



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0009587  
(43) 공개일자 2025년01월17일

- |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/><i>C07K 16/22</i> (2006.01) <i>A61K 39/00</i> (2006.01)<br/><i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/><i>C07K 16/22</i> (2013.01)<br/><i>A61P 35/00</i> (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2025-7000711(분할)</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2016년03월03일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2023-7037758<br/>원출원일자(국제) 2016년03월03일<br/>심사청구일자 2023년12월01일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2025년01월08일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2016/020779</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2016/141244<br/>국제공개일자 2016년09월09일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>62/128,133 2015년03월04일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>젠자임 코퍼레이션<br/>미국 메사추세츠주 02141 캠프리지 워터 스트리트 450</p> <p>(72) 발명자<br/>추, 화웨이<br/>미국 08807 뉴저지주 브리지워터 메일 코드: 55에이-505에이 코퍼레이트 드라이브 55 사노피 내<br/>팬, 클라크<br/>미국 01776 메사추세츠주 서드버리 더턴 로드 353<br/>버드, 줄리<br/>미국 08807 뉴저지주 브리지워터 메일 코드: 55에이-505에이 코퍼레이트 드라이브 55 사노피 내</p> <p>(74) 대리인<br/>양영준, 임근실</p> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

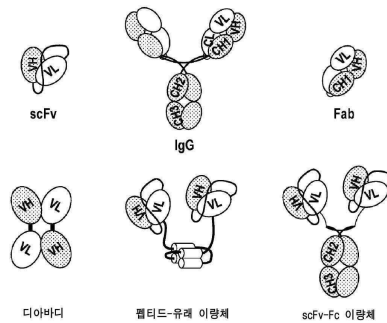
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 전환 성장 인자-β1에 높은 친화성, 결합력 및 특이성으로 결합하는 scFv-Fc 이량체

(57) 요약

scFv-Fc 이량체는 TGFβ1에 높은 친화성 및 결합력으로 선택적으로 결합하고, 이를 중화시킨다. scFv 영역은 메텔리무탐과 동일한 VH 및 VL 도메인 또는 CDR 영역을 포함할 수 있다. 그들의 더 작은 크기, 높은 선택성, TGFβ1에 대한 효력 및 긴 생체내 반감기의 독특한 조합은 scFv-Fc 이량체가 치료적 적용을 위한 이상적인 후보물질이 되게 한다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

TGFβ1에 선택적으로 결합하는 분리된 결합 단백질을 포함하는, 암을 치료하기 위한 약제학적 조성물이며, 상기 결합 단백질은 N-말단에서 C-말단으로,

(VH 도메인)-(링커1)-(VL 도메인)-(링커2)-(힌지)-(Fc 영역)

의 식으로 이루어진 폴리펩티드 쇠로부터 형성된 이량체이며,

여기서

상기 VH 도메인은

SEQ ID NO: 22의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR) 1,

SEQ ID NO: 23의 HCDR2, 및

SEQ ID NO: 25의 HCDR3

을 포함하고,

상기 VL 도메인은

A2S 치환을 갖는 SEQ ID NO: 27의 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR) 1,

SEQ ID NO: 28의 LCDR2, 및

SEQ ID NO: 29의 LCDR3

을 포함하고,

상기 링커1은 SEQ ID NO: 3 또는 4이고,

상기 링커2는 SEQ ID NO: 20 또는 그의 변이체이며, 상기 변이체는 글리신에서 세린 또는 세린에서 글리신으로 의, 최대 2개의 아미노산 치환을 가짐으로써 SEQ ID NO: 20과 상이하고,

상기 힌지는 인간 IgG1 힌지 영역으로부터의 아미노산 서열을 포함하고,

상기 Fc 영역은 인간 IgG1으로부터 유래되는 것인

약제학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 VH 및 VL 도메인이 각각 SEQ ID NO: 1 및 6에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 것인 약제학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 링커1이 아미노산 서열 SGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 3) 또는 GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 4)이고, 상기 힌지가 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열을 포함하는 것인 약제학적 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 링커2가 SEQ ID NO: 20인 약제학적 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드 쇠가 SEQ ID NO: 9에 나타난 아미노산 서열을 포함하는 것인 약제학적

조성물.

**청구항 6**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분리된 결합 단백질이 하기의 특징 중 적어도 하나를 갖는 것인 억제학적 조성물:

- a) A549 생물학적 검정에서 1 nM 미만의 인간 TGFβ1에 대한 IC<sub>50</sub>을 갖는 특징,
- b) 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정시 인간 TGFβ2에 대한 Kd보다 적어도 50% 더 낮은, 인간 TGFβ1에 대한 Kd를 나타내는 특징, 및
- c) 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정시 인간 TGFβ3에 대한 Kd보다 적어도 50% 더 낮은, 인간 TGFβ1에 대한 Kd를 나타내는 특징.

**청구항 7**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암이 유방암, 전립선암, 난소암, 위암, 신장암, 췌장암, 대장암, 피부암, 폐암, 자궁경부암, 방광암, 신경교종, 중피종 및 카포시 육종에서 선택되는 것인 억제학적 조성물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

- [0001] 관련 출원
- [0002] 본 특허 출원은 본원에 전문이 참조로 포함되는 2015년 3월 4일자 출원된 미국 가특허 출원 제62/128,133호의 이익을 주장한다.
- [0003] 기술 분야
- [0004] 각각이 단쇄 단편 가변 분자(scFv), 힌지 및 Fc 분자를 포함하는 2개의 폴리펩티드 단량체를 갖는 항원-결합 이량체는 전환 성장 인자-β1(TGFβ1)에 높은 친화성 및 결합력을 나타내지만, TGFβ2 또는 TGFβ3에는 그렇지 않다. 항원-결합 이량체를 포함하는 조성물 및 TGFβ1 활성을 수반하는 질환의 치료를 위한 이들의 이용 방법이 제공된다.

**배경 기술**

- [0005] 많은 중증 질환(disease)은 TGFβ-유도 신호전달 경로의 기능장애와 관련이 있다. TGFβ의 조직 수준의 증가는 예를 들어, 특발성 폐섬유증 및 심근 섬유증의 발생의 한 요인인 것으로 여겨진다. 추가로, TGFβ의 높은 국소 조직 수준은 몇몇 유형의 암 세포의 유지 및 진행을 가능하게 할 수 있다. 따라서, TGFβ 신호전달의 하향-조절에 의해, 이러한 종양 세포의 생존력을 감소시킬 수 있다.
- [0006] TGFβ 아이소폼(isoform)은 2개의 단량체가 이황화 가교를 통해 공유 결합되어 있는 유사한 구조 프레임워크를 갖는 약 25 kDa의 동중이량체 분자이다. 포유동물 아이소폼은 70 내지 82%의 서열 동일성을 공유하지만, 혈관 발생 및 면역 세포 기능의 조절에서 활성이 증첩되지 않는다. 인간에는 3가지 TGFβ 아이소폼이 보고되어 있다: TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3(각각 스위스 프로트(Swiss Prot) 수탁 번호 P01137, P08112 및 P10600). TGFβ1 및 TGFβ3는 I형 및 II형 TGFβ 수용체로 알려져 있는 2개의 막횡단 수용체의 세포의 도메인으로의 결합시에 세포 신호전달 캐스케이드를 촉발시킨다. TGFβ2는 I형 및 II형 TGFβ 수용체뿐 아니라, III형 TGFβ 수용체에도 결합할 수 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0007] 인간 TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3에 결합할 수 있는 항체를 임상 이용을 위하여 시험하였다. 예를 들어, Gruetter 등은 악성종양 및 섬유성 질환의 치료용으로 임상 개발 중인 인간 IgG4 모노클로날 항체(Mab; 즉, GC1008)인 GC1008을 개시하였다. 문헌[*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 105(51): 20251-56 (2008)]. GC1008은 "범-특이적 (pan-specific)" TGFβ 중화 항체인데, 그 이유는 그것이 3개의 인간 TGFβ 아이소폼 모두를 중화시킬 수 있기

때문이다. TGFβ1을 선택적으로 중화시키는 항체가 예를 들어, 본 명세서에 참조로 포함되는 미국 특허 제 6,492,497호 및 미국 특허 제7,151,169호에 개시되어 있다. CAT192(IgG4)로도 알려져 있는 메텔리무맙(metelimumab)은 TGF-β1을 선택적으로 중화시키는 인간 IgG4 모노클로날 항체이다. 예를 들어, 미국 특허 제 6,492,497호를 참조한다. 메텔리무맙을 피부경화증으로도 알려져 있는 광범위 피부 전신 경화증의 치료에 대하여 시험하였으나, 불충분한 효능이 입증되었다.

**과제의 해결 수단**

- [0008] 요약
- [0009] 본 발명은 인간 TGFβ1을 선택적으로 중화시킬 수 있는 TGFβ1-결합 scFv-Fc 이량체를 제공한다. 일 실시형태에서, scFv-Fc 이량체는 2개의 폴리펩티드 단량체로 이루어진 scFv-Fc 융합 단백질로서 포맷화되며, 각 단량체는 단쇄 Fv 영역(scFv), 힌지 및 Fc 영역을 포함한다. scFv-Fc 이량체의 VH 및 VL 도메인은 IgG1 또는 IgG4 포맷으로 사용되는 경우보다 TGFβ1에 더 높은 친화성 및 결합력을 나타내며, TGFβ1을 더욱 효율적으로 중화시킨다.
- [0010] 일 실시형태에서, scFv 성분은 메텔리무맙의 VH 및 VL 도메인과 동일한 VH 및 VL 도메인으로 이루어질 수 있다. scFv 성분에서 가변 도메인은 링커, 예를 들어, [G<sub>4</sub>S]<sub>3</sub>-형 링커에 의해 함께 연결될 수 있다. scFv-Fc 이량체의 scFv 성분은 각각 힌지 영역, 예를 들어, 인간 IgG1 또는 IgG4 힌지 영역을 통해 Fc 영역에 융합될 수 있다. 이량체 중 단량체는 힌지 영역 내의 시스테인 잔기 사이의 이황화 결합에 의해 공유적으로 연결될 수 있다. 다른 실시형태에서, scFv-Fc 이량체는 메텔리무맙과 구조적 차이점, 가장 현저하게는 CH<sub>1</sub> 및 CL 도메인의 부재 및 VH와 VL 도메인 사이의 링커의 존재를 가질 수 있다. 유리하게는, scFv-Fc 이량체는 A549 세포 효력 생물학적 검정에서 동일한 VH 및 VL 도메인을 포함하는 scFv(CAT191(scFv), SEQ ID NO: 12에 나타냄)의 세기보다 거의 수백배 더 큰 세기의 TGFβ1에 대한 걸보기 친화성을 나타낸다. 추가로, scFv-Fc 이량체는 A549 세포 생물학적 검정에서 동일한 VH 및 VL 도메인을 포함하는 IgG-포맷화 항체(예를 들어, CAT192)의 세기보다 수 천배 더 큰 세기의 TGFβ1에 대한 걸보기 친화성을 나타낸다. 또한, scFv-Fc 이량체는 바람직한 안정성 및 약동학적 특성을 나타낸다. 그들의 상대적으로 작은 크기 및 연장된 혈청 중 반감기 때문에, scFv-Fc 이량체는 치료적 적용에 특히 유용하다.
- [0011] 따라서, 본 발명은 TGFβ1에 결합할 수 있는 가변 도메인을 포함하는 분리된 결합 단백질에 관한 것이며, 결합 단백질은 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정시, 인간 TGFβ2에 대한 동일한 결합 단백질의 Kd보다 적어도 약 50% 더 낮은 인간 TGFβ1에 대한 Kd를 나타낸다.
- [0012] 다른 실시형태에서, 본 발명은 TGFβ1에 결합할 수 있는 가변 도메인을 포함하는 분리된 결합 단백질에 관한 것이며, 결합 단백질은 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정시, 인간 TGFβ3에 대한 동일한 결합 단백질의 Kd보다 적어도 약 50% 더 낮은 인간 TGFβ1에 대한 Kd를 나타낸다.
- [0013] 추가의 실시형태에서, 본 발명은 TGFβ1에 결합할 수 있는 가변 도메인을 포함하는 분리된 결합 단백질에 관한 것이며, 결합 단백질은 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정시, 인간 TGFβ2에 대한 동일한 결합 단백질의 Kd보다 적어도 약 50% 더 낮고, 인간 TGFβ3에 대한 동일한 결합 단백질의 Kd보다 적어도 약 50% 더 낮은 인간 TGFβ1에 대한 Kd를 나타낸다.
- [0014] 추가의 실시형태에서, 본 발명은 TGFβ1에 결합하는 분리된 결합 단백질에 관한 것이며, 결합 단백질은 제1 폴리펩티드 쇄 및 제2 폴리펩티드 쇄를 포함하며, 제1 및 제2 폴리펩티드 쇄는 각각 (VD<sub>1</sub>)-(링커1)<sub>n</sub>-(VD<sub>2</sub>)-(링커2)<sub>m</sub>-(힌지)<sub>p</sub>-(Fc 영역)의 식을 가지며,
- [0015] VD<sub>1</sub>은 TGFβ1에 결합할 수 있는 항체로부터 분리된 VL 도메인 및 TGFβ1에 결합할 수 있는 항체로부터 분리된 VH 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 제1 가변 도메인을 포함하며, VD<sub>2</sub>는 TGFβ1에 결합할 수 있는 항체로부터 분리된 VL 도메인 및 TGFβ1에 결합할 수 있는 항체로부터 분리된 VH 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 제2 가변 도메인을 포함하며; n은 0 또는 1이며, m은 0 또는 1이며, p는 0 또는 1이다.
- [0016] 일 실시형태에서, 본 발명은 TGFβ1에 선택적으로 결합하는 분리된 TGFβ1-결합 scFv-Fc 이량체에 관한 것이다. scFv-Fc 이량체는 2개의 폴리펩티드 단량체를 포함할 수 있으며, 각각은 N-말단에서 C-말단으로, 하기의 식을 갖는다: (VH 도메인)-(링커)-(VL 도메인)-(힌지)-(Fc 영역). 다른 실시형태에서, TGFβ1에 결합하는 분리된 결합 단백질이 개시되며, 이는 제1 폴리펩티드 쇄 및 제2 폴리펩티드 쇄를 포함한다. 제1 및 제2 폴리펩티드 쇄는

들 모두 N-말단에서 C-말단으로, 하기의 식을 가질 수 있다: (VH 도메인)<sub>n</sub>-(링커1)<sub>m</sub>-(VL 도메인)<sub>n</sub>-(링커2)<sub>m</sub>-(힌지)<sub>p</sub>-(Fc 영역). p는 0 또는 1일 수 있으며, n은 0 또는 1일 수 있으며, m은 0 또는 1일 수 있다. 일 양태에서, 제1 및 제2 폴리펩티드 쇄는 동일할 수 있으며, 이량체를 형성할 수 있다.

