



공개특허 10-2023-0132468

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0132468
(43) 공개일자 2023년09월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)	(71) 출원인
C07K 16/42 (2006.01) A61K 31/165 (2006.01)	리제너론 파아마슈티컬스, 인크.
A61K 39/00 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)	미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777
(52) CPC특허분류	(72) 발명자
C07K 16/4258 (2013.01)	던 마이클
A61K 31/165 (2013.01)	미국 뉴욕주 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내 모르던 로리
(21) 출원번호 10-2023-7024056	(74) 대리인
(22) 출원일자(국제) 2021년12월17일	장훈
심사청구일자 없음	
(85) 번역문제출일자 2023년07월14일	
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/064073	
(87) 국제공개번호 WO 2022/133239	
국제공개일자 2022년06월23일	
(30) 우선권주장	
63/127,959 2020년12월18일 미국(US)	

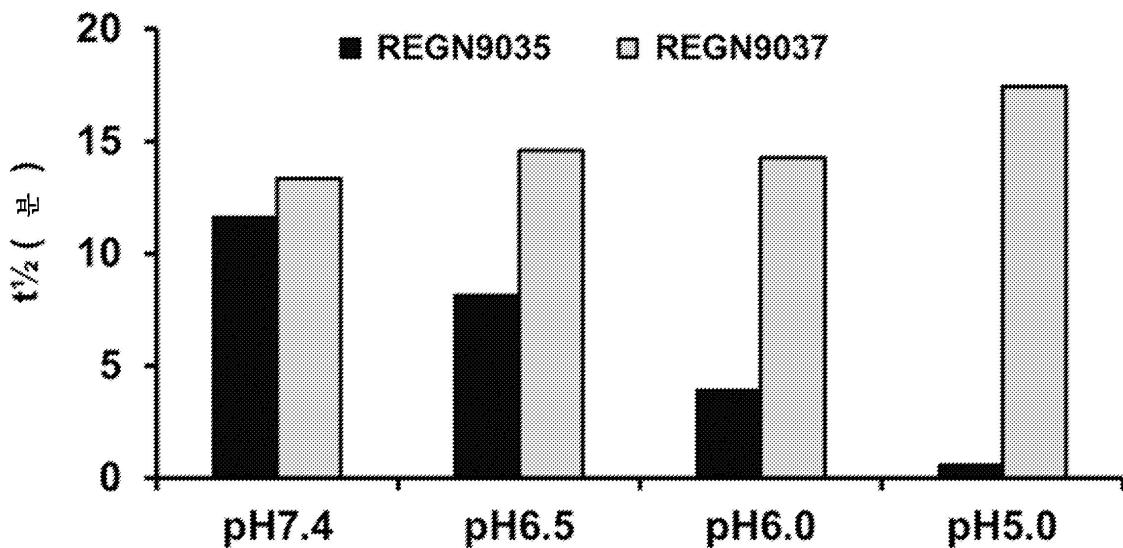
전체 청구항 수 : 총 128 항

(54) 발명의 명칭 NPR1 작용제에 결합하는 면역글로불린 단백질

(57) 요 약

본 개시내용은 인간 나트륨 배설 촉진 펩타이드 수용체 1(NPR1) 효능제에 결합하는 신규의 면역글로불린 단백질, 바람직하게는 항-NPR1 항체를 제공한다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 단백질은 항-NPR1 항체에 결합하는 적어도 하나의 면역글로불린 가변 도메인을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 단백질은 투여된 항-NPR1 항체의 효과를 차단하고/하거나 역전시키는 데 유용하다. 소정의 실시형태에서, 항원 결합 단백질은 인간에서의 혈압 및 혈류역학의 효과적인 관리에 유용하다.

대 표 도



(52) CPC특허분류

A61P 9/12 (2018.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/21 (2013.01)

C07K 2317/35 (2013.01)

C07K 2317/565 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자

스탈 널

미국 뉴욕주 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내

황 태미

미국 뉴욕주 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내

채터지 이시타

미국 뉴욕주 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내

카마트 비살

미국 뉴욕주 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내

라피크 아시크

미국 뉴욕주 10591 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내

명세서

청구범위

청구항 1

나트륨 배설 촉진 웨타이드 수용체 1(NPR1: natriuretic peptide receptor 1) 효능제의 혈류역학적 효과를 역전시키는 제제.

청구항 2

나트륨 배설 촉진 웨타이드 수용체 1(NPR1) 효능제의 투여와 연관된 혈압 감소를 역전시키는 제제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제제는 면역글로불린 단백질, 혈관수축제, 알파-아드레노수용체 효능제, 스테로이드, 항이뇨 호르몬, 혈관생성 억제제, 및 혈압을 증가시키는 소분자 제제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제제.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제제는 면역글로불린 단백질인, 제제.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제제는 NPR1 효능제에 특이적으로 결합하는, 제제.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, NPR1 효능제는 NPR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 제제.

청구항 7

제6항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 48을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) 내에 함유된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3); 및 서열 번호 52를 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내에 함유된 3개의 경쇄 CDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하는, 제제.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 각각 서열 번호 49, 50 및 51을 포함하는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3); 및 각각 서열 번호 53, 54 및 55를 포함하는 3개의 경쇄 CDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하는, 제제.

청구항 9

제8항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 48의 HCVR 및 서열 번호 52의 LCVR을 포함하는, 제제.

청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단일클론 항체인, 제제.

청구항 11

제10항에 있어서, 항체는 IgG1 항체인, 제제.

청구항 12

제10항에 있어서, 항체는 IgG4 항체인, 제제.

청구항 13

제10항에 있어서, 항체는 서열 번호 56을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 57을 포함하는 경쇄를 포함하는, 제제.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, NPR1 효능체는 R5381인, 제제.

청구항 15

제4항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 단백질은 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, Fab 단편, F(ab)2 단편, Fv 단편, Fd 단편, scFv, dAb, 2가 단일클론 항체 또는 1가 단일클론 항체를 포함하는, 제제.

청구항 16

제15항에 있어서, 면역글로불린 단백질은 중쇄 가변 영역(HCVR) 내에 함유된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3) 및 경쇄 가변 영역(LCVR) 내에 함유된 3개의 경쇄 CDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하는 적어도 하나의 면역글로불린 가변 도메인을 포함하는, 제제.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 면역글로불린 단백질은 서열 번호 4, 6, 8, 12, 14 및 16; 또는 서열 번호 24, 26, 28, 32, 34 및 36으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3) 및 3개의 경쇄 CDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하는, 제제.

청구항 18

제17항에 있어서, HCVR은 서열 번호 2 및 22로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 적어도 90%, 선택적으로 95%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, LCVR은 서열 번호 10 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 적어도 90%, 선택적으로 95%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, HCVR은 서열 번호 2 및 22로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; LCVR은 서열 번호 10 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 21

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, HCVR은 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하고; LCVR은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 22

제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, HCVR은 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하고; LCVR은 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 23

제17항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 단백질은 적어도 하나의 면역글로불린 가변 도메인을 포함하는 인간 단일클론 항체를 포함하는, 제제.

청구항 24

제23항에 있어서, 인간 단일클론 항체는 IgG1 또는 IgG4 아이소타입을 갖는, 제제.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 인간 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 중쇄는 서열 번호 18 및 38로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 단일클론 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 경쇄는 서열 번호 20 및 40으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 27

제4항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 단백질은 하나의 면역글로불린 가변 도메인을 포함하는, 제제.

청구항 28

제27항에 있어서, 하나의 면역글로불린 가변 도메인은 중쇄 가변 영역(HCVR) 내에 함유된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3) 및 경쇄 가변 영역(LCVR) 내에 함유된 3개의 경쇄 CDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하고, HCDR1은 서열 번호 4 및 24로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; HCDR2는 서열 번호 6 및 26으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; HCDR3은 서열 번호 8 및 28로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; LCDR1은 서열 번호 12 및 32로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; LCDR2는 서열 번호 14 및 34로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; LCDR3은 서열 번호 16 및 36으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 29

제28항에 있어서, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3은 (i) 서열 번호 4, 6, 8, 12, 14 및 16; 및 (ii) 서열 번호 24, 26, 28, 32, 34 및 36으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, HCVR은 서열 번호 2 및 22로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 적어도 90%, 선택적으로 95%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 31

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, LCVR은 서열 번호 10 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 적어도 90%, 선택적으로 95%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 32

제28항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, HCVR은 서열 번호 2 및 22로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; LCVR은 서열 번호 10 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 33

제28항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, HCVR은 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하고; LCVR은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 34

제28항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, HCVR은 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하고; LCVR은 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 35

제26항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 하나의 면역글로불린 가변 도메인은 Fab 단편 내에 포함된, 제제.

청구항 36

제26항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 다합체화 성분을 추가로 포함하는, 제제.

청구항 37

제36항에 있어서, 다합체화 성분은 적어도 하나의 Fc 단편을 포함하는, 제제.

청구항 38

제37항에 있어서, Fc 단편은 아이소타입 IgG1, IgG4 또는 이의 변이체를 갖는, 제제.

청구항 39

제38항에 있어서, Fc 단편은 IgG4 아이소타입을 갖는, 제제.

청구항 40

제38항에 있어서, Fc 단편은 IgG1 아이소타입을 갖는, 제제.

청구항 41

제37항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 Fc 단편 및 제2 Fc 단편을 포함하고, Fc 단편 둘 다가 아닌 제1 Fc 단편 또는 제2 Fc 단편은 변형이 결여된 면역글로불린 단백질과 비교하여 면역글로불린 단백질의 단백질 A에 대한 결합을 감소시키는 CH3 도메인의 변형을 포함하는, 제제.

청구항 42

제41항에 있어서, 변형은 Fc 단편에서 H315R 치환 및 Y316F 치환(EU 넘버링)을 포함하는, 제제.

청구항 43

제37항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 다합체화 성분은 서열 번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 단편 및 서열 번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 단편을 포함하는, 제제.

청구항 44

제16항 내지 제22항 및 제26항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 가변 도메인은 1가 단일클론 항체에 포함된, 제제.

청구항 45

제44항에 있어서, 1가 단일클론 항체는 중쇄 불변 영역 및 HCVR을 포함하는 중쇄 및 LCVR을 포함하는 경쇄를 포함하는, 제제.

청구항 46

제45항에 있어서, 중쇄 불변 영역은 변형이 결여된 면역글로불린 단백질과 비교하여 면역글로불린 단백질의 단백질 A에 대한 결합을 감소시키는 CH3 도메인의 변형을 포함하는, 제제.

청구항 47

제46항에 있어서, 변형은 IgG1 또는 IgG4 아이소타입의 중쇄 불변 영역에서의 H315R 치환 및 Y316F 치환(EU 넘버링)을 포함하는, 제제.

청구항 48

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄는 서열 번호 42의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 49

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄는 서열 번호 44의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열 번호 40의 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 50

제44항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 단백질은 Fc 단편을 추가로 포함하는, 제제.

청구항 51

제50항에 있어서, Fc 단편은 IgG1 또는 IgG4 아이소타입을 갖는, 제제.

청구항 52

제50항 또는 제51항에 있어서, Fc 단편은 서열 번호 46의 아미노산 서열을 포함하는, 제제.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제제는 REGN9035 또는 REGN9037인, 제제.

청구항 54

제15항 내지 제53항 중 어느 한 항에 제시된 것과 같은 면역글로불린 단백질의 중쇄 가변 영역(HCVR)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 55

제15항 내지 제53항 중 어느 한 항에 제시된 것과 같은 면역글로불린 단백질의 경쇄 가변 영역(LCVR)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드 분자.

청구항 56

제54항의 폴리뉴클레오타이드 분자 및/또는 제55항의 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함하는, 백터.

청구항 57

제56항의 백터를 발현하는 숙주 세포.

청구항 58

제57항에 있어서, 숙주 세포는 CHO 세포인, 숙주 세포.

청구항 59

면역글로불린 단백질을 제조하는 방법으로서, 제57항의 숙주 세포를 단백질의 생성을 허용하는 조건 하에 성장시키는 단계 및 이렇게 생성된 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 숙주 세포는 CHO 세포인, 방법.

청구항 61

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제제는 혈관수축제인, 제제.

청구항 62

제61항에 있어서, 혈관수축제는 미도드린인, 제제.

청구항 63

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항의 제제 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는, 약제학적

조성물.

청구항 64

NPR1 효능제의 혈류역학적 효과를 역전시키는 방법으로서, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 제1항 내지 제53항 중 어느 한 항의 제제의 치료적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 65

NPR1 효능제의 투여와 연관된 혈류역학적 변경을 역전시키는 방법으로서, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 제1항 내지 제53항 중 어느 한 항의 제제의 치료적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 66

제64항 또는 제65항에 있어서, 상기 조성물은 대상체에게 피하로, 정맥내로, 진피내로, 복강내로, 근육내로 또는 경구로 투여되는, 방법.

청구항 67

제64항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, NPR1 효능제는 NPR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 48을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR) 내에 함유된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3); 및 서열 번호 52를 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내에 함유된 3개의 경쇄 CDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하는, 방법.

청구항 69

제64항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, NPR1 효능제는 R5381인, 방법.

청구항 70

제64항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 고혈압, 심부전 및 만성 신장 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환 또는 장애를 갖는, 방법.

청구항 71

제15항 내지 제53항 중 어느 한 항의 제제와 결합에 대해 경쟁하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 72

제15항 내지 제53항 중 어느 한 항의 제제와 동일한 에피토프에 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 73

면역글로불린 단백질로서,

(a) 중쇄 가변 영역(HCVR) 및 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하는 단일 면역글로불린 가변 도메인이되, HCVR은 서열 번호 2 및 22로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고, LCVR은 서열 번호 10 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 단일 면역글로불린 가변 도메인을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 74

면역글로불린 단백질로서,

(a) 중쇄 가변 영역(HCVR) 내에 함유된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3) 및 경쇄 가변 영역(LCVR) 내에 함유된 3개의 경쇄 CDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하는 단일 면역글로불린 가변 도메인

이되, HCDR1-HCDR2-HCDR3은 서열 번호 4, 6 및 8, 및 24, 26 및 28로 이루어진 군으로부터 선택되고, LCDR1-LCDR2-LCDR3은 서열 번호 12, 14 및 16, 및 32, 34 및 36으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 단일 면역글로불린 가변 도메인을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 75

제74항에 있어서,

(i) HCDR1은 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 8의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 12의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 14의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 16의 아미노산 서열을 포함하고; 또는

(ii) HCDR1은 서열 번호 24의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR2는 서열 번호 26의 아미노산 서열을 포함하고, HCDR3은 서열 번호 28의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR1은 서열 번호 32의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR2는 서열 번호 34의 아미노산 서열을 포함하고, LCDR3은 서열 번호 36의 아미노산 서열을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 76

제74항 또는 제75항에 있어서, HCVR은 서열 번호 2 및 22로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 적어도 90%, 선택적으로 95%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 77

제74항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, LCVR은 서열 번호 10 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 적어도 90%, 선택적으로 95%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 78

제74항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, HCVR은 서열 번호 2 및 22로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; LCVR은 서열 번호 10 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 79

제73항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서,

- (1) HCVR은 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하고, LCVR은 서열 번호 10의 아미노산 서열을 포함하고; 또는
- (2) HCVR은 서열 번호 22의 아미노산 서열을 포함하고, LCVR은 서열 번호 30의 아미노산 서열을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 80

제73항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 다합체화 성분을 추가로 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 81

제80항에 있어서, 다합체화 성분은 적어도 하나의 Fc 단편을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 82

제81항에 있어서, Fc 단편은 인간 IgG1 또는 IgG4 아이소타입을 갖는, 면역글로불린 단백질.

청구항 83

제81항 또는 제82항에 있어서, 제1 Fc 단편 및 제2 Fc 단편을 포함하고, Fc 단편 둘 다가 아닌 제1 Fc 단편 또는 제2 Fc 단편은 변형이 결여된 면역글로불린 단백질과 비교하여 면역글로불린 단백질의 단백질 A에 대한 결합을 감소시키는 CH3 도메인의 변형을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 84

제83항에 있어서, 변형은 Fc 단편에서 H315R 치환 및 Y316F 치환(EU 넘버링)을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 85

제80항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 제1 Fc 단편 및 서열 번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 제2 Fc 단편을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 86

제73항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 2의 HCVR, 서열 번호 10의 LCVR 및 다합체화 성분을 포함하고, 다합체화 성분은 서열 번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 제1 Fc 단편 및 서열 번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 제2 Fc 단편을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 87

제73항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 22의 HCVR, 서열 번호 30의 LCVR 및 다합체화 성분을 포함하고, 다합체화 성분은 서열 번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 제1 Fc 단편 및 서열 번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 제2 Fc 단편을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 88

제73항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 단백질은 HCVR 및 중쇄 불변 영역을 포함하는 중쇄 및 LCVR 및 경쇄 불변 영역을 포함하는 경쇄를 포함하고, 중쇄는 인간 IgG1 또는 IgG4 아이소타입을 갖는, 면역글로불린 단백질.

청구항 89

제88항에 있어서, 중쇄 불변 영역은 변형이 결여된 면역글로불린 단백질과 비교하여 면역글로불린 단백질의 단백질 A에 대한 결합을 감소시키는 CH3 도메인의 변형을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 90

제89항에 있어서, 변형은 IgG1 또는 IgG4 아이소타입의 중쇄 불변 영역에서의 H315R 치환 및 Y316F 치환(EU 넘버링)을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 91

제88항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄는 서열 번호 42 및 44로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 92

제88항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄는 서열 번호 20 및 40으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 93

제88항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서,

- (i) 중쇄는 서열 번호 42의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하고; 또는
- (ii) 중쇄는 서열 번호 44의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열 번호 40의 아미노산 서열을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 94

제88항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 다합체화 성분을 추가로 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 95

제94항에 있어서, 다합체화 성분은 Fc 단편을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 96

제96항에 있어서, Fc 단편은 인간 IgG1 또는 IgG4 아이소타입을 갖는, 면역글로불린 단백질.

청구항 97

제95항 또는 제96항에 있어서, Fc 단편은 서열 번호 46의 아미노산 서열을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 98

제88항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 42의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 단편을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 99

제88항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 번호 44의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 서열 번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 및 서열 번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 단편을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 100

제73항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 단백질은 NPR1 효능체에 특이적으로 결합하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 101

제100항에 있어서, NPR1 효능체는 NPR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 면역글로불린 단백질.

청구항 102

제101항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR 및 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 LCVR을 포함하는, 면역글로불린 단백질.

청구항 103

제100항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, NPR1 효능체는 R5381인, 면역글로불린 단백질.

청구항 104

제73항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 단백질은 REGN9035 또는 REGN9037인, 면역글로불린 단백질.

청구항 105

제73항 내지 제104항 중 어느 한 항에 제시된 것과 같은 면역글로불린 단백질의 HCVR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드 문자.

청구항 106

제73항 내지 제104항 중 어느 한 항에 제시된 것과 같은 면역글로불린 단백질의 LCVR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 폴리뉴클레오타이드 문자.

청구항 107

제105항의 폴리뉴클레오타이드 문자 및/또는 제106항의 폴리뉴클레오타이드 문자를 포함하는, 벡터.

청구항 108

제107항의 벡터를 발현하는 숙주 세포.

청구항 109

제108항에 있어서, 숙주 세포는 CHO 세포인, 숙주 세포.

청구항 110

면역글로불린 단백질을 제조하는 방법으로서, 제108항의 숙주 세포를 단백질의 생성을 허용하는 조건 하에 성장시키는 단계 및 이렇게 생성된 단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 111

제110항에 있어서, 숙주 세포는 CHO 세포인, 방법.

청구항 112

제73항 내지 제104항 중 어느 한 항의 면역글로불린 단백질 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 113

NPR1 효능제의 혈류역학적 효과를 역전시키는 방법으로서, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 제73항 내지 제104항 중 어느 한 항의 면역글로불린 단백질의 치료적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 114

NPR1 효능제의 투여와 연관된 혈류역학적 변경을 역전시키는 방법으로서, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 제73항 내지 제104항 중 어느 한 항의 면역글로불린 단백질의 치료적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 115

제113항 또는 제114항에 있어서, 상기 조성물은 대상체에게 피하로, 정맥내로, 진피내로, 복강내로, 근육내로 또는 경구로 투여되는, 방법.

청구항 116

제113항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, NPR1 효능제는 NPR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 방법.

청구항 117

제116항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR 및 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 LCVR을 포함하는, 방법.

청구항 118

제113항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, NPR1 효능제는 R5381인, 방법.

청구항 119

제113항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 고혈압, 심부전 및 만성 신장 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환 또는 장애를 갖는, 방법.

청구항 120

제73항 내지 제104항 중 어느 한 항의 면역글로불린 단백질과 결합에 대해 경쟁하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 121

제73항 내지 제104항 중 어느 한 항의 면역글로불린 단백질과 동일한 에피토프에 결합하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

청구항 122

조성물로서, (i) 제73항 내지 제104항 중 어느 한 항의 면역글로불린 단백질; 및 (ii) NPR1 효능제를 포함하는, 조성물.

청구항 123

제122항에 있어서, NPR1 효능제는 NPR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, 조성물.

청구항 124

제123항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 48의 아미노산 서열을 포함하는 HCVR 및 서열 번호 52의 아미노산 서열을 포함하는 LCVR을 포함하는, 조성물.

청구항 125

제122항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, NPR1 효능제는 R5381인, 조성물.

청구항 126

제122항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 이를 필요로 하는 대상체에서 효과적인 혈압 조절을 위한 방법에서 사용하기 위한, 조성물.

청구항 127

제126항에 있어서, 대상체는 NPR1 연관된 질환 또는 장애를 갖는, 조성물.

청구항 128

제127항에 있어서, 질환 또는 장애는 고혈압, 심부전 및 만성 신장 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 조성물.

발명의 설명**기술 분야**

[0001]

기술분야

[0002]

본 개시내용은 나트륨 배설 촉진 웹타이드 수용체 1(NPR1) 효능제에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 단백질 및 이 단백질을 사용하는 치료 방법에 관한 것이다.

[0003]

관련 출원의 상호 참조

[0004]

본 출원은 PCT 특허 국제 출원으로서 2021년 12월 17일에 출원되었다. 본 출원은 2020년 12월 18일에 출원된 미국 가특허 출원 제63/127,959호의 우선권을 주장하고; 이의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0005]

서열 성명

[0006]

본 출원은 ASCII 형식으로 전자로 제출되고 본원에 그 전체가 참고로 포함된 서열 목록을 함유한다. 2021년 12월 13일에 생성된 상기 ASCII 사본은 명칭이 40848-0104WOU1-SeqListing.txt이고, 크기가 71 킬로바이트이다.

배경 기술

[0007]

나트륨 배설 촉진 웹타이드 수용체 1(NPR1; NPR-A로도 알려짐)은 사이클릭 GMP로의 GTP의 전환을 촉매화하는 효소인 구아닐릴 시클라제 수용체의 세포-표면 패밀리에 속한다. NPR1은 신장, 폐, 부신, 맥관구조, 뇌, 간, 내피 및 지방 조직에서는 고도로 발현되고, 심장에서는 더 낮은 수준으로 발현된다. 이것은 심방 나트륨 배설 촉진 웹타이드(ANP) 또는 뇌 나트륨 배설 촉진 웹타이드(BNP)에 결합함으로써 활성화된다. NPR1 활성화 및 신호전달

은 많은 조직을 수반하는 많은 생리학적 반응을 자극한다. ANP-NPR1 시스템은 혈관이완, 나트륨뇨 배설항진, 이뇨, 내피 투과성 및 지방분해 및 면역 세포 기능과 같은 비심혈관 기능에서의 이의 역할에 대해 잘 연구되었다 (Potter 2011, *Pharmacol. Ther.* 130: 71-82). NPR1의 활성화는 나트륨뇨 배설항진(신장에 의한 염의 배설) 및 더 낮은 혈압으로 이어진다.

[0008] NPR1의 작용효과에 의도된 현재 허가된 치료제는 다수의 임상 도전을 제시한다.

[0009] NPR1에 대한 단일클론 항체는 처음에 문헌[Kitano, et al., (1995 *Immunol Lett* 47: 215-22)]에 의해 기재되었다. 활성화 또는 효능제 항-NPR1 항체는 예를 들면 US 특허/공보 제9090695호 및 제20160168251호 및 WO2010065293호에 개시되어 있다. 높은 친화도로 NPR1 단백질에 특이적으로 결합하고 이를 활성화하는 완전 인간 효능제 항체는 미국 공보 제20200123263호에 기재되어 있다. R5381은 현재의 관리 표준 치료와 비교하여 전신 혈압 감소에서의 긴 효과 지속기간을 나타낸 NPR1의 효능제이다.

[0010] 생체내 연구는 R5381이 불리한 저혈압의 증거(즉, 실신, 운동능력 변경, 사망) 없이 유의미하고 지속적인 전신 혈압 감소를 유도하였다는 것을 나타냈다. 소정의 항-NPR1 항체의 주요 작용 방식이 혈류역학적인 것으로 발견되었으므로, 이의 혈류역학적 효과를 사전에 제압하기 위한 역전 제제의 필요성이 있다.

발명의 내용

[0011] NPR1 효능제(예를 들면, 활성화 또는 효능제 항-NPR1 항체)의 사용에 관한 가능한 우려를 해소하기 위한 노력으로, 이러한 NPR1 효능제에 특이적으로 결합하는 역전 제제가 본원에 개시된 것과 같이 개발되었다.

[0012] 항-NPR1 항체는 NPR1과 연관된 질환, 장애 또는 병태의 치료 및/또는 예방을 위해 및/또는 이러한 질환, 장애 또는 병태와 연관된 적어도 하나의 증상을 개선하기 위해 기재되었다(예를 들면, WO2020/086406호 참조). 항-NPR1 항체의 주요 작용 방식은 혈류역학적이다. 혈압 저하와 연관된 잠재적인 불리한 사건은 정상(낮은) 정맥 압을 갖는 대상체에서 지속적인, 증후성 저혈압, 보상성 교감신경계 반응으로부터의 반사성 빈맥(가능하게는 심근경색, 뇌졸중, 부정맥, 심부전에 대한 위험을 증가시킴) 및 감소된 심박출량 및 종말 장기 관류를 포함할 수 있다. 따라서, 항-NPR1 항체의 혈류역학적 효과를 표적화하고 안정화하거나 감소시키거나 역전시킬 수 있는 역전 제제(또는 구제 제제)의 필요성이 있다.

[0013] 따라서, 본 개시내용은 나트륨 배설 촉진 웨بت아이드 수용체 1(NPR1) 효능제의 혈류역학적 효과를 역전시키는 제제를 제공한다. 상기 제제는 또한 본원에서 역전 제제 또는 구제 제제로 지칭된다.

[0014] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 대상체에서의 NPR1 효능제의 투여와 연관된 혈압의 감소를 역전시키는 제제를 제공한다.

[0015] 일 실시형태에서, 상기 제제는 면역글로불린 단백질, 혈관수축제, 알파-아드레노수용체 효능제, 스테로이드, 항이뇨 호르몬, 혈관생성 억제제 및 혈압을 증가시키는 소분자 제제로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0016] 일 실시형태에서, 상기 제제는 면역글로불린 단백질이다. 일 실시형태에서, 상기 제제는 NPR1 효능제에 특이적으로 결합한다. 일 실시형태에서, NPR1 효능제는 NPR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일 실시형태에서, 항-NPR1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 48을 포함하는 중쇄 가변 영역 (HCVR) 내에 함유된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3); 및 서열 번호 52를 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR) 내에 함유된 3개의 경쇄 CDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함한다. 일 실시형태에서, 항-NPR1 항체는 각각 서열 번호 49, 50 및 51을 포함하는 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3); 및 각각 서열 번호 53, 54 및 55를 포함하는 3개의 경쇄 CDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함한다. 일 실시형태에서, 항-NPR1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 48의 HCVR 및 서열 번호 52의 LCVR을 포함한다. 일 실시형태에서, 항-NPR1 항체는 단일클론 항체이다. 일 실시형태에서, 항-NPR1 항체는 IgG1 또는 IgG4 항체이다. 일 실시형태에서, 항-NPR1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열 번호 56을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 57을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일 실시형태에서, 항-NPR1 항체는 R5381이다.

[0017] 일 실시형태에서, 구제 제제는 면역글로불린 단백질이다. 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 2가 항체를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 1가 또는 '1아암' 항체를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 재조합 단일클론 항체를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 2가 또는 1가인 완전 인간 단일클론 항체를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 IgG1 또는 IgG4 아이소타입을 갖는 완전 인간 단일클론 항체이다. 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 Fab 단편을 포함한다.

일부 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 단일클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 2가 단일클론 항체, 1가 단일클론 항체, Fab 단편, F(ab)2 단편, Fv 단편, Fd 단편, scFv 또는 dAb를 포함한다. 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 중쇄 가변 영역(HCVR) 내에 함유된 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3) 및 경쇄 가변 영역(LCVR) 내에 함유된 3개의 경쇄 CDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하는 적어도 하나의 면역글로불린 가변 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 HCVR에 함유된 3개의 중쇄 CDR 및 LCVR에 함유된 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 1개의 면역글로불린 가변 도메인을 포함한다. 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 다합체화 성분을 추가로 포함하고, 다합체화 성분은 적어도 하나의 Fc 단편을 포함한다. 일 실시형태에서, 다합체화 성분은 제1 Fc 단편 및 제2 Fc 단편을 포함하고, 둘 다가 아닌 제1 Fc 단편 또는 제2 Fc 단편은 변형이 결여된 면역글로불린 단백질과 비교하여 면역글로불린 단백질의 단백질 A에 대한 결합을 감소시키는 CH3 도메인의 변형을 포함한다. 일 실시형태에서, 변형은 H315R 치환 및 Y316F 치환(EU 넘버링)을 포함한다.

[0018] 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 1가 항체를 포함하고, 1가 항체는 중쇄 불변 영역 및 HCVR을 포함하는 중쇄 및 경쇄 불변 영역 및 LCVR을 포함하는 경쇄를 포함하고, 중쇄는 인간 IgG1 또는 IgG4 아이소타입을 갖는다. 일 실시형태에서, 중쇄 불변 영역은 변형이 결여된 면역글로불린 단백질과 비교하여 면역글로불린 단백질의 단백질 A에 대한 결합을 감소시키는 CH3 도메인의 변형을 포함한다. 일 실시형태에서, 변형은 H315R 치환 및 Y316F 치환(EU 넘버링)을 포함한다. 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 다합체화 성분을 추가로 포함하고, 다합체화 성분은 Fc 단편을 포함한다. 일 실시형태에서, Fc 단편은 인간 IgG1 또는 IgG4 아이소타입을 갖는다.

[0019] 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 HCVR에 함유된 3개의 중쇄 CDR 및 LCVR에 함유된 3개의 경쇄 CDR을 포함하는 1개의 면역글로불린 가변 도메인을 포함하는 Fab 단편을 포함한다. 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 다합체화 성분을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 다합체화 성분은 적어도 하나의 Fc 단편을 포함한다. 일 실시형태에서, Fc 단편은 인간 IgG1, IgG4 또는 이의 변이체를 갖는다. 일 실시형태에서, 다합체화 성분은 제1 Fc 단편 및 제2 Fc 단편을 포함하고, 둘 다가 아닌 제1 Fc 단편 또는 제2 Fc 단편은 변형이 결여된 면역글로불린 단백질과 비교하여 면역글로불린 단백질의 단백질 A에 대한 결합을 감소시키는 CH3 도메인의 변형을 포함한다. 일 실시형태에서, 변형은 IgG1 또는 IgG4 아이소타입의 Fc 단편에서의 H315R 치환 및 Y316F 치환(EU 넘버링)을 포함한다.

[0020] 표 1은 예시적인 면역글로불린 단백질의 중쇄 가변 영역(HCVR), 경쇄 가변 영역(LCVR), 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR)(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3) 및 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR)(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)의 아미노산 서열 식별자를 제시한다. 표 2는 예시적인 면역글로불린 단백질의 HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 및 LCDR3의 핵산 서열 식별자를 제시한다.

[0021] CDR의 경계를 확인하기 위해 사용될 수 있는 예시적인 관례는 예를 들면 Kabat 정의, Chothia 정의 및 AbM 정의를 포함한다. 일반적인 용어에서, Kabat 정의는 서열 가변성에 기초하고, Chothia 정의는 구조 루프 영역의 위치에 기초하고, AbM 정의는 Kabat과 Chothia 접근법 사이의 타협이다. 예를 들면, 문헌[Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); 및 Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268-9272 (1989)]을 참조한다. 공공 데이터베이스는 또한 항체 내에 CDR 서열을 확인하기 위해 이용 가능하다.

[0022] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 HCVR 및 LCVR을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 상기 HCVR은 12개 이하의 아미노산 치환을 갖는 표 1에 열거된 아미노산 서열을 포함하고/하거나, 상기 LCVR은 10개 이하의 아미노산 치환을 갖는 표 1에 열거된 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들면, 본 개시내용은 HCVR 및 LCVR을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 상기 HCVR은 표 1에 열거된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 아미노산 서열은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개 또는 12개의 아미노산 치환을 갖는다. 또 다른 예에서, 본 개시내용은 HCVR 및 LCVR을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 상기 LCVR은 표 1에 열거된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 아미노산 서열은 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 아미노산 치환을 갖는다. 일 실시형태에서, 본 개시내용은 HCVR 및 LCVR을 포함하는 면역글로불린 단백질 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 상기 HCVR은 표 1에 열거된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 아미노산 서열은 적어도 하나의 아미노산 치환을 갖고/갖거나, 상기 LCVR은 표 1에 열거된 아미노산 서열을 포함하고, 상기 아미노산 서열은 적어도 하나의 아미노산 치환을 갖는다.

[0023] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 표 1에 열거된 임의의 HCVR 아미노산 서열로부터

선택되는 아미노산 서열 또는 이것과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 HCVR을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0024] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 표 1에 열거된 임의의 LCVR 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 이것과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다.

[0025] 본 개시내용은 또한 표 1에 열거된 임의의 HCVR1 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 중쇄 CDR1(HCDR1)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0026] 본 개시내용은 또한 표 1에 열거된 임의의 HCDR2 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 중쇄 CDR2(HCDR2)를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0027] 본 개시내용은 또한 표 1에 열거된 임의의 HCDR3 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 중쇄 CDR3(HCDR3)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0028] 본 개시내용은 또한 표 1에 열거된 임의의 LCDR1 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 경쇄 CDR1(LCDR1)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0029] 본 개시내용은 또한 표 1에 열거된 임의의 LCDR2 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 경쇄 CDR2(LCDR2)를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0030] 본 개시내용은 또한 표 1에 열거된 임의의 LCDR3 아미노산 서열로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열을 포함하는 경쇄 CDR3(LCDR3)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0031] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 표 1에 열거된 임의의 LCDR3 아미노산 서열과 쌍을 지은 표 1에 열거된 임의의 HCDR3 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3 및 LCDR3 아미노산 서열 쌍(HCDR3/LCDR3)을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 소정의 실시형태에 따르면, 본 개시내용은 표 1에 열거된 임의의 예시적인 면역글로불린 단백질 내에 함유된 HCDR3/LCDR3 아미노산 서열 쌍을 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 소정의 실시형태에서, HCDR3/LCDR3 아미노산 서열 쌍은 서열 번호 8/16 및 28/36으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0032] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 본원에 개시된 핵산 분자에 의해 암호화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 예를 들면, 본 개시내용은 표 1에 열거된 임의의 HCVR 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하고; 소정의 실시형태에서 핵산 분자는 표 2에 열거된 임의의 LCVR 핵산 서열 또는 이것과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0033] 본 개시내용은 또한 표 1에 열거된 임의의 LCVR 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하고; 소정의 실시형태에서 핵산 분자는 표 2에 열거된 임의의 LCVR 핵산 서열 또는 이것과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0034] 본 개시내용은 또한 표 1에 열거된 임의의 HCDR1 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하고; 소정의 실시형태에서 핵산 분자는 표 2에 열거된 임의의 HCDR1 핵산 서열 또는 이것과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0035] 본 개시내용은 또한 표 1에 열거된 임의의 HCDR2 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하고; 소정의 실시형태에서 핵산 분자는 표 2에 열거된 임의의 HCDR2 핵산 서열 또는 이것과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드

서열을 포함한다.

- [0036] 본 개시내용은 또한 표 1에 열거된 임의의 HCDR3 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하고; 소정의 실시형태에서 핵산 분자는 표 2에 열거된 임의의 HCDR3 핵산 서열 또는 이것과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0037] 본 개시내용은 또한 표 1에 열거된 임의의 LCDR1 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하고; 소정의 실시형태에서 핵산 분자는 표 2에 열거된 임의의 LCDR1 핵산 서열 또는 이것과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0038] 본 개시내용은 또한 표 1에 열거된 임의의 LCDR2 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하고; 소정의 실시형태에서 핵산 분자는 표 2에 열거된 임의의 LCDR2 핵산 서열 또는 이것과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0039] 본 개시내용은 또한 표 1에 열거된 임의의 LCDR3 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하고; 소정의 실시형태에서 핵산 분자는 표 2에 열거된 임의의 LCDR3 핵산 서열 또는 이것과 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0040] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 변형된 글리코실화 패턴을 갖는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 일부 실시형태에서, 원치 않는 글리코실화 부위를 제거하기 위한 변형 또는 예를 들면 항체 의존적 세포 독성(ADCC: antibody dependent cellular cytotoxicity) 기능을 증가시키기 위해 올리고사카라이드 사슬에 존재하는 푸코스 모이어티가 결여된 항체가 사용될 수 있다(문헌[Shield, et al., (2002) JBC 277:26733] 참조). 다른 분야에서, 보체 의존적 세포독성(CDC: complement dependent cytotoxicity)을 변형시키기 위해 갈락토실화의 변형이 이루어질 수 있다.
- [0041] 일 양태에서, 본 개시내용은 (i) HCVR 내에 함유된 3개의 중쇄 CDR(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3) 및 LCVR 내에 함유된 3개의 경쇄 CDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하는 하나의 면역글로불린 가변 도메인을 포함하는 면역글로불린 단백질을 제공한다. 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질의 HCVR은 표 1에서의 임의의 HCVR 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질의 LCVR은 표 1에서의 임의의 LCVR 서열로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, HCVR은 서열 번호 2 및 22로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; LCVR은 서열 번호 10 및 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 3개의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR)(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3) 및 3개의 경쇄 CDR(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 포함하고, HCDR1은 서열 번호 4 및 24로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; HCDR2는 서열 번호 6 및 26으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; LCDR1은 서열 번호 12 및 32로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; LCDR2는 서열 번호 14 및 34로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; LCDR3은 서열 번호 16 및 36으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3은 (i) 서열 번호 4, 6, 8, 12, 14 및 16; 또는 (ii) 서열 번호 24, 26, 28, 32, 34 및 36으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 다합체화 성분을 추가로 포함하고, 다합체화 성분은 적어도 하나의 Fc 단편을 포함한다. 일 실시형태에서, Fc 단편은 IgG1 또는 IgG4 아이소타입을 갖는다. 일 실시형태에서, 다합체화 성분은 제1 Fc 단편 및 제2 Fc 단편을 포함하고, 둘 다가 아닌 제1 Fc 단편 또는 제2 Fc 단편은 변형이 결여된 면역글로불린 단백질과 비교하여 면역글로불린 단백질의 단백질 A에 대한 결합을 감소시키는 CH3 도메인의 변형을 포함한다. 일 실시형태에서, 변형은 IgG1 또는 IgG4 아이소타입의 Fc 단편에서의 H315R 치환 및 Y316F 치환(EU 넘버링)을 포함한다. 일 실시형태에서, 다합체화 성분은 서열 번호 46의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 단편 및 서열 번호 58의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 단편을 포함한다.

