 유지 혹은 항원과의 결합에 관여하고 있어, 실질적으로 항체의 상보성을 결정하는 기능을 갖고 있다고 생각되는 것인 한, 본 발명에 있어서는 CDR에 포함한다.

[0128] 항hTfR 항체가, 인간화 항체 또는 인간 항체인 경우에 대해, 이하에 더욱 상세히 설명한다. 인간 항체의 경쇄에는, λ쇄와 κ쇄가 있다. 항hTfR 항체를 구성하는 경쇄는, λ쇄와 κ쇄의 어느 것이어도 된다. 또한, 인간의 중쇄에는, γ쇄, μ쇄, α쇄, σ쇄 및 ε쇄가 있고, 각각, IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE에 대응하고 있다. 항hTfR 항체를 구성하는 중쇄는, γ쇄, μ쇄, α쇄, σ쇄 및 ε쇄의 어느 것이어도 되지만, 바람직하게는 γ쇄이다. 더욱이, 인간의 중쇄의 γ쇄에는, γ1쇄, γ2쇄, γ3쇄 및 γ4쇄가 있고, 각각, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4에 대응하고 있다. 항hTfR 항체를 구성하는 중쇄가 γ쇄인 경우, 그 γ쇄는, γ1쇄, γ2쇄, γ3쇄 및 γ4쇄의 어느 것이어도 되지만, 바람직하게는, γ1쇄 또는 γ4쇄이다. 항hTfR 항체가, 인간화 항체 또는 인간 항체이며, 또한 IgG인 경우, 인간 항체의 경쇄는 λ쇄와 κ쇄의 어느 것이어도 되고, 인간 항체의 중쇄는, γ1쇄, γ2쇄, γ3쇄 및 γ4쇄의 어느 것이어도 되지만, 바람직하게는, γ1쇄 또는 γ4쇄이다. 예를 들어, 바람직한 항hTfR 항체의 하나의 태양으로서, 경쇄가 λ쇄이며 중쇄가 γ4쇄인 것, 경쇄가 λ쇄이며 중쇄가 γ1쇄인 것을 들 수 있다.

[0129] 본 발명에 있어서, 항hTfR 항체와 결합시켜 결합체로 해야 할 약제(생리 활성 단백질을 포함한다)는, 근육에 있

어서 기능시켜야 할 약제이다. 항hTfR 항체와 그와 같은 약제를 결합시키는 방법으로서는, 비펩티드 링커 또는 펩티드 링커를 개재시켜 결합시키는 방법이 있다. 비펩티드 링커로서는, 폴리에틸렌 글라이콜, 폴리프로필렌 글라이콜, 에틸렌 글라이콜과 프로필렌 글라이콜의 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올, 폴리바이닐 알코올, 다당류, 덱스트란, 폴리바이닐 에터, 생분해성 고분자, 지질 중합체, 키틴류, 및 히알루론산, 또는 이들의 유도체, 혹은 이들을 조합한 것을 이용할 수 있다. 펩티드 링커는, 펩티드 결합한 1~50개의 아미노산으로 구성되는 펩티드쇄 혹은 그의 유도체로서, 그 N말단과 C말단이, 각각 항hTfR 항체 및 약제 중 어느 하나와 공유 결합을 형성하는 것에 의해, 항hTfR 항체와 약제를 결합시키는 것이다.

[0130] 비펩티드 링커로서 PEG를 이용하여 본 발명의 항hTfR 항체와 약제를 결합시킨 것은, 특히, 항hTfR 항체-PEG-약제라고 한다. 항hTfR 항체-PEG-약제는, 항hTfR 항체와 PEG를 결합시켜 항hTfR 항체-PEG를 제작하고, 그 다음에 항hTfR 항체-PEG와 약제를 결합시키는 것에 의해 제조할 수 있다. 또는, 항hTfR 항체-PEG-약제는, 약제와 PEG를 결합시켜 약제-PEG를 제작하고, 그 다음에 약제-PEG와 항hTfR 항체를 결합시키는 것에 의해서도 제조할 수 있다. PEG를 항hTfR 항체 및 약제와 결합시킬 때에는, 카보네이트, 카보닐이미다졸, 카복실산의 활성 에스터, 아즈락톤, 환상 이미드싸이온, 아이소사이아네이트, 아이소싸이오사이아네이트, 이미데이트, 또는 알데하이드 등의 작용기로 수식된 PEG가 이용된다. 이들 PEG에 도입된 작용기가, 주로 항hTfR 항체 및 약제 분자 내의 아미노기와 반응하는 것에 의해, PEG와 hTfR 항체 및 약제가 공유 결합한다. 이 때 이용되는 PEG의 분자량 및 형상에 특별히 한정은 없지만, 그 평균 분자량(MW)은, 바람직하게는 MW=500~60000이고, 보다 바람직하게는 MW=500~20000이다. 예를 들어, 평균 분자량이 약 300, 약 500, 약 1000, 약 2000, 약 4000, 약 10000, 약 20000 등인 PEG는, 비펩티드 링커로서 적합하게 사용할 수 있다.

[0131] 예를 들어, 항hTfR 항체-PEG는, 항hTfR 항체와 알데하이드기를 작용기로서 갖는 폴리에틸렌 글라이콜(ALD-PEG-ALD)을, 해당 항체에 대한 ALD-PEG-ALD의 몰비가 11, 12. 5, 15, 110, 120 등이 되도록 혼합하고, 이것에 $NaCNBH_3$ 등의 환원제를 첨가하여 반응시키는 것에 의해 얻어진다. 그 다음에, 항hTfR 항체-PEG를, $NaCNBH_3$ 등의 환원제의 존재하에서, 약제와 반응시키는 것에 의해, 항hTfR 항체-PEG-약제가 얻어진다. 반대로, 먼저 약제와 ALD-PEG-ALD를 결합시켜 약제-PEG를 제작하고, 그 다음에 약제-PEG와 항hTfR 항체를 결합시키는 것에 의해서도, 항hTfR 항체-PEG-약제를 얻을 수 있다.

[0132] 약제가 생리 활성 단백질(목적 단백질)인 경우에 있어서는, 항hTfR 항체와 목적 단백질은, 항hTfR 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C말단측 또는 N말단측에, 링커 서열을 개재시켜 또는 직접적으로, 각각 목적 단백질의 N말단 또는 C말단을 펩티드 결합에 의해 결합시킬 수도 있다. 이와 같이 항hTfR 항체와 목적 단백질을 결합시켜 이루어지는 융합 단백질은, 항hTfR 항체의 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 cDNA의 3'말단측 또는 5'말단측에, 직접 또는 링커 서열을 코딩하는 DNA 서열을 끼워, 목적 단백질을 코딩하는 cDNA가 인프레임으로 배치된 DNA 단편을, 포유동물 세포용의 발현 벡터에 짜넣고, 이 발현 벡터를 도입한 포유동물 세포를 배양하는 것에 의해, 얻을 수 있다. 이 포유동물 세포에는, 목적 단백질을 코딩하는 DNA 단편을 중쇄와 결합시키는 경우에 있어서는, 항hTfR 항체의 경쇄를 코딩하는 cDNA 단편을 짜넣은 포유동물 세포용의 발현 벡터도, 동일한 호스트 세포에 도입되고, 또한, 목적 단백질을 코딩하는 DNA 단편을 경쇄와 결합시키는 경우에 있어서는, 항hTfR 항체의 중쇄를 코딩하는 cDNA 단편을 짜넣은 포유동물 세포용의 발현 벡터도, 동일한 호스트 세포에 도입된다. 항hTfR 항체가 1본쇄 항체인 경우, 항hTfR 항체와 목적 단백질을 결합시킨 융합 단백질은, 목적 단백질을 코딩하는 cDNA의 5'말단측 또는 3'말단측에, 직접, 또는 링커 서열을 코딩하는 DNA 서열을 끼워, 1본쇄 항hTfR 항체를 코딩하는 cDNA를 연결한 DNA 단편을, (포유동물 세포, 효모 등의 진핵생물 또는 대장균 등의 원핵생물 세포용의) 발현 벡터에 짜넣고, 이 발현 벡터를 도입한 이들 세포 중에서 발현시키는 것에 의해, 얻을 수 있다. 한편, 융합 단백질은 결합체의 일 형태로서 이해되어야 할 것이다.

[0133] 항hTfR 항체의 경쇄의 C말단측에 목적 단백질을 결합시킨 타입의 융합 단백질은, 항인간 트랜스페린 수용체 항체가, 경쇄의 가변 영역의 모두 또는 일부를 포함하는 아미노산 서열과, 중쇄의 가변 영역의 모두 또는 일부를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것이고, 목적 단백질이, 이 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 경쇄의 C말단측에 결합한 것이다. 여기에서 항hTfR 항체의 경쇄와 목적 단백질은, 직접 결합해도 되고, 링커를 개재시켜 결합해도 된다.

[0134] 항hTfR 항체의 중쇄의 C말단측에 목적 단백질을 결합시킨 타입의 융합 단백질은, 항인간 트랜스페린 수용체 항체가, 경쇄의 가변 영역의 모두 또는 일부를 포함하는 아미노산 서열과, 중쇄의 가변 영역의 모두 또는 일부를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것이고, 목적 단백질이, 이 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 중쇄의 C말단측에 결합한 것이다. 여기에서 항hTfR 항체의 중쇄와 목적 단백질은, 직접 결합해도 되고, 링커를 개재시켜 결

합해도 된다.

[0135] 항hTfR 항체의 경쇄의 N말단측에 목적 단백질을 결합시킨 타입의 융합 단백질은, 항인간 트랜스페린 수용체 항체가, 경쇄의 가변 영역의 모두 또는 일부를 포함하는 아미노산 서열과, 중쇄의 가변 영역의 모두 또는 일부를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것이고, 목적 단백질이, 이 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 경쇄의 N말단측에 결합한 것이다. 여기에서 항hTfR 항체의 경쇄와 목적 단백질은, 직접 결합해도 되고, 링커를 개재시켜 결합해도 된다.

[0136] 항hTfR 항체의 중쇄의 N말단측에 목적 단백질을 결합시킨 타입의 융합 단백질은, 항인간 트랜스페린 수용체 항체가, 경쇄의 가변 영역의 모두 또는 일부를 포함하는 아미노산 서열과, 중쇄의 가변 영역의 모두 또는 일부를 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 것이고, 목적 단백질이, 이 항인간 트랜스페린 수용체 항체의 중쇄의 N말단측에 결합한 것이다. 여기에서 항hTfR 항체의 중쇄와 목적 단백질은, 직접 결합해도 되고, 링커를 개재시켜 결합해도 된다.

[0137] 이 때 항hTfR 항체와 목적 단백질의 사이에 배치되는 링커 서열은, 바람직하게는 1~50개, 보다 바람직하게는 1~17개, 더 바람직하게는 1~10개, 보다 더 바람직하게는 1~5개의 아미노산으로 구성되는 펩티드쇄이지만, 항hTfR 항체에 결합시켜야 할 목적 단백질에 따라, 링커 서열을 구성하는 아미노산의 개수는, 1개, 2개, 3개, 1~17개, 1~10개, 10~40개, 20~34개, 23~31개, 25~29개 등으로 적절히 조정할 수 있다. 그와 같은 링커 서열은, 이것에 의해 연결된 항hTfR 항체가 hTfR과의 친화성을 유지하고, 또한 당해 링커 서열에 의해 연결된 목적 단백질이, 생리적 조건하에서 당해 단백질의 생리 활성을 발휘할 수 있는 한, 그 아미노산 서열에 한정은 없지만, 바람직하게는, 글라이신과 세린으로 구성되는 것이고, 예를 들어, 글라이신 또는 세린의 어느 1개의 아미노산으로 이루어지는 것, 아미노산 서열 Gly-Ser, 아미노산 서열 Gly-Gly-Ser, 아미노산 서열 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호 3), 아미노산 서열 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호 4), 또는 이들 아미노산 서열이 1~10개, 혹은 2~5개 연속하여 이루어지는 1~50개의 아미노산으로 이루어지는 서열, 2~17개, 2~10개, 10~40개, 20~34개, 23~31개, 또는 25~29개의 아미노산으로 이루어지는 서열 등을 갖는 것이다. 예를 들어, 아미노산 서열 Gly-Ser을 갖는 것은 링커 서열로서 적합하게 이용할 수 있다.

[0138] 항hTfR 항체가 인간화 항체 또는 인간 항체인 경우, 항hTfR 항체와 목적 단백질은, 항hTfR 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N말단(또는 C말단)에, 링커 서열을 개재시켜 또는 직접적으로, 목적 단백질의 C말단(또는 N말단)을, 각각 펩티드 결합에 의해 결합시킬 수 있다. 목적 단백질을 항hTfR 항체의 중쇄의 N말단측(또는 C말단측)에 결합시키는 경우, 항hTfR 항체의 γ쇄, μ쇄, α쇄, σ쇄 또는 ε쇄의 N말단(또는 C말단)에, 링커 서열을 개재시켜 또는 직접적으로, 목적 단백질의 C말단(또는 N말단)이, 펩티드 결합에 의해 각각 결합된다. 항hTfR 항체의 경쇄의 N말단측(또는 C말단측)에 목적 단백질을 결합시키는 경우, 항hTfR 항체의 λ쇄 또는 κ쇄의 N말단(또는 C말단)에, 링커 서열을 개재시켜 또는 직접적으로, 목적 단백질의 C말단(또는 N말단)이, 펩티드 결합에 의해 각각 결합된다. 단, 항hTfR 항체가, Fab 영역으로 이루어지는 것 또는 Fab 영역과 힌지부의 전부 혹은 일부로 이루어지는 것(Fab, $F(ab')_2$ 및 F(ab'))인 경우, 목적 단백질은, Fab, $F(ab')_2$ 및 F(ab')를 구성하는 중쇄 또는 경쇄의 N말단(또는 C말단)에, 링커 서열을 개재시켜 또는 직접적으로, 그 C말단(또는 N말단)을 펩티드 결합에 의해 각각 결합시킬 수 있다.

[0139] 항hTfR 항체와 목적 단백질의 융합 단백질에 있어서, 항hTfR 항체가 1본쇄 항체인 경우, 면역글로불린 경쇄의 가변 영역의 모두 또는 일부를 포함하는 아미노산 서열과, 면역글로불린 중쇄의 가변 영역의 모두 또는 일부를 포함하는 아미노산 서열은, 일반적으로 링커 서열을 개재시켜, 결합된다. 이 때, hTfR에 대한 항hTfR 항체의 친화성이 유지되는 한, 경쇄 유래의 아미노산 서열의 C말단측에 링커 서열이 결합하고, 추가로 그의 C말단측에 중쇄 유래의 아미노산 서열이 결합해도 되고, 또한 이것과는 반대로, 중쇄 유래의 아미노산 서열의 C말단측에 링커 서열이 결합하고, 추가로 그의 C말단측에 경쇄 유래의 아미노산 서열이 결합해도 된다. 1본쇄 항체가 scFv여도 마찬가지이다.

