



등록특허 10-2560072



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년07월25일
(11) 등록번호 10-2560072
(24) 등록일자 2023년07월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/22 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7027372
- (22) 출원일자(국제) 2016년03월03일
심사청구일자 2021년03월03일
- (85) 번역문제출일자 2017년09월27일
- (65) 공개번호 10-2017-0120689
- (43) 공개일자 2017년10월31일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2016/020780
- (87) 국제공개번호 WO 2016/141245
국제공개일자 2016년09월09일
- (30) 우선권주장
62/128,149 2015년03월04일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
JP2003501348 A
WO2012135345 A1

- (73) 특허권자
젠자임 코포레이션
미국 메사추세츠주 02141 캠브리지 워터 스트리트
450
- (72) 발명자
추, 화웨이
미국 08807 뉴저지주 브리지워터 메일 코드: 55에
이-505에이 코퍼레이트 드라이브 55 사노피 내
버드, 줄리
미국 08807 뉴저지주 브리지워터 메일 코드: 55에
이-505에이 코퍼레이트 드라이브 55 사노피 내
- (74) 대리인
양영준, 임근실

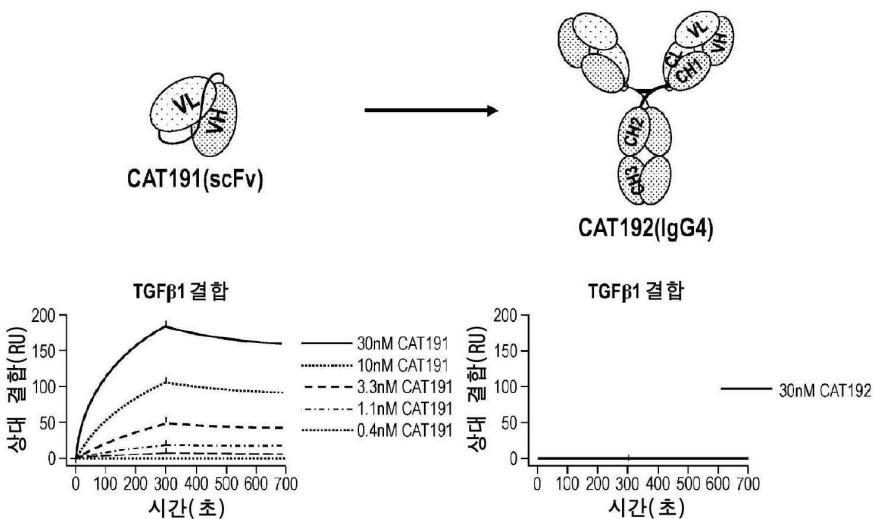
전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 한정선

(54) 발명의 명칭 전환 성장 인자-베타1에 높은 친화성, 결합력 및 특이성으로 결합하는 변형된-IgG 항체

(57) 요약

변형된 IgG 항체는 TGF β 1에 높은 친화성 및 결합력으로 선택적으로 결합하고, 이를 중화시킨다. 변형된 IgG 항체는 4개의 폴리펩티드 쇄를 포함하며, 폴리펩티드 쇄의 엘보우 영역에 대한 변형을 포함할 수 있다. 변형된 IgG 항체는 메텔리무맙과 동일한 VH 및 VL 도메인 또는 CDR 영역을 포함할 수 있다. 변형된 IgG 항체는 치료 및 진단 응용에 유용하다.

대 표 도scFv(CAT191)와 IgG4(CAT192) 간의 TGF β 1 친화성의 비교

(52) CPC특허분류

C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/522 (2013.01)
C07K 2317/53 (2013.01)
C07K 2317/55 (2013.01)
C07K 2317/567 (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

TGF β 1에 결합하고,

IgG 또는 IgG의 Fab 단편이며,

(i) SEQ ID No: 3에 나타낸 가변 도메인 (VL) 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 경쇄 (LC), 및

(ii) SEQ ID No: 1에 나타낸 가변 도메인 (VH) 아미노산 서열을 포함하는 면역글로불린 중쇄 (HC)

를 포함하며,

여기서

(a) LC 엘보우 영역은 제1 링커를 포함하거나,

(b) HC 엘보우 영역은 제2 링커를 포함하거나, 또는

(c) 상기 (a) 및 (b) 모두이고,

여기서

상기 제1 링커 및 제2 링커는 독립적으로 GG, GGS, GGGS 또는 GGGGS을 포함하고,

상기 HC는 IgG4 아이소형의 것인

분리된 결합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 HC가 인간 IgG4 아이소형의 것인 분리된 결합 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 HC가 (EU 넘버링에 따른) S228P 돌연변이를 포함하는 헌지 영역을 포함하는 것인 분리된 결합 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 HC가 SEQ ID No: 56, 57, 58 또는 61을 포함하는 것인 분리된 결합 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 LC가 SEQ ID No: 16 및 38-43 중 어느 하나를 포함하는 것인 분리된 결합 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 LC가 SEQ ID No: 39-43 중 어느 하나를 포함하는 것인 분리된 결합 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 HC가 SEQ ID No: 17, 18, 56-58 및 61 중 어느 하나를 포함하는 것인 분리된 결합 단백질.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 HC 및 상기 LC가

각각 SEQ ID No: 18 및 39,

각각 SEQ ID No: 18 및 40,
각각 SEQ ID No: 18 및 41,
각각 SEQ ID No: 18 및 42,
각각 SEQ ID No: 18 및 43,
각각 SEQ ID No: 56 및 38,
각각 SEQ ID No: 56 및 39,
각각 SEQ ID No: 56 및 40,
각각 SEQ ID No: 56 및 41,
각각 SEQ ID No: 56 및 42,
각각 SEQ ID No: 56 및 43,
각각 SEQ ID No: 57 및 38,
각각 SEQ ID No: 57 및 39,
각각 SEQ ID No: 57 및 40,
각각 SEQ ID No: 57 및 41,
각각 SEQ ID No: 57 및 42,
각각 SEQ ID No: 57 및 43,
각각 SEQ ID No: 58 및 38,
각각 SEQ ID No: 58 및 39,
각각 SEQ ID No: 58 및 40,
각각 SEQ ID No: 58 및 41,
각각 SEQ ID No: 58 및 42,
각각 SEQ ID No: 58 및 43,
각각 SEQ ID No: 61 및 38,
각각 SEQ ID No: 61 및 39,
각각 SEQ ID No: 61 및 40,
각각 SEQ ID No: 61 및 41,
각각 SEQ ID No: 61 및 42, 또는
각각 SEQ ID No: 61 및 43
을 포함하는 것인 분리된 결합 단백질.

청구항 9

유효량의 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 분리된 결합 단백질 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는, 인간에서 섬유성 질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 분리된 결합 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 분리된 폴리뉴클레오티드.

청구항 11

제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 포유동물 발현 벡터.

청구항 12

제10항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포.

청구항 13

제12항의 숙주 세포를 상기 결합 단백질을 생성하기에 적합한 조건하에 배양하는 단계
를 포함하는, 분리된 결합 단백질의 제조 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 특허 출원은 본원에 전문이 참조로 포함되는 2015년 3월 4일자로 출원된 미국 가출원 제62/128,149호의 이익을 주장한다.

[0003] 기술 분야

[0004] 전환 성장 인자- β 1(TGF β 1)에 높은 친화성 및 결합력을 나타내지만, TGF β 2 또는 TGF β 3에는 그렇지 않은 제1, 제2, 제3 및 제4 폴리펩티드 쇄를 각각이 포함하는 변형된-IgG 항체. 변형된-IgG 항체를 포함하는 조성물 및 TGF β 1 활성을 수반하는 질환의 치료를 위한 이의 이용 방법이 제공된다.

배경 기술

[0005]

많은 중증 질환(disease)은 TGF β -유도 신호전달 경로의 기능장애와 관련이 있다. TGF β 의 조직 수준의 증가는 예를 들어, 특발성 폐섬유증 및 심근 섬유증의 발생의 한 요인인 것으로 여겨진다. 추가로, TGF β 의 높은 국소 조직 수준은 몇몇 유형의 암 세포의 유지 및 진행을 가능하게 할 수 있다. 따라서, TGF β 신호전달의 하향-조절에 의해, 이러한 종양 세포의 생존력을 감소시킬 수 있다.

[0006]

TGF β 아이소폼(isoform)은 2개의 단량체가 이황화 가교를 통해 공유 결합되어 있는 유사한 구조 프레임워크를 갖는 약 25 kDa의 동종이량체 분자이다. 포유동물 아이소폼은 70 내지 82%의 서열 동일성을 공유하지만, 혈관 발생 및 면역 세포 기능의 조절에서 활성이 중첩되지 않는다. 인간에는 3가지 TGF β 아이소폼이 보고되어 있다: TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3(각각 스위스 프로트(Swiss Prot) 수탁 번호 P01137, P08112 및 P10600). TGF β 1 및 TGF β 3은 I형 및 II형 TGF β 수용체로 알려져 있는 2개의 막횡단 수용체의 세포외 도메인으로의 결합시에 세포 신호전달 캐스케이드를 촉발시킨다. TGF β 2는 I형 및 II형 TGF β 수용체뿐 아니라, III형 TGF β 수용체에도 결합할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007]

인간 TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3에 결합할 수 있는 항체를 임상 이용을 위하여 시험하였다. 예를 들어, Gruetter 등은 악성종양 및 섬유성 질환의 치료용으로 임상 개발 중인 인간 IgG4 모노클로널 항체(Mab; 즉, GC1008)인 GC1008을 개시하였다. 문헌[Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 105(51): 20251-56 (2008)]. GC1008은 "범-특이적(pan-specific)" TGF β 중화 항체인데, 그 이유는 그것이 3개의 인간 TGF β 아이소폼 모두를 중화시킬 수 있기 때문이다. TGF β 1을 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- β 1을 선택적으로 중화시키는 인간 IgG4 모노클로널 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 TGF β 1에 선택적으로 결합하고 이를 중화시킬 수 있는 TGF β 1-결합 변형된-IgG 항체를 제공한다. 개시된 변형된-IgG 항체는 메텔리무맙으로부터 유래된다. 변형된-IgG 항체의 VH 및 VL 도메인은 메텔리무맙의 것들과 유사한 TGF β 1-결합 친화성 및 결합력 및 TGF β 1 중화 능력을 나타낸다. 많은 경우에, 개시된 항체는 메텔리무맙에 비하여 개선된 친화성, 결합력 및 중화 능력을 제공한다. 일 실시형태에서, 변형된-IgG 항체는 각각이 CL 도메인에 연결된 VL 도메인을 포함하는 2개의 폴리펩티드 쇄, 및 각각이 CH1 도메인, 힌지 및 Fc 영역에 연결된 VH 도메인을 포함하는 2개의 폴리펩티드 쇄를 함유한다.

[0010]

본 발명의 변형된-IgG 항체는 TGF β 1에 결합할 수 있는 가변 도메인을 포함한다. 다른 실시형태에서, 개시된 변형된-IgG 항체는 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시, 인간 TGF β 2에 대한 동일한 결합 단백질의 Kd보다 적어도 약 50% 더 낮은 인간 TGF β 1에 대한 Kd를 나타내는 결합 단백질을 포함한다.

[0011]

다른 실시형태에서, 본 발명은 TGF β 1에 결합할 수 있는 가변 도메인을 포함하는 분리된 결합 단백질에 관한 것이다. 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시, 인간 TGF β 3에 대한 동일한 결합 단백질의 Kd보다 적어도 약 50% 더 낮은 인간 TGF β 1에 대한 Kd를 나타낸다.

[0012]

추가의 실시형태에서, 본 발명은 TGF β 1에 결합할 수 있는 가변 도메인을 포함하는 분리된 결합 단백질에 관한 것이다. 결합 단백질은 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시, 인간 TGF β 2에 대한 동일한 결합 단백질의 Kd보다 적어도 약 50% 더 낮고, 인간 TGF β 3에 대한 동일한 결합 단백질의 Kd보다 적어도 약 50% 더 낮은 인간 TGF β 1에 대한 Kd를 나타낸다.

[0013]

추가의 실시형태에서, 본 발명은 TGF β 1에 결합하는 분리된 결합 단백질에 관한 것이다. 결합 단백질은 제1 폴리펩티드 쇄, 제2 폴리펩티드 쇄, 제3 폴리펩티드 쇄 및 제4 폴리펩티드 쇄를 포함한다. 일 양태에서, 제1 및 제2 폴리펩티드 쇄는 N-말단에서 C-말단으로 하기의 식을 갖는다:

[0014] (VL 도메인)-(링커1)_m-(CL 도메인),

[0015] 상기 식에서,

[0016] VL 도메인은 가변 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), 가변 경쇄 상보성 결정 영역 2(LCDR2) 및 가변 경쇄 상보성 결정 영역 3(LCDR3)를 포함하며, m은 1이며, 링커1은 류신-글루탐산-이소류신-라이신-X_p-Y_q-Z_r-아르기닌-트레오닌-발린-알라닌의 서열을 갖는 웨티드를 포함하며, X, Y 및 Z는 독립적으로 세린, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신 및 트레오닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산이며, p, q 및 r은 각각 독립적으로 0 내지 5의 정수이다. 다른 양태에서, 제3 및 제4 폴리웨티드 쇄는 N-말단에서 C-말단으로 하기의 식을 갖는다:

[0017] (VH 도메인)-(링커2)_n-(CH1 도메인)-(힌지)_s-(Fc 영역),

[0018] 상기 식에서,

[0019] VH 도메인은 가변 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), 가변 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2) 및 가변 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)를 포함하며; n은 0 또는 1이며, s는 0 또는 1이다. 다른 양태에서, 링커2는 트레오닌-발린-세린-A_d-B_e-C_f-세린-알라닌-세린-트레오닌의 서열을 갖는 웨티드를 함유할 수 있으며, A, B 및 C는 독립적으로 세린, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신 및 트레오닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산이며, d, e 및 f는 각각 독립적으로 0 내지 5의 정수이다.

[0020] 일 양태에서, 링커2는 SEQ ID No. 45, SEQ ID No. 46, SEQ ID No. 47 및 SEQ ID No. 48로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 함유할 수 있다.

[0021] 일 양태에서, HCDR1은 SEQ ID No. 7의 아미노산 서열을 가질 수 있으며, HCDR2는 SEQ ID No. 8의 아미노산 서열을 가질 수 있으며, HCDR3은 SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11 또는 SEQ ID No. 15의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0022] VH 도메인의 프레임워크 영역은 가변 중쇄 생식계열 서열로부터 선택될 수 있다. VH 도메인은 예를 들어, SEQ ID No. 1 또는 SEQ ID No. 2에 나타낸 인간 VH 도메인 서열 또는 최대 5개의 아미노산의 변형을 갖는 그의 변이체로부터 선택될 수 있다.

[0023] 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. 12의 아미노산 서열을 가질 수 있으며, LCDR2는 SEQ ID No. 13의 아미노산 서열을 가질 수 있으며, LCDR3은 SEQ ID No. 14의 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0024] VL 도메인의 프레임워크 영역은 가변 람다 또는 카파 생식계열 서열로부터 선택될 수 있다. VL 도메인은 예를 들어, SEQ ID No. 3 또는 SEQ ID No. 4에 나타낸 인간 V_K 도메인 서열 또는 최대 4개의 아미노산의 변형을 갖는 그의 변이체로부터 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 이량체의 각 폴리웨티드는 SEQ ID NO: 1에 나타낸 VH 도메인 및 SEQ ID No. 3에 나타낸 V_K 도메인을 포함할 수 있으며, 이는 각각 메텔리무맙에 존재하는 VH 및 VL 도메인이다.

[0025] 다른 실시형태에서, Fc 영역은 힌지에 의해 CH1 도메인에 연결된다. 힌지는 인간 IgG1 또는 IgG4 힌지 영역으로부터 유래되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 힌지는 아미노산 서열 PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP(SEQ ID No. 5) 또는 최대 5개의 아미노산 변형을 갖는 그의 변이체를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 힌지 길이는 1개에서 15개의 아미노산까지 다양할 수 있다.

[0026] 다른 실시형태에서, 위치-지정 돌연변이유발을 CAT192 Fab 엘보우(elbow) 영역에서 수행하여, TGF β 1 결합 친화성을 개선시킨다. 1 내지 5개의 아미노산(G, GG, GGS, GGGS 및 GGGGS)을 경쇄 엘보우 영역에 삽입하여, 2개의 쇄로부터 기능성 결합 파라토프를 제시하는데 필요할 수 있는 힌지의 유연성을 증가시킨다. Expi293 트랜스펙션으로부터의 조절된 배지는 우수한 발현 및 옥텟(Octet)에 의한 TGF β 1으로의 결합의 유의미한 개선을 보인다. 돌연변이체를 Ni-NTA에 의해 정제하고, 높은 TGF β 결합 친화성을 비아코어(Biacore)를 사용하여 확인한다. LC 엘보우 영역 내로 1 내지 5개의 아미노산이 삽입된 CAT192 돌연변이체는 TGF β 1로의 scFv의 고 친화성 결합이 회복된다. 이를 조작된 엘보우 삽입 돌연변이체는 또한 아이소폼-선택성을 보유하며, TGF β 1 특이적 길항제로서 제공될 수 있다.

