



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0086942
(43) 공개일자 2016년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2869 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-7016410
(22) 출원일자(국제) 2014년11월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2016년06월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/066687
(87) 국제공개번호 WO 2015/077491
국제공개일자 2015년05월28일
(30) 우선권주장
61/906,568 2013년11월20일 미국(US)

(71) 출원인
리제너론 파아마슈티컬스, 인크.
미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소오 밀 리
버 로드 777
(72) 발명자
스티비 파나이오티스
미국 뉴저지주 075052 웨스트 오렌지 파울러 드라
이브 32
그로마다 제스퍼
미국 뉴욕주 10583 스카스데일 볼더 릿지 로드 62
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
장훈

전체 청구항 수 : 총 38 항

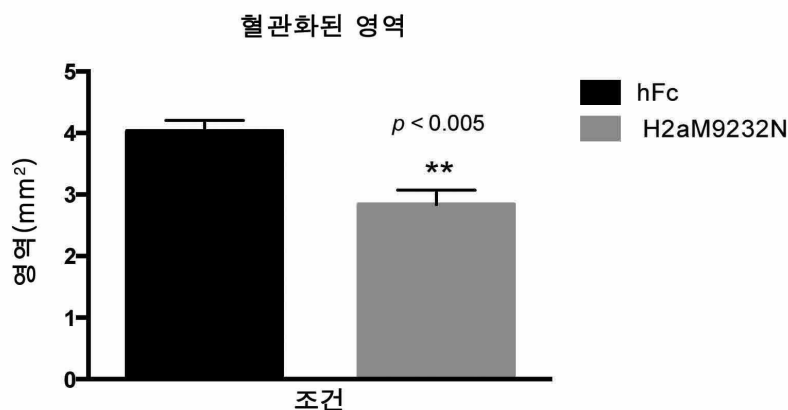
(54) 발명의 명칭 APLNR 조절물질 및 이들의 용도

(57) 요약

본 발명은 APLNR에 결합하는 아펠린 수용체(APLNR) 조절물질 및 그의 이용 방법을 제공한다. 본 발명에는 APLNR-매개된 신호전달을 억제하거나 약화시키는 APLNR 조절물질, 예컨대 항체, 또는 이들의 항원-결합 단편이 포함된다. 본 발명에는 APLNR-매개된 신호전달을 활성화하는 APLNR 조절물질, 예컨대 항체, 또는 이들의 항체 융합 단백질이 포함된다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 항체 또는 항원-결합 단편 또는 항체 융합 단백질은 인간 APLNR에 고친화도로 결합하는 완전 인간 항체이다. 본 발명의 APLNR 조절물질은 APLNR 신호전달 및/또는 APLNR 세포성 발현과 연관되는 질환 및 장애, 예컨대 심혈관 질환, 혈관신생 질환, 대사성 질환 및 섬유성 질환의 치료에 유용하다.

대표도 - 도1

RVD 모델에서 항-APLNR의 효과에 대한 통계 분석



(52) CPC특허분류

C07K 14/705 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/56 (2013.01)
C07K 2317/74 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)

(72) 발명자

머피 앤드류 제이.

미국 뉴욕주 10520 크로톤-오옌-허드슨 뉴턴 코트
10

레이 요나던

미국 뉴저지주 07621 베르겐필드 원저 로드 420

킴 지 에이치.

미국 뉴욕주 10606 화이트 플레인스 뱅크 스트리트
25 #222케이

로보프 이란 비.

미국 뉴욕주 10033 뉴욕 파인허스트 애비뉴 116
알32

명세서

청구범위

청구항 1

단리된 항체, 항체-융합 단백질 또는 항원-결합 단편으로서, 상기 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편이 서열 목록 번호 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 및 210/218로 구성된 군으로부터 선택되는 HCVR/LCVR 서열 쌍을 포함하는 참조 항체와 인간 아펠린 수용체(APLNR)로의 결합에 대해 경쟁하며, 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편이 인간 APLNR에 특이적으로 결합하는 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편이 APLNR 상에서 서열 목록 번호 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 및 210/218로 구성된 군으로부터 선택되는 HCVR/LCVR 서열 쌍을 포함하는 참조 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 항체-융합 단백질 또는 항원-결합 단편.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 항체, 항체-융합 단백질 또는 항원-결합 단편이 하기를 포함하는 항체, 항체-융합 단백질 또는 항원-결합 단편: (a) 서열 목록 번호 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 및 210으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR)의 상보성 결정 영역(CDR); 및 (b) 서열 목록 번호 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 및 218로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR)의 CDR.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체, 항체-융합 단백질 또는 항원-결합 단편이 각각 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 HCVR1-HCVR2-HCVR3-LCVR1-LCVR2-LCVR3 도메인을 포함하는 단리된 항체, 항체-융합 단백질 또는 항원-결합 단편: 서열 목록 번호 4-6-8-12-14-16; 20-22-24-28-30-32; 36-38-40-44-46-48; 52-54-56-60-62-64; 68-70-72-76-78-80; 84-86-88-92-94-96; 100-102-104-108-110-112; 116-118-120-124-126-128; 132-134-136-140-142-144; 148-150-152-156-158-160; 164-166-168-172-174-176; 180-182-184-188-190-192; 196-198-200-204-206-208; 및 212-214-216-220-222-224.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체, 항체-융합 단백질 또는 항원-결합 단편이 하기를 포함하는 단리된 항체, 항체-융합 단백질 또는 항원-결합 단편: (a) 서열 목록 번호 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 및 210으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR); 및 (b) 서열 목록 번호 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 및 218로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR).

청구항 6

청구항 1 내지 5 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체, 항체-융합 단백질 또는 항원-결합 단편이 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍의 중쇄 및 경쇄 CDR을 포함하는 단리된 항체, 항체-융합 단백질 또는 항원-결합 단편: 서열 목록 번호 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 및 210/218.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체, 항체-융합 단백질 또는 항원-결합 단편이 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍을 포함하는 단리된 항체, 항체-융합 단백질 또는 항원-결합

단편: 서열 목록 번호 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 및 210/218.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이들의 항원-결합 단편이 APLNR 및 아펠린의 상호작용을 차단하는 단리된 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이들의 항원-결합 단편이 경쟁적 결합 분석에서 APLNR 및 아펠린의 상호작용을 차단하여 적어도 50% 결합 억제율을 나타내는 단리된 항체, 또는 항원-결합 단편.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이들의 항원-결합 단편이 APLNR 및 아펠린의 상호작용을 차단하지 않거나 부분적으로만 차단하는 단리된 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이들의 항원-결합 단편이 cAMP 축적의 APLNR-매개된 억제를 감소시키는 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이들의 항원-결합 단편이 시험관내 cAMP 축적 분석에서 측정되는 약 10 nM 미만의 IC₅₀으로 cAMP의 APLNR-매개된 억제를 감소시키는 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 13

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이들의 항원-결합 단편이 시험관내 pERK 분석에서 APLNR-매개된 pERK 대 총 ERK 비를 억제하는 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 14

청구항 1 내지 13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체 또는 이들의 항원-결합 단편이 시험관내 pERK 분석에서 측정되는 약 100 nM 미만의 IC₅₀으로 APLNR-매개된 pERK 대 총 ERK 비를 억제하는 항체 또는 항원-결합 단편.

청구항 15

청구항 1 내지 14 중 어느 한 항의 항체, 항체-융합 단백질 또는 항원-결합 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 16

암 또는 전이성 질환의 치료 방법으로서, 청구항 15의 약학 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 17

망막병증의 치료 방법으로서, 청구항 15의 약학 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 18

병리적 혈관신생의 치료 방법으로서, 청구항 15의 약학 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 19

(i) 면역글로불린(Ig) 분자 또는 항원-결합 단편 및 (ii) 아펠린 펩타이드, 또는 이들의 유사체를 포함하는 단

백질.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 Ig 분자가 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍의 하나 이상의 CDR을 포함하며, 아미노산 서열 쌍이 서열 목록 번호 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 및 210/218로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질.

청구항 21

청구항 19에 있어서, 상기 아펠린 펩타이드가 Ig 분자의 N 또는 C 말단에서 Ig 분자에 융합되는 단백질.

청구항 22

청구항 19에 있어서, 상기 아펠린 펩타이드가 중쇄의 N 말단 또는 C 말단에서 Ig 분자에 융합되는 단백질.

청구항 23

청구항 19에 있어서, 상기 아펠린 펩타이드가 경쇄의 N 말단 또는 C 말단에서 Ig 분자에 융합되는 단백질.

청구항 24

청구항 20에 있어서, 상기 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍의 CDR이 인접한 단백질.

청구항 25

$N' - P1 - X1(n) - A1 - C'$ 또는 $N' - A1 - X1(n) - P1 - C'$ 을 포함하는 단백질에 있어서, 하기와 같은 단백질:

- a) N'이 폴리펩타이드의 N-말단이고 C'이 C-말단이며,
- b) P1이 HCVR, LCVR, 중쇄, 경쇄, 및 HCVR/LCVR ScFv 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고,
- c) A1이 아펠린 펩타이드, 또는 이들의 유사체를 포함하고,
- d) X1이 펩타이드 링커이며, 여기서 $n = 0$ 내지 10임.

청구항 26

청구항 19 내지 25 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아펠린 펩타이드가 서열 목록 번호 227의 아미노산 서열을 갖는 프리프로아펠린 폴리펩타이드의 단편 또는 유사체를 포함하는 단백질.

청구항 27

청구항 19 내지 26 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아펠린 펩타이드가 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 프리프로아펠린 폴리펩타이드의 단편 또는 유사체를 포함하는 단백질: 서열 목록 번호 227, 서열 목록 번호 228, 서열 목록 번호 229, 서열 목록 번호 230, 서열 목록 번호 262, 서열 목록 번호 269, 서열 목록 번호 270, 서열 목록 번호 271, 서열 목록 번호 272, 서열 목록 번호 273, 서열 목록 번호 283, 서열 목록 번호 284, 및 서열 목록 번호 285.

청구항 28

청구항 19 내지 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아펠린 펩타이드가 서열 목록 번호 227의 아미노산 서열을 갖는 프리프로아펠린 폴리펩타이드의 아미노산 잔기 6-77, 40-77, 42-77, 43-77, 47-77, 59-77, 61-77, 63-77, 64-77, 65-77, 66-77, 67-77, 73-77, 1-25, 6-25, 42-64, 61-64, 61-74, 61-75, 61-76, 65-76, 65-75, 42-58, 42-57, 42-56, 42-55, 42-54, 42-53, 및 피로글루타미드화된 아펠린 65-77로 구성된 군으로부터 선택되는 단백질.

청구항 29

청구항 19 내지 28 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아펠린 펩타이드가 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 단백

질: 아펠린40-77(아펠린-38), 아펠린42-77(아펠린-36), 아펠린43-77(아펠린-35), 아펠린47-77(아펠린-31), 아펠린59-77(아펠린-19), 아펠린61-77(아펠린-17), 아펠린63-77(아펠린-15), 아펠린64-77(아펠린-14), 아펠린65-77(아펠린-13), 아펠린66-77(아펠린-12, 또는 A12), 아펠린67-77(아펠린-11), 아펠린68-77(아펠린-10), 아펠린73-77(아펠린-5), 아펠린61-76(아펠린-K16P), 아펠린61-75(아펠린-K15M), 아펠린61-74(아펠린-K14P), 및 [Pyr1]아펠린-13.

청구항 30

청구항 19 내지 29 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질이 cAMP 축적의 APLNR-매개된 억제를 활성화하는 단백질.