[0140] 여기에서 면역글로불린의 경쇄와 중쇄의 사이에 배치되는 링커 서열은, 바람직하게는 2~50개, 보다 바람직하게는 8~50개, 더 바람직하게는 10~30개, 보다 더 바람직하게는 12~18개 또는 15~25개, 예를 들어 15개 혹은 25개의 아미노산으로 구성되는 펩티드쇄이다. 그와 같은 링커 서열은, 이것에 의해 양 쇄가 연결되어 이루어지는 항hTfR 항체가 hTfR과 친화성을 유지하고 또한 당해 항체에 결합한 목적 단백질이, 생리적 조건하에서 그 생리 활성을 발휘할 수 있는 한, 그 아미노산 서열에 한정은 없지만, 바람직하게는, 글라이신만 또는 글라이신과 세린으로 구성되는 것이고, 예를 들어, 아미노산 서열 Gly-Ser, 아미노산 서열 Gly-Gly-Ser, 아미노산 서열 Gly-Gly-Gly, 아미노산 서열 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호 3), 아미노산 서열 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열

번호 4), 또는 이들 아미노산 서열이 2~10개, 혹은 2~5개 연속하여 이루어지는 서열을 갖는 것이다. 링커 서열의 바람직한 일 태양으로서, 아미노산 서열 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(서열 번호 3)이 3개 연속하여 이루어지는 15개의 아미노산으로 이루어지는 서열을 들 수 있다.

[0141] 항hTfR 항체가 1본쇄 항체인 경우에 있어서의 이와 같은 융합 단백질은, 예를 들어, 융합 단백질을 코딩하는 염기 서열을 갖는 DNA 단편을 짜넣은 발현 벡터로 포유동물 세포 등의 호스트 세포를 형질 전환시키고, 이 호스트 세포를 배양하는 것에 의해 제조할 수 있다.

[0142] 한편, 본 발명에 있어서, 1개의 펩티드쇄에 복수의 링커 서열이 포함되는 경우, 편의상, 각 링커 서열은 N말단측으로부터 순차로, 제 1 링커 서열, 제 2 링커 서열과 같이 명명한다.

[0143] 항hTfR 항체와 융합시켜야 할 목적 단백질에는, 그 단백질이 근육에 있어서 기능시켜야 할 것인 한, 특별히 제한은 없다. 목적 단백질로서 바람직한 것으로서, 예를 들어, 근육에 기능 장애를 일으키는 리소좀병의 원인 유전자로 코딩되는 리소좀 효소가 있다. 이와 같은 리소좀 효소에는, 인간 산성 α-글루코시다제(hGAA), 인간 α-갈락토시다제 A가 있지만, 이것에 한정하지 않고, α-L-이두로니다제(IDUA), 이두론산-2-설파타제(IDS), 글루코세레브로시다제(GBA), β-갈락토시다제, GM2 활성화 단백질, β-헥소사미니다제 A, β-헥소사미니다제 B, N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스페라제, α-만노시다제(LAMAN), β-만노시다제, 갈락토실세라미다제(GALC), 사포신 C, 아릴설파타제 A(ARSA), α-L-푸코시다제(FUCA1), 아스파틸글루코사미니다제, α-N-아세틸갈락토사미니다제, 산성 스핑고미엘리나제(ASM), β-글루쿠로니다제(GUSB), 헤파란 N-설파타제(SGSH), α-N-아세틸글루코사미니다제(NAGLU), 아세틸 CoA α-글루코사미니드 N-아세틸트랜스페라제, N-아세틸글루코사민-6-황산 설파타제, 산성 세라미다제(AC), 아밀로-1,6-글루코시다제, 시알리다제, 아스파틸글루코사미니다제, 팔미토일 단백질 싸이오에스테라제-1(PPT-1), 트라이펩티딜펩티다제-1(TPP-1), 히알루로니다제-1, CLN1, CLN2 등도 포함된다.

[0144] 이하, 항hTfR 항체와 리소좀 효소의 융합 단백질에 대해, 산성 α-글루코시다제와 α-갈락토시다제 A를 예로 채택하여 상술한다.

[0145] 항hTfR 항체와 인간 산성 α-글루코시다제(hGAA)의 융합 단백질은, 이것을 폼페병 환자에게 투여했을 때, 해당 환자의 근세포 중에 반입되어, 리소좀까지 운반된다. 그렇게 해서, 폼페병 환자의 근세포의 리소좀 내에 축적한 글리코겐을 분해한다. 폼페병의 경우, 주로 골격근 세포로 이루어지는 근육 및 주로 심근 세포로 이루어지는 근육이 타겟이 된다. 폼페병에서는 심근 및 골격근의 기능 장애가 증상의 중심이지만, 이 융합 단백질을 투여하는 것에 의해, 골격근 세포 및 심근 세포에 축적된 글리코겐이 분해되므로, 구심성 심 비대, 골격근 침습에 의한 근력 저하, 근 긴장 저하 등의 제 증상을 개선할 수 있다. 즉, 항hTfR 항체와 인간 산성 α-글루코시다제의 융합 단백질은, 폼페병에 있어서의, 골격근의 기능 장애 또는/및 심장 장애의 치료제로서 사용할 수 있다.

[0146] 항hTfR 항체와 인간 산성 α-글루코시다제의 융합 단백질의 적합한 구체예로서, 인간 산성 α-글루코시다제와 항hTfR 항체의 융합 단백질로서, 해당 인간화 항hTfR 항체의 경쇄가 서열 번호 24의 아미노산 서열을 갖는 것이고, 해당 인간화 항hTfR 항체의 중쇄가 그 C말단측에서, 링커 서열 Gly-Ser을 개재시켜, 인간 산성 α-글루코시다제와 결합하고 있고, 전체로서 서열 번호 27로 나타나는 아미노산 서열을 갖는 것인, 융합 단백질을 들 수 있다.

[0147] 또한, 인간 산성 α-글루코시다제와 항hTfR 항체의 융합 단백질로서, 서열 번호 24의 아미노산 서열을 갖는 항hTfR 항체의 경쇄와, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 갖는 항hTfR 항체의 중쇄의 C말단에, 링커 서열 Gly-Ser을 개재시켜, 서열 번호 1로 나타나는 인간 산성 α-글루코시다제가 결합한 것을 포함하는, 융합 단백질이 있다.

[0148] 항hTfR 항체와 인간 α-갈락토시다제 A(hα-GalA)의 융합 단백질은, 이것을 파브리병 환자에게 투여했을 때, 해당 환자의 근세포 중에 반입되어, 리소좀까지 운반된다. 그렇게 해서, 파브리병 환자의 근세포의 리소좀 내에 축적한 트라이헥소실세라미드를 분해한다. 파브리병의 경우, 주로 심근 세포로 이루어지는 근육이 타겟이 된다. 파브리병에서는 심혈관계의 이상이 인정되지만, 이 융합 단백질을 투여하는 것에 의해, 심근 세포에 축적한 트라이헥소실세라미드가 분해되므로, 심실 비대 등의 심혈관계 이상의 제 증상을 개선할 수 있다. 이 융합 단백질은, 주로 심장이 장애되는 비전형적인 타입의 파브리병인 심파브리병에, 특히 유효하다. 즉, 항hTfR 항체와 인간 α-갈락토시다제 A의 융합 단백질은, 파브리병, 특히 심파브리병에 있어서의, 심장 장애의 치료제로서 사용할 수 있다.

[0149] 항hTfR 항체와 인간 α-갈락토시다제 A의 융합 단백질의 적합한 구체예로서, 인간 α-갈락토시다제 A와 항hTfR 항체의 융합 단백질로서, 해당 인간화 항hTfR 항체의 경쇄가 서열 번호 24의 아미노산 서열을 갖는 것이고, 해

당 인간화 항hTfR 항체의 중쇄가 그 C말단측에서, 링커 서열 Gly-Ser을 개재시켜, 인간 α-갈락토시다제 A와 결합하고 있고, 전체로서 서열 번호 29로 나타나는 아미노산 서열을 갖는 것인, 융합 단백질을 들 수 있다.

[0150] 또한, 인간 α-갈락토시다제 A와 항hTfR 항체의 융합 단백질로서, 서열 번호 24의 아미노산 서열을 갖는 항hTfR 항체의 경쇄와, 서열 번호 25의 아미노산 서열을 갖는 항hTfR 항체의 중쇄의 C말단에, 링커 서열 Gly-Ser을 개재시켜, 서열 번호 2로 나타나는 인간 α-갈락토시다제 A가 결합한 것을 포함하는, 융합 단백질이 있다.

[0151] 본 발명의 항hTfR 항체와 약제를 결합시킨 결합체는, 혈중에 투여하여 근육에 있어서 약효를 발휘시켜야 할 의약 조성물로서 사용할 수 있다. 이러한 약제는, 일반적으로 점적 정맥 주사 등에 의한 정맥 주사, 피하 주사, 근육 주사에 의해 환자에게 투여되지만, 투여 경로에는 특별히 한정은 없다.

[0152] 본 발명의 항hTfR 항체와 약제를 결합시킨 결합체는, 의약 조성물로서, 동결건조품, 또는 수성 액제 등의 형태로 의료 기관에 공급할 수 있다. 수성 액제의 경우, 의약 조성물을, 안정화제, 완충제, 등장화제를 함유하는 용액에 미리 용해한 것을, 바이알 또는 주사기에 봉입한 제제로서 공급할 수 있다. 주사기에 봉입된 제제는, 일반적으로 프리필드 시린지 제제라고 호칭된다. 프리필드 시린지 제제로 하는 것에 의해, 환자 자신에 의한 약제의 투여를 간이하게 할 수 있다.

[0153] 수성 액제로서 공급되는 경우, 수성 액제에 함유되는 결합체의 농도는, 용법 용량에 따라 적절히 조정되어야 할 것이지만, 예를 들어 1~4mg/mL이다. 또한, 수성 액제에 함유되는 안정화제는, 약제학적으로 허용할 수 있는 것인 한 특별히 한정은 없지만, 비이온성 계면활성제를 적합하게 사용할 수 있다. 이와 같은 비이온성 계면활성제로서는, 폴리소베이트, 폴록사머 등을 단독으로 또는 이들을 조합하여 사용할 수 있다. 폴리소베이트로서는 폴리소베이트 20, 폴리소베이트 80이, 폴록사머로서는 폴록사머 188(폴리옥시에틸렌(160) 폴리옥시프로필렌(30) 글라이콜)이 특히 적합하다. 또한, 수성 액제에 함유되는 비이온성 계면활성제의 농도는, 0.01~1mg/mL인 것이 바람직하고, 0.01~0.5mg/mL인 것이 보다 바람직하고, 0.1~0.5mg/mL인 것이 더 바람직하다. 안정화제로서, 히스티딘, 아르기닌, 메티오닌, 글라이신 등의 아미노산을 사용할 수도 있다. 안정화제로서 사용하는 경우의, 수성 액제에 함유되는 아미노산의 농도는, 0.1~40mg/mL인 것이 바람직하고, 0.2~5mg/mL인 것이 보다 바람직하고, 0.5~4mg/mL인 것이 더 바람직하다. 수성 액제에 함유되는 완충제는, 약제학적으로 허용할 수 있는 것인 한 특별히 한정은 없지만, 인산염 완충제가 바람직하고, 특히 인산 나트륨 완충제가 바람직하다. 완충제로서 인산 나트륨 완충제를 사용하는 경우의, 인산 나트륨의 농도는, 바람직하게는 0.01~0.04M이다. 또한, 완충제에 의해 조정되는 수성 액제의 pH는, 바람직하게는 5.5~7.2이다. 수성 액제에 함유되는 등장화제는, 약제학적으로 허용할 수 있는 것인 한 특별히 한정은 없지만, 염화 나트륨, 만니톨을 단독으로 또는 조합하여 등장화제로서 적합하게 사용할 수 있다.

[0154] **실시예**

[0155] 이하, 실시예를 참조하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하지만, 본 발명이 실시예에 한정되는 것은 의도하지 않는다.

[0156] 〔실시예 1〕 hTfR 발현용 벡터의 구축

[0157] 인간 비장 Quick Clone cDNA(Clontech사)를 주형으로 하여, 프라이머 hTfR5'(서열 번호 7) 및 프라이머 hTfR3'(서열 번호 8)를 이용하여, PCR에 의해 인간 트랜스페린 수용체(hTfR)를 코딩하는 유전자 단편을 증폭시켰다. 증폭시킨 hTfR을 코딩하는 유전자 단편을, MluI와 NotI로 소화하고, pCI-neo 벡터(Promega사)의 MluI와 NotI 사이에 삽입했다. 얻어진 벡터를, pCI-neo(hTfR)라고 이름 붙였다. 그 다음에, 이 벡터를, MluI와 NotI로 소화하여, hTfR을 코딩하는 유전자 단편을 절출하고, 국제 공개 공보(WO2012/063799)에 기재된 발현 벡터인 pE-mIRES-GS-puro의 MluI와 NotI의 사이에 짜넣는 것에 의해, hTfR 발현용 벡터인 pE-mIRES-GS-puro(hTfR)를 구축했다.

[0158] 〔실시예 2〕 재조합 hTfR의 제작

[0159] 일렉트로포레이션법에 의해, CHO-K1 세포에 pE-mIRES-GS-puro(hTfR)를 도입한 후, 메티오닌설폭시민(MSX) 및 퓨로마이신을 포함하는 CD OptiCHO™ 배지(Invitrogen사)를 이용하여 세포의 선택 배양을 행하여, 재조합 hTfR 발현 세포를 얻었다. 이 재조합 hTfR 발현 세포를 배양하여, 재조합 hTfR을 조제했다.

[0160] 〔실시예 3〕 재조합 hTfR을 이용한 마우스의 면역

[0161] 실시예 2에서 조제한 재조합 hTfR을 항원으로서 이용하여 마우스를 면역했다. 면역은, 마우스에 항원을 정맥내

투여 또는 복강내 투여하여 행했다.

[0162] 〔실시예 4〕 하이브리도마의 제작

[0163] 최후에 항원을 투여한 날의 약 1주일 후에 마우스의 비장을 적출하고 호모지나이즈하여, 비세포를 분리했다. 얻어진 비세포를 마우스 미엘로마 세포주(P3.X63.Ag8.653)와 폴리에틸렌 글라이콜법을 이용하여 세포 융합시켰다. 세포 융합 종료 후, (1X) HAT 서플리멘트(Life Technologies사) 및 10% Ultra low IgG 소 태아 혈청(Life Technologies사)을 포함하는 RPMI1640 배지에 세포를 현탁시키고, 세포 현탁액을 96웰 플레이트 20매에 200μL/웰씩 분주했다. 탄산 가스 배양기(37℃, 5% CO_2)에서 세포를 10일간 배양한 후, 각 웰을 현미경하에서 관찰하여, 단일의 콜로니가 존재하는 웰을 선택했다. 각 웰의 세포가 거의 컨플루언트가 된 시점에서 배양 상청을 회수하고, 이것을 하이브리도마의 배양 상청으로 하여, 이하의 스크리닝에 제공했다.