[0017] 다른 실시형태에서, 개시된 TGFβ1 결합 단백질은 N-말단에서 C-말단으로, (VH 도메인)<sub>n</sub>-(링커1)<sub>m</sub>-(VL 도메인)<sub>n</sub>-(링커2)<sub>m</sub>-(힌지)<sub>p</sub>-(Fc 영역)의 식을 갖는 폴리펩티드 쇄를 포함할 수 있으며, p는 0 또는 1일 수 있으며, n은 0 또는 1일 수 있으며, m은 0 또는 1일 수 있다.

[0018] 개시된 결합 단백질의 VH 도메인은 가변 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 가변 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2) 및 가변 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 포함할 수 있다. 일 양태에서, HCDR1은 SEQ ID NO: 22의 아미노산 서열을 가질 수 있으며, HCDR2는 SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열을 가질 수 있으며, HCDR3은 SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 또는 SEQ ID NO: 30의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0019] VH 도메인의 프레임워크 영역은 가변 중쇄 생식계열 서열로부터 선택될 수 있다. VH 도메인은 예를 들어, SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 2에 나타난 인간 VH 도메인 서열 또는 최대 4개의 아미노산의 변형을 갖는 그의 변이체로부터 선택될 수 있다.

[0020] 개시된 결합 단백질의 VL 도메인은 가변 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 가변 경쇄 상보성 결정 영역 2(LCDR2) 및 가변 경쇄 상보성 결정 영역 3(LCDR3)을 포함할 수 있다. 일 양태에서, LCDR1은 SEQ ID NO: 27의 아미노산 서열을 가질 수 있으며, LCDR2는 SEQ ID NO: 28의 아미노산 서열을 가질 수 있으며, LCDR3은 SEQ ID NO: 29의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0021] VL 도메인의 프레임워크 영역은 가변 람다 또는 카파 생식계열 서열로부터 선택될 수 있다. VL 도메인은 예를 들어, SEQ ID NO: 5 또는 SEQ ID NO: 6에 나타난 인간 V<sub>K</sub> 도메인 서열 또는 최대 4개의 아미노산의 변형을 갖는 그의 변이체로부터 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 이량체의 각 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 1에 나타난 VH 도메인 및 SEQ ID NO: 5에 나타난 V<sub>K</sub> 도메인을 포함할 수 있으며, 이는 각각 메틸리무랍에 존재하는 VH 및 VL 도메인이다.

[0022] 일 실시형태에서, scFv 성분에서 가변 도메인은 약 15개 아미노산 길이의 유연성 링커에 의해 연결될 수 있다. 이러한 맥락에서 "약"은 링커가 최대 + 또는 - 4개 아미노산 길이만큼 달라질 수 있음을 의미한다. 최적의 유연성을 위하여, 링커는 대부분 글리신 및 세린 잔기로 이루어진다. 예를 들어, 링커는 [G<sub>4</sub>S]<sub>3</sub>-형 링커일 수 있다. 링커는 아미노산 서열 SGGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 3), 아미노산 서열 GGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 4), 또는 최대 4개의 아미노산 변형을 갖는 그의 변이체를 가질 수 있다. 본 발명의 목적을 위하여, "최대 x개의 아미노산 변형을 갖는"은 최대 X개의 아미노산이 폴리펩티드의 구조 및 기능을 유의미하게 변경시키지 않고, 해당 분야의 숙련자에 의해 상이한 아미노산으로 변경될 수 있음을 의미한다.

[0023] 다른 실시형태에서, p는 1이며, scFv 성분은 힌지에 의해 Fc 영역에 연결된다. 힌지는 인간 IgG1 또는 IgG4 힌지 영역으로부터 유래된 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 힌지는 아미노산 서열 PKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP(SEQ ID NO: 7) 또는 최대 4개의 아미노산 변형을 갖는 그의 변이체를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 힌지 길이는 3 내지 15개 아미노산으로 달라질 수 있다. 힌지가 인간 IgG1 유래의 것인 경우, 그것은 아미노산 서열 CPPCP(SEQ ID NO: 21)를 포함할 수 있다. 추가로, 인간 IgG1 힌지이기도 한 SEQ ID NO: 7의 힌지의 변이체는 아미노산 서열 CPPCP(SEQ ID NO: 21)를 포함할 수 있다.

[0024] 다른 실시형태에서, m은 1이며, 링커2는 scFv 성분과 힌지 사이에 존재한다. 일 양태에서, 링커2는 아미노산 서열 GGSG(SEQ ID NO: 20) 또는 최대 2개의 아미노산 변형을 갖는 그의 변이체를 포함할 수 있다.

[0025] Fc 영역은 2개 또는 3개의 불변 도메인, 예를 들어, CH<sub>2</sub> 도메인 및 CH<sub>3</sub> 도메인을 포함할 수 있다. Fc 영역은 예를 들어, 인간 IgG1, 인간 IgG4 또는 최대 10개의 아미노산 변형을 갖는 인간 IgG1 또는 IgG4의 변이체로부터 수득될 수 있다. 일 실시형태에서, 이량체의 각 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 9에 나타난 서열을 갖는다. SEQ ID NO: 9의 scFv-Fc 이량체의 구조는 도 2에 나타나 있다. scFv-Fc 이량체는 TGFβ1에 선택적으로 결합할 수 있다. scFv-Fc 이량체는 1 nM 미만 또는 심지어 0.1 nM 미만의 겔보기 해리 상수를 보일 수 있다. 겔보기 해리 상수는 예를 들어, A549 생물학적 검정을 사용함으로써 또는 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정될 수 있다.

[0026] 다른 실시형태에서, 분리된 폴리뉴클레오티드가 개시되며, 이는 scFv-Fc 이량체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 분리된 폴리뉴클레오티드는 cDNA, 재조합 DNA 또는 합성 DNA일 수 있다. 숙주 세포는 분

리된 핵산을 포함할 수 있다. 숙주 세포는 인간 세포, 예를 들어, 인간 배아 신장 293(HEK293) 세포 및 그로부터 유래된 세포주일 수 있거나, 또는 그것은 중국 햄스터 난소(CHO) 세포일 수 있다. scFv-Fc 이량체의 제조 방법은 숙주 세포를 scFv-Fc 이량체를 생성하기에 적합한 조건하에서 배양하는 단계를 포함할 수 있다. scFv-Fc 이량체는 정제될 수 있다. 순도는 90%, 95%, 99%, 99.5% 이상일 수 있다.

[0027] 본 발명의 scFv-Fc 이량체는 조성물의 한 성분일 수 있다. 조성물은 약제학적 조성물일 수 있다. 약제학적 조성물은 치료적 유효량의 scFv-Fc 이량체를 포함할 수 있다. 조성물은 하나 이상의 생물학적 활성 성분, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.

[0028] 인간에서 TGFβ1 활성으로부터 직접적으로 또는 간접적으로 초래되는 질환 또는 증상의 치료 방법은 치료적 유효량의 scFv-Fc 이량체를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 질환 또는 증상은 섬유성 질환, 암, 면역-매개의 질환, 예를 들어, 광범위 피부 전신 경화증, 골 재형성 질환, 신장 질환 및/또는 그들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. scFv-Fc 이량체는 섬유성 질환, 암, 면역-매개의 질환, 예를 들어, 광범위 피부 전신 경화증, 골 재형성 질환, 신장 질환 및/또는 그들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환 또는 장애의 치료용 약제의 제조에 사용될 수 있다. 질환 또는 장애의 치료는 TGFβ1의 중화 또는 TGFβ1 신호전달의 저해를 포함할 수 있다. 질환 또는 장애의 치료는 TGFβ1-매개의 피브로블라스트 생성, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 생성, 상피 세포 증식, 내피 세포 증식, 평활근 세포 증식 또는 면역억제의 저해를 포함할 수 있다. 질환 또는 장애의 치료는 자연 살해 세포 활성의 증가를 포함할 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0029] 본원에 제시된 도면은 예시의 목적을 위한 것이며, 본 발명의 범주를 제한하기 위해 사용되지 않아야 한다.

도 1은 다양한 포맷의 일반 구조를 도시한 것이다.

도 2는 scFv(CAT191)가 전장 IgG4(CAT192) 분자로 전환되는 경우 친화성의 소실을 보였던 비아코어 TGFβ1 결합 검정의 결과를 도시한 것이다.

도 3은 TGFβ1-자극된 IL-11 생성에 대한 다양한 항체 작제물에 의한 저해 효과를 비교하는 A549 세포 생물학적 검정의 결과를 보여준다: scFv 디아바디 5aa(SEQ ID NO: 14); CAT191(scFv)(SEQ ID NO: 12); CAT191(scFv-Fc)(SEQ ID NO: 9); 및 CAT192(IgG4)(경쇄 SEQ ID NO: 10 및 중쇄 SEQ ID NO: 11).

도 4는 정맥내(IV) 투여 후의 CAT191(scFv-Fc)의 반감기를 결정하기 위한 약동학적 시험의 결과를 도시한 것이다.

도 5는 복강내(IP) 투여 후의 CAT191(scFv-Fc)의 반감기를 결정하기 위한 약동학적 시험의 결과를 도시한 것이다.

도 6은 CHO 세포로부터 제조되는 CAT191(scFv-Fc)의 TGFβ1-특이적 결합 결과를 보여준다.

도 7은 CHO 세포로부터 제조되는 CAT191(scFv-Fc)의 세포-기반의 효력 검정법 결과를 보여준다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0030] 상세한 설명

[0031] 개시된 scFv-Fc 이량체는 TGFβ1에 선택적으로, 그리고 높은 친화성 및 결합력으로 결합하고, 이를 중화시킨다. scFv 영역은 메텔리무맘에서와 동일한 VH 및 VL 도메인으로 이루어질 수 있다. scFv-Fc 이량체는 유리하게 가변 도메인이 다른 포맷에서 사용되는 경우보다 TGFβ1 중화에 더 큰 효능을 보인다. 본 발명의 scFv-Fc 이량체는 그들의 상대적으로 작은 크기 및 연장된 혈청 중 반감기 때문에, 치료적 적용을 위한 이상적인 후보물질이다.

[0032] 본원에 사용되는, 제1 요소 "및/또는" 제2 요소는 개별적으로 제1 또는 제2 요소의 구체적 개시, 또는 조합되는 제1 및 제2 요소의 구체적 개시를 의미한다. 단수형("a," "an") 및 "상기(the)"는 문맥에서 명백하게 다르게 언급되지 않는 한, 복수의 언급 대상을 포함한다.

[0033] "분리된" 폴리뉴클레오티드(또는 핵산) 또는 단백질은 유전자 조작 기술을 사용하여 그의 천연 형태로부터 제거되고/거나 변경된다. "정제된" 핵산 또는 단백질은 상당히 순수하고, 예를 들어, 적어도 90% 순수하거나, 균질한 형태로 존재할 수 있다.

[0034] 인간 TGFβ1로의 "선택적인 결합" 또는 이에 "선택적으로 결합하는"은 결합 단백질(예를 들어, scFv-Fc 이량

체)이 인간 TGFβ2 또는 인간 TGFβ3으로의 결합보다 더 높은 친화성으로, 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정시 인간 TGFβ2 또는 인간 TGFβ3과의 그의 해리 상수보다 적어도 50% 더 낮은 인간 TGFβ1과의 해리 상수로 인간 TGFβ1에 결합할 수 있는 것을 의미한다.

[0035] *scFv-Fc 이량체*

[0036] 일 실시형태에서, 본 발명의 scFv-Fc 이량체 가변 도메인은 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제6,492,497호에 개시된 CDR(예를 들어, 미국 특허 제6,492,497호의 SEQ ID NO: 11 내지 19)로부터의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함한다. CDR 영역은 하기에 열거되어 있다:

HCDR1	SYGMH	SEQ ID No. 22
HCDR2	VISYDGSIKYYADSVKG	SEQ ID No. 23
HCDR3	TGEYSGYDTSQVEL	SEQ ID No. 24
	TGEYSGYDTPQYS	SEQ ID No. 25
	TGFYSGYDTPASPD	SEQ ID No. 26
LCDR1	RASQGIGDDL	SEQ ID No. 27

[0037] LCDR2 GTSTLQS SEQ ID No. 28

[0038] LCDR3 LQDSNYPLT SEQ ID No. 29

[0039] 놀랍게도, 하기의 서열을 갖는 공통 HCDR3 결합 모티프가 공개된다:

HCDR3 TGX<sub>1</sub>YSGYDTX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub> SEQ ID No. 30

[0041] 여기서, X<sub>1</sub>은 임의의 아미노산(바람직하게는 E 또는 F)이거나 부재일 수 있고,

[0042] X<sub>2</sub>는 임의의 아미노산(바람직하게는 S, D 또는 P)이거나 부재일 수 있고,

[0043] X<sub>3</sub>은 임의의 아미노산(바람직하게는 G, P 또는 A)이거나 부재일 수 있고,

[0044] X<sub>4</sub>는 임의의 아미노산(바람직하게는 V, Q 또는 S)이거나 부재일 수 있고,

[0045] X<sub>5</sub>는 임의의 아미노산(바람직하게는 E, Y 또는 P)이거나 부재일 수 있고,

[0046] X<sub>6</sub>은 임의의 아미노산(바람직하게는 L, S 또는 D)이거나 부재일 수 있다.