[0027] 다른 양태에서, VH 도메인은 SEQ ID No. 7의 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1), SEQ

ID No. 8의 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄 상보성 결정 영역 2(HCDR2) 및 SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11 및 SEQ ID No. 15로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 가변 중쇄 상보성 결정 영역 3(HCDR3)을 함유할 수 있다.

[0028] 다른 양태에서, VL 도메인은 SEQ ID No. 12의 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1), SEQ ID No. 13의 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄 상보성 결정 영역 2(LCDR2) 및 SEQ ID No. 14의 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄 상보성 결정 영역 3(LCDR3)을 함유할 수 있다.

[0029] 다른 양태에서, 링커1은 류신-글루탐산-이소류신-라이신-X_p-Y_q-Z_r-아르기닌-트레오닌-발린-알라닌의 서열을 갖는 웨프티드를 함유할 수 있으며, X, Y 및 Z는 독립적으로 세린, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신 및 트레오닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산이며, p, q 및 r은 각각 독립적으로 0 내지 5의 정수이다. 다른 양태에서, X, Y 및 Z는 각각 바람직하게는 세린 및 글리신이다. 다른 양태에서, p, q 및 r은 각각 1이다. 다른 양태에서, p는 0이며, q 및 r은 각각 1이다. 다른 양태에서, p는 1이며, q 및 r은 각각 0이다. 다른 양태에서, p는 2이며, q 및 r은 각각 1이다. 다른 양태에서, p는 1이며, q 및 r은 각각 2이다.

[0030] 일 실시형태에서, 링커1은 SEQ ID No. 22, SEQ ID No. 23, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25 및 SEQ ID No. 26으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 함유할 수 있으며, 이의 각각은 SEQ ID No. 21로부터 유래된 돌연변이 형이다. 다른 실시형태에서, 제1 폴리웨프티드 쇄는 SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 40 및 SEQ ID No. 41로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 함유하며, 이의 각각은 CAT192 IgG1의 경쇄(SEQ ID No. 38)로부터 유래되는 돌연변이 형이다.

[0031] 다른 양태에서, 링커1 및 링커2는 각각 독립적으로 상기 링커1에 대하여 기재된 바와 같을 수 있다. 이러한 양태에서, 링커2는 류신-글루탐산-이소류신-라이신-A_d-B_e-C_f-아르기닌-트레오닌-발린-알라닌의 서열을 갖는 웨프티드를 함유할 수 있으며, A, B 및 C는 독립적으로 세린, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신 및 트레오닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산이며, d, e 및 f는 각각 독립적으로 0 내지 5의 정수이다. 다른 양태에서, A, B 및 C는 각각 바람직하게는 세린 및 글리신이다. 다른 양태에서, d, e 및 f는 각각 1이다. 다른 양태에서, d는 0이며, e 및 f는 각각 1이다. 다른 양태에서, d는 1이며, e 및 f는 각각 0이다. 다른 양태에서, d는 2이며, e 및 f는 각각 1이다. 다른 양태에서, d는 1이며, e 및 f는 각각 2이다.

[0032] 다른 실시형태에서, 링커2는 SEQ ID No. 22, SEQ ID No. 23, SEQ ID No. 24, SEQ ID No. 25 및 SEQ ID No. 26으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 함유할 수 있으며, 이의 각각은 SEQ ID No. 21로부터 유래되는 돌연변이 형이다. 다른 실시형태에서, 제1 폴리웨프티드 쇄는 SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 40 및 SEQ ID No. 41로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 함유하며, 이의 각각은 CAT192 IgG1의 경쇄(SEQ ID No. 38)로부터 유래되는 돌연변이 형이다.

[0033] 다른 실시형태에서, 개시된 TGFβ1-결합 Fab 또는 IgG 분자는 TGFβ1에 선택적으로 결합하지만, TGFβ2 또는 TGFβ3에 유의미한 정도로 결합하지 않는다.

[0034] 다른 실시형태에서, 본원에 개시된 변형된 IgG 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있는 분리된 폴리뉴클레오티드가 개시된다. 분리된 폴리뉴클레오티드는 cDNA, 재조합 DNA 또는 합성 DNA일 수 있다. 숙주 세포는 분리된 핵산을 포함할 수 있다. 숙주 세포는 인간 세포, 예를 들어, 인간 배아 신장 293(HEK293) 세포 및 이로부터 유래된 세포주일 수 있거나, 그것은 중국 햄스터 난소(CHO) 세포일 수 있다. 변형된 IgG 항체의 제조 방법은 숙주 세포를 변형된 IgG 항체를 생성하기에 적합한 조건하에 배양하는 단계를 포함할 수 있다. 변형된 IgG 항체는 정제될 수 있다. 순도는 90%, 95%, 99%, 99.5% 이상일 수 있다.

[0035] 특정 실시형태에서, 본 발명의 변형된 IgG 항체는 조성물의 한 성분일 수 있다. 조성물은 약제학적 조성물일 수 있다. 약제학적 조성물은 치료적 유효량의 변형된 IgG 항체를 포함할 수 있다. 조성물은 하나 이상의 생물학적 활성 성분, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.

[0036] 또한, 치료적 유효량의 변형된 IgG 항체를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 인간에서 TGFβ1 활성으로부터 직접적으로 또는 간접적으로 초래되는 질환 또는 증상의 치료 방법이 제공된다. 질환 또는 증상은 섬유성 질환, 암 또는 면역-매개의 질환, 예를 들어, 광범위 피부 전신 경화증, 골 재형성 질환, 신장 질환 및/또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 변형된 IgG 항체는 섬유성 질환, 암 또는 면역-매개의 질환, 예를 들어, 광범위 피부 전신 경화증, 골 재형성 질환, 신장 질환 및/또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환 또는 장애의 치료용 약제의 제조에 사용될 수 있다. 질환 또는 장애의 치료는

TGF β 1의 중화 또는 TGF β 1 신호전달의 저해를 포함할 수 있다. 질환 또는 장애의 치료는 TGF β 1-매개의 피브로 넥틴 생성, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 생성, 상피 세포 증식, 내피 세포 증식, 평활근 세포 증식의 저해 및/또는 면역억제를 포함할 수 있다. 질환 또는 장애의 치료는 자연 살해 세포 활성의 증가를 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037]

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

도 1은 scFv(CAT191)가 전장 IgG4(CAT192) 분자로 전환되는 경우 친화성의 소실을 보였던 비아코어 TGF β 1 결합 검정의 결과를 도시한 것이다.

도 2는 scFv, Fab, IgG 분자의 구조 요소 및 친화성을 회복하기 위하여 조작된 엘보우 영역을 도시한 것이다.

도 3은 중쇄 및 경쇄 엘보우 영역 내에 추가의 아미노산이 있는 정제된 IgG 변이체의 SDS-PAGE 젤의 결과를 보여준다. SDS-PAGE는 환원 및 비-환원 조건하에서의 정제된 IgG 변이체의 순도를 보여준다.

도 4는 중쇄 및 경쇄 엘보우 영역 내에 추가의 아미노산이 있는 정제된 IgG 변이체의 비아코어 결합 검정을 보여준다. 비아코어 검정 결과에 의해, 변이체에 의한 아이소폼-선택적 및 고 친화성 결합이 입증된다.

도 5는 경쇄 엘보우 영역 내에 추가의 아미노산이 있는 정제된 IgG 변이체의 A549 세포 생물학적 검정을 보여준다. A549 검정에서는 TGF β 1-자극되는 IL-11 생성에 대한 다양한 항체 작제물에 의한 저해 효과를 비교하며, 이는 엘보우 조작된 변이체가 이러한 세포 기반의 효력 검정에서 매우 강력함을 보여준다.

도 6은 추가의 아미노산이 CAT192 Fab의 중쇄 및 경쇄 둘 모두의 엘보우 영역 내로 삽입되는 경우 고 친화성 결합이 회복되는 것을 보여주는 비아코어 TGF β 1 결합 검정을 도시한 것이다.

도 7은 CAT192 Fab 돌연변이체의 열안정성의 시차 주사 형광측정법(DSF) 분석의 결과를 보여준다.

도 8은 CAT192 IgG4 돌연변이체의 열안정성의 시차 주사 형광측정법(DSF) 분석의 결과를 보여준다.

도 9는 CAT192 Fab 변이체에 대하여 규명된 결정 구조를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038]

상세한 설명

[0039]

개시된 변형된 IgG 항체는 TGF β 1에 선택적으로, 그리고 높은 친화성 및 결합력으로 결합하고 이를 중화한다. 변형된 IgG 항체는 메텔리무맙에서와 동일한 VH 및 VL 도메인으로 이루어질 수 있다. 변형된 IgG 항체는 유리하게는 TGF β 1의 중화에 있어서 가변 도메인이 다른 형식으로 사용되는 경우보다 더 큰 효능을 보여준다.

[0040]

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.

[0041]

"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.

[0042]

인간 TGF β 1으로의 "선택적인 결합" 또는 이에 "선택적으로 결합하는"은 결합 단백질(예를 들어, scFv-Fc 이량체)이 인간 TGF β 2 또는 인간 TGF β 3으로의 결합보다 더 높은 친화성으로, 예를 들어, 표면 플라스몬 공명에 의해 측정시 인간 TGF β 2 또는 인간 TGF β 3와의 그의 해리 상수보다 적어도 50% 더 낮은 인간 TGF β 1과의 해리 상수로 인간 TGF β 1에 결합할 수 있는 것을 의미한다.

[0043]

일 실시형태에서, 본 발명의 변형된 IgG 항체의 가변 도메인은 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제6,492,497 호에 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. 7
HCDR2	VISYDGSIKYADSVKG	SEQ ID No. 8
HCDR3	TGEYSGYDTSGVEL	SEQ ID No. 9
	TGEYSGYDTDPQYS	SEQ ID No. 10
	TGFYSGYDTPASPD	SEQ ID No. 11
LCDR1	RASQGIGDDLG	SEQ ID No. 12
LCDR2	GTSTLQS	SEQ ID No. 13
LCDR3	LQDSNYPLT	SEQ ID No. 14

[0044]

[0045] 놀랍게도, 하기의 서열을 갖는 공통 HCDR3 결합 모티프가 공개된다:

HCDR3	TGX ₁ YSGYDTX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆	SEQ ID No. 15
-------	---	---------------

[0046]

[0047] 여기서, X₁은 임의의 아미노산(바람직하게는 E 또는 F)이거나 부재일 수 있고,

[0048]

X₂는 임의의 아미노산(바람직하게는 S, D 또는 P)이거나 부재일 수 있고,

[0049]

X₃은 임의의 아미노산(바람직하게는 G, P 또는 A)이거나 부재일 수 있고,

[0050]

X₄는 임의의 아미노산(바람직하게는 V, Q 또는 S)이거나 부재일 수 있고,

[0051]

X₅는 임의의 아미노산(바람직하게는 E, Y 또는 P)이거나 부재일 수 있고,

[0052]

X₆은 임의의 아미노산(바람직하게는 L, S 또는 D)이거나 부재일 수 있다.

[0053]

일 실시형태에서, 개시된 변형된 항체의 VH 도메인은 SEQ ID No. 7의 서열을 갖는 HCDR1, SEQ ID No. 8의 서열을 갖는 HCDR2, 및 SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11 및 SEQ ID No. 15로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 HCDR3을 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 도메인의 프레임워크 영역은 가변 람다 또는 카파 생식계열 서열로부터, 예를 들어, 동일한 인간 가변 람다 또는 카파 생식계열 서열로부터 선택될 수 있다. 현재는, 약 40개의 가변 카파 생식계열 서열 및 약 30개의 가변 람다 생식계열 서열, 예를 들어, V_H3, V_k1, V_H 1-69 및 V_H 1-e와 같이, 약 40개의 가변 중쇄 생식계열 서열이 해당 분야에 알려져 있다.

[0054]

삭제

[0055]

삭제

[0056]

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.

[0057]

본 발명의 변형된 IgG 항체는 각각 SEQ ID No. 1 및 SEQ ID No. 3에 나타낸 서열을 갖는, 메텔리무맙에서와 동일한 VH 및 VL 도메인으로 이루어질 수 있다. VH 도메인은 SEQ ID No. 2에 나타낸 서열을 갖는 VH 도메인에 의해 대체될 수 있으며; VL 도메인은 SEQ ID No. 4에 나타낸 서열을 갖는 VL 도메인에 의해 대체될 수 있다. 이들

VH 및 VL 도메인은 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제6,492,497호(예를 들어, 미국 특허 제6,492,497호의 SEQ ID No. 4, 6, 8 및 10)에 개시되어 있다.

- [0058] "가변 도메인"(VD)은 해당 분야의 숙련자에게 알려져 있는 바와 같이 항원/리간드 결합에 수반되는 면역글로불린의 초가변 결합 도메인 또는 수용체의 리간드 결합 도메인을 지칭한다. 가변 도메인은 일상적으로 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.
- [0059] "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 테 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 이루어 질 수 있다. 예를 들어, VH 도메인의 N-말단 잔기는 결실될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 목적을 위하여, 용어 "내지", "로부터", "까지" 및 "적어도"는 포괄적이다. 예를 들어, "0부터 5까지"의 정수는 0 이상 5 이하의 임의의 정수를 의미한다.
- [0061] 일 실시형태에서, 변형된 IgG 항체를 탈면역화시키기 위하여 최대 5개의 아미노산 치환이 이루어질 수 있다. 탈면역화는 예를 들어, 문헌[Harding et al. (2010) mAbs 2: 256-265]의 방법에 따라 수행될 수 있다.
- [0062] 예를 들어, 변형된 IgG 항체의 안정성을 증가시키고/거나 그들이 응집하는 경향을 감소시키기 위하여 VH 및/또는 VL 도메인의 프레임워크 잔기를 치환시킬 수 있다. 불량한 안정성은 재조합으로 발현되는 경우 발현되는 변형된 IgG 항체가 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. 예를 들어, 변형된 IgG 항체에서 VH 및/또는 VL 도메인의 안정성을 증가시키고/거나 그의 응집 경향을 감소시키는 것으로 예상되는 프레임워크 아미노산 치환은 예를 들어, WO 2007/109254호에 개시되어 있다. 본 발명의 VH 및 VL 도메인 내의 상응하는 잔기에서의 치환은 유사하게 변형된 IgG 항체의 안정성을 증가시키고/거나 그의 응집 경향을 감소시키는 것으로 예상된다.
- [0063] 용인될 수 있는 치환은 SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3 또는 SEQ ID No. 4의 아미노산을 다른 인간 VH 또는 VL 도메인 생식계열 서열에 존재하는 상응하는 아미노산으로 대체하는 것들을 포함하는 것으로 예상된다. 이를 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_H 1-69) 또는 DP-88(V_H 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.
- [0064] 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-접근 가능한 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.
- [0065] 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 추정의 N-글리코실화 부위를 제거하여, N-당형태(glycoform)의 형성을 방지하거나 줄일 수 있다. 아미노-말단 잔기를 Gln 잔기로 치환하여, 피로글루타밀화(pyroglutamylatation)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.
- [0066] 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, 겹출가능한 표지, 독소, 표적

화 모이어티 또는 단백질에 커플링될 수 있다. 예를 들어, Cys 잔기는 세포독성 약물에 커플링되어, 약물 친수 계이트를 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.

[0067] 검출가능한 표지는 방사성표지, 예를 들어, ^{131}I 또는 ^{99}Tc 를 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.

[0068] 변형된 IgG 항체의 VL 도메인은 본원에 링커1로 지칭되는 링커에 의해 CL 도메인에 연결된다. 변형된 IgG 항체의 VH 도메인은 임의로 본원에 링커2로 지칭되는 제2 링커에 의해 CH1 도메인에 연결된다. 변형된 IgG 항체의 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.

[0069] 링커1은 IgG 분자에서 VL과 CL을 연결하는 웨티드 또는 증가된 유연성을 갖는 변형된 버전을 함유할 수 있다. 예를 들어, 그것은 류신-글루탐산-이소류신-라이신- $\text{X}_p\text{-Y}_q\text{-Z}_r$ -아르기닌-트레오닌-발린-알라닌의 서열을 가질 수 있으며, X, Y 및 Z는 독립적으로 세린, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신 및 트레오닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산이며, p, q 및 r은 각각 독립적으로 0 내지 5의 정수이다. X, Y 및 Z는 각각 바람직하게는 세린 및 글리신이며, p, q 및 r은 각각 1이다. 다른 양태에서, p는 0이며, q 및 r은 각각 1이다. 다른 양태에서, p는 1이며, q 및 r은 각각 0이다.

[0070] 링커2는 트레오닌-발린-세린- $\text{A}_d\text{-B}_e\text{-C}_f$ -세린-알라닌-세린-트레오닌의 서열을 갖는 웨티드를 함유하며, A, B 및 C는 독립적으로 세린, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신 및 트레오닌으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산이며, d, e 및 f는 각각 독립적으로 0 내지 5의 정수이다.