[0042]

서열 번호 58:

```

ESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS
SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSL

```

[0043]

SPGK

[0044]

일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 2가 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 1가('1아암') 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 HCVR을 포함하는 중쇄 및 LCVR을 포함하는 경쇄를 포함하고, 중쇄는 인간 IgG1 또는 IgG4 아이소타입을 갖는다. 일 실시형태에서, 중쇄는 변형이 결여된 면역글로불린 단백질과 비교하여 면역글로불린 단백질 A에 대한 결합을 감소시키는 CH3 도메인의 변형을 포함한다. 일 실시형태에서, 변형은 IgG1 또는 IgG4 아이소타입의 중쇄에서의 H315R 치환 및 Y316F 치환(EU 넘버링)을 포함한다. 일 실시형태에서, 중쇄는 서열 번호 18 및 38로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖고; 경쇄는 서열 번호 20 및 40으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는다. 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 Fc 단편을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, Fc 단편은 IgG1 또는 IgG4 아이소타입을 갖는다. 일 실시형태에서, Fc 단편은 서열 번호 46을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0045]

일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 항-NPR1 항체에 특이적으로 결합한다. 일 실시형태에서, 항-NPR1 항체는 R5381이다.

[0046]

일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 REGN9035이다. 일 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 REGN9037이다.

[0047]

일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 면역글로불린 단백질의 중쇄 가변 영역(HCVR)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 분자를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 면역글로불린 단백질의 경쇄 가변 영역(LCVR)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오타이드 분자를 제공한다. 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 폴리뉴클레오타이드 분자를 제공한다. 소정의 실시형태에서, 벡터는 면역글로불린 단백질의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 발현 벡터이다. 예를 들면, 본 개시내용은 본원에 개시된 임의의 핵산 분자, 즉 표 2에 제시된 것과 같은 임의의 HCVR, LCVR 및/또는 CDR 서열을 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현 벡터를 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 벡터를 발현하는 숙주 세포를 제공한다. 예를 들면, 본 개시내용은 본원에 개시된 것과 같은 면역글로불린 단백질의 중쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 제1 재조합 발현 벡터; 및 면역글로불린 단백질의 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩타이드를 발현할 수 있는 제2 재조합 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일 실시형태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 면역글로불린 단백질의 중쇄 가변 영역(HCVR)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 단리된 폴리뉴클레오타이드 분자 및 본원에 개시된 면역글로불린 단백질의 경쇄 가변 영역(LCVR)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 단리된 폴리뉴클레오타이드 분자를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 소정의 실시형태에서, 숙주 세포는 포유류 세포 또는 원핵 세포를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 에스체리치아 콜라이(이. 콜라이) 세포이다.

[0048]

일 양태에서, 본 개시내용은 항체 또는 단편의 생성을 허용하는 조건 하에 본원에 개시된 숙주 세포를 성장시키는 단계 및 이렇게 생성된 면역글로불린 단백질 또는 단편을 회수하는 단계를 포함하는 항-NPR1 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 단백질 또는 이의 단편을 제조하는 방법을 제공한다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 본 개시내용의 면역글로불린 단백질 또는 이의 단편의 HCVR 및/또는 LCVR을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 숙주 세포로 도입하는 단계; 핵산 서열의 발현에 유리한 조건 하에 숙주 세포를 배양하는 단계; 및 배양 배지 및/또는 숙주 세포로부터 면역글로불린 단백질 또는 이의 단편을 단리하는 단계를 포함하는 본 개시내용의 면역글로불린 단백질 또는 이의 단편을 제조하는 방법을 제공한다. 단리된 면역글로불린 단백질 또는 이의 단편은 선행 기술에서 알려진 임의의 방법을 사용하여 정제될 수 있다. 일 실시형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 본원에서 어딘 가에 개시된 것과 같이 단백질 A에 대한 차등적 결합을 이용하는 시약 및 방법을 사용하여 정제될 수 있다.

- [0049] 일 실시형태에서, 구제 제제는 혈관수축제이다. 또 다른 실시형태에서, 혈관수축제는 미도드린이다.
- [0050] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 구제 제제 및 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 일 실시형태에서, 상기 조성물은 구제 제제 및 제2 치료제의 조합을 포함한다. 일 실시형태에서, 제2 치료제는 구제 제제와 유리하게 조합되는 임의의 제제이다. 본 개시내용의 구제 제제를 수반하는 추가 병용 치료제 및 공동제형은 본원에서 어딘 가에 개시되어 있다.
- [0051] 일 양태에서, 본 개시내용은 나트륨 배설 촉진 웨타이드 수용체 1(NPR1) 단백질에 특이적으로 결합하는 효능제 항체 또는 항원 결합 단편의 혈류역학적 효과를 역전시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의 본원에 개시된 구제 제제를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0052] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 나트륨 배설 촉진 웨타이드 수용체 1(NPR1) 단백질에 특이적으로 결합하는 효능제 항체 또는 항원 결합 단편의 투여와 연관된 혈압 감소를 역전시키는 방법을 제공하고, 상기 방법은 이를 필요로 하는 대상체에게 치료적 유효량의 본원에 개시된 구제 제제를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0053] 소정의 실시형태에서, 약제학적 조성물은 대상체에게 피하로, 정맥내로, 진피내로, 복강내로, 근육내로 또는 경구로 투여된다.
- [0054] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 이를 필요로 하는 대상체에서 항-NPR1 항체의 투여와 연관된 혈류역학적 효과를 역전시키기 위한 약제의 제조에서의 본원에 개시된 구제 제제의 용도를 제공한다.
- [0055] 일 실시형태에서, 대상체는 NPR1 연관된 질환 또는 장애를 갖는다. 일 실시형태에서, 질환 또는 장애는 고혈압, 심부전 및/또는 만성 신장 질환이다.
- [0056] 일 양태에서, 본 개시내용은 (i) 본원에 개시된 것과 같은 면역글로불린 단백질; 및 (ii) 및 NPR1 효능제를 포함하는 조성물을 제공한다. 일 실시형태에서, NPR1 효능제는 항-NPR1 항체(예를 들면, R5381)이다. 일 실시형태에서, 상기 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에서 효과적인 혈압 조절을 위한 방법에서 사용된다. 일 실시형태에서, 대상체는 NPR1 연관된 질환 또는 장애를 갖는다. 일 실시형태에서, 질환 또는 장애는 고혈압, 심부전 및/또는 만성 신부전이다.
- [0057] 일 양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 면역글로불린 단백질과 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0058] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 면역글로불린 단백질과 동일한 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0059] 다른 실시형태는 계속되는 상세한 설명의 검토로부터 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0060] 도 1은 막대 그래프 형태로 pH 7.4, pH 6.5, pH 6.0 및 pH 5.0 완충액 중의 항-R5381 항체 REGN9035 및 REGN9037의 해리 반감기($t_{1/2}$)의 비교를 제공한다.
- 도 2는 선 그래프 형태로 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스에서 항-R5381 항체 REGN9035, REGN9037, REGN6580 및 REGN6581의 약역학적 프로파일을 제공한다.
- 도 3은 선 그래프 형태로 정상압 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스에서 R5381 유도된 수축기 혈압 저하를 역전시키는 것에 대한 2가 항-R5381 mAb의 효과를 보여준다. 원격측정된 정상압 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스를 수축기 혈압 및 체중에 기초하여 그룹으로 무작위화하였다. 동물에게 표 18에 기재된 것과 같이 R5381 또는 PBS의 단일 5 mg/kg 피하 주사를 주었다. 이후, 동물에게 표 18에 기재된 것과 같이 항-R5381 2가 mAb 또는 PBS의 단일 50 mg/kg 정맥내 주사를 주었다. 모든 값은 제-2일 내지 제20일 동안 24시간에 걸친 평균 압력 ± SEM, 그룹마다 n=4-5이다. 통계학 - 둔넷(Dunnett)에 의한 2방향 ANOVA; 아이소타입 대조군 mAb에 대해 $^* p<0.05$.
- 도 4는 선 그래프 형태로 정상압 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스에서 R5381 유도된 확장기 혈압 저하를 역전시키는 것에 대한 2가 항-R5381 mAb의 효과를 보여준다. 원격측정된 정상압 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스를 수축기 혈압 및 체중에 기초하여 그룹으로 무작위화하였다. 동물에게 표 18에 기재된 것과 같이 R5381 또는 PBS의 단일 5 mg/kg 피하 주사를 주었

다. 이후, 동물에게 표 18에 기재된 것과 같이 항-R5381 2가 mAb 또는 PBS의 단일 50 mg/kg 정맥내 주사를 주었다. 모든 값은 제-2일 내지 제20일 동안 24시간에 걸친 평균 압력 ± SEM, 그룹마다 n=4-5이다. 통계학 - 듀넷에 의한 2방향 ANOVA; 아이소타입 대조군 mAb에 대해 *p<0.05.

도 5는 선 그래프 형태로 정상압 NPR1^{hu/hu} 마우스에서 R5381 mAb 유도된 심박수 효과를 역전시키는 것에 대한 2가 항-R5381 mAb의 효과를 보여준다. 원격측정된 정상압 NPR1^{hu/hu} 마우스를 수축기 혈압 및 체중에 기초하여 그룹으로 무작위화하였다. 동물에게 표 18에 기재된 것과 같이 R5381 또는 PBS의 단일 5 mg/kg 피하 주사를 주었다. 이후, 동물에게 표 18에 기재된 것과 같이 항-R5381 2가 mAb 또는 PBS의 단일 50 mg/kg 정맥내 주사를 주었다. 모든 값은 제-2일 내지 제20일 동안 24시간에 걸친 평균 심박수 ± SEM, 그룹마다 n=4-5이다. 통계학 - 듀넷에 의한 2방향 ANOVA.

도 6은 선 그래프 형태로 정상압 NPR1^{hu/hu} 마우스에서 R5381 mAb 유도된 평균 동맥 혈압 저하를 역전시키는 것에 대한 2가 항-R5381 mAb의 효과를 보여준다. 원격측정된 정상압 NPR1^{hu/hu} 마우스를 수축기 혈압 및 체중에 기초하여 그룹으로 무작위화하였다. 동물에게 표 18에 기재된 것과 같이 R5381 또는 PBS의 단일 5 mg/kg 피하 주사를 주었다. 이후, 동물에게 표 18에 기재된 것과 같이 항-R5381 2가 mAb 또는 PBS의 단일 50 mg/kg 정맥내 주사를 주었다. 모든 값은 제-2일 내지 제20일 동안 24시간에 걸친 평균 압력 ± SEM, 그룹마다 n=4-5이다. 통계학 - 듀넷에 의한 2방향 ANOVA; 아이소타입 대조군 mAb에 대해 *p<0.05.

도 7은 선 그래프 형태로 정상압 NPR1^{hu/hu} 마우스에서 R5381 유도된 수축기 혈압 저하를 역전시키는 것에 대한 2가 항-R5381 mAb의 효과를 보여준다. 원격측정된 정상압 NPR1^{hu/hu} 마우스를 수축기 혈압 및 체중에 기초하여 그룹으로 무작위화하였다. 동물에게 표 23에 기재된 것과 같이 R5381 또는 PBS의 단일 5 mg/kg 피하 주사를 주었다. 이후, 동물에게 표 23에 기재된 것과 같이 항-R5381 2가 mAb 또는 아이소타입 대조군 mAb의 단일 50 mg/kg 피하 주사를 주었다. 모든 값은 제-3일 내지 제21일 동안 24시간에 걸친 평균 압력 ± SEM, 그룹마다 n=4-5이다. 통계학 - 듀넷에 의한 2방향 ANOVA; 아이소타입 대조군 mAb에 대해 *p<0.05 PBS; 아이소타입 대조군 mAb에 대해 **p<0.01 PBS; 아이소타입 대조군 mAb에 대해 !p<.05 REGN6580; 아이소타입 대조군에 대해 #p<0.05 REGN6581.

도 8은 선 그래프 형태로 정상압 NPR1^{hu/hu} 마우스에서 R5381 유도된 수축기 혈압 저하를 역전시키는 것에 대한 1가 항-R5381 mAb의 효과를 보여준다. 원격측정된 정상압 NPR1^{hu/hu} 마우스를 체중에 기초하여 그룹으로 무작위화하였다. 동물에게 표 28에 기재된 것과 같이 NPR1 효능제 mAb 또는 아이소타입 대조군 mAb의 단일 5 mg/kg 피하 주사를 주었다. 이후, 동물에게 표 28에 기재된 것과 같이 항-R5381 2가(REGN6580) 또는 1가(REGN9035 또는 REGN9037) mAb 또는 PBS의 단일 50 mg/kg 정맥내 주사를 주었다. 모든 값은 평균 ± SEM, 그룹마다 n=4-5이다. 통계학 - 듀넷에 의한 2방향 ANOVA; 아이소타입 대조군 mAb에 대해 *p<0.05 REGN6580 s.c.; 아이소타입 대조군 mAb에 대해 #p<0.05 REGN9035 s.c.; 아이소타입 대조군 mAb에 대해 !p<0.05 REGN9037 s.c.; 아이소타입 대조군 mAb에 대해 ^p<0.05 REGN6580 i.v.; 아이소타입 대조군 mAb에 대해 &p<0.05 REGN9035 i.v.; 아이소타입 대조군 mAb에 대해 >p<0.05 REGN9037 i.v..

도 9는 선 그래프 형태로 정상압 NPR1^{hu/hu} 마우스에서 R5381 유도된 혈압 저하를 역전시키는 것에 대한 1가 및 2가 항-R5381 mAb의 급성 효과를 보여준다. 원격측정된 정상압 NPR1^{hu/hu} 마우스를 체중에 기초하여 그룹으로 무작위화하였다. 동물에게 표 28에 기재된 것과 같이 R5381 또는 PBS 대조군의 단일 5 mg/kg 피하 주사를 주었다. 이후, 동물에게 표 28에 기재된 것과 같이 항-R5381 2가(REGN6580) 또는 1가(REGN9035 또는 REGN9037) mAb 또는 아이소타입 대조군 mAb의 단일 50 mg/kg 정맥내 주사를 주었다. 모든 값은 평균 ± SEM, 그룹마다 n=4-5이다.

도 10은 선 그래프 형태로 정상압 NPR1^{hu/hu} 마우스에서 R5381 유도된 cGMP 생성을 역전시키는 것에 대한 1가 항-R5381 mAb의 효과를 보여준다. 원격측정된 정상압 NPR1^{hu/hu} 마우스를 체중에 기초하여 그룹으로 무작위화하였다. 동물에게 표 28에 기재된 것과 같이 NPR1 효능제 mAb 또는 아이소타입 대조군 mAb의 단일 5 mg/kg 피하 주사를

주었다. 이후, 동물에게 표 28에 기재된 것과 같이 항-R5381 2가(REGN6580) 또는 1가(REGN9035 또는 REGN9037) mAb 또는 PBS의 단일 50 mg/kg 정맥내 주사를 주었다. 뇨를 연구 제21일 내지 제22일에 밤새 수집하였다. 모든 값은 평균 ± SEM, 그룹마다 n=5-6이다. 통계학 - 듀넷에 의한 ANOVA; PBS + PBS에 대해 *** p<0.0001; R5381 + 아이소타입 대조군 mAb에 대해 ##### p<0.0001.

도 11은 25 mg/kg의 R5381의 단일 용량 후 3일에 투여된 2.5 mg/kg의 미도드린의 3개의 용량이 R5381의 혈압 저하 효과를 역전시킨다는 것을 보여준다. 체중이 3 내지 5 kg인 수컷 시아노몰거스 원숭이를 전파 원격측정 송신기로 수술로 이식하였다. 제0일에, 동물은 각각 식염수(PBS; n=10) 또는 25 mg/kg의 R5381(n=13)의 단일 IV 볼루스를 받았다. 제3일에, 동물은 x축에 점선으로 표시된 것처럼 각각 경구 위관영양에 의해 투여되는 2.5 mg/kg/용량의 미도드린(식염수 그룹에 대해 n=6; R5381 그룹에 대해 n=7) 또는 물/비히클(식염수 그룹에 대해 n=4; R5381 그룹에 대해 n=6)의 3개의 용량을 받았고, 각각의 용량은 3시간 내지 4시간 떨어졌다. 혈압 측정을 (기준선 측정을 위해) 투약 전 및 투약 후 4일 아침 기간 동안 각각의 동물에 대해 수집하였다. R5381 투약 후 35시간과 72시간 사이에 각각의 치료 그룹에 대한 기준선 수축기 혈압으로부터의 평균 변경이 도시되어 있다. 데이터는 그룹 평균 ± 평균의 표준 오차로서 표현된다.

도 12는 25 mg/kg의 단일 용량 후 3일에 투여된 2.5 mg/kg의 미도드린의 3개의 용량이 R5381 유도된 심박수 효과를 역전시킨다는 것을 보여준다. 체중이 3 내지 5 kg 연령인 수컷 시아노몰거스 원숭이를 전파 원격측정 송신기로 수술로 이식하였다. 제0일에, 동물은 각각 식염수(PBS; n=10) 또는 25 mg/kg의 R5381(n=13)의 단일 IV 볼루스를 받았다. 제3일에, 동물은 x축에 점선으로 표시된 것처럼 각각 경구 위관영양에 의해 투여되는 2.5 mg/kg/용량의 미도드린(식염수 그룹에 대해 n=6; R5381 그룹에 대해 n=7) 또는 물/비히클(식염수 그룹에 대해 n=4; R5381 그룹에 대해 n=6)의 3개의 용량을 받았고, 각각의 투여는 3시간 내지 4시간 간격이다. 심박수 측정을 (기준선 측정을 위해) 투약 전 및 투약 후 4일 아침 기간 동안 각각의 동물에 대해 수집하였다. R5381 투약 후 35시간과 72시간 사이에 각각의 치료 그룹에 대한 기준선 심박수로부터의 평균 변경이 도시되어 있다. 데이터는 그룹 평균 ± 평균의 표준 오차로서 표현된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061]

본 방법을 기재하기 전에, 본 개시내용이 특정한 방법 및 기재된 실험 조건이 변할 수 있으면서 이러한 방법 및 조건으로 제한되지는 않는 것으로 이해되어야 한다. 본원에 사용된 전문용어가 오직 특정한 실시형태를 기재할 목적을 위한 것이고, 본 개시내용의 범위가 오직 첨부된 청구항에 의해 제한되므로 제한하는 것으로 의도되지 않는다고 또한 이해되어야 한다.

[0062]

달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 분야의 당업자가 흔히 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 개시내용의 실행 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 재료가 이제 기재된다. 본원에 언급된 모든 공보는 본원에 그 전문이 참고로 포함된다.

[0063]

정의

[0064]

"NPRA"로도 칭하는 용어 "NPR1"은 나트륨 배설 촉진 펩타이드 수용체 1(나트륨 배설 촉진 펩타이드 수용체 A로도 알려짐)을 지칭한다. NPR1은 cGMP 합성을 촉매화하는 효소인 동종이합체성 막관통 구아닐레이트 시클라제이다. 단백질은 세포외 리간드 결합 도메인, 단일 막관통 스패닝 영역, 세포내 단백질 키나제 유사 상동성 도메인 및 구아닐릴 시클라제 촉매 도메인을 포함하는 4개의 구별되는 영역을 갖는다. 전장 NPR1 단백질의 아미노산 서열은 수탁 번호 P16066.1(서열 번호 59)로서 UniProtKB/Swiss-Prot에서 제공된 아미노산 서열에 의해 예시된다:

1 mpgrrpags rirlllllll pplllllrgs hagnltvavv lplantsypw
 swarvgpave
 61 lalaqvkarl dlpgwtvrt vlgssenalg vcsdtaapla avdlkwehnp
 avflgpgcwy
 121 aaapvgrfta hwrvppltag apalgfgykd eyalttrags syaklgdfva
 alhrrlgwer
 181 qalmiyayrp gdeehciflv eglfmrvrdr initvdhlef aeddishytr
 lirtmpkgr
 241 viyicsspda frtlmlale aglcgedyvf fhldifgqsl qggqgpaprr
 pwergdgqdv
 301 sarqafqaak iitykdpdn np eyleflkqlk hlayersnft medglvntip
 asfhdgllly
 361 iqavtetlah ggtvtdgeni tqrwmwnrsfq gvtgylkids sgdrtdfs
 wdmdpengaf
 421 rvvlnyngts qelvavsgrk lnwplgyppp dipkgfdne dpacnqdhls
 tlevlalvgs
 481 lsilgiliws ffiyrmqle kelaselwrv rwedvepssl erhirsagsr
 ltlsgrgsny
 541 gsllttagqf qvfaktayyk gnlvavkrvn rkrieltkv lfelkhmrdr
 qnehltrfvvg
 601 actdppnici lteycprgsl qdilenesit ldwmfrysly ndivkgmlf
 hngaicshgn
 661 lkssncvvdg rfvikitdyg lesfrldlp qghtvyakk1 wtapellrma
 sppvrgsqag
 721 dvysfgiilq eialrsgvfh vegldlspke iiervtrgeq ppfrpslalq
 shleelgilm
 781 qrcwaedpqe rppfqqirlt lrkfnnrenss nildnilsrm eqyannleel
 veertqayle
 841 ekraeaally qilphsvaeq lkrgetvqae afdsutyiys divgitalsa
 estpmqvvtl
 901 lndlytcfd da vidnfdvykv etigdaymvv sglpvrngrl hacevarmal
 alldavrsfr
 961 irhrpqeqlr lrighgtgv cagvvglkmp ryclfgdtvn tasrmesnge
 alkihlsset
 1021 kavleefggf elelrgdvem kgkgkvrtiyw llgergsstr g

[0065]

[0066]

용어 "NPR1"은 재조합 NPR1 단백질 또는 이의 단편을 포함한다. 상기 용어는 또한 예를 들면 히스티딘 태그, 마우스 또는 인간 Fc, 또는 신호 서열에 커플링된 NPR1 단백질 또는 이의 단편을 포함한다.

[0067]

용어 "NPR1 효능제"는, 본원에 사용된 것과 같이, NPR1 활성을 활성화하거나 증가시키거나 강화시키거나, NPR1의 활성화된 형태를 안정화시키는 분자를 지칭한다. 바람직한 실시형태에서, 용어 "NPR1 효능제"는 NPR1에 특이적으로 결합하고, NPR1의 적어도 하나의 생물학적 활성을 활성화하거나 증가시키는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 지칭한다. 이러한 효능제 항-NPR1 항체는 리간드(예를 들면, ANP 또는 BNP)의 존재 또는 부재 하에 NPR1에 결합할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 생물학적 활성을 효능제 항-NPR1 항체의 투여 시 대상체에서의 혈압의 저하 또는 감소를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 소정의 실시형태에서, 생물학적 활성을 질환 또는 장애, 예컨대 고혈압, 심부전 또는 만성 신장 질환을 갖는 대상체에서의 혈류역학적 변경(예를 들면, 혈압의 감소)을 포함한다. 상기 용어는 예를 들면 미국 공보 제20200123263호에 개시된 효능제 항-NPR1 항체를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 용어는 서열 번호 48의 HCVR 및 서열 번호 52의 LCVR을 포함하는 항-NPR1 항체를 지칭한다. 또 다른 특정 실시형태에서, 상기 용어는 R5381(REGN5381로도 알려짐)을 지칭한다. R5381은 서열 번호 56의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 57의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하는 완전 인간 항-NPR1 단일클론 항체이다.

[0068]

본원에 사용된 것과 같이, "역전 제제" 또는 "구제 제제"는 NPR1 효능제의 혈류역학적 효과를 역전시키는 제제이다. 용어 "역전 제제" 및 "구제 제제"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용된다. 소정의 실시형태에서, 역전 제제는 본원에서 지칭되면서 NPR1에 특이적으로 결합하는 효능제 항체 또는 항원 결합 단편의 (대상체에 대한)

투여와 연관된 혈류역학적 변경을 역전시킨다. 용어 "역전시킨다"는 NPR1 효능제의 투여의 결과로서 혈압이 감소된 대상체의 혈압을 증가시키는 것을 포함한다. 혈압의 증가는 당해 분야에 알려진 임의의 표준 혈압 평가 수단(예를 들면, 혈압계)을 사용하여 측정될 수 있다. 그 증가는 이의 효능제 항체 치료 전 수준으로의 증가 또는 적절한 혈류역학적 안정성을 생성시키는 수준으로의 증가일 수 있다. 혈류역학적 효과는 혈압 강하와 연관된 효과인 간접적인 효과를 포함할 수 있다. 이 효과는 본원에 개시된 제제를 사용하여 마찬가지로 역전될 수 있다. 혈류역학적 효과는, 본원에서 지칭되면서, 생리학적 매개변수, 예컨대 혈압 및 심박수 또는 임상 징후, 예컨대 현기증, 가벼운 현기증, 흐린 시력, 구역, 피로를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 역전 제제는 NPR1 효능제에 특이적으로 결합하고, NPR1 효능제에 의해 야기된 혈류역학적 효과를 역전시킨다. 특정 실시형태에서, 역전 제제는 본원에 개시된 것과 같은 면역글로불린 단백질을 포함한다.

[0069] 용어 "면역글로불린 단백질"은, 본원에 사용된 것과 같이, 적어도 하나의 면역글로불린 가변 도메인을 포함하는 항원 결합 분자를 지칭한다. 적어도 하나의 가변 도메인은 항원 결합 도메인이고, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 가변 도메인은 본원에서 어딘 가에 개시된 것과 같이 항체의 Fab, Fv, 단일 사슬 Fv 또는 임의의 다른 항원 결합 단편에 포함된다. 일부 실시형태에서, 가변 도메인은 1가 항체 또는 2가 항체에 포함된다. 상기 용어는 항체 및 이의 항원 결합 단편, 1가 항체, 2가 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 면역글로불린 단백질은 또한 가변 도메인에 연결된 다합체화 성분을 포함할 수 있다. 본원에서 어딘 가에 개시된 것과 같이, 다합체화 성분은 항체의 Fc 단편 또는 항체의 절두된 중쇄를 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 Fab 내에 단일 가변 도메인을 포함할 수 있고, Fab는 적어도 하나의 Fc 단편에 연결된다. 소정의 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 (i) 중쇄 불변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄, (ii) 경쇄 불변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄 및 (iii) Fc 단편 또는 절두된 중쇄를 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다. 소정의 실시형태에서, Fc 도메인 폴리펩타이드는 항원 결합 도메인에 연결되지 않은 Fc 도메인 폴리펩타이드를 지칭하는 "더미 Fc"이다. 단일 가변 도메인을 포함하는 면역글로불린 단백질은 "1아암" 또는 "단일 아암" 또는 "1가" 항체로 지칭될 수 있다. 본 개시 내용의 맥락에서, 상기 용어는 또 다른 항체("항-이디오타입 항체")의 가변 영역에 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 상기 용어는 항-NPR1 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 특이적으로 결합하는 단일 가변 도메인을 포함하는 항체(또는 이의 항원 결합 단편)를 지칭한다. 일 실시형태에서, 항-NPR1 항체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 경쟁적 결합체이다. 본 개시내용의 1아암 항체는 본원에서 표 1에 제시된 것과 같은 임의의 HCVR/LCVR 또는 CDR 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 예시적인 1아암 항-R5381 항체는 REGN9035 및 REGN9037을 포함한다.

[0070] 용어 "항체"는, 본원에 사용된 것과 같이, 달리 규정되지 않는 한, 디설파이드 결합에 의해 상호연결된 2개의 중(H)쇄 및 2개의 경(L)쇄인 4개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 면역글로불린 분자(즉, "완전 항체 분자")뿐만 아니라 이의 다합체(예를 들면, IgM) 또는 이의 항원 결합 단편을 지칭하도록 의도된다. 본 개시내용의 맥락에서, 용어 "2가 항체"는 "완전 항체 분자", 즉, 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄를 포함하는 것을 지칭한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역("HCVR" 또는 "V_H") 및 중쇄 불변 영역(도메인 C_H1, C_H2 및 C_H3으로 이루어짐)으로 이루어진다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역("LCVR" 또는 "V_L") 및 경쇄 불변 영역(C_L)으로 이루어진다. V_H 영역 및 V_L 영역은 프레임워크 영역(FR: framework region)이라 칭하는 더 보존된 영역이 개재된 상보성 결정 영역(CDR)이라 칭하는 초가변성의 영역으로 추가로 하위분할될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L은 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 아미노 말단에서 카복시 말단으로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 이루어진다. 본 개시내용의 소정의 실시형태에서, 항체(또는 이의 항원 결합 단편)의 FR은 인간 생식선 서열과 동일할 수 있거나, 자연적으로 또는 인공적으로 변형될 수 있다. 아미노산 공통 서열은 2개 이상의 CDR의 사이드-바이-사이드 분석에 기초하여 정의될 수 있다.

[0071] 소정의 실시형태에서, 용어 "항체" 또는 "항원 결합 분자"는 1가 항원 결합 분자를 포함한다. 1가 항원 결합 분자는 단일 중쇄 및 단일 경쇄에 의해 형성된 단일 항원 결합 도메인을 포함한다. 1가 항원 결합 분자는 적어도 중쇄의 Fc 도메인을 포함하는 폴리펩타이드를 추가로 포함한다. 소정의 실시형태에서, Fc 도메인 폴리펩타이드는 항원 결합 도메인에 연결되지 않은 Fc 도메인 폴리펩타이드를 지칭하는 "더미(dummy) Fc"이다. 소정의 실시 형태에서, 1가 항체는 완전한 중쇄, 완전한 경쇄 및 절두된 중쇄를 갖는다.

[0072] "Fc 단편" 또는 "Fc 영역"은, 본원에 사용된 것과 같이, Fc 수용체라 칭하는 세포 표면 수용체 및 보체 시스템의 일부 단백질과 상호작용하는 항체의 꼬리 영역인 면역글로불린의 단편 결정화 가능한 영역을 지칭한다. 이 특성은 항체가 면역계를 활성화하게 한다. IgG, IgA 및 IgD 항체 아이索타입에서, Fc 영역 또는 Fc 도메인은 항

체의 중쇄의 제2 불변 도메인 및 제3 불변 도메인(CH₂ 및 CH₃)으로부터 유래되고; IgM 및 IgE Fc 영역은 폴리펩타이드 사슬에서 3개의 중쇄 불변 도메인(C_H 도메인 2-4)을 함유한다. 본 개시내용의 맥락에서, 상기 용어는 달리 규정되지 않는 한 인간 Fc 도메인으로부터 유래된 Fc 영역을 지칭한다. 소정의 실시형태에서, Fc 단편은 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 아이소타입으로부터 유래된다.

[0073] 본원에 사용된 것과 같이, "다합체화 성분"은 동일한 또는 유사한 구조 또는 구성의 제2 거대분자와 회합하는 능력을 갖는 임의의 거대분자를 지칭한다. 예를 들면, 다합체화 성분은 면역글로불린 C_H3 도메인을 포함하는 폴리펩타이드일 수 있다. 다합체화 성분의 비제한적인 예는 항체의 Fc 부분(C_H2-C_H3 도메인을 포함), 예를 들면 아이소타입 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로부터 선택되는 IgG의 Fc 도메인뿐만 아니라 각각의 아이소타입 그룹 내의 임의의 알로타입이다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 적어도 하나의 Fc 단편을 포함하는 다합체화 성분을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 2개의 Fc 단편을 포함한다. 제1 Fc 단편 및 제2 Fc 단편은 예를 들면 IgG1/IgG1, IgG2/IgG2, IgG4/IgG4와 같은 동일한 IgG 아이소타입을 가질 수 있다. 대안적으로, 제1 Fc 단편 및 제2 Fc 단편은 예를 들면 IgG1/IgG2, IgG1/IgG4, IgG2/IgG4 등과 같은 상이한 IgG 아이소타입을 가질 수 있다. 소정의 실시형태에서, 2개의 Fc 단편은 동일한 서열을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 2개의 Fc 단편은 하나 이상의 아미노산에 의해 서로 상이하다. 소정의 실시형태에서, Fc 단편들 다가 아니라 제1 Fc 단편 또는 제2 Fc 단편은 변형이 결여된 면역글로불린 단백질과 비교하여 면역글로불린 단백질의 단백질 A에 대한 결합을 감소시키는 CH₃ 도메인의 변형을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 다합체화 성분은 적어도 하나의 시스테인 잔기를 함유하는 1개 내지 약 200개의 아미노산 길이의 Fc 단편 또는 아미노산 서열이다. 다른 실시형태에서, 다합체화 성분은 시스테인 잔기 또는 짧은 시스테인 함유 웨타이드 또는 폴리펩타이드를 포함한다. 예를 들면, Fc 도메인을 포함하는 다합체화 성분은 본원에서 어딘 가에 개시된 것과 같이 Fc 도메인의 야생형, 자연 발생 버전과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변경(예를 들면, 삽입, 결실 또는 치환)을 포함할 수 있다.

[0074] 하나 이상의 CDR 잔기의 치환 또는 하나 이상의 CDR의 생략이 또한 가능하다. 결합에 대해 1개 또는 2개의 CDR이 필요 없을 수 있는 항체가 과학 문헌에 기재되어 있다. Padlan 외(1995 FASEB J. 9:133-139)는 공개된 결정 구조에 기초하여 항체와 이의 항원 사이의 접촉 영역을 분석하였고, CDR 잔기의 오직 약 1/5 내지 1/3이 실제로 항원과 접촉한다고 결론지었다. Padlan은 또한 1개 또는 2개의 CDR이 항원과의 접촉에서 아미노산을 갖지 않는 많은 항체를 발견하였다(또한, 문헌[Vajdos, et al., 2002 J Mol Biol 320:415-428] 참조).

[0075] 항원과 접촉하지 않은 CDR 잔기는 문자 모델링에 의해 및/또는 경험적으로 Chothia CDR 밖에 있는 Kabat CDR의 영역으로부터 이전의 연구에 기초하여 확인될 수 있다(예를 들면, CDRH2에서의 잔기 H60-H65가 대개 필요하지 않음). CDR 또는 이의 잔기(들)가 생략되면, 이것은 보통 또 다른 인간 항체 서열에서의 상응하는 위치를 점유하는 아미노산 또는 이러한 서열의 컨센서스로 치환된다. 치환하기 위한 CDR 및 아미노산 내의 치환을 위한 위치는 또한 경험적으로 선택될 수 있다. 경험적 치환은 보존적 치환 또는 비보존적 치환일 수 있다.

[0076] 본원에 개시된 (항-NPR1 항체에 특이적으로 결합하는) 완전 인간 면역글로불린 단백질은 상응하는 생식선 서열과 비교하여 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인의 프레임워크 및/또는 CDR 영역에서의 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 아미노산 서열을 예를 들면 공공 항체 서열 데이터베이스로부터 이용 가능한 생식선 서열과 비교하여 이러한 돌연변이가 용이하게 확인될 수 있다. 본 개시내용은 본원에 개시된 임의의 아미노산 서열로부터 유래된 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 하나 이상의 프레임워크 및/또는 CDR 영역 내의 하나 이상의 아미노산은 항체가 유래된 생식선 서열의 상응하는 잔기(들), 또는 또 다른 인간 생식선 서열의 상응하는 잔기(들), 또는 상응하는 생식선 잔기(들)의 보존적 아미노산 치환으로 돌연변이된다(이러한 서열 변경은 본원에서 총체적으로 "생식선 돌연변이"라 지칭됨).

[0077] 당업자는 본원에 개시된 중쇄 가변 영역 서열 및 경쇄 가변 영역 서열에 의해 시작하여 하나 이상의 개별 생식선 돌연변이 또는 이의 조합을 포함하는 많은 항체 및 항원 결합 단편을 용이하게 제조할 수 있다. 소정의 실시 형태에서, V_H 도메인 및/또는 V_L 도메인 내의 모든 프레임워크 및/또는 CDR 잔기는 항체가 유래된 원래의 생식선 서열에서 발견된 잔기로 다시 돌연변이된다. 다른 실시형태에서, 오직 소정의 잔기는 원래의 생식선 서열, 예를 들면 오직 FR1의 처음의 8개의 아미노산 내에 또는 FR4의 마지막 8개의 아미노산 내에 발견된 돌연변이된 잔기, 또는 오직 CDR1, CDR2 또는 CDR3 내에 발견된 돌연변이된 잔기로 다시 돌연변이된다. 다른 실시형태에서, 프레임워크 및/또는 CDR 잔기(들) 중 하나 이상은 상이한 생식선 서열(들)(즉, 항체가 원래 유래된 생식선 서열과 상이한 생식선 서열)의 상응하는 잔기로 돌연변이된다. 더욱이, 본 개시내용의 항체는 프레임워크 및/또는 CDR

영역 내에 2개 이상의 생식선 돌연변이의 임의의 조합을 함유할 수 있고, 예를 들면 소정의 개별 잔기는 특정한 생식선 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이되는 한편, 원래의 생식선 서열과 상이한 소정의 다른 잔기는 유지되거나 상이한 생식선 서열의 상응하는 잔기로 돌연변이된다. 하나 이상의 생식선 돌연변이를 함유하는 항체 및 항원 결합 단편은 얻어지면 하나 이상의 원하는 특성, 예컨대 개선된 결합 특이성, 증가된 결합 친화도, 개선된 또는 향상된 길항제성 생물학적 특성, 감소된 면역원성 등에 대해 용이하게 시험될 수 있다. 이 일반 방식으로 얻어진 항체 및 항원 결합 단편은 본 개시내용 내에 포함된다.