청구항 31

청구항 19 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질이 시험관내 cAMP 축적 분석에서 측정되는 약 100 nM 미만의 EC50으로 cAMP의 APLNR-매개된 억제를 감소시키는 단백질.

청구항 32

청구항 19 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질이 시험관내 cAMP 축적 분석에서 측정되는 약 10 nM 미만의 EC50으로 cAMP의 APLNR-매개된 억제를 감소시키는 단백질.

청구항 33

청구항 19 내지 32 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질이 시험관내 pERK 분석에서 APLNR-매개된 pERK를 활성화하는 단백질.

청구항 34

청구항 19 내지 33 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질이 시험관내 pERK 분석에서 약 10 nM 미만의 EC50으로 APLNR-매개된 pERK 대 총 ERK 비를 증가시키는 단백질.

청구항 35

청구항 19 내지 34 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질이 시험관내 pERK 분석에서 약 1 nM 미만의 EC50으로 APLNR-매개된 pERK 대 총 ERK 비를 증가시키는 단백질.

청구항 36

청구항 19 내지 35 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질이 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열 쌍을 포함하는 단백질: 서열 목록 번호 130/235, 130/237, 239/138, 241/138, 243/138, 245/138, 247/122, 114/249, 114/251, 253/26, 255/26, 257/26, 259/26, 274/138, 275/138, 276/138, 277/138, 278/138, 279/26, 280/26, 281/26, 및 282/26.

청구항 37

청구항 19 내지 36 중 어느 하나의 단백질 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학 조성물.

청구항 38

청구항 15 또는 37에 있어서, 환자에서 APLNR 활성화에 관련되거나 이에 의해 유도되는 질환 또는 장애의 치료용 약제의 제조에서 사용하기 위한 조성물.

발명의 설명

기술 분야

서열 목록

본 출원은 2014년 11월 20일에 생성된 파일 7410W001_seqlisting.txt(126,005 bytes)로 컴퓨터로 읽을 수 있는

형태로 제출된 서열 목록을 참조로 도입한다.

[0003] **발명 분야**

[0004] 본 발명은 인간 APLNR에 특이적인 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편인 아펠린 수용체(APLNR) 조절물질, 및 이들의 이용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 프리프로아펠린은 인간 CNS 및 말초 조직, 예로 폐, 심장, 및 유선에서 발현되는 77 개 아미노산 단백질이다. 다양한 크기의 아펠린 펩타이드의 C-말단 단편을 포함하는 펩타이드가 G 단백질-커플링된 수용체, APJ 수용체 (현재 APLNR로 알려져 있음)를 활성화하는 것으로 나타났다(Habata, et al., 1999, *Biochem Biophys Acta* 1452:25-35; Hosoya, et al., 2000, *JBC*, 275(28):21061-67; Lee, et al., 2000, *J Neurochem* 74:34-41; Medhurst, et al., 2003, *J Neurochem* 84:1162-1172). 여러 연구에서는 아펠린 펩타이드 및 유사체가 APJ 수용체(APLNR)와 이들의 상호작용을 통해 심혈관 및 혈관신생 작용, 예컨대 내피-의존적 혈관확장을 전달함을 시사한다(Tatemoto et al., 2001, *Regul Pept* 99:87-92).

[0006] 아펠린 시스템은 병리생리적 혈관신생에서 역할을 담당하는 것으로 나타난다. 연구들에서는 아펠린이 저산소증-유도된 망막 혈관신생에 관여될 수 있음을 시사하였다(Kasai et al., 2010, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:2182-2187). 일부 보고에서, 특정 조성물은 아펠린/APJ 경로를 억제함으로써(예로, US 특허 번호 7,736,646 참고), 예컨대 병리적 혈관신생을 차단할 수 있고, 이에 따라 망막에서 종양 성장 또는 혈관화의 억제에 유용한 APLNR 억제제에 의해 혈관신생을 억제할 수 있다(Kojima, Y. and Quertermous, T., 2008, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 28:1687-1688; Rayalam, S. et al. 2011, *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 6(3):367-72). 이와 같이, 아펠린-매개된 신호전달의 간섭은 증식성 당뇨병성 망막병증의 조기 예방에서도 유익할 수 있다(Tao et al., 2010, *Invest Ophthalmol Visual Science* 51:4237-4242; Lu, Q. et al, 2013, *PLoS One* 8(7):e69703).

[0007] 아펠린은 또한 인슐린 조절 및 당뇨병과 비만 관련 장애의 기전에서도 보고되었다. 비만의 마우스 모델에서, 아펠린은 지방세포로부터 방출되며, 인슐린에 의해 직접 상향조절된다(Boucher, et al., 2005, *Endocrinol* 146:1764-71). 아펠린 녹아웃 마우스는 감소된 인슐린 감수성을 나타낸다(Yue, et al., 2010, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298:E59-E67).

[0008] 또한, 아펠린-유도된 혈관확장 및 혈관신생은 허혈증-재관류 부상에서 보호성일 수 있고, 병태, 예컨대 울혈성 심부전, 심근 경색, 및 심근병증에서 심장 기능을 개선할 수 있다. 아펠린 펩타이드의 치료적 투여는 혈관신생 촉진 및 허혈증으로부터의 기능적 회복에 기여하는 것으로 보고된다(Eyries M, et al., 2008, *Circ Res* 103:432-440; Kidoya H, et al., 2010, *Blood* 115:3166-3174).

[0009] APLNR 신호전달, 및 이들의 조절은 다양한 질환 및 장애에서 하나의 요인으로 시사되었으며(예로 WO2004081198A2, 2004년 9월 23일 공개됨), APLNR의 생물학적 활성을 조정하는 치료제에 대한 필요성이 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0010] **발명의 간략한 요약**

[0011] 본 발명은 인간 아펠린 수용체("APLNR")에 결합하는 APLNR 조절물질을 제공한다. 본 발명의 APLNR 조절물질은 특허, APLNR-매개된 신호전달을 활성화하거나 억제하는데, 그리고 APLNR 활성 및/또는 신호전달에 관련된 질환 및 장애를 치료하는데 유용하다.

[0012] 본 발명의 APLNR 조절물질에는 항체, 항체-융합 단백질, 및 이들의 항원-결합 단편이 포함된다.

[0013] 본 발명의 항체 및 항체-융합 단백질은 전장(예를 들어, IgG1, IgG2 또는 IgG4 항체)일 수도 있고 또는 항원 결합부(예를 들어, Fab, F(ab')₂ 또는 scFv 단편)만 포함할 수도 있고, 기능성에 영향을 미치지도록, 예로 잔여 효과기 기능을 제거하도록 개질될 수도 있다(Reddy et al., 2000, *J. Immunol.* 164:1925-1933).

[0014] 본 발명은 서열 목록 번호 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 및 210으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이들의 실질적으로 유사한 서열을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR)을 포함하는 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편을 제공한다.

- [0015] 본 발명은 또한 서열 목록 번호 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 및 218로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이들의 실질적으로 유사한 서열을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하는 항체, 항체-융합 단백질 또는 항체의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한 서열 목록 번호 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 및 210/218로 구성되는 군으로부터 선택된 HCVR 및 LCVR(HCVR/LCVR) 서열 쌍을 포함하는 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한 서열 목록 번호 8, 24, 40, 56, 72, 88, 104, 120, 136, 152, 168, 184, 200, 및 216으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이들의 실질적으로 유사한 서열을 갖는 중쇄 CDR3(HCDR3) 도메인; 및 서열 목록 번호 16, 32, 48, 64, 80, 96, 112, 128, 144, 160, 176, 192, 208, 및 224로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이들의 실질적으로 유사한 서열을 갖는 경쇄 CDR3(LCDR3) 도메인을 포함하는 항체, 항체-융합 단백질 또는 항체의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0018] 특정 구현예에서, 항체, 항체-융합 단백질 또는 항체의 항원-결합부는 서열 목록 번호 8/16, 24/32, 40/48, 56/64, 72/80, 88/96, 104/112, 120/128, 136/144, 152/160, 168/176, 184/192, 200/208, 및 216/224로 구성되는 군으로부터 선택된 HCDR3/LCDR3 아미노산 서열 쌍을 포함한다.
- [0019] 본 발명은 또한 서열 목록 번호 4, 20, 36, 52, 68, 84, 100, 116, 132, 148, 164, 180, 196, 및 212로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이들의 실질적으로 유사한 서열을 갖는 중쇄 CDR1(HCDR1) 도메인; 서열 목록 번호 6, 22, 38, 54, 70, 86, 102, 118, 134, 150, 166, 182, 198, 및 214로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이들의 실질적으로 유사한 서열을 갖는 중쇄 CDR2(HCDR2) 도메인; 서열 목록 번호 12, 28, 44, 60, 76, 92, 108, 124, 140, 156, 172, 188, 204, 및 220으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이들의 실질적으로 유사한 서열을 갖는 경쇄 CDR1(LCDR1) 도메인; 및 서열 목록 번호 14, 30, 46, 62, 78, 94, 110, 126, 142, 158, 174, 190, 206, 및 222로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이들의 실질적으로 유사한 서열을 갖는 경쇄 CDR2(LCDR2) 도메인을 추가로 포함하는 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 단편을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 특정한 비제한적, 예시적인 항체, 항체-융합 단백질 및 항원-결합 단편은 각각 하기로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 도메인을 포함한다: 서열 목록 번호 4-6-8-12-14-16(예로 H1M9207N); 20-22-24-28-30-32(예로 H2aM9209N); 36-38-40-44-46-48(예로 H2aM9222N); 52-54-56-60-62-64(예로 H2aM9227N); 68-70-72-76-78-80(예로 H2aM9228N); 84-86-88-92-94-96(예로 H2aM9230N); 100-102-104-108-110-112(예로 H2aM9232N); 116-118-120-124-126-128(예로 H4H9092P); 132-134-136-140-142-144(예로 H4H9093P); 148-150-152-156-158-160(예로, H4H9101P); 164-166-168-172-174-176(예로 H4H9103P); 180-182-184-188-190-192(예로, H4H9104P); 196-198-200-204-206-208(예로 H4H9112P); 및 212-214-216-220-222-224(예로 H4H9113P).
- [0021] 관련된 구현예에서, 본 발명에는 APLNR에 특이적으로 결합하는 항체, 항체-융합 단백질 또는 항체의 항원-결합 단편이 포함되며, 여기서 항체, 항체-융합 단백질 또는 항원-결합 단편은 서열 목록 번호 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 및 210/218로 구성되는 군으로부터 선택된 중쇄 및 경쇄 가변 영역(HCVR/LCVR) 서열 내에 포함되는 중쇄 및 경쇄 CDR 도메인을 포함한다. HCVR 및 LCVR 아미노산 서열 내에서 CDR을 확인하기 위한 방법 및 기법은 당분야에 널리 공지되어 있으며, 본원에 개시된 특정된 HCVR 및/또는 LCVR 아미노산 서열 내에서 CDR을 확인하기 위해 이용될 수 있다. CDR의 경계를 확인하기 위해 이용될 수 있는 예시적인 관습에는, 예로 Kabat 정의, Chothia 정의, 및 AbM 정의가 포함된다. 일반 용어에서, Kabat 정의는 서열 가변성에 기반하며, Chothia 정의는 구조적 루프 영역의 위치에 기반하고, AbM 정의는 Kabat 및 Chothia 접근 간 절충이다. 예로, [Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md.(1991); Al-Lazikani et al., 1997, *J. Mol. Biol.* 273:927-948; 및 Martin et al., 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272]를 참고하라. 항체 내에서 CDR 서열을 확인하기 위해 공개 데이터베이스도 이용 가능하다.
- [0022] 본 발명은 또한 아펠린 펩타이드를 추가로 포함하는 항체-융합 단백질 또는 이들의 단편을 제공한다. 본 발명의