[0164] 〔실시예 5〕 고친화성 항체 산생 세포주의 스크리닝

[0165] 재조합 hTfR 용액(Sino Biologics사)을 50mM 탄산 나트륨 완충액(pH 9.5~9.6)으로 희석하여 5μg/mL의 농도로 조정하고, 이것을 고상 용액으로 했다. 고상 용액을, Nunc MaxiSorp™ flat-bottom 96웰 플레이트(기재: 폴리스타이렌, Nunc사)의 각 웰에 50μL씩 첨가한 후, 플레이트를 실온에서 1시간 정치하여, 재조합 hTfR을 플레이트에 흡착시켜 고정했다. 고상 용액을 버리고, 각 웰을 250μL의 세정액(PBS-T: 0.05% Tween20을 함유하는 PBS)으로 3회 세정한 후, 각 웰에 블로킹액(1% BSA를 함유하는 PBS)을 200μL씩 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1시간 정치했다.

[0166] 블로킹액을 버리고, 각 웰을 250μL의 PBS-T로 3회 세정한 후, 각 웰에 하이브리도마의 배양 상청을 50μL씩 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1시간 정치하여, 배양 상청에 포함되는 마우스 항hTfR 항체를 재조합 hTfR에 결합시켰다. 이 때, 컨트롤로서 마우스 항hTfR 항체를 산생하지 않는 하이브리도마의 배양 상청을 웰에 50μL 첨가한 것을 놓았다. 또한, 각 배양 상청을 가한 웰의 옆의 웰에, 하이브리도마의 배양용 배지를 50μL 첨가한 것을 놓아, 이것을 모크(mock) 웰로 했다. 측정은 n=2로 실시했다. 그 다음에, 용액을 버리고, 각 웰을 250μL의 PBS-T로 3회 세정했다.

[0167] 상기의 각 웰에 100μL의 HRP 표지 염소 항마우스 이뮤노글로불린 항체 용액(프로메가사)을 첨가하고, 플레이트를 실온에서 1분간 정치했다. 그 다음에, 용액을 버리고, 각 웰을 250μL의 PBS-T로 3회 세정했다. 그 다음에, 각 웰에 50μL의 발색용 기질액 TMB Stabilized Substrate for Horseradish Peroxidase(프로메가사)를 첨가하고, 실온에서 10~20분간 정치했다. 그 다음에, 각 웰에 100μL의 정지액(2N 황산)을 첨가한 후, 플레이트 리더를 이용하여 각 웰의 450nm에 있어서의 흡광도를 측정했다. 각 배양 상청 및 컨트롤의 2개의 웰의 평균치를 취하고, 이들의 평균치로부터, 각 배양 상청 및 컨트롤마다 둔 2개의 모크 웰의 평균치를 각각 뺀 것을 측정치로 했다.

[0168] 높은 측정치를 나타낸 웰에 첨가한 배양 상청에 대응하는 14종류의 하이브리도마 세포를, hTfR에 대해서 고친화성을 나타내는 항체(고친화성 항hTfR 항체)를 산생하는 세포주(고친화성 항체 산생 세포주)로서 선택했다. 이들 14종의 세포주를, 클론 1주~클론 14주로 번호 붙였다. 또한, 클론 1주~클론 14주가 산생하는 항hTfR 항체를, 각각 항hTfR 항체 번호 1~항hTfR 항체 번호 14로 했다.

[0169] 〔실시예 6〕 고친화성 항hTfR 항체의 가변 영역의 아미노산 서열의 해석

[0170] 실시예 5에서 선택한 클론 1주~클론 14주 중에서 추가로 클론주 3을 선택했다. 클론주 3의 cDNA를 조제하고, 이 cDNA를 주형으로 하여 항체의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 유전자를 증폭시켰다. 증폭시킨 유전자의 염기 서열을 번역하여, 이 세포주의 산생하는 항hTfR 항체 번호 3의 경쇄 및 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열을 결정했다.

[0171] 항hTfR 항체 번호 3은, 경쇄의 가변 영역에 서열 번호 9로 나타나는 아미노산 서열과, 중쇄의 가변 영역에 서열 번호 10으로 나타나는 아미노산 서열을 포함하는 것이었다. 또한, 그 경쇄의 가변 영역은, CDR1에 서열 번호 11 또는 12, CDR2에 서열 번호 13 또는 14, 및 CDR3에 서열 번호 15로 나타나는 아미노산 서열을 포함하여 이루어지고, 그 중쇄의 가변 영역은, CDR1에 서열 번호 16 또는 17, CDR2에 서열 번호 18 또는 19, 및 CDR3에 서열 번호 20 또는 21로 나타나는 아미노산 서열을 포함하여 이루어지는 것이었다. 단, CDR은 상기의 아미노산 서열에 한정되지 않고, 이들 아미노산 서열을 포함하는 영역, 이들 아미노산 서열의 일부를 포함하는 연속한 3개 이상의 아미노산으로 이루어지는 아미노산 서열도 CDR로 할 수 있다고 생각되었다.

[0172] 〔실시예 7〕 항hTfR 항체의 인간 TfR 및 원숭이 TfR에 대한 친화성의 측정

[0173] 항hTfR 항체와 인간 TfR 및 원숭이 TfR에 대한 친화성의 측정은, 바이오레이어 간섭법(BioLayer Interferometry: BLI)을 이용한 생체 분자 상호작용 해석 시스템인 OctetRED96(ForteBio사, a division of Pall Corporation)을 이용하여 실시했다. 바이오레이어 간섭법의 기본 원리에 대해, 간단히 설명한다. 센서 칩 표면에 고정된 생체 분자의 층(레이어)에 특정 파장의 광을 투사했을 때, 생체 분자의 레이어와 내부의 참조가 되는 레이어의 2개의 표면으로부터 광이 반사되어, 광의 간섭파가 생긴다. 측정 시료 중의 분자가 센서 칩 표면의 생체 분자에 결합하는 것에 의해, 센서 선단의 레이어의 두께가 증가하여, 간섭파에 파장 시프트가 생긴다. 이 파장 시프트의 변화를 측정하는 것에 의해, 센서 칩 표면에 고정된 생체 분자에 결합하는 분자수의 정량 및 속도론적 해석을 리얼타임으로 행할 수 있다. 측정은, 대체로 OctetRED96에 첨부된 조작 메뉴얼에 따라 실시했다. 인간 TfR로서는, N말단에 히스티딘 태그가 부가한, 서열 번호 1에 나타나는 아미노산 서열 중에서 N말단측으로부터 89번째의 시스테인 잔기로부터 C말단의 페닐알라닌까지의, hTfR의 세포외 영역의 아미노산 서열을 갖는 재조합 인간 TfR(r인간 TfR: Sino Biological사)을 이용했다. 원숭이 TfR로서는, N말단에 히스티딘 태그가 부가한, 서열 번호 2에 나타나는 아미노산 서열 중에서 N말단측으로부터 89번째의 시스테인 잔기로부터 C말단의 페닐알라닌까지의, 필리핀원숭이의 TfR의 세포외 영역의 아미노산 서열을 갖는 재조합 원숭이 TfR(r원숭이 TfR: Sino Biological사)을 이용했다.

[0174] 실시예 6에서 선택한 클론 3주를, 세포 농도가 약 $2X10^5$개/mL가 되도록, (1X) HAT 서플리멘트(Life Technologies사) 및 10% Ultra low IgG 소 태아 혈청(Life Technologies사)을 포함하는 RPMI1640 배지로 희석하고, 1L의 삼각 플라스크에 200mL의 세포 현탁액을 가하고, 37℃에서, 5% CO_2와 95% 공기로 이루어지는 습윤 환경에서 약 70rpm의 교반 속도로 6~7일간 배양했다. 배양 상청을 원심 조작에 의해 회수하고, 0.22μm 필터(Millipore사)로 여과하여, 배양 상청으로 했다. 회수한 배양 상청을, 미리 150mM NaCl을 포함하는 컬럼 체적 3배용(容)의 20mM Tris 완충액(pH 8.0)으로 평형화해 둔 Protein G 컬럼(컬럼 체적: 1mL, GE헬스케어사)에 부하했다. 그 다음에, 컬럼 체적의 5배용의 동 완충액에 의해 컬럼을 세정한 후, 150mM NaCl을 포함하는 컬럼 체적의 4배용의 50mM 글라이신 완충액(pH 2.8)으로, 흡착한 항체를 용출시키고, 용출 획분을 채취했다. 용출 획분에 1M Tris 완충액(pH 8.0)을 첨가하여 pH 7.0으로 조정했다. 이것을 항hTfR 항체 번호 3의 정제품으로서 이하의 실험에 이용했다.

[0175] 정제한 항hTfR 항체 번호 3을, 각각 HBS-P+(150mM NaCl, 50μM EDTA 및 0.05% Surfactant P20을 포함하는 10mM HEPES)로 2단계 희석하여, 0.78125~50 nM(0.117~7.5μg/mL)의 7단계의 농도의 항체 용액을 조제했다. 이 항체 용액을 샘플 용액으로 했다. r인간 TfR과 r원숭이 TfR을, 각각 HBS-P+로 희석하여, 25μg/mL의 용액을 조제하여, 각각 r인간 TfR-ECD(Histag) 용액 및 r원숭이 TfR-ECD(Histag) 용액으로 했다.

[0176] 상기 2단계 희석하여 조제한 샘플 용액을, 96well plate, black(greiner bio-one사)에 200μL/웰씩 첨가했다. 또한, 상기 조제한 r인간 TfR-ECD(Histag) 용액 및 r원숭이 TfR-ECD(Histag) 용액을, 소정의 웰에 각각 200μL/웰씩 첨가했다. 베이스라인, 해리용 및 세정용의 웰에는, HBS-P+를 200μL/웰씩 첨가했다. 재생용의 웰에는, 10mM Glycine-HCl(pH 1.7)을 200μL/웰씩 첨가했다. 활성화용의 웰에는, 0.5mM $NiCl_2$ 용액을 200μL/웰씩 첨가했다. 이 플레이트와 바이오센서(Biosensor/Ni-NTA: ForteBio사, a division of Pall Corporation)를, OctetRED96의 소정의 위치에 설치했다.

[0177] OctetRED96을 하기의 표 1에 나타내는 조건에서 작동시켜 데이터를 취득 후, OctetRED96 부속의 해석 소프트웨어를 이용하여, 결합 반응 곡선을 1:1 결합 모델 혹은 2:1 결합 모델에 피팅하여, 항hTfR 항체와 r인간 TfR 및 r원숭이 TfR에 대한 회합 속도 상수(kon) 및 해리 속도 상수(koff)를 측정하고, 해리 상수(K_D)를 산출했다. 한편, 측정은 25~30℃의 온도하에서 실시했다.

표 1

표1 OctetRED96의 작동 조건

	스텝	접촉 시간 (sec)	속도 (rpm)	역치
1	베이스라인 1	60	1000	-
2	부하	600	1000	1.5~2.0
3	베이스라인 2	60	1000	-
4	회합	180	1000	-
5	해리	540	1000	-
6	재생	5	1000	-
7	세정	5	1000	-
상기 6~7의 스텝을 6~7회 반복한다.				
8	활성화	60	1000	-
모든 샘플의 측정이 종료될 때까지, 1~8의 스텝을 반복하여 행한다.				

[0178]

[0179] 항hTfR 항체 번호 3의 인간 TfR과의 해리 상수(K_D)는 $1X10^{-12}$M 이하이며, 원숭이 TfR과의 해리 상수(K_D)는 $1X10^{-12}$M 이하였다. 이들 결과는, 항hTfR 항체 번호 3이, 인간 TfR뿐만 아니라 원숭이 TfR과도 높은 친화성을 갖는 항체임을 나타내는 것이다.

[0180] 〔실시예 8〕 인간화 항hTfR 항체의 제작

[0181] 항hTfR 항체 번호 3의 경쇄 및 중쇄의 가변 영역에 포함되는 아미노산 서열의 인간화를 시도했다. 그리고, 서열 번호 22에 나타나는 아미노산 서열을 갖는 인간화된 경쇄의 가변 영역과, 서열 번호 23에 나타나는 아미노산 서열을 갖는 인간화된 중쇄의 가변 영역을 얻었다. 더욱이, 경쇄에 대해서는, 가변 영역에 서열 번호 22에 나타나는 아미노산 서열을 갖는, 서열 번호 24로 나타나는 아미노산 서열의 경쇄를 얻었다. 또한, 중쇄에 대해서는, 가변 영역에 서열 번호 23에 나타나는 아미노산 서열을 갖는, 서열 번호 25로 나타나는 아미노산 서열의 중쇄를 얻었다. 한편, 서열 번호 25로 나타나는 아미노산 서열의 중쇄는 IgG4 타입의 것이다. 이렇게 하여 얻어진 인간화 항hTfR 항체의 인간 TfR과의 해리 상수(K_D)를 실시예 7에 기재된 방법으로 측정했다. 그 결과, 인간화 항hTfR 항체의 인간 TfR과의 해리 상수(K_D)는 $1X10^{-12}$M 이하이며, 원숭이 TfR과의 해리 상수(K_D)는 약 $1X10^{-9}$M 이었다. 이들 결과는, 얻어진 항hTfR 항체 번호 3의 인간화 항체가, 인간 TfR뿐만 아니라 원숭이 TfR과도 높은 친화성을 갖는 항체임을 나타내는 것이다.

[0182] 〔실시예 9: 항TfR 항체와 hGAA의 융합 단백질을 코딩하는 유전자의 구축〕

[0183] 서열 번호 24로 나타나는 아미노산 서열의 경쇄를 코딩하는 DNA 단편(서열 번호 26)을 합성했다. 이 DNA 단편은, 5'측에는, 5'단으로부터 순차로 MluI 서열과, 분비 시그널로서 기능하는 리더 펩티드를 코딩하는 서열을 갖고, 3'측에는 NotI 서열을 갖는다.

[0184] 또한, 서열 번호 25로 나타나는 아미노산 서열의 중쇄의 C말단측에, Gly-Ser로 이루어지는 링커 서열을 개재시켜, 서열 번호 1로 나타나는 아미노산 서열의 인간 산성 α-글루코시다제가 결합한, 전체로서 서열 번호 27로 나타나는 아미노산 서열의 단백질을 코딩하는 DNA 단편(서열 번호 28)을 합성했다. 이 DNA 단편은, 5'측에는, 5'단으로부터 순차로 MluI 서열과, 분비 시그널로서 기능하는 리더 펩티드를 코딩하는 서열을 갖고, 3'측에는 NotI 서열을 갖는다.