[0078] 본 개시내용은 또한 하나 이상의 보존적 치환을 갖는 본원에 개시된 임의의 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 (항-NPR1 항체에 특이적으로 결합하는) 완전 인간 면역글로불린 단백질을 포함한다. 예를 들면, 본 개시내용은 본원에 개시된 임의의 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열에 대해, 예를 들면 10개 이하, 8개 이하, 6개 이하, 4개 이하 등의 보존적 아미노산 치환을 갖는 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열을 갖는 (항-NPR1 항체에 특이적으로 결합하는) 완전 인간 면역글로불린 단백질을 포함한다.

[0079] 용어 항체의 "항원 결합 부분", 항체의 "항원 결합 단편" 및 기타는, 본원에 사용된 것과 같이, 복합체를 형성하도록 항원에 특이적으로 결합하는 임의의 자연 발생, 효소로 수득 가능한, 합성 또는 유전 조작된 폴리펩타이드 또는 당단백질을 포함한다. 용어 항체의 "항원 결합 단편" 또는 "항체 단편"은, 본원에 사용된 것과 같이, 항-NPR1 항체에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체 단편은 Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편, dAb 단편, CDR을 함유하는 단편 또는 단리된 CDR을 포함할 수 있다. 소정의 실시 형태에서, 용어 "항원 결합 단편"은 다중특이적 항원 결합 분자의 폴리펩타이드 단편을 지칭한다. 항체의 항원 결합 단편은 항체 가변 도메인 및 (선택적으로) 불변 도메인을 암호화하는 DNA의 조작 및 발현을 수반하는 단백 분해 분해 또는 재조합 유전 조작 기법과 같은 임의의 적합한 표준 기법을 사용하여 예를 들면 전체 항체 분자로부터 유래될 수 있다. 이러한 DNA는 공지되고/되거나, 예를 들면 상업적 원천, DNA 라이브러리(예를 들면, 패지-항체 라이브러리 포함)로부터 용이하게 구입 가능하거나, 합성될 수 있다. DNA는 서열분석되고, 예를 들면 하나 이상의 가변 도메인 및/또는 불변 도메인을 적합한 구성으로 배열하도록 또는 코돈을 도입하고, 시스테인 잔기를 생성하고, 아미노산을 변형, 부가 또는 결실 등을 하도록 화학적으로 또는 분자 생물학 기법을 사용하여 조작될 수 있다.

[0080] 항원 결합 단편의 비제한적인 예는 (i) Fab 단편; (ii) F(ab')₂ 단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단일-사슬 Fv(scFv) 분자; (vi) dAb 단편; 및 (vii) 항체의 초가변 영역을 모방하는 아미노산 잔기로 이루어진 최소 인식 단위(예를 들면, 단리된 상보성 결정 영역(CDR), 예컨대 CDR3 웨პ타이드), 또는 구속된 FR3-CDR3-FR4 웨პ타이드를 포함한다. 다른 조작된 분자, 예컨대 도메인 특이적 항체, 단일 도메인 항체, 도메인-결실된 항체, 키메라 항체, CDR-그래프팅된 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 나노바디(예를 들면, 1가 나노바디, 2가 나노바디 등), 소형 모듈식 면역의약품(SMIP: small modular immunopharmaceutical) 및 상어 가변 IgNAR 도메인은 또한 본원에 사용된 것과 같이 "항원 결합 단편"과 같은 표현 내에 포함된다.

[0081] 항체의 항원 결합 단편은 통상적으로 적어도 하나의 가변 도메인을 포함할 것이다. 가변 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성을 가질 수 있고, 일반적으로 하나 이상의 프레임워크 서열에 인접하거나 이것과 프레임 상에 있는 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이다. V_L 도메인과 회합된 V_H 도메인을 갖는 항원 결합 단편에서, V_H 도메인 및 V_L 도메인은 임의의 적합한 배열로 서로에 대해 위치할 수 있다. 예를 들면, 가변 영역은 이합체성일 수 있고, V_H - V_H, V_H - V_L 또는 V_L - V_L 이합체를 함유한다. 대안적으로, 항체의 항원 결합 단편은 단량체성 V_H 도메인 또는 V_L 도메인을 함유할 수 있다.

[0082] 소정의 실시형태에서, 항체의 항원 결합 단편은 적어도 하나의 불변 도메인에 공유 연결된 적어도 하나의 가변 도메인을 함유할 수 있다. 본 개시내용의 항체의 항원 결합 단편 내에 발견될 수 있는 가변 도메인 및 불변 도메인의 비제한적인 예시적인 구성은 (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-C_H2; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-C_H2; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; 및 (xiv) V_L-C_L을 포함한다. 상기 열거된 임의의 예시적인 구성을 포함하는 가변 도메인 및 불변 도메인의 구성에서, 가변 도메인 및 불변 도메인은 서로에 직접 연결될 수 있거나, 완전 또는 부분 힌지 또는 링커 영역에 의해 연결될 수 있다. 힌지 영역은 단일 폴리펩타이드 분자에서 인접한 가변 도메인 및/또는 불변 도메인 사이에 가요성 연결 또는 반가요성 연결을 생성시키는 적어도 2개(예를 들면, 5개, 10개, 15개, 20개, 40개, 60개 또는 그 이상)의 아미노산으로 이루어질 수 있다. 더욱이, 본 개시내용의 항체의

항원 결합 단편은 (예를 들면, 디설파이드 결합(들)에 의한) 서로와 및/또는 하나 이상의 단량체성 V_H 도메인 또는 V_L 도메인과 비공유 회합으로 상기 열거된 임의의 가변 도메인 및 불변 도메인 구성의 동종이합체 또는 이종이합체(또는 다른 다합체)를 포함할 수 있다.

[0083] 용어 "인간 항체" 또는 "완전 인간 항체" 또는 "완전 인간 면역글로불린 단백질"은, 본원에 사용된 것과 같이, 인간 생식선 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하도록 의도된다. 본 개시내용의 인간 mAb는 예를 들면 CDR 및 특정 CDR3에서 인간 생식선 면역글로불린 서열(예를 들면, 시험관내 랜덤 또는 부위 특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 유도된 돌연변이)에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 그러나, 용어 "인간 항체" 또는 "완전 인간 항체"는, 본원에 사용된 것과 같이, 또 다른 포유류 종(예를 들면, 마우스)의 생식선으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 FR 서열로 그래프팅된 mAb를 포함하도록 의도되지는 않는다. 상기 용어는 비인간 포유류 또는 비인간 포유류의 세포에서 재조합으로 생성된 항체를 포함한다. 상기 용어는 인간 대상체로부터 단리되거나 인간 대상체에서 생성된 항체를 포함하도록 의도되지는 않는다.

[0084] 용어 "재조합"은, 본원에 사용된 것과 같이, 예를 들면 DNA 스플라이싱 및 형질전환 발현을 포함하는 재조합 DNA 기술로서 당해 분야에 알려진 기술 또는 방법에 의해 생성되거나 발현되거나 단리되거나 얻어진 본 개시내용의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 지칭한다. 상기 용어는 비인간 포유류(형질전환 비인간 포유류, 예를 들면 형질전환 마우스를 포함) 또는 세포(예를 들면, CHO 세포) 발현 시스템에서 발현되거나 재조합 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체를 지칭한다.

[0085] 용어 "특이적으로 결합한다" 또는 "에 특이적으로 결합한다" 또는 기타는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 예를 들면 생리학적 조건 하에 비교적 안정한 항-NPR1 항체와 복합체를 형성한다는 것을 의미한다. 특이적 결합은 적어도 약 1×10^{-8} M 또는 미만의 평형 해리 상수(예를 들면, 더 작은 K_D는 더 단단한 결합을 나타냄)를 특징으로 할 수 있다. 2개의 분자가 특이적으로 결합하는지를 결정하는 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있고, 예를 들면 평형 투석, 표면 플라즈몬 공명 및 기타를 포함한다. 본원에 기재된 것과 같이, 항체는 표면 플라즈몬 공명, 예를 들면 항-NPR1 항체(예를 들면, R5381)에 특이적으로 결합하는 BIACORE™에 의해 확인되었다. 더욱이, 항-NPR1 항체에서의 하나의 영역 및 하나 이상의 추가 항원에 결합하는 다중특이적 항체 또는 항-NPR1 항체의 2개의 상이한 영역에 결합하는 이중특이적 항체는 그럼에도 불구하고 본원에 사용된 것과 같이 "특이적으로 결합하는" 항체로 여겨진다.

[0086] 용어 "고친화도" 항체는 표면 플라즈몬 공명, 예를 들면 BIACORE™ 또는 용액-친화도 ELISA에 의해 측정된 것과 같이 적어도 10^{-8} M; 바람직하게는 10^{-9} M; 더 바람직하게는 10^{-10} M, 훨씬 더 바람직하게는 10^{-11} M의 K_D로서 표현된 항-NPR1 항체에 대한 결합 친화도를 갖는 mAb를 지칭한다.

[0087] 용어 "느린 분해 속도", "Koff" 또는 "kd"는 표면 플라즈몬 공명, 예를 들면 BIACORE™에 의해 결정된 것과 같이 $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 또는 미만, 바람직하게는 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 또는 미만의 속도 상수로 항-NPR1 항체로부터 해리되는 항체를 의미한다.

[0088] 용어 항체의 "항원 결합 부분", 항체의 "항원 결합 단편" 및 기타는, 본원에 사용된 것과 같이, 복합체를 형성하도록 항원에 특이적으로 결합하는 임의의 자연 발생, 효소로 수득 가능한, 합성 또는 유전 조작된 폴리펩타이드 또는 당단백질을 포함한다. 본원에 기재된 면역글로불린 단백질의 "항원"은 항-NPR1 항체(예를 들면, R5381) 또는 이의 항원 결합 단편(즉, NPR1에 결합하는 항체의 단편)이다. 용어 항체의 "항원 결합 단편" 또는 "항체 단편"은, 본원에 사용된 것과 같이, 항-NPR1 항체에 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다.

[0089] 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 항체 또는 항체 단편은 리간드 또는 치료학적 모이어티("면역접합체"), 제2 구제 제제 또는 항-NPR1 항체의 혈류역학적 효과를 역전시키기 위해 유용한 임의의 다른 치료학적 모이어티와 같은 모이어티에 접합될 수 있다.

[0090] "단리된 항체"는, 본원에 사용된 것과 같이, 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체(Ab)가 실질적으로 없는 항체를 지칭하도록 의도된다(예를 들면, 항-NPR1 항체 또는 이의 단편에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 항-NPR1 항체 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 Ab가 실질적으로 없음).

[0091] 용어 "표면 플라즈몬 공명"은, 본원에 사용된 것과 같이, 예를 들면 BIACORE™ 시스템(Pharmacia Biosensor

AB, 스웨덴 읍살라 및 N.J. 피츠카타웨이)을 사용하여 바이오센서 매트릭스 내에 단백질 농도의 변경의 검출에 의해 실시간 생물분자 상호작용의 분석을 허용하는 광학 현상을 지칭한다.

[0092] 용어 "K_D"는, 본원에 사용된 것과 같이, 특정한 항체-항원 상호작용의 평형 해리 상수를 지칭하도록 의도된다.

본 개시내용의 맥락에서, 면역글로불린 단백질의 "항원"은 항-NPR1 항체(예를 들면, R5381) 또는 이의 항원 결합 단편(즉, NPR1에 결합하는 항체의 단편)이다.

[0093] 용어 "에피토프"는 파라토프로 알려진 항체 분자의 가변 영역에서 특정 항원 결합 부위와 상호작용하는 항원 결정부위를 지칭한다. 면역글로불린 단백질의 "항원"은 항-NPR1 항체(예를 들면, R5381) 또는 이의 항원 결합 단편(즉, NPR1에 결합하는 항체의 단편)이다. 단일 항원은 하나 초과의 에피토프를 가질 수 있다. 따라서, 상이한 면역글로불린 단백질(항체)은 항원에서의 상이한 부위에 결합할 수 있고, 상이한 생물학적 효과를 가질 수 있다. 용어 "에피토프"는 또한 B 세포 및/또는 T 세포가 반응하는 항원에서의 부위를 지칭한다. 이것은 또한 항체가 결합하는 항원의 영역을 지칭한다. 에피토프는 구조적 또는 기능적으로 정의될 수 있다. 기능적 에피토프는 일반적으로 구조적 에피토프의 하위집단이고, 상호작용의 친화도에 직접적으로 기여하는 잔기를 갖는다. 에피토프는 또한 입체배향적일 수 있고, 즉 비선형 아미노산으로 구성될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 에피토프는 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 기 또는 설포닐 기와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그룹인 결정인자를 포함할 수 있고, 소정의 실시형태에서 특정 3차원 구조적 특징 및/또는 특정 전하 특징을 가질 수 있다.

[0094] 용어 "교차 경쟁한다"는, 본원에 사용된 것과 같이, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 항원에 결합하고 또 다른 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합을 억제하거나 차단한다는 것을 의미한다. 면역글로불린 단백질의 "항원"은 항-NPR1 항체(예를 들면, R5381) 또는 이의 항원 결합 단편(즉, NPR1에 결합하는 항체의 단편)이다. 상기 용어는 또한 배향 둘 다에서의 2개의 항체 사이의 경쟁, 즉 제2 항체에 결합하고 이의 결합을 차단하는 제1 항체 및 그 반대를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 제1 항체 및 제2 항체는 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 대안적으로, 제1 항체 및 제2 항체는 상이한, 그러나 중첩하는 에피토프에 결합할 수 있어서 하나의 결합은 예를 들면 입체 장애를 통해 제2 항체의 결합을 억제하거나 차단한다. 항체 사이의 교차 경쟁은 당해 분야에 알려진 방법에 의해, 예를 들면 실시간 표지 비함유 생물층 간섭측정 검정에 의해 측정될 수 있다. 2개의 항체 사이의 교차 경쟁은 자가-자가 결합으로 인해 배경 신호보다 적은 제2 항체의 결합으로서 표현될 수 있다(여기서, 제1 항체 및 제2 항체는 동일한 항체임). 2개의 항체 사이의 교차 경쟁은 기준선 자가-자가 배경 결합보다 적은 예를 들면 제2 항체의 % 결합으로서 표현될 수 있다(여기서, 제1 항체 및 제2 항체는 동일한 항체임).

[0095] 용어 "실질적인 동일성" 또는 "실질적으로 동일한"은, 핵산 또는 이의 단편을 지칭할 때, 또 다른 핵산(또는 이의 상보성 가닥)과 적절한 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실에 의해 최적으로 정렬될 때, 서열 동일성의 임의의 잘 알려진 알고리즘, 예컨대 하기에 기술된 것과 같은 FASTA, BLAST 또는 GAP에 의해 측정된 것과 같이 뉴클레오타이드 염기의 적어도 약 90% 및 더 바람직하게는 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%에서의 뉴클레오타이드 서열 동일성이 있다는 것을 나타낸다. 기준 핵산 분자와 실질적인 동일성을 갖는 핵산 분자는 소정의 경우에 기준 핵산 분자에 의해 암호화된 폴리펩타이드와 동일하거나 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다.

[0096] 용어 "실질적인 유사성" 또는 "실질적으로 유사한"은, 폴리펩타이드에 적용되면서, 2개의 웨이드 서열이 디폴트 갭 중량을 사용하여 예컨대 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해 최적으로 정렬될 때 적어도 90%의 서열 동일성, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 95%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 공유한다는 것을 의미한다. 바람직하게는, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 의해 상이하다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 화학 특성(예를 들면, 전하 또는 소수화도)을 갖는 측쇄(R 기)를 갖는 또 다른 아미노산 잔기에 치환된 것이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 특성을 실질적으로 변경하지 않을 것이다. 2개 이상의 아미노산 서열이 보존적 치환에 의해 서로 상이한 경우에, 유사성의 퍼센트 또는 정도는 치환의 보존적 성질에 대해 수정하도록 위쪽으로 조정될 수 있다. 이 조정을 만들기 위한 수단은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들면, 본원에 참조로 포함된 문헌[Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331]을 참조한다. 유사한 화학 특성을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산의 기의 예는 1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신; 2) 지방족-하이드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; 3) 아미드 함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; 4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판; 5) 염기성 측쇄: 리신, 아르기닌 및 히스티딘; 6) 산성 측쇄: 아스파르테이트 및 글루타메이트 및 7) 황 함유 측쇄: 시스테인 및 메티오닌을 포함한다. 바람직한 보존적 아미노산 치환 기는 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루타메이트-아스파르테이트 및 아스파라긴-글루타민이다. 대안적으로, 보존적 대체는 본원에 참고로 포함된 문헌[Gonnet, et

*al., (1992) Science 256: 1443 45]*에 개시된 PAM250 로그-우도 행렬에서 양의 값을 갖는 임의의 변경이다. "적절히 보존적"인 대체는 PAM250 로그-우도 행렬에서 음이 아닌 값을 갖는 임의의 변경이다.

[0097] 폴리펩타이드에 대한 서열 유사성은 통상적으로 서열 분석 소프트웨어를 사용하여 측정된다. 단백질 분석 소프트웨어는 보존적 아미노산 치환을 포함하는 다양한 치환, 결실 및 다른 변형으로 배정된 유사성의 측정치를 사용하여 유사한 서열을 일치시킨다. 예를 들면, GCG 소프트웨어는 밀접하게 관련된 폴리펩타이드, 예컨대 유기체의 상이한 종으로부터의 상동성 폴리펩타이드 사이에 또는 야생형 단백질과 이의 뮤테인 사이에 서열 상동성 또는 서열 동일성을 결정하기 위해 디폴트 매개변수와 사용될 수 있는 GAP 및 BESTFIT와 같은 프로그램을 함유한다. 예를 들면, GCG 버전 6.1을 참조한다. 폴리펩타이드 서열은 디폴트 또는 추천된 매개변수를 갖는 FASTA, GCG 버전 6.1에서의 프로그램을 사용하여 또한 비교될 수 있다. FASTA(예를 들면, FASTA2 및 FASTA3)는 쿼리 서열과 조사 서열 사이의 최고의 중첩의 영역의 정렬 및 퍼센트 서열 동일성을 제공한다(상기 Pearson (2000) 문헌). 또 다른 바람직한 알고리즘은 본 개시내용의 서열을 상이한 유기체로부터의 많은 수의 서열을 함유하는 데 이타베이스와 비교할 때 디폴트 매개변수를 사용한 컴퓨터 프로그램 BLAST, 특히 BLASTP 또는 TBLASTN이다. 예를 들면, 각각이 본원에 참고로 포함된 문헌[Altschul, et al., (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 및 (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402]을 참조한다.

[0098] "치료적 유효량"이라는 구절에 의해 이것이 투여된 원하는 효과를 생성하는 양이 의도된다. 정확한 양은 치료의 목적에 따라 달라질 것이고, 알려진 기법을 사용하여 당업자에 의해 확인될 것이다(예를 들면, 문헌[Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*] 참조). 예를 들면, 본 발명에 따른 구제 제제의 치료적 유효량은, 일 실시형태에서, 나트륨 배설 촉진 펩타이드 수용체 1(NPR1) 효능제의 혈류역학적 효과의 약간의 역전 정도를 생성시키는 양이다.

[0099] 본원에 사용된 것과 같이, 용어 "대상체"는 동물, 바람직하게는 포유류, 더 바람직하게는 인간을 지칭한다. 본 개시내용의 특정 실시형태에서, 대상체는 혈압 강하 또는 NPR1에 특이적으로 결합하는 효능제 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 투여와 연관된 다른 혈류역학적 매개변수의 변경을 경험했거나 경험하거나 경험할 수 있다.

[0100] 본원에 사용된 것과 같이, 용어 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료"는 이를 필요로 하는 대상체에 대한 본원에 기재된 면역글로불린 단백질과 같은 치료제의 투여로 인한 질환 또는 장애의 적어도 하나의 증상 또는 적응증의 감소 또는 중증도의 개선을 지칭한다. 상기 용어는 질환의 진행 또는 증상/적응증의 악화의 억제를 포함한다. 상기 용어는 또한 질환의 양성 예후를 포함하고, 즉 대상체는 본 개시내용의 항체와 같은 치료제의 투여 시 질환이 없을 수 있거나 질환이 감소될 수 있다. 치료제는 치료학적 용량으로 대상체에게 투여될 수 있다.

[0101] 용어 "예방하다", "예방하는" 또는 "예방"은 치료제의 투여 시 질환 또는 장애의 정후 또는 이러한 질환 또는 장애의 임의의 증상 또는 적응증의 억제를 지칭한다.

인간 면역글로불린 단백질의 제조

[0103] 특정한 항원에 특이적인 면역글로불린 가변 (항원 결합) 도메인은 당해 분야에 알려진 임의의 항체 생성 기술에 의해 제조될 수 있다. 이것은 얻어지면 일상적 방법을 사용하여 본 개시내용의 면역글로불린 단백질 문자를 생성하도록 적절히 배열될 수 있다. (본 개시내용의 면역글로불린 단백질 문자를 삭제하기 위해 사용될 수 있는 예시적인 면역글로불린 단백질 성분 및 형식의 설명은 본원에서 어딘 가에 제공된다.) 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 단백질의 하나 이상의 개별 성분(예를 들면, 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역)은 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 완전 인간 항체로부터 유래된다. 이러한 항체를 제조하는 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있다. 예를 들면, 인간 항체는 형질전환 마우스에서 생성될 수 있다.

[0104] 임의의 이러한 알려진 방법은 항-NPR1 항체에 특이적으로 결합하는 인간 항체를 제조하기 위해 본 개시내용의 맥락에서 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 항-NPR1 항체는 R5381이다.

[0105] 하기 중 어느 하나를 포함하는 면역원은 항-NPR1 항체에 대한 항원을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질(항체)은 전장 항-NPR1 항체(예를 들면, R5381) 또는 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 DNA로 면역화된 마우스로부터 얻어진다. 대안적으로, 단백질 또는 이의 단편은 표준 생화학 기법을 사용하여 생성되고 변형되고 면역원으로서 사용될 수 있다.

[0106] 일부 실시형태에서, 면역원은 이. 콜라이 또는 임의의 다른 진핵 세포 또는 포유류 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소(CHO) 세포에서 발현된 재조합 항-NPR1 항체 또는 이의 항원 결합 단편일 수 있다.

[0107] 본 개시내용의 면역글로불린 단백질의 중쇄 및/또는 경쇄 중 하나 이상은 VELOCIMMUNE® 기술(예를 들면, US 제

6,596,541호 참조, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE® 또는 단일클론 항체를 생성하기 위한 임의의 다른 알려진 방법을 사용하여 제조될 수 있다. VELOCIMMUNE® 기술을 사용하여, 인간 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 갖는 항-NPR1 항체(예를 들면, R5381)에 대한 고친화도 키메라 항체가 초기에 단리된다. VELOCIMMUNE® 기술은 마우스가 항원 자극에 반응하여 인간 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 포함하는 항체를 생성하도록 내인성 마우스 불변 영역 좌위에 작동 가능하게 연결된 인간 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 게놈을 갖는 형질전환 마우스의 생성을 수반한다. 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 암호화하는 DNA는 단리되고, 인간 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 암호화하는 DNA에 작동 가능하게 연결된다. 이후, DNA는 완전 인간 항체를 발현할 수 있는 세포에서 발현된다.

[0108] 하기 실험 부문에서처럼, 항체는 규명되고 친화도, 선택도, 에피토프 등을 포함하는 원하는 특징에 대해 선택된다. 마우스 불변 영역은 본 개시내용의 완전 인간 항체, 예를 들면 야생형 또는 변형된 IgG1 또는 IgG4를 생성하도록 원하는 인간 불변 영역으로 대체된다. 선택된 불변 영역이 특정 용도에 따라 변할 수 있지만, 고친화도 항원 결합 및 표적 특이성 특징이 가변 영역에 있다.

[0109] 생물학적동등성

[0110] 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 기재된 항체의 아미노산 서열에서 변하지만, 항-NPR1 항체, 예를 들면 R5381에 결합하는 능력을 보유하는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포함한다. 이러한 변이체 단백질은 모 서열과 비교할 때 아미노산의 하나 이상의 부가, 결실 또는 치환을 포함하지만, 기재된 단백질(예를 들면, 항체)의 생물학적 활성과 본질적으로 동등한 생물학적 활성을 나타낸다. 마찬가지로, 면역글로불린 단백질의 (예를 들면, 항체 암호화) DNA 서열은 개시된 서열과 비교할 때 뉴클레오타이드의 하나 이상의 부가, 결실 또는 치환을 포함하지만, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질(예를 들면, 항체 또는 항체 단편)과 본질적으로 생물동등한 항체 또는 항체 단편을 암호화하는 서열을 포함한다.

[0111] 2개의 항원 결합 단백질 또는 항체는 예를 들면 이들이 단일 용량 또는 다수의 용량으로 유사한 실험 조건 하에 동일한 물 용량으로 투여될 때 흡수율 및 흡수 정도가 상당한 차이를 나타내지 않는 약학 균등물 또는 약학 대안물이면 생물동등으로 여겨진다. 일부 항체는 이들이 이의 흡수 정도가 동등하지만 이의 흡수율이 동등하지 않으면 균등물 또는 약학 대안물로 여겨질 것이고, 이러한 흡수율 차이가 의도적이고 표지화에 반영되고, 예를 들면 만성 사용에 대해 효과적인 신체 약물 농도의 획득에 본질적이 아니고, 연구된 특정한 약물 생성물에 대해 의학적으로 대수롭지 않다고 여겨지므로 그런데도 생물동등으로 여겨질 수 있다.

[0112] 일 실시형태에서, 2개의 면역글로불린 단백질은 이의 안전성, 순도 또는 효력에서의 임상적으로 의미 있는 차이가 없으면 생물동등이다.

[0113] 일 실시형태에서, 2개의 면역글로불린 단백질은 환자가 기준 생성물과 생물학적 생성물 사이에 1회 이상 스위칭이 될 수 있는데, 이러한 스위칭이 없는 계속된 치료와 비교하여 임상적으로 유의미한 면역원성 변경 또는 유효성 감소를 포함하여 예상된 부작용 위험 증가 없이 스위칭이 될 수 있으면 생물동등이다.

[0114] 일 실시형태에서, 2개의 면역글로불린 단백질은 이들이 둘 다 사용의 병태 또는 병태들에 대한 공통 작용 기전 또는 작용 기전들에 의해 이러한 기전이 알려진 정도로 작용하면 생물동등이다.

[0115] 생물학적동등성은 생체내 방법 및/또는 시험관내 방법에 의해 입증될 수 있다. 생물학적동등성 측정은 예를 들면 (a) 면역글로불린 단백질 또는 이의 대사물질의 농도가 시간의 함수로서 혈액, 혈장, 혈청 또는 다른 생물학적 유체에서 측정되는 인간 또는 다른 포유류에서의 생체내 시험; (b) 인간 생체내 생체이용률 데이터와 상관되고 이것을 합당하게 예측하는 시험관내 시험; (c) 면역글로불린 단백질(예를 들면, 항체(또는 이의 표적))의 적절한 급성 약리학적 효과가 시간의 함수로서 측정되는 인간 또는 다른 포유류에서의 생체내 시험; 및 (d) 면역글로불린 단백질의 안전성, 효능 또는 생체이용률 또는 생물학적동등성을 확립하는 잘 제어된 임상 실험을 포함한다.

[0116] 본 개시내용의 면역글로불린 단백질(예를 들면, 항체)의 생물동등 변이체는 예를 들면 잔기 또는 서열의 다양한 치환을 만들고/or 써 또는 생물학적 활성에 필요하지 않은 말단 또는 내부 잔기 또는 서열을 결실시킴으로써 자체될 수 있다. 본 개시내용의 면역글로불린 단백질의 "생물학적 활성"(예를 들면, R5381에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체 단편)은 항원(예를 들면, 항-NPR1 항체 R5381)에 특이적으로 결합하는 것, 항-NPR1 항체의 혈류 역학적 효과를 역전시키는 것 및 항-NPR1 항체의 투여의 결과로서 강하된 혈압을 증가시키는 것을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 혈류, 심장 로딩 및/또는 심박수는 또한 소정의 실시형태에서 긍정적으로 영향을 받는다. 예를 들면, 생물학적 활성에 본질적이 아닌 시스테인 잔기는 원형재현 시 불필요한 또는 부정확한 분자내

디설파이드 브릿지의 형성을 방지하기 위해 결실되거나 다른 아미노산으로 대체될 수 있다. 다른 맥락에서, 생물동등 면역글로불린 단백질은 항체의 글리코실화 특징을 변형시키는 아미노산 변경, 예를 들면 글리코실화를 없애거나 제거하는 돌연변이를 포함하는 항체 변이체를 포함할 수 있다.

[0117] Fc 변이체를 포함하는 면역글로불린 단백질

본 개시내용의 소정의 실시형태에 따르면, 예를 들면 중성 pH와 비교하여 산성 pH에서 FcRn 수용체에 대한 항체 결합을 향상시키거나 감소시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 면역글로불린 단백질이 제공된다. 예를 들면, 본 개시내용은 항-NPR1 항체에 결합하고 Fc 도메인의 C_H2 또는 C_H3 영역에서의 돌연변이를 포함하는 면역글로불린 단백질을 포함하고, 돌연변이(들)는 산성 환경에서(예를 들면, pH가 약 5.5 내지 약 6.0의 범위인 엔도솜에서) FcRn에 대한 Fc 도메인의 친화도를 증가시킨다. 이러한 돌연변이는 동물에게 투여될 때 면역글로불린 단백질의 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다. 이러한 Fc 변형의 비제한적인 예는 예를 들면 위치 250번(예를 들면, E 또는 Q); 250번 및 428번(예를 들면, L 또는 F); 252번(예를 들면, L/Y/F/W 또는 T), 254번(예를 들면, S 또는 T) 및 256번(예를 들면, S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 또는 위치 428번 및/또는 433번(예를 들면, H/L/R/S/P/Q 또는 K) 및/또는 434번(예를 들면, A, W, H, F 또는 Y[N434A, N434W, N434H, N434F 또는 N434Y])에서의 변형; 또는 위치 250번 및/또는 428번에서의 변형; 또는 위치 307번 또는 308번(예를 들면, 308F, V308F) 및 434번에서의 변형을 포함한다. 일 실시형태에서, 변형은 428L(예를 들면, M428L) 및 434S(예를 들면, N434S) 변형; 428L, 259I(예를 들면, V259I) 및 308F(예를 들면, V308F) 변형; 433K(예를 들면, H433K) 및 434(예를 들면, 434Y) 변형; 252, 254 및 256(예를 들면, 252Y, 254T 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형(예를 들면, T250Q 및 M428L); 및 307 및/또는 308 변형(예를 들면, 308F 또는 308P)을 포함한다. 더 또 다른 실시형태에서, 변형은 265A(예를 들면, D265A) 및/또는 297A(예를 들면, N297A) 변형을 포함한다.

예를 들면, 본 개시내용은 250Q 및 248L(예를 들면, T250Q 및 M248L); 252Y, 254T 및 256E(예를 들면, M252Y, S254T 및 T256E); 428L 및 434S(예를 들면, M428L 및 N434S); 257I 및 311I(예를 들면, P257I 및 Q311I); 257I 및 434H(예를 들면, P257I 및 N434H); 376V 및 434H(예를 들면, D376V 및 N434H); 307A, 380A 및 434A(예를 들면, T307A, E380A 및 N434A); 및 433K 및 434F(예를 들면, H433K 및 N434F)로 이루어진 군으로부터 선택되는 돌연변이의 하나 이상의 쌍 또는 그룹을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 면역글로불린 단백질을 포함한다. 상기 Fc 도메인 돌연변이 및 본원에 개시된 항체 가변 도메인 내의 다른 돌연변이의 모든 가능한 조합은 본 개시내용의 범위 내에 고려된다.

본 개시내용은 또한 제1 C_H3 도메인 및 제2 Ig C_H3 도메인을 포함하는 면역글로불린 단백질을 포함하고, 제1 Ig C_H3 도메인 및 제2 Ig C_H3 도메인은 서로 적어도 하나의 아미노산에 의해 상이하고, 적어도 하나의 아미노산 차이는 아미노산 차이가 결여된 단백질과 비교하여 단백질 A에 대한 면역글로불린 단백질의 결합을 감소시킨다. 일 실시형태에서, 제1 Ig C_H3 도메인은 단백질 A에 결합하고, 제2 Ig C_H3 도메인은 단백질 A 결합을 감소시키거나 폐지하는 돌연변이, 예컨대 EU 넘버링에 의해 H315R을 함유한다. 제2 C_H3은 EU 넘버링에 의해 Y316F를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 제1 Ig C_H3 도메인은 단백질 A에 결합하고, 제2 Ig C_H3 도메인은 단백질 A 결합을 감소시키거나 폐지하는 돌연변이, 예컨대 H95R 변형(IMGT 엑손 넘버링에 의해; EU 넘버링에 의해 H435R)을 함유한다. 제2 C_H3은 Y96F 변형(IMGT에 의해; EU에 의해 Y436F)을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, 미국 특허 제8,586,713호를 참조한다. 제2 C_H3 내에 발견될 수 있는 추가 변형은 IgG1 항체의 경우에 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M 및 V82I(IMGT에 의해; EU에 의해 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M 및 V422I); IgG2 항체의 경우에 N44S, K52N 및 V82I(IMGT; EU에 의해 N384S, K392N 및 V422I); 및 IgG4 항체의 경우에 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q 및 V82I(IMGT에 의해; EU에 의해 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q 및 V422I)를 포함한다.

본 개시내용은 또한 항-NPR1 항체에 결합하고, 키메라 중체 불변(C_H) 영역을 포함하는 면역글로불린 단백질을 포함하고, 키메라 C_H 영역은 하나 초과의 면역글로불린 아이소타입의 C_H 영역으로부터 유래된 분절을 포함한다. 예를 들면, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 분자로부터 유래된 C_H3 도메인의 일부 또는 전부와 조합된 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 분자로부터 유래된 C_H2 도메인의 일부 또는 전부를 포함하는 키메라 C_H 영역을 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에 따르면, 본 개시내용의 항체는 키메라 힌지 영역을 갖는 키메라 C_H 영역을 포함한다. 예를 들면, 키메라 힌지는 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간

IgG4 헌지 영역으로부터 유래된 "하부 헌지" 서열(EU 넘버링에 따라 위치 228번 내지 236번의 아미노산 잔기)과 조합된 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 헌지 영역으로부터 유래된 "상부 헌지" 아미노산 서열(EU 넘버링에 따라 위치 216번 내지 227번의 아미노산 잔기)을 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에 따르면, 키메라 헌지 영역은 인간 IgG1 또는 인간 IgG4 상부 헌지로부터 유래된 아미노산 잔기 및 인간 IgG2 하부 헌지로부터 유래된 아미노산 잔기를 포함한다. 본원에 기재된 것과 같은 키메라 C_H 영역을 포함하는 항체는 소정의 실시형태에서 항체의 치료학적 특성 또는 약동학적 특성에 부정적으로 영향을 미치지 않으면서 변형된 Fc 효과기 기능을 나타낼 수 있다. (예를 들면, 개시내용이 본원에 그 전체가 참고로 포함된 미국 특허 출원 공보 제2014/0243504호 참조).

[0122] 면역글로불린 단백질의 생물학적 특징

일반적으로, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 NPR1 효능제(예컨대, 항-NPR1 항체)에 결합하고 이의 혈류역학적 효과를 역전시킴으로써 기능한다. 예를 들면, 본 개시내용은 예를 들면 본원에서의 실시예 3에 정의된 것과 같은 검정 형식을 이용하여 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 것과 같이 25°C에서의 약 3 nM 미만 및 37°C에서의 약 7 nm 미만의 K_d로 항-NPR1 항체(의 모 하이브리도마)에 결합하는 항체 및 항체의 항원 결합 단편을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 예를 들면 본원에서의 실시예 3에 정의된 것과 같은 검정 형식 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정된 것과 같이 약 25 nM 미만, 약 10 nM 미만, 약 7 nM 미만, 약 6 nM 미만, 약 5 nM 미만, 약 4 nM 미만, 약 3 nM 미만, 약 2 nM 미만, 약 1 nM 미만, 약 0.75 nM 미만 또는 약 0.5 nM 미만의 K_d로 항-NPR1 항체의 모 하이브리도마에 결합한다.

본 개시내용은 또한 pH 민감 방식으로 NPR1 효능제에 결합하는 면역글로불린 단백질 및 이의 단편을 포함한다. 예를 들면, REGN9035 및 REGN9037의 K_d 및 해리 반감기(t_½)는 본원에서의 실시예 5에 기재된 것과 같이 pH 7.4, pH 6.5, pH 6.0 및 pH 5.0 완충액 중에 변한다. REGN9035에 대해, 해리 반감기(t_½)는 약 12분에서 약 0.6분으로 감소하는 pH로 유의미하게 감소하고; REGN9037에 대해 해리 반감기(t_½)는 약 13분 내지 약 17분 사이의 감소하는 pH로 약간 변한다. 각각에 대한 K_d는 마찬가지로 REGN9035에 대해 약 9.96E-04 내지 1.97E-02로 변하고, REGN9037에 대해 약 8.67E-04 내지 약 6.64E-04로 변한다.

본 개시내용은 또한 항-NPR1 항체에 의해 유도된 hNPR1의 활성화를 억제하는 면역글로불린 단백질 및 이의 단편을 포함한다. 예를 들면, 2가 및 1가 항-R5381 항체 및 이의 항원 결합 단편은 내인성 리간드(예를 들면, ANP, BNP)의 존재 및 부재 하에 hNPR1의 R5381 유도된 활성화를 차단한다. NPR1의 R5381 유도된 활성화의 최대 억제(약 97% 내지 약 106%)는 예를 들면 본원에서의 실시예 6에 정의된 것과 같은 검정 형식 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 cGMP 측정에 의해 측정되었다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 항체 또는 항원 결합 단편은 hNPR1의 항-NPR1 항체 유도된 활성화를 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 적어도 약 100%, 적어도 약 101%, 적어도 약 102%, 적어도 약 103%, 적어도 약 104% 또는 적어도 약 105%, 적어도 약 106% 억제한다.