특정한 비제한적, 예시적인 항체-융합 단백질은 서열 목록 번호 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 및 210/218로 구성되는 군으로부터 선택된 중쇄 및 경쇄 가변 영역(HCVR/LCVR) 서열을 포함하며; 아펠린 펩타이드 서열, 예로 서열 목록 번호 227, 서열 목록 번호 228, 서열 목록 번호 229 또는 서열 목록 번호 230의 단편 또는 유사체를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 아펠린 펩타이드 서열, 또는 이들의 단편 또는 유사체는 서열 목록 번호 227, 서열 목록 번호 228, 서열 목록 번호 229, 서열 목록 번호 230, 서열 목록 번호 262, 서열 목록 번호 269, 서열 목록 번호 270, 서열 목록 번호 271, 서열 목록 번호 272, 서열 목록 번호 273, 서열 목록 번호 283, 서열 목록 번호 284, 및 서열 목록 번호 285로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0023] 본 발명은 서열 목록 번호 239, 241, 243, 245, 247, 253, 255, 257, 259, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 및 282로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이들의 실질적으로 유사한 서열을 갖는 중쇄(HC)를 포함하는 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0024] 본 발명은 또한 서열 목록 번호 235, 237, 249 및 251로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 이들의 실질적으로 유사한 서열을 갖는 경쇄(LC)를 포함하는 항체-융합 단백질 또는 항체-융합 단백질의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0025] 본 발명은 또한 서열 목록 번호 130/235, 130/237, 239/138, 241/138, 243/138, 245/138, 247/122, 114/249, 114/251, 253/26, 255/26, 257/26, 259/26, 274/138, 275/138, 276/138, 277/138, 278/138, 279/26, 280/26, 281/26, 및 282/26으로 구성되는 군으로부터 선택된 HC 및 LC(HC/LC) 아미노산 서열 쌍을 포함하는 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편을 제공한다.

[0026] 특정한 비제한적, 예시적인 항체-융합 단백질은 (i) 면역글로불린(Ig) 분자 및 (ii) 아펠린 펩타이드, 또는 이들의 유사체를 포함한다. 일부 구현예에서, Ig 분자는 본원에 기재된 항-APLNR 항체이다. 추가 구현예에서, 아펠린 펩타이드는 서열 목록 번호 227, 서열 목록 번호 228, 서열 목록 번호 229 또는 서열 목록 번호 230으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 서열 목록 번호 227, 서열 목록 번호 228, 서열 목록 번호 229 또는 서열 목록 번호 230으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 단편 또는 유사체를 포함한다.

[0027] 본 발명의 또 다른 측면은 $N' - P1 - X1(n) - A1 - C'$ 또는 $N' - A1 - X1(n) - P1 - C'$ 을 포함하는 단백질을 제공하며, 여기서 N' 은 N-말단이고 C' 은 폴리펩타이드의 C-말단이며; P1은 HCVR, LCVR, 중쇄, 경쇄, 및 HCVR/LCVR ScFv 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; A1은 아펠린 펩타이드, 또는 이들의 유사체를 포함하고; X1은 펩타이드 링커이고; $n = 0$ 내지 10이다.

[0028] 일부 구현예에서, 아펠린 펩타이드, 또는 이들의 유사체는 아펠린40-77(아펠린-38), 아펠린42-77(아펠린-36), 아펠린43-77(아펠린-35), 아펠린47-77(아펠린-31), 아펠린59-77(아펠린-19), 아펠린61-77(아펠린-17), 아펠린63-77(아펠린-15), 아펠린64-77(아펠린-14), 아펠린65-77(아펠린-13), 아펠린66-77(아펠린-12, 또는 A12), 아펠린67-77(아펠린-11), 아펠린68-77(아펠린-10), 아펠린73-77(아펠린-5), 아펠린61-76(아펠린-K16P), 아펠린61-75(아펠린-K15M), 아펠린61-74(아펠린-K14P), 또는 $[Pyr^1]$ 아펠린-13을 포함한다.

[0029] 특정 구현예에 따르면, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편은 서열 목록 번호 130 및 235(예로 H4H9093P-1-NVK3), 130 및 237(예로 H4H9093P-2-CVK3), 239 및 138(예로 H4H9093P-3-NVH3), 241 및 138(예로 H4H9093P-4-NVH0), 243 및 138(예로 H4H9093P-5-NVH1), 245 및 138(예로 H4H9093P-6-NVH2), 247 및 122(예로 H4H9092P-1-NVH3), 114 및 249(예로 H4H9092P-2-NVK3), 114 및 251(예로 H4H9092P-3-CVK3), 253 및 26(예로 H4H9209N-1-NVH0), 255 및 26(예로 H4H9209N-2-NVH1), 257 및 26(예로 H4H9209N-3-NVH2), 259 및 26(예로 H4H9209N-4-NVH3), 274 및 138(예로 H4H9093P-APN9-(G4S)3), 275 및 138(예로 H4H9093P-APN10-(G4S)3), 276 및 138(예로 H4H9093P-APN11-(G4S)3), 277 및 138(예로 H4H9093P-APN11+S-(G4S)3), 278 및 138(예로 H4H9093P-APNV5-11-(G4S)3), 279 및 26(예로 H4H9209N-APN9-(G4S)3), 280 및 26(예로 H4H9209N-APN10-(G4S)3), 281 및 26(예로 H4H9209N-APN11-(G4S)3), 또는 282 및 26(예로 H4H9209N-APN11+S-(G4S)3)의 아미노산 서열에 의해 인코딩되는 중쇄 및 경쇄 서열을 포함한다.

[0030] 또 다른 측면에서, 본 발명은 항-APLNR 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편을 인코딩하는 핵산 분자를 제공한다. 본 발명의 핵산을 수반하는 재조합 발현 벡터, 및 이러한 벡터가 도입된 숙주 세포도, 항체 생산을 허용하는 조건 하에 숙주 세포를 배양하고, 생산되는 항체 또는 항체-융합 단백질을 회수함으로써 항체

또는 항체-융합 단백질을 생산하는 방법과 마찬가지로 본 발명에 의해 포괄된다.

- [0031] 하나의 구현예에서, 본 발명은 서열 목록 번호 1, 17, 33, 49, 65, 81, 97, 113, 129, 145, 161, 177, 193, 및 209로 구성되는 군으로부터 선택된 핵산 서열, 또는 이들의 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 실질적으로 동일한 서열에 의해 인코딩되는 HCVR을 포함하는 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0032] 본 발명은 또한 서열 목록 번호 9, 25, 41, 57, 73, 89, 105, 121, 137, 153, 169, 185, 201, 및 217로 구성되는 군으로부터 선택된 핵산 서열, 또는 이들의 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 실질적으로 동일한 서열에 의해 인코딩되는 LCVR을 포함하는 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0033] 본 발명은 또한 서열 목록 번호 7, 23, 39, 55, 71, 87, 103, 119, 135, 151, 167, 183, 199, 및 215로 구성되는 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이들의 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 실질적으로 동일한 서열에 의해 인코딩되는 HCDR3 도메인; 및 서열 목록 번호 15, 31, 47, 63, 79, 95, 111, 127, 143, 159, 175, 191, 207, 및 223으로 구성되는 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이들의 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 실질적으로 동일한 서열에 의해 인코딩되는 LCDR3 도메인을 포함하는 항체, 항체-융합 단백질 또는 항체의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0034] 본 발명은 또한 서열 목록 번호 3, 19, 35, 51, 67, 83, 99, 115, 131, 147, 163, 179, 195, 및 211로 구성되는 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이들의 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 실질적으로 동일한 서열에 의해 인코딩되는 HCDR1 도메인; 서열 목록 번호 5, 21, 37, 53, 69, 85, 101, 117, 133, 149, 165, 181, 197, 및 213으로 구성되는 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이들의 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 실질적으로 동일한 서열에 의해 인코딩되는 HCDR2 도메인; 서열 목록 번호 11, 27, 43, 59, 75, 91, 107, 123, 139, 155, 171, 187, 203, 및 219로 구성되는 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이들의 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 실질적으로 동일한 서열에 의해 인코딩되는 LCDR1 도메인; 및 서열 목록 번호 13, 29, 45, 61, 77, 93, 109, 125, 141, 157, 173, 189, 205, 및 221로 구성되는 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열, 또는 이들의 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 실질적으로 동일한 서열에 의해 인코딩되는 LCDR2 도메인을 추가로 포함하는 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0035] 특정 구현예에 따르면, 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편은 서열 목록 번호 1 및 9(예로 H1M9207N), 17 및 25(예로 H2aM9209N), 33 및 41(예로 H2aM9222N), 49 및 57(예로 H2aM9227N), 65 및 73(예로 H2aM9228N), 81 및 89(예로 H2aM9230N), 97 및 105(예로 H2aM9232N), 113 및 121(예로 H4H9092P), 129 및 137(예로 H4H9093P), 145 및 153(예로 H4H9101P), 161 및 169(예로 H4H9103P), 177 및 185(예로 H4H9104P), 193 및 201(예로 H4H9112P), 또는 209 및 217(예로 H4H9113P)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 중쇄 및 경쇄 CDR 서열을 포함한다.
- [0036] 하나의 구현예에서, 본 발명은 서열 목록 번호 238, 240, 242, 244, 246, 252, 254, 256, 및 258로 구성되는 군으로부터 선택된 핵산 서열, 또는 이들의 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 실질적으로 동일한 서열에 의해 인코딩되는 중쇄(HC)를 포함하는 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0037] 본 발명은 또한 서열 목록 번호 234, 236, 248, 및 250으로 구성되는 군으로부터 선택된 핵산 서열, 또는 이들의 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 실질적으로 동일한 서열에 의해 인코딩되는 경쇄(LC)를 포함하는 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0038] 특정 구현예에 따르면, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편은 서열 목록 번호 129 및 234(예로 H4H9093P-1-NVK3), 129 및 236(예로 H4H9093P-2-CVK3), 238 및 137(예로 H4H9093P-3-NVH3), 240 및 137(예로 H4H9093P-4-NVH0), 242 및 137(예로 H4H9093P-5-NVH1), 244 및 137(예로 H4H9093P-6-NVH2), 246 및 121(예로 H4H9092P-1-NVH3), 113 및 248(예로 H4H9092P-2-NVK3), 113 및 250(예로 H4H9092P-3-CVK3), 252 및 25(예로 H4H9209N-1-NVH0), 254 및 25(예로 H4H9209N-2-NVH1), 256 및 25(예로 H4H9209N-3-NVH2), 또는 258 및 25(예로 H4H9209N-4-NVH3)의 핵산 서열에 의해 인코딩되는 중쇄 및 경쇄 서열을 포함한다.
- [0039] 다른 구현예에서, 항체-융합 단백질은 서열 목록 번호 130 및 235(예로 H4H9093P-1-NVK3), 130 및 237(예로

H4H9093P-2-CVK3), 239 및 138(예로 H4H9093P-3-NVH3), 241 및 138(예로 H4H9093P-4-NVH0), 243 및 138(예로 H4H9093P-5-NVH1), 245 및 138(예로 H4H9093P-6-NVH2), 247 및 122(예로 H4H9092P-1-NVH3), 114 및 249(예로 H4H9092P-2-NVK3), 114 및 251(예로 H4H9092P-3-CVK3), 253 및 26(예로 H4H9209N-1-NVH0), 255 및 26(예로 H4H9209N-2-NVH1), 257 및 26(예로 H4H9209N-3-NVH2), 259 및 26(예로 H4H9209N-4-NVH3), 274 및 138(예로 H4H9093P-APN9-(G4S)3), 275 및 138(예로 H4H9093P-APN10-(G4S)3), 276 및 138(예로 H4H9093P-APN11-(G4S)3), 277 및 138(예로 H4H9093P-APN11+S-(G4S)3), 278 및 138(예로 H4H9093P-APNV5-11-(G4S)3), 279 및 26(예로 H4H9209N-APN9-(G4S)3), 280 및 26(예로 H4H9209N-APN10-(G4S)3), 281 및 26(예로 H4H9209N-APN11-(G4S)3), 또는 282 및 26(예로 H4H9209N-APN11+S-(G4S)3)으로 구성된 군으로부터 선택되는 중쇄 및 경쇄 아미노산 쌍을 인코딩하는 핵산 분자를 포함한다.