[0185] 〔실시예 10: 항TfR 항체와 hGAA의 융합 단백질 발현 벡터의 구축〕

[0186] pEF/myc/nuc 벡터(인비트로젠사)를, KpnI와 NcoI로 소화하여, EF-1α 프로모터 및 그의 제 1 인트론을 포함하는 영역을 절출하고, 이것을 T4 DNA 폴리메라제로 평활 말단화 처리했다. pCI-neo(인비트로젠사)를, BglII 및 EcoRI로 소화하여, CMV의 인핸서/프로모터 및 인트론을 포함하는 영역을 절제한 후에, T4 DNA 폴리메라제로 평

활 말단화 처리했다. 이것에, 상기의 EF-1α 프로모터 및 그의 제 1 인트론을 포함하는 영역을 삽입하여, pE-neo 벡터를 구축했다. pE-neo 벡터를, SfiI 및 BstXI로 소화하여, 네오마이신 내성 유전자를 포함하는 약 1kbp의 영역을 절제했다. pcDNA3.1/Hygro(+)(인비트로젠사)를 주형으로 하여 프라이머 Hyg-Sfi5'(서열 번호 30) 및 프라이머 Hyg-BstX3'(서열 번호 31)를 이용하여, PCR 반응에 의해 하이그로마이신 유전자를 증폭했다. 증폭한 하이그로마이신 유전자를, SfiI 및 BstXI로 소화하고, 상기의 네오마이신 내성 유전자를 절제한 pE-neo 벡터에 삽입하여, pE-hygr 벡터를 구축했다.

[0187] pE-hygr 벡터 및 pE-neo 벡터를 각각 MluI와 NotI로 소화했다. 실시예 9에서 합성한 항hTfR 항체의 경쇄를 코딩하는 DNA 단편(서열 번호 26)과, 항hTfR 항체의 중쇄와 인간 산성 α-글루코시다제를 결합시킨 단백질을 코딩하는 DNA 단편(서열 번호 28)을 MluI와 NotI로 소화하여, 각각 pE-hygr 벡터와 pE-neo 벡터의 MluI-NotI 사이에 삽입했다. 얻어진 벡터를, 각각 인간화 항hTfR 항체의 경쇄 발현용 벡터의 pE-hygr(LC)와 항hTfR 항체의 중쇄와 인간 산성 α-글루코시다제를 결합시킨 단백질 발현용 벡터의 pE-neo(HC-hGAA)로 했다.

[0188] 〔실시예 11: hGAA-인간화 항hTfR 항체 융합 단백질 발현용 세포의 제작〕

[0189] CHO 세포(CHO-K1: American Type Culture Collection으로부터 입수)를, 하기의 방법에 의해, GenePulser(Bio-Rad사)를 이용하여, 실시예 10에서 구축한 pE-hygr(LC) 및 pE-neo(HC-hGAA)로 형질 전환했다. 세포의 형질 전환은 대체로 이하의 방법으로 행했다. $5X10^5$개의 CHO-K1 세포를 CD OptiCHO™ 배지(Life Technologies사)를 첨가한 3.5cm 배양 디시에 파종하고, 37℃, 5% CO_2의 조건하에서 하룻밤 배양했다. 배지를 Opti-MEM™ I 배지(Life Technologies사)로 교환하고, 세포를 $5X10^6$세포/mL의 밀도가 되도록 현탁했다. 세포 현탁액 100μL를 채취하고, 이것에 Opti-MEM™ I 배지로 100μg/mL로 희석한 pE-hygr(LC1) 및 pE-neo(HC1) 플라스미드 DNA 용액을 5μL씩 첨가했다. GenePulser(Bio-Rad사)를 이용하여, 일렉트로포레이션을 실시하여, 세포에 플라스미드를 도입했다. 세포를, 37℃, 5% CO_2의 조건하에서 하룻밤 배양한 후, 0.5mg/mL의 하이그로마이신 및 0.8mg/mL의 G418을 첨가한 CD OptiCHO™ 배지로 선택 배양했다.

[0190] 그 다음에, 한계 희석법에 의해, 1웰당 1개 이하의 세포가 파종되도록, 96웰 플레이트 상에 선택 배양으로 선택된 세포를 파종하고, 각 세포가 단클론 콜로니를 형성하도록 약 10일간 배양했다. 단클론 콜로니가 형성된 웰의 배양 상청을 채취하고, 배양 상청 중의 인간화 항체 함량을 ELISA법으로 조사하여, hGAA-인간화 항hTfR 항체 융합 단백질 고발현 세포주를 선택했다.

[0191] 이 때의 ELISA법은 대체로 이하의 방법으로 실시했다. 96웰 마이크로타이터 플레이트(Nunc사)의 각 웰에, 염소 항인간 IgG 폴리클로날 항체 용액을 0.05M 탄산수소염 완충액(pH 9.6)으로 4μg/mL로 희석한 것을 100μL씩 가하고, 실온에서 적어도 1시간 정치하여 항체를 플레이트에 흡착시켰다. 그 다음에, PBS-T로 각 웰을 3회 세정 후, Starting Block (PBS) Blocking Buffer(Thermo Fisher Scientific사)를 각 웰에 200μL씩 가하고 플레이트를 실온에서 30분 정치했다. 각 웰을 PBS-T로 3회 세정한 후, PBS-BT(PBS에 0.5% BSA 및 0.05% Tween20을 첨가한 것)로 적당한 농도로 희석한 배양 상청 또는 인간 IgG 표준품을, 각 웰에 100μL씩 가하고, 플레이트를 실온에서 적어도 1시간 정치했다. 플레이트를 PBS-T로 3회 세정한 후, PBS-BT로 희석한 HRP 표지 항인간 IgG 폴리클로날 항체 용액을, 각 웰에 100μL씩 가하고, 플레이트를 실온에서 적어도 1시간 정치했다. PBS-T로 각 웰을 3회 세정 후, 인산-시트르산 완충액(pH 5.0)을 포함하는 0.4mg/mL o-페닐렌다이아민을 100μL씩 각 웰에 가하고, 실온에서 8~20분간 정치했다. 그 다음에, 1mol/L 황산을 100μL씩 각 웰에 가하여 반응을 정지시키고, 96웰 플레이트 리더를 이용하여, 각 웰의 490nm에 있어서의 흡광도를 측정했다. 높은 측정치를 나타낸 웰에 대응하는 세포를, hGAA-인간화 항hTfR 항체 융합 단백질 고발현 세포주로 했다. 이 세포주가 발현하는 hGAA와 인간화 항hTfR 항체의 융합 단백질을, hGAA-항hTfR 항체로 했다.

[0192] 〔실시예 12〕 hGAA-항hTfR 항체의 제조

[0193] hGAA-항hTfR 항체를, 이하의 방법으로 제조했다. 실시예 11에서 얻은 hGAA-항hTfR 항체 고발현주를, 세포 농도가 약 $2X10^5$개/mL가 되도록, CD OptiCHO™ 배지로 희석하고, 1L의 삼각 플라스크에 200mL의 세포 현탁액을 가하고, 37℃에서, 5% CO_2와 95% 공기로 이루어지는 습윤 환경에서 약 70rpm의 교반 속도로 6~7일간 배양했다. 배양 상청을 원심 조작에 의해 회수하고, 0.22μm 필터(Millipore사)로 여과하여, 배양 상청으로 했다. 회수한 배양 상청에, 컬럼 체적의 5배용의 150mL NaCl을 포함하는 20mM Tris 완충액(pH 8.0)을 첨가하고, 컬럼 체적의 3배용의 150mM NaCl을 포함하는 20mM Tris 완충액(pH 8.0)으로 미리 평형화해 둔 Protein A 컬럼(컬럼 체적:

1mL, Bio-Rad사)에 부하했다. 그 다음에, 컬럼 체적의 5배용의 동 완충액을 공급하여 컬럼을 세정한 후, 150mM NaCl을 포함하는 컬럼 체적의 4배용의 50mM 글라이신 완충액(pH 2.8)으로, 흡착된 hGAA-항hTfR 항체를 용출시켰다. 이 hGAA-항hTfR 항체를 포함하는 용출액의 pH를 1M Tris 완충액(pH 8.0)을 첨가하여 pH 7.0으로 조정하고, 그 다음에 아미콘 울트라 30kDa막(Millipore사)을 이용하여 PBS로 버퍼 교환했다. 이것을 hGAA-항hTfR 항체의 정제품으로 했다.

[0194] 〔실시예 13〕 인간 골격근을 이용한 세포 내로의 hGAA의 반입량의 측정

[0195] 인간 골격근 세포(PromoCell사)를 Skeletal Muscle Cell Growth Medium(Ready-to-use)(PromoCell사)으로 $8.0X10^4$개/mL로 희석하고, 250μL씩 Cellnest™(후지 필름)로 코팅한 96웰 플레이트의 각 웰에 파종한다. 37℃, 5% CO_2하에서 3일간 배양 후, 배지를 골격근 세포 분화 유도용의 배지 Skeletal Muscle Cell Differentiation Medium(Ready-to-use)(PromoCell사)으로 교환한다. 그리고, 2일마다 분화 유도용 배지로 배지 교환을 행하여, 6일간 분화 유도한다. 배지를 제거한 후, 분화 유도용 배지를 이용하여 조제한 hGAA-항hTfR 항체 및 hGAA의 단계 희석액(0.005~20.0μg/mL)을, 피검 물질로서, 각각 100μL씩 각 웰에 첨가하고, 37℃, 5% CO_2하에서 추가로 20시간 배양한다.

[0196] 배양 후, 배지를 제거하고, 300μL의 PBS로 각 웰을 3회 세정한다. M-PER™(with 0.5% Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific사)를 100μL씩 각 웰에 첨가하고, 플레이트 쉐이커로 실온에서 25분간 진탕하여 세포 추출액을 조제한다. 각 웰로부터 20μL의 추출액을 분취하고, BCA protein assay kit(Pierce사)를 이용하여 추출액 중에 포함되는 단백질을 정량한다. 또한, 20μL의 추출액을 분취 후의 각 웰에, PBS-BT를 80μL씩 첨가하고, 플레이트 쉐이커로 실온에서 10분간 진탕하여, ELISA 측정에 제공하는 세포 추출액을 조제한다.

[0197] 피검 물질을 무첨가한 웰의 세포로부터 마찬가지로 하여 세포 추출액을 조제하여, 이것을 풀 추출액으로 한다. hGAA-항hTfR 항체 및 시판되는 의료용 hGAA를, 풀 추출액으로 단계 희석하여, 검량선 시료를 조제한다. 피검 물질은 이하의 ELISA법에 의해 정량할 수 있다.

[0198] 토끼를 hGAA로 면역하여 얻은 토끼 항hGAA 폴리클로날 항체를, 20mmol/L 탄산 나트륨 완충액(pH 9.0)으로 5μg/mL로 희석하고, 100μL씩 96웰 플레이트(Maxisorp™)의 각 웰에 첨가하고, 플레이트 쉐이커로 실온에서 1시간 진탕한다. 항체 용액을 제거하고, 블로킹 완충액(1% BSA를 포함하는 PBS)을 300μL씩 각 웰에 첨가하고, 실온에서 1시간 정치한다. 그 다음에, 300μL의 PBS-T로 각 웰을 3회 세정한다. 그 다음에, 검량선 시료 및 각 세포 추출액을 각각 100μL씩 각 웰에 첨가하고, 플레이트 쉐이커로 실온에서 1시간 진탕한다. 300μL의 세정액으로 각 웰을 3회 세정 후, PBS-BT로 조제한 Biotin 표지화 토끼 항hGAA 항체(자사 조제)를 100μL씩 각 웰에 첨가하고, 플레이트 쉐이커로 실온에서 1시간 진탕한다. 300μL의 세정액으로 각 웰을 3회 세정 후, 0.5% BSA/PBS(with 0.05% Tween20)로 희석한 NeutrAvidin-HRP conjugate(Pierce사)를 100μL씩 각 웰에 첨가하고, 플레이트 쉐이커로 실온에서 15분간 진탕하고, 그 다음에 300μL의 세정액으로 각 웰을 3회 세정한다. TMB Microwell Peroxidase Substrate(2-Component System, KPL사)의 TMB Peroxidase Substrate와 TMB Peroxidase Substrate Solution B의 등량 혼합액을 100μL씩 각 웰에 첨가하여 실온에서 발색 반응시킨다. 충분한 발색이 얻어진 후, 100μL씩 1mol/L 인산을 각 웰에 첨가하여, 반응을 정지시킨다. 마이크로플레이트 리더로 파장 450nm에 있어서의 흡광도를 측정하고, SoftMax Pro(Molecular Device사)를 이용하여 검량선을 제작하고, 이것에 각 피검 물질의 측정치를 내삽하여, 각 피검 물질의 농도를 산출한다. 각 세포 추출액의 피검 물질 농도를 단백 농도로 나누어, 피검 물질의 세포내 반입량(ng/mg 단백질)으로 한다.

[0199] 〔실시예 14〕 CD71-KI/GAA-KO 마우스의 제작

[0200] 산성 α-글루코시다제 유전자(GAA 유전자)를 녹아웃하고, 또한 인간 트랜스페린 수용체 유전자(CD71 유전자)를 녹인한 CD71-KI/GAA-KO 마우스를, 일반적인 유전자 공학적 수법에 의해 제작했다. 작성 방법은 대체로 이하와 같다. 마우스 GAA 유전자의 엑손 6에 존재하는 BamHI 부위에 종지 코돈과 네오마이신 내성 유전자를 삽입하는 것에 의해, 마우스 GAA 유전자를 녹아웃할 수 있는 타게팅 벡터(GAA 녹아웃 벡터)를 구축했다. 이 타게팅 벡터는, 서열 번호 32로 나타나는 염기 서열을 포함한다. 타게팅 벡터를 선상화한 후, C57BL/6 계통의 ES 세포에 일렉트로포레이션법에 의해 도입했다. 도입 후, 네오마이신 약제 내성을 지표로 한 선택 배양을 행하여, 약제 내성 ES 클론을 취득했다. 얻어진 약제 내성 ES 클론을 게놈 PCR 및 서던 블롯에 의해 스크리닝하여, 특이적인 상동 재조합이 성립한 클론(상동 재조합 ES 클론)을 선별했다. 상동 재조합 ES 클론과 ICR 계통의 8세포기배

(胚)를 이용하여, 어그리게이션법으로 키메라배를 제작했다. 레시피언트 마우스에 키메라배를 이식하여 키메라 마우스를 출산시켰다.

[0201] 키메라 마우스를 자연 교배시켜 GAA-KO 헤테로 마우스를 제작하고, 추가로 교배를 거듭하여 GAA-KO 호모 마우스를 제작했다. CD71-KI 헤테로 마우스와 GAA-KO 호모 마우스를 교배시키고, 얻어진 마우스를 스크리닝하여 CD71-KI/GAA-KO 마우스를 제작했다. 한편, CD71-KI 헤테로 마우스는, Sonoda H., et al. Molecular Therapy 26. 1366-74 (2018)에 기재된 방법에 준하여 제작했다.