[0071] 다른 실시형태에서, 헌지는 변형된 IgG 항체의 CH1 도메인과 Fc 영역 사이에 선택적으로 삽입된다. 일상태에서, 헌지 영역은 선택적으로 CH1 부분을 Fc 영역에 연결하는 유연성 도메인이다. IgG 분자 내의 헌지 영역의 유연성은 Fab 아암(arm)이 광범위한 각을 채용하게 하여, 가변 거리만큼 따로 이격된 에피토프로의 결합을 가능하게 할 수 있다. 다른 양태에서, 적합한 헌지 영역은 예를 들어, 아미노산 서열 PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP(SEQ ID No. 5)를 갖는 인간 IgG1 헌지 영역을 포함한다. 이러한 서열은 예를 들어, 미국 특허 제8,048,421호의 도 4B에 개시된 바와 같은, 인간 IgG1 상측 헌지의 일부, 중간 헌지 및 CH_2 도메인의 N-말단 부분에 상응한다.

[0072] 다른 실시형태에서, 변형된 IgG 항체의 적합한 Fc 영역은 2개 또는 3개의 불변 영역을 함유한다. Fc 영역은 SEQ ID No. 6에 나타낸 바와 같은 인간 IgG1 또는 SEQ ID No. 17의 CH_2 및 CH_3 도메인에 나타낸 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 죽음(ADCP)을 매개한다.

[0073] 변형된 IgG 항체의 다양한 특성을 개선시키기 위하여 헌지 및 Fc 영역에 변형을 이를 수 있다. 일실시형태에서, 천연 발생 인간 Fc 영역의 1, 2, 3, 4, 5 또는 최대 10개의 아미노산이 헌지 영역의 변형에 더하여 변형될 수 있다. 예를 들어, Fc 영역을 변형시켜, 변형된 IgG 항체의 혈청 반감기를 증가시킬 수 있다. IgG의 반감기는 수용체 FcRn으로의 그의 pH-의존성 결합에 좌우된다. 내피 세포의 표면상에 발현되는 FcRn은 pH-의 존적 방식으로 IgG에 결합하며, 그것을 분해로부터 보호한다. 예를 들어, CH_2 와 CH_3 도메인 사이의 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.

[0074]

힌지 및/또는 Fc 영역에 대한 다른 변형은 이펙터 기능을 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 4개의 인간 IgG 아이소형은 활성화 Fc γ 수용체(Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIIa), 저해성 Fc γ RIIb 수용체 및 제1 보체 성분(C1q)에 상이한 친화성으로 결합하여, 상이한 이펙터 기능을 초래한다. 예를 들어, Fc γ R 또는 C1q로의 IgG의 결합은 IgG 힌지 영역 및 CH₂ 도메인에 위치한 잔기에 좌우된다. 이를 잔기의 단일의 또는 다중의 아미노산 치환은 Fc γ R 또는 C1q와 IgG의 상호작용을 조절함으로써 이펙터 기능에 영향을 미칠 수 있다. 이펙터 기능에 영향을 미치는 다른 치환이 알려져 있다. 이를 변형은 예를 들어, 문헌[Strohl (2009) "Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies," *Curr. Opin. Biotechnol.* 20:685-91]에 검토되어 있다.

[0075]

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	IM252Y/S254T/T256E + H433K/N434F	FcRn으로의 결합 증가	반감기 증가	2
IgG1	인간	E233P/L234V/L235A/G236 + A327G/A330S/P331S	Fc γ RI으로의 결합 감소	ADCC 및 CDC 감소	3, 4
IgG1	인간	E333A	Fc γ RIIIa로의 결합 증가	ADCC 및 CDC 증가	5, 6
IgG1	인간	S239D/A330L/I332E	Fc γ 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 γ RIIA/Fc γ RIIB 비 증가	대식구 식세포 작용 증가	11
IgG1	인간	K322A	C1q로의 결합 감소	CDC 감소	5
IgG4	인간	S228P	--	Fab-아임 교환 감소	12
IgG2a	마우스	L235E + E318A/K320A/K322A	Fc γ 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.

[0076]

추가로, 재조합 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 헌지 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 응용에서 이황화 결합 스크램블링(scrambling) 및 구조 이성질체의 형성을 제한하기 위한 IgG2 헌지 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 γ RIIA 결합을 증가시키거나 Fc γ RIIB 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.

[0078] 변형된 IgG 항체의 핵산 및 그의 제조 방법

본 발명의 추가의 양태는 변형된 IgG 항체를 인코딩하는 핵산을 제공한다. 분리된 핵산은 예를 들어, 합성 DNA, 비-천연 발생 mRNA 또는 cDNA일 수 있다. 예에는 미국 특히 제6,492,497호의 SEQ ID NO: 3, 5, 7 및 9에 나타낸 VH 및 VL 도메인을 인코딩하는 핵산이 포함된다. 재조합 숙주 세포는 상기 하나 이상의 작제물을 포함할 수 있다. 변형된 IgG 항체의 제조 방법은 인코딩하는 핵산을 숙주 세포에서 변형된 IgG 항체를 생성하기 위한 조건 하에 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.

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 원생생물, 진균, 식물 및 동물 세포를 포함한다. 가장 바람직하게는, 숙주 세포는 원핵 세포 주 에스카리키아 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.

적절하게 프로모터 서열, 터미네이터 서열, 폴리아데닐화 서열, 인핸서 서열, 마커 유전자 및 기타 서열을 포함하는 적절한 조절 서열을 함유하는, 변형된 IgG 항체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 적절한 백터를 선택하거나 작제할 수 있다. 백터는 예를 들어, 플라스미드, 파지, 파지미드, 아데노바이러스, AAV, 렌티바이러스일 수 있다. 예를 들어, 핵산 작제물의 제조, 돌연변이유발, 시퀀싱, 세포로의 DNA의 도입 및 유전자 발현에서의 핵산의 조작을 위한 기술 및 프로토콜은 당업계에 널리 알려져 있다.

본원에 사용되는 용어 "백터"는 그것이 연결되는 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하는 의도이다. 하나의 유형의 백터에는 "플라스미드"가 있으며, 이는 추가의 DNA 세그먼트가 라이게이션될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭한다. 다른 유형의 백터에는 바이러스 백터가 있으며, 여기서, 추가의 DNA 세그먼트가 바이러스 계놈 내로 라이게이션될 수 있다. 특정 백터는 그들이 도입되는 숙주 세포에서 자가 복제할 수 있다(예를 들어, 박테리아 복제 원점을 갖는 박테리아 백터 및 에피솜 포유동물 백터). 기타 백터(예를 들어, 비-에피솜 포유동물 백터)는 숙주 세포 내로의 도입시에 숙주 세포의 계놈 내로 통합될 수 있으며, 그에 의해, 숙주 계놈과 함께 복제된다. 더욱이, 특정 백터는 그들이 작동가능하게 연결되는 유전자의 발현을 유도할 수 있다. 이러한 백터는 본원에 "재조합 발현 백터"(또는 간단히 "발현 백터")로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 백터는 종종 플라스미드의 형태로 존재한다. 플라스미드가 가장 흔하게 사용되는 백터의 형태임에 따라, 본 명세서에서 "플라스미드" 및 "백터"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 제공하는 이러한 다른 형태의 발현 백터, 예를 들어, 바이러스 백터(예를 들어, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데나-연관 바이러스)를 포함하는 의도이다.

숙주 세포 내로의 이러한 핵산의 도입은 당업계에 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 계놈, 예를 들어, 염색체 내로 통합된다. 통합은 표준 기술에 따라 계놈과의 재조합을 촉진시키는 서열의 포함에 의해 촉진될 수 있다.

[0084] 폴리펩티드의 클로닝 및 다양한 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. 이종 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.

[0085] 다른 실시형태에서, 개시된 변형된 IgG 항체는 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 변형된 IgG 항체의 ADCC 활성을 증가시키기 위하여 푸코실화를 억제함으로써 의도적으로 변경될 수 있다.

항체 또는 그의 항원-결합 단편의 이용 방법

[0087] 변형된 IgG 항체는 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. 치료 가능한 증상은 TGF β 1이 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.

[0088] 인간 TGF β 1에 특이적인 항체는 동물 모델에서 TGF β 1 사구체신염(문헌[Border et al. (1990) Nature 346: 371-374]), 신경 흉터(문헌[Logan et al. (1994) Eur. J. Neurosci. 6: 355-363]), 피부 흉터(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, TGF β 1, 2 및 3에 대한 항체는 폐 섬유증, 방사선 유도 섬유증(미국 특허 제5,616,561호), 골수섬유증, 화상, 뒤퀴트렌 수축, 위궤양 및 류마티스 관절염의 모델에서 효과적인 것으로 나타났다(문헌[Wahl et al. (1993) Exp. Medicine 177: 225-230]).

[0089] 변형된 IgG 항체는 TGF β 1 활성으로부터 직접적으로 또는 간접적으로 야기되는 질환 및 증상을 치료하는데 유용하다. 변형된 IgG 항체는 시험관내 또는 생체내에서 인간 TGF β 1 아이소폼의 활성을 선택적으로 저해할 수 있다. TGF β 1 아이소폼의 활성은 TGF β -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, 변형된 IgG 항체는 국소분절사구체경화증(FSGS), 간 섬유증(HF), 급성 심근경색증(AMI), 특발성 폐섬유증(IPF), 피부경화증(SSc) 및 마르판 증후군을 치료하는데 유용하다.

[0090] 변형된 IgG 항체는 섬유성 질환(예를 들어, 사구체신염, 신경 흉터, 피부 흉터, 폐 섬유증, 허파 섬유증, 방사선 유도 섬유증, 간 섬유증, 골수섬유증), 화상, 면역 매개의 질환, 염증성 질환(류마티스 관절염 포함), 이식 거부, 암, 뒤퀴트렌 구축 및 위궤양을 포함하나 이들에 한정되지 않는 질환 및 증상을 치료하는데 유용하다. 변형된 IgG 항체는 또한 당뇨성(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, 신장경화증, 신장석회증, 전신홍반루푸스, 쇼그伦 증후군, 베거스병, 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, 변형된 IgG 항체는 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. 예를 들어, 이러한 길항제와 병용하여 변형된 IgG 항체를 이용하는 방법은 WO 2004/098637호에 나타나 있다.

[0091] 변형된 IgG 항체는 또한, 전신 경화증, 수술후 유착, 켈로이드 및 비후 흉터, 증식유리체망막병증, 녹내장 배액

수술, 각막 손상, 백내장, 페로니병, 성인 호흡 곤란 증후군, 간 경화증, 심근경색증 후 흉터, 혈관성형술 후 재협착증, 지주막하 출혈 후 흉터, 다발성 경화증, 고리판절제술 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.

[0092] 변형된 IgG 항체는 추가로, 질환 및 증상, 예를 들어, 정맥 궤양, 혀혈성 궤양(욕창), 당뇨성 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 재-상피화를 촉진시키는데 유용하다.

[0093] 변형된 IgG 항체는 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.

[0094] 변형된 IgG 항체는 대식구-매개의 감염에 대한 면역 반응을 증진시키는데 유용하다. 그들은 또한, 종양, AIDS 또는 육아종 질환에 의해 야기되는 면역억제를 감소시키는데 유용하다. 변형된 IgG 항체는 과증식성 질환, 예를 들어, 유방, 전립선, 난소, 위, 신장, 췌장, 대장, 피부, 폐, 자궁경부 및 방광암, 신경교종, 종괴종 및 다양한 백혈병 및 육종, 예를 들어, 카포시 육종을 포함하나 이들에 한정되지 않는 암을 치료하는데 유용하며, 이러한 종양의 재발 또는 전이를 치료하거나 예방하는데 유용하다. 변형된 IgG 항체는 또한 사이클로스포린-매개의 전이를 저해하는데 유용하다.

[0095] 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.

[0096] 치료 방법은 변형된 IgG 항체 또는 변형된 IgG 항체를 포함하는 약제학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 변형된 IgG 항체는 투여용 약제의 제조에 사용될 수 있다. 예를 들어, 약제 또는 약제학적 조성물의 제조 방법은 변형된 IgG 항체를 약제학적으로 허용되는 부형제와 함께 제형화하는 단계를 포함한다. 조성물은 단독으로 또는 치료할 증상에 따라 동시에 또는 순차적으로 다른 치료와 병용하여 투여될 수 있다.

[0097] 투여는 바람직하게는 환자에게 이익을 보이기에 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.

[0098] 정확한 용량은 변형된 IgG 항체가 진단을 위한 것인지 치료를 위한 것인지, 치료할 영역의 크기 및 위치 및 변형된 IgG 항체에 부착된 임의의 검출가능한 표지 또는 기타 분자의 성질을 포함한 수많은 요인에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 전형적인 변형된 IgG 항체의 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.

[0099] 일 실시형태에서, 환자의 체중 kg당 약 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 15 mg 또는 20 mg의 개시된 항체의 용량 수준이 인간에서 유용하고 안전할 수 있다. 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 투여는 투여되는 생성물의 양을 감소시키고, 작용 부위에서 농도를 증가시킬 수 있으며, 이는 안전성을 향상시킬 수 있다.

[0100] 변형된 IgG 항체는 주사에 의해, 예를 들어, 피하, 정맥내, 공동내(예컨대, 종양 절제 후), 복강내 또는 근육내로 투여될 수 있다. 변형된 IgG 항체는 또한, 흡입에 의해, 또는 국소적으로(예를 들어, 안구내, 비강내, 직장, 상처 내로, 피부 상으로) 또는 경구로 전달될 수 있다.

[0101] 변형된 IgG 항체는 통상적으로, 변형된 IgG 항체에 더하여 적어도 하나의 성분을 포함할 수 있는 약제학적 조성

물의 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, 저장 수명 또는 유효성을 증가시키는 유화제, 보존제 또는 완충제가 있다.

[0102] 담체 또는 기타 물질의 정확한 성질은 투여 경로에 따라 달라질 것이다. 정맥내 주사 또는 고통 부위에서의 주사를 위하여, 활성 성분은 발열원이 없고, 적합한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는, 비경구적으로 허용되는 수용액의 형태로 존재할 것이다. 해당 분야의 관련 숙련자는 예를 들어, 염화나트륨 주사, 링거 주사 및 젖산 링거 주사와 같은 등장성 비히클을 이용하여 적절한 용액을 충분히 제조할 수 있다. 보존제, 안정화제, 완충제, 항산화제 및/또는 기타 첨가제가 포함될 수 있다.

[0103] 변형된 IgG 항체는 액체, 반고체 또는 고체 형태, 예를 들어, 액체 용액(예컨대, 주사가능한 및 주입가능한 용액), 분산액 또는 혼탁액, 분말, 리포좀 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 변형된 IgG 항체 농도와 pH를 포함할 수 있다. 고체 제형은 예를 들어, 동결건조, 분무 건조, 또는 초임계 유체 기술에 의한 건조에 의해 생성될 수 있다.

[0104] 치료적 조성물은 용액, 마이크로에멀젼, 분산액, 리포좀, 또는 높은 약물 농도에 적절한 다른 규칙 구조(ordered structure)로서 제형화될 수 있다. 멸균 주사가능한 용액은 변형된 IgG 항체를 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 유동성은 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.

[0105] 특정 실시형태에서, 활성 화합물은 이식물, 경피 패치 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 비롯한 제어 방출 제형과 같이, 변형된 IgG 항체를 신속한 방출에 대해 보호할 담체를 이용하여 제조할 수 있다. 생분해성, 생체적 합성 중합체, 예를 들어, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수몰, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이러한 제형의 제조를 위한 많은 방법은 특허를 받았거나, 일반적으로 해당 분야의 숙련자에게 공지되어 있다.

[0106] 변형된 IgG 항체의 이용 방법은 TGF β 로의 결합을 야기하거나 그를 가능하게 하는 것을 포함할 수 있다. 이러한 결합은 예를 들어, 환자로의 변형된 IgG 항체의 투여 후에 생체내에서 일어날 수 있거나, 그것은 시험관내에서, 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블로팅, 면역조직화학, 면역침전법, 친화성 크로마토그래피 또는 세포 기반의 검정 또는 생체외 기반의 치료 방법, 예를 들어, 세포 또는 체액을 생체 외에서 변형된 IgG 항체와 접촉시킨 다음, 환자에게 투여하는 방법에서 일어날 수 있다.

[0107] 변형된 IgG 항체를 포함하는 키트가 제공된다. 변형된 IgG 항체를 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.

[0108] 시료 중 변형된 IgG 항체의 반응성은 임의의 적절한 수단, 예를 들어, 방사성면역검정(RIA)에 의해 결정될 수 있다. 방사성 표지된 항원을 비표지된 항원(시험 시료)과 혼합하고, 변형된 IgG 항체에 결합되게 할 수 있다. 결합된 항원을 비결합된 항원으로부터 물리적으로 분리하고, 변형된 IgG 항체에 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.

[0109] 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. 이를 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/스트렙트아비딘 및 알칼리성 포스파타제 검출 시스템이 사용될 수 있다. 항체-리포터 컨쥬케이트에 의해 생성되는 신호를 사용하여, 시료 중 관련 항체 결합의 정량화가능한 절대적 또는 상대적 데이터를 도출할 수 있다.