[0040] 다른 구현예에 따르면, 본 발명은 함께 항체-융합 단백질을 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드 및 제2 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 본 발명은 함께 항체-융합 단백질을 인코딩하는 제1 폴리뉴클레오타이드 및 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포를 추가로 제공한다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리뉴클레오타이드는 세포 내에서 동일한 핵산 분자 또는 상이한 핵산 분자의 일부이다.

[0041] 특정 예에서, 제1 폴리뉴클레오타이드는 (i) 서열 목록 번호 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 및 210으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR), 및 (ii) 서열 목록 번호 227의 아미노산 서열을 갖는 프리프로아펠린 폴리펩타이드의 단편 또는 유사체인 아펠린 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하며; 제2 폴리뉴클레오타이드는 서열 목록 번호 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 및 218로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩한다.

[0042] 다른 구현예에서, 제1 폴리뉴클레오타이드는 서열 목록 번호 2, 18, 34, 50, 66, 82, 98, 114, 130, 146, 162, 178, 194, 및 210으로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역(HCVR)을 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩하며, 제2 폴리뉴클레오타이드는 (i) 서열 목록 번호 10, 26, 42, 58, 74, 90, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 및 218로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역(LCVR), 및 (ii) 서열 목록 번호 227의 아미노산 서열을 갖는 프리프로아펠린 폴리펩타이드의 단편 또는 유사체인 아펠린 펩타이드를 포함하는 폴리펩타이드를 인코딩한다.

[0043] 본 발명에는 개질된 글리코실화 패턴을 갖는 항-APLNR 항체 및 항체-융합 단백질이 포함된다. 일부 적용에서, 바람직하지 못한 글리코실화 부위를 제거하기 위한 개질, 또는 예를 들어 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC) 기능을 증가시키기 위해 올리고당류 사슬 상에 존재하는 푸코스 모이티가 없는 항체가 유용할 수 있다(Shield et al., 2002, *JBC* 277:26733 참고). 다른 적용에서, 보체 의존적 세포독성(CDC)을 개질하기 위해 갈락토실화의 개질이 수행될 수 있다.

[0044] 또 다른 측면에서, 본 발명은 APLNR에 특이적으로 결합하는 재조합 인간 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 단편 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 관련 측면에서, 본 발명은 항-APLNR 항체 또는 항체-융합 단백질 및 제2 치료제의 조합인 조성물을 특징으로 한다. 하나의 구현예에서, 제2 치료제는 항-APLNR 항체 또는 항체-융합 단백질과 유리하게 조합되는 임의의 제제이다. 항-APLNR 항체와 유리하게 조합될 수 있는 예시적인 제제에는 비제한적으로 APLNR 활성을 억제하는 다른 제제(다른 항체 또는 이들의 항원-결합 단편, 융합 단백질, 펩타이드 작용제 또는 길항제, 소분자 등을 포함) 및/또는 APLNR에 직접 결합하지는 않지만 그럼에도 불구하고 APLNR-매개된 신호전달을 방해하거나, 차단하거나, 약화시키는 제제가 포함된다. 항체-융합 단백질과 유리하게 조합될 수 있는 예시적인 제제에는 비제한적으로 APLNR 활성을 활성화하는 다른 제제(다른 융합 단백질, 항체 또는 이들의 항원-결합 단편, 펩타이드 작용제 또는 길항제, 소분자 등을 포함) 및/또는 APLNR 신호전달 또는 하류 세포 효과를 활성화하는 제제가 포함된다. 본 발명의 항체 및 항체-융합 단백질이 관여되는 추가적인 조합 치료법 및 공동-제형은 본원에서 다른 곳에 개시된다. 이와 같이, 본 발명에 따라 임의의 하나 이상의 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편을 포함하는 약학 조성물이 제공된다.

[0045] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 APLNR 조절물질을 이용하여 APLNR 활성을 억제하기 위한 치료 방법을 제공하며, 여기서 치료 방법은 본 발명의 항체, 항체-융합 단백질 또는 항체의 항원-결합 단편을 포함하는 치료 유효량의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 치료되는 장애는 APLNR 활성 또는 신호전달의 제거, 억제 또는 감소에 의해 개선되거나, 완화되거나, 억제되거나, 예방되는 임의의 질환 또는 병태이다. 본 발명의 항-APLNR 항체, 항체-융합 단백질 또는 항체 단편은 APLNR 및 APLNR 결합 파트너(예로, APLNR 수용체 리간드, 예컨대 아펠린 펩타이드) 간 상호작용을 차단하는 기능을 할 수도 있고, 또는 다르게는 APLNR의 신호전달 활성을 억

제할 수도 있다.

[0046] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 APLNR 조절물질을 이용하여 APLNR 활성을 활성화하기 위한 치료 방법을 제공하며, 여기서 치료 방법은 본 발명의 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편을 포함하는 치료 유효량의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 치료되는 장애는 APLNR 활성 또는 신호전달의 활성화, 자극 또는 증폭에 의해 개선되거나, 완화되거나, 억제되거나, 예방되는 임의의 질환 또는 병태이다. 본 발명의 항-APLNR 항체, 항체-융합 단백질 또는 항체 단편은 APLNR 및 APLNR 결합 파트너(예로, APLNR 수용체 리간드, 예컨대 아펠린 펩타이드) 간 상호작용을 강화하는 기능을 할 수도 있고, 또는 다르게는 APLNR의 신호전달 활성을 활성화하거나 증강시킬 수 있다.

[0047] 본 발명에는 또한 환자에서 APLNR 활성화에 관련되거나 이에 의해 유도되는 질환 또는 장애의 치료를 위한 약제의 제조에서 본 발명의 항-APLNR 항체, 항체-융합 단백질 또는 항체의 항원-결합부의 용도가 포함된다. 본 발명은 환자에서 APLNR 활성화에 관련되거나 이에 의해 유도되는 질환 또는 장애의 치료를 위한 약제의 제조에서 사용하기 위한 항체 조성물을 추가로 제공하며, 이러한 질환 또는 장애는 심혈관 질환, 급성 탈보상 심부전, 울혈성 심부전, 심근 경색, 심근병증, 허혈증, 허혈증/재관류 부상, 폐 고혈압, 당뇨병, 신경 부상, 신경변성, 일과성 열감 증상, 유체 항상성, HIV 감염, 비만, 암, 전이성 질환, 망막병증, 섬유증, 및 병리적 혈관신생으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0048] 본 발명은 심혈관 질환, 급성 탈보상 심부전, 울혈성 심부전, 심근 경색, 심근병증, 허혈증, 허혈증/재관류 부상, 폐 고혈압, 당뇨병, 신경 부상, 신경변성, 일과성 열감 증상, 유체 항상성, HIV 감염, 비만, 암, 전이성 질환, 망막병증, 섬유증, 또는 병리적 혈관신생의 치료 방법을 추가로 제공하며, 상기 방법은 본 발명에 따른 임의의 항체, 항체-융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편을 포함하는 약학 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0049] 다른 구현에는 후속되는 상세한 설명의 검토로부터 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 RVD 모델에서 항-APLNR 항체 효과의 통계 분석을 도시한다. 길항성 항-APLNR 항체, H2aM9232N은 발달 중인 마우스 망막에서 대조군(hFc)에 비해 망막 혈관 증식에서 대략 30%의 통계적으로 유의미한 평균 감소를 일으켜서, APLNR 차단이 유의미한 항-혈관신생 효과를 가짐을 시사하였다(** $p < 0.005$; 2-테일 p 값 = 0.0014; $t = 4.123$, $df = 12$).

도 2는 절단된 아펠린 융합 항체, H4H9209N-APN11-(G4S)3(도 2a) 또는 H4H9209N-APN11+S-(G4S)3(도 2b)에 있어서 혈청에 대한 노출 0, 6 및 24 시간 후 질량 분광측정 상에서 온전한 아펠린 펩타이드 피크의 패턴을 도시한다. 혈청 노출 후 융합 항체의 Lys-C 소화 후, 관심 펩타이드는 QRPRLSHK 서열을 가지며, 1004에서 질량 전하 비 피크를 보고한다. 아펠린-cter11 융합 항체는 혈청 노출 24 시간 후 잔여 아펠린 피크를 갖는다.

도 3은 시점 0, 6 및 24 시간에 베타-어레스틴 활성화 분석(DiscoverX β -어레스틴 활성화 분석)에서 회색된 혈청에 대해 노출된 아펠린-항체 융합물(H4H9093P-3-NVH3, H4H9209N-APN11-(G4S)3, 또는 H4H9209N-APN11+S-(G4S)3)의 활성을 나타낸다. 이들의 C-말단에서 아펠린-Cter11 및 아펠린-Cter11+S를 갖는 항체 융합물은 혈청 노출 6h 후 β -어레스틴 활성을 보유한다. 6h 시점 값은 0 h 시점 대비 활성화 백분율을, 또는 H4H9093P-3-NVH3, H4H9209N-APN11-(G4S)3, 또는 H4H9209N-APN11+S-(G4S)3에 대해 각각 2.4%, 70.4% 및 33.6%를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 상세한 설명

[0052] 본 발명을 설명하기 전에, 기재된 특정한 방법 및 실험 조건은 변할 수 있으므로, 본 발명이 이들 방법 및 조건에 제한되지 않음이 이해되어야 한다. 또한 본원에서 이용된 용어는 특정 구현예의 설명만을 목적으로 하는 것이며, 본 발명의 범위는 첨부되는 청구범위에 의해서만 제한될 것이므로, 제한하려는 것이 아님이 이해되어야 한다.

[0053] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 이용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 이용되는 용어 "약"은 특정한 언급된 수치값에 대해 이용되는 경우, 그 값이 언급된 값에서 1% 이하만큼 변할 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 본원에서 이용되는 표현 "약 100"에는 99 및 101 그리고 그 사이의 모든 값이 포함된다(예로, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4 등).