[0202] 〔실시예 15〕 마우스를 이용한 세포 내로의 hGAA의 반입량의 측정

[0203] 실시예 12에서 제작한 hGAA-항hTfR 항체의 정제품 및 시판되는 의료용 hGAA를, 각각 생리 식염수를 이용하여 4mg/mL의 용액으로 했다. 이들 용액을 이용하여, CD71-KI/GAA-KO 마우스에, hGAA-항hTfR 항체와 hGAA를 각각 꼬리 정맥으로부터 투여했다. hGAA-항hTfR 항체와 hGAA의 어느 것도 1회당의 투여량을 20mg으로 하여 격주로 합계 4회 투여했다. 최후의 투여의 2주일 후에, 마우스를 방혈사시키고, 심장, 횡격막, 가자미근, 전경골근, 및 대퇴사두근을 채취했다. 채취한 조직은 생리 식염수로 세정했다. 이들 근 조직에 포함되는 글리코겐 농도(mg/g 습조직 중량)를 실시예 16에 기재하는 방법으로 측정했다. hGAA-항hTfR 항체를 투여한 군을 hGAA-항hTfR 항체 투여군, 시판되는 의료용 hGAA를 투여한 군을 hGAA 투여군으로 했다. 또한, 등량의 생리 식염수를 투여한 CD71-KI/GAA-KO 마우스를 KO 컨트롤군으로 했다. 더욱이, 등량의 생리 식염수를 투여한 야생형 마우스를 야생형 컨트롤군으로 했다. 각 군 모두 마우스 5마리로 했다.

[0204] 각 근 조직에 포함되는 글리코겐량의 측정 결과를 도 1~5에 나타낸다. 도 1은 심장, 도 2는 횡격막, 도 3은 가자미근, 도 4는 전경골근, 도 5는 대퇴사두근의 측정 결과를 각각 나타낸다. 각 근 조직에 포함되는 글리코겐량은, hGAA 투여군의 각 조직에 포함되는 글리코겐량을 100%로 했을 때, hGAA-항hTfR 항체 투여군에서는, 심장에서 약 7.5%, 횡격막에서 약 6.5%, 가자미근에서 약 13.5%, 전경골근에서 약 13.5%, 대퇴사두근에서 약 6%까지 저하되었다. 이들 결과는, 시판되는 의료용 hGAA와 비교하여 hGAA-항hTfR 항체가 근 조직에 축적된 글리코겐량을 효율 좋게 분해할 수 있음을 나타내는 것이다. 폼페병(당원병 II형)은, 유전적으로 산성 α-글루코시다제 활성의 대부분 또는 전부를 결손하는 것에 의해, 세포의 리소좀에 글리코겐이 대량으로 축적되는 질환이며, 심근 및 골격근의 기능 장애가 증상의 중심이 된다. 즉, hGAA-항hTfR 항체는 hGAA와 비교하여 폼페병 환자의 심근 및 골격근에 축적된 글리코겐을 효율 좋게 분해할 수 있으므로, 폼페병 환자의 효소 보충량법에 있어서의 치료제로서 유망하다.

[0205] 〔실시예 16〕 조직 중에 포함되는 글리코겐량의 측정법

[0206] 비즈 파쇄기(BEADS CRUSHER μT-12, 다이테크사)에 세팅한 홀더에, 실시예 15에서 얻은 조직과 15개의 직경 0.5mm의 SUS 비즈를 넣고, 추가로 주사용수를 가했다. 비즈 파쇄기를 작동시켜 조직을 파쇄했다. 얻어진 조직 파쇄물을 15,000rpm, 10분간, 4℃에서 원심하고, 상청을 검체 용액으로서 채취하여, 측정 시까지 동결 보존했다.

[0207] 글리코겐 농도의 측정은, Glycogen Colorimetric/Fluorometric Assay Kit(Biovision사)를 이용하여 대체로 이하의 수순으로 측정했다. 검량선 시료(Glycogen Standard)를 순수로 단계적으로 희석하고, 이 희석액을 F96 Black plate(Nunc사)의 웰에 50μL씩 첨가했다. 또한, 검체 용액을 마찬가지로 웰에 50μL씩 첨가했다. 이 때, 각 검량선 시료 희석액 및 검체 용액을, 각각 2웰에 첨가했다. Hydrolysis Enzyme Mix를 검량선 시료를 첨가한 2웰 및 검체를 첨가한 1웰에 1μL씩 첨가 혼합하고, 실온에서 30분간 반응시켜, 글리코겐을 글루코스로 분해시켰다. 추가로, 모든 웰에 형광 시약을 함유하는 Reaction Mix를 50μL씩 첨가하고, 차광하 실온에서 30분간 반응시켰다. 형광 플레이트 리더(SPECTRA max GEMINI XPS, 몰리큘러 디바이스사)를 이용하여 형광 강도를 측정하고(Ex/Em = 535/587nm), 검량선 시료의 이론 농도(X)와 시그널 평균치(Y)로부터 Linear fit curve에 의해 작성한 검량선으로부터, Hydrolysis Enzyme Mix를 첨가한 검체 용액 및 첨가하고 있지 않는 검체 용액의 글루코스 농도를 산출했다. 그 다음에, Hydrolysis Enzyme Mix를 첨가한 검체 용액의 글루코스 농도 측정치로부터 첨가하고 있지 않는 검체 용액의 글루코스 농도를 빼서, 이 값을 검체 용액의 글리코겐 농도로 했다. 검체 용액의 조제에 이용한 조직의 중량과, 구한 글리코겐 농도로부터, 각 조직의 글리코겐 농도(mg/g 습조직 중량)를 구했다.

산업상 이용가능성

[0208] 본 발명에 의하면, 근육에서 기능시켜야 할 약제로서, 그대로는 근육에 충분히 반입되지 않는 약제를, 항트랜스페린 수용체 항체와 결합시킨 결합체로 하는 것에 의해, 근육에 효율 좋게 반입되도록 할 수 있으므로, 근육의

질환의 새로운 치료약의 개발에 응용할 수 있다. 또한, 근육에서 기능시키기 위해서 대량으로 투여할 필요가 있는 단백질, 예를 들어 hGAA를, 본 발명을 응용한 융합 단백질로 하는 것에 의해, 그 투여량을 큰 폭으로 줄일 수 있으므로, 의료 경제상의 이점도 있다.

서열목록 자유텍스트

[0210] 서열 번호 3: 링커예 1의 아미노산 서열

서열 번호 4: 링커예 2의 아미노산 서열

서열 번호 7: 프라이머 hTfR5', 합성 서열

서열 번호 8: 프라이머 hTfR3', 합성 서열

서열 번호 9: 마우스 항hTfR 항체 번호 3의 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열

서열 번호 10: 마우스 항hTfR 항체 번호 3의 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열

서열 번호 11: 마우스 항hTfR 항체 번호 3의 경쇄 CDR1의 아미노산 서열 1

서열 번호 12: 마우스 항hTfR 항체 번호 3의 경쇄 CDR1의 아미노산 서열 2

서열 번호 13: 마우스 항hTfR 항체 번호 3의 경쇄 CDR2의 아미노산 서열 1

서열 번호 14: 마우스 항hTfR 항체 번호 3의 경쇄 CDR2의 아미노산 서열 2

서열 번호 15: 마우스 항hTfR 항체 번호 3의 경쇄 CDR3의 아미노산 서열

서열 번호 16: 마우스 항hTfR 항체 번호 3의 중쇄 CDR1의 아미노산 서열 1

서열 번호 17: 마우스 항hTfR 항체 번호 3의 중쇄 CDR1의 아미노산 서열 2

서열 번호 18: 마우스 항hTfR 항체 번호 3의 중쇄 CDR2의 아미노산 서열 1

서열 번호 19: 마우스 항hTfR 항체 번호 3의 중쇄 CDR2의 아미노산 서열 2

서열 번호 20: 마우스 항hTfR 항체 번호 3의 중쇄 CDR3의 아미노산 서열 1

서열 번호 21: 마우스 항hTfR 항체 번호 3의 중쇄 CDR3의 아미노산 서열 2

서열 번호 22: 인간화 항hTfR 항체 번호 3의 경쇄의 가변 영역의 아미노산 서열

서열 번호 23: 인간화 항hTfR 항체 번호 3의 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열

서열 번호 24: 인간화 항hTfR 항체 번호 3의 경쇄의 아미노산 서열

서열 번호 25: 인간화 항hTfR 항체 번호 3의 중쇄의 아미노산 서열

서열 번호 26: 인간화 항hTfR 항체 번호 3의 경쇄의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열, 합성 서열

서열 번호 27: 인간화 항hTfR 항체 번호 3의 중쇄와 hGAA의 융합 단백질의 아미노산 서열

서열 번호 28: 인간화 항hTfR 항체 번호 3의 중쇄와 hGAA의 융합 단백질의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열, 합성 서열

서열 번호 29: 인간화 항hTfR 항체 번호 3의 중쇄와 hα-GalA의 융합 단백질의 아미노산 서열

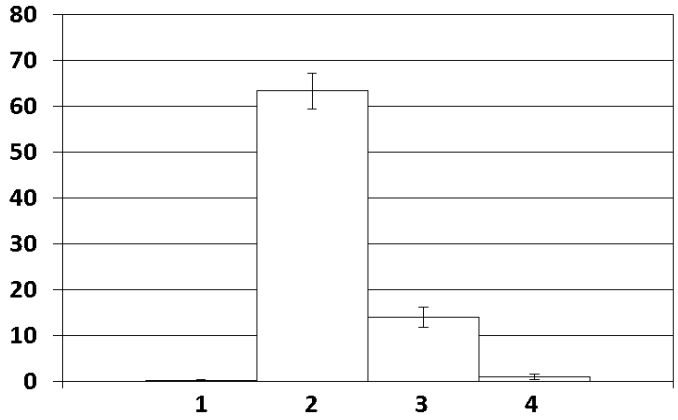
서열 번호 30: 프라이머 Hyg-Sfi5', 합성 서열

서열 번호 31: 프라이머 Hyg-BstX3', 합성 서열

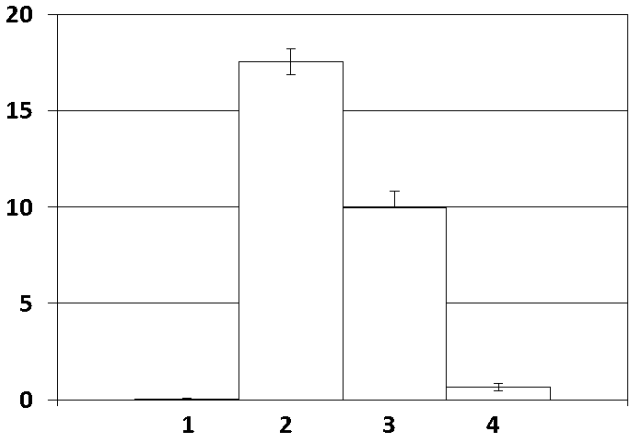
서열 번호 32: GAA 녹아웃 벡터의 염기 서열, 합성 서열

도면

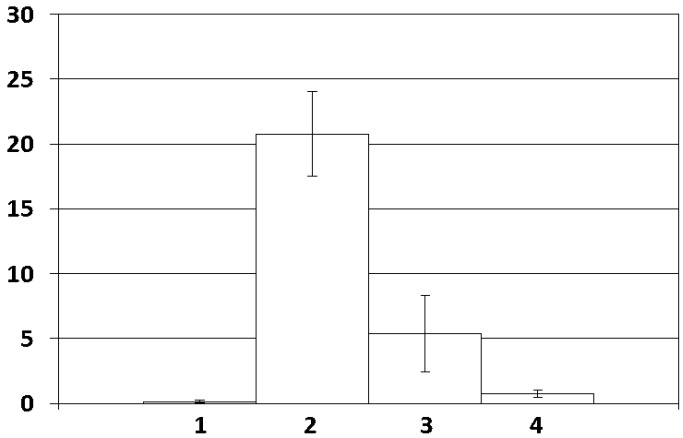
도면1



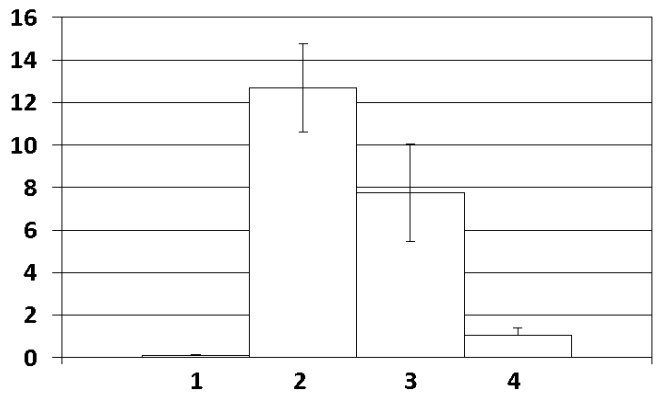
도면2



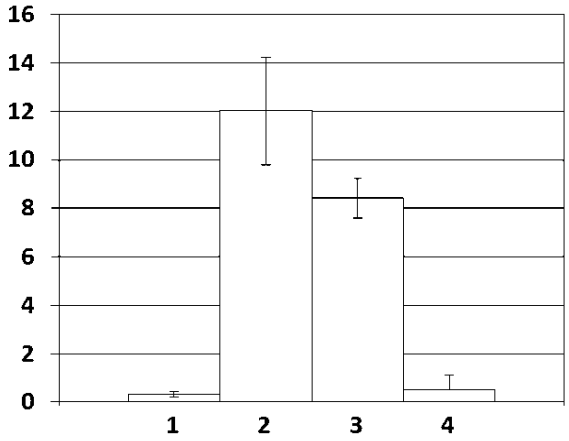
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> JCR Pharmaceuticals Co., Ltd.