[0110] 또한, 본 발명은 경쟁 검정에서 항원 수준을 측정하기 위한 변형된 IgG 항체의 용도를 제공한다. 변형된 IgG 항체를 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 웹티드 결합을 통해 공유적으로 또는 비-공유적으로 연결될 수 있다. 변형된 IgG 항체 및 단백질 리포터는 웹티드 결합에 의해 연결될 수 있으며, 재조합에 의해 융합 단백질로서 발현될 수 있다.

[0111] 본 발명의 추가의 양태 및 실시형태는 하기의 실험적 예시를 포함하여, 본 발명의 견지에서 해당 분야의 숙련자에게 명백해질 것이다.

[0112] 실시예

실시예 1: 경쇄 엘보우 영역에 추가의 아미노산이 있는 변형된 IgG4 항체

[0114] CAT192는 TGF β 1-특이적 항체이나, 그것이 scFv로부터 전장 IgG4로 전환되는 경우 그의 결합 친화성의 대부분은 소실되었다(도 1). IgG1 및 IgG4 Fab 둘 모두가 TGF β 1에 대하여 매우 낮은 친화성을 나타내기 때문에, 항체 하위유형 및 Fc 포맷만으로는 이러한 현상을 설명하지 않는다. TGF β 1으로의 scFv의 단단한 결합은 중쇄와 경쇄 Fv 도메인을 연결하는 긴 (GGGGS)₃ 링커로부터 초래되는 높은 유연성으로 인하여 이루어질 수 있다. 이러한 높은 유연성은 Fab 또는 IgG 버전으로의 scFv의 전환 동안 소실될 수 있다. CAT192의 낮은 친화성은 매우 느린 온-속도(on-rate)뿐 아니라 매우 느린 오프-속도(off-rate)를 특징으로 하였다. 느린 온-속도 및 오프-속도는 CAT192와 TGF β 1 사이의 결합이 CAT192(IgG4) 내의 불리한 아미노산에 의해 제한되는 잠재적인 입체형태적 변화를 필요로 할 수 있음을 뒷받침한다. 항체 Fv 도메인을 CH1 도메인에 연결하는 경쇄 엘보우 영역에 추가의 아미노산을 부가함으로써 scFv의 Fab 또는 IgG 버전의 유연성/친화성을 증가시키기 위하여 설계된 실험이 본원에 기재된다. 더욱 구체적으로, 부가되는 아미노산에 밀줄이 있는 하기에 표 2에 나타낸 바와 같이 1개의 글리신(G), 2개의 글리신(GG), 2개의 글리신 및 1개의 세린(GGS), 3개의 글리신 및 1개의 세린(GGGS) 및 4개의 글리신 및 1개의 세린(GGGGS) 서열을 야생형 경쇄 엘보우 영역 내로 부가하도록 돌연변이체를 설계하였다.

표 2

변형된-IgG4 경쇄 엘보우 영역 삽입 돌연변이체

명칭	위치	아미노산 서열
WT	경쇄 엘보우 영역	LEIKRTVA (SEQ ID No. 21)
LC+G	경쇄 엘보우 영역	LEIK <u>G</u> RTVA (SEQ ID No. 22)
LC+GG	경쇄 엘보우 영역	LEIK <u>GG</u> RTVA (SEQ ID No. 23)
LC+GGS	경쇄 엘보우 영역	LEIK <u>GGS</u> RTVA (SEQ ID No. 24)
LC+GGGS	경쇄 엘보우 영역	LEIK <u>GGGS</u> RTVA (SEQ ID No. 25)
LC+GGGGS	경쇄 엘보우 영역	LEIK <u>GGGGS</u> RTVA (SEQ ID No. 26)
A25S	경쇄 Fv	Ala25→Ser25

[0115]

[0116] 경쇄 아미노산 #25는 scFv에서는 Ala이지만, IgG4로 전환되는 경우 Ser으로 변경되었다. 따라서, 추가의 A25S 돌연변이체를 Ala에서 Ser으로의 변경이 TGF β 1으로의 scFv의 친화성에 영향을 미치는지 여부를 시험하기 위한 대조군으로서 포함하였다. 야생형 CAT192 및 돌연변이체 DNA 및 아미노산 서열은 하기에 열거되어 있다.

SEQ ID No. 38: 엘보우 영역에 밀줄이 있는 CAT192 IgG1 야생형 LC의 아미노산

서열

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNERGE
C

SEQ ID No. 27: CAT192(IgG1) 경체의 코딩 서열

atggcgttgtctgcatacatcgtttctggggccacagccaccggcggtcacagcGAGATCGTGCTGACA
CAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGGCGACAGAGTGACCATCAC
CTGTAGAGCCAGCCAGGGCATCGGCGACGACCTGGGATGGTATCAGCAGA
AGCCTGGCAAGGCCCCATCCTGCTGATCTACGGCACCGAGCACACTGCAG
AGCGGCGTGCCCTCCAGATTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACC
CTGACCATCAAACAGCCTGCAGCCGAGGACTTCGCCACCTACTACTGTCTG

[0117]

CAAGACAGCAACTACCCCTGACCTCGCGGAGGCACCCGGCTGGAAAT
 CAAGCGTACGGTGGCCGCTCCTCCGTGTTCATCTTCCCTCCCTCCGACGA
 GCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTCTGCTGAACAACTTCTA
 CCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCG
 GCAACTCCCAGGAGTCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTAC
 TCCCTGTCCCTCACCTGACCCTGTCCAAGGCCACTACGAGAAGCACAA
 GGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCTGTCCAGGCCGTGACCA
 AGTCCTCAACCGGGCGAGTGCTGA

CAT192LC+G (LEIKGRTVA)

정방향 5'-ggctggaaatcaaggccgtacggccgc-3' (SEQ ID No. 28)

상보물 5'-gccccaccgtacggcccttgattccagcc-3' (SEQ ID No. 29)

CAT192LC+GG. (LEIKGGRTVA)

정방향 5'-ggctggaaatcaaggccgtacggccgc-3' (SEQ ID No. 30)

상보물 5'-gccccaccgtacggcccttgattccagcc-3' (SEQ ID No. 31)

CAT192LC+GGS. (LEIKGGSRTVA)

정방향 5'-ggctggaaatcaaggccgtacggccgc-3' (SEQ ID No. 32)

상보물 5'-gccccaccgtacggcccttgattccagcc-3' (SEQ ID No. 33)

CAT192LC+GGGS. (LEIKGGGSRTVA)

정방향 5'-ggctggaaatcaaggccgtacggccgc-3' (SEQ ID No. 34)

상보물 5'-gccccaccgtacggcccttgattccagcc-3' (SEQ ID No. 35)

CAT192LC+GGGGS. (LEIKGGGGSRTVA)

정방향 5'-ggctggaaatcaaggccgtacggccgc-3' (SEQ ID No.

36)

상보물 5'-gccccaccgtacggcccttgattccagcc-3' (SEQ ID No. 37)

[0118]

[0119]

A25S 돌연변이체 및 야생형 LC와 함께 5가지의 CAT192 LC 돌연변이체를 24-웰 플레이트 포맷(4 x 1 ml)에서 Expi293F 트랜스펙션 시스템(라이프 테크놀로지즈(Life Technologies))을 사용하여 His-태깅된 CAT192 HC Fab 와 동시-발현시켰다. 조절 배지(CM)를 트랜스펙션 4일 후에 수집하고, 옥텟 QK384 기기를 사용하여, 단일의 검정에서 발현 수준 및 TGF β 1 결합을 계산하였다. 정제된 CAT192 Fab-His를 표준 곡선으로 사용하였다(100에서 3.125 μ g/ml까지 2배 희석). CAT192 Fab CM을 희석제에서 1:10 희석하고, GC1008 Fab CM을 양성 대조군으로 포함하였다. 항-Fab-CH1 바이오센서로의 결합을 정량화 및 포획을 위하여 1000 rpm 및 30°C 플레이트 온도에서 2 분 동안 측정하였다. 그 다음, 센서를 결합 평가를 위하여 200 nM의 TGF β 1을 함유하는 웰 내로 이동시켰다.

[0120]

TGF β 1 결합 결과는, 각각의 추가의 아미노산 삽입이 야생형 대응부에 비하여 CAT192 Fab의 결합 친화성을 증가시켰음을 보여주었다. 적어도 2개의 글리신의 부가는 결합 친화성을 GC1008 Fab 항체의 것과 유사한 수준으로 증가시켰다. A25S 돌연변이체는 야생형 및 정제된 재조합 CAT192 Fab의 친화성과 유사하게 약한 TGF β 1 결합 친화성을 보였다. 센서에 포획된 Fab의 양을 농도에 대하여 또는 완충제를 제하여 정규화시키지 않았기 때문에, 이러한 결과는 정성적이었다.

[0121]

그 다음, CAT192 LC Fab 변이체를 라이닌(Rainin)으로부터의 퓨어스피드(PureSpeed) IMAC 팁(tip)을 사용하여 정제하여, TGF β 1에 대한 친화성을 정확하게 평가하고, 표면 플라스몬 공명을 사용하여 아이소폼-특이성을 확인하였다. 각 시료에 대한 조절된 배지를 4개의 웰(각각 약 800 μ l)로 나누고, 약 200 μ l의 평형화 완충제를 각각에 첨가하여, 각 시료에 대하여 2개의 1 ml 정제 팁(20 μ l 수지)를 사용하였다. 시료를 용리 단계 후에 아미콘

울트라(Amicon Ultra) 필터를 사용하여 집코(Gibco) PBS pH 7.2 내로 완충제 교환하여, 이미다졸을 제거하였다. 농도를 A280에 의해 측정하고, 3.5 μg 을 비-환원 4-20% 트리스(Tris)-글리신 SDS-PAGE 겔 상으로 로딩하고, 쿠마시 염색하여 순도를 점검하였다. 전체 수율은 CM 중 출발 물질의 12 내지 42%의 범위였다.

[0122] 비아코어 T200 기기를 사용하여 정제된 CAT192 WT 및 LC 돌연변이 Fab의 TGF β 결합 친화성을 평가하였다. TGF β 1, TGF β 2 및 TGF β 3(124, 125 및 112 RU)을 아민 화학을 사용하여 CM5 시리즈 S 칩에 고정화하였다. 넓은 농도 범위를 사용하여 낮은 친화성 및 높은 친화성의 결합제 둘 모두를 설명하였다. Fab를 HBS-EP+ 완충제에서 270에서 0.37 nM까지 3배 희석하였다. 각 시료를 2별로 주입하였다. K_D 를 최고 농도로서 30 nM을 사용하는 전형적인 농도 범위를 사용하여 결정하였다. 비아코어 결합 결과는 상기 기재된 옥텟 결과에 따랐으며, 다시 말하면, CAT192 LC의 엘보우 영역 내의 아미노산의 부가가 TGF β 1에 대한 결합 친화성을 개선시켰다. 각각의 추가의 잔기의 삽입을 사용하여 단계적 개선이 입증되었다(도 6). CAT192 Fab LC 돌연변이체 중 어느 것도 동일한 조건하에서 TGF β 2 또는 TGF β 3에 결합하지 않았으며, 이는 돌연변이체가 아이소폼-선택성을 유지하면서 TGF β 1 결합을 유의미하게 증가시키는 것을 입증한다. 따라서, 엘보우 조작된 돌연변이체는 TGF β 1에 아이소폼-선택성 및 높은 친화성으로 결합하는 신규한 변이체의 세트였다.

표 3

변형된 Fab의 K_D

시료	K_D (nM)
WT Fab	n/a
LC+G Fab	n/a
LC+GG Fab	3.32
LC+GGS Fab	3.76
A25S Fab	n/a

[0123]

[0124] 실시예 2: 중쇄 엘보우 영역 내에 추가의 아미노산이 있는 변형된 IgG4 항체

[0125] 높은 친화성 및 TGF β 1-선택적 결합을 나타낸 엘보우 영역 내의 경쇄 돌연변이체에 대한 후속 조치로서, 항체 Fv 도메인을 CH1 도메인에 연결시키는 중쇄 엘보우 영역에 추가의 아미노산을 삽입함으로써 유연성/친화성을 증가시키기 위한 돌연변이체도 또한 설계하였다. 더욱 구체적으로, 부가되는 아미노산에 밀줄이 있는 하기 표 4에 나타낸 바와 같이, 1개의 글리신(G), 2개의 글리신(GG) 및 4개의 글리신 및 세린(GGGGS) 서열을 야생형 중쇄 엘보우 영역 내로 부가하도록 돌연변이체를 설계하였다.

표 4

변형된-IgG4 중쇄 엘보우 삽입 돌연변이체

명칭	위치	아미노산 서열
WT	중쇄 엘보우 영역	TVTVSSAS (SEQ ID No. 44)
HC+G	중쇄 엘보우 영역	TVTV <u>G</u> SAS (SEQ ID No. 45)
HC+GG	중쇄 엘보우 영역	TVTV <u>GG</u> SAS (SEQ ID No. 46)
HC+GG-ST	중쇄 엘보우 영역	TVTV <u>GG</u> S <u>T</u> (SEQ ID No. 47)
HC+GGGS	중쇄 엘보우 영역	TVTV <u>GGGS</u> SAS (SEQ ID No. 48)

[0126]

[0127] HC+GG-ST는 PCR 돌연변이유발 과정으로부터의 예상되지 않는 부산물이었으며, 이는 설계된 바와 같이 엘보우에 2개의 글리신이 부가되었지만, DNA 시퀀싱에 의해 확인된 바와 같이, 엘보우 영역의 말단에서 2개의 아미노산이

결실되었다. 이러한 돌연변이체는 중쇄 엘보우 영역에 동일한 수의 아미노산을 가졌지만, 엘보우 링커에 상이한 아미노산 조성을 가졌다. 그것을 특성화 및 친화성 비교를 위한 대조군으로서 포함시켰다.

CAT192 HC+G 프라이머

정방향 5'-ccaccgtgacagtgtctggcagcgccagc-3'

(SEQ ID No. 50)

상보물 5'-gctggcgctgccagacactgtcacggtgg-3'

(SEQ ID No. 51)

CAT192 HC+GG-ST 프라이머

정방향 5'-ccaccgtgacagtgtctggcggcagcgccagc-3'

(SEQ ID No. 52)

상보물 5'-gctggcgctggcccagacactgtcacggtgg-3'

(SEQ ID No. 53)

CAT192 HC+GGGS 프라이머

정방향 5'-caccaccgtgacagtgtctggggcggcagcgccagca-3'

(SEQ ID No. 54)

상보물 5'-tgctggcgctggccggcccagacactgtcacggtggtg-3'

(SEQ ID No. 55)

CAT192 HC+GG 프라이머

정방향 5'- caccaccgtgacagtgtctggcggcagcgccagca -3'

(SEQ ID No. 529)

상보물 5'- tgctggcgctgccggccagacactgtcacggtggtg -3'

(60)

[0128]

[0129] 이들 CAT192 HC 돌연변이체를 24-웰 플레이트 포맷(4 x 1 ml)에서 Expi293F 트랜스펙션 시스템(라이프 테크놀로지즈)을 사용하여 CAT192 LC Fab와 동시-발현시켰다. 조절 배지를 트랜스펙션 후 4일에 수집한 다음, 라이닌으로부터의 퓨어스피드 IMAC 팁을 사용하여 정제하여, TGF β 1에 대한 친화성을 정확하게 평가하였다.

[0130]

비아코어 T200 기기를 사용하여 실시예 1에 기재된 바와 같이 정제된 CAT192 돌연변이 Fab의 TGF β 결합 친화성을 평가하였다. 도 6에 나타낸 결과에 의해, 경쇄 엘보우 영역 내의 돌연변이와 같이, CAT192 중쇄의 엘보우 영역 내의 아미노산의 부가도 또한 TGF β 1에 대한 결합 친화성을 개선시키는 것이 뒷받침된다. 예를 들어, CAT192 HC+GGGS 돌연변이체는 TGF β 1에 대하여 매우 높은 친화성 결합을 보였다.

[0131]

실시예 3: 중쇄 및 경쇄 조합 돌연변이체

[0132]

24-웰 플레이트 포맷(4 x 1 ml)에서 Expi293F 트랜스펙션 시스템(라이프 테크놀로지즈)을 사용하여 중쇄 및 경쇄 둘 모두의 엘보우 영역에 돌연변이를 지니는 DNA의 동시-트랜스펙션에 의해 조합 CAT192 돌연변이체를 생성하였다. 상이한 조합이 표 5에 열거되어 있다.

표 5

다양한 중쇄 및 경쇄 조합 돌연변이체

WT HC WT LC	WT HC LC+G	WT HC LC+GG	WT HC LC+GGS	WT HC LC+GGGS	WT HC LC+GGGGS
HC+G WT LC	HC+G LC+G	HC+G LC+GG	HC+G LC+GGS	HC+G LC+GGGS	HC+G LC+GGGGS
HC+GG WT LC	HC+GG LC+G	HC+GG LC+GG	HC+GG LC+GGS	HC+GG LC+GGGS	HC+GG LC+GGGGS
HC+GG-ST WT LC	HC+GG-ST LC+G	HC+GG-ST LC+GG	HC+GG-ST LC+GGS	HC+GG-ST LC+GGGS	HC+GG-ST LC+GGGGS
HC+GGGGS WT LC	HC+GGGGS LC+G	HC+GGGGS LC+GG	HC+GGGGS LC+GGS	HC+GGGGS LC+GGGS	HC+GGGGS LC+GGGGS

[0133]

[0134] 조합 배지를 트랜스팩션 4일 후에 수집한 다음, 라이닌으로부터의 퓨어스피드 IMAC 팁을 사용하여 정제하여, TGF β 1에 대한 친화성을 정확하게 평가하였다.