- [0054] 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에서 이용될 수 있지만, 이제 바람직한 방법 및 물질이 기재된다. 본 명세서에서 언급되는 모든 특허, 출원 및 비특허 문헌은 본원에 이들의 전문이 참조로 도입된다.
- [0055] **정의**
- [0056] 본원에서 이용되는 표현 "아펠린 수용체", "APLNR", "APJ 수용체" 등은 서열 목록 번호 225의 아미노산 서열, 또는 서열 목록 번호 225와 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 인간 APLNR 단백질을 나타낸다. 본원에서 단백질, 폴리펩타이드 및 단백질 단편에 대한 모든 언급은 비인간 종으로부터인 것으로 명시적으로(예로, "마우스 APLNR", "원숭이 APLNR" 등) 특정되지 않는 한, 각각의 단백질, 폴리펩타이드 또는 단백질 단편의 인간 버전을 나타내기 위한 것이다.
- [0057] 본원에서 이용되는 "APLNR에 결합하는 항체 또는 항체-융합 단백질" 또는 "항-APLNR 항체"에는 APLNR 단백질의 가용성 단편에 결합하는 면역글로불린 분자, 항체, 항체-융합 단백질 및 이들의 항원-결합 단편이 포함된다. 가용성 APLNR 분자에는 천연 APLNR 단백질뿐만 아니라 재조합 APLNR 단백질 변이체, 예컨대, 단량체성 및 이량체성 APLNR 구조물이 포함된다.
- [0058] 용어 "면역글로불린"(Ig)은 한 쌍은 경쇄(L)이고 한 쌍은 중쇄(H)인 2 쌍의 폴리펩타이드 사슬로 구성된 구조적으로 관련된 당단백질 클래스를 나타내며, 전체 4 개는 디설파이드 결합에 의해 내부-연결될 수 있다. 면역글로불린의 구조는 잘 분석되어 있다. 예를 들어, [Fundamental Immunology Ch. 7(Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y.(1989))]를 참고하라. 본 발명의 단백질은 면역글로불린 분자로부터 유도될 수 있는, 예컨대 임의의 면역글로불린 영역 또는 도메인으로부터 유도된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0059] 본원에서 이용되는 용어 "항체"는 특정 항원(예로, APLNR)에 특이적으로 결합하거나 상호작용하는 적어도 하나의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하는 임의의 항원-결합 분자 또는 분자 복합체를 의미한다. 용어 "항체"에는 디설파이드 결합에 의해 내부-연결된 2 개의 중쇄(H) 및 2 개의 경쇄(L)인 4 개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 면역글로불린 분자뿐만 아니라 이들의 다량체(예로, IgM), 더불어 본원에 기재되는 하나 이상의 중쇄의 단편 또는 하나 이상의 경쇄의 단편을 포함하는 면역글로불린 분자(예로 Fab, F(ab')₂ 또는 scFv 단편)가 포함된다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 HCVR 또는 V_H로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 3 개의 도메인, C_H1, C_H2 및 C_H3을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 LCVR 또는 V_L로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인(C_L1)을 포함한다. V_H 및 V_L 영역은 프레임 워크 영역(FR)으로 명명되는 보다 보존된 영역과 함께 분산된, 상보성 결정 영역(CDRs)으로 명명되는 고가변성 영역으로 추가 세분화될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L은 하기 순서로 아미노-말단부터 카복시-말단으로 배열된 3 개의 CDR 및 4 개의 FR로 이루어진다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 본 발명의 상이한 구현예에서, 항-APLNR 항체(또는 이들의 항원-결합부)의 FR은 인간 생식계열 서열과 동일할 수도 있고, 또는 천연 또는 인공 개질될 수도 있다. 아미노산 공통 서열은 2 개 이상의 CDR의 나란한 분석에 기반하여 정의될 수 있다.
- [0060] 본원에서 이용되는 용어 "항체"에는 또한 전체 항체 분자의 항원-결합 단편이 포함된다. 본원에서 이용되는 용어 항체의 "항원-결합부", 항체의 "항원-결합 단편" 등에는 항원에 특이적으로 결합하여 복합체를 형성하는 천연 생성되는, 효소적으로 수득 가능한, 합성 또는 유전 조작된 폴리펩타이드 또는 당단백질이 포함된다. 항체의 항원-결합 단편은, 예로 임의의 적합한 표준 기법, 예컨대 단백질 분해 소화 또는 항체 가변 및 선택적으로 불변 도메인을 인코딩하는 DNA의 조작 및 발현이 관여되는 재조합 유전 조작 기법을 이용하여 전체 항체 분자로부터 유도될 수 있다. 이러한 DNA는, 예로 상업적 공급원, DNA 라이브러리(예로, 파지-항체 라이브러리 포함)로부터 공지되고/되거나 쉽게 이용 가능하거나, 또는 합성될 수 있다. DNA는 서열분석되고, 화학적으로 또는 분자 생물학 기법을 이용해서, 예를 들어 하나 이상의 가변 및/또는 불변 도메인을 적합한 배치로 배열하거나, 코돈을 도입하거나, 시스테인 잔기를 생성하거나, 아미노산을 개질하거나 부가하거나 결실시키는 등을 위해 조작될 수 있다. 이러한 기법은 또한 전체 항체 분자에서 유도된 항원-결합 단편을 함유하는 임의의 항체-융합 분자를 합성하기 위해 채용될 수 있다.
- [0061] 항원-결합 단편의 비제한적 예에는 하기가 포함된다: (i) Fab 단편; (ii) F(ab')₂ 단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단일쇄 Fv(scFv) 분자; (vi) dAb 단편; 및 (vii) 항체의 고가변 영역을 모사하는 아미노산 잔기로 구성된 최소 인식 단위(예로, 단리된 상보성 결정 영역(CDR), 예컨대 CDR3 펩타이드), 또는 구축된 FR3-CDR3-FR4 펩타이드. 다른 조작 분자, 예컨대 도메인-특이적 항체, 단일 도메인 항체, 도메인-결실된 항체, 키메라성

항체, CDR-그래프트된 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 나노바디(예로 1가 나노바디, 2가 나노바디 등), 소형 모듈형 면역약제(SMIPs), 및 상여 가변 IgNAR 도메인이 또한 본원에서 이용되는 표현 "항원-결합 단편" 내에 포괄된다.

[0062] 항체의 항원-결합 단편은 전형적으로 적어도 하나의 가변 도메인을 포함할 것이다. 가변 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성일 수 있으며, 일반적으로 하나 이상의 프레임워크 서열에 인접하거나 같은 프레임인 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이다. V_L 도메인과 연관되는 V_H 도메인을 갖는 항원-결합 단편에서, V_H 및 V_L 도메인은 임의의 적합한 배열로 서로에 대해 배치될 수 있다. 예를 들어, 가변 영역은 이량체성일 수 있고, V_H - V_H , V_H - V_L 또는 V_L - V_L 이량체를 함유할 수 있다. 대안적으로, 항체의 항원-결합 단편은 단량체성 V_H 또는 V_L 도메인을 함유할 수 있다.

[0063] 특정 구현예에서, 항체의 항원-결합 단편은 적어도 하나의 불변 도메인에 공유 연결된 적어도 하나의 가변 도메인을 함유할 수 있다. 본 발명의 항체의 항원-결합 단편에서 확인될 수 있는 가변 및 불변 도메인의 비제한적, 예시적 배치에는 하기가 포함된다: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 ; 및 (xiv) V_L - C_L . 상기 기재된 임의의 예시적 배치를 포함하는 가변 및 불변 도메인의 임의의 배치에서, 가변 및 불변 도메인은 서로에게 직접 연결될 수도 있고, 또는 전체 또는 부분적 힌지 또는 링커 영역에 의해 연결될 수도 있다. 힌지 영역은 단일 폴리펩타이드 분자에서 인접한 가변 및/또는 불변 도메인 간에 가요성 또는 반-가요성 연결을 생성하는 적어도 2 개(예로, 5, 10, 15, 20, 40, 60 개 이상)의 아미노산으로 구성될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체의 항원-결합 단편은 서로 및/또는 하나 이상의 단량체성 V_H 또는 V_L 도메인과 비-공유 연합으로(예로, 디설파이드 결합(들)에 의해) 상기 기재된 임의의 가변 및 불변 도메인 배치의 동중-이량체 또는 이중-이량체(또는 다른 다량체)를 포함할 수 있다.

[0064] 전체 항체 분자와 마찬가지로, 항원-결합 단편은 단일특이적 또는 다중특이적(예로, 이중특이적)일 수 있다. 항체의 다중특이적 항원-결합 단편은 전형적으로 적어도 2 개의 상이한 가변 도메인을 포함할 것이며, 여기서 각각의 가변 도메인은 별도 항원으로 또는 동일한 항원 상의 상이한 에피토프로 특이적으로 결합할 수 있다. 본원에서 개시된 예시적인 이중특이적 포맷을 포함하는 임의의 다중특이적 항체 포맷은 당분야에서 이용 가능한 일상적 기법을 이용해서 본 발명의 항체의 항원-결합 단편의 맥락에서 이용하기 위해 채택될 수 있다.

[0065] 어구 "항체-융합 단백질"에는 본원에서 기재되는 항체 또는 항원-결합 단편을 함유하도록 조작된 본 발명의 항체에서 유도되는 재조합 폴리펩타이드 및 단백질이 포함된다. 예를 들어, "항체-아펠린 융합 단백질"에는 아펠린 펩타이드 또는 유사체의 아미노산 서열에 융합된 항-APLNR 항체에서 유도되는 아미노산 서열을 포함하는 키메라성 단백질이 포함된다. 아펠린 펩타이드 성분은 펩타이드 링커로 또는 이것이 없이 항체 경쇄 또는 중쇄의 N-말단 또는 C-말단에서 항-APLNR 항체 또는 항원-결합 단편에 융합될 수 있다. 본원에서 이용되는 어구 "에 융합된"은 전형적으로 두 유전자가 하나의 연속적 폴리펩타이드를 인코딩하도록 하나의 유전자를 제2 유전자와 같은 프레임으로 발현 벡터 내에 클로닝함으로써 둘 이상의 서열을 조합하여 제조되는 키메라성 유전자의 발현에 의해 형성되는 폴리펩타이드를 (비제한적으로) 의미한다. 재조합 클로닝 기법, 예컨대 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 및 제한 엔도뉴클레아제 클로닝은 당분야에 널리 공지되어 있다. 재조합 기술에 의해 제조되는 것에 부가하여, 폴리펩타이드의 일부는 화학적 반응, 또는 맞춤형 폴리펩타이드를 제조하기 위해 당분야에 공지된 수단에 의해 서로 "에 융합될" 수 있다.

[0066] 일부 구현예에서, 항체-융합 단백질의 성분 또는 아미노산은 링커(또는 "스페이서") 펩타이드에 의해 분리된다. 이러한 펩타이드 링커(예로, 폴리글리신 또는 Gly-Ser 링커)는 당분야에 널리 공지되어 있고 전형적으로 항체-융합 단백질의 하나 또는 두 성분 모두의 적절한 폴딩을 허용한다. 링커는 융합 단백질 성분의 가요성 접합 영역을 제공하여, 분자의 두 말단에 독립적으로 운동할 수 있도록 하고, 두 모이어티의 적절한 기능을 각각 보유하는데 있어서 중요한 역할을 담당할 수 있다. 따라서, 접합 영역은 일부 경우에 두 부분을 함께 조합하는 링커로서 그리고 두 부분이 각각 그 고유한 생물학적 구조를 형성하고 다른 부분을 방해하지 않도록 하는 스페이서로서 모두 작용한다. 또한, 접합 영역은 대상체의 면역계에서 외래로 인지하지 않을, 다시 말하면 면역원성으로 간주되지 않을 에피토프를 생성해야 한다. 링커 선택은 또한 결합 활성, 이에 따라 융합 단백질의 생체활성에 효과를 가질 수 있다(Huston, et al, 1988, *PNAS*, 85:16:5879-83; Robinson & Bates, 1998, *PNAS* 95(11):5929-34; 및 Arai, et al. 2001, *PEDS*, 14(8):529-32; Chen, X. et al., 2013, *Advanced Drug Delivery Reviews* 65:1357-1369 참고). 하나의 구현예에서, 아펠린 펩타이드는 하나 이상의 펩타이드 링커를 통

해 항체 또는 이들의 항원-결합 단편의 경쇄 또는 중쇄의 C-말단 또는 N-말단으로 연결된다.