[0047] VH 도메인은 SEQ ID No. 22의 HCDR1, SEQ ID No. 23의 HCDR2, 및 SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26 및 SEQ ID No. 30으로 이루어진 군으로부터 선택되는 HCDR3 중 하나를 포함한다. CDR 서열은 N-말단으로부터 하기의 순서로 어느 곳이나 1 내지 4개의 프레임워크 영역에 의해 분리될 수 있다: FW1 - CDR1 - FW2 - CDR2 - FW3 - CDR3 - FW4. VH 도메인의 프레임워크 영역은 가변 중쇄 생식계열 서열로부터 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, FW 영역 서열은 동일한 인간 가변 중쇄 생식계열 서열로부터 선택될 수 있다. VL 도메인은 SEQ ID NO: 7의 LCDR1, SEQ ID NO: 28의 LCDR2 및 SEQ ID NO: 29의 LCDR3을 포함한다. VL 도메인의 프레임워크 영역은 가변 램다 또는 카파 생식계열 서열로부터, 예를 들어, 동일한 인간 가변 램다 또는 카파 생식계열 서열로부터 선택될 수 있다. 현재는, 약 40개의 가변 카파 생식계열 서열 및 약 30개의 가변 램다 생식계열 서열, 예를 들어, V<sub>H3</sub>, V<sub>K1</sub>, V<sub>H 1-69</sub> 및 V<sub>H 1-e</sub>와 같이, 약 40개의 가변 중쇄 생식계열 서열이 해당 분야에 알려져 있다.

[0048] 다른 실시형태에서, 복합 VH 또는 VL 도메인은 본원에 개시된 CDR 서열을 사용함으로써 생성될 수 있다. 예를 들어, VH 또는 VL 도메인의 결정 구조는 하나의 항체로부터의 CDR 서열을 사용하고, 다른 항체로부터의 생식계열 FW 영역을 사용하여 복합 도메인을 생성하기 위한 지침으로서 사용될 수 있다. 더 많은 상세사항은 미국 특허 출원 공개 제20020099179호 및 문헌[Homes and Foote, J Immunol. 1997 Mar 1;158(5):2192-201]에서 찾을 수 있으며, 둘 모두는 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0049] 본 발명의 scFv-Fc 이량체는 각각 SEQ ID NO: 1 및 SEQ ID NO: 5에 나타난 서열을 갖는, 메텔리무맙에서와 동일한 VH 및 VL 도메인으로 이루어질 수 있다. VH 도메인은 SEQ ID NO: 2에 나타난 서열을 갖는 VH 도메인에 의해

대체될 수 있으며; VL 도메인은 SEQ ID NO: 6에 나타난 서열을 갖는 VL 도메인에 의해 대체될 수 있다. 이들 VH 및 VL 도메인은 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제6,492,497호(예를 들어, SEQ ID NO: 4, 6, 8 및 10)에 개시되어 있다.

- [0050] "가변 도메인"(VD)은 해당 분야의 숙련자에게 알려져 있는 바와 같이 항원/리간드 결합에 수반되는 면역글로불린의 추가변 결합 도메인 또는 수용체의 리간드 결합 도메인을 지칭한다. 가변 도메인은 일반적으로 면역글로불린 내의 그들의 위치 또는 기원에 의해 지칭되며; 면역글로불린의 경쇄의 가변 도메인(VL), 면역글로불린의 중쇄의 가변 도메인(VH), 카멜리드(camelid) 면역글로불린의 중쇄의 가변 도메인(VHH)으로 예시된다.
- [0051] "변이체" 가변 도메인은 참조 서열에 비하여 아미노산 부가, 치환 및/또는 결실을 포함한다. VH 또는 VL 도메인의 "변이체"는 최대 4개의 이러한 아미노산 변형을 가질 수 있다. 예를 들어, 2개의 도메인 중 하나가 아미노산 치환을 포함할 수 있는 데 반하여, 다른 도메인은 변형되지 않거나, 도메인 둘 모두가 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 아미노산 잔기를 부가하거나 결실시키는 변형은 VH 또는 VL 도메인의 N-말단 또는 C-말단에서 이루어질 수 있다. 예를 들어, VH 도메인의 N-말단 잔기는 결실될 수 있다.
- [0052] 예를 들어, scFv-Fc 이량체를 탈면역화시키기 위하여 최대 4개의 아미노산 치환이 이루어질 수 있다. 탈면역화는 예를 들어, 문헌[Harding et al. (2010) mAbs 2: 256-265]의 방법에 따라 수행될 수 있다.
- [0053] 예를 들어, scFv-Fc 이량체의 안정성을 증가시키고/거나 그들이 응집하는 경향을 감소시키기 위하여 VH 및/또는 VL 도메인의 프레임워크 잔기를 치환시킬 수 있다. 불량한 안정성은 재조합으로 발현되는 경우 발현되는 scFv-Fc 이량체가 적절하게 폴딩되는 능력에 영향을 미쳐, 소정의 분율의 발현된 항체가 비-기능성이 되게 할 수 있다. 안정성이 낮은 항체는 또한 잠재적으로 면역원성 응집물을 형성하기 쉽거나, 손상된 결합력 또는 저장 수명을 가질 수 있다. 특히 scFv 폴리펩티드는 박테리아 및 포유동물 발현 시스템 둘 모두에서 안정성, 용해성, 발현, 응집, 분해 산물 및 전반적인 제조가능성에 문제를 나타낼 수 있다. 예를 들어, scFv 폴리펩티드에서 VH 및/또는 VL 도메인의 안정성을 증가시키고/거나 그의 응집 경향을 감소시킬 것으로 예상되는 프레임워크 아미노산 치환은 예를 들어, WO 2007/109254호에 개시되어 있다. 본 발명의 VH 및 VL 도메인 내의 상응하는 잔기에서의 치환은 유사하게 scFv-Fc 이량체의 안정성을 증가시키고/거나 그의 응집 경향을 감소시킬 것으로 예상된다.
- [0054] 용인될 수 있는 치환은 SEQ ID NO: 1, 2, 5 또는 6의 아미노산을 다른 인간 VH 또는 VL 도메인 생식계열 서열에 존재하는 상응하는 아미노산으로 대체하는 것들을 포함하는 것으로 예상된다. 이들 생식계열 서열 중 임의의 것에 존재하는 아미노산으로의 프레임워크 아미노산의 치환이 용인될 수 있다. 예를 들어, SEQ ID NO: 1의 VH 도메인의 잔기는 임의의 VH 생식계열 서열, 예를 들어, DP-10(V<sub>H</sub> 1-69) 또는 DP-88(V<sub>H</sub> 1-e)로부터의 생식계열 서열 내의 상응하는 위치에 존재하는 아미노산으로 치환될 수 있다. 이러한 경우에 상응하는 위치는 해당 분야에 널리 알려져 있는 정렬 기술, 예를 들어, ClustalW를 사용한 다양한 생식계열 서열 간의 서열 정렬에 의해 결정된다.
- [0055] 용인될 것으로 예상되는 추가의 치환은 3개의 공-결정 구조의 분석에 의해 결정시, 대부분의 그의 측쇄가 용매에 노출되는 아미노산에 대하여 이루어지는 것들이다. 당업계에 널리 알려져 있는 기술을 사용하여 용매-접근가능한 표면 영역의 잔기가 추정될 수 있다. 추가로, 아미노산의 측쇄가 인접 잔기와 입체 장애를 생성하지 않는다면, 가변 도메인 내에 매립된 아미노산에 대한 치환이 더 잘 용인될 것으로 예상된다. 이러한 이유로, 매립된 아미노산은 일반적으로 유사한 또는 보다 작은 크기의 측쇄를 갖는 아미노산으로 치환된다. 예를 들어, Leu, Val, Ala 또는 Gly으로의 매립된 Ile 잔기의 치환이 용인될 것으로 예상된다. 치환에 의해 생성되는 가능한 입체 장애를 3개의 공-결정 구조의 분석에 의해 예측할 수 있다. 용인될 것으로 예상되는 추가의 치환은 가변 도메인 내에 존재하는 정전기 상호작용, 예를 들어, 쌍극자-쌍극자 상호작용, 유도되는 쌍극자 상호작용, 수소 결합 또는 이온 결합을 유지하는 것들이다.
- [0056] 가변 도메인의 추가의 아미노산 치환은 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 신규한 유용한 특성을 부여할 것으로 예상되는 것들을 포함한다. 예를 들어, VH 및/또는 VL 도메인 내의 추정된 N-글리코실화 부위를 제거하여, N-당 형태(glycoform)의 형성을 방지하거나 줄일 수 있다. 아미노-말단 잔기를 Gln 잔기로 치환하여, 피로글루타미화(pyroglutamylation)를 야기할 수 있으며, 이는 하전 변이체의 수를 감소시킬 수 있다. 아미노산 치환을 사용하여 등전점을 낮출 수 있으며, 이는 예를 들어, IgG 폴리펩티드 항체의 제거 속도를 감소시킬 수 있다.
- [0057] 가변 도메인의 표면 잔기는 예를 들어, Cys 또는 Lys 잔기로 치환될 수 있으며, 이는 이어서 공유적으로 변형되고, 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 유용한 특징을 부여하는 분자, 예를 들어, 검출가능한 표지, 독소, 표적화 모이어티 또는 단백질에 커플링될 수 있다. 예를 들어, Cys 잔기는 세포독성 약물에 커플링되어, 약물 컨주

게이트를 형성할 수 있다. 또한, Cys 잔기는 혈청 반감기를 증가시키는 분자, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 또는 혈청 알부민에 커플링될 수 있다. 이러한 아미노산 변형은 예를 들어, 문헌[Beck et al. (2010) Nature 10: 345-52]에 검토되어 있다.

[0058] 검출가능한 표지는 방사성표지, 예를 들어, <sup>131</sup>I 또는 <sup>99</sup>Tc를 포함하며, 이를 당업계에 공지되어 있는 방법을 사용하여 항체 또는 그의 항원-결합 단편에 부착시킬 수 있다. 또한, 표지는 호스래디시(horseradish) 과산화효소와 같은 효소 표지를 포함한다. 표지는 검출가능한 특정 동족 모이어티, 예를 들어, 표지된 아비딘으로의 결합을 통해 검출될 수 있는 화학적 모이어티, 예를 들어, 비오틴을 추가로 포함한다. 정제를 용이하게 하는 다른 모이어티가 부착될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 널리 공지되어 있는 재조합 변형 및 발현 방법을 사용하여 His-태그화될 수 있다.

[0059] scFv-Fc 이량체의 VH 및 VL 도메인은 본원에 링커로 지칭되는 링커에 의해 함께 연결된다. scFv 단편의 제조에 적합한 링커는 해당 분야에 널리 알려져 있다. 예를 들어, 문헌[Bird et al. (1988) Science, 242: 423-426]; 문헌[Huston et al. (1988) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 5879-5883]을 참조한다. 이것은 예를 들어, 인코딩하는 핵산을 프레임 내 융합하고, 융합 단백질을 적합한 숙주 세포에서 발현시킴으로써 달성될 수 있다. 적합한 링커는 [G<sub>4</sub>S]<sub>3</sub>-형의 링커를 포함한다. [G<sub>4</sub>S]<sub>3</sub>-형 링커는 글리신 및 세린 잔기의 반복 유닛으로 이루어져 있다. 이러한 링커는 예를 들어, SGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 3) 또는 GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 4)의 서열 또는 최대 4개의 아미노산 변형을 갖는 그의 변이체를 가질 수 있다. 변형은 링커 길이를 변하게 하는 결실 또는 삽입, 또는 아미노산 치환, 바람직하게는 Gly에서 Ser 또는 그 반대로의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. [G<sub>4</sub>S]<sub>3</sub>-형 링커는 scFv 구조에서 가변 도메인을 연결시키기 위하여 널리 사용되어 왔는데, 그 이유는 상기 링커가 가변 도메인에 최소의 입체형태 변형을 야기하며, 저자극성이기 때문이다. 예를 들어, 문헌[Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83]을 참조한다.

[0060] scFv-Fc 이량체에서, 본원에서 링커2로 지칭되는 짧은 링커 서열이 VL 도메인과 힌지 사이에 선택적으로 삽입된다. 이러한 링커 서열은 Fc 성분에 대하여 scFv 성분의 유연성을 증가시킨다. 일 실시형태에서, 링커2는 GGSG(SEQ ID NO: 20)의 서열을 갖는다. GGSG 링커에 대한 적합한 변형은 1 내지 4개의 아미노산 만큼의 그의 길이의 변경 또는 1 또는 2개의 아미노산의 치환, 바람직하게는 Gly에서 Ser, 또는 그 반대로의 치환을 포함한다.

[0061] 힌지 영역은 scFv 부분을 Fc 영역에 연결시키는 유연성 도메인이다. IgG 및 IgA 분자 내의 힌지 영역의 유연성은 Fab 아암(arm)이 광범위한 각을 채용하게 하여, 가변 거리만큼 따로 이격된 에피토프로의 결합을 가능하게 한다. 적합한 힌지 영역은 예를 들어, 아미노산 서열 PKSCDKTHTCPPCPPELLGGP(SEQ ID NO: 7)를 갖는 인간 IgG1 힌지 영역을 포함한다. 이러한 서열은 예를 들어, 미국 특허 제8,048,421호의 도 4B에 개시된 바와 같은, 인간 IgG1 상측 힌지의 일부, 중간 힌지 및 CH<sub>2</sub> 도메인의 N-말단 부분에 상응한다. 인간 IgG1으로부터의 힌지는 2개의 Cys 잔기를 함유하며, 이는 상응하는 단량체 상의 힌지의 Cys 잔기와 이황화 결합을 형성할 수 있다. 이황화 결합을 형성하는 인간 IgG1 힌지 부분은 아미노산 서열 CPPCP(SEQ ID NO: 21)를 함유한다. 인간 IgG1 힌지의 변이체는 이러한 서열을 포함할 수 있다.

[0062] scFv 성분은 이량체의 Fc 성분을 형성하는 Fc 영역에 프레임 내 융합된다. 적합한 Fc 영역은 2 또는 3개의 불변 영역을 함유한다. Fc 영역은 SEQ ID NO: 8에 나타난 바와 같은 인간 IgG1 또는 SEQ ID NO: 11의 CH<sub>2</sub> 및 CH<sub>3</sub> 도메인에 나타난 바와 같은 IgG4로부터의 것들을 포함한다. 항체의 Fc 영역은 그의 혈청 반감기 및 이펙터 기능, 예를 들어, 보체-의존성 세포독성(CDC), 항체-의존성 세포독성(ADCC) 및 항체-의존성 세포 식세포작용(ADCP)을 매개한다.