본 개시내용은 또한 hNPR1에 대한 항-NPR1 항체 결합을 차단하는 면역글로불린 단백질 및 이의 단편을 포함한다. 예를 들면, 2가 및 1가 항-R5381 항체 및 이의 항원 결합 단편은 실시예 7에 기재된 것과 같은 차단 ELISA 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 평가된 것과 같이 인간 NPR1에 대한 결합으로부터 비오틴-R5381을 차단한다. 약 99% 및 약 100% 차단은 각각 1가/1아암 및 2가 항-R5381 항체에 대해 평가되었다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 항체 또는 항원 결합 단편은 hNPR1에 대한 항-NPR1 항체 결합을 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100% 차단한다.

본 개시내용은 또한 효능제 항-NPR1 항체에 의한 최소 내지는 무의 순환 면역 복합체(CIC)를 형성하는 면역글로불린 단백질 및 이의 단편을 포함한다. 예를 들면, 2가 및 1가 항-R5381 항체 및 이의 항원 결합 단편은 실시예 8에 기재된 것과 같은 Clq-CIC 검정 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 평가된 것과 같이 R5381과 겹출 가능한 CIC를 형성하지 않는다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 항체 또는 항원 결합 단편은 항-NPR1 항체와 CIC를 형성하지 않는다. 순환에서의 CIC의 존재는 질환 활성과 통계학적으로 상관된다.

본 개시내용은 또한 항-NPR1 항체의 혈류역학적 효과를 역전시키는 면역글로불린 단백질 및 이의 단편을 포함한다. 예를 들면, 2가 항-R5381 항체 및 이의 항원 결합 단편은 실시예 10에 기재된 것과 같은 면역검정 또는 실질적으로 유사한 검정을 통해 평가된 것과 같이 아이소타입 대조군보다 더 빠르고 더 효과적으로 마우스로부터

R5381을 청소할 수 있었다. R5381의 혈청 농도는 제7일에 유의미하게 더 낮았고, 제22일에 검출 불가능하였다. 또 다른 예에서, 2가 및 1가 항-R5381 항체 및 이의 항원 결합 단편은 실시예 11 및 실시예 12에 기재된 것과 같이 수축기 압력, 확장기 압력, 맥압 및 평균 동맥압뿐만 아니라 심박수를 수집하여 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 평가된 것과 같이 R5381의 혈압 저하 효과를 신속히 그리고 지속적으로 역전시켰다. 2가 및 1가 항-R5381 항체 및 이의 항원 결합 단편은 또한 실시예 11 및 실시예 12에 기재된 것과 같은 ELISA 또는 실질적으로 유사한 검정을 사용하여 뇨에서 평가된 것과 같이 NPR1 유도된 cGMP 생성을 억제하였다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 항체 또는 항원 결합 단편은 혈압을 기준선 수준으로 다시 증가시킨다(즉, 항-NPR1 항체의 투여로 인한 혈압 강하 전의 수준으로 다시 증가시킨다).

[0129] 일 실시형태에서, 본 개시내용은 항-NPR1 항체(예컨대, R5381)에 특이적으로 결합하는 단리된 재조합 면역글로불린 단백질 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하고, 면역글로불린 단백질은 (a) 완전 인간 단일클론 항체를 포함하는 특징; (b) 완전 인간 1가 또는 1아암 항체를 포함하는 특징; (c) 단일 면역글로불린 도메인 및 적어도 하나의 Fc 단편을 포함하는 다합체화 성분을 포함하는 특징; (d) 표면 플라즈몬 공명 검정에서 측정된 것과 같이 7 nM 미만의 해리 상수(K_D)로 25°C 및 37°C에서 항-NPR1 항체에 결합하는 특징; (e) pH 의존적 해리를 나타내는 특징; (f) NPR1의 항-NPR1 항체 유도된 활성화의 약 97% 내지 약 106%를 억제하는 특징; (g) 인간 NPR1에 대한 결합으로부터 적어도 약 비오틴-항-NPR1-효능제 항체를 차단하는 특징; (h) 항-NPR1 항체와 검출 가능한 CIC를 형성하지 않는 특징; (i) 아이소타입 대조군보다 더 빠르게 혈청으로부터 항-NPR1 항체를 청소하는 특징; (j) 항-NPR1 항체의 혈압 저하 효과를 역전시키는 특징; 및 (k) 표 1에 열거된 HCVR 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HCVR 및 표 1에 열거된 LCVR 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 HCVR을 포함하는 특징 중 하나 이상을 나타낸다.

[0130] 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 하나 이상의 상기 언급된 생물학적 특징 또는 임의의 이들의 조합을 보유할 수 있다. 본 개시내용의 면역글로불린 단백질의 다른 생물학적 특징은 본원에서의 실시예를 포함하여 본 개시내용의 검토로부터 당업자에게 분명할 것이다.

에피토프 맵핑 및 관련된 기술

[0132] 본 개시내용은 항-NPR1 항체 분자의 하나 이상의 영역 내에 발견된 하나 이상의 아미노산과 상호작용하는 면역글로불린 단백질을 포함한다. 면역글로불린 단백질이 결합하는 에피토프는 항-NPR1 항체 분자의 임의의 상기 언급된 도메인(예를 들면, 도메인에서의 선형 에피토프) 내에 배치된 3개 또는 그 이상(예를 들면, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개 또는 그 이상)의 아미노산의 단일 인접한 서열로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 에피토프는 항체 분자의 상기 언급된 도메인(예를 들면, 형태학적 에피토프)의 어느 것 또는 둘 다 내에 배치된 복수의 비인접한 아미노산(또는 아미노산 서열)으로 이루어질 수 있다.

[0133] 당업자에게 알려진 다양한 기법은 항체가 폴리펩타이드 또는 단백질 내에 "하나 이상의 아미노산과 상호작용하는지"를 결정하기 위해 사용될 수 있다. 예시적인 기법은 예를 들면 문헌[Antibodies, Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY)]에 기재된 것과 같은 일상적 교차 차단 검정을 포함한다. 다른 방법은 알라닌 스캐닝 돌연변이 분석, 펩타이드 블롯 분석(Reineke, (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), 펩타이드 절단 분석 결정학적 연구 및 NMR 분석을 포함한다. 게다가, 에피토프 절제, 에피토프 추출 및 항원의 화학 변형과 같은 방법이 이용될 수 있다(Tomer, (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). 항체가 상호작용하는 폴리펩타이드 내의 아미노산을 확인하기 위해 사용될 수 있는 또 다른 방법은 질량 분광법에 의해 검출된 수소/중수소 교환이다. 일반적인 용어에서, 수소/중수소 교환 방법은 관심 있는 단백질의 중수소 표지화, 이어서 중수소 표지된 단백질에 대한 항체의 결합을 수반한다. 다음에, 단백질/항체 복합체는 물로 이동되고, 항체 복합체에 의해 보호된 아미노산 내의 교환 가능한 양성자는 계면의 일부가 아닌 아미노산 내에 교환 가능한 양성자보다 더 느린 속도로 중수소에서 수소 역교환을 겪는다. 그 결과, 단백질/항체 계면의 일부를 형성하는 아미노산은 중수소를 보유할 수 있고, 따라서 계면에 포함되지 않은 아미노산과 비교하여 비교적 더 높은 질량을 나타낸다. 항체의 해리 후, 표적 단백질은 프로테아제 절단 및 질량 분광법 분석으로 처리되어서, 항체가 상호작용하는 특정 아미노산에 상응하는 중수소 표지된 잔기를 드러낸다. 예를 들면, 문헌[Ehring, (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen and Smith, (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A]을 참조한다.

[0134] 용어 "에피토프"는 B 세포 및/또는 T 세포가 반응하는 항원에서의 부위를 지칭한다. 본 개시내용의 맥락에서, 항원은 항-NPR1 항체이다. B-세포 에피토프는 단백질의 3차 폴딩에 의해 병치된 인접한 아미노산 또는 비인접한 아미노산 둘 다로부터 형성될 수 있다. 인접한 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 통상적으로 변성 용매에 대

한 노출에서 보유되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프는 통상적으로 변성 용매에 의한 처리에서 소실된다. 에피토프는 통상적으로 고유한 공간 구조에서 적어도 3개 및 더 보통, 적어도 5개 또는 8개 내지 10개의 아미노산을 포함한다.

[0135] 항원 구조 기반 항체 프로파일링(ASAP: Antigen Structure-based Antibody Profiling)으로도 알려진 변형-보조 프로파일링(MAP: Modification-Assisted Profiling)은 화학적으로 또는 효소적으로 변형된 항원 표면에 대한 각각의 항체의 결합 프로파일의 유사성에 따라 동일한 항원에 대향하여 지향된 많은 수의 단일클론 항체(mAb)를 분류하는 방법이다(본원에 그 전문이 참고로 구체적으로 포함된 US 2004/0101920호 참조). 각각의 카테고리는 또 다른 카테고리에 의해 표시된 에피토프와 명확히 상이하거나 이것과 부분적으로 중첩하는 고유한 에피토프를 반영할 수 있다. 이 기술은 유전적으로 구별되는 항체에 규명이 집중될 수 있도록 유전적으로 동일한 항체의 신속한 필터링을 허용한다. MAP는 하이브리도마 스크리닝에 적용될 때 원하는 특징을 갖는 mAb를 생성하는 회귀 하이브리도마 클론의 확인을 수월하게 할 수 있다. MAP는 본 개시내용의 항체를 상이한 에피토프를 결합시키는 항체의 그룹으로 분류하도록 사용될 수 있다.

[0136] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용은 항-NPR1 항체의 세포외 도메인 내에 발견된 하나 이상의 에피토프와 상호 작용하는 면역글로불린 단백질 및 이의 단편을 포함한다. 에피토프(들)는 항-NPR1 항체의 세포외 도메인 내에 배치된 3개 또는 그 이상(예를 들면, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개 또는 그 이상)의 아미노산의 하나 이상의 인접한 서열로 이루어질 수 있다. 대안적으로, 에피토프는 항-NPR1 항체 내에 배치된 복수의 비인접한 아미노산(또는 아미노산 서열)으로 이루어질 수 있다.

[0137] 본 개시내용은 표 1에 열거된 임의의 특정 예시적인 면역글로불린 단백질과 동일한 에피토프 또는 에피토프의 부분에 결합하는 항체를 포함한다. 마찬가지로, 본 개시내용은 또한 표 1에 열거된 임의의 특정 예시적인 면역글로불린 단백질과 항-NPR1 항체 또는 이의 단편에 대한 결합에 대해 경쟁하는 항체를 포함한다. 예를 들면, 본 개시내용은 표 1에 열거된 하나 이상의 항체와 항-NPR1 항체 또는 이의 단편에 대한 결합에 대해 교차 경쟁하는 항체를 포함한다.

[0138] 항체가 당해 분야에 알려진 일상적 방법을 사용하여 기준 면역글로불린 단백질과 동일한 에피토프에 결합하거나 이에 대한 결합에 대해 경쟁하는지를 용이하게 결정할 수 있다. 예를 들면, 시험 항체가 본 개시내용의 기준 면역글로불린 단백질과 동일한 에피토프에 결합하는지를 결정하기 위해, 기준 항체는 포화 조건 하에 항-NPR1 항체 단백질 또는 웨타이드에 결합하도록 허용된다. 다음에, 항-NPR1 항체 단백질 분자에 결합하는 시험 항체의 능력이 평가된다. 시험 항체가 기준 면역글로불린 단백질과의 포화 결합 후 항-NPR1 항체에 결합할 수 있으면, 시험 항체가 기준 면역글로불린 단백질과 상이한 에피토프에 결합한다는 것이 결론지어질 수 있다. 다른 한편, 시험 항체가 기준 면역글로불린 단백질과의 포화 결합 후 항-NPR1 항체 단백질에 결합할 수 없으면, 시험 항체는 본 개시내용의 기준 면역글로불린 단백질이 결합한 에피토프와 동일한 에피토프에 결합할 수 있다.

[0139] 항체가 기준 면역글로불린 단백질과 결합에 대해 경쟁하는지를 결정하기 위해, 상기 기재된 결합 방법론은 2가지 배향에서 수행된다: 제1 배향에서, 기준 항체는 포화 조건 하에 항-NPR1 항체 단백질에 결합하도록 허용된 후, 항-NPR1 항체 분자에 대한 시험 항체의 결합이 평가된다. 제2 배향에서, 시험 항체는 포화 조건 하에 항-NPR1 항체 분자에 결합하도록 허용된 후, 항-NPR1 항체 분자에 대한 기준 항체의 결합이 평가된다. 배향 둘 다에서 오직 제1(포화) 항체가 항-NPR1 항체 분자에 결합할 수 있으면, 시험 항체 및 기준 항체가 항-NPR1 항체에 대한 결합에 대해 경쟁한다는 것이 결론지어진다. 당업자에 의해 이해되는 것처럼, 기준 항체와 결합에 대해 경쟁하는 항체는 기준 항체와 동일한 에피토프에 반드시 결합하지 않을 수 있지만, 중첩하는 에피토프 또는 인접한 에피토프를 결합시킴으로써 기준 항체의 결합을 입체적으로 차단할 수 있다.

[0140] 2개의 항체는 각각이 항원에 대한 다른 것의 결합을 경쟁적으로 억제(차단)하면 동일한 에피토프 또는 중첩하는 에피토프에 결합한다. 항원은 항-NPR1 항체이다. 즉, 하나의 항체의 1배, 5배, 10배, 20배 또는 100배 과량은 경쟁적 결합 검정에서 측정된 것과 같이 적어도 50%만큼, 그러나 바람직하게는 75%, 90% 또는 심지어 99%만큼 다른 것의 결합을 차단한다(예를 들면, 문헌[Junghans, et al., Cancer Res. 1990 50:1495-1502] 참조). 대안적으로, 2개의 항체는 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 항원에서의 본질적으로 모든 아미노산 돌연변이가 다른 것의 결합을 감소시키거나 제거하면 동일한 에피토프를 갖는다. 2개의 항체는 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 일부 아미노산 돌연변이가 다른 것의 결합을 감소시키거나 제거하면 중첩하는 에피토프를 갖는다.

[0141] 이후, 시험 항체의 결합의 관찰된 결여가 사실 기준 항체와 동일한 에피토프에 대한 결합으로 인한 것인지 또는

입체 차단(또는 또 다른 현상)이 관찰된 결합의 결여의 원인인지를 확인하기 위해 추가의 일상적인 실험(예를 들면, 웨타이드 돌연변이 및 결합 분석)이 수행될 수 있다. ELISA, RIA, 표면 플라즈몬 공명, 유세포 분석법 또는 당해 분야에서 이용 가능한 임의의 다른 정량적 또는 정성적 항체 결합 검정을 사용하여 이 분류의 실험이 수행될 수 있다.

[0142] 면역접합체

본 개시내용은 NPR1 연관된 질환 또는 장애(예를 들면, 고혈압)를 치료하기 위해 그리고/또는 항-NPR1 항체의 치료학적 사용과 연관된 혈류역학적 효과를 개선하기 위해 치료학적 모이어티에 접합된 인간 면역글로불린 단백질("면역접합체")을 추가로 포함한다. 본원에 사용된 것과 같이, 용어 "면역접합체"는 방사능제, 사이토카인, 인터페론, 표적 또는 리포터 모이어티, 효소, 웨타이드 또는 단백질 또는 치료제에 화학적으로 또는 생물학적으로 연결된 면역글로불린 단백질을 지칭한다. 상기 단백질은 이의 표적인 항-NPR1 항체에 결합할 수 있는 한 분자와 함께 임의의 위치에서 방사능제, 사이토카인, 인터페론, 표적 또는 리포터 모이어티, 효소, 웨타이드 또는 치료제에 연결될 수 있다. 면역접합체의 예는 항체-약물 접합체 및 항체-독소 융합 단백질을 포함한다. 일 실시 형태에서, 상기 면역접합체는 NPR1 단백질에 대한 제2 상이한 항체일 수 있다. 구제 제제에 접합될 수 있는 치료학적 모이어티의 유형은 치료되는 병태 및 성취되는 원하는 치료 효과를 고려할 것이다. 면역접합체를 형성하기 위한 적합한 제제의 예는 당해 분야에 알려져 있고; 예를 들면 WO 05/103081호를 참조한다.

[0144] 치료학적 투여 및 제제

본 개시내용은 본 개시내용의 면역글로불린 단백질을 포함하는 치료학적 조성물을 제공한다. 본 개시내용에 따른 치료학적 조성물은 적합한 담체, 부형제 및 개선된 이동, 전달, 관용성 및 기타를 제공하도록 제형으로 혼입되는 다른 제제와 투여될 것이다. 다수의 적절한 제형은 모든 약학 화학자에게 알려진 제형학에서 발견될 수 있다: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. 이 제형은 예를 들면 산제, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 지질(양이온성 또는 음이온성) 함유 베시클(예컨대, LIPOFECTIN™), DNA 접합체, 무수 흡수 페이스트, 수중유 및 유중수 에멀션, 에멀션 카보왁스(다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 카보왁스를 함유하는 반고체 젤 및 반고체 혼합물을 포함한다. 또한 문헌[Powell, et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations", PDA (1998) *J Pharm Sci Technol* 52:238-311]을 참조한다.

면역글로불린 단백질의 용량은 투여되는 대상체의 연령 및 몸짓, 병태, 투여 경로 및 기타에 따라 변할 수 있다. 본 개시내용의 단백질이 성인 환자에서 항-NPR1 항체의 혈류역학적 효과를 역전시키거나 이러한 혈류역학적 효과를 예방하기 위해 사용될 때, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질을 보통 약 0.1 내지 약 100 mg/kg 체 중의 단일 용량으로 투여하는 것이 유리하다. 치료의 빈도 및 기간이 병태의 중증도에 따라 조정될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 적어도 약 0.1 mg 내지 약 800 mg, 약 1 내지 약 600 mg, 약 5 내지 약 500 mg 또는 약 10 내지 약 400 mg의 초기 용량으로서 투여될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 초기 용량은 초기 용량의 것과 대략 동일하거나 이것보다 적을 수 있는 양으로 면역글로불린 단백질 또는 이의 항원 결합 단편의 제2 또는 복수의 후속하는 용량의 투여가 후행할 수 있고, 후속하는 용량은 적어도 1일 내지 3일; 적어도 1주; 적어도 2주; 적어도 3주; 적어도 4주; 적어도 5주; 적어도 6주; 적어도 7주; 적어도 8주; 적어도 9주; 적어도 10주; 또는 적어도 14주에 의해 분리된다.

다양한 전달 시스템, 예를 들면 리포솜, 마이크로캡슐에서의 캡슐화, 돌연변이체 바이러스를 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체 매개된 내포작용은 알려져 있고, 본 개시내용의 약제학적 조성물을 투여하기 위해 사용될 수 있다(예를 들면, 문헌[Wu, et al., (1987) *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432] 참조). 도입 방법은 진피내 투여, 진피경유 투여, 근육내 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 피하 투여, 비강내 투여, 경막외 투여 및 경구 투여를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 상기 조성물은 임의의 편리한 경로에 의해, 예를 들면 점적 또는 볼루스 주사에 의해, 상피 또는 점막피부 내벽(예를 들면, 구강 점막, 직장 및 장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고, 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국소일 수 있다. 약제학적 조성물은 베시클, 특히 리포솜에서 또한 전달될 수 있다(예를 들면, 문헌[Langer (1990) *Science* 249:1527-1533] 참조).

본 개시내용의 면역글로불린 단백질을 전달하기 위한 나노입자의 사용이 본원에서 또한 고려된다. 항체 접합된 나노입자는 치료 분야 및 진단 분야 둘 다에 사용될 수 있다. 항체 접합된 나노입자 및 제조 방법 및 용도는 본원에 참고로 포함된 문헌[Arruebo, M., et al., 2009 ("Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications" in *J. Nanomat.* Volume 2009, Article ID 439389, 24 pages, doi: 10.1155/2009/439389)]에 의해 자세히 기재되어 있다. 나노입자는 개발되고 표적 세포에 대한 약제학적 조성물에 함유된 항체에 접합될 수

있다. 약물 전달을 위한 나노입자는 또한 예를 들면 각각 본원에 그 전문이 포함된 US 8257740호 또는 US 8246995호에 기재되어 있다.

[0149] 소정의 상황에서, 약제학적 조성물은 제어 방출 시스템에서 전달될 수 있다. 일 실시형태에서, 펌프가 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 중합체성 재료가 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 제어 방출 시스템은 조성물의 표적에 근접하게 배치될 수 있어서 오직 전신 용량의 분획을 요한다.

[0150] 주사용 조제물은 정맥내 주사, 피하 주사, 두개내 주사, 복강내 주사 및 근육내 주사, 드립 주입 등을 위한 투여량 형태를 포함할 수 있다. 이 주사용 조제물은 공중에게 알려진 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0151] 본 개시내용의 약제학적 조성물은 표준 침 및 주사기에 의해 피하로 또는 정맥내로 전달될 수 있다. 게다가, 피하 전달과 관련하여, 펜 전달 장치는 용이하게 본 개시내용의 약제학적 조성물을 전달하는 데 있어서 용도를 갖는다. 이러한 펜 전달 장치는 재활용 또는 일회용일 수 있다. 재활용 펜 전달 장치는 일반적으로 약제학적 조성물을 함유하는 대체형 카트리지를 사용한다. 카트리지 내의 모든 약제학적 조성물이 투여되고 카트리지가 비면, 빈 카트리지를 용이하게 폐기하고 약제학적 조성물을 함유하는 새로운 카트리지로 대체할 수 있다. 펜 전달 장치를 이후 재사용할 수 있다. 일회용 펜 전달 장치에서, 대체형 카트리지가 없다. 오히려, 일회용 펜 전달 장치는 장치 내의 저장소에 보유된 약제학적 조성물로 프리필드(prefilled)된다. 저장소에 약제학적 조성물이 비면, 전체 장치를 버린다.

[0152] 유리하게는, 상기에 기재된 경구 용도 또는 비경구 용도를 위한 약제학적 조성물은 활성 성분의 용량에 일치하도록 맞춰진 단위 투여량 형태로 제조된다. 단일 용량에서의 이러한 투여량 형태는 예를 들면 정제, 환제, 캡슐, 주사(앰플), 좌제 등을 포함한다. 함유된 면역글로불린 단백질의 양은 일반적으로 단위 용량에서 투여량 형태당 약 5 내지 약 500 mg이고; 특히 주사의 형태에서 면역글로불린 단백질이 약 5 내지 약 300 mg 및 다른 투여량 형태에 대해 약 10 내지 약 300 mg으로 함유되는 것이 바람직하다.

면역글로불린 단백질의 치료학적 용도

[0154] 본 개시내용은 면역글로불린 단백질을 포함하는 치료학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 치료학적 조성물은 본원에 개시된 것과 같은 임의의 면역글로불린 단백질 및 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 것과 같이, "이를 필요로 하는 대상체"라는 표현은 혈압의 증가 또는 NPR1 효능제의 투여로 인한 효과의 역전으로부터 이익인 인간 또는 비인간 동물을 의미한다.

[0155] 본 개시내용의 면역글로불린 단백질(및 이를 포함하는 치료학적 조성물)은 특히 혈압 증가가 유리한 임의의 질환 또는 장애를 치료하기 위해 유용하다. 특히, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 NPR1 발현 또는 활성화 연관되거나 이에 의해 매개된 임의의 질환 또는 장애의 치료, 예방 및/또는 개선에 사용될 수 있다. 본 개시내용의 치료 방법이 달성되는 작용 기전은 효능제 항-NPR1 항체에 대한 결합 및 효능제 항체의 제거/청소를 포함한다. 효능제 항-NPR1 항체의 제거는 혈압을 증가시킨다.

[0156] 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 NPR1 효능제가 투여된 대상체에서 예를 들면 임의의 NPR1 연관된 질환 또는 장애를 치료하기 위해 사용될 수 있고, NPR1 효능제의 혈류역학적 효과의 역전이 원해진다. NPR1 연관된 질환 또는 장애의 예는 고혈압, 심부전, 비만, 신부전, 만성 신장 질환, 황반 부종, 녹내장, 뇌졸중, 폐 장애, 폐 섬유증, 염증, 천식, 골격 성장 장애, 골절, 당뇨병 및 암을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 본 개시내용의 면역글로불린 단백질을 포함하는 치료학적 조성물의 투여는 혈압 저하와 관련된 하나 이상의 부작용의 예방으로 이어질 수 있다. 혈압 저하와 연관된 잠재적인 불리한 사건은 정상 (낮은) 정맥압을 갖는 대상체에서 지속적, 증상성 저혈압, 보상 교감신경계 반응으로부터의 반사성 빈맥(가능하게는 심근경색, 뇌졸중, 부정맥, 심부전에 대한 위험을 증가시킴) 및 감소된 심박출량 및 종말 장기 관류를 포함할 수 있다.

[0157] 일 실시형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 항-NPR1 항체의 투여의 결과로서 저혈압을 갖는 환자를 치료하기 위한 약제학적 조성물 또는 약제의 제조에 사용된다. 또 다른 실시형태에서, 면역글로불린 단백질은 혈압을 증가시키고/시키거나 혈압 강하와 연관된 증상을 해소하기 위해 유용한 당업자에게 알려진 임의의 다른 제제 또는 임의의 다른 치료제에 의한 부가 치료로서 사용된다.

[0158] 본 개시내용은 또한 (i) 치료학적 양의 본원에 개시된 것과 같은 면역글로불린 단백질; 및 (ii) 대상체에서의 혈압 및/또는 혈류역학적 변경의 효과적인 조절을 위한 방법에서 사용하기 위한 효능제 항-NPR1 항체를 포함하는 조성물을 제공하고, 대상체는 NPR1 연관된 질환 또는 장애를 겪는다.

비면역글로불린 단백질 역전 제제

- [0160] 본 개시내용의 소정의 실시형태에서, 항-NPR1 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 혈류역학적 효과를 역전시키는 데 사용하기 위한 제제(즉, 역전 제제)는 혈관수축제, 알파-아드레노수용체 효능제, 스테로이드, 항이뇨 호르몬, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 길항제 / 혈관생성 억제제 및 혈압을 증가시키는 소분자 제제로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0161] 혈관수축제는 혈관을 수축시켜 혈압을 증가시키는 제제이다. 알파-아드레노수용체 효능제(α -효능제)는 혈관 평활근에서 α -수용체에 결합하고, 평활근 수축 및 혈관수축을 유도하여 혈압을 증가시킨다. 항이뇨 호르몬은 물의 재흡수를 증가시켜 심혈관계에서 혈관수축을 야기하는 신장에 작용하는 뇌하수체 후엽에 의해 방출된 호르몬이다. 혈관수축제 및 항이뇨 호르몬은 당해 분야에 알려져 있다.
- [0162] 또 다른 실시형태에서, 역전 제제는 비제한적인 예로서 미도드린(midodrine), 레보페드(Levophed), 노르에피네프린(norepinephrine), 페닐에프린(phenylephrine), 플루드로코티손(fludrocortisone), 오르바텐(Orvaten), 노르테라(Northera), 에페드린(ephedrine), 바즈컬렙(Vazculep), 드록시도파(droxidopa), 아코바즈(Akovaz), 비오르펜(Biorphen), 코페드라(Corphedra) 및 에머페트(Emerphed)로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-NPR1 항체 유도된 혈류역학적 효과의 치료를 위한 약제이다.
- [0163] 따라서, 본 개시내용은 항-NPR1 항체 치료의 혈류역학적 효과를 역전시킬 수 있는 면역글로불린 단백질(항체를 포함) 이외의 역전 제제를 포함한다. 예를 들면, 미도드린인 α 1-아드레날린성 수용체 효능제는 본원에서 실시 예 14에 기재된 것과 같이 R5381의 혈압 및 심박수 효과를 역전시킬 수 있다.
- [0164] **병용 요법**
- [0165] 소정의 실시형태에서, 대상체의 혈압을 관리하기 위해 하나 이상의 다른 알려진 저혈압 치료제와 병용하여 본 개시내용의 면역글로불린 단백질 및 다른 역전 제제를 사용하는 것이 고려된다. 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 NPR1 효능제, 바람직하게는 항-NPR1 항체와 병용되어 사용된다. 하나의 특정 실시 형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 이를 필요로 하는 대상체에서 효과적인 혈압 관리를 위해 R5381과 병용되어 사용된다.
- [0166] 병용 치료제는 본 개시내용의 면역글로불린 단백질 및 본 개시내용의 면역글로불린 단백질 또는 본 개시내용의 면역글로불린 단백질의 생물학적으로 활성인 단편과 유리하게 조합될 수 있는 임의의 추가 치료제를 포함할 수 있다. 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 혈압을 증가시키거나 혈압 강하와 연관된 효과를 해소하기 위해 사용된 하나 이상의 약물 또는 치료제와 상승적으로 조합될 수 있다.
- [0167] 본원에 사용된 것과 같이, 용어 "병용되어"는 추가의 치료학적으로 활성인 성분(들)이 본 개시내용의 면역글로불린 단백질 또는 다른 역전 제제의 투여 전에, 투여와 동시에 또는 투여 후에 투여될 수 있다. 용어 "병용되어"는 또한 면역글로불린 단백질 또는 다른 역전 제제 및 제2 치료제의 순차적인 투여 또는 동반 투여를 포함한다.
- [0168] 특정 실시형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질은 NPR1 효능제, 예를 들면 R5381과 병용되어 대상체에게 투여된다. 추가의 실시형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질 및 NPR1 효능제, 예를 들면 R5381은 하나의 조성물에서 함께 또는 하나 초과의 조성물에서 별개로 동시에(동일한 시간에) 대상체에게 투여된다. 더 추가의 실시형태에서, 본 개시내용의 면역글로불린 단백질 및 NPR1 효능제, 예를 들면 R5381은 순차적으로 대상체에게 투여되고, NPR1 효능제, 예를 들면 R5381에 본 개시내용의 면역글로불린 단백질이 뒤따른다.
- [0169] 추가의 치료학적으로 활성인 성분(들)은 본 개시내용의 면역글로불린 단백질 또는 다른 역전 제제의 투여 전에 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들면, 제1 성분이 제2 성분의 투여 전 1주, 72시간, 60시간, 48시간, 36시간, 24시간, 12시간, 6시간, 5시간, 4시간, 3시간, 2시간, 1시간, 30분 또는 30분 미만에 투여되면 제1 성분은 제2 성분 "전에" 투여되는 것으로 여겨질 수 있다. 다른 실시형태에서, 추가의 치료학적으로 활성인 성분(들)은 본 개시내용의 면역글로불린 단백질 또는 다른 역전 제제의 투여 후에 대상체에게 투여될 수 있다. 예를 들면, 제1 성분이 제2 성분의 투여 후 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간 또는 초과에 투여되면 제1 성분은 제2 성분 "후에" 투여되는 것으로 여겨질 수 있다. 더 다른 실시형태에서, 추가의 치료학적으로 활성인 성분(들)은 본 개시내용의 면역글로불린 단백질 또는 다른 역전 제제의 투여와 동시에 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0170] 본 개시내용의 목적을 위해 "동시" 투여는 서로의 약 30분 이하 내에 대상체에게 투여되는 단일 투여량 형태 또는 별개의 투여량 형태의 대상체에 대한 예를 들면 면역글로불린 단백질 또는 다른 역전 제제 및 추가의 치료학

적으로 활성인 성분의 투여를 포함한다. 별개의 투여량 형태로 투여되면, 각각의 투여량 형태는 동일한 경로를 통해 투여될 수 있고(예를 들면, 면역글로불린 단백질 또는 다른 역전 제제 및 추가의 치료학적으로 활성인 성분 둘 다는 정맥내 등으로 투여될 수 있음); 대안적으로, 각각의 투여량 형태는 상이한 경로를 통해 투여될 수 있다(예를 들면, 면역글로불린 단백질 또는 다른 역전 제제는 정맥내로 투여될 수 있고, 추가의 치료학적으로 활성인 성분은 경구로 투여될 수 있음). 임의의 사건에서, 단일 투여량 형태로, 동일한 경로에 의해 별개의 투여량 형태로 또는 상이한 경로에 의해 별개의 투여량 형태로 성분을 투여하는 것은 모두 본 개시내용의 목적을 위해 "동시 투여"인 것으로 여겨진다. 본 개시내용의 목적을 위해, 추가의 치료학적으로 활성인 성분의 투여 "전에", 투여와 "동시에" 또는 투여 "후에" 면역글로불린 단백질 또는 다른 역전 제제의 투여(이들 용어가 본원에서 상기에 정의된 것처럼)는 추가의 치료학적으로 활성인 성분과 "병용된" 면역글로불린 단백질 또는 다른 역전 제제의 투여인 것으로 여겨진다.

[0171] 본 개시내용은 본 개시내용의 면역글로불린 단백질 또는 다른 역전 제제가 본원에서 어딘 가에 기재된 것과 같은 하나 이상의 추가의 치료학적 활성 성분(들)과 공동제형화된 약제학적 조성물을 포함한다.

면역글로불린 단백질의 진단학적 용도

[0173] 본 개시내용의 구제 제제는 예를 들면 진단 목적을 위해 샘플에서 항-NPR1 항체를 검출하고/하거나 측정하기 위해 사용될 수 있다. 항-NPR1 항체에 대한 예시적인 진단 검정은 예를 들면 환자로부터 얻은 샘플을 본 개시내용의 구제 제제와 접촉하는 단계를 포함할 수 있고, 구제 제제는 검출 가능한 표지 또는 리포터 분자로 표지되거나 환자 샘플로부터 항-NPR1 항체를 선택적으로 단리하기 위해 포획 리간드로서 사용된다. 대안적으로, 비표지된 구제 제제는 자체가 검출 가능하게 표지된 2차 항체와 조합되어 진단 분야에서 사용될 수 있다. 검출 가능한 표지 또는 리포터 분자는 방사선 동위원소, 예컨대 ³H, ¹⁴C, ³²P, ³⁵S 또는 ¹²⁵I; 형광 또는 화학발광 모이어티, 예컨대 플루오레세인 이소티오시아네이트 또는 로다민; 또는 효소, 예컨대 알칼리 포스파타제, β-갈락토시다제, 겨자무 과산화효소 또는 루시퍼라제일 수 있다. 샘플에서 항-NPR1 항체를 검출하거나 측정하기 위해 사용될 수 있는 특정 예시적인 검정은 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA), 방사면역검정(RIA) 및 형광 활성화 세포 분류(FACS)를 포함한다.

[0174] 본 개시내용에 따른 항-NPR1 항체 진단 검정에서 사용될 수 있는 샘플은 대상체에게 항-NPR1 항체 단백질 또는 이의 단편을 투여한 후 이의 검출 가능한 분량을 함유하는 환자로부터 얻을 수 있는 임의의 조직 또는 유체 샘플을 포함한다. 일반적으로, 건강한 환자(예를 들면, 항-NPR1 항체를 받지 않은 환자)로부터 얻은 특정한 샘플에서의 항-NPR1 항체 단백질의 수준은 초기에 항-NPR1 항체의 기준선 수준 또는 표준 수준을 확립하기 위해 측정될 것이다. 이후, 항-NPR1 항체의 이 기준선 수준은 항-NPR1 항체가 투여된 것으로 의심되는 개체로부터 얻은 샘플에서 측정된 항-NPR1 항체의 수준에 대해 비교될 수 있다.

[0175] 항-NPR1 항체 단백질에 특이적인 면역글로불린 단백질은 추가 표지 또는 모이어티를 함유하지 않을 수 있거나, 이것은 N-말단 또는 C-말단 표지 또는 모이어티를 함유할 수 있다. 일 실시형태에서, 표지 또는 모이어티는 비오틴이다. 결합 검정에서, (있다면) 표지의 위치는 웹타이드가 결합된 표면에 대한 웹타이드의 배향 결정할 수 있다. 예를 들면, 표면이 아비딘으로 코팅되면, N-말단 비오틴을 함유하는 웹타이드는 웹타이드의 C-말단 부분이 표면에 원위이도록 배향될 것이다.

실시예

[0177] 하기 실시예는 본 개시내용의 방법 및 조성물을 어떻게 제조하고 사용하는지의 완전한 개시내용 및 설명을 당업자에게 제공하도록 기재되어 있고, 본 발명자들이 이들의 발명으로서 여기는 것의 범위를 제한하도록 의도되지는 않는다. 사용된 숫자(예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하도록 노력이 이루어지지만, 일부 실험 오차 및 편차가 처리되어야 한다. 달리 표시되지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도이고, 실온은 약 25°C이고, 압력은 대기압 또는 대기압 근처이다.

[0178] 실시예 1: 나트륨 배설 촉진 웹타이드 수용체 1(NPR1)에 특이적으로 결합하는 효능제 항체에 대한 인간 항체의 생성

항-R5381 항체의 생성

[0180] 인간 면역글로불린 중쇄 및 카파 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA를 포함하는 VELOCIMMUNE® 마우스에서 항-NPR1 항체 단백질에 대한 인간 항체를 생성하였다. 마우스를 항-NPR1 항체 R5381(본원에서 어딘 가에 기재됨)로 면역화하였다.