[0067] 본 발명의 항체 및 항체-융합 단백질은 보체-의존적 세포독성(CDC) 또는 항체-의존적 세포-매개된 세포독성(ADCC)을 통해 기능할 수 있다. "보체-의존적 세포독성"(CDC)은 보체의 존재 하에 본 발명의 항체에 의한 항원-발현 세포의 용해를 나타낸다. "항체-의존적 세포-매개된 세포독성"(ADCC)은 Fc 수용체(FcRs)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포(예로, 자연 살해(NK) 세포, 호중구 및 대식구)가 표적 세포 상에서 결합된 항체를 인식하고, 이에 따라 표적 세포의 용해로 이어지는 세포-매개된 반응을 나타낸다. CDC 및 ADCC는 당분야에서 널리 공지되고 이용 가능한 분석을 이용해서 측정될 수 있다(예로, U.S. 특허 번호 5,500,362 및 5,821,337, 및 Clynes *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* 95:652-656 참고). 항체 또는 항체-융합 단백질의 불변 영역은 보체를 고정하고 세포-의존적 세포독성을 매개하는 항체의 능력에 있어서 중요하다. 따라서 항체의 이소형은 이것이 항체에 있어서 세포독성을 매개하기 위해 바람직한지의 기준에 따라 선택될 수 있다.

[0068] 또 다른 측면에서, 항체 또는 항체-융합 단백질은 항체의 바람직한 약동학 특성에 영향을 미치지 않고, 정상 Fc 효과기 기능의 전부, 또는 일부를 활성화하거나 활성화하지 않도록 그 Fc 도메인에서 조작될 수 있다. 따라서, 변형된 Fc 수용체 결합을 갖는 조작된 Fc 도메인을 갖는 항체 또는 항체-융합 단백질은 감소된 부작용을 가질 수 있다. 따라서 하나의 구현예에서, 단백질은 키메라성 또는 다르게 개질된 Fc 도메인을 포함한다. 키메라성 Fc 도메인의 하나의 예에 대해서는, 본원에 그 전문이 참조로 도입되는, 2014년 8월 7일에 공개된 PCT 국제 공개 번호 WO/2014/121087 A1을 참고하라.

[0069] 본 발명의 특정 구현예에서, 본 발명의 항-APLNR 항체 및 항체-융합 단백질은 인간 항체이다. 본원에서 이용되는 용어 "인간 항체"는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에서 유도된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하려는 것이다. 본 발명의 인간 항체에는, 예를 들어 CDR 및 특히 CDR3에서, 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 인코딩되지 않는 아미노산 잔기(예로, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이화에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해) 도입되는 돌연변이가 포함될 수 있다. 그러나 본원에서 이용되는 용어 "인간 항체"는 또 다른 포유류 중, 예컨대 마우스의 생식계열에서 유도된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그래프트된 항체를 포함하려는 것이 아니다.

[0070] 본 발명의 항체 및 항체-융합 단백질은, 일부 구현예에서 재조합 인간 항체일 수 있다. 본원에서 이용되는 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조되거나 발현되거나 생성되거나 분리되는 모든 인간 항체 및 이들의 융합 단백질, 예컨대 숙주 세포 내로 전달감염되는 재조합 발현 벡터를 이용해서 발현되는 항체(아래에서 추가로 기재됨), 재조합, 조합 인간 항체 라이브러리로부터 분리되는 항체(아래에서 추가로 기재됨), 인간 면역글로불린 유전자에 대해 트랜스제닉인 동물(예로, 마우스)로부터 분리되는 항체(예로, Taylor *et al.*, 1992, *Nucl. Acids Res.* 20:6287-6295 참고), 또는 다른 DNA 서열에 대한 인간 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱이 관여되는 임의의 다른 수단에 의해 제조되거나 발현되거나 생성되거나 분리되는 항체를 포함하려는 것이다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에서 유도되는 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나 특정 구현예에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관내 돌연변이화(또는 인간 Ig 서열에 대한 트랜스제닉 동물이 이용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이화)를 거치며, 이에 따라 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은 인간 생식계열 V_H 및 V_L 서열에서 유도되거나 이에 관련되지만, 생체내 인간 항체 생식계열 레퍼토리 내에 천연 존재할 수 없는 서열이다.

[0071] 인간 항체는 힌지 이중성과 연관되는 두 형태로 존재할 수 있다. 하나의 형태에서, 면역글로불린 분자는 이량체가 사슬간 중쇄 디설파이드 결합에 의해 함께 보유되는 대략 150-160 kDa의 안정한 4 개 사슬 구조물을 포함한다. 제2 형태에서, 이량체는 사슬간 디설파이드 결합에 의해 연결되지 않으며, 약 75-80 kDa의 분자가 공유 커플링된 경쇄 및 중쇄로 이루어져 형성된다(반-항체). 이들 형태는 친화도 정제 후에도 분리하기가 극히 어려웠다.

[0072] 다양한 온전한 IgG 이소형에서 제2 형태의 출현 빈도는 비제한적으로는 항체의 힌지 영역 이소형과 연관되는 구조적 차이에 기인한다. 인간 IgG4 힌지의 힌지 영역에서의 단일 아미노산 치환은 제2 형태의 출현을 전형적으로 인간 IgG1 힌지를 이용해서 관찰되는 수준으로 유의미하게 감소시킬 수 있다(Angal *et al.*, 1993, *Molecular Immunology* 30:105). 본 발명은, 예를 들어 생산 시 원하는 항체 형태의 수율을 개선하기 위해 바람직할 수 있는 힌지, C_H2 또는 C_H3 영역에서 하나 이상의 돌연변이를 갖는 항체를 포괄한다.

[0073] 본 발명의 항체 및 항체-융합 단백질은 분리된 항체일 수 있다. 본원에서 이용되는 "분리된 항체"는 그 천연 환경의 적어도 하나의 성분으로부터 확인되고 분리되고/되거나 회수된 항체를 의미한다. 예를 들어, 항체가 천연

존재하거나 천연 생성되는 유기체의 적어도 하나의 성분으로부터 또는 조직 또는 세포로부터 분리되거나 제거된 항체가 본 발명의 목적을 위해 "단리된 항체"이다. 단리된 항체에는 또한 재조합 세포 내에서의 원위치 항체가 포함된다. 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 또는 단리 단계를 거친 항체이다. 특정 구현예에 따르면, 단리된 항체에는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다.

[0074] 본 발명에는 중화 및/또는 차단 항-APLNR 항체 및 항체-융합 단백질이 포함된다. 본원에서 이용되는 "중화" 또는 "차단" 항체는 APLNR에 대한 그 결합이 하기와 같은 항체를 나타내려는 것이다: (i) APLNR 또는 APLNR 단편 및 APLNR 수용체 성분(예로, 아펠린 펩타이드 등) 간의 상호작용을 방해하고; 및/또는 (ii) APLNR의 적어도 하나의 생물학적 기능의 억제를 일으킨다. APLNR 중화 또는 차단 항체에 의해 유도되는 억제는 이것이 적절한 분석을 이용해서 검출 가능한 한 완전할 필요는 없다.

[0075] 본원에서 이용되는 용어 "길항제"는 작용제(예를 들어 내인성 리간드)로서 동일한 부위 또는 동일한 부위 근처에서 수용체에 결합하지만, 전형적으로 수용체의 활성 형태에 의해 개시되는 세포내 반응을 활성화하지 않고, 이에 의해 작용제 또는 부분 작용제에 의한 세포내 반응을 억제하거나 중화시키는 모이머티를 나타낸다. 일부 경우에서, 길항제는 작용제 또는 부분 작용제의 부재 하에 기준선 세포내 반응을 감소시키지 않는다. 길항제가 반드시 경쟁적 결합 억제제로서 기능할 필요는 없지만, 작용제를 격리시키거나 하류 효과를 간접적으로 조정함으로써 작용할 수 있다.

[0076] 본 발명에는 APLNR을 활성화하지만 APLNR의 완전 작용제, 예컨대 아펠린 펩타이드에 의해 나타나는 활성화보다는 적은 정도로 활성화하는 항-APLNR 항체 및 항체-융합 단백질이 포함된다. 예를 들어, 본원에서 이용되는 이러한 "활성화" 항체는 APLNR에 대한 그 결합이 하기와 같은 항체를 나타내려는 것이다: (i) APLNR 또는 APLNR 단편 및 APLNR 리간드(예로, 아펠린 펩타이드 등) 간 상호작용을 증강시키고; 및/또는 (ii) APLNR의 적어도 하나의 생물학적 기능의 활성화를 일으킨다. 항-APLNR 항체에 의해 유도되는 활성화는 이것이 적절한 분석을 이용해서 검출 가능한 한 완전할 필요는 없다. 상기 목적을 위해, 활성화 항체는 APLNR의 부분 또는 역 작용제로서 기능할 수 있다.

[0077] 본원에서 이용되는 용어 "작용제"는, 예컨대 그 내인성 리간드에 결합되는 경우, 수용체와 상호작용하고(직접적으로 또는 간접적으로 결합하고) 이를 활성화하고, 그 수용체의 생리적 또는 약리적 반응 특징을 개시하는 모이머티를 나타낸다. 예를 들어, APLNR에 대한 결합 시, 아펠린은 수용체를 활성화하여 수용체를 내재화한다. 또한, APLNR-아펠린 결합은 APLNR을 활성화하여 아데닐릴 사이클라제 활성을 감소시키고 이에 따라 세포 내 cAMP 축적을 억제한다.

[0078] 본원에서 이용되는 용어 "EC₅₀" 또는 "EC50"은 절반 최대 유효 농도를 나타내며, 여기에는 반응, 예를 들어 세포 반응을 기준선 및 특정된 노출 시간 후 최대치 사이의 절반으로 유도하는 리간드의 농도가 포함된다. EC₅₀은 본질적으로 그 최대 효과의 50%가 관찰되는 리간드의 농도를 나타낸다. 따라서 세포성 신호전달에 대해 증가된 수용체 활성은 감소된 EC₅₀ 값, 즉 절반 최대 유효 농도 값(더 큰 반응을 일으키기 위해 더 적은 리간드가 필요함)으로 관찰된다.

[0079] 본원에서 이용되는 용어 "IC₅₀" 또는 "IC50"은 세포 반응의 절반 최대 억제 농도를 나타낸다. 다시 말하면, 생물학적 또는 생화학적 수용체 기능의 억제에서 특정 모이머티(예로 단백질, 화합물 또는 분자)의 유효성 척도이며, 여기서 분석은 주어진 생물학적 공정을 억제하기 위해 필요한 상기 모이머티의 양을 정량한다. 따라서 세포성 신호전달에 대해, 더 큰 억제 활성은 감소된 IC₅₀ 값으로 관찰된다.

[0080] APLNR 활성화 및 억제를 검출하기 위한 예시적인 분석이 본원에서 작용 실시예에 기재된다.