[0063] scFv-Fc 이량체의 다양한 특성을 개선시키기 위하여 힌지 및 Fc 영역에 변형을 이룰 수 있다. 일 실시형태에서, 천연 발생 인간 Fc 영역의 1, 2, 3, 4, 5 또는 최대 10개의 아미노산이 힌지 영역의 변형에 더하여 변형될 수 있다. 예를 들어, Fc 영역을 변형시켜, scFv-Fc 이량체의 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다. IgG의 반감기는 수용체 FcRn으로의 그의 pH-의존성 결합에 좌우된다. 내피 세포의 표면에 발현되는 FcRn은 pH-의존적 방식으로 IgG에 결합하며, 그것을 분해로부터 보호한다. 예를 들어, CH<sub>2</sub>와 CH<sub>3</sub> 도메인 사이의 계면에 위치한 돌연변이는 FcRn으로의 결합 친화성 및 IgG1의 생체내 반감기를 증가시키는 것으로 나타났다. 이러한 변형은 예를 들어, 문헌[Strohl WR., 2009. Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. Curr Opin Biotechnol. 20(6):685-91]; 및 문헌[Vaccaro C. et al., 2005. Engineering the Fc region of immunoglobulin G to modulate in vivo antibody levels. Nat Biotechnol. 23(10):1283-8]에 검토되어 있다.

[0064] 힌지 및/또는 Fc 영역에 대한 다른 변형은 이펙터 기능을 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 4개의 인간 IgG 아이소형은 활성화 Fc $\gamma$  수용체(Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIa, Fc $\gamma$ RIIIa), 저해성 Fc $\gamma$ RIIb 수용체 및 제1 보체 성분(C1q)에 상이한 친화성으로 결합하여, 상이한 이펙터 기능을 초래한다. 예를 들어, Fc $\gamma$ R 또는 C1q로의 IgG의 결합은 IgG 힌지 영역 및 CH<sub>2</sub> 도메인에 위치한 잔기에 좌우된다. 이들 잔기의 단일의 또는 다중의 아미노산 치환은 Fc $\gamma$ R 또는 C1q와 IgG의 상호작용을 조절함으로써 이펙터 기능에 영향을 미칠 수 있다. 이펙터 기능에 영향을 미치는 다른 치환이 알려져 있다. 이들 변형은 예를 들어, 문헌[Strohl (2009) "Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies," *Curr. Opin. Biotechnol.* 20:685-91]에 검토되어 있다.

[0065] 힌지 및/또는 Fc 영역의 대표적인 변형은 표 1에 요약되어 있다.

**표 1**

대표적인 힌지 및 Fc 영역 변형

아이소형	종	치환	FcR/C1q 결합	이펙터 기능	참조 문헌
IgG1	인간	T250Q/M428L	FcRn으로의 결합 증가	반감기 증가	1
IgG1	인간	1M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F	FcRn으로의 결합 증가	반감기 증가	2
IgG1	인간	E233P/L234V/L235A/G236 + A327G/A330S/P331S	Fc $\gamma$ RI으로의 결합 감소	ADCC 및 CDC 감소	3, 4
IgG1	인간	E333A	Fc $\gamma$ RIIIa로의 결합 증가	ADCC 및 CDC 증가	5, 6
IgG1	인간	S239D/A330L/I332E	Fc $\gamma$ RIIIa로의 결합 증가	ADCC 증가	7, 8
IgG1	인간	P257I/Q311	FcRn으로의 결합 증가	반감기 불변	9
IgG1	인간	K326W/E333S	C1q로의 결합 증가	CDC 증가	10
IgG1	인간	S239D/I332E/G236A	Fc $\gamma$ RIIIa/Fc $\gamma$ RIIb 비 증가	대식구 식세포작용 증가	11
IgG1	인간	K322A	C1q로의 결합 감소	CDC 감소	5
IgG4	인간	S228P	--	Fab-아암 교환 감소	12
IgG2a	마우스	L235E + E318A/K320A/K322A	Fc $\gamma$ RI 및 C1q로의 결합 감소	ADCC 및 CDC 감소	10

1. Hinton et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-16.
2. Vaccaro et al. (2005) *Nature Biotechnol.* 23(10):1283-88.
3. Armour et al. (1999) *Eur. J. Immunol.* 29(8):2613-24.
4. Shields et al. (2001) *J. Biol. Chem.* 276(9):6591-604.
5. Idusogie et al. (2000) *J. Immunol.* 164(8):4178-84.
6. Idusogie et al. (2001) *J. Immunol.* 166(4):2571-75.
7. Lazar et al. (2006) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 103(11): 4005-10.
8. Ryan et al. (2007) *Mol. Cancer Ther.* 6: 3009-18.
9. Datta-Mannan et al. (2007) *Drug Metab. Dispos.* 35: 86-94.
10. Steurer et al. (1995) *J. Immunol.* 155(3):1165-74.
11. Richards et al. (2008) *Mol. Cancer Ther.* 7(8):2517-27.
12. Labrijn et al. (2009) *Nature Biotechnol.* 27(8):767-71.

[0066]

[0067] 추가로, 제조할 아미노산 변형을 사용하여 발현된 폴리펩티드의 구조적 동질성을 감소시킬 수 있다. 대표적인

예에는 문헌[Peters et al. (2012) J. Biol. Chem. 287(29): 24525-33]이 있으며, IgG4 힌지 영역 내의 Cys에서 Ser으로의 치환을 개시하며, 이는 이황화 결합 이질성을 감소시키고, Fab 도메인 열 안정성을 증가시킨다. 유사하게, 문헌[Zhang et al. (2010) Anal. Chem. 82: 1090-99]은 치료적 적용에서 이황화 결합 스캐램블링(scrambling) 및 구조 이성질체의 형성을 제한하기 위한 IgG2 힌지 영역의 조작을 개시한다. 또한, CH3 도메인에 대한 아미노산 변형을 사용하여 카르복시-말단 Lys 잔기를 결실시켜, 하전 변이체의 수를 감소시킬 수 있다. 또한, 아미노산 변형을 사용하여 재조합 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 약리학적 기능을 개선시킬 수 있다. 예를 들어, 아미노산 변형을 사용하여 보체 활성화를 증가시키고/거나, Fc $\gamma$ R1IIIA 결합을 증가시키거나 Fc $\gamma$ R1IIIB 결합을 감소시킴으로써 항체-의존성 세포독성(ADCC)을 증진시키고/거나 FcRn 결합을 증가시킴으로써 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다. 이러한 아미노산 변형은 예를 들어, 문헌[Beck et al. (2010) Nature 10: 345-52]에 검토되어 있다.

[0068] scFv-Fc 이량체의 핵산 및 그의 제조 방법

[0069] 본 발명의 추가의 양태는 scFv-Fc 이량체를 인코딩하는 핵산을 제공한다. 분리된 핵산은 예를 들어, 합성 DNA, 비-천연 발생 mRNA 또는 cDNA일 수 있다. 예에는 미국 특허 제6,492,497호의 SEQ ID NO: 3, 5, 7 및 9에 나타낸 VH 및 VL 도메인을 인코딩하는 핵산이 포함된다. 추가의 핵산에는 SEQ ID NO: 14에 나타낸 디아바디-5aa를 인코딩하는 본 발명의 SEQ ID NO: 13에 나타낸 서열, 및 SEQ ID NO: 16에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 류신 지퍼 펩티드-유래 이량체를 인코딩하는 SEQ ID NO: 15에 나타낸 서열이 포함된다. 추가의 핵산에는 SEQ ID NO: 9에 나타낸 아미노산 서열을 갖는 CAT191(scFv-Fc)을 인코딩하는 SEQ ID NO: 17에 나타낸 서열이 포함된다. 핵산은 플라스미드, 벡터 또는 전사 또는 발현 카세트 내에 삽입될 수 있다. scFv-Fc 이량체를 인코딩하는 핵산을 제조할 수 있으며, 발현되는 항체를 해당 분야에 널리 알려져 있는, 예를 들어, 문헌[Borsi et al. (2002) *Int. J. Cancer* 102: 75-85]에 개시된 통상의 기술을 사용하여 시험할 수 있다.

[0070] 재조합 숙주 세포는 상기 하나 이상의 작제물을 포함할 수 있다. scFv-Fc 이량체의 제조 방법은 인코딩하는 핵산을 숙주 세포에서 scFv-Fc 이량체를 생성하기 위한 조건하에 발현시키는 단계 및 항체를 회수하는 단계를 포함한다. 항체의 회수 방법은 항체의 분리 및/또는 정제를 포함할 수 있다. 생성 방법은 적어도 하나의 추가의 성분, 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 조성물 내로 항체를 제형화하는 단계를 포함할 수 있다.

[0071] 본원에 사용되는 용어 "재조합 숙주 세포"(또는 간단히 "숙주 세포")는 외인성 DNA가 도입되는 세포를 지칭하는 의도이다. 이러한 용어가 특정 대상 세포뿐 아니라 이러한 세포의 자손도 또한 지칭하는 의도임을 이해해야 한다. 특정 변형이 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인하여 다음의 세대에서 발생할 수 있기 때문에, 이러한 자손은 사실상 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 여전히 본원에 사용되는 용어 "숙주 세포"의 범주 내에 포함된다. 바람직하게는 숙주 세포는 생물의 계 중 임의의 것으로부터 선택되는 원핵 및 진핵 세포를 포함한다. 바람직한 진핵 세포는 원생동물, 진균, 식물 및 동물 세포를 포함한다. 가장 바람직하게는, 숙주 세포는 원핵 세포 주 에스케리키아 콜라이(*E. Coli*); 포유동물 세포주 CHO, HEK 293 및 COS; 곤충 세포주 Sf9; 및 진균 세포 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)를 포함하나 이들에 한정되지 않는다.

[0072] 적절하게 프로모터 서열, 터미네이터 서열, 폴리아데닐화 서열, 인핸서 서열, 마커 유전자 및 기타 서열을 포함하는 적절한 조절 서열을 함유하는, scFv-Fc 이량체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 적절한 벡터를 선택하거나 작제할 수 있다. 벡터는 예를 들어, 플라스미드, 파지, 파지미드, 아데노바이러스, AAV, 렌티바이러스일 수 있다. 예를 들어, 핵산 작제물의 제조, 돌연변이유발, 시퀀싱, 세포 내로의 DNA의 도입 및 유전자 발현에서의 핵산의 조작을 위한 기술 및 프로토콜은 당업계에 널리 알려져 있다.

[0073] 본원에 사용되는 용어 "벡터"는 그것이 연결되는 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하는 의도이다. 하나의 유형의 벡터에는 "플라스미드"가 있으며, 이는 추가의 DNA 세그먼트가 라이게이션될 수 있는 원형 이중가닥 DNA 루프를 지칭한다. 다른 유형의 벡터에는 바이러스 벡터가 있으며, 여기서, 추가의 DNA 세그먼트가 바이러스 계놈 내로 라이게이션될 수 있다. 특정 벡터는 그들이 도입되는 숙주 세포에서 자가 복제할 수 있다(예를 들어, 박테리아 복제 원점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 기타 벡터(예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로의 도입시에 숙주 세포의 계놈 내로 통합될 수 있으며, 그에 의해, 숙주 계놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 벡터는 그들이 작동가능하게 연결되는 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에 "재조합 발현 벡터"(또는 간단히 "발현 벡터")로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태로 존재한다. 플라스미드가 가장 흔하게 사용되는 벡터의 형태임에 따라, 본 명세서에서 "플라스미드" 및 "벡터"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한

기능을 제공하는 이러한 다른 형태의 발현 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터(예를 들어, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데나-연관 바이러스)를 포함하는 의도이다.