- [0181] 항체 면역 반응을 항-R5381 특이적 면역검정에 의해 모니터링하였다. 원하는 면역 반응이 달성될 때, 비장세포를 수화하고, 생존능력을 보존하고 하이브리도마 세포주를 생성하도록 마우스 골수종 세포와 융합하였다. 항-R5381 특이적 항체를 생성하는 세포주를 확인하도록 하이브리도마 세포주를 선별하고 선택하였다. 몇몇 항-R5381 키메라 항체(즉, 인간 가변 도메인 및 마우스 불변 도메인을 보유하는 항체)를 얻기 위해 세포주를 사용하였다.
- [0182] 미국 특허 제7,582,298호(본원에 그 전문이 참고로 구체적으로 포함됨)에 기재된 것과 같이 골수종 세포에 대한 융합 없이 항원-양성 마우스 B 세포로부터 항-R5381 항체를 또한 직접적으로 단리하였다. 이 방법을 사용하여, 몇몇 완전 인간 항-R5381 항체(즉, 인간 가변 도메인 및 인간 불변 도메인을 보유하는 항체)를 얻었다.
- [0183] 상기에 개시된 것과 같이 생성된 예시적인 항체는 mAb36312 및 mAb36313으로서 지정되었다.
- [0184] '1아암' 항-R5381 항체의 생성
- [0185] 1가 또는 '1아암' 항체 또는 항원 결합 분자를 생성하기 위해 상기에 생성된 것과 같은 선택된 항체를 사용하였다. 이러한 1가 항원 결합 분자는 HCVR 및 LCVR을 포함하는 단일 R5381 결합 부분을 포함한다. 전장 중쇄, 전장 경쇄 및 추가 Fc 도메인 폴리펩타이드를 포함하는 1가 항체를 표준 방법론(WO2010151792호 참조)을 사용하여 제작하였고, 여기서 중쇄 불변 영역은 적어도 2개의 아미노산에 의해 Fc 도메인 폴리펩타이드와 상이하다. 이러한 변형은 1가 항체의 정제에서 유용하다(WO2010151792호 참조).
- [0186] IgG4 Fc 도메인을 갖는 예시된 1아암 항체를 제조하고, REGN9035 및 REGN9037로서 지정되었다.
- [0187] 본 실시예의 방법에 따라 생성된 예시적인 항체의 생물학적 특성은 하기에 제시된 실시예에 자세히 기재되어 있다.
- [0188] **실시예 2: 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열**
- [0189] 표 1은 본 개시내용의 선택된 항-R5381 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 및 CDR의 아미노산 서열 식별자를 제시한다.
- 표 1: 아미노산 서열 식별자
- | 항체 지정 | 서열 번호 | | | | | | | |
|----------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| | HCVR | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
| mAb36312 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 |
| mAb36313 | 22 | 24 | 26 | 28 | 30 | 32 | 34 | 36 |
- [0190]
- [0191] 상응하는 핵산 서열 식별자는 표 2에 제시되어 있다.
- 표 2: 핵산 서열 식별자
- | 항체 지정 | 서열 번호 | | | | | | | |
|----------|-------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|
| | HCVR | HCDR1 | HCDR2 | HCDR3 | LCVR | LCDR1 | LCDR2 | LCDR3 |
| mAb36312 | 1 | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 | 13 | 15 |
| mAb36313 | 21 | 23 | 25 | 27 | 29 | 31 | 33 | 35 |
- [0192]
- [0193] 본원에서 지칭되는 항체는 통상적으로 완전 인간 가변 영역(들)을 갖지만, 인간 또는 마우스 불변 영역을 가질 수 있다. 당업자가 이해하는 것처럼, 특정한 Fc 아이소타입을 갖는 항체는 상이한 Fc 아이소타입을 갖는 항체로 전환될 수 있지만(예를 들면, 마우스 IgG1 Fc를 갖는 항체는 인간 IgG4 등을 갖는 항체로 전환될 수 있음), 임의의 사건에서, 표 2에 기재된 숫자 식별자로 표시된 가변 도메인(CDR을 포함)은 동일하게 있고, 항원에 대한 결합 특성은 Fc 도메인의 성질과 무관하게 동일하거나 실질적으로 유사한 것으로 예상된다. 소정의 실시형태에서, 마우스 IgG1 Fc를 갖는 선택된 항체는 인간 IgG4 Fc를 갖는 항체로 전환된다. 일 실시형태에서, IgG4 Fc 도메인은 US 20100331527호에 개시된 것과 같은 2개 이상의 아미노산 변경을 포함한다. 일 실시형태에서, 인간 IgG4 Fc는 이항체 안정화를 촉진하도록 헌지 영역에서의 세린에서 프롤린 돌연변이(S108P)를 포함한다. 달리 표시되지 않는 한, 하기 실시예에 사용된 모든 항체는 인간 IgG4 아이소타입을 포함한다.
- [0194] 서열 번호 2/10의 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍을 포함하는 예시적인 2가 항체는 REGN6580이다. REGN6580은 서열 번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0195] 서열 번호 22/30의 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍을 포함하는 예시적인 2가 항체는 REGN6581이다. REGN6581은 서열 번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열 번호 40의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0196] 선택된 항-R5381 항체는 항-R5381 결합 아암 및 추가 Fc 폴리펩타이드(또는 절두된 중쇄)를 포함하는 1아암 항체의 작제에 사용되었다. 소정의 실시형태에서, 항-R5381 결합 아암은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 아이소타입 또는 이의 변이체의 중쇄 불면 영역을 포함한다. 일 실시형태에서, 추가 Fc 폴리펩타이드는 IgG1 아이소타입 또는 이의 변이체를 갖는다. 일 실시형태에서, 추가 Fc 폴리펩타이드는 IgG4 아이소타입 또는 이의 변이체를 갖는다.

[0197] 표 3A, 표 3B 및 표 3C는 선택된 1아암 항체의 HCVR, LCVR, CDR 및 중쇄 및 경쇄 서열 식별자를 열거한다.

표 3A: 선택된 항체의 가변 영역 및 CDR의 아미노산 서열

항체 식별자	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
REGN9035	2	4	6	8	10	12	14	16
REGN9037	22	24	26	28	30	32	34	36

[0198]

표 3B: 선택된 항체의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열 식별자

항체 식별자	항-R5381 중쇄	절두된 중쇄	경쇄
REGN9035	서열 번호 42	서열 번호 46	서열 번호 20
REGN9037	서열 번호 44	서열 번호 46	서열 번호 40

[0199]

표 3C: 선택된 항체의 중쇄 및 경쇄 핵산 서열 식별자

항체 식별자	항-R5381 중쇄	절두된 중쇄	경쇄
REGN9035	서열 번호 41	서열 번호 45	서열 번호 19
REGN9037	서열 번호 43	서열 번호 45	서열 번호 39

[0200]

[0201] 달리 표시되지 않는 한, 하기 실시예에 사용된 모든 항체는 인간 IgG4 아이소타입을 포함한다.

실시예 3: 선택된 항체의 Biacore 결합 역학

[0203]

Biacore T200 바이오센서에 기초하여 실시간 표면 플라즈몬 공명(SPR)을 사용하여 H2aM22033N(R5381의 모 하이브리도마)에 대한 선택된 항-R5381 항체(mAb)의 결합에 대한 평형 해리 상수(K_D)를 결정하였다. 25°C 및 37°C에서 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA 및 0.05% v/v 계면활성제 Tween-20, pH 7.4(HBS-ET) 런닝 완충액에서 모든 결합 연구를 수행하였다. H2aM22033N을 포획하기 위해 항-마우스 Fc 특이적 항체(GE Healthcare, #BR100838)와의 아민 커플링에 의해 Biacore CM5 센서 칩 표면을 처음에 유도체화하였다. HBS-ET 런닝 완충액에서 준비된 mAb의 상이한 농도(100 nM - 3.7 nM, 3배 연속 희석)를 3분 동안 50 μ l/분의 유속에서 주입하였다. H2aM22033N에 결합된 상이한 mAb의 해리를 10분 동안 HBS-ET 런닝 완충액에서 모니터링하였다. 각각의 사이클의 끝에서, 10 mM 글리신-HCl, pH 1.5의 60초 주입을 사용하여 H2aM22033N 포획 표면을 재생하였다. Scrubber 2.0c 곡선-일치 소프트웨어를 사용하여 질량 수송 제한으로 1:1 결합 모델로 실시간 결합 센서그램을 일치시킴으로써 결합 속도(k_a) 및 해리 속도(k_d)를 결정하였다. 결합 해리 평형 상수(K_D) 및 해리 반감기($t_{1/2}$)는 하기로서 역학 속도로부터 계산되었다:

$$K_D (M) = \frac{kd}{ka}, \quad \text{및} \quad t_{1/2} (\text{분}) = \frac{\ln(2)}{60 * kd}$$

[0204]

[0205] 25°C 및 37°C에서 본 개시내용의 H2aM22033N에 결합하는 상이한 mAb에 대한 결합 역학 매개변수는 각각 하기 표 4 및 표 5에 기재되어 있다.

표 4: 25°C에서 H2aM22033N에 결합하는 상이한 mAb의 결합 역학 매개변수

포획된 mAb	주입된 분석물질	주입된 분석물질의 작제물 상세 내용	mAb 포획 수준(RU)	100 nM 결합된 Ag(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/초)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (분)
H2aM22033N	REGN6580	2가 hIgG4	179 ± 1.4	110	1.78E+0 5	9.42E- 05	5.28E- 10	123
	REGN9035	1가 hIgG4	148 ± 0.7	47	7.51E+0 4	1.32E- 04	1.76E- 09	87
	REGN6712	Fab	174 ± 0.3	60	8.50E+0 4	2.47E- 04	2.90E- 09	47
	REGN6581	2가 hIgG4	177 ± 0.5	65	1.27E+0 5	7.11E- 05	5.61E- 10	163
	REGN9037	1아암 hIgG4	144 ± 0.5	31	6.51E+0 4	9.89E- 05	1.52E- 09	117
	REGN6713	Fab	173 ± 0.5	39	5.91E+0 4	1.66E- 04	2.81E- 09	70

[0206]

표 5: 37°C에서 H2aM22033N에 결합하는 상이한 mAb의 결합 역학 매개변수

포획된 mAb	주입된 분석물질	주입된 분석물질의 작제물 상세 내용	mAb 포획 수준(RU)	100 nM 결합된 Ag(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/초)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (분)
H2aM22033 N	REGN6580	2가 hIgG4	217 ± 0.7	160	4.64E+ 05	4.24E- 04	9.14E- 10	27
	REGN9035	1가 hIgG4	166 ± 1.6	81	1.49E+ 05	8.60E- 04	5.78E- 09	13
	REGN6712	Fab	210 ± 0.4	85	2.18E+ 05	1.09E- 03	5.02E- 09	11
	REGN6581	2가 hIgG4	215 ± 0.6	104	3.17E+ 05	3.67E- 04	1.16E- 09	31
	REGN9037	1아암 hIgG4	158 ± 0.6	55	1.10E+ 05	7.38E- 04	6.71E- 09	16
	REGN6713	Fab	209 ± 0.5	66	1.64E+ 05	8.09E- 04	4.95E- 09	14

[0207]

실시예 4: 상이한 항-R5381 항체 사이의 교차 경쟁

[0208]

Octet HTX 바이오센서 플랫폼(Pall ForteBio Corp.)에서 실시간, 무표지 생물층 간섭측정(BLI) 검정을 사용하여 항-R5381 항체(mAb) 사이의 결합 경쟁을 결정하였다. 플레이트를 1000 rpm의 속도로 진탕시키면서 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA 및 0.05% v/v 계면활성제 Tween-20, 1 mg/mL BSA, pH 7.4(HBS-EBT) 완충액에서 25°C에서 전체 실험을 수행하였다. 2개의 mAb가 R5381에서 이의 각각의 에피토프에 대한 결합에 대해 서로 경쟁할 수 있는지를 평가하기 위해, R5381의 ~ 0.47 nm을 처음에 R5381의 1.7 μg/mL 용액을 함유하는 웰에서 1분 동안 바이오센서 선단을 액침함으로써 항-인간 항체(AHC) 코팅된 Octet 바이오센서 선단(Fortebio Inc, # 18-5064)에서 포획하였다. 이후, R5381 포획된 바이오센서 선단을 mAb-1의 50 μg/mL 용액을 함유하는 웰로 4분 동안 침지함으로써 제1 항-R5381 mAb(후속하여 mAb-1로 지칭됨)로 포화시켰다. 이후, 바이오센서 선단을 후속하여 제2 항-R5381 mAb(후속하여 mAb-2로 지칭됨)의 50 μg/mL 용액을 함유하는 웰로 3분 동안 침지하였다. 바이오센서 선단을 모든 실험 단계 사이에서 HBS-ETB 완충액에서 세척하였다. 실시간 결합 반응을 전체 실험 과정 동안 모니터링하고, 모든 단계의 종료 시 결합 반응을 기록하였다. mAb-1과 예비복합체화된 R5381에 대한 mAb-2 결합의 반응을 비교하고, 상이한 항-R5381 mAb의 경쟁적 거동/비경쟁적 거동을 결정하였다. 항-R5381 mAb 사이의 교차 경쟁이 있었다.

[0210] 실시예 5: R5381에 결합하는 항-R5381 항체의 pH 민감도

[0211] 실시간 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기반 Biacore 4000 바이오센서를 사용하여 pH 7.4, pH 6.5, pH 6.0 및 pH 5.0 완충액 중의 상이한 항-R5381 mAb에 대한 해리 속도 상수(k_d)를 결정하였다. 37°C에서 4개의 런닝 완충액, (i)

PBS, 0.05% v/v 계면활성제 Tween-20, pH 7.4(PBS-T-pH 7.4), (ii) PBS, 0.05% v/v 계면활성제 Tween-20, pH 6.5(PBS-T-pH 6.5), (iii) PBS, 0.05% v/v 계면활성제 Tween-20, pH 6.0(PBS-T-pH 6.0) 및 (iv) PBS, 0.05% v/v 계면활성제 Tween-20, pH 5.0(PBS-T-pH 5.0)을 사용하여 모든 결합 연구를 수행하였다. H2aM22033N(R5381의 모 하이브리도마)을 포획하기 위해 항-마우스 Fc 특이적 항체(GE Healthcare, # BR100838)와의 아민 커플링에 의해 Biacore CM5 센서 칩 표면을 처음에 유도체화하였다. PBS-T-pH7.4 완충액에서 준비된 항-R5381 mAb의 상이한 농도(100 nM - 11.11 nM, 3배 연속 희석)를 3분 동안 30 $\mu\text{l}/\text{분}$ 의 유속에서 주입한 후, 10분 동안 PBS-T-pH 7.4, PBS-T-pH 6.5, PBS-T-pH 6.0 또는 PBS-T PBS-T-pH 5.0 런닝 완충액에서 결합된 항-R5381 mAb를 해리 시켰다.

[0212] Scrubber 2.0c 곡선-일치 소프트웨어를 사용하여 1:1 결합 모델로 실시간 결합 센서그램을 일치시킴으로써 4개의 pH 런닝 완충액에서의 해리 속도 상수(k_d)를 결정하였다. 해리 반감기($t_{1/2}$)는 하기로서 k_d 값으로부터 계산되었다:

$$t_{1/2} (\text{분}) = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

[0213]

[0214] PBS-T, pH 7.4 중의 H2aM22033N에 대한 선택된 항-R5381 mAb 결합, 이어서 37°C에서의 본 개시내용의 PBS-T-pH 7.4, PBS-T-pH 6.5, PBS-T-pH 6.0 또는 PBS-T-pH 5.0 중의 해리에 대한 k_d 및 $t_{1/2}$ 값은 각각 표 6, 표 7, 표 8 및 표 9에 기재되어 있다.

표 6: 37°C에서의 PBS-T-pH 7.4 완충액 중의 H2aM22033N에 대한 선택된 항-R5381 mAb의 결합 및 PBS-T-pH 7.4 완충액 중의 해리

포획된 mAb	주입된 분석물질	mAb 포획 수준(RU)	100 nM 결합된 Ag(RU)	k_d (1/초)	$t_{1/2}$ (분)
H2aM22033N	REGN9035	159 ± 0.9	84	9.96E-04	12
	REGN9037	155 ± 1	55	8.67E-04	13

[0215]

표 7: 37°C에서의 PBS-T-pH 7.4 완충액 중의 H2aM22033N에 대한 선택된 항-R5381 mAb의 결합 및 PBS-T-pH 6.5 완충액 중의 해리

포획된 mAb	주입된 분석물질	mAb 포획 수준(RU)	100 nM 결합된 Ag(RU)	k_d (1/초)	$t_{1/2}$ (분)
H2aM22033N	REGN9035	173 ± 0.4	97	1.42E-03	8
	REGN9037	172 ± 0.3	63	7.92E-04	15

[0216]

표 8: 37°C에서의 PBS-T-pH 7.4 완충액 중의 H2aM22033N에 대한 선택된 항-R5381 mAb의 결합 및 PBS-T-pH 6.0 완충액 중의 해리

포획된 mAb	주입된 분석물질	mAb 포획 수준(RU)	100 nM 결합된 Ag(RU)	k_d (1/초)	$t\frac{1}{2}$ (분)
H2aM22033N	REGN9035	171 ± 0.8	95	2.94E-03	3.9
	REGN9037	168 ± 0.4	61	8.11E-04	14

[0217]

표 9: 37°C에서의 PBS-T-pH 7.4 완충액 중의 H2aM22033N에 대한 선택된 항-R5381 mAb의 결합 및 PBS-T-pH 5.0 완충액 중의 해리

포획된 mAb	주입된 분석물질	mAb 포획 수준(RU)	100 nM 결합된 Ag(RU)	k_d (1/초)	$t\frac{1}{2}$ (분)
H2aM22033N	REGN9035	165 ± 0.5	84	1.97E-02	0.6
	REGN9037	162 ± 0.3	54	6.64E-04	17

[0218]

pH 7.4, pH 6.5, pH 6.0 및 pH 5.0 완충액 중의 R5381 항-이디오타입 단일클론 항체 REGN9035 및 REGN9037의 해리 반감기($t\frac{1}{2}$)의 비교는 표 1에 도시되어 있다.

[0220]

실시예 6: R5381 유도된 NPR1 활성화의 억제

[0221]

인간 NPR1(hNPR1)의 조절을 평가하기 위해, C-말단 myc 및 FLAG 태그를 갖는 hNPR1을 안정하게 발현하는 안정한 HEK293 세포주를 개발하였다. 세포주는 hNPR1, HEK293/hNPR1.MycDDK HS의 높은 발현에 대해 분류되거나 HEK293/hNPR1로서 약칭되고, 10% FBS, NEAA, 펜/스트렙/글루트 및 500 µg/mL의 G418 세설판트를 함유하는 DMEM에서 유지되었다. NPR1에 대한 리간드의 결합은 수용체의 구아닐레이트 시클라제 도메인을 활성화하고, 이는 GTP로부터 cGMP의 생성을 촉매화한다(Zois, et al., 2014 *Nature* 11(7):403-412). NPR1 활성을 평가하도록 cGMP 수준을 측정하는 균일한 시간 분해 형광(HTRF: time-resolved fluorescence) 검정을 사용되었다.

[0222]

cGMP 검정을 위해, HEK293/hNPR1 세포를 50 µL의 완전한 성장 배지를 갖는 20,000개의 세포/웰에서의 96웰 절반면적 플레이트에서 플레이팅하고, 밤새 배양하였다. 다음날, 10 µL의 희석 완충액(0.1% FBS를 갖는 OptiMEM)으로 배지를 대체한 후 희석 완충액에서 제조된 임의의 효능제를 갖지 않는 샘플(하기 표 10 참조)을 포함하는 농도의 범위에서 10 µL의 2X 효능제를 첨가함으로써 hNPR1의 활성화를 유도하였다. R5381 유도된 hNPR1 활성화의 역전을 평가하기 위해, 세포를 희석 완충액에서 제조된 농도의 범위(표 10 참조)에서 10 µL의 2x 항-R5381로 처리한 후, 희석 완충액 단독에서 제조되거나 40 pM ANP 또는 80 pM BNP를 함유하는 10 µL의 70 nM R5381을 첨가하였다. 처리된 세포를 37°C에서 30분 동안 항온처리하였다. 제조사의 프로토콜(#62GM2PEH)에 따라 Cisbio로부터의 cGMP HTRF 키트를 사용하여 HTRF 검정을 수행하였다. 간단히, cGMP 표준 곡선에 대해 20 µL의 1x cGMP 연속 희석액을 빙 웰에 첨가하였다. 시험 물품을 갖는 샘플에서 cGMP 농도를 측정하기 위해, 용해 완충액에서 희석된 크립테이트와 접합된 10 µL의 cGMP-d2 및 10 µL의 항-cGMP 항체를 암소에서 실온에서 60분 동안 각각의 웰에 순서로 첨가하였다. EnVision 다중표지 플레이트 판독기(여기 = 320 nm, 방출 = 620 nm/665 nm, Perkin Elmer)를 사용하여 형광 강도를 측정하고, 형광 공명 에너지 이동(FRET) 비는 하기에 기재된 식을 이용하여 계산되었다:

$$FRET \% = \frac{665 \text{ nm} \text{에서의 신호}}{620 \text{ nm} \text{에서의 신호}} \times 10^4$$

[0223]

FRET 비는 cGMP 표준 곡선에 따라 cGMP 농도로 변환되고, GraphPad Prism 8을 사용하여 시험된 효능제에 대한 절반 최대 유효 농도(EC₅₀) 값 및 시험된 길항제에 대해 절반 최대 억제 농도(IC₅₀) 값을 얻기 위해 11점 용량-반응 곡선 위에서 4-매개변수 로지스틱 식을 이용하여 분석하였다. 최대 억제는 하기에 기재된 식에 의해 계산되었다:

$$\% \text{ 최대 억제} = \frac{[cGMP, nM]_{70nM REGN5381} - [cGMP, nM]_{\text{시험 항체}}}{[cGMP, nM]_{70nM REGN5381} - [cGMP, nM]_{\text{기준선}}} \times 100 \%$$

[0225]

[0226] 이 식에서, $[cGMP, nM]$ 기준선, $[cGMP, nM]$ 시험 항체 및 $[cGMP, nM]_{70 nM R5381}$ 은 희석 완충액, 가장 높은 농도의 항-R5381 항체 및 각각 40 pM ANP 또는 80 pM BNP를 갖거나 갖지 않는 70 nM R5381로 처리된 세포로부터의 cGMP 농도 값이다.

표 10: NPR1 cGMP 측정에서 사용된 시약의 농도

NPR1 효능제	농도 범위 [nM]
ANP	2 - 0.0020
BNP	4 - 0.0030
R5381	300 - 0.20
항-R5381(±R5381, ±ANP 또는 ±BNP)	300 - 0.20

[0227]

결과

[0229] R5381은 ANP 또는 BNP의 존재 또는 부재 하에 1.78 내지 31.2 nM의 EC50 값으로 cGMP 축적을 자극하기 위해 HEK293/hNPR1 세포에서 발현된 hNPR1을 활성화하였고, 여기서 항체를 갖지 않은 cGMP의 기준 수준은 ANP 또는 BNP의 일정한 양으로 인해 증가하였다(하기 표 11). REGN1945인 아이소타입 대조군은 희석 완충액에서 임의의 측정 가능한 활성화를 나타내지 않았다. ANP 및 BNP에 대한 EC50 값은 이 측정에서 cGMP 표준 곡선과 비교하여 높은 농도에서 정량 한계로 인해 계산되지 않았다.

[0230]

모든 1아암 및 2가 항-R5381 항체는 15.5 내지 57.5 nM의 IC50 값 및 97% 내지 106%의 최대 억제로 40 pM ANP 또는 80 pM BNP의 존재 또는 부재 하에 70 nM R5381 유도된 hNPR1 활성화를 차단하였다(표 11). REGN1945 인 아이소타입 대조군은 ANP 또는 BNP의 존재 또는 부재 하에 70 nM R5381 유도된 hNPR1 활성화의 어떠한 유의미한 억제를 나타내지 않았다(표 11).

[0231]

종합하면, 모든 항-R5381 항체는 cGMP 축적에 의해 측정된 것과 같이 내인성 리간드의 존재 또는 부재 하에 R5381 유도된 hNPR1 활성화의 유의미한 억제를 나타냈다.

표 11. 1아암 및 2가 항-R5381 항체는 내인성 리간드의 존재 또는 부재 하에 cGMP 축적에 의해 측정된 것과 같이 R5381 유도된 인간 NPR1 활성화를 유의미하게 억제하였다

R5381 ± 리간드, EC50 [M]	리간드 무	ANP		BNP	
		40pM ANP		80pM BNP	
		3.12E-08	2.07E-08	1.78E-09	
70 nM에서의 항- R5381	리간드 무	40pM ANP		80pM BNP	
	IC50 [M]	최대 억제(%)	IC50 [M]	최대 억제(%)	IC50 [M]
	REGN6580	1.55E-08	99	2.23E-08	102
REGN6581	1.80E-08	100	2.06E-08	104	3.50E-08
REGN9035	4.60E-08	100	2.66E-08	104	4.13E-08
REGN9037	3.63E-08	99	1.76E-08	101	3.81E-08
아이소타입 대조군	ND	27	ND	28	ND
					6

ND: 결정되지 않음; Max Inh.: 최대 억제.

[0232]

항-R5381 항체는 내인성 리간드의 부재 하에 또는 40 pM ANP 또는 80 pM BNP의 존재 하에 R5381 유도된 hNPR1 활성화를 억제하는 것으로 발견되었다. 세포를 증가하는 농도의 ANP, BNP, R5381 또는 아이소타입 대조군 (REGN1945) 단독 또는 일정한 농도의 ANP 또는 BNP의 존재 또는 부재 하에 70 nM R5381과 항온처리하였다. 형광 강도를 EnVision(여기 = 320 nm, 방출 = 620 nm/665 nm)을 사용하여 검출하고, FRET 비 및 cGMP 농도는 실험 절차에 기재된 것처럼 계산되었다.

[0233]

[0234]

실시예 7. 차단 ELISA 검정

[0235]

PBS 중의 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서의 hNPR1.ecto.mmh(이들 중 아미노산 1-441: NM_000906.3의 번역으로부터의 인간 NPR1 아미노산 G32-E473 및 아미노산 442-469: Myc-Myc-헥사히스티딘 태그; 서열 번호 47)를 96웰 미량액가 플레이트에 코팅하고, 4°C에서 밤새 항온처리하였다. 후속하여, 비특이적 결합 부위를 PBS(검정 완충액) 중의 BSA의 0.5%(w/v) 용액을 사용하여 차단하였다. 항-R5381 mAb 및 아이소타입 대조군 mAb를 검정 완충액에서 500 nM에서 8.46pM으로 3배 연속 희석하였다. 96웰 희석 플레이트에서, 285 pM 비오틴-R5381을 3배 연속 희석된 항체와 혼합하고, 실온(RT)에서 1시간 동안 예비결합하게 하였다. 항-R5381 및 아이소타입 대조군 mAb의 최종 농도는 333.33 nM 내지 5.64 pM의 범위이고, 비오틴-R5381의 최종 온도는 95 pM였다. RT에서의 1시간 항온처리 후, 예비결합 반응 혼합물을 hNPR1.ecto.mmh로 코팅된 미량액가 플레이트로 옮겼다. 미량액가 플레이트를 RT에서 1시간 동안 항온처리하고, 이후 플레이트 세척 용액으로 세척하였다. 폴리-HRP 스트렙타비딘 단백질을 사용하여 비오틴-R5381 결합을 검출하였다. 플레이트를 1시간 동안 RT에서 검출 단백질과 항온처리하고, 이후 플레이트 세척 용액으로 세척하였다. 제조사의 추천된 절차에 따라 TMB 비색 기질로 검정 플레이트를 현상시켰다.

[0236]

각각의 웰에 대한 450 nm에서의 흡광도를 기록하고, 항체의 농도의 함수로서 작도하였다. 11점 용량 반응 곡선 위에서 4개 매개변수 로지스틱 식을 이용하여 GraphPad Prism 소프트웨어에서 데이터를 분석하고, IC₅₀ 값을 계산하였다. 부동화된 hNPR1.ecto.mmh에 대한 비오틴-R5381의 50% 결합을 감소시키는 데 필요한 항체의 농도로서 정의된 계산된 IC₅₀ 값은 차단 효력의 표시자로서 사용되었다. 가장 높은 항-R5381 농도에서의 퍼센트 차단은 검정의 기준선에 대해 NPR1에 대한 비오틴-R5381의 결합을 차단하는 항체의 능력의 표시자로서 계산되었다. 비오틴-R5381의 0% 결합으로서 정의된 검정의 기준선 신호는 검정 완충액 단독을 갖는 웰에서 폴리-HRP 스트렙타비딘 결합으로부터의 OD_{450 nm} 판독으로부터 결정되었다. 항-R5381의 부재 하의 95 pM 비오틴-R5381의 결합 신호는 100% 결합 또는 0% 차단으로서 정의되었다.

[0237]

결과

[0238]

차단 ELISA 검정을 사용하여 인간 NPR1에 대한 비오틴-R5381 결합을 차단하는 항-R5381 항체의 능력을 평가하였다. 차단 결과는 하기 표 12에 요약되어 있다. 모든 항체에 대해 시험된 가장 높은 항체 농도(333.33 nM)에서 계산된 퍼센트 봉쇄는 보고된다. REGN9035는 2.04 nM의 IC₅₀[M]으로 95 pM 비오틴-R5381의 결합을 차단하였고, 가장 높은 시험된 농도에서 99.29% 봉쇄를 나타냈다. REGN9037은 2.40 nM의 IC₅₀[M]으로 95 pM 비오틴-R5381의 결합을 차단하였고, 가장 높은 시험된 농도에서 99.05% 봉쇄를 나타냈다.

[0239]

항-R5381 2가 항체 REGN6580 및 REGN6581은 각각 381 pM 및 543 pM의 IC₅₀[M] 값으로 95 pM 비오틴-R5381 결합을 차단하고, mAb 둘 다는 가장 높은 농도에서 100% 봉쇄를 나타냈다. 아이소타입 대조군 mAb(REGN1945)는 동일한 검정 조건 하에 비오틴-R5381의 어떠한 차단을 나타내지 않았다.

표 12: hNPR1.ecto.mmh(REGN3037)에 대한 95 pM 비오틴-R5381 결합을 차단하는 선택된 항-R5381 항체에 대한 IC₅₀[M] 값의 요약

	ELISA 플레이트 코팅된 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hNPR1.ecto.mmh에 대한 95pM 비오틴-R5381 결합을 차단하는 항-R5381(단일 아암 및 2가) mAb	
REGN#	IC ₅₀ [M]	333.33 nM 항체에 의한 % 차단
REGN9035	2.04E-09	99.29
REGN6580	3.81E-10	100
REGN9037	2.40E-09	99.05
REGN6581	5.43E-10	100
아이소타입 대조군	계산되지 않음	차단 무

100% 차단 = 검정 완충액 단독(비오틴-R5381 결합 무)에서의 HRP 접합된 2차 단백질을 갖는 웰의 OD_{450 nm} 값

0% 차단 = 비오틴-R5381(항-R5381 없음)의 일정한 양의 존재 하의 검정 완충액에서의 HRP 접합된

2차 단백질을 갖는 웰의 OD_{450 nm} 값.

[0240]

$$\text{최대 \% 차단} = 100 - \frac{[\text{실험 신호(항-REGN5381 + 비오틴-REGN5381)} - \text{배경 신호(완충액 단독)}]}{[\text{최대 신호(비오틴-REGN5381 단독)} - \text{배경 신호(완충액 단독)}]} \times 100$$

[0241]

[0242] 실험 신호 = 시험된 항-R5381 농도에서 관찰된 비오틴-R5381 결합의 OD₄₅₀

[0243]

최대 신호 = 항-R5381의 부재 하의 95 pM 비오틴-R5381 결합의 OD₄₅₀

[0244]

배경 신호 = 검정 완충액 단독 대조군에서의 폴리-HRP 스트렙타비딘 결합의 OD₄₅₀ 검정

[0245]

ELISA 기반 방법은 1아암의 항-R5381 mAb, REGN9035 및 REGN9037의 농도의 범위의 존재 하의 ELISA 플레이트 코팅된 hNPR1.ecto.mmh(서열 번호 47)에 대한 비오틴-R5381 결합의 차단을 평가하기 위해 사용되었다. 대조군으로서, 각각의 2가 mAb REGN6580 및 REGN6581 및 아이소타입 대조군 mAb를 또한 시험하였다. 가장 높은 mAb 농도 (333.33 nM)에서의 퍼센트 차단 및 mAb의 차단 IC₅₀[M] 값은 상기 표 12에 표로 되어 있다. 몰농도[M]는 mAb에 대한 항체 농도를 나타낸다.

실시예 8. R5381과 항-R5381 사이의 순환 면역 복합체 형성

[0247]

R5381과 항-R5381 항체 사이에 순환 면역 복합체(CIC)를 형성하는 가능성은 Quide1에 의해 개발된 MicroVue C1q-CIC 키트를 사용하여 시험되었다. 이 검정은 제조사의 지시에 따라 수행되었다. 항원 및 항체 샘플을 1:1 또는 1:10 비로 합하고, 37°C에서 30분 동안 항온처리하여 복합체 형성을 개시하였다. 이후, 항체-항원 샘플뿐만 아니라 양성 및 음성 열 응집된 감마 글로빈(HAGG) 대조군을 C1q 코팅된 시험 플레이트로 1:50 회석하였다. 키트 표준품을 C1q 코팅된 시험 플레이트에 직접 첨가하였다. 이후, 시험 플레이트를 RT에서 1시간 동안 항온처리하였다. 비결합된 항체, 항원 또는 복합체를 1X 세척 완충액을 사용하여 플레이트로부터 세척하였다. HRP 접합된 검출 항체를 시험 플레이트에 첨가하고, RT에서 30분 동안 항온처리하고, 이후 비결합된 HRP 접합된 검출 항체를 1X 세척 완충액을 사용하여 플레이트로부터 세척하였다. HRP 기질을 시험 플레이트에 첨가하고, RT에서 30분 동안 항온처리하였다. 이후, 산성 정지 용액을 적용하여 HRP 효소를 불활성화하였다. 이후, 플레이트를 405 nM에서 Perkin Elmer Victor X5 플레이트 판독기에서 판독하였다.

[0248]

원시 데이터를 배경 공제하고, MicroVue C1q-CIC 키트 표준품을 사용하여 선형 표준 곡선을 작도하고, 이것을 선형 회귀에 의해 분석하였다. 이후, 선형 회귀 식을 이용하여 샘플 및 HAGG 표준품 값(μg Eq/mL)을 계산하였다.

[0249]

결과

[0250]

HAGG 높은 대조군 및 낮은 대조군은 각각의 플레이트에서 포함되었다. 제조사의 지시에 따라, 4.0 μg Eq/mL보다 낮은 값을 갖는 임의의 샘플은 음성으로 여겨진다. MicroVue C1q-CIC 키트를 사용하여 R5381이 항-R5381 항체와 CIC를 형성할 가능성이 조사되었다. 결과는 하기 표 13A 및 표 13B에 요약되어 있다. 최종 값 및 CIC의 존재가 표시되어 있다. 임의의 실험 시험된 조건에서 CIC가 검출되지 않았다.

표 13A: CIq-CIC 검정

플레이트 1			
항체(REGN#)	항원(REGN#)	최종 값 (ug Eq/mL)	결과 (Pos/Neg)
1 μM REGN6580	100 nM R5381	0.20	Neg
100 nM REGN6580	100 nM R5381	0.22	Neg
1 μM REGN9035	100 nM R5381	0.29	Neg
100 nM REGN9035	100 nM R5381	0.18	Neg
1 μM 아이소타입 대조군	100 nM R5381	0.30	Neg
100 nM 아이소타입 대조군	100 nM R5381	0.31	Neg
1 μM REGN6580	100 nM 아이소타입 대조군	0.16	Neg
100 nM REGN6580	100 nM 아이소타입 대조군	0.11	Neg
1 μM REGN9035	100 nM 아이소타입 대조군	0.20	Neg
100 nM REGN9035	100 nM 아이소타입 대조군	0.15	Neg
1 μM 아이소타입 대조군	100 nM 아이소타입 대조군	0.17	Neg
100 nM 아이소타입 대조군	100 nM 아이소타입 대조군	0.16	Neg
-	100 nM R5381	0.08	Neg
-	100 nM 아이소타입 대조군	0.18	Neg
1 μM REGN6580	-	0.21	Neg
100 nM REGN6580	-	0.22	Neg
1 μM REGN9035	-	0.25	Neg
100 nM REGN9035	-	0.16	Neg
1 μM 아이소타입 대조군	-	0.25	Neg
100 nM 아이소타입 대조군	-	0.20	Neg
높은 HAGG 대조군	-	23.9	
낮은 HAGG 대조군	-	1.81	

[0251]

표 13B: CIq-CIC 검정

플레이트 2			
항체(REGN#)	항원(REGN#)	최종 값 (ug Eq/mL)	결과 (Pos/Neg)
1 μ M REGN6581	100 nM R5381	0.53	Neg
100 nM REGN6581	100 nM R5381	0.65	Neg
1 μ M REGN9037	100 nM R5381	0.42	Neg
100 nM REGN9037	100 nM R5381	0.64	Neg
1 μ M 아이소타입 대조군	100 nM R5381	0.46	Neg
100 nM 아이소타입 대조군	100 nM R5381	0.55	Neg
1 μ M REGN6581	100 nM 아이소타입 대조군	0.30	Neg
100 nM REGN6581	100 nM 아이소타입 대조군	0.35	Neg
1 μ M REGN9037	100 nM 아이소타입 대조군	0.55	Neg
100 nM REGN9037	100 nM 아이소타입 대조군	0.37	Neg
1 μ M 아이소타입 대조군	100 nM 아이소타입 대조군	0.36	Neg
100 nM 아이소타입 대조군	100 nM 아이소타입 대조군	0.41	Neg
-	100 nM R5381	0.39	Neg
-	100 nM 아이소타입 대조군	0.36	Neg
1 μ M REGN6581	-	0.62	Neg
100 nM REGN6581	-	0.37	Neg
1 μ M REGN9037	-	0.38	Neg
100 nM REGN9037	-	0.58	Neg
1 μ M 아이소타입 대조군	-	0.41	Neg
100 nM 아이소타입 대조군	-	0.43	Neg
높은 HAGG 대조군	-	21.2	
낮은 HAGG 대조군	-	1.92	

[0252]

실시예 9. $\text{NPR1}^{\text{hu}/\text{hu}}$ 마우스에서의 항-R5381 항체의 약동학적 평가

[0254]

REGN9035 및 REGN9037인 2개의 1아암 항-R5381 항체 및 REGN6580 및 REGN6581인 이들의 각각의 2가 모 대응물의 약동학적 평가는 인간화된 NPR1 마우스(인간화된 NPR1 대립유전자에 동형접합성인 마우스, $\text{NPR1}^{\text{hu}/\text{hu}}$)에서 수행되었다. 코호트는 시험된 항체당 5마리의 마우스를 함유하였다. REGN6580 및 REGN6581이 투약된 마우스는 단일 피하(SC) 1 mg/kg 용량을 받았다. REGN9035 및 REGN9037이 투약된 마우스는 이의 모 대응물에 대해 몰 당가 (0.67 mg/kg)에 기초하여 단일 정규화된 SC 용량을 받았다. 투약 후 6시간 및 1일, 2일, 3일, 7일, 10일, 14일, 21일 및 30일에 혈액 샘플을 수집하였다. 혈액을 혈청으로 가공하고, 분석까지 -80°C 에서 동결시켰다. GyroLab xPlore 플랫폼(Gyros)을 사용하여 REGN9035, REGN9037, REGN6580 및 REGN6581의 총 및 기능적 hIgG 혈청 농도를 측정하였다.