[0081] 본원에 개시된 항-APLNR 항체 및 항체-융합 단백질은 항체가 유도된 대응하는 생식계열 서열에 비해 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 프레임워크 및/또는 CDR 영역에 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는, 예를 들어 공개 항체 서열 데이터베이스에서 이용 가능한 생식계열 서열과 본원에 개시된 아미노산 서열을 비교하여 쉽게 확인될 수 있다. 본 발명에는 본원에 개시된 임의의 아미노산 서열에서 유도되는 항체 및 이들의 항원-결합 단편이 포함되며, 여기서 하나 이상의 프레임워크 및/또는 CDR 영역 내의 하나 이상의 아미노산은 항체가 유도된 생식계열 서열의 대응하는 잔기(들) 또는 또 다른 인간 생식계열 서열의 대응하는 잔기(들) 또는 대응하는 잔기(들)의 보존적 아미노산 치환으로 돌연변이된다(이러한 서열 변화는 본원에서 "생식계열 돌연변이"로 총칭됨). 당업자는 본원에 개시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열로부터 시작하여 하나 이상의 개별 생식계열 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하는 수많은 항체 및 항원-결합 단편을 쉽게 생산할

수 있다. 특정 구현예에서, V_H 및/또는 V_L 도메인 내의 모든 프레임워크 및/또는 CDR 잔기는 항체가 유도된 원래 생식계열 서열에서 확인되는 잔기로 다시 돌연변이된다. 다른 구현예에서, 특정 잔기만, 예로 FR1의 첫 번째 8 개 아미노산 내에서 또는 FR4의 마지막 8 개 아미노산 내에서 발견되는 돌연변이된 잔기만, 또는 CDR1, CDR2 또는 CDR3 내에서 발견되는 돌연변이된 잔기만 원래 생식계열 서열로 돌연변이된다. 다른 구현예에서, 하나 이상의 프레임워크 및/또는 CDR 잔기(들)는 상이한 생식계열 서열(즉, 항체가 원래 유도된 생식계열 서열과 상이한 생식계열 서열)의 대응하는 잔기(들)로 돌연변이된다. 또한, 본 발명의 항체 및 항체-융합 단백질은 프레임워크 및/또는 CDR 영역 내에 2 개 이상의 생식계열 돌연변이의 임의 조합을 함유할 수 있으며, 예로 특정한 개별 잔기는 특정 생식계열 서열의 대응하는 잔기로 돌연변이되는 반면, 원래의 생식계열 서열과 상이한 특정한 다른 잔기는 유지되거나 상이한 생식계열 서열의 대응하는 잔기로 돌연변이된다. 일단 수득되면, 하나 이상의 생식계열 돌연변이를 함유하는 항체, 및 항체-융합 단백질 및 항원-결합 단편은 하나 이상의 원하는 특성, 예컨대 개선된 결합 특이성, 증가된 결합 친화도, 증가되거나 강화된 길항성 또는 작용성 생물학적 특성(가능한 경우), 감소된 면역원성 등에 대해 쉽게 시험될 수 있다. 상기 일반적 방식으로 수득되는 항체, 및 항체-융합 단백질 및 항원-결합 단편이 본 발명 내에 포괄된다.

[0082] 본 발명에는 또한 하나 이상의 보존적 치환을 갖는, 본원에 개시된 임의의 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열의 변이체를 포함하는 항-APLNR 항체 및 항체-융합 단백질이 포함된다. 예를 들어, 본 발명에는, 예로 본원에 개시된 임의의 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열에 대해 10 개 이하, 8 개 이하, 6 개 이하, 4 개 이하 등의 보존적 아미노산 치환을 갖는 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 아미노산 서열을 갖는 항-APLNR 항체가 포함된다.

[0083] 용어 "에피토프"는 파라토프로 공지된 항체 분자의 가변 영역에서 특정한 항원 결합 부위와 상호작용하는 항원성 결정기를 나타낸다. 단일 항원은 하나를 초과하는 에피토프를 가질 수 있다. 따라서, 상이한 항체가 항원 상의 상이한 영역에 결합할 수 있고, 상이한 생물학적 효과를 가질 수 있다. 에피토프는 입체형태이거나 선형일 수 있다. 입체형태 에피토프는 선형 폴리펩타이드 사슬의 상이한 절편으로부터의 공간적으로 인접한 아미노산에 의해 생성된다. 선형 에피토프는 폴리펩타이드 사슬에서 인접한 아미노산 잔기에 의해 생성되는 것이다. 특정한 상황에서, 에피토프에는 항원 상의 당류, 포스포릴기 또는 설포닐기 모이어티가 포함될 수 있다.

[0084] 핵산 또는 이들의 단편을 나타내는 경우, 용어 "실질적 동일성" 또는 "실질적으로 동일한"은 적절한 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실을 포함하여 또 다른 핵산(또는 그 상보성 가닥)과 최적으로 정렬되는 경우, 서열 동일성의 임의의 널리 공지된 알고리즘, 예컨대 아래에서 논의되는 FASTA, BLAST 또는 Gap에 의해 측정되는 뉴클레오타이드 염기의 적어도 약 95%, 보다 바람직하게는 적어도 약 96%, 97%, 98% 또는 99%에서 뉴클레오타이드 서열 동일성이 존재함을 시사한다. 참조 핵산 분자에 대해 실질적 동일성을 갖는 핵산 분자는, 특정한 경우 참조 핵산 분자에 의해 인코딩되는 폴리펩타이드와 동일하거나 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 인코딩할 수 있다.

[0085] 폴리펩타이드에 대해 적용되는 용어 "실질적 유사성" 또는 "실질적으로 유사한"은 2 개의 펩타이드 서열이, 예컨대 기본 값 가중치를 이용해서 프로그램 GAP 또는 BESTFIT에 의해 최적으로 정렬되는 경우, 적어도 95% 서열 동일성, 보다 바람직하게는 적어도 98% 또는 99% 서열 동일성을 공유함을 의미한다. 바람직하게는, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 의해 상이하다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성(예로 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄(R 기)를 갖는 또 다른 아미노산 잔기에 의해 치환되는 것이다. 일반적으로, 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 특성을 실질적으로 변화시키지 않을 것이다. 2 개 이상의 아미노산 서열이 보존적 치환에 의해 서로 상이한 경우, 서열 동일성 백분율 또는 유사성 정도는 치환의 보존적 성질을 교정하기 위해 상향 조정될 수 있다. 상기 조정을 수행하기 위한 수단은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 예로, 본원에 참조로 도입되는 [Pearson, 1994, *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331]을 참고하라. 유사한 화학적 특성을 갖는 측쇄를 가지는 아미노산 그룹의 예에는 하기가 포함된다: (1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신; (2) 지방족-하이드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; (3) 아미드-함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; (4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판; (5) 염기성 측쇄: 라이신, 아르기닌 및 히스티딘; (6) 산성 측쇄: 아스파르테이트 및 글루타메이트, 및 (7) 황 함유 측쇄는 시스테인 및 메티오닌이다. 바람직한 보존적 아미노산 치환 그룹은 하기와 같다: 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 라이신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루타메이트-아스파르테이트, 및 아스파라긴-글루타민. 대안적으로, 보존적 대체는 본원에 참조로 도입되는 [Gonnet et al., 1992, *Science* 256: 1443-1445]에 개시된 PAM250 log-유사성 매트릭스에서 양의 값을 갖는 임의의 변화이다. "온건한 보존적" 대체는 PAM250 log-유사성 매트릭스에서 음이 아닌 값을 갖는 임의의 변화이다.

- [0086] 서열 동일성으로도 불리는 폴리펩타이드에 대한 서열 유사성은 전형적으로 서열 분석 소프트웨어를 이용해서 측정된다. 단백질 분석 소프트웨어는 보존적 아미노산 치환을 포함하는 다양한 치환, 결실 및 다른 개질에 대해 지정된 유사성 척도를 이용해서 유사한 서열을 매치한다. 예를 들어, GCG 소프트웨어는 가깝게 관련된 폴리펩타이드, 예컨대 상이한 유기체 중으로부터의 상동성 폴리펩타이드 간 또는 야생형 단백질 및 이들의 뮤테인 간 서열 상동성 또는 서열 동일성을 결정하기 위해 기본 파라미터와 함께 이용될 수 있는 프로그램, 예컨대 Gap 및 Bestfit을 함유한다. 예로, GCG Version 6.1을 참고하라. 폴리펩타이드 서열은 또한 GCG Version 6.1 내의 프로그램을 기본 또는 권장 파라미터를 이용해서 FASTA를 이용해서 비교될 수 있다. FASTA(예로, FASTA2 및 FASTA3)는 쿼리 및 검색 서열 간 최적 중첩 영역의 정렬 및 서열 동일성 백분율을 제공한다(Pearson, 1994, 상기 문헌). 본 발명의 서열을 상이한 유기체로부터의 다수 서열을 함유하는 데이터베이스와 비교하는 경우 바람직한 또 다른 알고리즘은 컴퓨터 프로그램 BLAST, 특히 기본 파라미터를 이용하는 BLASTP 또는 TBLASTN이다. 예로, 각각 본원에 참조로 도입되는 [Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 및 Altschul et al., 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402]를 참고하라.
- [0087] **APLNR 조절물질의 생물학적 특징**
- [0088] 본 발명에는 인간 APLNR에 결합하고 APLNR-매개된 신호전달을 억제하거나 약화시키는 항-APLNR 항체 및 이들의 항원-결합 단편이 포함된다. 항-APLNR 항체는, 예로 항체가 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특성을 나타내는 경우, "APLNR-매개된 신호전달을 억제하거나 약화시키는" 것으로 간주된다: (1) 세포 기반 생체 분석에서 APLNR-매개된 신호전달의 억제, 예컨대 cAMP의 증가된 축적; (2) ERK의 APLNR-유도된 인산화의 억제; 및 (3) 내재화 차단을 포함하는, APLNR-매개된 β -어레스틴 상호작용의 억제.
- [0089] 본 발명에는 인간 APLNR에 결합하고 APLNR-매개된 신호전달을 활성화하는 항체-융합 단백질이 포함된다. 항체-융합 단백질은, 예로 항체가 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특성을 나타내는 경우, "APLNR-매개된 신호전달을 활성화하는" 것으로 간주된다: (1) 세포 기반 생체분석에서 APLNR-매개된 신호전달의 활성화 또는 검출, 예컨대 cAMP의 억제; (2) ERK의 APLNR-유도된 인산화의 활성화; 및 (3) 내재화를 포함하는, APLNR-매개된 β -어레스틴 상호작용의 활성화.
- [0090] 세포-기반 생체분석에서 APLNR-매개된 신호전달의 억제 또는 활성화는 항-APLNR 항체, 항체 융합 단백질 또는 이들의 항원-결합 단편이 APLNR 수용체 및 APLNR 결합에 반응하여, 예로 본원에 기재된 분석 포맷 또는 APLNR 세포성 신호전달을 측정하기 위한 실질적으로 유사한 분석을 이용하여 검출 가능한 신호를 생성하는 리포터 요소를 발현하는 세포에서 생성되는 신호를 개질함을 의미한다. APLNR은 G 단백질-커플링된 수용체, 구체적으로 Gi/o-커플링된 수용체인 반면, 수용체의 자극은 다시 고리형 AMP(cAMP) 또는 다른 세포 신호전달 이벤트의 축적에 효과를 미치는 아데닐레이트 사이클라제 활성의 억제를 야기한다.
- [0091] 예를 들어, 본 발명에는, 예로 본원에서 실시예 5, 8, 9 또는 11에서 정의되는 분석 포맷, 또는 실질적으로 유사한 분석을 이용해서 세포-기반 차단 또는 억제 생체분석에서 측정되는 약 20 nM 미만, 약 10 nM 미만, 약 2 nM 미만, 약 1 nM 미만, 약 900 pM 미만, 약 800 pM 미만, 약 700 pM 미만, 약 600 pM 미만, 약 500 pM 미만, 약 400 pM 미만, 약 350 pM 미만, 약 300 pM 미만, 약 250 pM 미만, 약 200 pM 미만, 약 150 pM 미만, 약 100 pM 미만, 약 90 pM 미만, 약 80 pM 미만, 약 70 pM 미만, 약 60 pM 미만, 약 50 pM 미만, 약 40 pM 미만, 약 30 pM 미만, 약 20 pM, 또는 약 10 pM 미만의 IC₅₀으로, 인간 APLNR을 발현하는 세포에서 아펠린-매개된 신호전달을 차단하거나 억제하는 이들의 APLNR 조절물질이 포함된다.
- [0092] 전달감염된 세포에서 APLNR-유도된 인산화된 ERK1/2(pERK 분석)의 억제는 APLNR 조절물질이 인간 아펠린의 존재 하에 인간 APLNR을 발현하는 세포, 예로 실시예 6 또는 10의 분석 시스템 또는 실질적으로 유사한 분석을 이용해서 측정되는 pERK1/2 대 총 ERK의 비를 억제하거나 감소시킴을 의미한다. 예를 들어, 본 발명에는, 예로 본원에서 실시예 6 또는 10에서 정의되는 분석 포맷, 또는 실질적으로 유사한 분석을 이용해서 APLNR-유도된 pERK 분석에서 측정되는 약 50 nM 미만, 약 25 nM 미만, 약 20 nM 미만, 약 15 nM 미만, 약 10 nM 미만, 약 5 nM 미만, 약 1 nM 미만, 약 900 pM 미만, 약 800 pM 미만, 약 700 pM 미만, 약 600 pM 미만, 약 500 pM 미만, 약 400 pM 또는 약 300 pM 미만의 IC₅₀으로, 아펠린의 존재 하에 pERK의 APLNR-매개된 비를 억제하는 APLNR 조절물질이 포함된다.
- [0093] 그러나 다른 구현예에서, 본 발명의 특정 APLNR 조절물질은 APLNR-매개된 신호전달을 억제하거나 약화시키는 능력을 갖는 것에도 불구하고, APLNR 및 아펠린의 상호작용을 차단하지 않거나 부분적으로만 차단한다. 이러한 항체, 항체-융합 단백질 및 이들의 항원-결합 단편은 "간접적 차단제"로 본원에서 불릴 수 있다. 이론에 구애받지