- [0074] 숙주 세포 내로의 이러한 핵산의 도입은 당업계에서 널리 알려져 있는 기술을 사용하여 달성될 수 있다. 진핵 세포에 있어서, 적합한 기술은 예를 들어, 인산칼슘 트랜스펙션, DEAE-덱스트란, 전기천공법, 리포좀-매개 트랜스펙션 및 레트로바이러스 또는 다른 바이러스를 사용한 형질도입을 포함할 수 있다. 박테리아 세포에 있어서, 적합한 기술은 염화칼슘 형질전환, 전기천공법 및 박테리오파지를 사용한 트랜스펙션을 포함할 수 있다. 도입에 있어서, 예를 들어, 유전자의 발현을 위한 조건하에 숙주 세포를 배양함으로써 핵산으로부터 발현을 야기하거나 발현을 가능하게 할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명의 핵산은 숙주 세포의 게놈, 예를 들어, 염색체 내로 통합된다. 통합은 표준 기술에 따라 게놈과의 재조합을 촉진시키는 서열의 포함에 의해 촉진될 수 있다.
- [0075] 폴리펩티드의 클로닝 및 다양한 상이한 숙주 세포에서의 발현을 위한 시스템은 널리 알려져 있다. 적합한 숙주 세포는 박테리아, 포유동물 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 진균, 효모 및 트랜스제닉 식물 및 동물을 포함한다. 이중 폴리펩티드의 발현을 위해 당업계에서 이용가능한 포유동물 세포주는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, HeLa 세포, 새끼 햄스터 신장 세포, 마우스 흑색종 세포, 랫트 골수종 세포, 인간 배아 신장 세포, 예를 들어, HEK293 세포, 인간 배아 망막 세포 및 기타 등등을 포함한다. 원핵 세포, 예를 들어, 에스케리키아 콜라이에서의 항체 및 항체 단편의 발현은 해당 분야에 널리 확립되어 있다. 검토를 위해, 예를 들어, 문헌[Plueckthun Bio/Technology 9: 545-551 (1991)]을 참조한다. 또한, 배양된 진핵 세포에서의 발현은 예를 들어, 문헌 [Andersen et al. (2002) Curr. Opin. Biotechnol. 13: 117-23]에 검토된 바와 같이, 해당 분야의 숙련자에게 이용가능하다.
- [0076] scFv-Fc 이량체는 천연적으로 또는 발현 숙주, 예를 들어, CHO, HEK293 또는 NSO(ECACC 85110503) 세포의 선택에 의해 글리코실화되거나, 그들은 예를 들어, 원핵 세포에서의 발현에 의해 생성된다면 비글리코실화될 수 있다. 또한, 글리코실화는 예를 들어, 얻어진 scFv-Fc 이량체의 ADCC 활성을 증가시키기 위하여 푸코실화를 저해함으로써 의도적으로 변경될 수 있다.
- [0077] 항체 또는 그의 항원-결합 단편의 이용 방법
- [0078] scFv-Fc 이량체는 유효량을 투여하여, 환자를 치료하는 단계를 포함하는, 인간 또는 동물 신체의 치료 또는 진단 방법, 예를 들어, 인간 환자에서의 질환 또는 장애의 치료(예방적 처치를 포함할 수 있음) 방법에 이용될 수 있다. 치료가능한 증상은 TGFβ1이 역할을 수행하는 임의의 것, 예를 들어, 섬유성 질환, 암, 면역-매개 질환 및 상처 치유, 예를 들어, 광범위 전신 경화증, 골 재형성 질환, 신장 질환 및/또는 그들의 조합을 포함한다.
- [0079] 인간 TGFβ1에 특이적인 항체는 동물 모델에서 TGFβ1 사구체신염(문헌[Border et al. (1990) Nature 346: 371-374]), 신경 흥터(문헌[Logan et al. (1994) Eur. J. Neurosci. 6: 355-363]), 피부 흥터(문헌[Shah et al. (1992) Lancet 339: 213-214]; 문헌[Shah et al. (1994) J. Cell Science 107: 1137-1157]; 문헌[Shah et al. (1995) J. Cell Science 108: 985-1002]) 및 폐 섬유증(문헌[Giri et al. (1993) Thorax 48: 959-966])의 치료를 위하여 효율적인 것으로 나타났다. 추가로, TGFβ1, 2 및 3에 대한 항체는 폐 섬유증, 방사선 유도 섬유증(미국 특허 제5,616,561호), 골수섬유증, 화상, 뒤뮈트렌 수축, 위궤양 및 류마티스 관절염의 모델에서 효과적인 것으로 나타났다(문헌[Wahl et al. (1993) Exp. Medicine 177: 225-230]).
- [0080] scFv-Fc 이량체는 TGFβ1 활성으로부터 직접적으로 또는 간접적으로 야기되는 질환 및 증상을 치료하는데 유용하다. scFv-Fc 이량체는 시험관내 또는 생체내에서 인간 TGFβ1 아이소폼의 활성을 선택적으로 저해할 수 있다. TGFβ1 아이소폼의 활성은 TGFβ-매개의 신호전달, 세포외 기질(ECM) 침착, 상피 및 내피 세포 증식의 저해, 평활근 증식의 촉진, III형 콜라겐 발현의 유도, TGF-β, 피브로넥틴, VEGF 및 IL-11 발현의 유도, 잠재 관련 펩티드(Latency Associated Peptide)의 결합, 종양-유도 면역억제, 혈관신생의 촉진, 근섬유아세포의 활성화, 전이의 촉진 및 NK 세포 활성의 저해를 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 예를 들어, scFv-Fc 이량체는 국소분절 사구체경화증(FSGS), 간 섬유증(HF), 급성 심근경색증(AMI), 특발성 폐섬유증(IPF), 피부경화증(SSc) 및 마르판 증후군을 치료하는데 유용하다.
- [0081] scFv-Fc 이량체는 섬유성 질환(예를 들어, 사구체신염, 신경 흥터, 피부 흥터, 폐 섬유증, 허파 섬유증, 방사선 유도 섬유증, 간 섬유증, 골수섬유증), 화상, 면역 매개의 질환, 염증성 질환(류마티스 관절염 포함), 이식 거부, 암, 뒤뮈트렌 구축 및 위궤양을 포함하나 이들에 한정되지 않는 질환 및 증상을 치료하는데 유용하다. 그들은 또한 당뇨병(I형 및 II형) 신장병증, 방사선-유도 신장병증, 폐색성 신장병증, 광범위 전신 경화증, 폐 섬유증, 동종이식 거부, 유전성 신장 질환(예를 들어, 다낭성 신장 질환, 수질해면신장, 마제신), 사구체신염, 신장

경화증, 신장석회증, 전신흡반루푸스, 쇼그렌 증후군, 버거스병, 전신 또는 사구체 고혈압, 세뇨관간질성 신장병증, 신세뇨관산증, 신장 결핵 및 신경색증을 포함하나 이들에 한정되지 않는 신장 기능부전을 치료하고, 그를 예방하고, 그의 발생 위험을 감소시키는데 유용하다. 특히, 그들은 레닌 저해제, 안지오텐신-전환 효소(ACE) 저해제, Ang II 수용체 길항제("Ang II 수용체 차단제"로도 알려져 있음) 및 알도스테론 길항제를 포함하나 이들에 한정되지 않는 레닌-안지오텐신-알도스테론 시스템의 길항제와 병용되는 경우 유용하다. 이러한 길항제와 병용하여 scFv-Fc 이량체를 이용하는 방법은 예를 들어, WO 2004/098637호에 나타나 있다.

[0082] scFv-Fc 이량체는 또한, 전신 경화증, 수술후 유착, 켈로이드 및 비후 흉터, 증식유리체망막병증, 녹내장 배액수술, 각막 손상, 백내장, 폐로니병, 성인 호흡 곤란 증후군, 간 경화증, 심근경색증 후 흉터, 혈관성형술 후 재협착증, 지주막하 출혈 후 흉터, 다발성 경화증, 고리관절제술 후 섬유증, 힘줄 및 기타 회복 후의 섬유증, 문신 제거로 인한 흉터, 담즙성 간경화증(경화성 담관염 포함), 심장막염, 흉막염, 기관절개술, 투과성 중추신경계 손상, 호산구성 근육통 증후군, 혈관 재협착, 정맥폐쇄병, 췌장염 및 건선성 관절병증을 포함하는 ECM의 침착과 관련된 질환 및 증상을 치료하는데 유용하다.

[0083] scFv-Fc 이량체는 추가로, 질환 및 증상, 예를 들어, 정맥 궤양, 허혈성 궤양(욕창), 당뇨병 궤양, 이식 부위, 이식 공여자 부위, 찰과상 및 화상, 기관지 상피의 질환, 예를 들어, 천식, ARDS, 장 상피의 질환, 예를 들어, 세포독성 치료와 관련된 점막염, 식도 궤양(역류 질환), 위 궤양, 소장 및 대장 병변(염증성 장 질환)에서 재상피화를 촉진시키는데 유용하다.

[0084] scFv-Fc 이량체는 또한 예를 들어, 죽상경화 판의 안정화, 혈관 문합의 치유의 촉진에 있어서 내피 세포 증식을 촉진시키거나, 예를 들어, 동맥 질환, 재협착 및 천식에서 평활근 세포 증식을 저해하기 위해 사용될 수 있다.

[0085] scFv-Fc 이량체는 대식구-매개의 감염에 대한 면역 반응을 증진시키는데 유용하다. 그들은 또한, 종양, AIDS 또는 육아종 질환에 의해 야기되는 면역억제를 감소시키는데 유용하다. scFv-Fc 이량체는 과증식성 질환, 예를 들어, 유방, 전립선, 난소, 위, 신장, 췌장, 대장, 피부, 폐, 자궁경부 및 방광암, 신경교종, 중피종 및 다양한 백혈병 및 육종, 예를 들어, 카포시 육종을 포함하나 이들에 한정되지 않는 암을 치료하는데 유용하며, 이러한 종양의 재발 또는 전이를 치료하거나 예방하는데 유용하다. 본 발명의 scFv-Fc 이량체는 또한 사이클로스포린-매개의 전이를 저해하는데 유용하다.

[0086] 암 치료법의 맥락에서, "치료"는 종양 성장의 감속 또는 종양 전이의 감소 및 암의 부분적인 관해를 야기하여, 환자의 예상 수명을 연장시키는 임의의 의학적 개입을 포함한다.

[0087] 치료 방법은 scFv-Fc 이량체 또는 scFv-Fc 이량체를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. scFv-Fc 이량체는 투여용 약제의 제조에 사용될 수 있다. 예를 들어, 약제 또는 약제학적 조성물의 제조 방법은 scFv-Fc 이량체를 약제학적으로 허용되는 부형제와 함께 제형화하는 단계를 포함한다. 조성물은 단독으로 또는 치료할 증상에 따라 동시에 또는 순차적으로 다른 치료와 병용하여 투여될 수 있다.

[0088] 투여는 바람직하게는 환자에게 이익을 보이기 위해 충분한 "치료적 유효량"으로 이루어진다. 이러한 이익은 특정 질환 또는 증상의 적어도 하나의 징후의 적어도 개선일 수 있다. 투여되는 실제 양 및 투여 속도 및 시간-경과는 치료할 질환 또는 증상의 성질 및 중증도에 좌우될 것이다. 치료의 처방, 예를 들어, 투여량에 대한 결정 등은 해당 분야의 기술 수준으로 충분히 설계할 수 있는 전임상 및 임상 연구를 기반으로 결정될 수 있다.

[0089] 정확한 용량은 scFv-Fc 이량체가 진단을 위한 것인지 치료를 위한 것인지, 치료할 영역의 크기 및 위치 및 scFv-Fc 이량체에 부착된 임의의 검출가능한 표지 또는 기타 분자의 성질을 포함한 수많은 요인에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 전형적인 scFv-Fc 이량체의 용량은 전신 적용의 경우, 100 µg 내지 1 g 및 국소 적용의 경우, 1 µg 내지 1 mg의 범위일 수 있다. 성인 환자의 단일 치료를 위한 용량은, 아동 및 유아를 위해 비례적으로 조정될 수 있다. 치료는 의사의 재량으로, 매일, 주 2회, 매주, 매달, 또는 다른 간격으로 반복될 수 있다. 치료는 주기적일 수 있으며, 투여 사이의 기간은 약 2주 이상, 바람직하게는 약 3주 이상, 더욱 바람직하게는 약 4주 이상, 또는 1개월에 약 1회이다.

[0090] 환자의 체중 kg당 약 0.1, 0.3, 1, 3, 10 또는 15 mg의 용량 수준이 유용하고 안전한 것으로 예상된다. 예를 들어, 랫트 및 마우스에서 0.5 내지 5 mg/kg은 급성 환경에서 유효 용량이다. 따라서, 장기간 투여를 위하여, 예상되는 21일의 반감기에 기초하여 0.3 내지 10 mg/kg이 인간에게 투여될 수 있다. 용량은 최적의 투여를 용이하게 하기에 충분히 낮지만, 효능을 위해 충분할 수 있다. 예를 들어, 50 mg 미만의 용량은 피하 투여를 용이하게 한다. 정맥내 투여는 높은 용량 및 긴 투여 간격을 필요로 할 수 있는 중증 질환을 위한 전달 경로로 사용될 수 있다. 피하 주사는 생성물에 대한 잠재적인 면역 반응을 증가시킬 수 있다. 국소화된 질환을 위한 국소의 투여

는 투여되는 생성물의 양을 감소시키고, 작용 부위에서 농도를 증가시킬 수 있으며, 이는 안전성을 향상시킬 수 있다.

- [0091] 본 발명의 scFv-Fc 이량체는 주사에 의해, 예를 들어, 피하, 정맥내, 공동내(예컨대, 종양 절제 후), 병변내, 복강내 또는 근육내로 투여될 수 있다. scFv-Fc 이량체는 또한, 흡입에 의해, 또는 국소적으로(예를 들어, 안구내, 비강내, 직장, 상처 내로, 피부 상으로) 또는 경구로 전달될 수 있다.
- [0092] scFv-Fc 이량체는 통상적으로, scFv-Fc 이량체에 더하여 적어도 하나의 성분을 포함할 수 있는 약제학적 조성물의 형태로 투여될 것이다. 따라서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제, 담체, 완충제, 안정화제 또는 해당 분야의 숙련자에게 널리 알려져 있는 기타 물질을 포함할 수 있다. 이러한 물질은 무독성이어야 하며, 활성 성분의 효능을 방해해서는 안 된다. 이러한 물질은 예를 들어, 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅제, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화 및 흡수 지연제를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체의 일부 예는 물, 염수, 인산염 완충 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 및 그들의 조합이다. 많은 경우에, 조성물 내에 등장화제, 예를 들어, 당류, 폴리알콜, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 약제학적으로 허용되는 물질의 추가적인 예에는 습윤제 또는 보조 물질, 예를 들어, 저장수명 또는 유효성을 증가시키는 유효제, 보존제 또는 완충제가 있다.
- [0093] 담체 또는 기타 물질의 정확한 성질은 투여 경로에 따라 달라질 것이다. 정맥내 주사 또는 고통 부위에서의 주사를 위하여, 활성 성분은 발열원이 없고, 적절한 pK, 등장성 및 안정성을 갖는, 비경구적으로 허용되는 수용액의 형태로 존재할 것이다. 해당 분야의 관련 숙련자는 예를 들어, 염화나트륨 주사, 링거 주사 및 젯산 링거 주사와 같은 등장성 비히클을 이용하여 적절한 용액을 충분히 제조할 수 있다. 보존제, 안정화제, 완충제, 항산화제 및/또는 기타 첨가제가 포함될 수 있다.
- [0094] scFv-Fc 이량체는 액체, 반고체 또는 고체 형태, 예를 들어, 액체 용액(예컨대, 주사가능한 및 주입가능한 용액), 분산액 또는 현탁액, 분말, 리포솜 및 좌제로 제형화될 수 있다. 바람직한 형태는 의도한 투여 방식, 치료적 적용, 분자의 물리화학적 특성 및 전달 경로에 따라 달라진다. 제형은 부형제, 또는 부형제의 조합, 예를 들어, 당류, 아미노산 및 계면활성제를 포함할 수 있다. 액체 제형은 매우 다양한 scFv-Fc 이량체 농도와 pH를 포함할 수 있다. 고체 제형은 예를 들어, 동결건조, 분무 건조, 또는 초임계 유체 기술에 의한 건조에 의해 생성될 수 있다.
- [0095] 치료적 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 분산액, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적절한 다른 규칙 구조(ordered structure)로서 제형화될 수 있다. 멸균 주사가능한 용액은 scFv-Fc 이량체를 상기 열거된 성분 중 하나 또는 이들의 조합과 함께 적절한 용매에 혼입시킨 다음, 여과 살균시켜 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터의 기타 성분을 함유하는 멸균 비히클로 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 이전에 멸균-여과시킨 그의 용액으로부터 활성 성분 + 임의의 추가의 요망되는 성분의 분말을 생성시키는 진공 건조 및 동결-건조이다. 용액의 적절한 유통성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 입자 크기의 유지에 의해, 또는 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 조성물 내에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 야기될 수 있다.
- [0096] 특정 실시형태에서, 활성 화합물은 이식물, 경피 패치 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 비롯한 제어 방출 제형과 같이, scFv-Fc 이량체를 신속한 방출에 대해 보호할 담체를 이용하여 제조할 수 있다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예를 들어, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조를 위한 많은 방법은 특허를 받았거나, 일반적으로 해당 분야의 숙련자에게 공지되어 있다.
- [0097] scFv-Fc 이량체의 이용 방법은 TGFβ로의 결합을 야기하거나 그를 가능하게 하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 결합은 예를 들어, 환자로의 scFv-Fc 이량체의 투여 후에 생체내에서 일어날 수 있거나, 그것은 시험관내에서, 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯팅, 면역조직화학, 면역침전법, 친화성 크로마토그래피 또는 세포 기반의 검정 또는 생체의 기반의 치료 방법, 예를 들어, 세포 또는 체액을 생체 외에서 scFv-Fc 이량체와 접촉시킨 다음, 환자에게 투여하는 방법에서 일어날 수 있다.
- [0098] scFv-Fc 이량체를 포함하는 키트가 제공된다. scFv-Fc 이량체를 표지하여, 시료 중 그의 반응성이 측정되게 할 수 있다. 키트는 예를 들어, 진단 분석에서 사용될 수 있다. 키트는 성분의 사용에 대한 설명서를 포함할 수 있다. 이러한 방법의 수행을 보조하거나, 그를 가능하게 하기 위한 보조 물질이 키트에 포함될 수 있다.