[0135]

비아코어 T200 기기를 사용하여 실시예 1에 기재된 바와 같이 정제된 CAT192 돌연변이 Fab의 TGF β 결합 친화성을 평가하였다. 도 3에 나타낸 결과는 조합 돌연변이체가 CAT192의 TGF β 1로의 고 친화성 결합을 회복하는 것을 뒷받침한다. 이들 돌연변이 Fab에 의한 결합 친화성(KD)은 표 6에 열거되어 있다.

표 6

비아코어에 의해 결정되는 중쇄 및 경쇄 조합 돌연변이체의 TGF β 1-결합 친화성(KD)

Fab	형원	$k_a \times 10^5 / \text{Ms}$	$k_d \times 10^{-4} / \text{s}$	K _D nM
WT HC/WT LC	TGF β 1	n/d	n/d	>100
WT HC/LC+G	TGF β 1	0.16	10.6	66.5
WT HC/LC+GG	TGF β 1	0.70	5.69	8.1
WT HC/LC+GGS	TGF β 1	0.68	5.95	8.8
WT HC/LC+GGGS	TGF β 1	0.89	5.87	6.6
WT HC/LC+GGGGS	TGF β 1	1.18	5.83	5.0
HC+G/WT LC	TGF β 1	n/d	n/d	n/d
HC+G/LC+G	TGF β 1	1.51	6.32	4.2
HC+G/LC+GG	TGF β 1	2.36	6.64	2.8
HC+G/LC+GGS	TGF β 1	2.27	6.96	3.1
HC+G/LC+GGGS	TGF β 1	2.54	6.93	2.7
HC+G/LC+GGGGS	TGF β 1	2.62	6.90	2.6
HC+GG/WT LC	TGF β 1	0.2	5.3	31.7
HC+GG/LC+G	TGF β 1	1.1	4.9	4.4
HC+GG/LC+GG	TGF β 1	2.2	3.8	1.8
HC+GG/LC+GGS	TGF β 1	1.8	4.3	2.3
HC+GG/LC+GGGS	TGF β 1	2.4	3.7	1.5
HC+GG/LC+GGGGS	TGF β 1	2.2	3.9	1.8
HC+GG-ST/WT LC	TGF β 1	0.85	8.11	9.6
HC+GG-ST/LC+G	TGF β 1	1.31	5.87	4.5
HC+GG-ST/LC+GG	TGF β 1	2.04	6.64	3.3
HC+GG-ST/LC+GGS	TGF β 1	2.11	6.67	3.2
HC+GG-ST/LC+GGGS	TGF β 1	1.47	6.31	4.3
HC+GG-ST/LC+GGGGS	TGF β 1	2.50	7.17	2.9
HC+GGGGS/WT LC	TGF β 1	0.68	5.79	8.5
HC+GGGGS/LC+G	TGF β 1	2.21	6.77	3.1
HC+GGGGS/LC+GG	TGF β 1	2.65	7.27	2.7
HC+GGGGS/LC+GGS	TGF β 1	2.63	7.09	2.7
HC+GGGGS/LC+GGGS	TGF β 1	2.78	7.16	2.6
HC+GGGGS/LC+GGGGS	TGF β 1	2.64	7.44	2.8
GC1008 Fab	TGF β 1	7.11	20.80	2.9

n/d = 미검출

[0136]

[0137] 중쇄 및 경쇄 둘 모두의 엘보우 영역을 조작하는 경우 더 적은 아미노산 삽입이 필요하였다. 예를 들어, "HC+G" 및 "LC+G" 돌연변이의 조합은 TGF β 1에 대한 매우 높은 친화성 결합을 보였다.

실시예 4: 전장 IgG4 변이체의 친화성 및 효력 특성화

[0138]

IgG4 포맷의 돌연변이체를 생성하여, A549 세포-기반의 효력 검정에서 비아코어에 의해 회복된 친화성이 확인될 수 있는지를 결정하였다. CAT192 HC Fab를 중쇄 S228P IgG4 백본 내로 클로닝하여 절반-항체(half-antibody) 형성을 최소화시킨 다음, Expi293F 세포를 CAT192 IgG4 S228P HC 및 LC 삽입 돌연변이와 동시에 트랜스펙션시켰다.

[0140]

30 ml 트랜스펙션을 전장 CAT192 HC 및 LC 삽입 돌연변이체에서 수행하여, 생물검정에 충분한 물질을 수득하였다. Expi293F 세포를 30 μg 의 DNA(15 μg 의 LC + 15 μg 의 HC)로 트랜스펙션시켰다. 조절된 배지를 트랜스펙션 4

일 후에 수집하고, 단백질 A 바이오센서를 사용하여 옥텟에 의해 대략 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 발현을 갖는 것으로 분석되었다. 그 다음, CM을 연동 펌프와 함께 Hi-Trap 단백질 A HP 컬럼을 사용하여 정제하였다. CM을 0.5 $\text{mL}/\text{분}$ 으로 각 컬럼 상으로 로딩하고, 25배 컬럼 부피(CV)의 50 mM NaPi, 25 mM NaCl pH 7.1(2 $\text{mL}/\text{분}$)로 세척하고, 25 CV의 10 mM 석신산나트륨 pH 6.0(2 $\text{mL}/\text{분}$)으로 세척하고, 1 $\text{mL}/\text{분}$ 에서 10 mM 석신산나트륨 pH 3.75으로 3 x 2 mL 분획에 용리시켰다(#1,#2,#3 표지됨). 단백질 A 용리액을 0.2 M NaOH로 중화시키고, 40 mM NaCl의 최종 농도를 위하여 0.2 M NaCl을 첨가하였다. 그 다음, 시료를 농축시키고, 50 mM NaPi, 25 mM NaCl pH 7.1 내로 완충제 교환하였다. 그 다음, 이들 CAT192 IgG4 S228P HC 및 LC 삽입 돌연변이 단백질 A 용리액을 4-20% 트리스 글리신 젤에서 전개시키고(도 3), TGF β 1/ TGF β 2/ TGF β 3 결합에 대하여 비아코어에 의해 비교하였다(도 4). 비아코어 결과에 의해, 정제된 CAT192 IgG4 돌연변이체가 실제로 TGF β 1 결합을 회복하는 것이 나타났다. 돌연변이체 중 어느 것도 TGF β 2 또는 TGF β 3에 결합하지 않았다(도 4).

표 7

비아코어에 의해 결정시 전장 IgG4 변이체의 TGF β 1-결합 친화성(KD)

시료	$k_a (\times 10^5/\text{Ms})$	$k_d (\times 10^{-4}/\text{s})$	$K_D (\text{nM})$
CAT192 IgG4 S228P	n/d	n/d	>100
CAT192 IgG4 S228P LC+G	0.15	5.26	36.1
CAT192 IgG4 S228P LC+GG	1.0	0.2	0.2
CAT192 IgG4 S228P LC+GGS	0.8	2.2	2.7
CAT192 IgG4 S228P LC+GGGS	0.6	0.6	1.0
CAT192 IgG4 S228P LC+GGGGS	0.6	1.5	2.6
CAT192 IgG4 S228P HC+G	0.5	2.1	4.1
CAT192 IgG4 S228P HC+GG	1.0	2.0	2.2
CAT192 IgG4 S228P HC+GGGS	1.1	1.5	1.3
CAT192 IgG4 S228P HC+GG/ LC+GG	2.4	0.5	0.2

n/d = 미검출

[0141]

그 다음, CAT192 IgG S228P LC 삽입 돌연변이체를 A549 세포 효력 검정법에서 특성화시켰다(문현[Rapoza et al., 2006, J Immunol Methods, Vol1316, pp18]). 결과(도 5)에 의해, CAT192 삽입 돌연변이체가 돌연변이체에 의한 TGF β 1-자극된 IL-11 생성에서의 저해 효과에 의해 입증되는 바와 같이 TGF β 1 활성을 중화시키는 것이 나타났다. 경쇄 엘보우에 부가되는 2개의 글리신은 비아코어 결합 실험에서 관찰되는 바와 같이 CAT192가 효능을 회복하는데 충분한 것으로 나타났다.

[0143]

실시예 5: 열안정성 연구

[0144]

시차 주사 형광측정법(DSF)을 엘보우-삽입 돌연변이체에서 수행하여, 중쇄 및 경쇄의 힌지 영역에서의 추가의 아미노산이 CAT192 Fab 삽입 돌연변이체의 열안정성에 어떻게 영향을 미치는지를 결정하였다. DSF의 기본 원리는 온도가 증가함에 따라, 단백질이 언폴딩되기 때문에 형광 염료가 단백질의 소수성 영역에 결합하여, 신호의 증가를 제공하는 것이다. 이러한 방법은 제한된 시료를 사용하여 수행될 수 있으며, 고속 방식으로 시료의 상대적 안정성을 얻기 위하여 사용될 수 있다. 사이프로 오렌지(Sypro orange)를 형광 염료로서 사용하였다. 사용되는 조건은 0.1 mg/mL의 단백질, 1:4000 염료 비 및 10 μl 의 총 부피였다. 결과에 의해, CAT192 Fab 삽입 돌연변이체의 상대적 안정성이 엘보우 내의 글리신의 부가로 약간 감소되며, 최소 안정성 돌연변이체가 가장 긴 부가를 갖는 것으로 나타났다(도 7). T_m 값은 도 7에 요약되어 있다. 더 긴 사슬의 돌연변이체의 일부의 T_m 값은 그들의 언폴딩 패턴으로 인하여 계산하지 않았다. 또한, 경쇄 돌연변이체의 일부가 Fab로부터 IgG4 포맷으로 전환되는 경우 약간의 감소가 관찰되었다(도 8).

[0145]

실시예 6: CAT192 Fab 변이체의 결정 구조 측정

[0146]

CAT192 Fab WT 및 3가지 변이체의 단백질 구조를 규명하여, 가변 도메인의 유연성 증가와 함께 높은 친화성이 어떻게 회복되는지에 관한 구조 설명을 제공하였다.

[0147]

150 mL 트랜스펙션을 CAT192 HC 및 LC Fab 삽입 돌연변이체에서 수행하여, 구조 연구에 충분한 물질을 수득하였

다. Expi293F 세포를 150 µg의 DNA(75 µg의 LC + 75 µg의 HC)로 트랜스펙션시켰다. 조절 배지를 트랜스펙션 5일 후에 수집하였다. 그 다음, CM을 20 mM NaPi pH 7.4, 500 mM NaCl, 5 mM 이미다졸로 평형화된 His-Trap Excel 컬럼을 사용하여 정제하였다. Fab 단백질을 20 mM NaPi pH 7.4, 500 mM NaCl, 500 mM 이미다졸로 용리시키고, 즉시 크기 배제 크로마토그래피 컬럼(슈퍼덱스(Superdex) 200 10/300)을 사용하여 20 mM HEPES pH 7.0, 50 mM NaCl로 완충제 교환하였다. 그 다음, Fab를 20 mg/ml로 농축시키고, 성긴 매트릭스 스크린을 실은 및 4°C 둘 모두로 설정하였다. 구조 결정을 위해 사용되는 모든 결정을 4°C에서 1:1 단백질 대 결정화 조건 비로 수득하였다. 야생형 단백질 및 결합 친화성이 더 낮은 돌연변이체를 유사한 PEG 조건(WT: 12% PEG 8K/ 0.1 M 카코딜산나트륨 pH 6/0.2 M MgCl₂, CAT192 WT HC/LC+G: 12% PEG 20K/ 0.1 M MES pH 6.5, CAT192 HC+GGGS/WT LC: 12% PEG 20K, 0.1 M MES pH 5.75)에서 P21 공간군에서 결정화시켰다. 결합 친화성이 높은 돌연변이체 (HC+GG/LC+GG)를 2 M 황산암모늄, 0.1 M 아세트산나트륨 pH 4.6(공간군: C2)에서 결정화시켰다.

[0148]

결합 친화성이 낮은/중등의 변이체 및 야생형 Fab 구조(HC+WT/LC+G 및 HC+GGGS/LC+WT)는 거의 동일하였다(도 9, a 부분). WT HC/LC+G 및 HC+GGGS/WT LC는 각각 0.516 Å 및 0.538 Å의 R.M.S.D로 야생형 CAT192와 중첩되었다. 이들 구조의 각각에서, CDRH3 영역에 대한 전자 밀도는 비대칭 유닛에서 모든 분자에 대하여 소실되었다. 이것은 이러한 CDR이 낮은/중등의 결합 친화성 돌연변이체에 대하여 매우 유연한 것을 암시하였다. 대조적으로, 높은 결합 친화성 돌연변이체(HC+GG/LC+GG)는 다른 CAT192 Fab 구조에 비하여 가변 도메인에서 큰 입체형태적 변화를 나타내었다(도 9, a 부분). 모든 4개의 Fab 간의 불변 도메인이 잘 중첩되지만, CAT192 HC+GG/LC+GG에서 가변 도메인은 다른 구조에 비하여 유의미하게 이동되었다(도 9, b 부분). 추가로, HC CDR3 영역을 고 결합 친화성 구조에서 완전히 구조화하고, LC CDR3과의 상호작용에 의해 안정화시켰다(3 Å 미만). 비아코어 결과에 따른 이들 4개의 구조에 의해, 큰 입체형태적 재배치가 CAT192의 높은 결합 친화성을 회복하는데 필요하였음이 뒷받침되었다.

서열 목록

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

EVQLVESGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAI
SYDGSIKYYADSVKGRTFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
GYDTDPQYSWGQQGTTVTVSS

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

QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAI
SYDGSIKYYADSVKGRTFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
GYDTTPASPDWGQQGTTVTVSS

SEQ ID No. 3: 인간 IgG1 V_K 도메인 클론 SL15A: (SQN6 US6492497)

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

SEQ ID No. 4: 인간 IgG1 V_K 도메인 클론 SL15S: (SQN8 US6492497)

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQGIGDDLWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

SEQ ID No. 5: 인간 IgG1 헌지 영역

PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP

SEQ ID No. 6: 인간 IgG1 Fc 영역

SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 7

SYGMH

SEQ ID No. 8

VISYDGSIKYYADSVKG

[0149]

SEQ ID No. 9

TGEYSGYDTSGVEL

SEQ ID No. 10

TGEYSGYDTPQYS

SEQ ID No. 11

TGFYSGYDTPASPD

SEQ ID No. 12

RASQGIGDDLG

SEQ ID No. 13

GTSTLQS

SEQ ID No. 14

LQDSNYPLT

SEQ ID No. 15

TGX₁YSGYDTX₂X₃X₄X₅X₆

SEQ ID No. 16: CAT192 (IgG4) 경체

EWLTQSPSSLASAVGDRVTITCRASQGIGDDLGWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGGSGTDFTLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
ESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
C

SEQ ID No. 17: CAT192 (IgG4) 중체

EVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRTFISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
GYDTDPQYSWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSQLGTKTTCNVD
HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

SEQ ID No. 18: CAT192 (IgG4) S228P 중체

EVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAVI
SYDGSIKYYADSVKGRTFISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
GYDTDPQYSWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSQLGTKTTCNVD

HKPSNTKVDKRVESKYGPPCP~~PCPAEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQ'~~
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGK

SEQ ID No. 19: CAT191 (scFv)

EVQLVESGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVA
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEY
GYDTDPQYSWGQGTTVTVSSSGGGSGGGGGSEIVLTQSPSSLASAVGI
RVTITCRSSQGIGDDLGWYQQKPGKAPIIYGTSTLQSGVPSRFSGSGSGTD
TLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIK

SEQ ID No. 20: 인간 TGF β 1

ALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWIHEPKG~~YHANFCLGPCPYI~~
SLDTQYSKVLALYNQHNP~~GASAAPCCVPQA~~EPLPIVYYVGRKPKVEQLSN]
IVRSCKCS