[0255]

Gyros 기술은 레이저 유도된 형광 검출에 의해 자동화된 면역검정을 위해 친화도 흐름 통과 형식을 이용한다. 다수의 방사상으로 배열된 나노리터 크기의 친화도 포획 칼럼을 함유하는 콤팩트 디스크(CD)에 샘플을 로딩한다. 액체 흐름은 원심분리 힘 및 모세관 힘에 의해 제어된다.

[0256]

혈청에서의 총 및 기능적 REGN9035, REGN9037, REGN6580 및 REGN6581 농도의 측정을 위해, 시험 물품 특이적 비오티닐화된 포획 시약(하기 표 14)을 스트렙타비딘 코팅된 비드(Dynospheres)가 예비로딩된 Gyrolab Bioaffy 200 CD 함유 친화도 칼럼에 첨가하였다. 보정에 사용된 표준품(표 14)을 0.488 내지 2000 ng/mL의 범위의 농도에서 실행하였다. 혈청 샘플의 연속 희석액을 0.5% 소 혈청 알부민(BSA)을 함유하는 인산염 완충 식염수(PBS)에서 준비하였다. 표준품의 연속 희석액을 2% 노르말 마우스 혈청(NMS)을 함유하는 PBS + 0.5% BSA에서 준비하였

다. 1:50에서 희석된 혈청 샘플의 단일실험물(singlet) 및 표준품의 이중실험물(duplicate)을 실온에서 포획 시약 코팅된 친화도 칼럼에 첨가하였다. 포획된 인간 IgG를 Rexxip F 완충액(Gyros)에 희석된 (0.5 $\mu\text{g/mL}$ 에서의) Alexa-647 접합된 마우스 항-인간 IgG1/hIgG4 단일클론 항체를 사용하여 검출하고; 생성된 형광 신호는 GyroLab xPlore 장치에 의해 반응 단위(RU)로 기록되었다. 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 의 각각의 검정의 정량 한계(LLOQ)는 품질 관리(QC) 샘플이 예상된 농도로부터 25% 미만으로 계속해서 벗어나는 것으로 결정된 표준 곡선에서의 가장 낮은 농도로서 정의되었다(표 14). Gyrolab Evaluator Software에서 4개 매개변수 로지스틱 곡선 일치를 이용하여 제작된 표준 곡선으로부터의 내삽에 의해 샘플 농도를 결정하였다. 2개의 반복 실험으로부터의 평균 농도는 최종 농도를 계산하기 위해 사용되었다.

표 14. 인간 IgG에 대한 Gyros 면역검정에 대한 검정 조건

검출된 인간 IgG	포획 시약	포획 시약의 농도	표준품
REGN9035 (총)	비오틴 접합된 마우스 항-인간 카파 경쇄 불변 영 역 mAb	20 $\mu\text{g/mL}$	REGN9035
REGN9037 (총)			REGN9037
REGN6580(총)			REGN6580
REGN6581(총)			REGN6581
REGN9035 (기능적)	R5381의 비오틴 접합된 Fab	75 $\mu\text{g/mL}$	REGN9035
REGN9037 (기능적)			REGN9037
REGN6580(기능적)			REGN6580
REGN6581(기능적)			REGN6581

Fab, 항체 결합 단편

[0257]

[0258] Phoenix[®] WinNonlin[®] 소프트웨어 버전 6.3(Certara, L.P., 뉴욕주 프린스턴) 및 혈관외 투약 모델을 사용하여 비구획 분석(NCA)에 의해 PK 매개변수를 결정하였다. 각각의 항체에 대한 각각의 평균 농도 값(총 hIgG)을 사용하여, 혈청에서의 관찰된 최대 농도(C_{\max}), 관찰된 추정된 반감기($t_{1/2}$), 마지막 측정 가능한 농도까지의 시간에 대한 농도 곡선 하의 면적(AUC_{last}) 및 항체 청소율($C1$)을 포함하는 모든 PK 매개변수를 선형 내삽 및 균일한 가중에 의해 선형 사다리꼴 규칙을 사용하여 결정하였다.

[0259]

결과

[0260]

NPR1^{hu/hu} 마우스에서의 항-R5381 Ab의 1 mg/kg(또는 균등 용량) SC 투여 후, REGN9035, REGN9037, REGN6580 및 REGN6581은 혈청에서의 총 hIgG의 유사한 용량 정규화된 최대 농도를 나타냈다($C_{\max/D} =$ 각각 10.3, 9.23, 9.3 및 11.4 mg/mL). 게다가, REGN9035, REGN9037, REGN6580 및 REGN6581은 또한 유사한 반감기 값($T_{1/2} =$ 각각 18.1일, 17.1일, 16.1일 및 15.4일), 용량 정규화된 약물 노출 값($AUC_{last/D} =$ 각각 204, 174, 165 및 205($\text{d}^*\text{mg/mL}/(\text{mg/kg})$) 및 청소율($C1 =$ 각각 5.0, 6.1, 4.9 및 3.7 $\text{mL}/\text{일}/\text{kg}$)을 나타냈다. 더욱이, REGN9035, REGN9037, REGN6580 및 REGN6581의 총 및 기능적 인간 IgG 농도는 모든 측정된 시점에 걸쳐 필적하였다. NPR1^{hu/hu} 마우스에서의 REGN6580 및 REGN6581인 2가 대응물과 비교하여 REGN9035 및 REGN9037인 1아암 항체의 PK 프로파일에서 측정 가능한 차이가 보이지 않았다.

[0261]

총 및 기능적 항체 농도에 대한 데이터의 요약은 하기 표 15에 요약되어 있고, 평균 PK 매개변수는 하기 표 16에 기재되어 있고, 시간에 대한 평균 총 항체 농도는 도 2에 도시되어 있다.

표 15: 시간에 걸친 $\text{NPR1}^{\text{hu}/\text{hu}}$ 마우스에서의 REGN9035, REGN9037, REGN6580 또는 REGN6581 항체의 단일 1 mg/kg(또는 균등 용량) 피하 주사 후 총 및 기능적 hIgG의 평균 혈청 농도(± SEM)

항체	시간 (d)	총 hIgG 농도		기능적 hIgG 농도	
		평균 (μmL)	+/- SEM	평균 (μmL)	+/- SEM
REGN9035	0.25	2.2	0.18	2.2	0.17
	1	6.5	0.25	6.3	0.24
	2	6.8	0.23	7.4	0.29
	3	6.7	0.17	7.0	0.24
	7	5.9	0.27	5.9	0.25
	10	5.2	0.26	5.1	0.26
	14	3.9	0.71	3.8	0.76
	21	2.9	0.70	2.8	0.70
	30	1.9	0.49	1.8	0.44
REGN9037	0.25	1.8	0.18	1.7	0.16
	1	6.2	0.26	5.5	0.13
	2	6.2	0.14	5.7	0.08
	3	5.9	0.32	5.5	0.21
	7	5.1	0.15	4.8	0.05
	10	4.5	0.05	4.2	0.09
	14	4.2	0.18	3.7	0.10
	21	3.0	0.10	2.8	0.10
	30	2.0	0.14	1.7	0.13
REGN6580	0.25	1.6	0.20	1.7	0.21
	1	7.5	0.30	7.8	0.56
	2	9.0	0.45	8.6	0.40
	3	8.6	0.53	8.4	0.48

[0262]

항체	시간 (d)	총 hIgG 농도		기능적 hIgG 농도	
		평균 (μ /mL)	+/- SEM	평균 (μ /mL)	+/- SEM
REGN6581	7	7.5	0.52	7.0	0.50
	10	6.7	0.56	6.4	0.53
	14	6.1	0.56	5.6	0.50
	21	4.6	0.57	4.3	0.55
	30	2.2	0.57	2.1	0.55
	0.25	2.4	0.38	2.4	0.36
	1	9.7	0.68	9.4	0.60
	2	11.2	0.66	10.7	0.39
	3	10.6	0.47	9.9	0.53

약어: 시간 = 단일 용량 주사 후 일의 시간; d = 연구일; SEM = 평균 PK 매개변수의 표준 오차는 총 hIgG 농도의 시간에 대한 평균 농도 프로파일로부터 도출되었다. $T_{1/2}$ 및 AUC_{last} 는 제30일까지의 농도에 기초한다. 각각의 PK 매개변수에 대한 평균 \pm SEM 값은 모든 용량 그룹에 대해 기재되어 있다.

[0263]

표 16: 약동학적 매개변수의 요약

매개변수	단위	1 mg/kg(0.67 mg/kg 정량화된 용량)			
		REGN9035	REGN9037	REGN6580	REGN6581
C_{max}	μ g/mL	6.9 \pm 0.2	6.5 \pm 0.2	9.3 \pm 0.5	11.4 \pm 0.7
$C_{max/D}$	μ g/mL/mg/kg	10.3 \pm 0.3	9.23 \pm 0.5	9.3 \pm 0.5	11.4 \pm 0.7
$T_{1/2}$	d	18.1 \pm 1.1	17.1 \pm 1.2	16.1 \pm 2.3	15.4 \pm 1.1
AUC_{last}	d* μ g/mL	136 \pm 4	117 \pm 3.1	165 \pm 19	205 \pm 11
$AUC_{last/D}$	(d* μ g/mL)/(mg/kg)	204 \pm 5.9	174 \pm 4.6	165 \pm 19	205 \pm 11
C1	mL/일/kg	5.0 \pm 0.3	6.1 \pm 0.3	4.9 \pm 1.0	3.7 \pm 0.3

약어: AUC_{last} = 투약의 시간으로부터 마지막 측정 가능한 농도까지의 곡선 하의 면적; $AUC_{last/D}$ = 1 mg/kg 투약으로 정규화된 AUC 마지막 용량; $t_{1/2}$ = 제거의 종말 반감기; C_{max} = 피크 농도; $C_{max/D}$ = 1 mg/kg 투약으로 정규화된 C_{max} 용량; C1 = 시간에 걸친 항체의 청소율; SEM = 평균의 표준 오차.

[0264]

- [0265] 실시예 10. 항-R5381 항체에 의한 구제 후 총 R5381(항-NPR1 mAb)의 혈청 농도 분석
- [0266] R5381의 혈압 저하 효과를 역전시키는 데 있어서 REGN1945인 아이소타입 대조군 항체와 비교된 REGN6580 및 REGN6581인 2가 항-R5381 mAb의 유효성을 평가하는 생체내 연구로부터의 혈청의 샘플 농도 분석. 원격측정된 정상암 인간화된 NPR1(인간화된 NPR1 대립유전자에 동형접합성인 마우스, $\text{NPR1}^{\text{hu}/\text{hu}}$) 마우스에서 연구를 수행하였다. 요약하면, 코호트는 시험된 항체당 5마리의 마우스를 함유하였다. 모든 마우스는 R5381의 단일 투여(SC) 5 mg/kg 용량이 투여되었다. 3일 후, 마우스는 REGN6580, REGN6581 또는 REGN1945인 아이소타입 대조군의 단일 정맥내(IV) 50 mg/kg 용량을 받았다. 초기 R5381 투여 후 7일 및 22일에 혈액 샘플을 수집하였다. 혈액을 혈청으로 가공하고, 분석까지 -80°C에서 동결시켰다. GyroLab xPlore 플랫폼(Gyros)을 사용하여 총 R5381의 혈청 농도를 측정하였다.
- [0267] Gyros 기술은 레이저 유도된 형광 검출에 의해 자동화된 면역검정을 위해 친화도 흐름 통과 형식을 이용한다. 다수의 방사상으로 배열된 나노리터 크기의 친화도 포획 칼럼을 함유하는 콤팩트 디스크(CD)에 샘플을 로딩한다. 액체 흐름은 원심분리 힘 및 모세관 힘에 의해 제어된다.
- [0268] 혈청에서의 총 R5381의 측정을 위해, 면역검정을 수행하였다. R5381이 투여되고 항-R5381 mAb가 투여된 마우스는 혈청에서 항체:항-이디오타입 복합체를 형성하는 것으로 추정된다(R5381: REGN6580 또는 R5381: REGN6581). 이를 샘플의 총 R5381 항체 농도를 정확히 측정하기 위해, 검정의 출발 시 해리 단계를 수행하였다. 간단히, 총 R5381을 측정하기 위해, 75 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서의 REGN6712인 시험 물품 특이적 비오티닐화된 포획 시약을 4시간 동안 37°C에서 1:250에서 희석된 혈청 샘플 또는 0.244 내지 1000 ng/mL의 범위의 농도에서 희석된 표준품과 예비항온처리하였다. 혈청 샘플의 희석액을 0.5% 소 혈청 알부민(BSA)(+ 포획 시약)을 함유하는 인산염 완충 식염수(PBS)에서 준비하고, 표준품(R5381)의 연속 희석액을 0.4% 노르말 마우스 혈청(NMS)(+ 포획 시약)을 함유하는 PBS + 0.5% BSA에서 준비하였다. 포획 시약과 샘플 또는 표준품의 4시간 37°C 예비항온처리 후, 혈청 샘플(+포획 시약)의 희석된 단일실험물 및 표준품(+ 포획 시약)의 이중실험물을 스트렙타비딘 코팅된 비드(Dynosphere s)가 예비로딩된 Gyrolab Bioaffy 200 CD 함유 친화도 칼럼에 첨가하였다. 포획된 인간 IgG를 Rexxip F 완충액(Gyros)에 희석된 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 Alexa-647 접합된 마우스 항-인간 IgG1/hIgG4 단일클론 항체를 사용하여 검출하고; 생성된 형광 신호는 GyroLab xPlore 장치에 의해 반응 단위(RU)로 기록되었다. 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 의 각각의 검정의 정량 한계(LLQ)는 예비복합체화된 품질 관리(QC)(R5381: REGN6580, R5381: REGN6581) 샘플이 예상된 농도로부터 25% 미만으로 계속해서 벗어나는 것으로 결정된 표준 곡선에서의 가장 낮은 농도로서 정의되었다.
- [0269] R5381, 이어서 비결합 대조군 항체(REGN1945)가 투여된 마우스로부터의 혈청에서의 총 R5381 농도의 측정을 위해, 해리 단계가 필요하지 않았다. 총 R5381 농도는 하기와 같이 측정되었다. 간단히, 50 $\mu\text{g/mL}$ 에서의 mAb36313인 시험 물품 특이적 비오티닐화된 포획 시약을 실온에서 스트렙타비딘 코팅된 비드(Dynospheres)가 예비로딩된 Gyrolab Bioaffy 200 CD 함유 친화도 칼럼에 첨가하였다. 이 검정에서 보정에 사용된 표준품(R5381)은 0.488 내지 2000 ng/mL의 범위의 온도에서 희석되었다. 표준품의 연속 희석액을 1% 노르말 마우스 혈청(NMS)을 함유하는 PBS + 0.5% BSA에서 준비하였다. 1:100에서 희석된 혈청 샘플의 단일실험물 및 표준품의 이중실험물을 실온에서 포획 시약 코팅된 친화도 칼럼에 첨가하였다. 포획된 인간 IgG를 Rexxip F 완충액(Gyros)에 희석된 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 Alexa-647 접합된 마우스 항-인간 IgG1/hIgG4 단일클론 항체를 사용하여 검출하고; 생성된 형광 신호는 GyroLab xPlore 장치에 의해 RU로 기록되었다. 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 각각의 검정의 LLQ는 QC 샘플이 예상된 농도로부터 25% 미만으로 계속해서 벗어나는 것으로 결정된 표준 곡선에서의 가장 낮은 농도로서 정의되었다.
- [0270] Gyrolab Evaluator Software에서 4개 매개변수 로지스틱 곡선 일치를 이용하여 제작된 표준 곡선으로부터의 내삽에 의해 샘플 농도를 결정하였다. 2개의 반복 실험으로부터의 평균 농도는 최종 농도를 계산하기 위해 사용되었다.
- [0271] 평균 농도의 계산
- [0272] LLQ 미만(<LLQ)의 개별 농도 및 평균 농도는 정량 한계(BLQ)로서 보고된다. 개별 값의 >50%가 BLQ이면, 그 시점에 대한 평균 값은 BLQ로서 보고된다. 치료 그룹 내의 개별 값의 ≤50%가 BLQ이고, BLQ 값으로서 0을 사용하여, 평균 값이 산술적으로 BLQ이면, 평균 값은 BLQ로서 보고된다. 치료 그룹 내의 개별 값의 ≤50%가 BLQ이고, BLQ 값으로서 0을 사용하여, 평균 값이 산술적으로 LLQ 이상이면, 이 산술 값이 보고된다.
- [0273] 결과
- [0274] $\text{NPR1}^{\text{hu}/\text{hu}}$ 마우스에서의 R5381의 5 mg/kg 투여 후 7일, 이어서 3일 후에 구제 시약 REGN6580, REGN6581 또는 아

이소타입 대조군 mAb(REGN1945)의 50 mg/kg의 투여는 아이소타입 대조군의 용량을 받은 마우스와 비교하여 항-이디오타입 항체를 받은 마우스에서 총 R5381의 더 낮은 평균 혈청 농도를 생성시켰다. 이는 REGN6580 및 REGN6581인 항-이디오타입 항체가 아이소타입 대조군이 투약된 마우스와 비교하여 이 항-이디오타입 mAb가 주어질 때 마우스에서 보인 R5381의 더 빠른 청소를 담당한다는 것을 나타낸다.

[0275] R5381이 투약되고, 이어서 3일 후(초기 R5381 투약 후 7일)에 REGN6580 또는 REGN6581의 용량이 투약된 마우스는 각각 3.6 또는 7.4 $\mu\text{g/mL}$ 의 총 R5381 농도를 가졌다. 비교하면, 3일 후에 아이소타입 대조군이 투약된 마우스는 30.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 총 R5381 농도를 생성시켰다. R5381 투약, 이어서 항-이디오타입 항체의 투약 후 22일에 취한 혈청의 분석은 총 R5381의 검출 불가능한 농도를 생성시키는 반면, 아이소타입 대조군 투약된 그룹에서의 총 R5381의 혈청 농도는 여전히 대략 6 $\mu\text{g/mL}$ 였다.

[0276] REGN6580, REGN6581 또는 REGN1945인 아이소타입 대조군의 IV 투약에 의해 구제된 마우스에서의 총 R5381 혈청 농도에 대한 데이터의 요약은 하기 표 17에서 발견된다.

표 17: 제7일 및 제22일에 NPR1hu/hu 마우스에서 R5381의 단일 5 mg/kg 피하 주사, 이어서 나중에 3일에 REGN6580 또는 REGN6581 항-이디오타입 항체 또는 아이소타입 대조군의 단일 50 mg/kg 정맥내 주사 후 총 IgG의 평균 혈청 농도(\pm SEM)

항체 그룹	시간 (d)	총 hIgG 농도	
		총 R5381	
R5381 + REGN6580		평균($\mu\text{g/mL}$)	\pm SEM
	7	3.6	0.4
	22	BLQ	NA
		총 R5381	
R5381 + REGN6581		평균($\mu\text{g/mL}$)	\pm SEM
	7	7.4	2.7
	22	BLQ	NA
		총 R5381	
R5381 + 아이소타입 대조군		평균($\mu\text{g/mL}$)	\pm SEM
	7	30.5	3
	22	5.9	2.8

약어: 시간, 단일 용량 주사 후 일의 시간; d, 연구일; BLQ 정량 한계 미만; NA, 이용 가능하지

않음; SEM = 평균의 표준 오차

[0278] 실시예 11. 정상암 NPR1hu/hu 마우스에서 2가 항-R5381 mAb의 단일 50 mg/kg 정맥내 용량을 사용한 R5381 유도된 혈압 저하의 역전의 평가

[0279] 원격측정된 정상암 $\text{NPR1}^{\text{hu}/\text{hu}}$ 마우스에서 R5381에 의해 유도된 혈압 저하를 역전시키는 데 있어서 2가 항-R5381 항체의 효과를 평가하기 위해, 약 18 내지 20주령의 수컷 $\text{NPR1}^{\text{hu}/\text{hu}}$ 마우스(n=20)에게 PA-C10 텔레미터(DSI, 미네소타주 세인트 폴)를 이식하고 적어도 7일 동안 회복되게 하였다. 동물을 예비연구 수축기 혈압 및 체중에 기초하여 그룹(그룹 1 내지 4)으로 계층화하였다. 동물을 표준 조건(64°F 내지 84°F(18°C 내지 29°C)의 온도; 30% 내지 70%의 상대 습도) 하에 개별적으로 수용하고, 12시간 광/12시간 암 사이클을 유지시켰다. 식품(Research Diets Standard 펠릿 음식) 및 물을 임의로 제공하였다.

[0280] 시험 단백질을 제0일에 단일 피하 주사에 의해 적절한 동물에게 투여하였다. 구제 제제를 제3일에 단일 정맥내 주사에 의해 적절한 동물에게 투여하였다. 각각의 동물에 대한 용량 부피는 가장 최근의 체중 측정에 기초하였

다.

표 18: 용량 및 용량 그룹의 요약

그룹 번호	시험 물품	용량 (mg/kg s.c.)	구체 물품	용량 (mg/kg i.v.)	동물의 수
					수컷
1	PBS	0	PBS	0	5
2	REGN5381	5	IgG4P 아이소타입 대조군 mAb	50	5
3			REGN6580		5
4			REGN6581		5

[0281]

[0282] 수축기압, 확장기압, 맥압, 평균 동맥압 및 심박수를 시험 기간의 지속기간 동안 10분마다 10초 동안 수집하였다. 데이터를 비닝(binning)하고, 따라서 R5381 유도된 혈압 저하의 급성 역전(시간당 빈(bin)) 및 만성 역전(24시간 빈)에 대해 평가하였다. ELISA에 의해 뇨에서의 제21일/제22일 사이클리 구아노신 모노포스페이트(cGMP) 농도를 평가하였다. 부검에서 전체 절대 및 상대 심장 중량을 수집하였다. 모든 데이터는 평균 ± SEM으로 제시된다.

[0283]

결과

[0284]

2가 항-R5381 항체 REGN6580 및 REGN6581의 생체내 스크린은 R5381의 혈압 저하 효과의 신속하고 지속적인 역전을 나타냈다(도 3). REGN6580 및 REGN6581 둘 다는 R5381의 초기 투약 후 3일에 정맥내로 투여될 때 압력을 다시 기준선 수준으로 증가시킬 수 있었다. 시간 일치된 대조군과 비교된 6-8 mmHg의 초기 압력 강하(하기 표 1 9)는 REGN6580 또는 REGN6581 중 어느 하나의 투여 후 3일 내에 역전되었다(도 3).

표 19: 제1일 - 제2일 - 구체 물질의 투여 전 평균 혈압 및 심박수

그룹	시험 물품:	수축기 (mmHg)	확장기 (mmHg)	맥압 (mmHg)	평균 동맥 (mmHg)	심박수 (BPM)
1	PBS	120±1	96±1	33±0	114±1	600±7
2	R5381	123±0**	97±1	26±0***	111±1	629±3*
3		121±0***	92±0*	28±0***	107±0**	629±1*
4		121±1***	94±1	27±0***	108±1**	593±8

원격출정된 청상암 NTRI^{hu/hu} 마우스를 수축기 혈압 및 체중에 기초하여 그룹으로 무작위화하였다. 동물에게 표 18에 기재된 것과 같이 NTRI 효능제 mAb R5381 또는 PBS의 단일 5 mg/kg 피하 주사를 주었다. 모든 값은 평균 ± SEM. 그룹마다 n=4-5이다. 통계학 - 드넷에 의한 1방향 ANOVA: PBS에 대해 *p<0.05; PBS에 대해 **p<0.01; PBS에 대해 ***p<0.001.

[0285]

[0286] 역전의 지속성은 R5381 및 아이소타입 대조군 mAb가 투여된 동물과 비교할 때 REGN6580 또는 REGN6581이 투약된 동물에 대한 모든 혈류역학적 매개변수의 통계학적으로 유의미한 차이로 연구의 22일 지속기간 동안 유지되었다(하기 표 20).

표 20: 제4일 - 제20일 - 구제 물질의 투여 후 평균 혈압 및 심박수

그룹	시험 물품	구제 물품	수축기 (mmHg)	확장기 (mmHg)	맥압 (mmHg)	평균 동맥 (mmHg)	심박수 (BPM)
1	PBS	PBS	132±0***	97±0***	35±0***	115±0***	567±4**
2	R5381	아이소타입 대조군 mAb	122±0	93±0	29±0	108±0	582±4
3		REGN6580	128±0****	95±1*	33±1****	112±0****	582±3
4		REGN6581	129±0****	97±0****	33±0****	114±0****	562±2***

원격측정된 정상암 *NPR1^{hu/hu}* 마우스를 수축기 혈압 및 체중에 기초하여 그룹으로

두자위화하였다. 동물에게 표 18에 기재된 것과 같이 연구 제0일에 *NPR1* 효능제 *mAb R5381*

또는 *PBS*의 단일 5 mg/kg 피하 주사, 이어서 연구 제3일에 아이소타입 대조군 *mAb* 또는 항-

R5381 중 어느 것을 주었다. 모든 값은 평균 ± SEM, 그룹마다 n=4-5이다. 통계학 - 듀넷에

의한 1방향 ANOVA: 아이소타입 대조군에 대해 *p<0.05; 아이소타입 대조군에 대해

p<0.01; 아이소타입 대조군에 대해 *p<0.001; 아이소타입 대조군에 대해 ****p<0.0001.

[0287]

[0288] *PBS* 대조군 동물과 비교할 때, REGN6580 또는 REGN6581 중 어느 하나의 투여 후 통계학적으로 유의미한 차이가 주목되지 않았고(표 20, 도 3 내지 6), 이는 *R5381* 유도된 혈압 저하 효과의 완전하고 지속적인 역전을 나타낸다.

[0289]

2가 항-*R5381* 항체 REGN6580 및 REGN6581 둘 다는 *PBS* 투약된 동물과 비교하여 역전 제제 투약된 그룹 중 어느 것에서의 심장 중량 대 경골 중량의 통계학적으로 유의미한 차이 없음에 의해 표시된 것처럼 상대 심장 중량의 감소를 약화시켰다(하기 표 21).

표 21: 역전 제제의 투여 후 전체 및 상대 심장 중량

그룹	심장 중량 (mg)	뇌 중량 (mg)	경골 길이 (mm)	심장 중량 : 뇌 중량	심장 중량 : 경골 길이
PBS + PBS	148±4	493±11	17.6±0.2	300±10	8.4±0.1
R5381 + 아이소타입 대조군 mAb	133±4	473±20	18.2±0.2	280±9	7.3±0.2**
R5381 + REGN6580	137±2	463±5	17.4±0.2	296±5	7.9±0.1
R5381 + REGN6581	138±4	458±12	17.8±0.2	302±12	7.8±0.2

원격측정된 정상암 *NPR1^{hu/hu}* 마우스를 수축기 혈압 및 체중에 기초하여 그룹으로

두자위화하였다. 동물에게 표 18에 기재된 것과 같이 연구 제0일에 *NPR1* 효능제 *mAb R5381*

또는 *PBS*의 단일 5 mg/kg 피하 주사, 이어서 연구 제3일에 아이소타입 대조군 *mAb* 또는 항-

R5381 중 어느 것을 주었다. 모든 값은 평균 ± SEM, 그룹마다 n=4-5이다. 통계학 - 터키에

의한 1방향 ANOVA: *PBS*에 대해 **p<0.01.

[0290]

[0291]

뇨 부피에 대한 효과는 전달된 임의의 시험 또는 구제 물품에 의해 주목되지 않았다(하기 표 22).

표 22: 제22일 뇌 부피 및 뇌 cGMP 수준

그룹	시험 물품:	역전 제제	뇨 부피(mL/일)g)	뇨 cGMP(pmol/mL)	뇨 cGMP(pmol/일)
1	PBS	PBS	2.1±0.1*	6568±1143	13474±2678
2	R5381(5 mg/kg)	아이소타입 대조군(50 mg/kg)	1.0±0.2	6855±937	6800±457
		REGN6580(50 mg/kg)	1.4±0.2	6389±1824	9009±3548
		REGN6581(50 mg/kg)	1.4±0.3	4715±907	7341±2549

원격측정된 정상압 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스를 동일한 체중의 4개의 그룹으로 무작위화하고, R5381의

단일 피하 주사, 이어서 표 18에 열거된 용량에서의 역전 제제의 용량을 주었다. 연구
제21일에 시작하고 연구 제22일에 종료하여 뇌를 밤새 수집하였다. 모든 값은 평균 ± SEM,
그룹마다 $n=3-5$ 이다. 통계학 - 뉴넷에 의한 1방향 ANOVA: 그룹 2 R5381 + 아이소타입
대조군에 대해 * $p<0.05$.

[0292]

[0293]

cGMP 생성은 제22일에 뇌에서 평가될 때 역전 제제의 투여에 의해 영향을 받지 않았다(표 22).

[0294]

2가 항-R5381 항체 REGN6580 및 REGN6581 둘 다는 R5381의 단일 용량을 받은 정상압 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스에 대한 연구
제3일에 단일 정맥내 주사 후 연구 제21일에 걸쳐 R5381의 혈압 저하 효과를 신속하게 그리고 지속적으로 역
전시켰다.

[0295]

실시예 12. 정상압 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스에서 2가 항-R5381 mAb의 단일 50 mg/kg 피하 용량을 사용한 R5381 유도된
혈압 저하의 역전의 평가

[0296]

원격측정된 정상압 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스에서 R5381에 의해 유도된 혈압 저하를 역전시키는 데 있어서 2가 항-R5381
항체의 효과를 평가하기 위해, 약 10 내지 12주령의 수컷 $NPR1^{hu/hu}$ (n=20) 마우스에게 PA-C10 텔레미터(DSI, 미
네소타주 세인트 폴)를 이식하고 적어도 7일 동안 회복되게 하였다. 동물을 예비연구 수축기 혈압 및 체중에 기
초하여 그룹(그룹 1 내지 4)으로 계층화하였다. 동물을 표준 조건(64°F 내지 84°F(18°C 내지 29°C)의 온도; 30%
내지 70%의 상대 습도) 하에 개별적으로 수용하고, 12시간 광/12시간 암 사이클을 유지시켰다. 식품(Research
Diets Standard 펠릿 음식) 및 물을 임의로 제공하였다.

[0297]

시험 단백질을 제0일에 단일 피하 주사에 의해 적절한 동물에게 투여하였다. 구제 제제를 제3일에 단일 피하 주
사에 의해 적절한 동물에게 투여하였다. 각각의 동물에 대한 용량 부피는 가장 최근의 체중 측정에 기초하였다.

표 23: 용량 및 용량 그룹의 요약

그룹 번호	시험 물품	용량 (mg/kg s.c.)	구제 물품	용량 (mg/kg s.c.)	동물의 수
					수컷
1	PBS	0	PBS	0	5
2	REGN5381	5	IgG4P 아이소타입 대조군 mAb	50	5
			REGN6580		5
			REGN6581		5

[0298]

수축기압, 확장기압, 맥압, 평균 동맥압 및 심박수를 시험 기간의 지속기간 동안 10분마다 10초 동안 수집하였
다. 데이터를 비닝하고, 따라서 R5381 유도된 혈압 저하의 급성 역전(시간당 빈) 및 만성 역전(24시간 빈)에 대
해 평가하였다. ELISA에 의해 뇌에서의 제21일/제22일 사이클리 구아노신 모노포스페이트(cGMP) 농도를 평가하
였다. 모든 데이터는 평균 ± SEM으로 제시된다.

[0300]

결과

[0301]

2가 항-R5381 항체의 생체내 스크린은 R5381의 혈압 저하 효과의 지속적인 역전을 나타냈다(도 7 및 하기 표 24).

표 24: 제1일 - 제2일 - 구제 물질의 투여 전 평균 혈압 및 심박수

그룹	시험 물품:	수축기 (mmHg)	확장기 (mmHg)	맥압 (mmHg)	평균 동맥 (mmHg)	심박수 (BPM)
1	PBS	126±1	91±0	34±1	100±1	522±5
2		118±0**	90±0	28±0**	104±0	538±7
3	R5381	118±1**	91±1	27±1***	105±1	539±10
4		119±1*	92±2	28±0**	106±1	521±11

원격즉정된 정상압 *NPR1^{hu/hu}* 마우스를 수축기 혈압 및 체중에 기초하여 그룹으로 무작위화하였다. 동물에게 표 23에 기재된 것과 같이 *NPR1* 효능제 mAb R5381 또는 PBS의 단일 5 mg/kg 피하 주사를 주었다. 모든 값은 평균 ± SEM, 그룹마다 n=4-5이다. 통계학 - 뉴넷에 의한 1방향 ANOVA: PBS에 대해 *p<0.05; PBS에 대해 **p<0.01; PBS에 대해 ***p<0.001.

[0302]

[0303]

REGN6580 및 REGN6581 둘 다는 R5381의 초기 투약 후 3일에 피하로 투여될 때 압력을 다시 기준선 수준으로 증가시킬 수 있었다(도 7 및 하기 표 25).

표 25: 제4일 - 제20일 - 구제 물질의 투여 후 평균 혈압 및 심박수

그룹	시험 물품:	구제 물품	수축기 (mmHg)	확장기 (mmHg)	맥압 (mmHg)	평균 동맥 (mmHg)	심박수 (BPM)
1	PBS	PBS	130±1****	95±0****	35±0****	113±1****	523±4
2		아이소타입 대조군 mAb	116±0	88±0	28±0	102±0	524±3
3	R5381	REGN6580	126±1****	92±0****	34±0****	109±1****	501±3****
4		REGN6581	127±1****	93±1****	34±0****	111±1****	494±4****

원격즉정된 정상압 *NPR1^{hu/hu}* 마우스를 수축기 혈압 및 체중에 기초하여 그룹으로 무작위화하였다. 동물에게 표 23에 기재된 것과 같이 *NPR1* 효능제 mAb R5381 또는 아이소타입 대조군 mAb의 단일 5 mg/kg 피하 주사를 주었다. 모든 값은 평균 ± SEM, 그룹마다 n=4-5이다. 통계학 - 뉴넷에 의한 1방향 ANOVA: 아이소타입 대조군에 대해 ****p<0.0001.

[0304]

[0305]

역전의 지속성은 R5381 및 아이소타입 대조군 mAb가 투여된 동물과 비교할 때 REGN6580 또는 REGN6581이 투약된 동물에 대한 모든 혈류역학적 매개변수의 통계학적으로 유의미한 차이로 연구의 22일 지속기간 동안 유지되었다(도 7 및 표 25). PBS 대조군 동물과 비교할 때, REGN6580 또는 REGN6581 중 어느 하나의 투여 후 통계학적으로 유의미한 차이가 주목되지 않았고(표 25, 도 7), 이는 R5381 유도된 혈압 저하 효과의 완전하고 지속적인 역전을 나타낸다.

[0306]

REGN6580 및 REGN6581 둘 다는 22일 후에 REGN6580 또는 REGN6581 중 어느 하나의 피하 투여 후 뇌에서의 cGMP 수준의 통계학적으로 유의미한 감소에 의해 표시된 것처럼 NPR1 신호전달의 약화를 나타냈다(하기 표 26).

표 26: 제22일 뇌 부피 및 뇌 cGMP 수준

그룹	시험 물품:	역전 제제	뇌 부피(mL/일)g)	뇌 cGMP(pmol/mL)	뇌 cGMP(pmol/일)
1	PBS	PBS	1.3±0.2	2690±223*	3844±969*
2	R5381(5 mg/kg)	아이소타입			
		대조군(50 mg/kg)	1.7±0.2	6781±2079	11500±3795
		REGN6580(50 mg/kg)	1.1±0.1	2032±435*	3312±738*
4		REGN6581(50 mg/kg)	1.9±0.5	3165±370**	6305±2367

원격측정된 정상압 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스를 동일한 체중의 4개의 그룹으로 무작위화하고, R5381의

단일 피하 주사. 이어서 표 23에 열거된 용량에서의 역전 제제의 피하 용량을 주었다. 연구
제21일에 시작하고 연구 제22일에 종료하여 뇌를 밤새 수집하였다. 모든 값은 평균 ± SEM,
그룹마다 $n=3-5$ 이다. 통계학 - 둘넷에 의한 1방향 ANOVA: 그룹 2 R5381 + 아이소타입
대조군에 대해 * $p<0.05$.

[0307]

[0308]

절대 및 상대 심장 중량에서의 경향성을 띠는 통계학적으로 유의미하지 않은 감소가 R5381 및 아이소타입 대조
군의 투여에 의해 관찰되었다(하기 표 27).

표 27: 역전 제제의 투여 후 전체 및 상대 심장 중량

그룹	심장 중량 (mg)	뇌 중량 (mg)	경골 길이 (mm)	심장 중량 : 뇌 중량	심장 중량 : 경골 길이
PBS + PBS	126±8	427±7	17.6±0.2	0.294±0.015	0.007±0.0004
R5381 + 아이소타입 대조군 mAb	120±15	412±3	18.0±0.1	0.271±0.032	0.007±0.0009
R5381 + REGN6580	126±8	437±4	17.8±0.2	0.288±0.018	0.007±0.0004
R5381 + REGN6581	126±6	452±7	17.9±0.2	0.280±0.012	0.007±0.0004

원격측정된 정상압 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스를 수축기 혈압 및 체중에 기초하여 그룹으로
무작위화하였다. 동물에게 표 23에 기재된 것과 같이 $NPR1$ 효능제 mAb R5381 또는
아이소타입 대조군의 단일 5 mg/kg 피하 주사를 주었다. 모든 값은 평균 ± SEM, 그룹마다
 $n=4-5$ 이다. 통계학 - 둘넷에 의한 1방향 ANOVA.

[0309]

[0310]

이 변경은 아마도 R5381의 혈류역학적 효과로 기인한다. R5381, 이어서 REGN6580 또는 REGN6581 중 어느 하나를
받은 동물은 유의미하지는 않지만 R5381 유도된 혈류역학적 효과의 완화에 의해 정렬된 대조군 동물과 더 가까
운 절대 및 상대 심장 중량을 가졌다.

[0311]

연구 제3일에 단일 피하 주사 후, REGN6580 및 REGN6581인 2가 항-R5381 항체 둘 다는 원격측정된 정상압
 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스에서 평가된 것과 같이 R5381의 혈압 저하 효과를 신속하게 그리고 지속적으로 역전시켰다. 제제
둘 다는 또한 연구 제22일에 걸쳐 $NPR1$ 유도된 cGMP 생성을 억제하도록 기능하였다.