- [0099] 시료 중 scFv-Fc 이량체의 반응성은 임의의 적절한 수단, 예를 들어, 방사성면역검정(RIA)에 의해 결정될 수 있다. 방사성 표지된 항원을 비표지된 항원(시험 시료)과 혼합하고, scFv-Fc 이량체에 결합되게 할 수 있다. 결합된 항원을 비결합된 항원으로부터 물리적으로 분리하고, scFv-Fc 이량체에 결합된 방사성 항원의 양을 결정한다. 경쟁적 결합 검정은 또한, 리포터 분자에 연결된 항원 또는 유사체를 사용하여 비-방사성 항원과 함께 사용될 수 있다. 리포터 분자는 형광색소, 인광체(phosphor) 또는 염료일 수 있다. 적절한 형광색소에는 플루오레세인, 로다민, 피코에리트린 및 텍사스 레드(Texas Red)가 포함된다. 적합한 발색 염료에는 디아미노벤지딘이 포함된다.
- [0100] 다른 리포터에는 거대분자 콜로이드성 입자 또는 미립자 물질, 예를 들어, 착색된, 자성 또는 상자성인 라텍스 비드 및 검출가능한 신호가 시각적으로 관찰되거나, 전자적으로 검출되거나 다르게 기록되게 직접적으로 또는 간접적으로 야기할 수 있는 생물학적 또는 화학적 활성제가 포함된다. 이들 분자는 예를 들어, 발색시키거나 색상을 변화시키거나, 또는 전기적 특성의 변화를 야기하는 반응을 촉매작용시키는 효소일 수 있다. 그들은 에너지 상태 사이의 전자 전이가 특징적인 스펙트럼 흡수 또는 방출을 야기하도록 분자적으로 여기가능할 수 있다. 그들은 바이오센서와 함께 사용되는 화학적 엔티티를 포함할 수 있다. 비오틴/아비딘 또는 비오틴/스트렙타비딘 및 알칼리성 포스포타제 검출 시스템이 사용될 수 있다. 항체-리포터 컨주게이트에 의해 생성되는 신호를 사용하여, 시료 중 관련 항체 결합의 정량화가 가능한 절대적 또는 상대적 데이터를 도출할 수 있다.
- [0101] 또한, 본 발명은 경쟁 검정에서 항원 수준을 측정하기 위한 scFv-Fc 이량체의 용도를 제공한다. scFv-Fc 이량체를 리포터 분자에 연결하여 예를 들어, 결합시에 물리적 또는 광학적 변화가 발생하게 할 수 있다. 리포터 분자는 검출가능한, 바람직하게는 측정가능한 신호를 직접적으로 또는 간접적으로 생성할 수 있다. 리포터 분자는 직접적으로 또는 간접적으로, 예를 들면 펩티드 결합을 통해 공유적으로 또는 비-공유적으로 연결될 수 있다. scFv-Fc 이량체 및 단백질 리포터는 펩티드 결합에 의해 연결될 수 있으며, 재조합에 의해 융합 단백질로서 발현될 수 있다.
- [0102] 본 발명의 추가의 양태 및 실시형태는 하기의 실험적 예시를 포함하여, 본 발명의 견지에서 해당 분야의 숙련자에게 명백해질 것이다.
- [0103] *실시예*
- [0104] **실시예 1: scFv 및 IgG4 항체의 친화성 및 효력**
- [0105] CAT192(IgG4)(메틸리무맵)는 TGF- $\beta$ 1을 선택적으로 중화시키는 인간 IgG4 모노클로날 항체이다. TGF $\beta$ 1(20-600RU)을 NHS/EDC 화학을 사용하여 비아코어(Biacore) 상의 CM5 칩에 고정화시켰다. 다양한 양의 CAT192(IgG4)를 표면에 주입하여, 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정되는 TGF $\beta$ 1로의 결합을 모니터링하였다. 데이터를 1:1 결합 모델을 사용하여 분석하여, 결합 상수를 결정하였다. CAT192(IgG4)는 도 2에 나타낸 바와 같이 모체 CAT191scFv에 의한 결합과 비교하는 경우 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정시 상대적으로 낮은 친화성으로 TGF $\beta$ 1에 결합하는 것으로 관찰되었다. CAT192(IgG4)는 또한 TGF $\beta$ 1-자극되는 IL-11 생성의 저해를 측정하는 A549 세포-기반의 효력 검정에서 상대적으로 낮은 효능(IC50 = 약 10 nM)을 보였다. A549 검정의 대표적인 결과는 도 3에 나타나 있다. A549 검정을 문헌[Rapoza et al. (2006) "Development of an in vitro potency assay for therapeutic TGF $\beta$  antagonists: the A549 cell bioassay," J. Immunol. Methods 316: 18-26]에 개시된 절차에 따라 행하였다. 약 10 nM의 길보기 해리 상수가 TGF $\beta$ 1로의 특이적인 결합을 보이지만, CAT192(IgG4)의 치료적 적용은 더 높은 상대 효력으로부터 이익을 얻을 것이다.
- [0106] **실시예 2: 변형된 IgG1 항체**
- [0107] CAT192(IgG4) 친화성은 특정 변성 조건에 의해 약간 증진될 수 있으며, 이는 항체 폴딩이 IgG4로의 scFv의 전환 동안 친화성의 소실을 야기할 수 있음을 뒷받침한다. IgG4 폴딩은 독특한 것으로 제안되었다(문헌[Aalberse and Schuurman "IgG4 breaking the rules", Immunology 105:9-19]). IgG4에서 Fab 아암 교환 및 Fab와 Fc CH2 도메인의 상호작용은 CAT192(IgG4)에 의한 이러한 친화성의 소실을 설명할 가능성이 있을 수 있다. 따라서, IgG4 Fc(CH1, CH2 및 CH3 도메인)를 공통 IgG1 서열로 대체함으로써 IgG1 버전을 생성하도록 CAT192를 리모델링하였다. CAT192(IgG1)를 코딩하는 DNA를 진아트(GeneArt)로부터 합성하고, 발현 벡터 pCEP4(-E+I)Dest 내로 서브클로닝하였다.
- [0108] CAT192(IgG1)를 HEK293 트랜스펙션으로부터 생성하고, 단백질 A 컬럼으로 정제하였다. 그러나 IgG4로부터 IgG1로의 CAT192의 리모델링은 그의 친화성을 증가시키지 않았다. IgG1 및 IgG4로부터 생성되는 Fab 단편도 또한 그의 친화성을 증가시키지 않았다. CAT191(scFv)(SEQ ID NO: 12)의 높은 친화성은 전장 항체 포맷이 IgG1이든지

IgG4이든지 간에, 전장 항체 포맷으로의 전환 동안 소실되는 것으로 결론지었다. 라이브러리로부터 수득되는 scFv 성분을 치료적 개발을 위하여 종종 전장 IgG 포맷으로 조작하기 때문에, 이것은 예상치 못한 것이었다.

[0109] **실시예 3: 다양한 이량체 설계**

[0110] CAT191(scFv)(SEQ ID NO: 12)은 표면 플라즈몬 공명을 사용하여 높은 친화성으로 TGFβ1에 결합하는 것으로 관찰되었지만, CAT191(scFv)은 TGFβ1의 효율적인 중화에 필요한 결합력이 결여되어 있다. 따라서, scFv 성분을 기본 빌딩 블록으로 사용하여 다양한 다른 포맷을 시험하였다. 시험되는 포맷을 포함하는 항체 단편의 일반적인 포맷은 도 1에 도시되어 있다.

[0111] 시험되는 포맷에는 디아바디, 펩티드-유래의 이량체(예를 들어, 류신 지퍼 펩티드-유래 이량체) 및 scFv-Fc 이량체가 포함되었다. scFv CAT191 디아바디에서 (Gly4Ser)3-형 링커를 짧은 5aa 링커(GSSGG)(SEQ ID NO: 19)로 대체하여, 비-공유 2가 결합체(디아바디 이량체)를 생성하였다. 각 단량체는 SEQ ID NO: 14에 나타난 서열을 가졌다. 류신 지퍼 펩티드-유래 이량체의 각 단량체는 SEQ ID NO: 16에 나타난 서열을 가졌다. 마지막으로, scFv-Fc 이량체의 각 단량체는 SEQ ID NO: 9에 나타난 서열을 가졌다. 디아바디 및 펩티드 유래 이량체를 에스케리키아 콜라이에서 발현시키고, scFv-Fc를 HEK293 세포에서 발현시켰다.

[0112] 류신 지퍼 펩티드-유래 이량체는 발현시키기 어려우며, 부분적으로 정제된 이량체는 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정시, 오직 중등의 친화성만을 보였다. 디아바디(scFv 5aa)는 오직 중등의 친화성을 보였지만, 결합력을 보이지 않았다. 대조적으로, 일시적 HEK293 트랜스펙션으로부터 생성되는 scFv-Fc 이량체는 높은 친화성 및 결합력으로 TGFβ1에 특이적으로 결합하는 것으로 관찰되었다. 표면 플라즈몬 공명으로 수득되는 겔보기 해리 상수로서 표현되는 결합 결과는 하기 표 2에 요약되어 있다.

**표 2**

**scFv-Fc 이량체에 대한 결합 결과**

시료	24 RU TGFβ1 K <sub>d</sub> (nM)	105 RU TGFβ1 K <sub>d</sub> (nM)	544 RU TGFβ1 K <sub>d</sub> (nM)	
scFv-Fc	0.5	0.2	0.03	결합력 결합력 부재
CAT191 scFv	1.7	1.6	1.3	
scFv 5aa	4.1	3.3	4.8	

[0113]

[0114] 또한, 다양한 포맷의 TGFβ1 중화 효력을 A549 세포-기반의 생물학적 검정에서 비교하였다. 도 3은 디아바디("scFv 디아바디 5aa"), CAT191(scFv)("scFv"), scFv-Fc 이량체("CAT191(scFv-Fc)") 및 CAT192(IgG4)("CAT192")에 대한 A549 생물학적 검정 결과를 보여준다. 도 3에 나타난 바와 같이, scFv-Fc 이량체는 이러한 검정에서 CAT192보다 수 만배 더 낮은 세기의 겔보기 해리 상수를 나타내었다(약 10<sup>1</sup> nM에 비하여 약 10<sup>-3</sup> nM).

[0115] **실시예 4: scFv-Fc 클론**

[0116] CAT191(scFv-Fc)을 클로닝하고, CHO 세포에서 보다 대규모로 생성하였다. CAT191 scFv-Fc 코딩 서열을 유전자 특이적 정방향 및 역방향 프라이머 세트를 사용하여 pCEP4 기반의 발현 벡터로부터 PCR 증폭시켰다. PCR 증폭의 부분으로서, 하기의 변화를 CAT191 scFv-Fc 코딩 서열에 도입하였다: 1) 5' 및 3' 말단에서의 엔도뉴클레아제 부위의 부가, 2) 시작 코돈의 인접 상류의 코작(Kozak) 공통 서열의 부가, 3) "TAG" 종결 코돈에서 "TAA"로의 변경, 및 4) 종결 코돈의 4개 뉴클레오티드 상류의 티미딘의 구아노신으로의 돌연변이 및 이에 따른 내인성 스플라이스 공여자 부위의 제거. 스플라이스 공여자 부위 돌연변이는 아미노산 변경을 초래하지 않았다.

[0117] PCR 증폭된 CAT191 코딩 서열을 서플 벡터 내로 서브클로닝하여, 서열 검증 및 분자 클로닝을 용이하게 하였다. 서열 검증 후에, CAT191 코딩 서열을 젠자임(Genzyme) 발현 벡터 pGZ600 및 pGZ620 내로 클로닝하였다. 벡터 둘 모두는 햄스터 β-액틴 프로모터를 사용하여 CAT191 트랜스유전자의 발현을 유도하였다. 그들은 또한, 개별 프로모터(SV40)에 의해 유도되는 DHFR 선택가능한 마커를 함유하여, CHO 세포에서의 선택을 가능하게 하였다.

CHO-8D6 숙주 세포주를 pGZ600-CAT191 또는 pGZ620-CAT191 발현 플라스미드로 트랜스펙션시켰다. 잠시의 회복 기간 후에, 트랜스펙션된 세포를 선택을 위하여 뉴클레오티드-결핍 성장 배지 내로 배치시켜, 안정한 트랜스펙턴트(transfectant)의 풀(pool)을 생성하였다. 풀을 선택으로부터 회수한 후에, 제2차 선택을 20 nM 메토티렉세이트의 존재하에 수행하였다. 이러한 방식으로 선택된 CHO 풀을 증량시키고, 단백질 A 컬럼을 사용한 정제를 위하여 조절 배지를 사용하였다.

[0118] CHO 세포-생성된 단백질을 SDS-PAGE, 비아코어 결합, SEC-HPLC 및 A549 세포 효력 검정에 의해 특성화하였다. 결과에 의해, scFv-Fc 이량체가 더 높은 친화성 및 효력을 가지며, 그것이 TGFβ1을 특이적으로 중화시키는 것이 확인되었다. 효력은 유리하게 범-특이적 GC1008 항체와 비교된다(도 6 및 도 7).

[0119] **실시예 5: 순환 반감기**

[0120] CAT191(scFv-Fc)의 순환 반감기를 표 3에 도시된 연구 설계를 사용하여 마우스 모델에서 시험하였다.