<120> Method for sorting a protein to muscle tissue

<130> 1210P

<150> JP2018-018652

<151> 2018-02-05

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 883

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro
1 5 10 15

Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu
20 25 30

Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu
35 40 45

Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr
50 55 60

Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr
65 70 75 80

Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu
85 90 95

Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe
100 105 110

Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr
115 120 125

Pro Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe
130 135 140

Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg Gln Leu Asp Gly Arg
145 150 155 160

Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe
165 170 175

Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala
180 185 190

Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr
195 200 205

Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly
210 215 220

Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly
225 230 235 240

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

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

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

Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp
420 425 430
Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile
435 440 445
Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys
450 455 460
Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly
465 470 475 480

Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu

485 490 495

Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile

500 505 510

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

515 520 525

Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp

530 535 540

Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro

545 550 555 560

Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp

565 570 575

Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp

580 585 590

Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu

595 600 605

Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln

610 615 620

Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu

625 630 635 640

Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg

645 650 655

Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp

660 665 670

His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln

675 680 685

Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr

690 695 700

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

705 710 715 720

Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val

725 730 735

Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly
740 745 750

Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg
755 760 765

Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala
770 775 780

Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu
785 790 795 800

Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile
805 810 815

Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu
820 825 830

Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu
835 840 845

Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr Lys
850 855 860

Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe Leu Val
865 870 875 880

Ser Trp Cys

<210> 2
<211> 398
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

Leu Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp
1 5 10 15

Glu Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys
20 25 30

Ile Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu
35 40 45

Gly Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp

50 55 60

Met Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln

65 70 75 80

Arg Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys

85 90 95

Gly Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala

100 105 110

Gly Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe

115 120 125

Ala Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp

130 135 140

Ser Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu

145 150 155 160

Asn Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr

165 170 175

Met Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys

180 185 190

Asn His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile

195 200 205

Lys Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp

210 215 220

Val Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly

225 230 235 240

Asn Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp

245 250 255

Ala Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile

260 265 270

Ser Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile

275 280 285

Asn Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp

290 295 300

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

305 310 315 320

Ala Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile

325 330 335

Ala Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe

340 345 350

Ile Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp

355 360 365

Thr Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu

370 375 380

Gln Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu

385 390 395

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of an exemplified linker 1

<400> 3

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 4

<211

> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of an exemplified linker 2

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 5

<211> 760

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

100 105 110
Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys
115 120 125
Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile
130 135 140
Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln
145 150 155 160
Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe

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

225 230 235 240
Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile

245 250 255

Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu

260 265 270

Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe

275 280 285

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

290 295 300

Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln

305 310 315 320

Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr

325 330 335

Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp

340 345 350

Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser

355 360 365

Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile

370 375 380

Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp

385 390 395 400

His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala

405 410 415

Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met

420 425 430

Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile

435 440 445

Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr

450 455 460

Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr

465 470 475 480

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

485 490 495

Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn
500 505 510
Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp
515 520 525
Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe
530 535 540
Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp

545 550 555 560
Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu
565 570 575
Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu
580 585 590
Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn
595 600 605
Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp

610 615 620
Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln
625 630 635 640
Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu
645 650 655
Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys
660 665 670
Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro

675 680 685
Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser
690 695 700
Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys
705 710 715 720
Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala
725 730 735
Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp

740 745 750

Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe

755 760

<210> 6

<211> 760

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 6

Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu

1 5 10 15

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp

20 25 30

Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Val Asp Asp Glu Glu Asn Ala

35 40 45

Asp Asn Asn Thr Lys Ala Asn Gly Thr Lys Pro Lys Arg Cys Gly Gly

50 55 60

Asn Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Ile Phe Phe Leu Ile Gly

65 70 75 80

Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr

85 90 95

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

100 105 110

Glu Glu Asp Phe Pro Ala Ala Pro Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys

115 120 125

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

130 135 140

Lys Leu Leu Asn Glu Asn Leu Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln

145 150 155 160

Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Ile Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe

165 170 175

Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val

180 185 190

Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Gly
195 200 205
Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys
210 215 220
Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys

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

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

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

420 425 430
Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile

435 440 445

Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr

450 455 460

Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe

530 535 540

Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp

545 550 555 560

Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu

565 570 575

Val Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu

580 585 590

Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Thr Glu Leu Asn

595 600 605

Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Leu Phe Leu Arg Asp

610 615 620

Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Val Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln

625 630 635 640

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

645 650 655

Thr Thr Asp Phe Arg Asn Ala Glu Lys Arg Asp Lys Phe Val Met Lys

660 665 670

Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr Tyr Phe Leu Ser Pro

675 680 685

Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser

690 695 700

Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu Leu Glu Ser Leu Lys Leu Arg Arg

705 710 715 720

Gln Asn Asn Ser Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala

725 730 735

Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp

740 745 750

Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe

755 760

<210> 7

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer hTfR5', synthetic sequence

<400> 7

ccgacgcgtc gccaccatga tggatcaagc tagatcagca ttc 43

<210> 8

<211> 59

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer hTfR3', synthetic sequence

<400> 8

ataatgcggc cgcttaatga tgatgatgat gatgaaactc attgtcaatg tcccaaacg 59

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of the light-chain variable region of mouse anti-hTfR antibody No. 3

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Arg

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of the heavy-chain variable region of mouse anti-hTfR antibody No. 3

<400> 10

Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Met Asn Tyr

20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Ser Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Val Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Ser Val Tyr

65 70 75 80

Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Thr
115

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence 1 of CDR1 in the light chain of mouse anti-hTfR antibody No. 3

<400> 11

Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence 2 of CDR1 in the light chain of mouse anti-hTfR antibody No. 3

<400> 12

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 13

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence 1 of CDR2 in the light chain of mouse anti-hTfR antibody No. 3

<400> 13

Lys Val Ser Asn Arg Phe
1 5

<210> 14

<211> 7

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence 2 of CDR2 in the light chain of mouse

anti-hTfR antibody No. 3

<400> 14

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of CDR3 in the light chain of mouse anti-hTfR

antibody No. 3

<400> 15

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence 1 of CDR1 in the heavy chain of mouse

anti-hTfR antibody No. 3

<400> 16

Asn Tyr Trp Leu Gly

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence 2 of CDR1 in the heavy chain of mouse

anti-hTfR antibody No. 3

<400> 17

Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp

1 5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Amino acid sequence 1 of CDR2 in the heavy chain of mouse

anti-hTfR antibody No. 3

<400> 18

Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro

1 5

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence 2 of CDR2 in the heavy chain of mouse

anti-hTfR antibody No. 3

<400> 19

Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Ser Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Val

<210>

20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence 1 of CDR3 in the heavy chain of mouse

anti-hTfR antibody No. 3

<400> 20

Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr

1 5

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence 2 of CDR3 in the heavy chain of mouse anti-hTfR antibody No. 3

<400> 21

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr
1 5 10

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of the light-chain variable region of humanized anti-hTfR antibody No. 3

<400> 22

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

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

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

35 40 45

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

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

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

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 23

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of the heavy-chain variable region of humanized anti-hTfR antibody No. 3

<400> 23

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

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

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Amino acid sequence of the light-chain of humanized anti-hTfR antibody No. 3

<400> 24

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

20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

<210> 25
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Amino acid sequence of the heavy-chain of humanized anti-hTfR antibody No. 3 (IgG4)
<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Leu Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Asp Tyr Pro Thr Tyr Ser Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Val Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 26

<211> 740

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence encoding the amino acid sequence of the light-chain of humanized anti-hTfR antibody No. 3, synthetic sequence

<400> 26

acgcgtgccg ccaccatggg ctggagctgg attctgctgt tcctcctgag cgtgacagca 60

ggagtgcaca gcgacatcgt gatgacccag actcccctga gcctgagcgt gacacctggc 120

cagcctgcca gcatcagctg cagaagctct cagagcctgg tgcacagcaa cggcaacacc 180
tacctgcact ggtatctgca gaagcccggc cagagccctc agctgctgat ctacaaggtg 240
tccaacagat tcagcggcgt gcccgacaga ttctccggca gcggctctgg caccgacttc 300
accctgaaga tttccagagt ggaagccgag gacgtgggcg tgtactactg cagccagagc 360
acccacgtgc cctggacatt cggccagggc accaaggtgg aaatcaagag aaccgtggcc 420
gctcccagcg tgttcatctt cccacctagc gacgagcagc tgaagtccgg cacagcctct 480
gtcgtgtgcc tgctgaacaa cttctacccc cgcgaggcca aggtgcagtg gaaggtggac 540

aacgccctgc agagcggcaa cagccaggaa agcgtgaccg agcaggactc caaggacagc 600
acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg agcaaggccg actacgagaa gcacaaggtg 660
tacgcctgcg aagtgaccca ccagggcctg tctagccccg tgaccaagag cttcaacaga 720
ggcgagtgct aagcggccgc 740

<210> 27
<211> 1330
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Amino acid sequence of the fusion protein of the heavy chain of humanized anti-hTfR antibody No. 3 (IgG4) and hGAA

<400> 27

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

Lys Val Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Asp Glu Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

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

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

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

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp Val Pro Pro

450 455 460

Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr Gln Glu Gln

465 470 475 480

Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln Gly Leu Gln

485 490 495

Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro Ser Tyr Pro

500 505 510

Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly Tyr Thr Ala

515 520 525

Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp Ile Leu Thr

530 535 540

Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu His Phe Thr

545 550 555 560

Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu Glu Thr Pro

565 570 575

Arg Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe Ser

580 585 590

Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val His Arg Gln Leu Asp Gly Arg Val
595 600 605

Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu
610 615 620

Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala Glu
625 630 635 640

His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr Leu
645 650 655

Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly Ser
660 665 670

His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly Val
675 680 685

Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro Ser Pro
690 695 700

Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile Phe
705 710 715 720

Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val Val
725 730 735

Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu Cys
740 745 750

Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu Asn
755 760 765

Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu Asp
770 775 780

Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe Arg
785 790 795 800

Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg Tyr
805 810 815

Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly Ser
820 825 830

Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr Asn

835 840 845

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

850 855 860

Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp Met

865 870 875 880

Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile Asp

885 890 895

Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys Pro

900 905 910

Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly Gly

915 920 925

Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu Ser

930 935 940

Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile Ala

945 950 955 960

Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val Ile

965 970 975

Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp Thr

980 985 990

Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro Glu

995 1000 1005

Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp

1010 1015 1020

Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg

1025 1030 1035

Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn

1040 1045 1050

Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro

1055 1060 1065

Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu

1070 1075 1080

Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly
1085 1090 1095
Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser
1100 1105 1110
Ser Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu
1115 1120 1125
Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly
1130 1135 1140

Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Ile
1145 1150 1155
Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu
1160 1165 1170
Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro
1175 1180 1185
Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro
1190 1195 1200

Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro
1205 1210 1215
Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly
1220 1225 1230
Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg
1235 1240 1245
Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile
1250 1255 1260

Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln
1265 1270 1275
Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln
1280 1285 1290
Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro
1295 1300 1305
Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu

1310 1315 1320

Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys

1325 1330

<210> 28

<211> 4076

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleic acid sequence encoding the amino acid sequence of the fusion protein of the heavy chain of humanized anti-hTfR antibody No. 3 (IgG4) and hGAA, synthetic sequence

<400> 28

acgcgtgccg ccaccatggg ctggagctgg attctgctgt tcctcctgag cgtgacagca 60

ggagtgcaca gcgaggtgca actagtgcag tctggagcag aggtgaaaaa gcccggggag 120

tctctgaaga tttcctgtaa gggttctgga tacagcttta ccaactactg gctgggatgg 180

gtgcgccaga tgcccgggaa aggcctggag tggatggggg acatctaccc cggcggagac 240

taccctacat acagcgagaa gttcaaggtc caggtcacca tctcagccga caagtccatc 300

agcaccgcct acctgcagtg gagcagcctg aaggcctcgg acaccgccat gtattactgt 360

gcgagatcag gcaattacga cgaagtggcc tactggggcc aaggaaccct ggtcaccgtc 420

tcctcagcta gcaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg cgccctgctc caggagcacc 480

tccgagagca cagccgccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 600

tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg 660

aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt 720

gagtccaaat atggtccccc atgcccacca tgcccagcac ctgagttcct gggggggtcca 780

tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag gacactctca tgatctcccg gacccctgag 840

gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtac 900

gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc 960

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag 1020

tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa 1080

gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg 1140

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc 1200

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aggctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320

gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag 1380

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaagga tctgctcacc ctggacggcc tagggccgtg 1440

cctacccagt gcgacgtgcc tcctaattcc aggttcgact gcgcccccga taaagccatc 1500

acccaggaac agtgtgaggc caggggctgt tgctatattc ccgccaagca gggcctgcag 1560

ggcgctcaga tgggccagcc ctggtgcttc ttccccccct cctatccctc ctacaagctg 1620

gaaaacctgt cctcctccga gatgggctac acagccaccc tcacaaggac aacccccacc 1680

ttcttcccca aggacatcct caccctgcgg ctggatgtga tgatggagac cgagaaccgg 1740

ctgcacttca ccatcaagga ccctgccaat cggcggtacg aggtgcctct ggaaaccccc 1800

cgggtgcact ccagggctcc ttcccctctg tatagcgtgg agtttagcga ggagcccttc 1860

ggcgtgatcg tgcaccggca gctcgacgga agggtgctgc tgaacaccac cgtcgccccc 1920

ctgttcttcg ccgatcagtt cctccagctg tccacctccc tgccctccca gtacattacc 1980

ggcctggctg agcacctgag ccccctgatg ctgtccacca gctggacaag gatcaccctg 2040

tggaatcggg acctcgctcc caccctggga gccaatctgt acggcagcca ccccttctac 2100

ctggccctcg aagatggagg cagcgctcat ggcgtgttcc tgctgaattc caacgctatg 2160

gacgtggtgc tccaaccctc ccctgccctg tcctggagga gcacaggcgg cattctggac 2220

gtctacattt tcctcggccc cgagcctaaa tccgtcgtcc agcagtacct ggacgtggtg 2280

ggctaccctt ttatgcctcc ttactggggc ctgggctttc acctgtgtag gtggggctat 2340

tccagcaccg ctattacacg gcaggtcgtc gaaaacatga cacgggccca ctttcccctg 2400

gacgtccaat ggaatgacct ggactacatg gactcccggc gggacttcac attcaataag 2460

gacggcttcc gggacttccc tgccatggtg caggagctgc atcagggagg ccggaggtac 2520

atgatgattg tggaccctgc tatttccagc tccggacctg ctggctccta ccggccctac 2580

gacgagggac tgcggagggg cgtcttcatc acaaacgaaa ccggtcagcc cctgattgga 2640

aaggtgtggc ccggttctac agctttcccc gactttacaa accccacagc cctggcttgg 2700

tgggaggaca tggtggccga gtttcacgac caggtgcctt tcgacggcat gtggatcgat 2760

atgaacgagc cttccaactt tatcaggggc agcgaggatg gctgccccaa caacgagctc 2820

gagaatcccc cctacgtccc cggagtcgtg ggaggcacac tccaggctgc cacaatctgc 2880

gccagctccc atcagttcct gagcacccat tacaacctgc ataacctgta cggcctcacc 2940

gaagccatcg ccagccatag ggctctggtg aaggccaggg gaacacggcc tttcgtgatc 3000

tccaggagca catttgccgg ccacggcagg tacgctggcc actggacagg cgatgtctgg 3060

tcctcctggg agcaactggc ttccagcgtc cccgagatcc tccagttcaa cctgctgggc 3120

gtgcccctgg tgggcgccga cgtgtgcggc tttctcggca acacctccga ggagctgtgt 3180
gtgcggtgga cccagctggg cgccttctat ccctttatgc ggaatcacaa cagcctgctg 3240
tccctgcctc aggaacccta cagcttcagc gaacctgctc agcaggccat gcggaaggcc 3300
ctgaccctcc ggtatgccct gctgccccac ctctataccc tgtttcatca ggctcatgtg 3360
gctggcgaga cagtggctag gcctctgttc ctggagtttc ccaaggattc cagcacatgg 3420
acagtggacc atcagctgct gtggggcgag gctctgctga tcacacccgt gctgcaggcc 3480
ggcaaagccg aggtgacagg ctatttcccc ctgggaacct ggtacgacct ccagacagtg 3540

cccattgagg ccctgggttc tctccctcct cctcctgccg ctcccaggga acctgctatc 3600
cactccgaag gccagtgggt gaccctgcct gctcccctgg acacaatcaa cgtccacctg 3660
cgggctggct acattattcc tctccaggga cccggcctga caaccacaga gagcaggcag 3720
cagcccatgg ccctggctgt cgctctgaca aaaggaggcg aggcccgggg agagctcttc 3780
tgggatgacg gcgagagcct ggaggtcctg gagaggggag cctataccca ggtgatcttc 3840
ctcgcccgga acaacaccat tgtgaacgag ctggtgaggg tcacatccga aggagccgga 3900
ctgcaactgc agaaagtgac agtgctgggc gtcgccaccg ctcctcaaca ggtgctgtcc 3960

aacggcgtgc ccgtctccaa ctttacctac agccccgaca ccaaggtgct ggacatttgt 4020
gtgtccctgc tgatgggcga acagtttctg gtgtcctggt gttaataagc ggccgc 4076