SEQ ID No. 21: CAT192 IgG4 야생형 LC 엘보우 영역

LEIKRTVA

SEQ ID No. 22: 1개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 LC 엘보우 영역

LEIKGRTVA

SEQ ID No. 23: 2개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 LC 엘보우 영역

LEIKGGRTVA

SEQ ID No. 24: 3개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 LC 엘보우 영역

LEIKGGGRTVA

SEQ ID No. 25: 4개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 LC 엘보우 영역

LEIKGGGSRTVA

SEQ ID No. 26: 5개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 LC 엘보우 영역

LEIKGGGSRTVA

SEQ ID No. 27: CAT192(IgG1) 경쇄의 코딩 서열

atggcgtggctctgcacatcactgttctggccacagccacggcggtgcacagcGAGATCGTGCTGACA
CAGAGCCCCCAGCAGCCTGTCTGCCAGCGTGGCGACAGAGTGACCATCAC
CTGTAGAGCCAGGCCAGGGCATCGGCACGACCTGGATGGTATCAGCAGA
AGCCTGGCAAGGCCCCCATCCTGCTGATCTACGGCACCGACACTGCAG
AGCGGCGTGCCTCCAGATTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACC
CTGACCATCAACAGCCTGCAGCCCAGGGACTCGCCACCTACTACTGTCTG
CAAGACAGCAACTACCCCCTGACCTTCGGGGAGGCACCCGGCTGGAAAT
CAAGCGTACGGTGGCCCTCCTCCGTGTTCATCTCCCTCCCTCCGACGA
GCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTCTGCTGAACAACCTCTA
CCCTCGGGAGGCAAGGTGCAGTGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCG
GCAACTCCCAGGAGTCCGTACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTAC
TCCCTGTCCCTCACCTGTCCAAGGCGACTACGAGAACGACAA
GGTGTACGCCTGTGAGGTGACCCACCAGGGCTGTCCAGCCCTGTGACCA
AGTCCTCAACCGGGCGAGTGTGA

SEQ ID No. 28: CAT192LC+G (LEIKGRTVA), 정방향

5'-ggctggaaatcaaggggccgtacgggtggccgc-3'

SEQ ID No. 29: CAT192LC+G (LEIKGRTVA), 상보물

5'-cgggccaccgtacggcccttgattccagcc-3'

SEQ ID No. 30: CAT192LC+GG (LEIKGGRTVA), 정방향

5'-ggctggaaatcaaggggccgtacgggtggccgc-3'

SEQ ID No. 31: CAT192LC+GG (LEIKGGRTVA), 상보물

5'-cgggccaccgtacggcccttgattccagcc-3'

SEQ ID No. 32: CAT192LC+GGS (LEIKGGSRTVA), 정방향

5'-ggctggaaatcaaggggccgtacgggtggccgc-3'

SEQ ID No. 33: CAT192LC+GGS (LEIKGGSRTVA), 상보물

5'-cgggccaccgtacggctggcccttgattccagcc-3'

SEQ ID No. 34: CAT192LC+GGGS (LEIKGGGSRTVA), 정방향

5'-ggctggaaatcaaggggccgtacgggtggccgc-3'

SEQ ID No. 35: CAT192LC+GGGS (LEIKGGGSRTVA), 상보물

5'-gcggccaccgtacggctgccggcccttattccagcc-3'

SEQ ID No. 36: CAT192LC+GGGGS (LEIKGGGGSRTVA), 정방향

5'-ggctggaaatcaaggcgccggcggcagccgtacggtgccgc-3'

SEQ ID No. 37: CAT192LC+GGGGS (LEIKGGGGSRTVA), 상보물

5'-geggccaccgtacggctgccggccgccttgattccagcc-3'

SEQ ID No. 38: CAT192 IgG1 야생형 LC

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
 QSGVPSRFSGGSGTDFLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKR
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ
 ESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGE
 C

SEQ ID No. 39: 1개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 경쇄

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
 QSGVPSRFSGGSGTDFLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKG
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
 QESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRNG
 EC

SEQ ID No. 40: 2개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 경쇄

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
 QSGVPSRFSGGSGTDFLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKG
GRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFR
 GEC

SEQ ID No. 41: 3개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 경쇄

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
 QSGVPSRFSGGSGTDFLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKG
GSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG
 NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN
 RGEC

SEQ ID No. 42: 4개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 경쇄

EIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIGDDLWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
 QSGVPSRFSGGSGTDFLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKG
GGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS

GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
NRGEC

SEQ ID No. 43: 5개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 경쇄

EIVLTQSPSSLSAVGDRVTITCRASQGIGDDLWYQQKPGKAPILLIYGTSTL
QSGVPSRFSGSGSTDFLTINSLQPEDFATYYCLQDSNYPLTFGGGTRLEIKG
GGGSRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQ
SGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

SEQ ID No. 44: CAT192 IgG4 야생형 HC 엘보우 영역

TVTVSSAS

SEQ ID No. 45: 1개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 HC 엘보우 영역

TVTVSGSAS

SEQ ID No. 46: 2개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 HC 엘보우 영역

TVTVSGGSAS

SEQ ID No. 47: 2개의 추가의 아미노산이 삽입되고, 1개의 아미노산이 결절된 돌연변이
HC 엘보우 영역

TVTVSGGSAS

SEQ ID No. 48: 5개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 HC 엘보우 영역

TVTVSGGGGSAS

SEQ ID No. 49: CAT192 IgG4 야생형 HC의 코딩 시열

ATGGGCTGGTCTCTGCATCATCCTTTTCRKTGGCCACCGGCCACCGGGGTG
CACTCTGAAGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGAGTGTTGCAGCCTGG
CAGAACGCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGGCTTCACCTTCAGCAGCT
ACGGAATGCACGGGTGCGCCAGGCCCCCTGGCAAAGAACTGGAAATGGGT
GGCCGTGATCAGCTACGACGGCAGCATCAAGTACTACGCCGACAGCGTG
AGGGCCGGTTCACCATCTCCGGGACAACAGCAAGAACACCCCTGTACCTG
CAGATGAACAGCCTGCCGCCAGGACACCGCCGTGACTACTGTGCTAG
AACCGGCCAGTACAGCGGCTACGACACCGACCCTCAGTACTCTGGGCC
AGGGCACCACCGTGACAGTGTCTAGGCCAGCACCAAGGGCCAAGCGTG

[0154]

TTCCCTCTGGCCCCCTGCAGCAGAAGCACCGAGCGAACATCTACAGCCGCC
 GGGCTGCCTCGTAAGGACTACTTCCCAGGCCGTGACAGTGTCCCTGGA
 ACTCTGGCGCCCTGACCAGCGGAGTCATACCTTCCAGCCGTGCTGCAG
 AGCAGCGGCCTGTACTCTGTAGCAGCGTCGTGACTGTGCCAGCAGCTC
 TCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAACGTGGACCACAAGCCCAGCAACA
 CCAAGGTGGACAAGAGAGTGACATACCACCAACCACCATCAC

SEQ ID No. 50: CAT192HC+G (TVTVSGSAS), 정방향

5'-ccaccgtgacagtgtctggcagcgccage-3'

SEQ ID No. 51: CAT192HC+G (TVTVSGSAS), 상보물

5'-gttgcgcgtccagacactgtcacgggtgg-3'

SEQ ID No. 52: CAT192HC+GG-ST (TVTVSGGSAS), 정방향

5'-ccaccgtgacagtgtctggcggcagcgccage-3'

SEQ ID No. 53: CAT192HC+GG-ST (TVTVSGGSAS), 상보물

5'-gttgcgcgtccagacactgtcacgggtgg-3'

SEQ ID No. 54: CAT192HC+GGGS (TVTVSGGGSAS), 정방향

5'-caccaccgtgacagtgtctggcggcggcggcagcagcgccagca-3'

SEQ ID No. 55: CAT192HC+GGGS (TVTVSGGGSAS), 상보물

5'-tgttgcgcgtgtccgcggccagacactgtcacgggtgg-3'

SEQ ID No. 56: 1개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 종쇄

EVQLVESGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAI
 SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
 YDGTDPQYSWGQGTTVTVSGASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
 YFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSVVTPSSLGQTQYICNV
 NHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISR
 TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL
 TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0155]

SEQ ID No. 57: 2개의 추가의 아미노산이 삽입되고, 2개의 아미노산이 결실된 돌연변이 중쇄

EVQLVESGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
GYDTDPQYSWGQGTTVTVSGGSAKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LYGCLVKDYFPEPVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP
EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 58: 5개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 중쇄

EVQLVESGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
GYDTDPQYSWGQGTTVTVSGGGSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LYGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID No. 59: CAT192HC+GG (TVTVSGGSAS), 정방향

5'- caccaccgtacagtgtctggcgccagcgcac-3'

SEQ ID No. 60: CAT192HC+GG (TVTVSGGSAS), 상보물

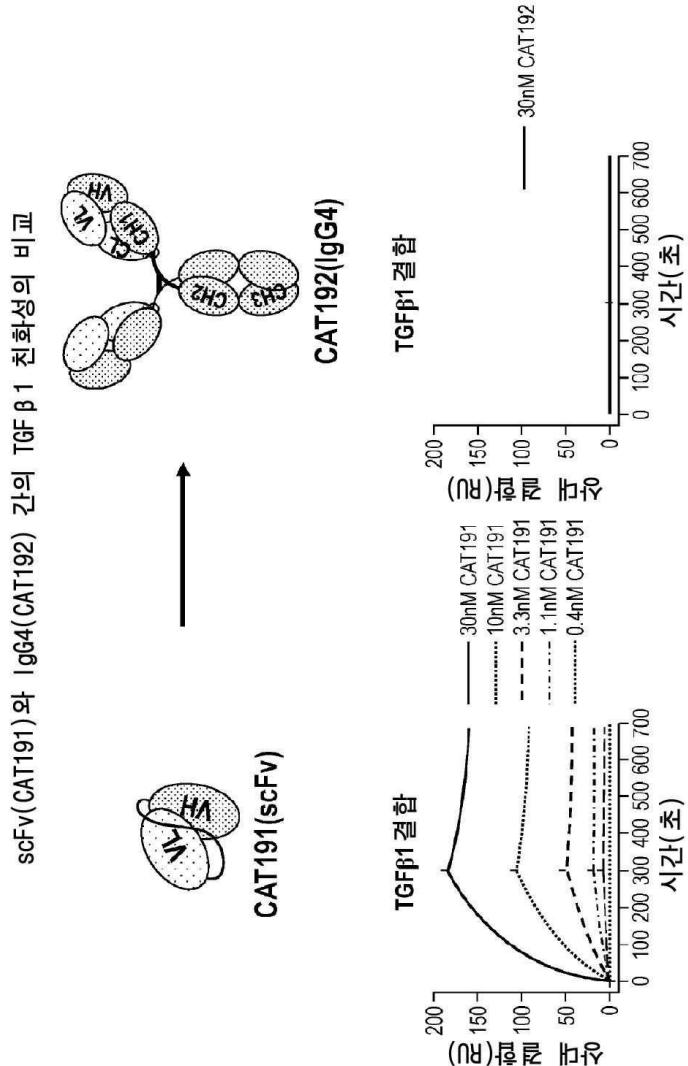
5'- tgctggcgctgccgcccagacactgtcacggtggtg-3'

SEQ ID No. 61: 2개의 추가의 아미노산이 삽입된 돌연변이 중쇄

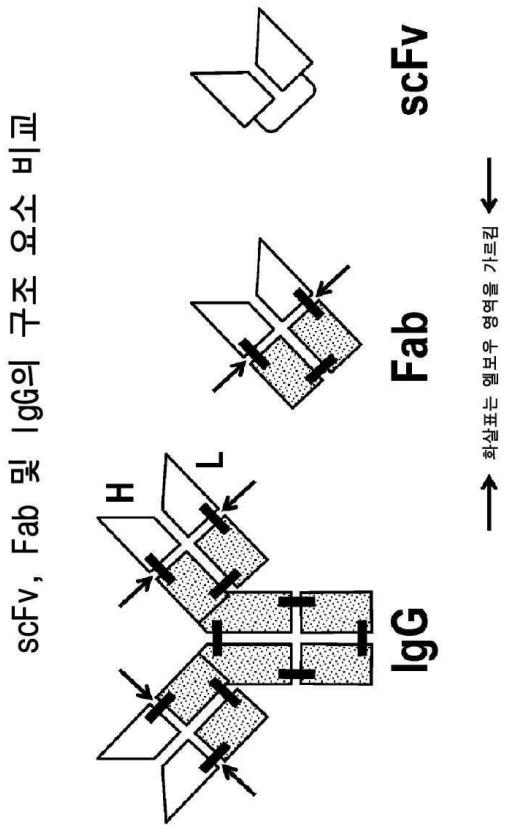
EVQLVESGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKELEWVAI
SYDGSIKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTGEYS
GYDTDPQYSWGQGTTVTVSGGSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LYGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN
VNHKPSNTKVDDKVEPKSCDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