**표 3**

scFv-Fc 이량체의 순환 반감기

군	동물 번호	시험 항목	용량 (mg/kg)	투여 경로	시점
1	1-8	scFv-Fc	1.0	ip	투여 후 2, 6, 24, 72, 144, 240 및 336시간
2	9-18	scFv-Fc	1.0	iv	투여 후 0.25, 6, 24, 72, 144, 240 및 336시간

[0121]

[0122] 복강내(IP) 또는 정맥내(IV) 투여 후 특정 시간에 혈액을 안와정맥총으로부터 채혈하였다. 대략 60 μl의 전혈을 헤마토크리트 튜브(hematocrit tube) 내로 수집하고, 혈청을 위하여 처리하였다. 모든 시료를 분석 시까지 -80℃에 보관하였다. CAT191(scFv-Fc) 농도를 ELISA에 의해 결정하였다. 이러한 약동학적 연구의 결과는 도 4 및 도 5에 도시되어 있다. 결과에 의해, 수 시간인 전형적인 scFv 분자에 대한 순환 반감기보다 훨씬 더 긴 1.5 내지 2.0일의 순환 반감기가 입증되었다.

[0123] **실시예 6: scFv-Fc 이량체 안정성**

[0124] -80℃에 보관된 CAT191(scFv-Fc)의 안정성을 SEC-HPLC, 비아코어 TGFβ1 결합 및 A549 효력 검정에 의해 1년 동안 모니터링하였다. 시험 기간 동안 응집, 친화성 및 효력의 변화가 관찰되지 않았다. 4℃에 보관된 물질은 1년에 걸쳐 약하지만 지속적인 응집의 증가를 나타내었다. 더 작은 크기, 높은 선택성, TGFβ1에 대한 효력 및 긴 생체내 반감기의 독특한 조합은, CAT191(scFv-Fc)이 치료적 적용을 위한 이상적인 후보물질이 되게 한다.

[0125] 과학 간행물을 포함하지만 이에 한정되지 않는 본 명세서에 열거된 모든 문헌, 및 특허 및 특허 출원 공보는 전체 내용이 본원에 복사되는 것처럼 본 명세서에 참조로 포함된다.

시열 목록

**SEQ ID No. 1:** 인간 IgG1 VH 도메인 클론 SL15(SQN4 US6492497)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI  
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS  
GYDTPQYSWGQGT TTVTVSS

**SEQ ID No. 2:** 인간 IgG1 VH 도메인 클론 JT182(SQN10 US6492497)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI  
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS  
GYDTPASPDWGQGT TTVTVSS

[0126]

**SEQ ID No. 3: 합성 링커**

SGGSGGGGSGGGGS

**SEQ ID No. 4: 합성 링커**

GGGSGGGGSGGGGS

**SEQ ID No. 5: 인간 IgG1 V<sub>K</sub> 도메인 클론 SL15A: (SQN6 US6492497)**

EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL  
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

**SEQ ID No. 6: 인간 IgG1 V<sub>K</sub> 도메인 클론 SL15S: (SQN8 US6492497)**

EIVLTQSPSSLSASVGDRTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL  
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

**SEQ ID No. 7: 인간 IgG1 힌지 영역**

PKSCDKTHTCPPAPPELLGGP

**SEQ ID No. 8: 인간 IgG1 Fc 영역**

SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK  
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP  
PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**SEQ ID No. 9: CAT191(scFv-Fc)**

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI  
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS  
GYDTPQYSWGQGTITVTVSSSGGGGGGGGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGD  
RVTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGTDF  
TLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKGGSGPKSCDKTHTCPPCP  
APPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ  
PENNYKTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYT  
QKSLSLSPGK

**SEQ ID No. 10: CAT192 (IgG4) 경쇄**

EWLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL  
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKR  
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE  
C

[0127]

**SEQ ID No. 11: CAT192 (IgG4) 중쇄**

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI  
SYDGSIKYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS  
GYDTPQYSWGQGTTVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF  
PEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD  
HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVVVDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ  
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQV  
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR  
WQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKLSLSLGK

**SEQ ID No. 12: CAT191(scFv)**

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI  
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS  
GYDTPQYSWGQGTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGD  
RVITICRSSQIGDDLWYQKPKGAPILLIYGTSTLQSGVPSRFRSGSGS  
GTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

**SEQ ID No. 13: 디아바디-5aa 인코딩 핵산**

atgacatgattacccaagcttggagccttttttggagattttcaacgtgaaaaattattatcgaattccttagttgtcc  
tttctatgcgccacggccatggccgaggtgcagctggtggagctctggggagggcgtggtccagcctgggaggtcc  
ctgagactctctgtgcagcctctggattcacttcaagtactatggcatgcaactgggtccccaagcctcaggaaggag  
ctggagtggtggcagttatcatatgatggaagtattaaatactatgcagactccgtgaaaggccgattcaccatccag  
agacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacgcctgagagctgaggacacggctgtgtattactgtgcgcaac  
tggatgaatatagtggctacgatacggacccccagtactcctgggggcaaggggaccaggtcaccgtcctcaggttctc  
tggcgggtgaaattgtgctgactcagctcctcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcactgcccgtcaa  
gtcagggcattggagatgattgggctggtatcagcagaagccagggaaagcccctatcctcctgatctatgtatcaccac  
tttacaagtggtgctccgtaaggttcagcggcagtgatctggcacagattcactcaccatcaaacgcctgcaagcct  
gaaatgattgcaacttattactgtctacaagattccaattaccgctcacttccggcggagggacacgactggagattaaacgt  
gcccggcgcacatcatcaccatcacggggcccgaacaacaaactcatctcagaagagatctgaatggggccgcat  
agtagctcagatcaaacgggctagccagccagaactgccccggaaagccccgaggatgtcagaccaccaccacc  
ac

**SEQ ID No. 14: 디아바디-5aa**

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTESSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI  
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS  
GYDTPQYSWGQGTTVTVSSGSSGGEIVLTQSPSSLSASVGD  
RVITICRSSQIGDDLWYQKPKGAPILLIYGTSTLQSGVPSRFRSGSGS  
GTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKRAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDLN  
GAA

**SEQ ID No. 15: 류신 지퍼 웨터드-유레 이량체 인코딩 핵산**

gaggtgcagctggtggagctctgggggagggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactctctgtgcagcctctggatt  
caccttcagtagctatggcatgcaactgggtccgccagcctcagccaaggagctggaatgggtggcagttatcatatga  
tggaagtattaaatactatgcagactccgtgaaaggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctg  
caaatgaacagcctgagagctgaggacacggctgtgtattactgtgcgcgaactggtgaatatagtggctacgatacggac  
ccccagtactcctggggcgaaggaccacggtcaccgtctcctcaagtggaggcgttcagcggaggtgcaagcggc

[0128]

gggtggcgggaltcggaaattgtgctgactcagctccatccctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttggc  
gtcaagtcaaggcattggagatgattgggctggtatcagcagaagccagggaaagcccctatcctcctgatctatggtaca  
tccactttacaaagtgggtcccgtcaaggttcagcggcagtgatctggcacagatttacttccatcaacagcctgc  
agcctgaagatttgaacttattactgtctacaagattccaattaccgctcactttcggcggaggacacgactggagatta  
aacgtgcggccgcacatcatcaccatcacggggccgcagaacaaaactatctcagaagaggatctgaatggggc  
cgcaccaagcccagacccccaggttctcagcgaactggaaagaactgctgaaacatctgaaagaactgctgaaag  
gcccgcgtaaagcgaactggaaagaactgctgaaacatctgaaagaactgctgaaaggcgggtgcggcggcggctc  
atcatcaccatcat

**SEQ ID No. 16:** 류신 지퍼 웨터트-유래 이량체

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI  
SYDGSIKYYADS VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS  
GYDTPDQYSWGQGTITVTVSSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPSSLSASVGD  
RVITICRSSQIGDDL GWYQQKPGKAPILLIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSDTF  
LTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKRAAAHHHHHHGAAEQK  
LISEEDLNGAAPKPTPPGSSGELEELLKHLKELLKGRKGELEELLKHLKELL  
KGGAPGGHHHHHHH

**SEQ ID No. 17:** CAT191(scFv-Fc) 인코딩 핵산

gaggtgcagctgggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggctcctgagactcctctgagcagcctctggatt  
cacttcagtagctatggcatgactgggtccgccagcctccagcgaaggagctggagtgggtggcagttatcatatga  
tggaagtataaatactatgcagactccgtgaaggccgattcaccatcctcagagacaattccaagaacacgctgtatctg  
caaatgaacagcctgagagctgaggacacggctgtgtattactgtgcgcaactggtgaatatagtgctacgatacggac  
ccccagtactcctgggggcaaggaccacggctcaccgtctcctcaagtgaggcgggtcagcggagggtggcagcggc  
ggtggcggatcggaaattgtgctgactcagctccatccctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgc  
gtcaagtcaaggcattggagatgattgggctggtatcagcagaagccagggaaagcccctatcctcctgatctatggtaca  
tccactttacaaagtgggtcccgtcaaggttcagcggcagtgatctggcacagatttacttccatcaacagcctgc  
agcctgaagatttgaacttattactgtctacaagattccaattaccgctcactttcggcggaggacacgactggagatta  
aaggtggcagcggacctaactctgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggacc  
gtcagcttctcttcccccaaacccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggcagcagctgctggtggtggac  
gtgagccacgaagacctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggcgtggagggtgcataatgccaagacaaagccgc  
gggaggaagcagtaaacagcagcgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccagagctggctgaatggcaagga  
gtacaagtgcaaggtctcaacaaagccctcccagccccatcgagaaacatctcacaagcacaaggcagccccga  
gaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacgtgctgtcaag  
gcttctatcccagcagacatcggcgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgectcccgt  
gctggactccgagcgtctctctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagatggcagcaggggacgtctctc  
atgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctcctcctgtctccgggtaaatagtag

**SEQ ID No. 18:** 인간 TGFβ1

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIW  
SLDTQYSKVLALYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNM  
IVRSCKCS

**SEQ ID No. 19**

GSSGG

[0129]

**SEQ ID No. 20**

GGSG

**SEQ ID No. 21**

CPPCP

**SEQ ID No. 22**

SYGMH

**SEQ ID No. 23**

VISYDGSIKYYADSVKG

**SEQ ID No. 24**

TGEYSGYDTSGVEL

**SEQ ID No. 25**

TGEYSGYDTPQYS

**SEQ ID No. 26**

TGFYSGYDTPASPD

**SEQ ID No. 27**

RASQGIGDDLG

**SEQ ID No. 28**

GTSTLQS

**SEQ ID No. 29**

LQDSNYPLT

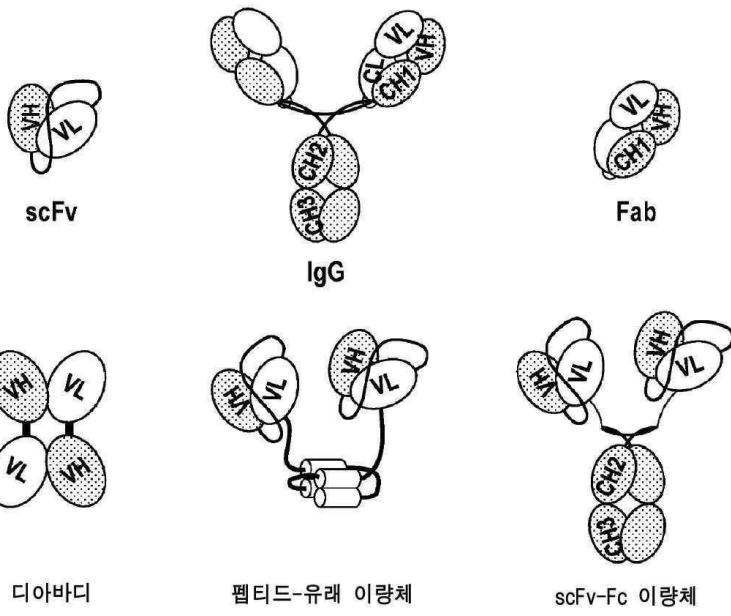
**SEQ ID No. 30**

TGX<sub>1</sub>YSGYDTX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>

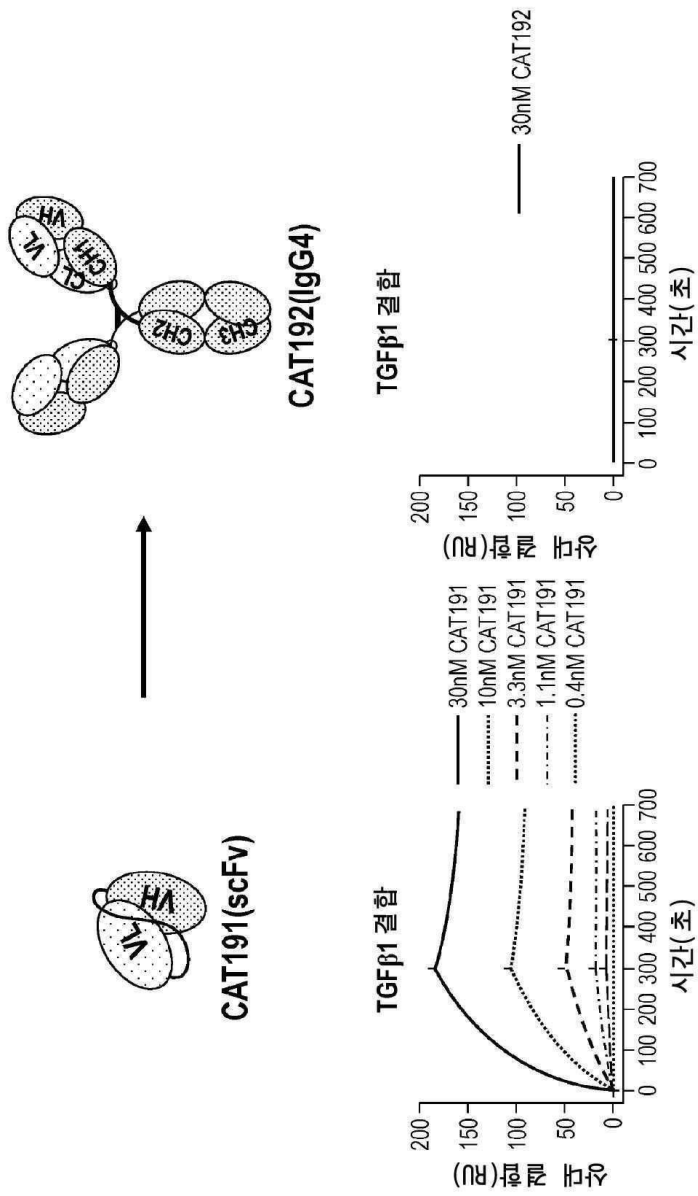
[0130]