<210> 29
<211> 845
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Amino acid sequence of the fusion protein of the heavy chain of humanized anti-hTfR antibody No. 3 (IgG4) and h alfa-galA
<400> 29

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

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

```
    50                  55                  60
Lys Val Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80

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

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

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

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        275                 280                 285
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
    290                 295                 300
```

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350
Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415
Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Ser Leu
435 440 445
Asp Asn Gly Leu Ala Arg Thr Pro Thr Met Gly Trp Leu His Trp Glu
450 455 460

Arg Phe Met Cys Asn Leu Asp Cys Gln Glu Glu Pro Asp Ser Cys Ile
465 470 475 480
Ser Glu Lys Leu Phe Met Glu Met Ala Glu Leu Met Val Ser Glu Gly
485 490 495
Trp Lys Asp Ala Gly Tyr Glu Tyr Leu Cys Ile Asp Asp Cys Trp Met
500 505 510
Ala Pro Gln Arg Asp Ser Glu Gly Arg Leu Gln Ala Asp Pro Gln Arg
515 520 525

Phe Pro His Gly Ile Arg Gln Leu Ala Asn Tyr Val His Ser Lys Gly
530 535 540
Leu Lys Leu Gly Ile Tyr Ala Asp Val Gly Asn Lys Thr Cys Ala Gly

545 550 555 560

Phe Pro Gly Ser Phe Gly Tyr Tyr Asp Ile Asp Ala Gln Thr Phe Ala

565 570 575

Asp Trp Gly Val Asp Leu Leu Lys Phe Asp Gly Cys Tyr Cys Asp Ser

580 585 590

Leu Glu Asn Leu Ala Asp Gly Tyr Lys His Met Ser Leu Ala Leu Asn

595 600 605

Arg Thr Gly Arg Ser Ile Val Tyr Ser Cys Glu Trp Pro Leu Tyr Met

610 615 620

Trp Pro Phe Gln Lys Pro Asn Tyr Thr Glu Ile Arg Gln Tyr Cys Asn

625 630 635 640

His Trp Arg Asn Phe Ala Asp Ile Asp Asp Ser Trp Lys Ser Ile Lys

645 650 655

Ser Ile Leu Asp Trp Thr Ser Phe Asn Gln Glu Arg Ile Val Asp Val

660 665 670

Ala Gly Pro Gly Gly Trp Asn Asp Pro Asp Met Leu Val Ile Gly Asn

675 680 685

Phe Gly Leu Ser Trp Asn Gln Gln Val Thr Gln Met Ala Leu Trp Ala

690 695 700

Ile Met Ala Ala Pro Leu Phe Met Ser Asn Asp Leu Arg His Ile Ser

705 710 715 720

Pro Gln Ala Lys Ala Leu Leu Gln Asp Lys Asp Val Ile Ala Ile Asn

725 730 735

Gln Asp Pro Leu Gly Lys Gln Gly Tyr Gln Leu Arg Gln Gly Asp Asn

740 745 750

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

755 760 765

Met Ile Asn Arg Gln Glu Ile Gly Gly Pro Arg Ser Tyr Thr Ile Ala

770 775 780

Val Ala Ser Leu Gly Lys Gly Val Ala Cys Asn Pro Ala Cys Phe Ile

785 790 795 800

Thr Gln Leu Leu Pro Val Lys Arg Lys Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr
805 810 815

Ser Arg Leu Arg Ser His Ile Asn Pro Thr Gly Thr Val Leu Leu Gln
820 825 830

Leu Glu Asn Thr Met Gln Met Ser Leu Lys Asp Leu Leu
835 840 845

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Hyg-Sfi5', synthetic sequence

<400> 30

gaggccgcct cggcctctga 20

<210> 31

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Hyg-BstX3', synthetic sequence

<400> 31

aaccatcgtg atgggtgcta ttcctttgc 29

<210> 32

<211> 15669

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucelic acid sequence of GAA knockout vector, synthetic sequence

<400> 32

ggcggccgct tgatacctta caactacatg aaggctcata accatctgta cagatacagt 60

gtactcatat acataaaata aataattttt taaaaaagaa gccgaagctg agcgtggtgg 120

cacatgcctt taaccccagc acttgggagg cagaggcagg tagatttctg agttccaggc 180

cagcctggtc tatagagtga gttccaggac agccagggct gtacacagaa accctgtctc 240

ggaaaaacaa aaaaagaaaa agaaaaacat tcccatcact taacttttct aaaagattta 300

ttatgtatac aacattctgc ctgcacttac gtctgcaggc cagaagaggg caccagatct 360

cattatagat agtcatgagc caccaggtgg ttgctgggat ttgaactcag gacctctgga 420

agagcagcca gtgctctcaa cctctgagcc atctctccag cccacgtaat tgttttaaga 480

agccaaaatt ctcaccatac tgtctcccct ctcctagatc aaagatcctg ctagtaagcg 540

ctacgaagtg cccctggaga ccccacgtgt gctgagccag gcaccatccc cactttacag 600

cgtggaattc tcagaggaac cctttggagt gatcgttcgt aggaagcttg gtggccgagt 660

gttgtgagtt ggttacctga ggctttgact ccaccctgag tggcccctta gggtcagagc 720

ttctgcaatc agcaaacctg tctacctcat tccaaaccct gccttttct gtcttgtttt 780

ctgttgctgt ggtaaacacg aacagaagcc acgtggggaa gagaaagtgg tttacctcac 840

aggttctagg ccatgctcca tcactgccgg ggcaggaact gaagcagagg ccatggagga 900

gtgctgttta ctgccttagt cctcatggct cacttagctt aagttcttat ccagcccaga 960

actaccagcc ctagggtgtt accaccctca gtgagctagg ccccacccac aacgaactag 1020

gccccaccca cagtgagcta ggccccaccc acaacaagct aggccccacc cacagtgtgc 1080

taggccctcc cacatcagtc aaaataaaaa atactccctc aggttactta cagaccaatc 1140

taatggaagt atgttctcag tggagagtca ttccctcttc tagatggccc tcgcttgtat 1200

caagtgatca cccagttctt ggcttccagc ttcctcattg ggtcccagag gttccctctg 1260

tggcttccca gtgaggagtg gtgcctccca ggagagacag gcagtgtgtg gagatgaccc 1320

accacagagg atgatccatc caagtgccag ggggactagg ggaagacagt tgtccgtcca 1380

cagtggcgcc ccctgcaggc ggcacactct gccagccgcc tctcttaagc cttgtgtttc 1440

tccaaggtcc atgtccccca gacaggacct catgctggta cccctgtgcc ctctgacctg 1500

gggtgacatg ggacccccct gggcatgcct gctccggctt ctcccactgt cttcagatgc 1560

tgagagcctc tgggctctat gtggccgttg tcccagggtt gtaatctggc gtccccccac 1620

aggctgaaca caaccgtggc ccccctgttc ttcgctgacc agttcctgca gctgtccact 1680

tccctgccct cccagcacat cacaggcctg ggggaacacc tcagcccact catgctcagc 1740

accgactggg ctcgtatcac cctctggaac cgggacacac caccctcggt aagagacggg 1800

cagtgggtgg gagggtggag gctgggatcc tgagtgcaag gcgttgtctc ttgtcacccc 1860

agcaaggtac caacctctac gggtcacatc ctttctacct ggcactggag gacggtggct 1920

tggctcacgg tgtcttcttg ctaaacagca atgccatggg tgagtcacca gactggggct 1980

cctcagcggt cacttccgtg tgagagcttg cccgctccag agtctgcctg tctccaagcg 2040

acctccgtgg agagagtccc gtgagcagag tccccctcat cctcggaacc taaggaggtc 2100

ctgggtgatt ctccaggctc acatgttcac gtccttcagg ccttgctatg ttgagctcag 2160

tacagctgcc tcaggcccac cctgaggaca tctccccaca attcatattg gaagggcgcg 2220

ccataacttc gtataatgta tgctatacga agttatagcc acactccacc cacaggttga 2280

gtcccccatc tgtggggcac ttgttcctga gcccaaacac ttctttccag atgtcatcct 2340

gcaacccagc ccagccctaa cctggaggtc aacgggcggg tgaaattcta ccgggtaggg 2400

gaggcgcttt tcccaaggca gtctggagca tgcgctttag cagccccgct gggcacttgg 2460

cgctacacaa gtggcctctg gcctcgcaca cattccacat ccaccggtag gcgccaaccg 2520

gctccgttct ttggtggccc cttcgcgcca ccttctactc ctcccctagt caggaagttc 2580

ccccccgccc cgcagctcgc gtcgtgcagg acgtgacaaa tggaagtagc acgtctcact 2640

agtctcgtgc agatggacag caccgctgag caatggaagc gggtaggcct ttggggcagc 2700

ggccaatagc agctttgctc cttcgctttc tgggctcaga ggctgggaag gggtgggtcc 2760

gggggcgggc tcaggggcgg gctcaggggc ggggcgggcg cccgaaggtc ctccggaggc 2820

ccggcattct gcacgcttca aaagcgcacg tctgccgcgc tgttctcctc ttcctcatct 2880

ccgggccttt cgacctgcag ccaatatggg atcggccatt gaacaagatg gattgcacgc 2940

aggttctccg gccgcttggg tggagaggct attcggctat gactgggcac aacagacaat 3000

cggctgctct gatgccgccg tgttccggct gtcagcgcag gggcgcccgg ttctttttgt 3060

caagaccgac ctgtccggtg ccctgaatga actgcaggac gaggcagcgc ggctatcgtg 3120

gctggccacg acgggcgttc cttgcgcagc tgtgctcgac gttgtcactg aagcgggaag 3180

ggactggctg ctattgggcg aagtgccggg gcaggatctc ctgtcatctc accttgctcc 3240

tgccgagaaa gtatccatca tggctgatgc aatgcggcgg ctgcatacgc ttgatccggc 3300

tacctgccca ttcgaccacc aagcgaaaca tcgcatcgag cgagcacgta ctcggatgga 3360

agccggtctt gtcgatcagg atgatctgga cgaagagcat caggggctcg cgccagccga 3420

actgttcgcc aggctcaagg cgcgcatgcc cgacggcgat gatctcgtcg tgacccatgg 3480

cgatgcctgc ttgccgaata tcatggtgga aaatggccgc ttttctggat tcatcgactg 3540

tggccggctg ggtgtggcgg accgctatca ggacatagcg ttggctaccc gtgatattgc 3600

tgaagagctt ggcggcgaat gggctgaccg cttcctcgtg ctttacggta tcgccgctcc 3660

cgattcgcag cgcatcgcct tctatcgcct tcttgacgag ttcttctgag gggatcgatc 3720

cgctgtaagt ctgcagaaat tgatgatcta ttaaacaata aagatgtcca ctaaaatgga 3780

agtttttcct gtcatacttt gttaagaagg gtgagaacag agtacctaca ttttgaatgg 3840

aaggattgga gctacggggg tgggggtggg gtgggattag ataaatgcct gctctttact 3900

gaaggctctt tactattgct ttatgataat gtttcatagt tggatatcat aatttaaaca 3960

agcaaaacca aattaagggc cagctcattc ctcccactca tgatctatag atctatagat 4020

ctctcgtggg atcattgttt ttctcttgat tcccactttg tggttctaag tactgtggtt 4080

tccaaatgtg tcagtttcat agcctgaaga acgagatcag cagcctctgt tccacataca 4140

cttcattctc agtattgttt tgccaagttc taattccatc agaagctatc ctggatgtgt 4200

atgtgttcct aggcccagag cccaagagcg ttgtgcaaca atacctggat gttgtgggta 4260

ggcataactt cgtataatgt atgctatacg aagttatgtc gacctggccc ctgcccactg 4320

agctcagacc cctgcccctt gctccttgcc ccatgtcccc agtccctgct cactcgcagt 4380

actggtcctc aggatacccc ttcatgcctc catactgggg cctcggcttc cacctctgcc 4440

gctggggcta ctcctcgacc gccattgtcc gccaggtagt ggagaacatg accaggacac 4500

acttcccgct ggtgagtggc agtcagggtg agggcggccc cagcttccgt gctcttggct 4560

cccgacctca gcatcagctc gcgtcctctg cttcaggacg tgcaatggaa tgacctggac 4620

tacatggacg cccgaagaga cttcaccttc aaccaggaca gctttgccga cttcccagac 4680

atggtgcggg agctgcacca ggatggccgg cgctacatga tgatcgtggt aagcaggttt 4740

gggcacagcc attgctgctg cttccgtgtg gcctcttcct cctacctgag cagtttccca 4800

ggacactctc tgatgtgtct gctgcccagg ctcctggaca cacccatgag ctcggggctc 4860

tttggttaac aggcgggatc cgcagaactg ctctgcctta aagcctgcgg caggggccgt 4920

aacgagctgg tactgagctg aggacctaga tgtggtttgt gcgtcctcct ggccctgctc 4980

ctctctcagg ccagctatgt ccatgtggga aggaaacata cttgccctgt gcctgtcccc 5040

gcagcaggaa ggtccaagaa gaccaaacag tcacagccat gggatgtcct tgaggggagg 5100

gagctaagcc ctggaagata cggctttgta aggaagggct acgactgcct cgccgccacc 5160

accaccacca ccaccaccac ggggcagtga atagtggtac aggcagtgag ggccacccag 5220

acattaggca agccctccac cactgagctg cactgccaac tctctttccg gtttttattt 5280

gaggcagggc cacaccagat tgcccagcca ggccttgaat ccataatcct cccacttccg 5340

cggtccaggc agctgggatg atgaacctgt atcaccagcc cccgtgcaga tttaagacag 5400

ggtctcctca tgtagctctg actgacccat ctgtcactgt atagagtaga ccaggctggc 5460

ctcaaactca cccgcctgcc tcttagtctc tcagcagctg gaactaaagg cgtgcgccac 5520

catgcctggg tgctttttat tcatctccat ttttaaaaag taagtggggc tggaaagatg 5580

gctgagcagt taaagcacac tgctctcgaa gaggactgga gttcggtgcc tgggacccac 5640

accaagcagc tgtacttgtc atttcagcag ctgctgctgg cctctgtggg tcacgtgcat 5700

tcgcgtgcgt gcgcgcgcgc gcacacacac acacagacac acacacacag acacacaagt 5760

aataataagc tggacagtgt ggtaaacacc tgttttttttt ttattattta tttatttatt 5820

tatttgagca cactggagct gtcttcagac acaccagaag agggcatcag atcccattac 5880

agatgtttgt gagctaccat gtggttttgg ggatttgaac tcaggacctc tggaagagca 5940
gcagtcagtg ctcttaacct ctgagccatc tccccagcgc atacagtgaa caccttaat 6000
cacagctctc gggaggcaga ggcaggtgca tctcttgagt tctgtgccaa cccggtctac 6060
agagtgagtt tcaaggcagc caagaatata caaagaaacc ccatctttaa aattaaaaat 6120
aaaataaaaa gagcaaatat aagcaactgc tgtaactctg gaaagcctga gaacaggagg 6180
atcacacgtc tagacttgct caccctgct gcccccaaca ggcttcgcac agcctgacct 6240
atgccgcttt cctgtatagg ccatctctgc ctcggccagc tctcttctct gggacctgag 6300