[0312]

실시예 13. 정상압 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스에서 1가 항-R5381 mAb의 단일 50 mg/kg 용량을 사용한 R5381 유도된 혈압 저
하의 역전의 평가

[0313]

원격측정된 정상압 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스에서 R5381에 의해 유도된 혈압 저하를 역전시키는 데 있어서 1가 항-R5381
항체의 효과를 평가하기 위한 노력으로, ~ 13 내지 14주령의 수컷 $NPR1^{hu/hu}$ ($n=48$) 마우스에게 PA-C10 텔레미터
(DSI, 미네소타주 세인트 폴)를 이식하고 적어도 7일 동안 회복되게 하였다. 동물을 예비연구 수축기 혈압 및
체중(하기 표 29)에 기초하여 그룹(하기 표 28)(그룹 1 내지 8)으로 계층화하였다.

표 28: 용량 및 용량 그룹의 요약

그룹 번호	시험 물품	용량 (mg/kg s.c.)	구제 물품	구제 용량 (mg/kg)	구제 용량 경로	동물의 수
						수컷
1	PBS	0	PBS	0	i.v.	6
2	REGN5381	5	IgG4P 아이소타입 대조군 mAb	50	s.c.	6
3			REGN6580			6
4			REGN9035			6
5			REGN9037			6
6			REGN6580	1.v.	i.v.	6
7			REGN9035			6
8			REGN9037			6

[0314]

표 29: 제1일 - 제2일 - 구제 물질의 투여 전 평균 혈압 및 심박수

그룹	시험 물품:	수축기 (mmHg)	확장기 (mmHg)	맥압 (mmHg)	평균 동맥 (mmHg)	심박수 (BPM)
1	R5381	123±0	89±0	34±0	107±0	545±5
2		120±0***	90±0	30±0***	106±0*	582±2***
3		120±0***	91±1	29±0***	106±0	556±3*
4		116±0****	88±0	28±0****	103±0****	574±0***
5		117±0****	89±0	28±0****	104±0***	565±2**
6		117±0****	88±0	28±1****	104±0***	565±1**
7		116±0****	89±1	28±0****	104±0***	555±1
8		118±0****	88±0	29±1***	104±0***	543±2

원격증정된 정상압 NTRI^{hu/hu} 마우스를 수축기 혈압 및 체중에 기초하여 그룹으로

무작위화하였다. 동물에게 표 28에 기재된 것과 같이 NTRI 효능제 mAb R5381 또는 PBS의

단일 5 mg/kg 피하 주사를 주었다. 모든 값은 평균 ± SEM. 그룹마다 n=4-5이다. 통계학 -

유넷에 의한 1방향 ANOVA: PBS에 대해 *p<0.05; PBS에 대해 **p<0.01; PBS에 대해

p<0.001; PBS에 대해 *p<0.0001.

[0315]

동물을 표준 조건(64°F 내지 84°F(18°C 내지 29°C)의 온도; 30% 내지 70%의 상대 습도) 하에 개별적으로 수용하고, 12시간 광/12시간 암 사이클을 유지시켰다. 식품(Research Diets Standard 펠릿 음식) 및 물을 임의로 제공하였다.

[0317]

시험 단백질을 제0일에 단일 피하 주사에 의해 적절한 동물에게 투여하였다. 구제 제제를 제3일에 단일 피하 또는 정맥내 주사에 의해 적절한 동물에게 투여하였다. 각각의 동물에 대한 용량 부피는 가장 최근의 체중 측정에 기초하였다. 뇨의 밤샘 수집을 연구 제20일 및 제21일에 수행하였다.

[0318]

수축기압, 확장기압, 맥압, 평균 동맥압 및 심박수를 시험 기간의 지속기간 동안 10분마다 10초 동안 수집하였다. 데이터를 비닝하고, 따라서 R5381 유도된 혈압 저하의 급성 역전(시간당 빈) 및 만성 역전(24시간 빈)에 대해 평가하였다. ELISA에 의해 뇨에서의 제21일/제22일 사이클릭 구아노신 모노포스페이트(cGMP) 농도를 평가하였다. 모든 데이터는 평균 ± SEM으로 제시된다.

[0319]

결과

[0320]

1가 항-R5381 항체의 생체내 스크린은 R5381의 혈압 저하 효과의 신속하고 지속적인 역전을 나타냈다(하기 표 30; 도 8 및 도 9).

표 30: 제4일 - 제20일 - 구제 물질의 투여 후 평균 혈압 및 심박수

그룹	시험 물품:	구제 물품	구제 용량 경로	수축기 (mmHg)	확장기 (mmHg)	맥압 (mmHg)	평균 동맥 (mmHg)	심박수 (BPM)
1	PBS	PBS	i.v.	125±0****	90±0**	34±0****	100±0****	534±2****
2	R5381	아이소타입 대조군 mAb	s.c.	119±0	88±0	31±0	105±0	550±3
3				130±0****	94±0****	36±0****	113±0****	522±2****
4				125±0****	91±0****	34±0***	109±0****	550±2
5				126±0****	92±0****	35±0****	110±0****	531±2***
6		REGN6580	i.v.	129±1****	94±1****	34±0****	113±1****	524±2****
7				126±0****	92±0****	34±0***	110±0****	528±2***
8				120±1****	92±1****	37±0****	111±1****	514±2***

원격측정된 정상압 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스를 수축기 혈압 및 체중에 기초하여 그룹으로무작위화하였다. 동물에게 표 28에 기재된 것과 같이 $NPR1$ 효능제 mAb R5381 또는 PBS의

단일 5 mg/kg 피하 주사를 주었다. 모든 것은 평균 ± SEM, 그룹마다 n=4-5이다. 통계학 -

듀넷에 의한 1방향 ANOVA: 아이소타입 대조군에 대해 *p<0.05; 아이소타입 대조군에 대해

p<0.01: 아이소타입 대조군에 대해 *p<0.001: 아이소타입 대조군에 대해 ****p<0.0001.

[0321]

REGN9035 및 REGN9037 둘 다는 R5381의 초기 투약 후 3일에 정맥내로 또는 피하로 투여될 때 압력을 다시 기준선 수준으로 증가시킬 수 있었다(표 30; 도 8 및 도 9). 시간 일치된 대조군과 비교된 3 내지 6 mmHg의 초기 절대 압력 강하(표 29) 및 ~ 10 mmHg의 상대 압력(도 8)은 REGN9035, REGN9037 또는 REGN6580의 정맥내 투약 후 시간 내에 역전되었다(도 9). REGN9035, REGN9037 또는 REGN6580의 피하 전달은 역전 제제 투여 후 24시간 내에 완전한 역전을 달성하였다(도 9). 역전의 지속성은 R5381 및 아이소타입 대조군 mAb가 투여된 동물과 비교할 때 REGN9035 또는 REGN9037이 투약된 동물에 대한 모든 혈류역학적 매개변수의 통계학적으로 유의미한 차이로 연구의 20일 지속기간 동안 유지되었다(표 30, 도 8). PBS 대조군 동물과 비교할 때, REGN9035, REGN9037 또는 REGN6580 중 어느 하나의 투여 후 통계학적으로 유의미한 차이가 주목되지 않았고(표 30, 도 8), 이는 R5381 유도된 혈압 저하 효과의 완전하고 지속적인 역전을 나타낸다. R5381에 의해 유도된 혈압 감소는 아마도 $NPR1$ 효능작용에 의해 유도된 좌심실 후부하 감소의 결과인 더 작은 심장 중량(하기 표 31)을 생성시켰다.

표 31: 절대 및 상대 심장 중량

그룹	시험 물품:	구제 물품	구제 용량 경로	심장 중량 (mg)	뇌 중량 (mg)	경골 길이 (mm)	심장 중량 : 뇌 중량	심장 중량 : 경골 길이
1	PBS	PBS	i.v.	126±0	482±0	17.4±0	0.26±0	7.2±0
2	R5381	아이소타입 대조군 mAb	s.c.	112±0	481±0	17.8±0	0.23±0	6.3±0
3				128±0	476±0	17.6±0	0.27±0*	7.3±0*
4				126±0	463±0	17.6±0	0.27±0*	7.1±0
5				133±0*	468±0	17.8±0	0.28±0**	7.5±0**
6		REGN6580	i.v.	120±0	472±1	17.7±0	0.25±1	6.8±0
7				125±0	476±0	17.8±0	0.26±0	7.0±0
8				125±0	463±1	17.4±0	0.27±1*	7.2±0

원격측정된 정상압 $NPR1^{hu/hu}$ 마우스를 수축기 혈압 및 체중에 기초하여 그룹으로무작위화하였다. 동물에게 표 28에 기재된 것과 같이 $NPR1$ 효능제 mAb R5381 또는 PBS의

단일 5 mg/kg 피하 주사를 주었다. 모든 것은 평균 ± SEM, 그룹마다 n=4-5이다. 통계학 -

듀넷에 의한 1방향 ANOVA: 아이소타입 대조군에 대해 *p<0.05; 아이소타입 대조군에 대해

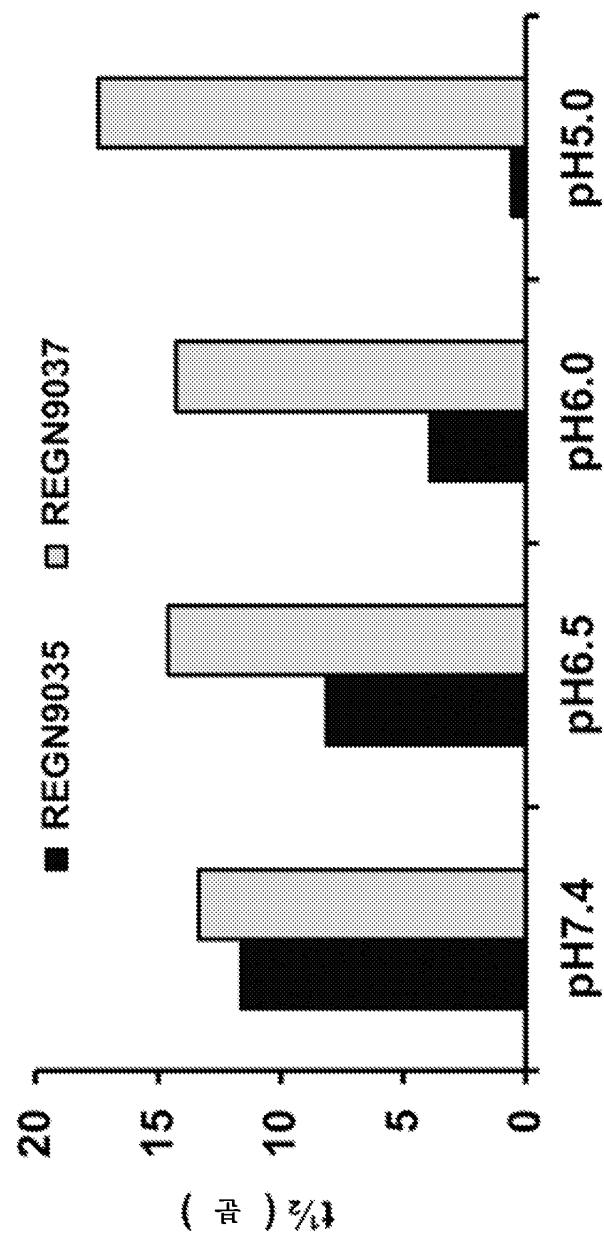
**p<0.01.

[0323]

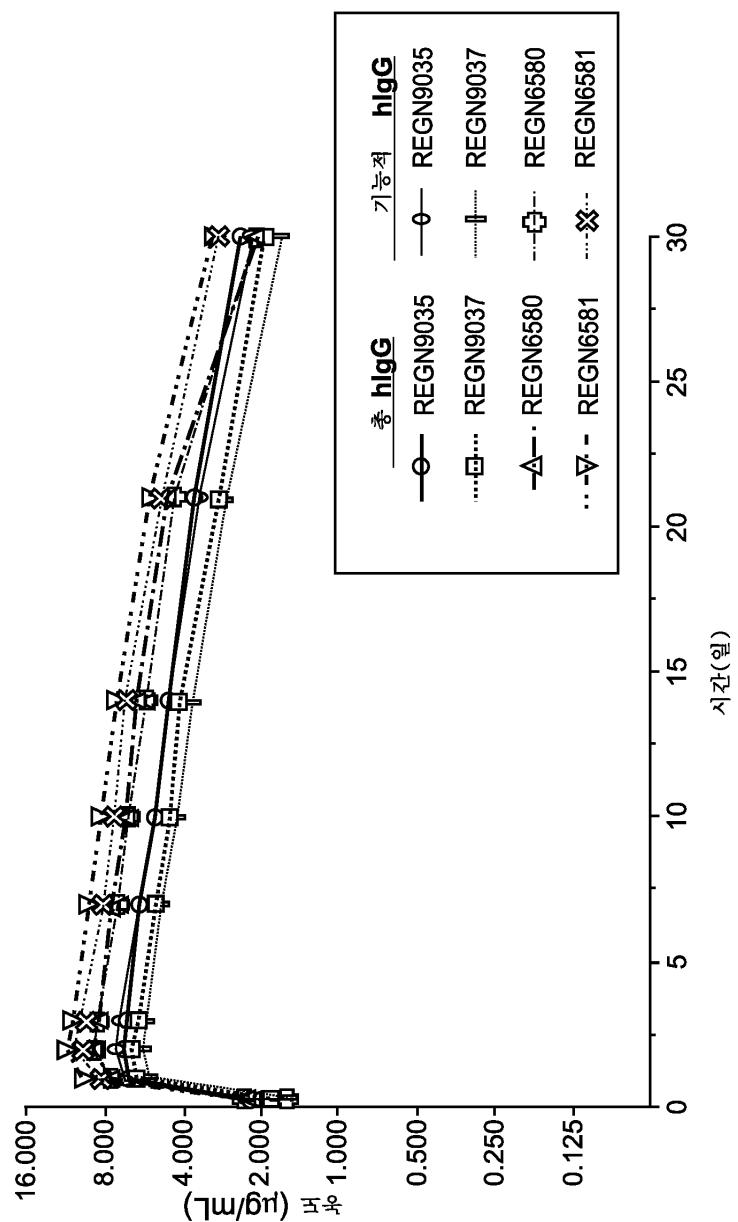
- [0324] REGN9035, REGN9037 또는 REGN6580인 임의의 역전 제제의 투여 후 심근 구조 변경이 개선되었다(표 31). 마지막으로, 모든 항-R5381 mAb는 22일 후에 피하 또는 정맥내 투여에 의한 cGMP의 통계학적으로 유의미한 감소에 의해 표시된 것처럼 NPR1 신호전달의 약화를 나타냈다(도 10).
- [0325] 2가 및 1가 항-R5381 항체 REGN6580 및 REGN9035 및 REGN9037 둘 다는 각각 R5381의 단일 용량을 받은 정상암 NPR1^{hu/hu} 마우스에 대한 연구 제3일에 단일 피하 또는 정맥내 주사 후 연구 제21일에 걸쳐 R5381의 혈압 저하 효과를 신속하게 그리고 지속적으로 역전시키고, NPR1 유도된 cGMP 생성을 억제하였다.
- [0326] **실시예 14. 원격측정된 시아노몰거스 원숭이에서 R5381의 단일 정맥내 용량 후 미도드린 구제**
- [0327] 시아노몰거스 원숭이에서 R5381의 혈압 저하 효과를 일시적으로 역전시키기 위한 효과적인 제제로서 미도드린인 알파-아드레날린 성 수용체 효능제를 평가하기 위해 생체내 연구를 수행하였다. 3일 후에 25 mg/kg의 R5381의 단일 IV 볼루스를 받은 동물에게 각각의 용량 사이의 3시간 내지 4시간으로 경구 위관영양에 의해 2.5 mg/kg의 미도드린의 3개의 용량을 투여하였다. 각각의 동물에 대해 기준선으로서 작용한 투약 전 측정인 혈류역학적 변경에 대해 평가하기 위해 미도드린 투약 후 1일을 포함하여 R5381 투약 후 4일 동안 동물을 모니터링하였다. 미도드린은 시간 일치된 대조군 수준으로 R5381 유도된 평균 수축기 혈압 감소를 일시적으로 역전시켰다. 미도드린은 또한 R5381 유도된 평균 심박수 상승을 일시적으로 역전시키고, R5381 투약된 동물에서 기준선 심박수로부터의 평균 감소를 생성시켰다.
- [0328] 구체적으로는, 정상암 원격측정된 수컷 시아노몰거스 원숭이에서 R5381의 혈압 효과를 일시적으로 역전시키기 위한 제제로서의 혈관수축제의 투여의 유용성의 평가는 특히 R5381에 대한 환자가 이들의 혈압이 증가될 필요가 있을 수 있는 임상 설정(예를 들면, 쇼크 유도된 저혈압)과 관련된다. 용량 투여 전에, 각각의 동물에게 전파 원격측정 송신기를 수술로 이식하였다. 제0일에, 동물은 각각 식염수(PBS; n=10) 또는 25 mg/kg의 R5381(n=13)의 단일 IV 볼루스를 받았다. 제3일에, 동물은 각각 경구 위관영양에 의해 투여된 미도드린인 알파-아드레날린 성 수용체 효능제(식염수 그룹에 대해 n=6; R5381 그룹에 대해 n=7) 또는 물/비히클(식염수 그룹에 대해 n=4; R5381 그룹에 대해 n=6)의 3개의 2.5 mg/kg 용량을 받았고, 각각의 용량은 3시간 내지 4시간 떨어졌다. 심혈관 혈류역학적 변경을 평가하기 위해 48시간 동안 동물을 모니터링하였다. R5381 투약 전 제-3일에서 R5381 투약 후 제4일에 각각의 동물에 대해 혈압 및 심박수 측정을 수집하였다. 투약 전 측정은 각각의 동물에 대한 기준선으로서 작용하였다.
- [0329] **결과**
- [0330] 미도드린은 시아노몰거스 원숭이에서 R5381의 혈압 및 심박수 효과를 역전시켰다. 미도드린의 3개의 용량은 R5381 유도된 평균 수축기 혈압 감소를 일시적으로 역전시켰고, 미도드린을 받은 R5381 투약된 동물은 미도드린을 받지 않은 식염수 투약된 동물에서 관찰된 것과 비교하여 기준선 수축기 혈압으로부터의 유사한 평균 변경을 나타낸다(도 11).
- [0331] 게다가, 미도드린의 3개의 용량은 R5381 유도된 평균 심박수 상승을 역전시켰다. 미도드린의 투여는 R5381 투약된 동물에서 기준선 심박수로부터의 평균 감소를 생성시켰고; 미도드린이 투여된 식염수 용량 동물에서 유사한 효과가 관찰되었다(도 12).
- [0332] 본 개시내용은 본원에 기재된 특정 실시형태에 의해 범위에서 제한되지 않아야 한다. 실제로, 본원에 기재된 것 이외의 다양한 변형은 상기 설명 및 동반된 도면으로부터 당업자에게 자명할 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구항의 범위 내에 해당하도록 의도된다.