도면

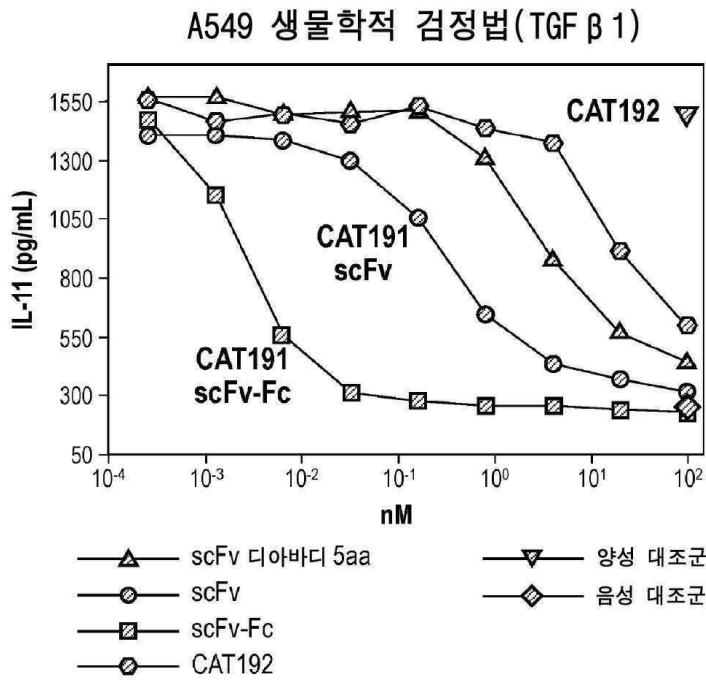
도면1



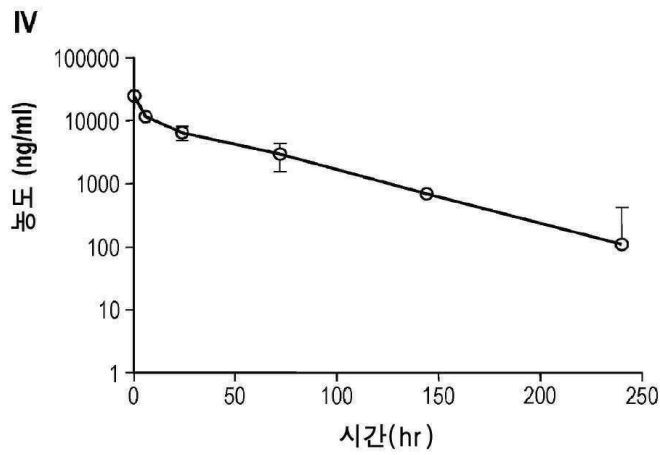
도면2



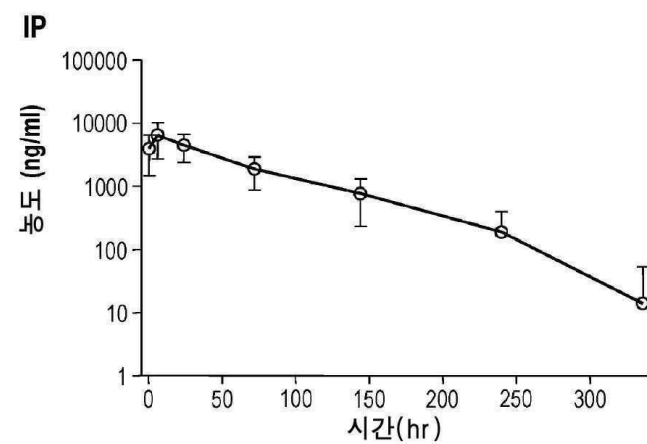
도면3



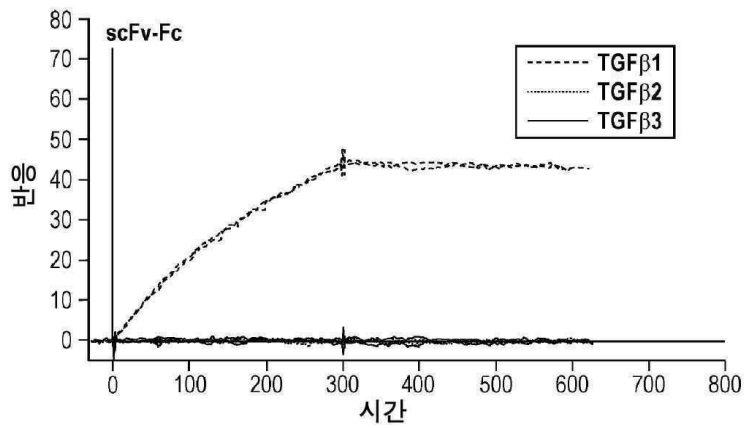
도면4



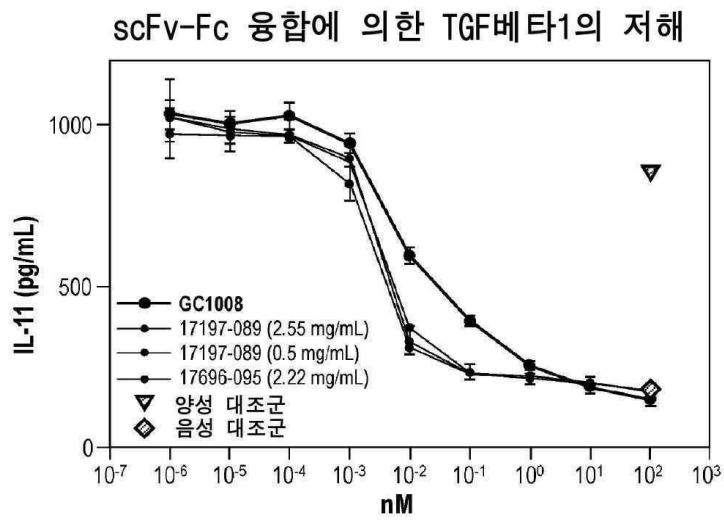
도면5



도면6



도면7



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Pan, Clark

Qiu, Huawei

Bird, Julie

<120> SCFV-FC DIMERS THAT BIND TRANSFORMING GROWTH FACTOR-Beta1 WITH HIGH AFFINITY, AVIDITY AND SPECIFICITY

<130> 578962

<150> 62/128133

<151> 2015-03-04

<160> 30

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 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 Glu Leu Glu Trp Val

35                    40                    45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85                    90                    95

Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser

100                    105                    110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115                    120

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 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 Glu Leu Glu Trp Val

35                    40                    45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val



20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 7



145                      150                      155                      160  
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
                                          165                      170                      175  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
                                          180                      185                      190  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
                                          195                      200                      205  
 Lys  
  
 <210> 9  
 <211> 480  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 9  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 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 Glu Leu Glu Trp Val  
                                          35                      40                      45  
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                          85                      90                      95  
 Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser  
                                          100                      105                      110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser  
                                          115                      120                      125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln

130                      135                      140  
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr  
 145                      150                      155                      160  
 Cys Arg Ser Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp Leu Gly Trp Tyr Gln Gln  
                                  165                      170                      175  
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Ile Leu Leu Ile Tyr Gly Thr Ser Thr Leu  
                                  180                      185                      190  
 Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
  
 195                      200                      205  
 Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr  
                                  210                      215                      220  
 Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
 225                      230                      235                      240  
 Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Gly Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
                                  245                      250                      255  
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
  
 260                      265                      270  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
                                  275                      280                      285  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
                                  290                      295                      300  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 305                      310                      315                      320  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
  
 325                      330                      335  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
                                  340                      345                      350  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
                                  355                      360                      365  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
                                  370                      375                      380

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys

385                    390                    395                    400

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

                         405                    410                    415

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

                         420                    425                    430

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

                         435                    440                    445

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

                         450                    455                    460

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

465                    470                    475                    480

<210> 10

<211> 213

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

1                    5                    10                    15

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp Leu

                         20                    25                    30

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

                         35                    40                    45

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

                         50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr

                         85                    90                    95

Phe Gly Gly 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> 11

<211> 450

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 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 Glu Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser



Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 355 360 365  
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 370 375 380  
  
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 385 390 395 400  
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp  
 405 410 415  
 Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 420 425 430  
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu  
 435 440 445  
  
 Gly Lys  
 450  
 <210> 12  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 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 Glu Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser

100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ser Gly Gly Gly Ser

115 120 125  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln

130 135 140  
 Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr  
 145 150 155 160

Cys Arg Ser Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp Leu Gly Trp Tyr Gln Gln  
 165 170 175  
 Lys Pro Gly Lys Ala Pro Ile Leu Leu Ile Tyr Gly Thr Ser Thr Leu

180 185 190  
 Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

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

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

245

<210

> 13

<211> 984

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

atgacatga ttacgccaag ctttggagcc ttttttttgg agattttcaa cgtgaaaaaa 60  
 ttattattcg caattccttt agttgttctt ttctatgctg cccagccggc catggccgag 120  
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 180  
 tgtgcagcct ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg ccaggetcca 240  
 ggcaaggagc tggagtgggt ggcagttata tcatatgatg gaagtattaa atactatgca 300  
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 360  
 caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gctgtgtatt actgtgctcg aactggtgaa 420

tatagtggct acgatacga cccccagtac tcttgggggc aaggaccac ggtcacctc 480  
 tcctcaggtt cctctggcgg tgaattgtg ctgactcagt ctccatctc cctgtctgca 540  
 tctgtaggag acagagtcac catcacttgc cggtaagtc agggcattgg agatgatttg 600  
 ggctggtatc agcagaagcc agggaaagcc cctatctcc tgatctatgg tacatccact 660  
 ttacaagtg gggccccgc aaggttcagc ggcagtggat ctggcacaga tttcactctc 720  
 accatcaaca gctgcagcc tgaagatttt gcaacttatt actgtctaca agattccaat 780

taccgcctca ctttcggcgg agggacacga ctggagatta aacgtgcggc cgccatcat 840  
 catcaccatc acggggcccg agaacaaaaa ctcatctcag aagaggatct gaatggggcc 900  
 gcatagtagc tcgagatcaa acgggctagc cagccagaac tcgccccgga agaccccgag 960  
 gatgtcgagc accaccacca ccac 984

<210> 14

<211> 262

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser

100 105 110

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

115 120 125

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



gcccctatcc tctgatcta tggtagatcc actttacaaa gtgggtccc gtcaaggttc 600  
 agcggcagtg gatctggcac agatttact ctacatca acagcctgca gcctgaagat 660  
 ttgcaactt attactgtct acaagattcc aattaccgc tcactttcgg cggagggaca 720  
 cgactggaga ttaaactgic ggccgcacat catcatcacc atcacggggc cgcagaacaa 780  
 aaactcatct cagaagagga tctgaatggg gccgcacca agcccagtac cccccaggt 840

tcttcaggcg aactggaaga actgetgaaa catctgaaag aactgctgaa aggccccggt 900  
 aaaggcgaac tggaagaact gctgaaacat ctgaaagaac tgctgaaagg cgggtgcgccg 960  
 ggcggtcacc atcatcacca tcat 984

<210> 16

<211> 328

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly 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 Glu Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile 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 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser

100 105 110

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

115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ile Val Leu Thr Gln

130 135 140

Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr



gcagactccg tgaagggccg attcacatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gcgaactggt 300  
 gaatatagtg gctacgatac ggacccccag tactcctggg ggcaaggagc cacggtcacc 360  
 gtctcctcaa gtggaggcgg ttcaggcgga ggtggcagcg gcggtggcgg atcggaatt 420  
 gtgctgactc agtctccatc ctccctgtct gcatctgtag gagacagagt caccatcact 480  
 tgccggtcaa gtcagggcat tggagatgat ttgggctggt atcagcagaa gccagggaaa 540

gccctatcc tctgatcta tggtagatcc actttacaaa gtgggtccc gtcaaggttc 600  
 agcggcagtg gatctggcac agatttact ctccatca acagcctgca gcctgaagat 660  
 ttgcaactt attactgtct acaagattcc aattaccgc tcaacttccg cggagggaca 720  
 cgactggaga ttaaaggtgg cagcggacct aaatcttgtag acaaaactca cacatgccca 780  
 ccgtgccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tctcttccc cccaaaacc 840  
 aaggacacc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 900  
 cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 960

aagacaaage cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1020  
 gtctgcacc aggactggct gaatggcaag gactacaagt gcaaggtctc caacaagcc 1080  
 ctcccagccc ccactgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1140  
 gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacgtgc 1200  
 ctggtcaaag gcttctatcc cagcagatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc 1260  
 gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggtcctt ctctcttac 1320  
 agcaagctca ccgtggacaa gagcagatgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1380

atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctcctgtc tccgggtaaa 1440  
 tagtag 1446

<210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Ala Leu Asp Thr Asn Tyr Cys Phe Ser Ser Thr Glu Lys Asn Cys Cys

1 5 10 15

Val Arg Gln Leu Tyr Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp

20 25 30

Ile His Glu Pro Lys Gly Tyr His Ala Asn Phe Cys Leu Gly Pro Cys

35 40 45

Pro Tyr Ile Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu

50 55 60

Tyr Asn Gln His Asn Pro Gly Ala Ser Ala Ala Pro Cys Cys Val Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Lys Val Glu Gln Leu Ser Asn Met Ile Val Arg Ser Cys Lys Cys Ser

100 105 110

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Gly Ser Ser Gly Gly

1 5

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Gly Gly Ser Gly

1

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 22  
 Ser Tyr Gly Met His  
 1 5

<210> 23  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 23  
 Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

<210> 24  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 24  
 Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Ser Gly Val Glu Leu  
 1 5 10

<210> 25  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 25  
 Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Asp Pro Gln Tyr Ser  
 1 5 10

<210> 26  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 26

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

1                    5                    10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp Leu Gly

1                    5                    10

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser

1                    5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr

1                    5

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc\_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc\_feature

<222> (10)..(14)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 30

Thr Gly Xaa Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

10