cttctacctc tgccgctccg gctgctcctc cttctgggct ttggggctag gctcttcact 6360
gttggcttct ccccccagga ccctgccatc agcagcgcag gccctgctgg gagttacagg 6420
ccctacgacg agggtctgcg gaggggcgtg ttcatcacca acgagactgg gcagccgctg 6480
attgggaagg tagcgagggg gatgggagct gtggtggtgg tggtggtggt ggggtcctca 6540
ctgggggtaa ctcctgacag tcgcctgagg ttttctaagt ggagggtgtt ctcaggcatc 6600
ctgagtagct gggcccggct taagcctagc agacctttcg tgaggccttg gagattgggg 6660
ggaggggagt cttccttgtc cctgggggcc ttctgggagt tctgagtccc agcctcccca 6720

tcctaagcag ccctggccat gggagaagtg agggcttgtg tctggtggtc agggatcaat 6780
ggcactatct caacctcttt cccatgccct ggttcatggc tcatctgccc cacggcctta 6840
tgtgtagggc tggcctttgc tctcccaagg ctgaaggccc ctatgccctg aggcattgtt 6900
tgatattggg cttgaggctc tctgatatca tcattggctt agagcgaggc tgctgccttg 6960
cttgaggcat gaggcccaac agggctctgg cgcaggatct gtgtggtatt ggttcttccc 7020
tctgggctct tgttcaggtt tggcctggaa ccaccgcctt ccctgatttc accaaccctg 7080
agaccttga ctggtggcag gacatggtgt ctgagttcca cgcccaggtg cccttcgatg 7140

gcatgtggct cgtaagtgca gtcccatccc tccatgggta cacccccagc ctctggggac 7200
caacctagct cacatctctg cctcttccag gacatgaacg aaccgtccaa cttcgttaga 7260
ggctctcagc agggctgccc caacaatgaa ctggagaacc ccccctatgt gcccggtgag 7320
ccctgcttgc ctgcccggaa tggggatagt gctagagtta gtggcttaaa ccagggagtg 7380
tgcgcctctc tgtggtttgg gggatgtaaa gctctccatt tttttggccg tcaatagaca 7440
cagcagcttc gggacacaga acccaggagt gaagtcctac agtgtgtgac acagacatgg 7500
tcacagctag ccagtgcatc aggggaaggg ggttaggccc ggatgacaga cacttaggat 7560

gagtcaagag aaggtggatg tggagactgt aggtttagga ggaccgtctt tcgtacacct 7620

gtctttggac tagcagaagt gtatagtgat gtgggggggat ggggatggga ccagtttcag 7680

gaggctccgc cctgggcaga acccaaggag gtgtcaatca aagcagaggg tgtgggccaa 7740

ggagagggca cagggaaccc tggagagagt tacacctaaa actagtcctc ctctcgccta 7800

ggggtggttg gcgggatctt gcaggcagcc accatctgtg cctccagcca ccaattcctc 7860

tccacacact acaacctcca caacctgtac ggcctcactg aagctatcgc ctccagcagg 7920

tgaggctctg ccggctctgc accagccagc ctgccctgca atcacagtgg gggtcgagag 7980

gtgggctggc tcatgtcagg gtcatgaaag gaagggaaag aggttaccat accacccatg 8040

ggccagcgat gcctgcacgt ctgctgaaat ggttgctgtt ttccccctcc ccccccccagc 8100

atggagccgg cttctccccc ctatgcccag accagcccag atgttaagtg gggatgtcca 8160

aagggactcc atgtctctgg caaggcttag agtggtgact cacctgtaaa tgacttaaga 8220

gtcattgggg caggcctgac tgtacctagc atactttaaa gatggcctct ctttcccacc 8280

cattgtgatc tactaaacta tcagttcctc ttggccctga tccccttgct gctggccccc 8340

atgctctgtt ccagcacacg ggtgtgtatg acccaggtga gcccaggtct ctgtgttctc 8400

atcccactca gggccctggt caagactcgg ggaacacgac cctttgtgat ctcccgctca 8460

accttctcgg gccacggccg gtacgctggt cactggacag gggatgtgcg gagctcttgg 8520

gagcatcttg catactctgt gccaggtgag tacaagctgc ctgcagggct ctggggtctt 8580

ttctgggggt ctttgggctg tgggctcacc actgcagatg gtattgtgat agcttgggga 8640

catgcgccat ctcatgtggc acatgaagcc tgctgctggt ccttactcac ctgtgtcagc 8700

agcgcacctg tgcagtatgg ctcgcctggg caccttttctt ctcaggatcc ctgtgtctgt 8760

ttcaccctga ccactgcttg aaaagccctc agactctcgc cagagaccgg ttgttctctg 8820

gtcacctcat ccggagacac aggctagctg ttccacttgc ttttggggtt ttgtttgttt 8880

ttcaagacag ggtctctctc tctctctctc tgtatagcca tgaatgtcct ggaactggct 8940

ttgtagacca gtctggcctc aaattcatag aagtctgcct gcctctgcct cccaagtgct 9000

gggattaaag acgtttataa ccacagccca gctgcctgat ctacttgcaa aaaggagttt 9060

ggtttttatt ccaagaactt gaatgccatt ggcccatgtt aggtcagaaa gtcaggagcc 9120

ctagagaaca gactagggaa ggagagggag ccaggcctcc tcatgggcac ctaaggggcg 9180

tgactaagag tttggaacct tctaacttct ggaagactgg cttctgtata ggatatgctc 9240

acagacctat gaagggcccc agctggctga ctcctcagag gtggagctgg ctacctctgc 9300

ctcatgggct gcagctcact gcaggcaggc ctggtaggcc aggagccaga ctcagagcag 9360

ccttgcagag ctgagtctgg tctttctcct tctcttttgg cctcaggtct cttaatgtcc 9420

tgaggctgcc agagctgagg gcagctttct ggggacttaa tgtcatagga atccatctgt 9480

ggatagtgac tggaccatag gtctgcagcc aaggagtgac agagccacac ccccttgccc 9540

caaggtgtgg ctcggtgccc ctcacagcct tgggaaccct tcattctgct ctaggccctc 9600

tgggcgttgc tgctgggatg tatctccatc ctcacagggc tatcgtccca tgtgactttt 9660

aagtgtccca cgacattttc ttcaggacca catcaaaccc accttagtgc cattacatct 9720

ggagagctcc tgtttccaaa tgaggttaca gtcacacatc ctgcacccca gtatcttggg 9780

ctctgggcta ctctgctgcc cacaggcgtt aggacaaatg gaaagcagag aactatgggc 9840

tcttgcccgt caggccggga tggcaaggct gggttcaacc tgcccagcag gcctgtctgt 9900

ccagctgctg tcttggtaac ctggtaccac tctgcctctg tacccagaca tcctgcagtt 9960

caacctgctg ggcgtgcccc tggtcggggc ggacatctgc ggcttcatag gagacacgtc 10020

agaagagctg tgtgtgcgct ggacccagtt gggggccttc tacccccttca tgcggaacca 10080

caatgacctg aatagcgtgg taggacggag tggcagggag tccccaccca cctagaccct 10140

ctcctggtta atcccatacc tgctggaaga gctgtcgacg aattctaccg ggtaggggag 10200

gcgcttttcc caaggcagtc tggagcatgc gctttagcag ccccgctggg cacttggcgc 10260

tacacaagtg gcctctggcc tcgcacacat tccacatcca ccggtaggcg ccaaccggct 10320

ccgttctttg gtggcccctt cgcgccacct tctactcctc ccctagtcag gaagttcccc 10380

cccgccccgc agctcgcgtc gtgcaggacg tgacaaatgg aagtagcacg tctcactagt 10440

ctcgtgcaga tggacagcac cgctgagcaa tggaagcggg taggcctttg gggcagcggc 10500

caatagcagc tttgctcctt cgctttctgg gctcagaggc tgggaagggg tgggtccggg 10560

ggcgggctca ggggcgggct caggggcggg gcgggcgcga aggtcctccc gaggcccggc 10620

attctcgcac gcttcaaaag cgcacgtctg ccgcgctgtt ctcctcttcc tcatctccgg 10680

gcctttcgac ctgcagcgac ccgcttaaca gcgtcaacag cgtgccgcag atcttggtgg 10740

cgtgaaactc ccgcacctct tcggccagcg ccttgtagaa gcgcgtatgg cttcgtaccc 10800

ctgccatcaa cacgcgtctg cgttcgacca ggctgcgcgt tctcgcggcc ataacaaccg 10860

acgtacggcg ttgcgccctc gccggcaaca aaaagccacg gaagtccgcc tggagcagaa 10920

aatgcccacg ctactgcggg tttatataga cggtccccac gggatgggga aaaccaccac 10980

cacgcaactg ctggtggccc tgggttcgcg cgacgatatc gtctacgtac ccgagccgat 11040

gacttactgg cgggtgttgg gggcttccga gacaatcgcg aacatctaca ccacacaaca 11100

ccgcctcgac cagggtgaga tatcggccgg ggacgcggcg gtggtaatga caagcgccca 11160

gataacaatg ggcatgcctt atgccgtgac cgacgccgtt ctggctcctc atatcggggg 11220

ggaggctggg agctcacatg ccccgccccc ggccctcacc ctcatcttcg accgccatcc 11280

catcgccgcc ctcctgtgct acccggccgc gcgatacctt atgggcagca tgacccccca 11340

ggccgtgctg gcgttcgtgg ccctcatccc gccgaccttg cccggcacaa acatcgtgtt 11400

gggggccctt ccggaggaca gacacatcga ccgcctggcc aaacgccagc gccccggcga 11460

gcggcttgac ctggctatgc tggccgcgat tcgccgcgtt tatgggctgc ttgccaatac 11520

ggtgcggtat ctgcagggcg gcgggtcgtg gcgggaggat tggggacagc tttcgggggc 11580

ggccgtgccg ccccagggtg ccgagcccca gagcaacgcg ggcccacgac cccatatcgg 11640

ggacacgtta tttaccctgt ttcgggcccc cgagttgctg gcccccaacg gcgacctgta 11700

taacgtgttt gcctgggctt tggacgtctt ggccaaacgc ctccgtccca tgcatgtctt 11760

tatcctggat tacgaccaat cgcccgccgg ctgccgggac gccctgctgc aacttacctc 11820

cgggatggtc cagacccacg tcaccacccc aggctccata ccgacgatct gcgacctggc 11880

gcgcacgttt gcccgggaga tgggggaggc taactgaaac acggaaggag acaataccgg 11940

aaggaacccg cgctatgacg gcaataaaaa gacagaataa aacgcacggg tgttgggtcg 12000

tttgttcata aacgcggggt tcggtcccag ggctggcact ctgtcgatac cccaccgaga 12060

ccccattggg accaatacgc ccgcgtttct tccttttccc caccccaacc cccaagttcg 12120

ggtgaaggcc cagggctcgc agccaacgtc ggggcggcaa gccctgccat agccacgggc 12180

cccgtgggtt agggacgggg tcccccatgg ggaatggttt atggttcgtg ggggttatta 12240

ttttgggcgt tgcgtggggt caggtccacg actggactga gcagacagac ccatggtttt 12300

tggatggcct gggcatggac cgcatgtact ggcgcgacac gaacaccggg cgtctgtggc 12360

tgccaaacac ccccgacccc caaaaaccac cgcgcggatt tctggcgccg ccggacgaac 12420

taaacctgac tacggcatct ctgccccttc ttcgctggta cgaggagcgc ttttgttttg 12480

tattggtcac cacggccgag tttccgcggg accccggcca ggacctgcag aaattgatga 12540

tctattaaac aataaagatg tccactaaaa tggaagtttt tcctgtcata ctttgttaag 12600

aagggtgaga acagagtacc tacattttga atggaaggat tggagctacg ggggtggggg 12660

tggggtggga ttagataaat gcctgctctt tactgaaggc tctttactat tgctttatga 12720

taatgtttca tagttggata tcataattta aacaagcaaa accaaattaa gggccagctc 12780

attcctccca ctcatgatct atagatctat agatctctcg tgggatcatt gtttttctct 12840

tgattcccac tttgtggttc taagtactgt ggtttccaaa tgtgtcagtt tcatagcctg 12900

aagaacgaga tcagcagcct ctgttccaca tacacttcat tctcagtatt gttttgccaa 12960

gttctaattc catcagaagc ttggcactgg ccgtcgtttt acaacgtcgt gactgggaaa 13020

accctggcgt tacccaactt aatcgccttg cagcacatcc ccctttcgcc agctggcgta 13080

atagcgaaga ggcccgcacc gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat 13140

ggcgcctgat gcggtatttt ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatatggt 13200

gcactctcag tacaatctgc tctgatgccg catagttaag ccagccccga cacccgccaa 13260

cacccgctga cgcgccctga cgggcttgtc tgctcccggc atccgcttac agacaagctg 13320

tgaccgtctc cgggagctgc atgtgtcaga ggttttcacc gtcatcaccg aaacgcgcga 13380

gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 13440

cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 13500

tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 13560

aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctttt 13620

ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 13680

ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 13740

tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 13800

tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 13860

actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 13920

gcatgacagt aagagaatta tgcagtgctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 13980

acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacaacatgg 14040

gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 14100

acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 14160

gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 14220

ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 14280

gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggtaagccct 14340

cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 14400

agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 14460

catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 14520

tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 14580

cagaccccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttttctg cgcgtaatct 14640

gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgccg gatcaagagc 14700

taccaactct ttttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 14760

ttctagtgta gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 14820

tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 14880

ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggttt 14940

cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 15000

agctatgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg 15060

gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatcttt 15120

atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 15180

gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt tttacggttc ctggccttttt 15240

gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 15300

ttaccgcctt tgagtgagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt 15360

cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 15420

cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca 15480

acgcaattaa tgtgagttag ctcactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc 15540

cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 15600

accatgatta cgccaacgct cgaaattaac cctcactaaa gggaacaaaa gctggagctc 15660

caccgcggt 15669