도면

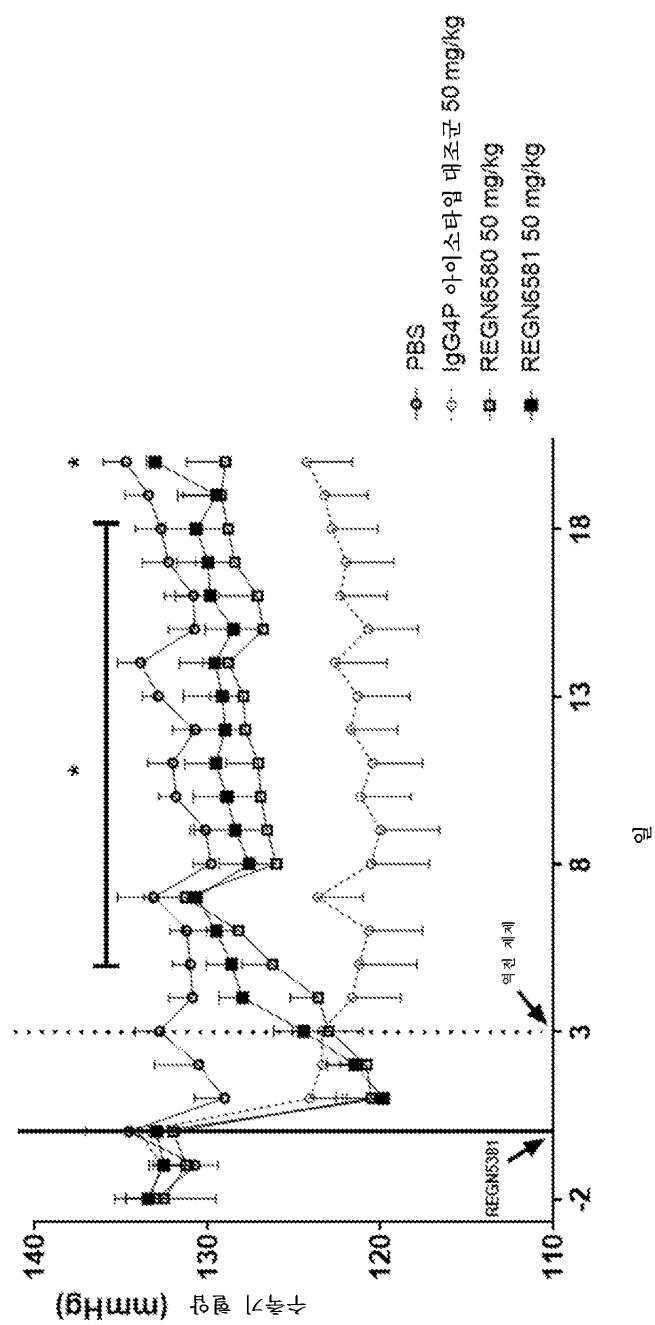
도면1



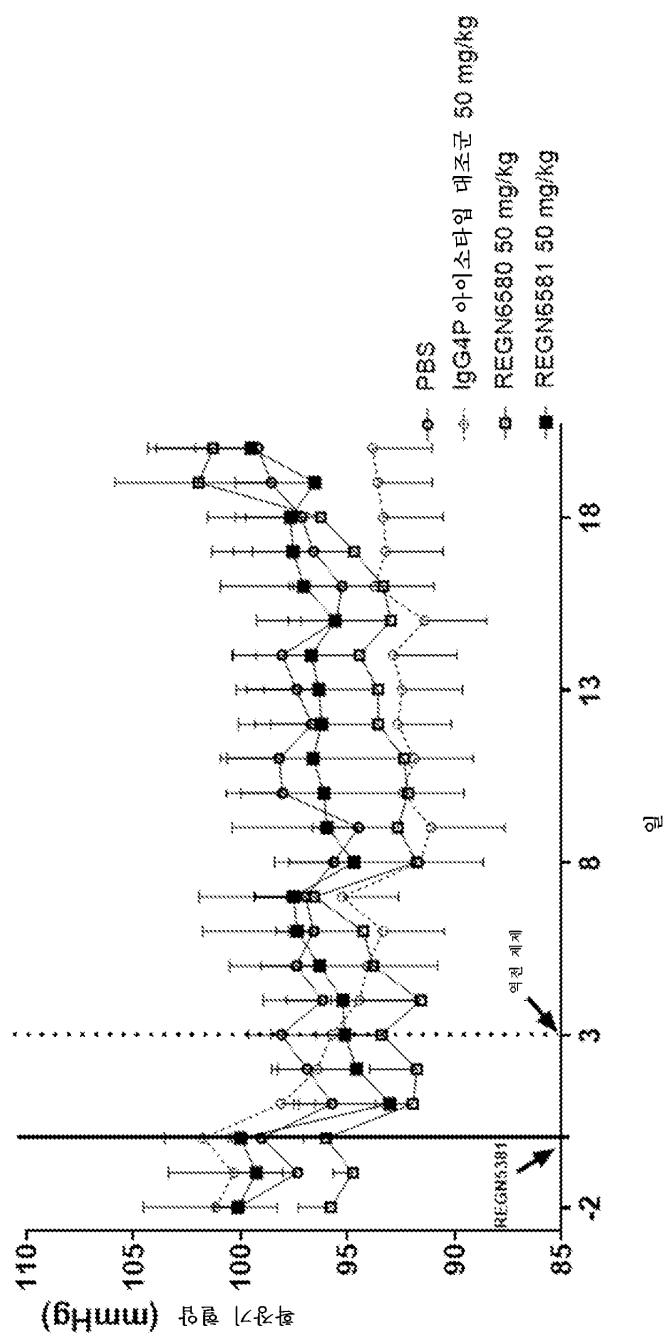
도면2



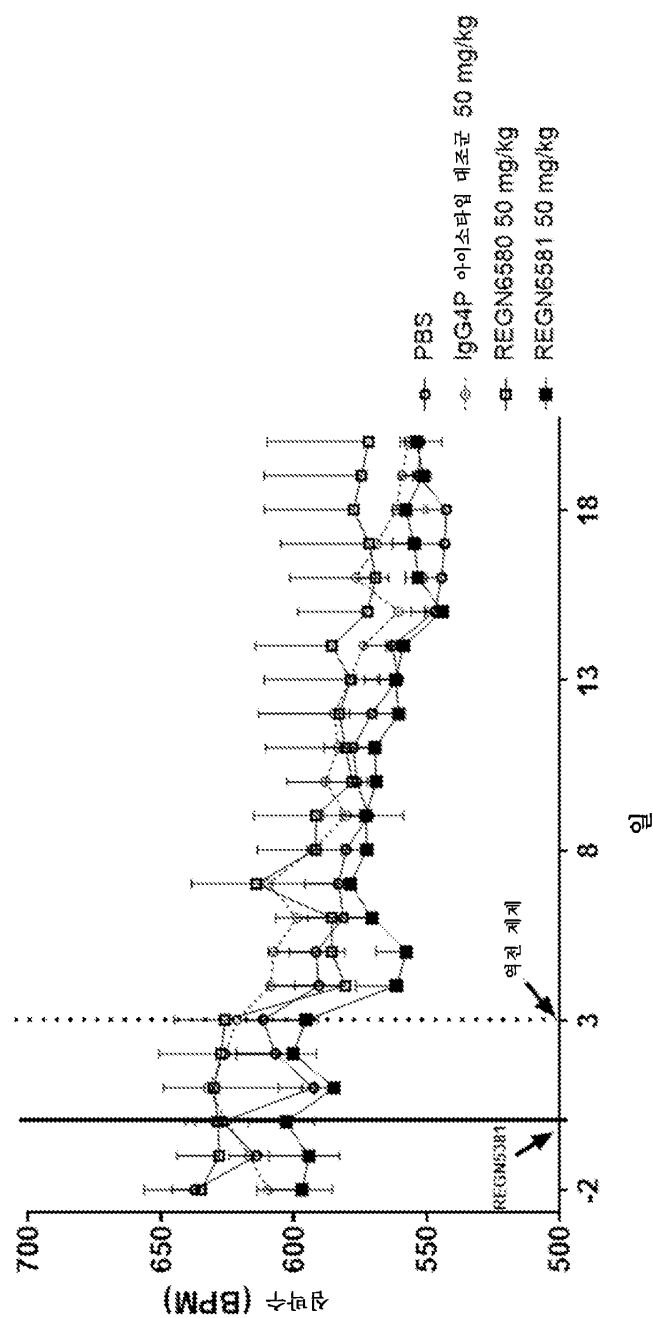
도면3



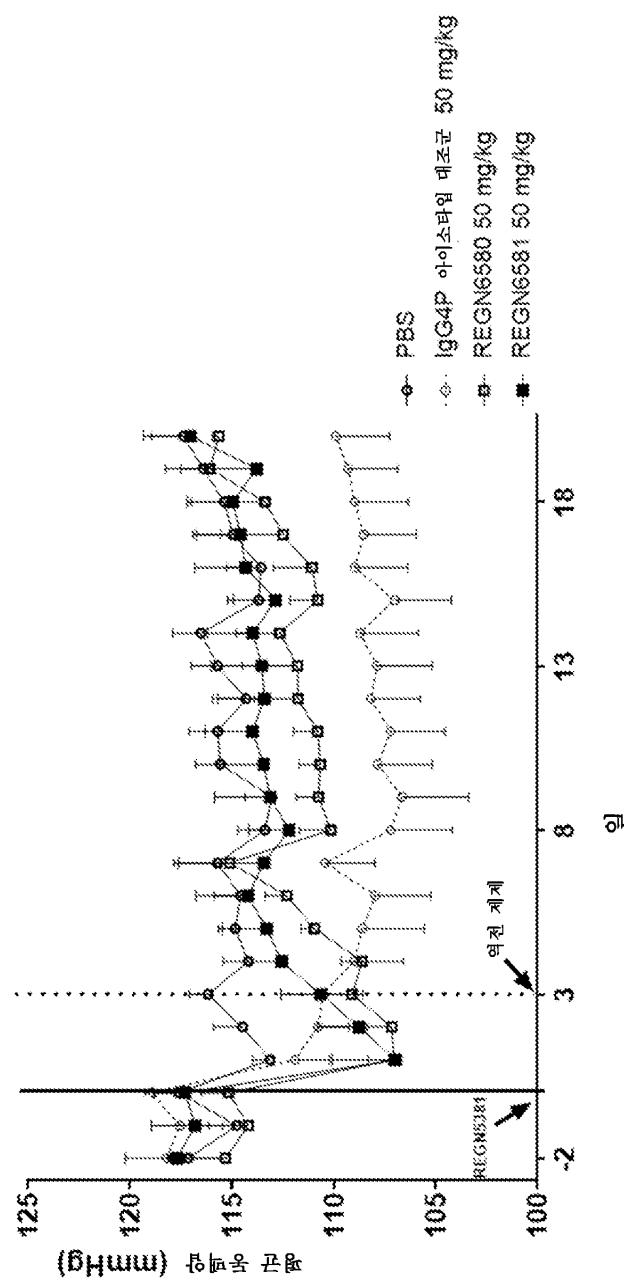
도면4



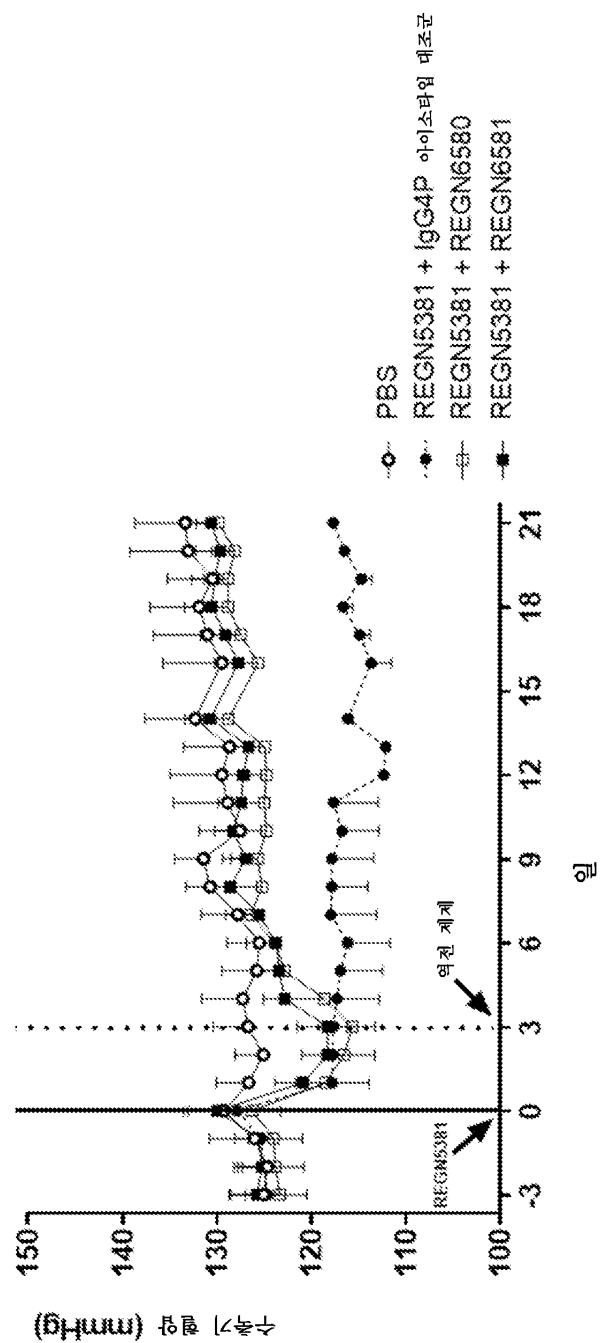
도면5



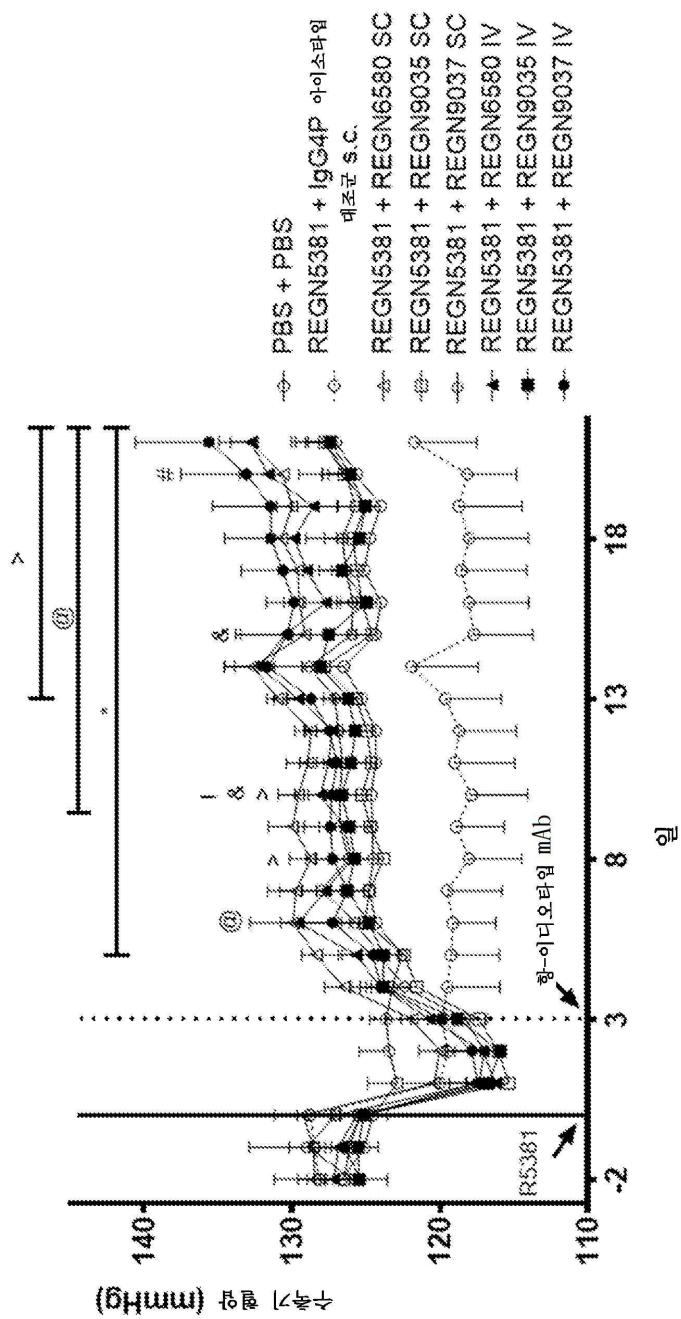
도면6



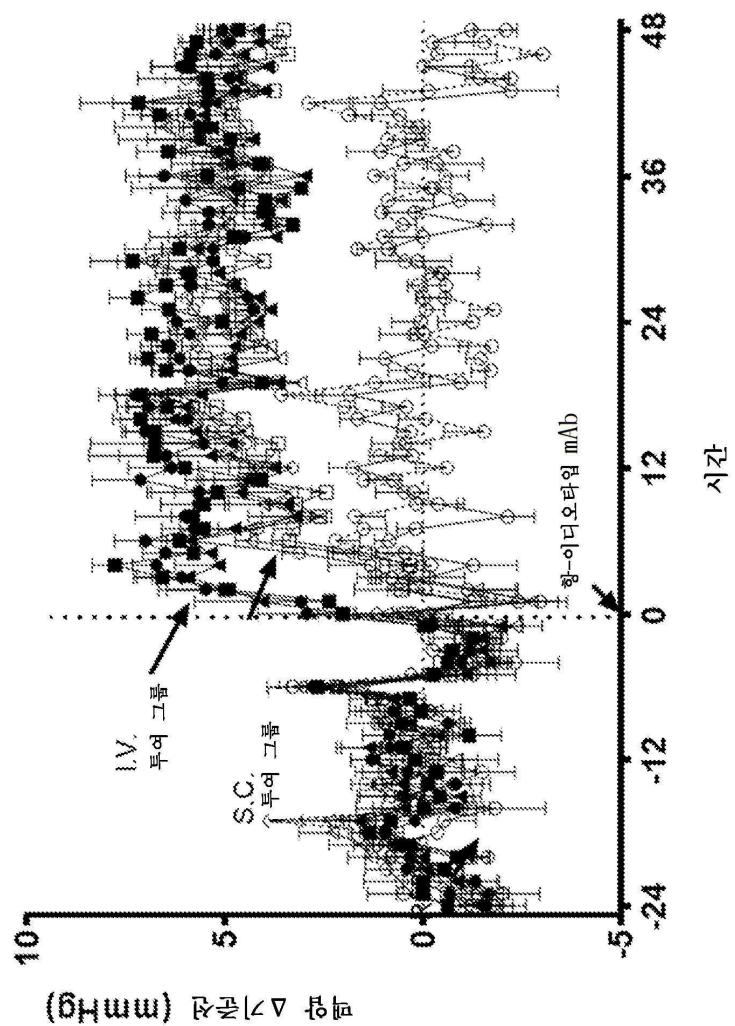
도면7



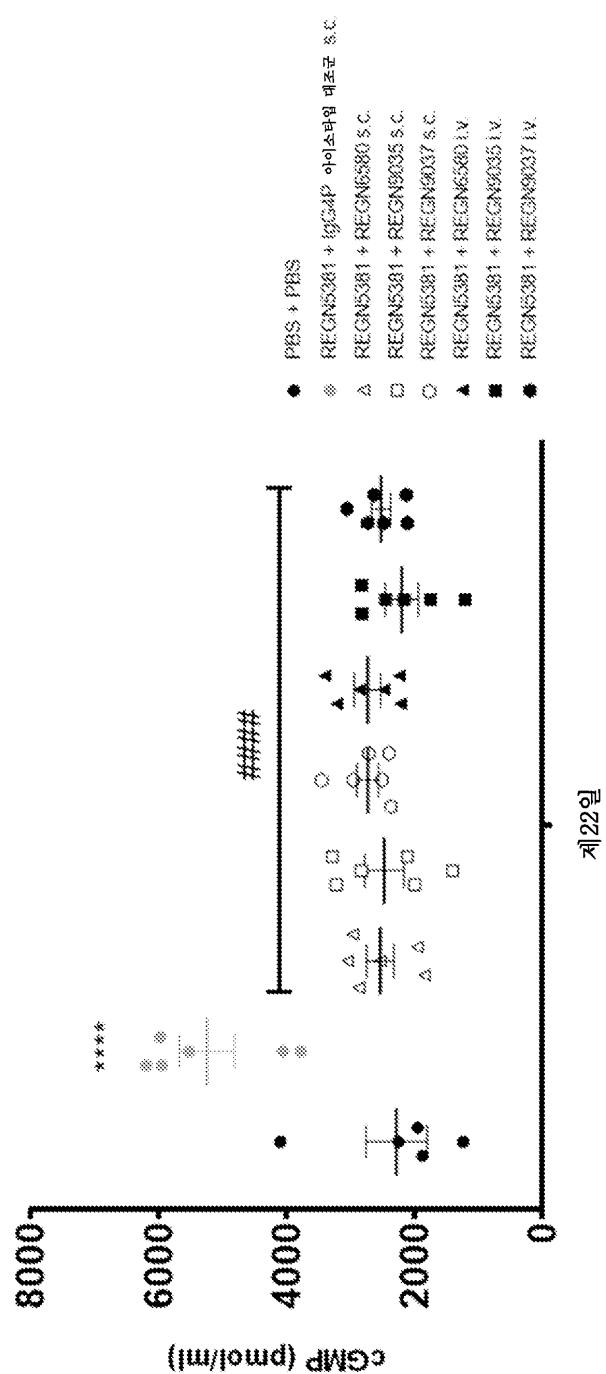
도면8



도면9

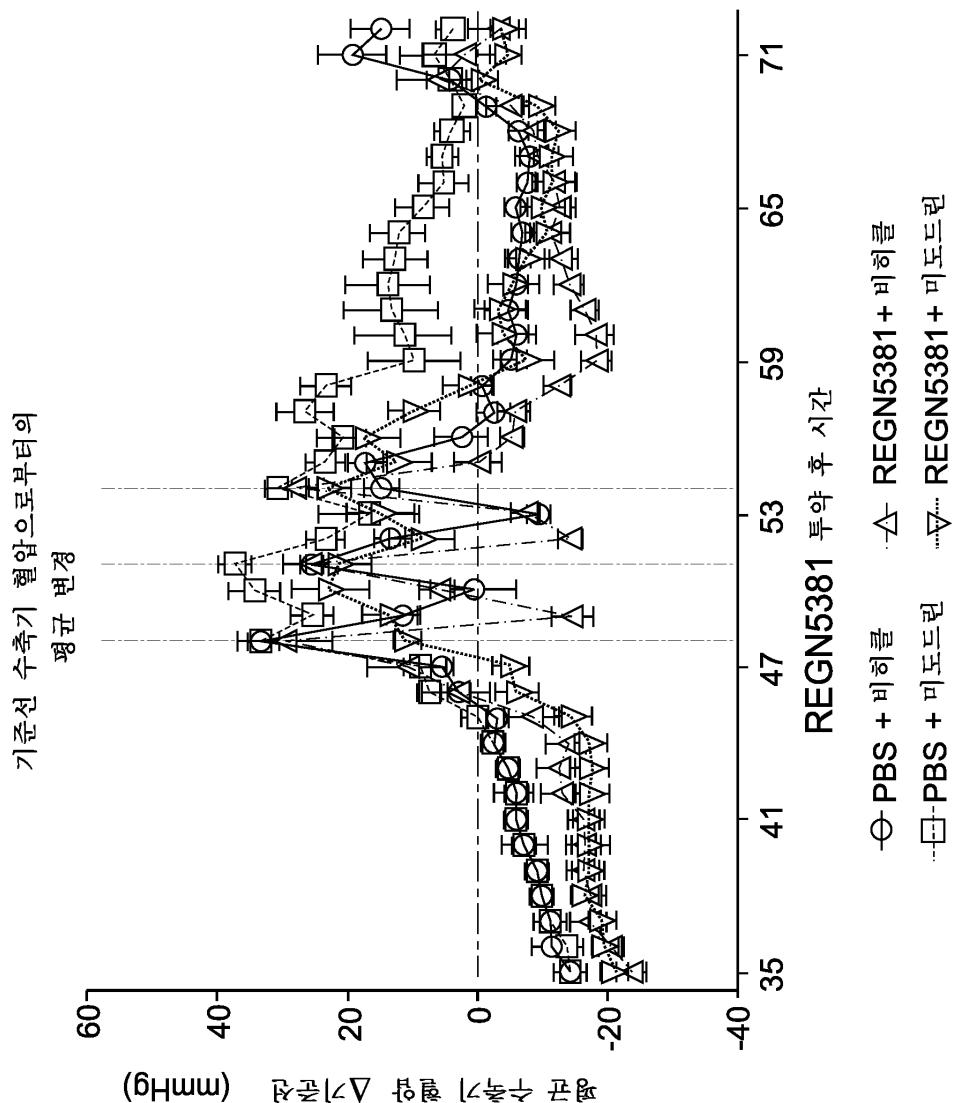


도면10

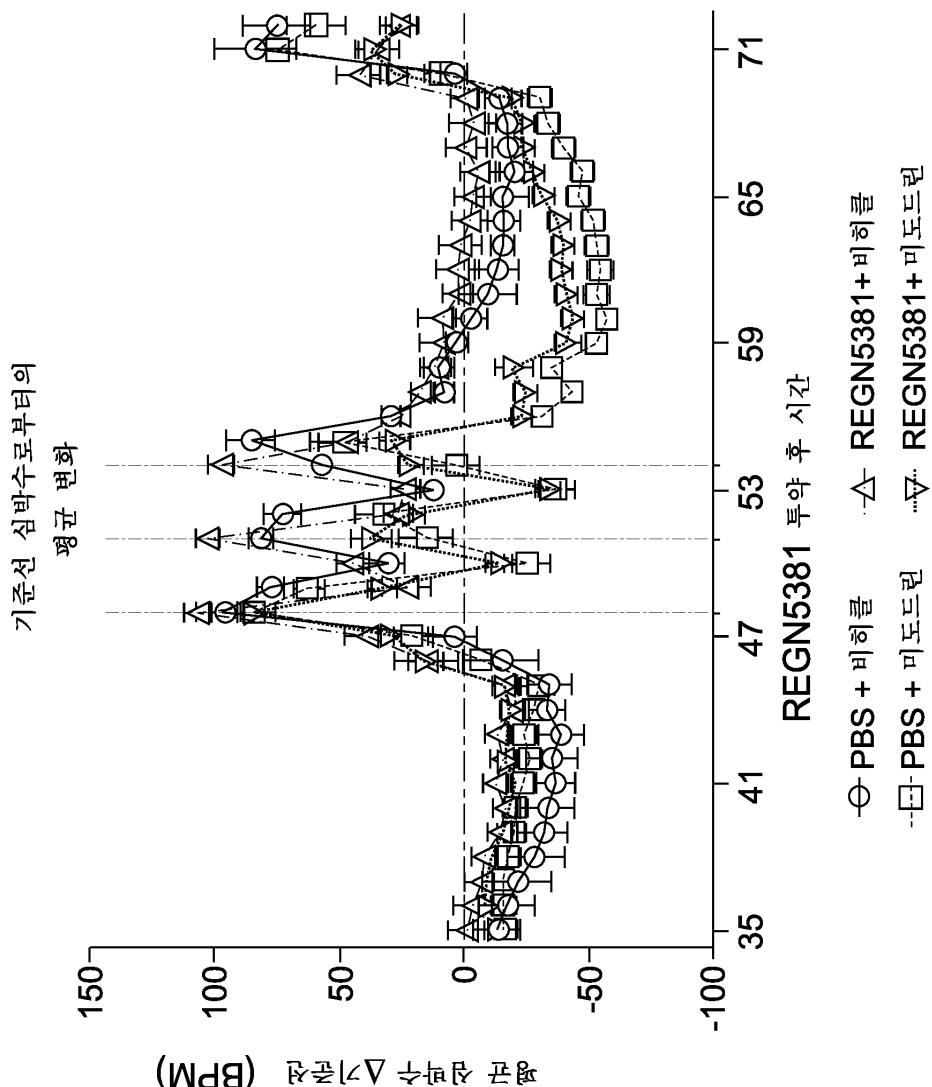


제22회

도면11



도면12



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.

<120> IMMUNOGLOBULIN PROTEINS THAT BIND TO NPR1 AGONISTS

<130> 40848.0104WOU1

<140><141><150> 63/127,959

<151> 2020-12-18

<160> 59

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 1

caggtgcagc tggtgaggc tgggggaggc gtggccagc ctgggaggc cctgagactc	60
tcctgtcag cgtctggatt cacttcagt agctatggca tgcaactgggt ccgcaggct	120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggactt atatggttt atggagggtta taaatactat	180
gcagactccg tgaaggcccg attaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctccaaatga acagcctgag agccgacgac acggctgtgtt attactgtgc gagaggttcc	300
gcagcagctg gccacgttcc gtttactac tggggccagg gaatcctgggt caccgtctcc	360
tca	363

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 2

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Leu Ile Trp Phe Asp Gly Gly Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Arg Gly Ser Ala Ala Ala Gly His Val Pro Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110
 Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 3

ggattcacct tcagtagcta tggc 24

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1 5

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 5

atatggttt atggagggtta taaa 24

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 6
Ile Trp Phe Asp Gly Gly Tyr Lys
1 5
<210> 7
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223>
> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"
<400> 7
gcgagagggtt ccgcagcagc tggccacgtt ccgttgact ac 42
<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"
<400> 8
Ala Arg Gly Ser Ala Ala Ala Gly His Val Pro Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 9
<211> 318
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 9

gacatccaga	tgaccaggc	tccttccacc	ctgtctgcat	ctgttaggaga	cagggtcacc	60
atcaacttgtc	gggcaggta	gagtattagt	agttggttgg	cctggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctataag	gcgtctagtt	tagaaagtgg	ggtccccatca	180
aggttcagcg	gcagtggtac	tgagacagaa	ttcactctca	ccatcagcag	cctgcagcct	240
gatgatttg	caacttatta	ctgccaacag	tataatagtt	attggacgtt	cggcccaggg	300
accaagggtgg	aaatcaaa					318

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 10

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Trp Thr

85	90	95
----	----	----

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100	105
-----	-----

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 11

cagagtatta gtagttgg 18

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 12

Gln Ser Ile Ser Ser Trp

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221>

> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 13

aaggcgtct 9

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 14

Lys Ala Ser

1

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 15

caacagtata atagttattg gacg

24

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 16

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Trp Thr

1

5

<210> 17

<211> 1347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 17

caggtgcagc tggtgagtc tggggaggc gtggccagc ctggagggtc cctgagactc

60

tcctgtgcag cgtctggatt cacctttagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct

120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcactt atatggttt atggaggtta taaatactat	180		
gcagactcg tgaagggccg attaccate tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240		
ctccaaatga acagccttag agccgacgac acggctgtgt attactgtgc gagaggttcc	300		
gcagcagctg gccacgttcc gtttgactac tggggcagg gaatccgtgt caccgttcc	360		
tcaagcctcca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc	420		
gagagcacag ccgcctggg ctgcctggc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg	480		
tcgttgaact caggccct gaccagcggc gtgcacacct tccggctgt cctacagtcc	540		
tcaggactct actcccttag cagcgtggt accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag	600		
acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagtttag	660		
tccaaatatg gtccccatg cccaccctgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca	720		
gtcttctgt tccccccaaa acccaaggac actctcatga tctccggac ccctgaggtc	780		
acgtgcgtgg tggtgacgt gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtagtgc	840		
gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg	900		
taccgtgtgg tcagcgtctt caccgtctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac	960		
aagtgcagg tctccaacaa aggccctcccg tcctccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	1020		
aaagggcage cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccaggaa ggagatgacc	1080		
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg	1140		
gagtgggaga gcaatggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1200		
tccgacggct ccttcttctt ctacagcagg ctcaccgtgg acaagagcag gtggcaggag	1260		
ggaaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag	1320		
tccctctccc tgctctggg taaatga	1347		
<210> 18			
<211> 448			
<212> PRT			
<213> Artificial Sequence			
<220><221> source			
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"			
<400> 18			
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Leu Ile Trp Phe Asp Gly Gly Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Ser Ala Ala Ala Gly His Val Pro Phe Asp Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260	265	270
Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
275	280	285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
290	295	300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Tyr		
305	310	315
320		
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr		
325	330	335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
340	345	350
Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
355	360	365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
370	375	380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
385	390	395
400		
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser		
405	410	415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
435	440	445
<210> 19		
<211> 642		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"		
<400> 19		

gacatccaga tgacctcacc ctgtctgcat ctgttaggaga cagggtcacc 60

atcacttgc gggccagtca gagtattagt agttggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcgtctagtt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgagacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagect 240
 gatgatgg caacttatta ctgccaacag tataatagtt attggacggtt cgccccagg 300
 accaagggtgg aaatcaaacg aactgtggct gcaccatctg tttcatctt cccgcatct 360
 gatgagcgt tgaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420
 agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgcctcc aatcggtaa ctcccaggag 480

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540
 agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtccacca tcagggcctg 600
 agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 642

<210> 20

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 20

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Trp Thr

85 90 95

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys

210
 <210> 21
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<400> 21
 cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaaagc cttcgagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgc ctccatcagt acttactact ggagctggat ccggcagccc 120
 ccagggagg gactggaggta gattgggtat atttattaca gtgggaccac taactacaat 180
 ccctccctca agatcgagt caccattca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aaattgagct ctgtgaccgc tgccggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agataggggt 300
 ggctacgatg gggagtgggg ccaggaaacc ctggtcaccc tctcctca 348

<210> 22

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 22

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser Thr Tyr

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Glu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 23

ggtgccctcca tcagtagtta ctac 24

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 24

Gly Ala Ser Ile Ser Thr Tyr Tyr

1 5

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 25

atttattaca gtgggaccac t 21

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 26

Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr

1 5

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 27

gcgagagata ggggtggcta cgatggggag	30
----------------------------------	----

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide"

<400> 28

Ala Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Glu

1	5	10
---	---	----

<210> 29

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 29

gacatcgta tgaccaggc tccagactcc ctggctgtgt ctctggcga gagggccacc	60
--	----

atcaactgca agtccagcca gagtgttta tacagctcca acaataagaa ctacttaact	120
--	-----

tggtaccaggc agaaaccagg acagcctctt aagctgctca ttactggc gtctacccgg	180
--	-----

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cacttcacc	240
--	-----

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatactact	300
---	-----

ccgttcaatt tcggcggagg gaccaagggtg gagatcaaa	339
---	-----

<210> 30

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 30

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50	55	60
----	----	----

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65	70	75	80
----	----	----	----

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

Lys

<210> 31

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 31

cagagtgttt tatacagctc caacaataag aactac	36
---	----

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 32

Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr

1 5 10

<210> 33

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 33

tggcgctt 9

<210> 34

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 34

Trp Ala Ser

1

<210> 35

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"

<400> 35

cagcaatatt atactactcc gttcact

27

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 36
Gln Gln Tyr Tyr Thr Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 37

<211> 1332

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 37

caggtgcgc	tgcaggagtc	gggcccagga	ctggtaagc	cttcggagac	cctgtccctc	60
acctgcactg	tctctggtgc	ctccatca	acttactact	ggagctggat	ccggcagccc	120

ccagggaaagg	gactggagtg	atttgggtat	atttattaca	gtgggaccac	taactacaat	180
ccctccctca	agagtgcagt	caccatttca	gtagacacgt	ccaagaacca	gttctccctg	240
aaatttgagct	ctgtgaccgc	tgcggacacg	gccgtgtatt	actgtgcgag	agataggggt	300
ggctacgatg	gggagtgggg	ccagggaaacc	ctggtcaccg	tctcctcage	ctccaccaag	360
ggcccatcg	tctccccct	ggcgccctgc	tccaggagca	cctccgagag	cacagccgcc	420
ctgggctgcc	tggtaagga	ctacttcccc	gaaccggta	cggtgtcgtg	gaactcaggc	480
gcctgacca	gccccgtgca	cacccccc	gctgtcctac	agtcctcagg	actctactcc	540

ctcagcagcg	tggtgaccgt	gccctccagc	agcttggca	cgaagaccta	cacctgcaac	600
gtagatcaca	agcccgacaa	caccaagggt	gacaagagag	tttagtccaa	atatggtccc	660
ccatgccac	cctgcccagc	acctgagttc	ctggggggac	catcagtctt	cctgttcccc	720
ccaaaaccca	aggacactct	catgatctcc	cggacccctg	aggtcacgtg	cgtggtggtg	780
gacgtgagcc	aggaagaccc	cgaggtccag	ttcaactggt	acgtggatgg	cgtggaggtg	840

cataatgcc a gacaaagcc gcgggaggag cagtcaaca gcacgtaccg tgtggtcagc	900
gtcctcaccc tccgtacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggctcc	960
aacaaaggcc tcccgctc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga	1020
gagccacagg tgtacacct gcccccatec caggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc	1080
ctgacctgcc tggtaaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtggagagcaat	1140
gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cttccgtgc tggactccga cggctccttc	1200
ttcctctaca gcaggctcac cgtggacaag agcaggtggc aggagggaa tgtttctca	1260
tgctccgtga tgcataaggc tctgcacaac cactacacac agaagtccct ctccctgtct	1320
ctggtaaat ga	1332

<210> 38

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 38

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser Thr Tyr

20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Glu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355

360

365

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

370

375

380

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

385 390 395 400

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

405

410

415

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

420

425

430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

435

440

<210> 39

<211> 663

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 39

gacatcgta tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctggcga gagggccacc	60
atcaactgca agtccagcca gagtgttta tacagctcca acaaataagaa ctacttaact	120
tggtaccagg agaaaccagg acagcctct aagctgctca ttactggc gtctaccgg	180
gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctacc	240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatactact	300
ccgttcaatt tcggcggagg gaccaagggtg gagatcaaac gaactgtggc tgcaccatct	360
gtcttcatct tcccgcattc tcatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgggtgtgc	420
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc	480
caatcggtt actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc	540
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc	600
gaagtccacc atcaggccct gagctcgccc gtcacaaaga gttcaacag gggagagtgt	660

tag	663
-----	-----

<210> 40

<211> 220

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 40

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

<210> 41

<211

> 1347

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 41

cagggtcggc	tgggtggagtc	tgggggaggc	gtgggtccagc	ctggggaggc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cgtctggatt	cacccatcgat	agctatggca	tgcactgggt	ccggccaggct	120
ccaggcaagg	ggctggagt	ggtggcac	ttatggttt	atggaggtta	taaaatactat	180
gcagactccg	tgaaggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctccaaatga	acagccttag	agccgacgac	acggctgtgt	attactgtgc	gagaggttcc	300

gcagcagctg	gccacgttcc	gttgactac	tggggccagg	gaatcctgg	caccgtctcc	360
ttagccagca	caaaagggtcc	tagcgaaaa	ccacttgc	catgttcaag	gtcaac	420
gaaagtaccg	ccgcttttgg	ctgtctcgta	aaagattatt	ttcccgaacc	tgtaactgtc	480
tcccttggaa	ccggcgcact	cacttccggc	gtacatacct	tccccgtgt	cctccaatct	540
tccgggtctct	actccctgtc	ttctgttgtc	actgttccat	catcctcact	cggcacaaaa	600
acatatacct	gcaacgttga	tcacaagcca	agtaatacc	aagttgataa	gcgcgtcgaa	660
tccaaaatacg	gtccccctg	ccccccatgt	cccgctccag	agtttctcg	tggccctct	720

gttttcctt ttccccctaa acccaaagat accctcatga tttccagaac ccccgaggc	780
acctgcgtcg tcgttgatgt aagccaagaa gatcccgaag tccagttcaa ttggtatgt	840
gacggtgttg aagtccataa tgcaaaaaca aaacccagag aggaacagtt taattcaacc	900
tatcgtgtcg ttagcgtact caccgttctt catcaagact ggctcaatgg aaaagaatat	960
aatgtaaag ttagcaacaa aggtctgcc agttcaatcg aaaaaacaat tagcaaagcc	1020
aaaggccaac ctgcgaacc ccaagtctat accttgc(cc) cttctcagga agaaatgacc	1080
aaaaaccaag ttctactcac atgcctcgta aaggattct atccatcaga cattgcagta	1140

gaatggaat ctaacggcca acctgaaaat aattacaaaa ccactcctcc tgtcctcgat 1200
 tctgacggct ctttttcct ttactccaga ttgactgtg ataaatcccg ctggcaggaa 1260
 ggtaacgtt ttcttggtc tgtgatgcac gaagccctcc ataacagatt cactcaaaaa 1320
 tcttttctc tctccctgg caaataa 1347

<210> 42

<211> 448

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 42

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

1	5	10	15												
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr

20	25	30													
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val

35	40	45													
Ala	Leu	Ile	Trp	Phe	Asp	Gly	Gly	Tyr	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val

50	55	60													
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr

65	70	75	80												
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys

85	90	95												
Ala	Arg	Gly	Ser	Ala	Ala	Gly	His	Val	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly

100	105	110													
Gln	Gly	Ile	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser

115	120	125													
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala

130	135	140													
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 210 215 220
 Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser

405	410	415
Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
420	425	430
Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210> 43		
<211> 1332		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 43

caggtgcagc tgcaaggagtc gggcccagga ctggtaagc cttcgagac cctgtccctc	60
acctgcactg tctctggtgc ctccatcagt acttactact ggagctggat cggcagcccc	120
ccagggaaagg gactggagtg gattgggtat atttattaca gtgggaccac taactacaat	180
ccctccctca agagtcgagt caccattca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg	240
aaatttgagct ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agataggggt	300
ggctacgatg gggagtgggg ccagggAACc ctggcacccg tctccctcagc cagcacaaaa	360

ggtcctagcg ttttccact tgccccatgt tcaaggtaa cctccgaaag taccggcgct	420
cttggctgtc tcgtaaaaga ttatttccc gaacctgtaa ctgtctcctg gaactccggc	480
gcactcaattt ccggcgtaca tacttcccc gctgtctcc aatcttccgg tctctactcc	540
ctgtttctg ttgtcaactgt tccatcatcc tcactcggca caaaaacata tacctgcaac	600
gttgcataca agccaagtaa taccaaagtt gataaggcg cgatccaa atacggtccc	660
ccctggcccc catgtccgc tccagagttt ctggggcc cctctgtttt ccttttccc	720
cctaaaccca aagataaccct catgattcc agaaccccc aggtcacctg cgtcgtcggt	780

gatgtaaGCC aagaagatcc cgaagtccag ttcaatttgtt atgttagacgg tggtgaagtc	840
cataatgcaa aaacaaaacc cagagaggaa cagtttaattt caacctatcg tgtcgtagc	900
gtactcaccc ttcttcatca agactggctc aatggaaaag aatataaatg taaagtttagc	960
aacaaaggta tggccagttc aatcgaaaaa acaatttagca aagccaaagg ccaacctcg	1020
gaaccccaag tctatacctt gcccccttct caggaagaaa tgaccaaaaa ccaagttca	1080
ctcacatgcc tcgtaaaagg attctatcca tcagacattg cagtagaaatg ggaatcta	1140

ggccaacctg aaaataatta caaaaccact ctcctgtcc tcgattctga cggtctttt 1200

ttccttact ccagattgac tggataaa tcccgctggc aggaaggtaa cggttttct 1260

tgttgtga tgacgaaagc ctcataac agattcactc aaaaatctt ttctctcc 1320

cctggcaat aa 1332

<210> 44

<211> 443

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 44

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ala Ser Ile Ser Thr Tyr

20	25	30
----	----	----

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35	40	45
----	----	----

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Arg Asp Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Glu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
165	170	175	
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu			
180	185	190	
Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr			
195	200	205	
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro			
210	215	220	
Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro			
225	230	235	240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr			
245	250	255	
Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn			
260	265	270	
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg			
275	280	285	
Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val			
290	295	300	
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser			
305	310	315	320
Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys			
325	330	335	
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu			
340	345	350	
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe			
355	360	365	
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu			
370	375	380	
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe			
385	390	395	400

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

405 410 415

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

420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435 440

<210> 45

<211> 690

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 45

gagtccaaat atggcccccc atgcccaccc tgcccagcac ctgagttctt gggggggacca	60
tcatgtttcc tttttcccccc aaaacccaag gacactctca tttttttttt gacccttgag	120
gtcacgtgcg ttgtggtgga cgtgagccag gaagaccccg aggtccagtt caactggtag	180
gtggatggcg tggagggtgca taatgccaag acaaaggccgc gggaggagca gttcaacagc	240
acgtaccgtg ttgtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag	300
tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc ccgttccca tcgagaaaac catctccaa	360
gccaaagggc agcccccaga gcccacaggta tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg	420

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaaggct tttttttttt cgacatcgcc	480
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tccctgtctg	540
gactccgacg gtccttctt cctctacagc aggctaccg tggacaagag caggtggcag	600
gaggggaaatg tttttttttt ccgttccatg ctccgtatg catgaggctc tgcacaacca ctacacacag	660
aagtccctct ccctgtctt gggtaaatga	690

<210> 46

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 46

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 47

<211> 469

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 47

Gly Asn Leu Thr Val Ala Val Val Leu Pro Leu Ala Asn Thr Ser Tyr

1	5	10	15
Pro Trp Ser Trp Ala Arg Val Gly Pro Ala Val Glu Leu Ala Leu Ala			
20	25	30	
Gln Val Lys Ala Arg Pro Asp Leu Leu Pro Gly Trp Thr Val Arg Thr			
35	40	45	
Val Leu Gly Ser Ser Glu Asn Ala Leu Gly Val Cys Ser Asp Thr Ala			
50	55	60	
Ala Pro Leu Ala Ala Val Asp Leu Lys Trp Glu His Asn Pro Ala Val			
65	70	75	80
Phe Leu Gly Pro Gly Cys Val Tyr Ala Ala Ala Pro Val Gly Arg Phe			
85	90	95	
Thr Ala His Trp Arg Val Pro Leu Leu Thr Ala Gly Ala Pro Ala Leu			
100	105	110	
Gly Phe Gly Val Lys Asp Glu Tyr Ala Leu Thr Thr Arg Ala Gly Pro			
115	120	125	
Ser Tyr Ala Lys Leu Gly Asp Phe Val Ala Ala Leu His Arg Arg Leu			
130	135	140	
Gly Trp Glu Arg Gln Ala Leu Met Leu Tyr Ala Tyr Arg Pro Gly Asp			
145	150	155	160
Glu Glu His Cys Phe Phe Leu Val Glu Gly Leu Phe Met Arg Val Arg			
165	170	175	
Asp Arg Leu Asn Ile Thr Val Asp His Leu Glu Phe Ala Glu Asp Asp			
180	185	190	

Leu Ser His Tyr Thr Arg Leu Leu Arg Thr Met Pro Arg Lys Gly Arg

195 200 205

Val Ile Tyr Ile Cys Ser Ser Pro Asp Ala Phe Arg Thr Leu Met Leu

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Asp Ile Phe Gly Gln Ser Leu Gln Gly Gln Gly Pro Ala Pro

245 250 255

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

260 265 270

Ala Phe Gln Ala Ala Lys Ile Ile Thr Tyr Lys Asp Pro Asp Asn Pro

275 280 285

Glu Tyr Leu Glu Phe Leu Lys Gln Leu Lys His Leu Ala Tyr Glu Gln

290 295 300

Phe Asn Phe Thr Met Glu Asp Gly Leu Val Asn Thr Ile Pro Ala Ser

305 310 315 320

Phe His Asp Gly Leu Leu Tyr Ile Gln Ala Val Thr Glu Thr Leu

325 330 335

Ala His Gly Gly Thr Val Thr Asp Gly Glu Asn Ile Thr Gln Arg Met

340 345 350

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

355 360 365

Ser Gly Asp Arg Glu Thr Asp Phe Ser Leu Trp Asp Met Asp Pro Glu

370 375 380

Asn Gly Ala Phe Arg Val Val Leu Asn Tyr Asn Gly Thr Ser Gln Glu

385 390 395 400

Leu Val Ala Val Ser Gly Arg Lys Leu Asn Trp Pro Leu Gly Tyr Pro

405 410 415

Pro Pro Asp Ile Pro Lys Cys Gly Phe Asp Asn Glu Asp Pro Ala Cys

420 425 430

Asn Gln Asp His Leu Ser Thr Leu Glu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu

435

440

445

Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His

450

455

460

His His His His His

465

<210> 48

<211> 124

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 48

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Lys Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Ser Ala Gln Arg Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ile Thr Met Thr Trp Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Gly Gly Pro Val Met Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 49

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 50

Ile Lys Pro Asn Ser Gly Gly Thr

1 5

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 51

Ser Arg Gly Gly Pro Val Met Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

1 5 10 15

Val

<210> 52

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 52

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 53

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 53

Gln Ser Ile Asp Ser Tyr

1 5

<210> 54

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 54

Val Ala Ser

1

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 55

Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Thr

1 5

<210> 56

<211> 451

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 56

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Trp Ile Lys Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Ser Ala Gln Arg Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Ile Thr Met Thr Trp Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Gly Gly Pro Val Met Asn Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp

100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr

165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val

180 185 190

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

195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser

210 215 220

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325	330	335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
340	345	350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
355	360	365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
370	375	380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
385	390	395
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val		
400	405	410
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
435	440	445
Leu Gly Lys		
450		
<210> 57		
<211> 213		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><221> source		
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"		
<400> 57		
Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr		
20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ile Pro Thr

85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro

100 105 110

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

115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu

145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser

165 170 175

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

180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe

195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 58

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 58

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

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

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

180	185	190
-----	-----	-----

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

195	200	205
-----	-----	-----

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

210	215	220
-----	-----	-----

Leu Ser Pro Gly Lys

225

<210> 59

<211> 1061

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Met Pro Gly Pro Arg Arg Pro Ala Gly Ser Arg Leu Arg Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Leu Pro Pro Leu Leu Leu Leu Arg Gly Ser His Ala
 20 25 30
 Gly Asn Leu Thr Val Ala Val Val Leu Pro Leu Ala Asn Thr Ser Tyr
 35 40 45
 Pro Trp Ser Trp Ala Arg Val Gly Pro Ala Val Glu Leu Ala Leu Ala
 50 55 60
 Gln Val Lys Ala Arg Pro Asp Leu Leu Pro Gly Trp Thr Val Arg Thr
 65 70 75 80
 Val Leu Gly Ser Ser Glu Asn Ala Leu Gly Val Cys Ser Asp Thr Ala
 85 90 95
 Ala Pro Leu Ala Ala Val Asp Leu Lys Trp Glu His Asn Pro Ala Val
 100 105 110
 Phe Leu Gly Pro Gly Cys Val Tyr Ala Ala Ala Pro Val Gly Arg Phe
 115 120 125
 Thr Ala His Trp Arg Val Pro Leu Leu Thr Ala Gly Ala Pro Ala Leu
 130 135 140
 Gly Phe Gly Val Lys Asp Glu Tyr Ala Leu Thr Thr Arg Ala Gly Pro
 145 150 155 160
 Ser Tyr Ala Lys Leu Gly Asp Phe Val Ala Ala Leu His Arg Arg Leu
 165 170 175
 Gly Trp Glu Arg Gln Ala Leu Met Leu Tyr Ala Tyr Arg Pro Gly Asp
 180 185 190
 Glu Glu His Cys Phe Phe Leu Val Glu Gly Leu Phe Met Arg Val Arg
 195 200 205
 Asp Arg Leu Asn Ile Thr Val Asp His Leu Glu Phe Ala Glu Asp Asp
 210 215 220
 Leu Ser His Tyr Thr Arg Leu Leu Arg Thr Met Pro Arg Lys Gly Arg
 225 230 235 240

Val Ile Tyr Ile Cys Ser Ser Pro Asp Ala Phe Arg Thr Leu Met Leu

245 250 255

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

260 265 270

Leu Asp Ile Phe Gly Gln Ser Leu Gln Gly Gln Gly Pro Ala Pro

275 280 285

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

290 295 300

Ala Phe Gln Ala Ala Lys Ile Ile Thr Tyr Lys Asp Pro Asp Asn Pro

305 310 315 320

Glu Tyr Leu Glu Phe Leu Lys Gln Leu Lys His Leu Ala Tyr Glu Gln

325 330 335

Phe Asn Phe Thr Met Glu Asp Gly Leu Val Asn Thr Ile Pro Ala Ser

340 345 350

Phe His Asp Gly Leu Leu Tyr Ile Gln Ala Val Thr Glu Thr Leu

355 360 365

Ala His Gly Gly Thr Val Thr Asp Gly Glu Asn Ile Thr Gln Arg Met

370 375 380

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

385 390 395 400

Ser Gly Asp Arg Glu Thr Asp Phe Ser Leu Trp Asp Met Asp Pro Glu

405 410 415

Asn Gly Ala Phe Arg Val Val Leu Asn Tyr Asn Gly Thr Ser Gln Glu

420 425 430

Leu Val Ala Val Ser Gly Arg Lys Leu Asn Trp Pro Leu Gly Tyr Pro

435 440 445

Pro Pro Asp Ile Pro Lys Cys Gly Phe Asp Asn Glu Asp Pro Ala Cys

450 455 460

Asn Gln Asp His Leu Ser Thr Leu Glu Val Leu Ala Leu Val Gly Ser

465 470 475 480

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

485 490 495

Met Gln Leu Glu Lys Glu Leu Ala Ser Glu Leu Trp Arg Val Arg Trp

500 505 510

Glu Asp Val Glu Pro Ser Ser Leu Glu Arg His Leu Arg Ser Ala Gly

515 520 525

Ser Arg Leu Thr Leu Ser Gly Arg Gly Ser Asn Tyr Gly Ser Leu Leu

530 535 540

Thr Thr Glu Gly Gln Phe Gln Val Phe Ala Lys Thr Ala Tyr Tyr Lys

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

Glu His Leu Thr Arg Phe Val Gly Ala Cys Thr Asp Pro Pro Asn Ile

595 600 605

Cys Ile Leu Thr Glu Tyr Cys Pro Arg Gly Ser Leu Gln Asp Ile Leu

610 615 620

Glu Asn Glu Ser Ile Thr Leu Asp Trp Met Phe Arg Tyr Ser Leu Thr

625 630 635 640

Asn Asp Ile Val Lys Gly Met Leu Phe Leu His Asn Gly Ala Ile Cys

645 650 655

Ser His Gly Asn Leu Lys Ser Ser Asn Cys Val Val Asp Gly Arg Phe

660 665 670

Val Leu Lys Ile Thr Asp Tyr Gly Leu Glu Ser Phe Arg Asp Leu Asp

675 680 685

Pro Glu Gln Gly His Thr Val Tyr Ala Lys Lys Leu Trp Thr Ala Pro

690 695 700

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

705 710 715 720

Asp Val Tyr Ser Phe Gly Ile Ile Leu Gln Glu Ile Ala Leu Arg Ser

725 730 735

Gly Val Phe His Val Glu Gly Leu Asp Leu Ser Pro Lys Glu Ile Ile
 740 745 750
 Glu Arg Val Thr Arg Gly Glu Gln Pro Pro Phe Arg Pro Ser Leu Ala
 755 760 765
 Leu Gln Ser His Leu Glu Glu Leu Gly Leu Leu Met Gln Arg Cys Trp
 770 775 780
 Ala Glu Asp Pro Gln Glu Arg Pro Pro Phe Gln Gln Ile Arg Leu Thr
 785 790 795 800
 Leu Arg Lys Phe Asn Arg Glu Asn Ser Ser Asn Ile Leu Asp Asn Leu
 805 810 815
 Leu Ser Arg Met Glu Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Glu Glu Leu Val Glu
 820 825 830
 Glu Arg Thr Gln Ala Tyr Leu Glu Glu Lys Arg Lys Ala Glu Ala Leu
 835 840 845
 Leu Tyr Gln Ile Leu Pro His Ser Val Ala Glu Gln Leu Lys Arg Gly
 850 855 860
 Glu Thr Val Gln Ala Glu Ala Phe Asp Ser Val Thr Ile Tyr Phe Ser
 865 870 875 880
 Asp Ile Val Gly Phe Thr Ala Leu Ser Ala Glu Ser Thr Pro Met Gln
 885 890 895
 Val Val Thr Leu Leu Asn Asp Leu Tyr Thr Cys Phe Asp Ala Val Ile
 900 905 910
 Asp Asn Phe Asp Val Tyr Lys Val Glu Thr Ile Gly Asp Ala Tyr Met
 915 920 925
 Val Val Ser Gly Leu Pro Val Arg Asn Gly Arg Leu His Ala Cys Glu
 930 935 940
 Val Ala Arg Met Ala Leu Ala Leu Asp Ala Val Arg Ser Phe Arg
 945 950 955 960
 Ile Arg His Arg Pro Gln Glu Gln Leu Arg Leu Arg Ile Gly Ile His
 965 970 975
 Thr Gly Pro Val Cys Ala Gly Val Val Gly Leu Lys Met Pro Arg Tyr

980 985 990
Cys Leu Phe Gly Asp Thr Val Asn Thr Ala Ser Arg Met Glu Ser Asn
995 1000 1005
Gly Glu Ala Leu Lys Ile His Leu Ser Ser Glu Thr Lys Ala Val

1010 1015 1020
Leu Glu Glu Phe Gly Gly Phe Glu Leu Glu Leu Arg Gly Asp Val
1025 1030 1035
Glu Met Lys Gly Lys Gly Lys Val Arg Thr Tyr Trp Leu Leu Gly
1040 1045 1050
Glu Arg Gly Ser Ser Thr Arg Gly
1055 1060