도면

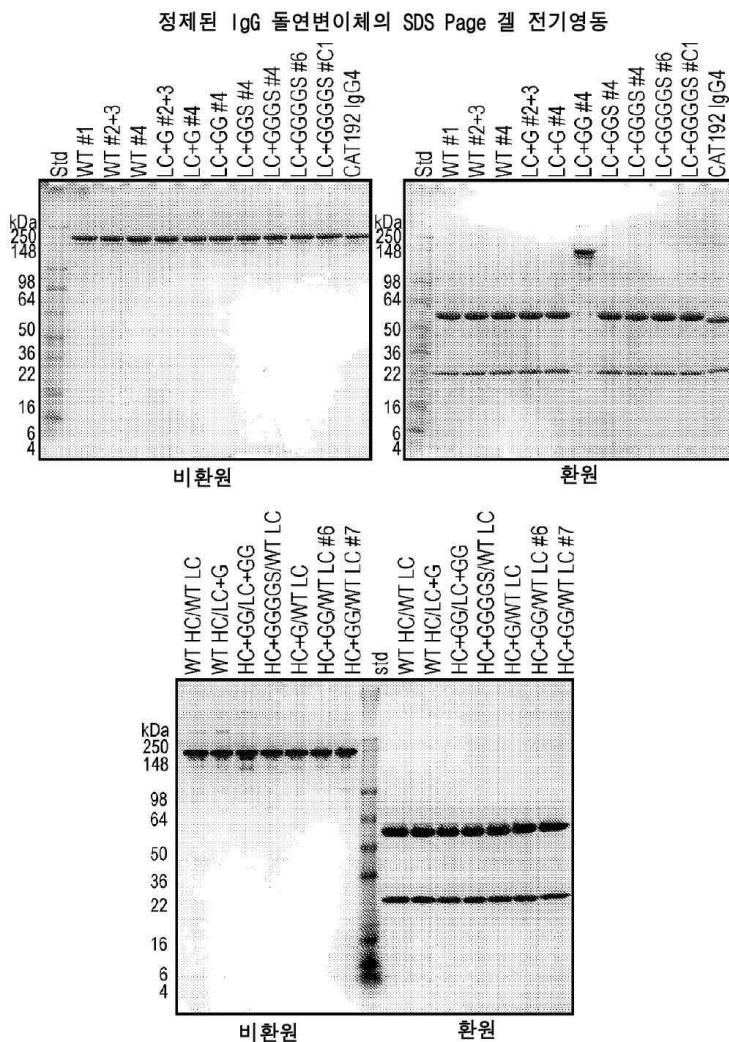
도면 1



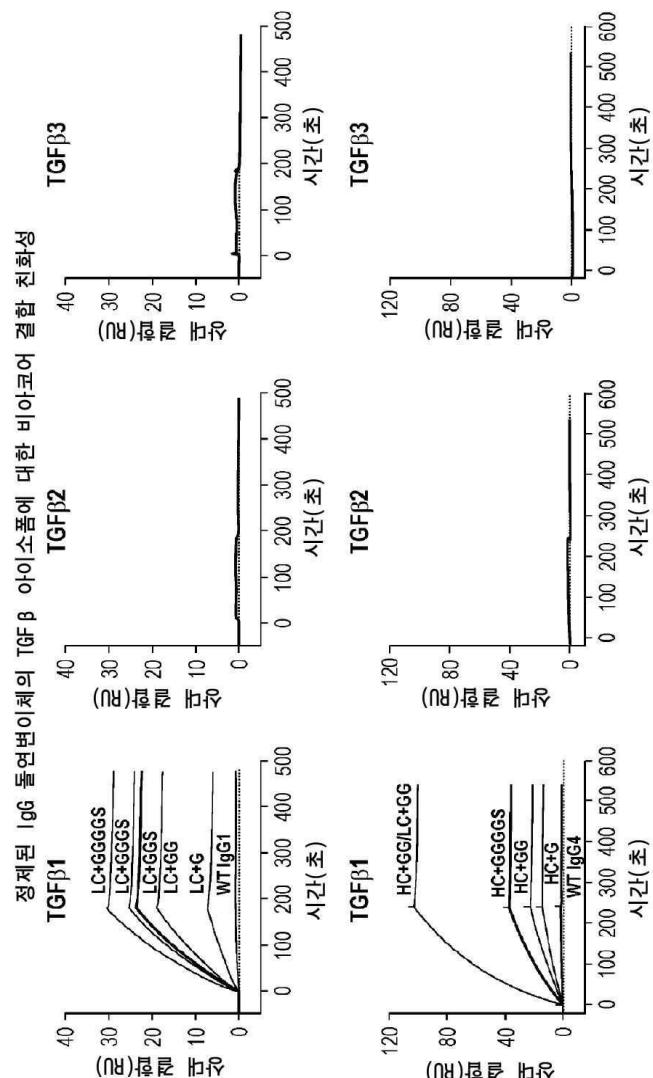
도면2



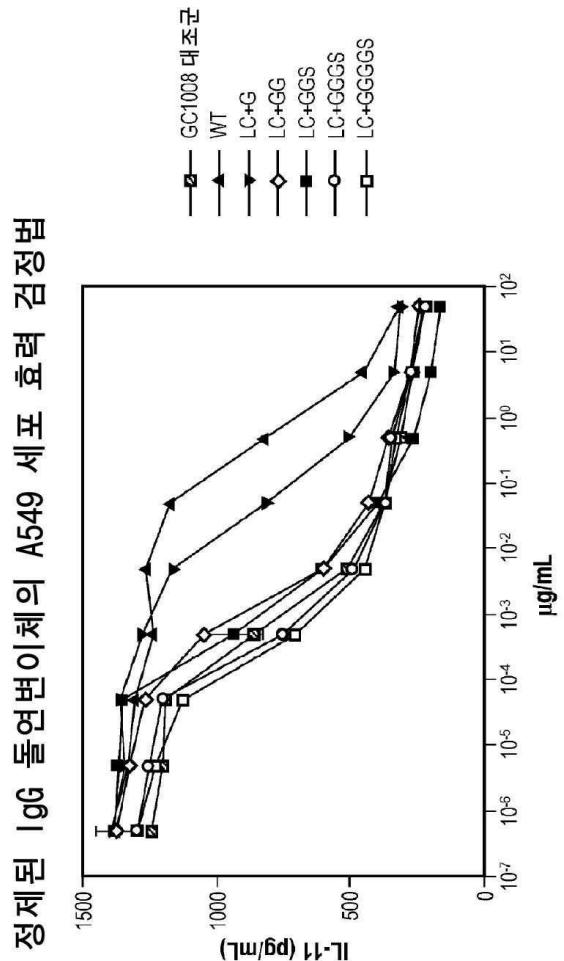
도면3



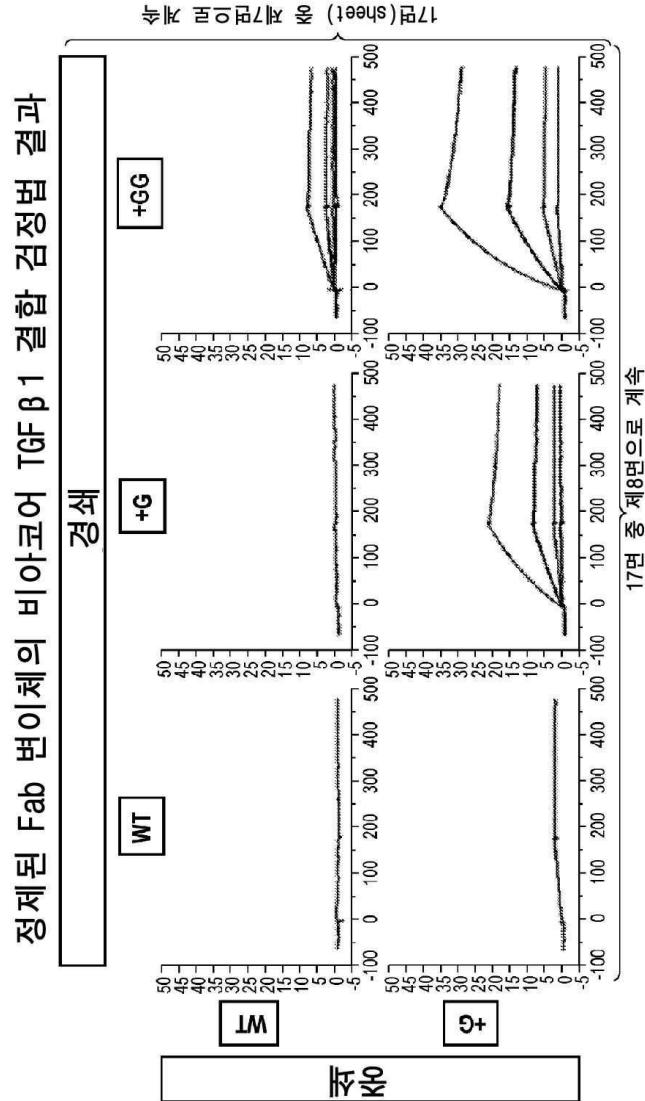
도면4



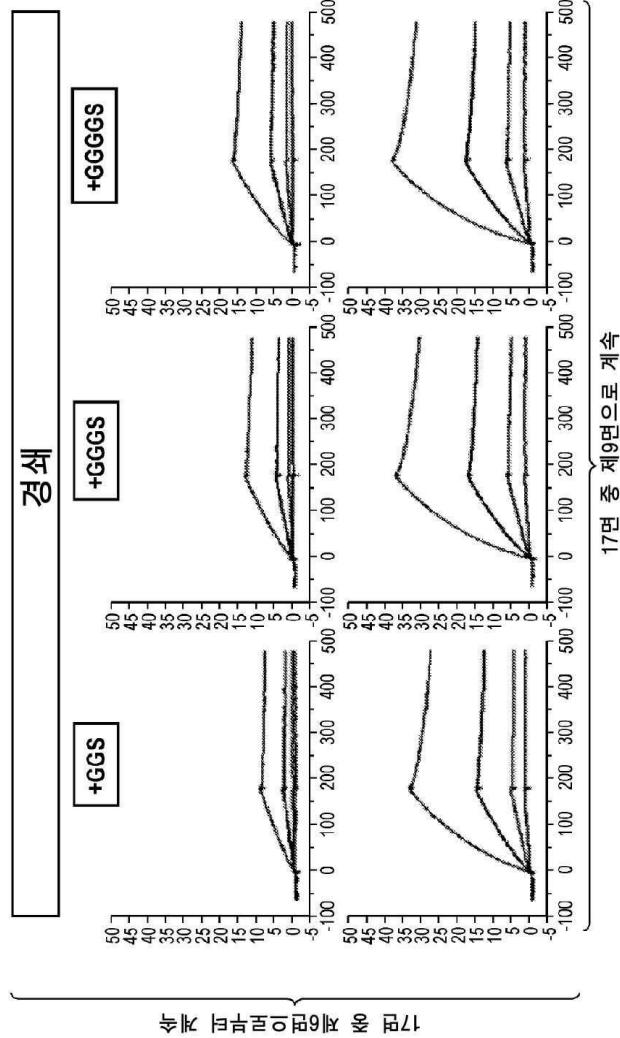
도면5



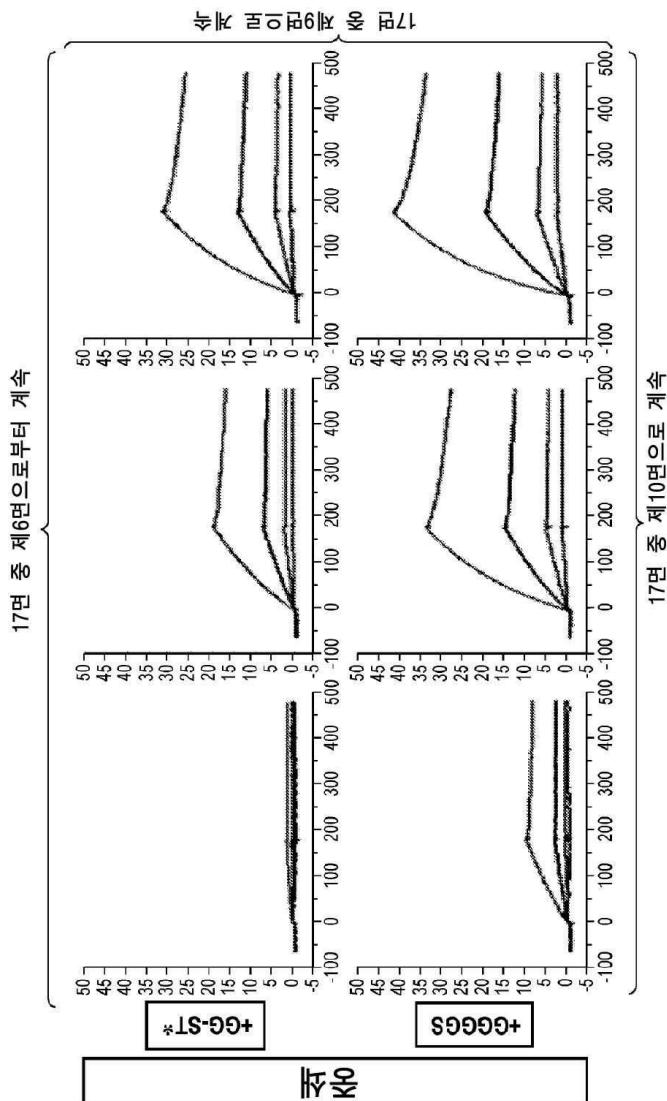
도면6a



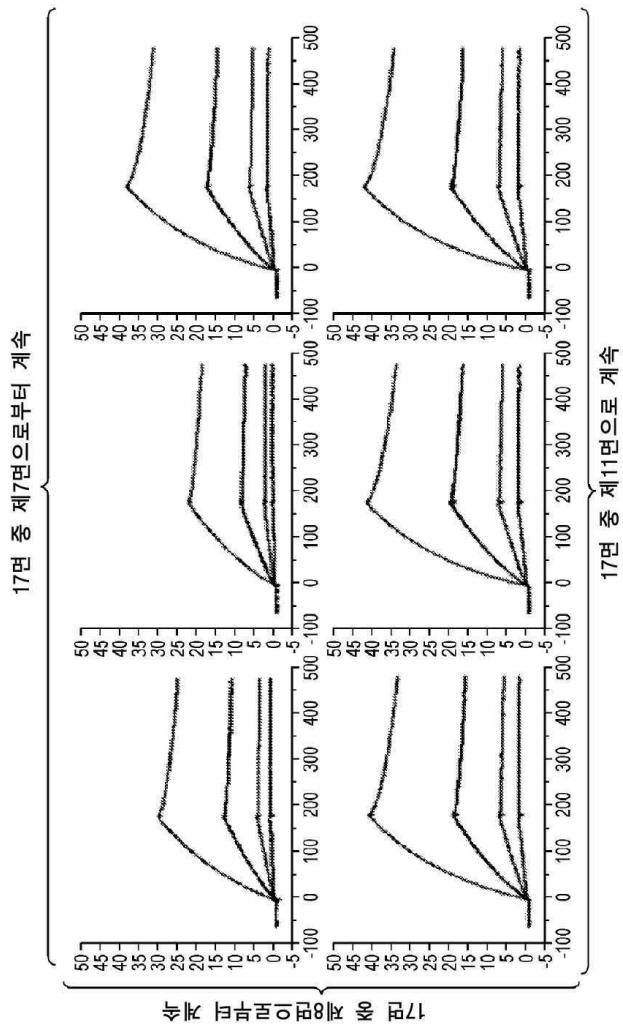
도면 6b

정제된 Fab 변이체의 비아코어 TGF β 1 결합·검정법 결과

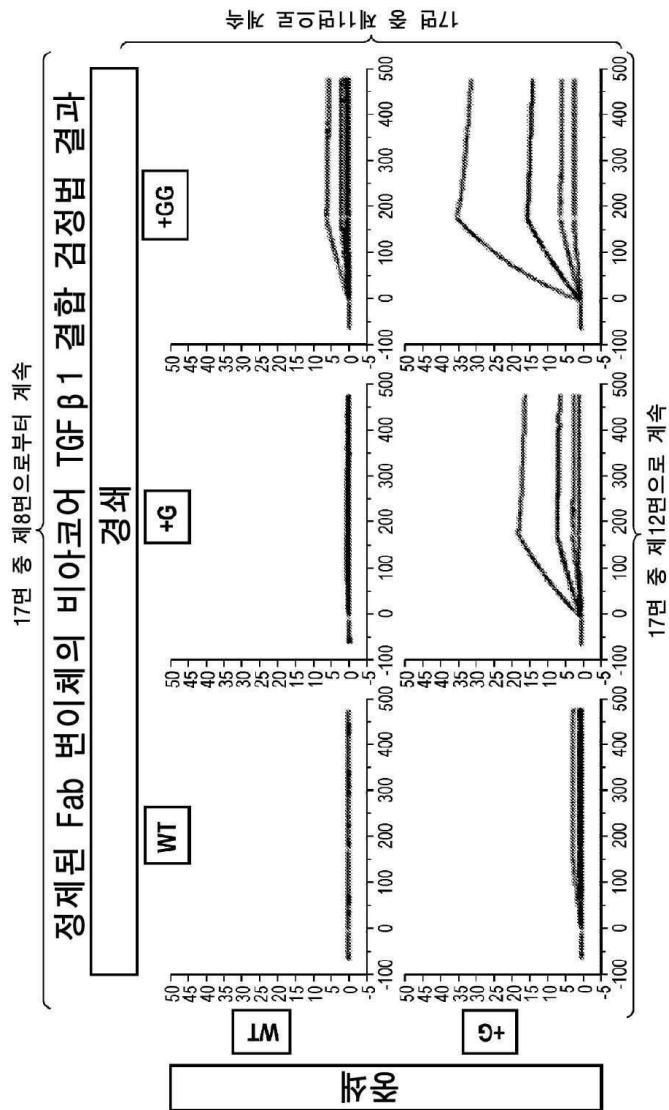
도면 6c



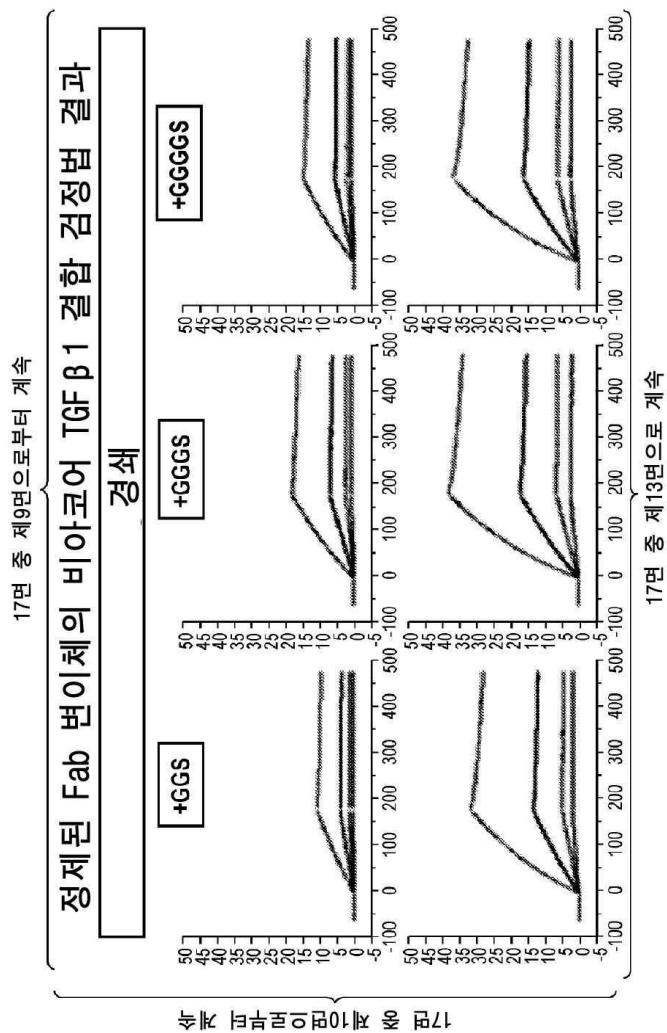
도면 6d



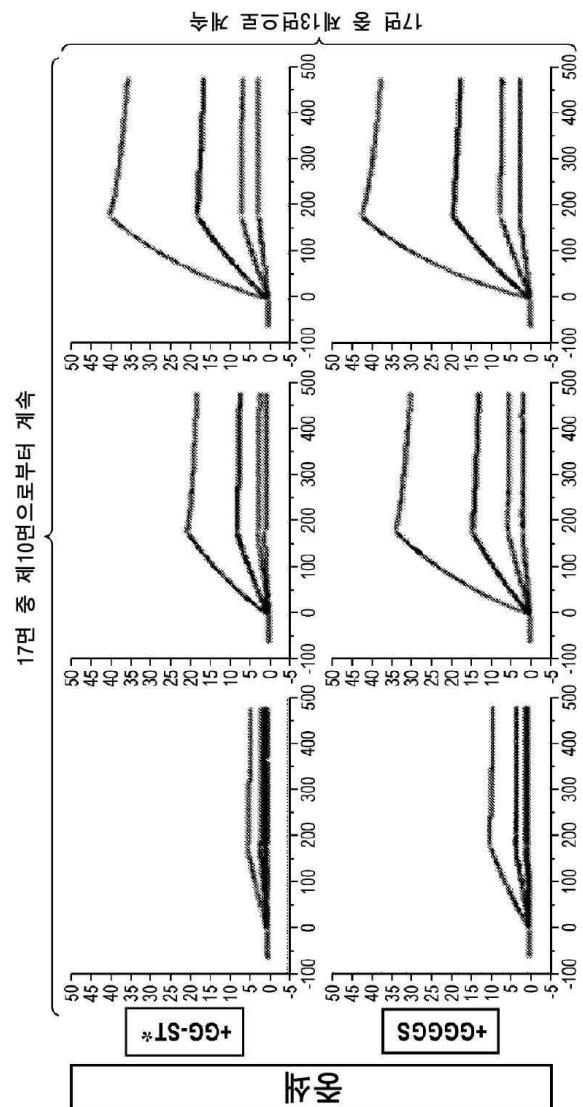
도면6e



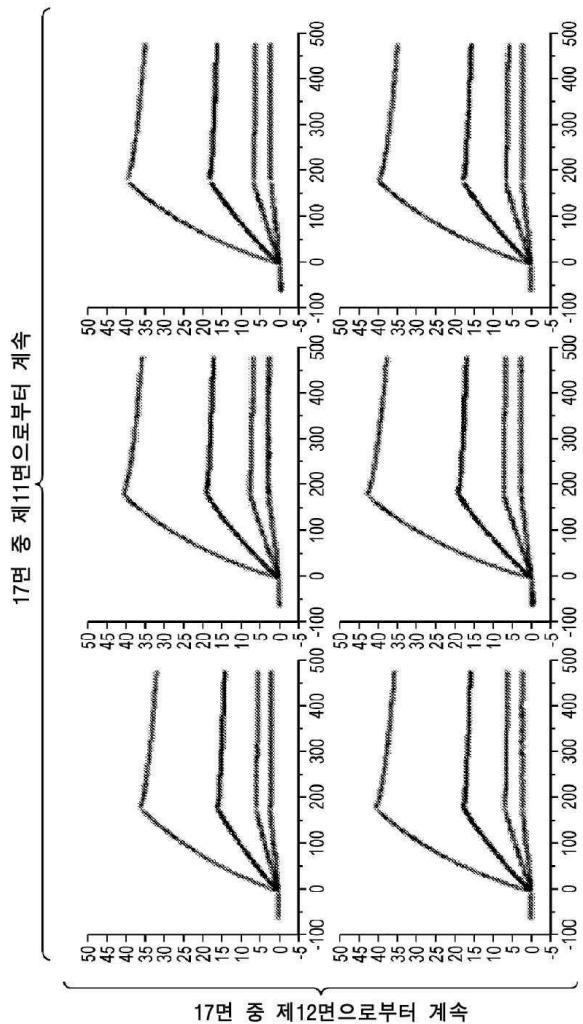
도면6f



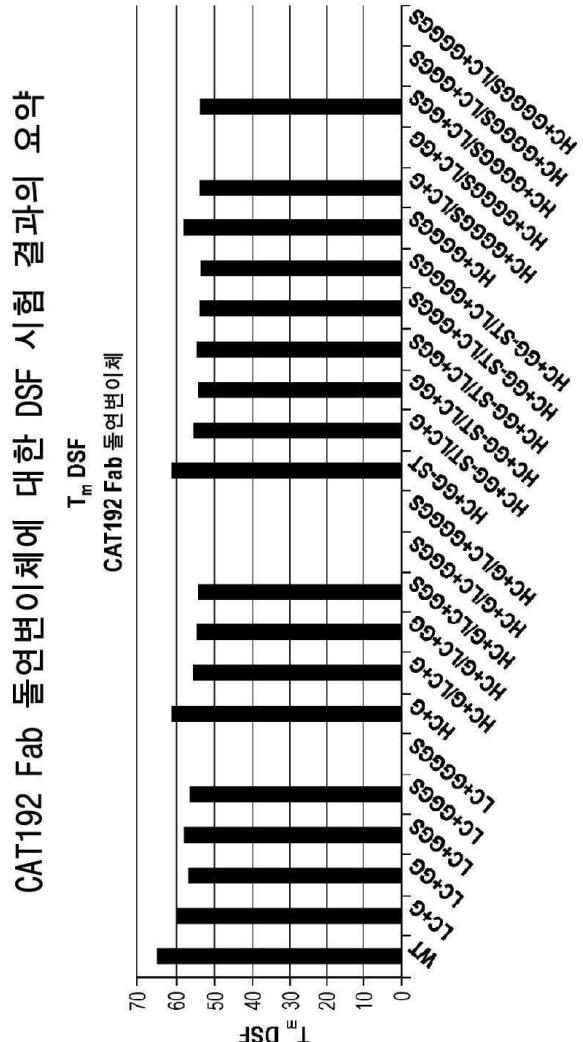
도면 6g



도면 6h

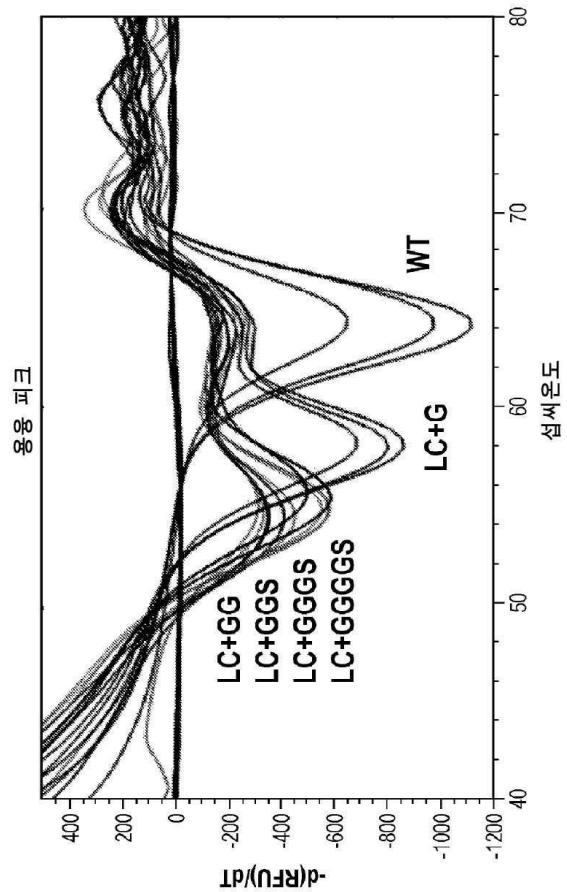


도면7

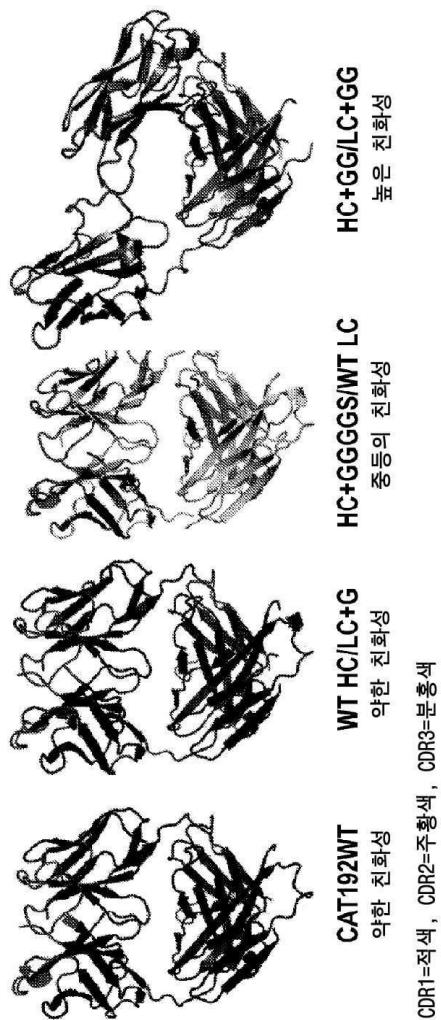


도면8

CAT192 IgG4 돌연변이체에 대한 DSF 실험 결과



도면 9a



도면9b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Qiu, Huawei

Bird, Julie

<120> MODIFIED-IgG ANTIBODIES THAT BIND TRANSFORMING GROWTH
FACTOR-Beta1 WITH HIGH AFFINITY, AVIDITY AND SPECIFICITY

<130> 578941

<150> 62/128, 149

<151> 2015-03-04

<160> 61

<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 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 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 Pro Ala Ser Pro Asp

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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 Ala 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 Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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 Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 5

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

Glu Leu Leu Gly Gly Pro

20

<210> 6

<211> 209

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

1 5 10 15

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 65 70 75 80
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 85 90 95
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 100 105 110
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 115 120 125
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 130 135 140
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 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> 7
 <211> 5
 <212> PRT

 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 Ser Tyr Gly Met His
 1 5
 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

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

1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Thr Gly Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Thr Ser Gly Val Glu Leu

1 5 10

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

1 5 10

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp Leu Gly

1 5 10

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 15

<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> 15

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

1 5 10

<210> 16

<211> 213

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr		
85	90	95
Phe 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
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> 17		
<211> 450		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 17		
Glu 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 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 Ala Ser Thr Lys Gly			
115	120	125	
Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser			
130	135	140	
Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val			
145	150	155	160
Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe			
165	170	175	
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val			
180	185	190	
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val			
195	200	205	
Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys			
210	215	220	
Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
245	250	255	

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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> 18

<211> 450

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Glu 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 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 Ala Ser Thr Lys Gly

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245	250	255
-----	-----	-----

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

260	265	270
-----	-----	-----

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

275	280	285
-----	-----	-----

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

290	295	300
-----	-----	-----

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

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

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

325	330	335
-----	-----	-----

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

340	345	350
-----	-----	-----

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> 19

<211> 245

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Glu 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 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 Gly Ser

115 120 125

Gly Gly Gly Ser 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 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 Thr

225 230 235 240

Arg Leu Glu Ile Lys

245

<210>

> 20

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Leu Glu Ile Lys Gly Arg Thr Val Ala

1 5

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Leu Glu Ile Lys Gly Gly Arg Thr Val Ala

1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Leu Glu Ile Lys Gly Ser Arg Thr Val Ala

1 5 10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Leu Glu Ile Lys Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala

1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Arg Thr Val Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 702

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

atgggcttgt cctgcacat catcggttctg gtggccacag ccaccggcgt gcacagcag	60
atcgtgtga cacagagccc cagcagcctg tctgccagcg tggcgacag agt gaccatc	120

acctgttagag ccagccaggg catcggtc ac gacactggat ggtatcagca gaaggctggc	180
aaggccccca tcctgctgat ctacggcacc agcacactgc agagcggcgt gcccctccaga	240
ttttctggca gggctccgg caccgacttc accctgacca tcaacagcct gcagcccgag	300
gacttcgcca cctactactg tctgcaagac agcaactacc ccctgacccctt cggcgaggc	360
acccggctgg aaatcaagcg tacggtgcc gctccttccg tttcatctt ccctccctcc	420
gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctcc gtggtgtgtc tgctgaacaa ctttaccct	480
cggaggccca aggtgcagtg gaaggtggac aacgcctgc agtccggcaa ctccaggag	540

tccgtcaccg agcaggactc caaggacagc acctactccc tgcctccac cctgaccctg	600
tccaaggccg actacgagaa gcacaagggtg tacgcctgtg aggtgaccca ccagggcctg	660
tccagccctg tgaccaagtc cttcaaccgg ggcgagtgtc ga	702

<210> 28

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 28

ggctggaaat caagggccgt acggtgccgc c	31
------------------------------------	----

<210> 29

<211> 31

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

gcggccaccg tacggccctt gatttccagc c	31
------------------------------------	----

<210> 30

<211> 34

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 30

ggctggaaat caagggccgc cgtacggtgccgc c	34
---------------------------------------	----

<210> 31

<211> 34	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 31	
gcggccaccc tacggccgcc cttgattcc agcc	34
<210> 32	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 32	
ggctggaaat caagggcggc agccgtacgg tggccgc	37
<210> 33	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 33	
gcggccaccc tacggctgcc gcccttgatt tccagcc	37
<210> 34	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 34	
ggctggaaat caagggcggc ggcagccgt a cggtggccgc	40
<210> 35	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 35	
gcggccaccc tacggctgcc gccccttg atttccagcc	40
<210> 36	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 36	

ggctggaaat caagggcggc ggccgcagcc gtacggtggc cgcc 43

<210> 37

<211> 43

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

gcggccaccg tacggctgcc gcccgcgcc ttgattcca gcc 43

<210> 38

<211> 214

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

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 Ala 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 Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 39

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

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 Ala 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 Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Arg Thr Val Ala

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 40
 <211> 216
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 40
 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 Ala 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 Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Gly Arg Thr Val
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
 115 120 125
 Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg

130	135	140	
Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn			
145	150	155	160
Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser			
165	170	175	
Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys			
180	185	190	
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr			
195	200	205	
Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210	215		
<210> 41			
<211> 217			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 41			
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 Ala 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 Thr Arg Leu Glu Ile Lys Gly Ser Arg Thr			
100	105	110	
Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu			
115	120	125	

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 42

<211> 218

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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 Ala 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 Gly Gly Ser Arg

100 105 110

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

 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
<210> 43
<211> 219
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 43
 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 Ala 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 Gly Gly Gly Ser

100	105	110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
115	120	125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
130	135	140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
145	150	155
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
165	170	175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
180	185	190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
195	200	205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	
<210> 44		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 44		
Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser		
1	5	
<210> 45		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 45		
Thr Val Thr Val Ser Gly Ser Ala Ser		
1	5	
<210> 46		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		

<400> 46

Thr Val Thr Val Ser Gly Gly Ser Ala Ser

1 5 10

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Thr Val Thr Val Ser Gly Gly Ser Ala

1 5

<210> 48

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Thr Val Thr Val Ser Gly Gly Gly Ser Ser Ala Ser

1 5 10

<210> 49

<211> 738

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

atgggcttgtt cctgcacatcat cctgtttctg gtggccaccg ccaccggcgt gcactctgaa 60

tgccagctgg tggaatctgg cggcgaggatg gtgcagccctg gcagaaggct gagactgagc 120

tgtgcccca gcccgttcac cttagcagcgt tacggaatgc actgggtgcg ccaggcccct 180

ggcaaaagaac tggaatgggt ggccgtgtatc agctacgacg gcagcatcaa gtactacgcc 240

gacagcgtga agggccgggtt caccatctcc cgggacaaca gcaagaacac cctgtacctg 300

cagatgaaca gcctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgttag aaccggcgg 360

tacagcggct acgacaccga ccctcagtac tcttggggcc agggcaccac cgtgacagt 420

tcttagcgcca gcaccaaggg cccaagcgtt ttccctctgg ccccttgcag cagaaggcacc 480

agcgaatcta cagccgcctt gggctgcctc gtgaaggact actttccgaa gcccgtgaca 540

gtgtcctgga actctggcgc cctgaccaggc ggagtgcata ccttccagc cgtgctgcag 600

agcagcggcc tgtactctc gagcagcgtc gtgactgtgc ccagcagctc tctggcacc	660
aagacctaca cctgtaacgt ggaccacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtg	720
catcaccacc accatcac	738
<210> 50	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 50	
ccaccgtgac agtgtctggc agcgccagc	29
<210> 51	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 51	
gctggcgctg ccagacactg tcacggtg	29
<210> 52	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 52	
ccaccgtgac agtgtctggc ggcagcgcca gc	32
<210> 53	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 53	
gctggcgctg ccgccagaca ctgtcacggt gg	32
<210> 54	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 54	
caccaccgtg acagtgtctg gccccggcgg cagcagcgcc agca	44

<210> 55

<211> 44

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

tgctggcgct gctgccgccc ccgcagaca ctgtcacggt ggtg 44

<210> 56

<211> 454

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Glu 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 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 Gly Ser Ala Ser Thr Lys

115 120 125

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

130 135 140

Gly 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 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn		
195	200	205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro		
210	215	220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
225	230	235
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
245	250	255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
260	265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
275	280	285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
305	310	315
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
325	330	335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
340	345	350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn		
355	360	365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
370	375	380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
385	390	395
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
405	410	415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210> 57

<211> 453

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Glu 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 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 Gly Gly Ser Ala Lys Gly
 115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 145 150 155 160

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

165	170	175
Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val		
180	185	190
Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val		
195	200	205
Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys		
210	215	220
Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu		
225	230	235
Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
245	250	255
Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
260	265	270
Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
290	295	300
Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
305	310	315
Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
325	330	335
Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
340	345	350
Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
355	360	365
Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
370	375	380
Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
385	390	395
400		
Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
405	410	415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 58
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 58

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 Gly Gly Gly Ser Ser

115 120 125
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 130 135 140
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 145 150 155 160
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

165	170	175
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
180	185	190
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
195	200	205
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
210	215	220
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys		
225	230	235
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
245	250	255
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
260	265	270
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
275	280	285
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
290	295	300
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
305	310	315
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
325	330	335
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
340	345	350
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
355	360	365
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
370	375	380
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
385	390	395
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
405	410	415

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 420 425 430
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 59

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 59

caccaccgtg acagtgtctg gcggcagcgc cagca 35

<210> 60

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 60

tgctggcgct gccgccagac actgtcacgg tggtg 35

<210> 61

<211> 455

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Glu 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 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 Gly Gly Ser Ala Ser Thr			
115	120	125	
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser			
130	135	140	
Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu			
145	150	155	160
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His			
165	170	175	
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser			
180	185	190	
Val Val Thr Val Pro Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys			
195	200	205	
Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu			
210	215	220	
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro			
225	230	235	240
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys			
245	250	255	
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val			
260	265	270	
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp			
275	280	285	
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr			
290	295	300	
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
305	310	315	320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

450 455