않고, 본 발명의 간접적 차단제는 APLNR의 N-말단 리간드 결합 도메인과 중첩되거나 부분적으로만 중첩되는 에피토프에서 APLNR에 대한 결합에 의해 기능하지만, 그럼에도 불구하고 APLNR/아펠린 상호작용을 직접적으로 차단하지 않고 APLNR-매개된 신호전달을 방해하는 것으로 여겨진다.

[0094] 본 발명의 또 다른 구현예에서, APLNR 조절물질은 부분 작용제 또는 역 작용제이다. 완전 작용제는 최대 범위로 수용체를 활성화한다. 완전 작용제보다 낮은 효과를 갖는 화합물은 이들이 신호 전달을 자극하지만 완전 작용제보다 적은 정도로 자극하므로, 부분 작용제로 불린다. 역 작용제는 수용체에 대한 결합 시 측정 가능한 또는 검출 가능한 신호의 기준 수준을 감소시켜서, 내인성 활성화의 방해 또는 차단을 시사한다. 다시 말하면, 일부 역 작용제는 이들의 항상적 활성을 억제함으로써 특정 수용체의 활성을 감소시킨다.

[0095] 특정 구현예에서, 본 발명에는 본원에서 실시예 5, 8, 9 또는 11에서 정의되는 분석 포맷, 또는 실질적으로 유사한 분석을 이용해서, 세포-기반 APLNR 활성화 생체분석에서 측정되는 약 100 nM 미만, 약 75 nM 미만, 약 50 nM 미만, 약 25 nM 미만, 약 10 nM 미만, 약 1 nM 미만, 약 900 pM 미만, 약 800 pM 미만, 약 700 pM 미만, 약 600 pM 미만, 약 500 pM 미만, 약 400 pM 미만, 약 350 pM 미만, 약 300 pM 미만, 약 250 pM 미만, 약 200 pM 미만, 약 150 pM 미만, 약 100 pM 미만, 약 90 pM 미만, 약 80 pM 미만, 약 70 pM 미만, 약 60 pM 미만, 약 50 pM 미만, 약 40 pM 미만, 약 30 pM 미만, 약 20 pM, 또는 약 10 pM 미만의 EC50으로 인간 APLNR을 발현하는 세포에서 신호전달을 활성화하거나 증가시키는 이들의 APLNR 조절물질이 포함된다.

[0096] 전달감염된 세포에서 APLNR-매개된 인산화된 ERK1/2(pERK)의 활성화는 APLNR 조절물질이 인간 APLNR을 발현하는 세포에서, 예로 실시예 6 또는 10의 분석 시스템 또는 실질적으로 유사한 분석을 이용해서 측정되는 pERK1/2 대 총 ERK의 비를 증가시킴을 의미한다. 예를 들어, 본 발명에는, 예로 본원에서 실시예 6 또는 10에서 정의되는 분석 포맷, 또는 실질적으로 유사한 분석을 이용해서 APLNR-유도된 pERK 분석에서 측정되는 약 100 nM 미만, 약 75 nM 미만, 약 50 nM 미만, 약 25 nM 미만, 약 20 nM 미만, 약 15 nM 미만, 약 10 nM 미만, 약 5 nM 미만, 약 1 nM 미만, 약 900 pM 미만, 약 800 pM 미만, 약 700 pM 미만, 약 600 pM 미만, 약 500 pM 미만, 약 400 pM 또는 약 300 pM 미만의 EC50으로, 아펠린의 존재 하에 pERK의 APLNR-매개된 비를 증가시키는 APLNR 조절물질이 포함된다.

[0097] 본 발명에는 높은 친화도 및/또는 특이성을 갖는 가용성 APLNR 분자에 결합하는 APLNR 조절물질이 포함된다. 예를 들어, 본 발명에는, 예로 본원에서 실시예 4에서 정의되는 분석 포맷을 이용해서 형광 활성화 세포 정렬(FACS) 분석에 의해 측정되는 약 20 초과의 결합비로 APLNR에 결합하는 항체 및 항체의 항원-결합 단편이 포함된다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편은, 예로 FACS, 또는 실질적으로 유사한 분석에 의해 측정되는 15 초과, 약 20 초과, 약 100 초과, 약 200 초과, 약 300 초과, 약 400 초과, 약 500 초과, 약 1000 초과, 약 1500 초과, 또는 약 2000 초과의 결합 비로 APLNR에 결합한다.

[0098] 본 발명에는 또한, 예로 널리 공지된 BIAcore™ 분석 포맷, 또는 실질적으로 유사한 분석을 이용해서 25°C 또는 37°C에서 표면 플라즈몬 공명에 의해 측정되는 약 10 분 초과의 해리 반감기($t_{1/2}$)로 APLNR에 특이적으로 결합하는 항-APLNR 항체 및 이들의 항원-결합 단편이 포함된다.

[0099] 본 발명의 항체는 하나 이상의 상기 언급된 생물학적 특징, 또는 이들의 임의 조합을 보유할 수 있다. 본 발명의 항체의 다른 생물학적 특징은 본원에서의 작용 실시예를 포함하는 본 개시의 검토로부터 당업자에게 명확할 것이다.

[0100] 수용체 분석

[0101] Gi/o-커플링된 수용체, 예컨대 APLNR의 세포 신호전달 경로는 다양한 생체분석에 의해 측정될 수 있다. ERK 1/2의 인산화는 Gi/o-커플링된 GPCR 활성화의 직접적인 생리적 기능 관독을 제공한다. Gi/o-커플링된 GPCR 활성화를 시험하기 위한 일반적인 방법은 세포에서 축적되는 폴스콜린-자극 cAMP 수준 감소의 측정을 필요로 하는 아데닐레이트 사이클라제 활성의 억제이다.

[0102] Gi/o-커플링된 수용체의 활성화는 감소된 아데닐릴 사이클라제 활성, 이에 따라 G 알파 서브유닛 Gi 또는 Go를 통한 세포에서의 cAMP 억제로 이어진다. 억제 신호를 최대화하기 위해, 폴스콜린(아데닐레이트 사이클라제의 직접적 활성화제)이 전형적으로 분석에서 아데닐릴 사이클라제, 이에 따라 cAMP를 자극하기 위해 이용됨으로써 억제 신호를 더 쉽게 검출 가능하게 만든다. 세포내 cAMP의 축적을 측정하기 위해, 방사선측정 GE Healthcare SPA™(Piscataway, NJ, USA) 및 Perkin Elmer Flash-Plate™ cAMP 분석뿐만 아니라 형광 또는 발광-기반 동중성 분석(예로 PerkinElmer AlphaScreen™, DiscoverX HitHunter™(Fremont, CA, USA), 및 Molecular Devices

FLIPR®(Sunnyvale, CA, USA))이 이용 가능하다.

- [0103] Gi/o이 대부분의 세포에서 가장 풍부한 G 단백질이며 다른 G 단백질에 비해 더 빠른 GDP-GTP 교환 속도를 가지므로, [³⁵S]GTPγS 분석은 Gi/o-커플링된 수용체에 대해 일반적으로 유용하다(Milligan G., 2003, *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24:87-90). APLNR-매개된 구아닌 뉴클레오타이드 교환은 APLNR을 발현하는 세포로부터 제조되는 원형질막에 대한 [³⁵S]GTPγS 결합을 측정하여 모니터링된다. 시판되는 신틸레이션 인접 분석(SPA™) 키트는 원하는 [³⁵S]GTPγS-결합된 α 서브유닛의 측정을 허용한다(PerkinElmer, Waltham, MA, USA).
- [0104] APLNR과 같이 cAMP 수준을 조정하는 GPCR의 작용은 cAMP 반응 요소(CRE)에 의해 세포 내 루시퍼라제 전사에 연결될 수 있다. CRE-luc 구축물(CRE-반응성 루시퍼라제)은 프로모터 및 CRE 전사 반응 요소(TRE)의 일련 반복의 조절 하에 루시퍼라제 리포터 유전자를 인코딩한다. 수용체의 활성화 후, 세포내 cAMP 축적은 화학발광 검출 시약의 첨가 후 세포에서 발현되는 루시퍼라제의 양에 의해 측정된다. APLNR, 및 다른 Gi-커플링된 수용체에 있어서, 폴스콜린이 cAMP를 유도하기 위해 첨가되며, CRE 활성(화학발광) 감소는 GPCR 활성화를 시사한다. 다양한 상업적 키트가, 예컨대 Promega(Madison, WI, USA), SABiosciences(A Qiagen Company, Valencia, CA, USA) 등에서 이용 가능하다.
- [0105] 인산화된 ERK(pERK)가 APLNR 활성화를 결정하기 위해 APLNR 수용체를 발현하는 세포로부터 세포 용해액 중에 측정될 수 있다. 내인성 세포의 신호-조절된 키나제 1 및 2(ERK1 및 ERK2)는 세린/트레오닌 단백질 키나제의 보존된 패밀리에 속하며, 다양한 자극과 연관된 세포성 신호전달 이벤트에 관여된다. ERK 단백질의 키나제 활성화는 ERK1에서는 트레오닌 202/티로신 204에서 그리고 ERK2에서는 트레오닌 185/티로신 187에서 이중 인산화에 의해 조절된다. MEK1 및 MEK2는 상기 경로에서 ERK 1/2에 관여되는 주요 상위 키나제이다. 다른 키나제 및 전사 인자를 포함하는 ERK 1/2의 여러 하류 표적이 확인되었다. 하나의 예에서, pERK 1/2 분석은 재조합 또는 내인성 수용체를 발현하는 세포 배양의 세포성 용해액 중 ERK1의 특이적 인산화를 측정하기 위해 효소-연관된 면역흡착 분석(ELISA) 방법을 이용한다. 다른 예에서, pERK 1/2 분석은 ERK1에서 인산화된 Thr202/Tyr204 또는 ERK2에서 phospho-Thr185/Tyr187을 인식하는 1차(접합되지 않은) 항체 및 일차 항체를 인식하는 2차 접합 항체를 이용하는 반면, 2차 접합 mAb가 검출 방법을 제공한다, 예컨대 콘주게이트가 외인성으로 첨가된 기질과 반응한다. 다양한 시판 키트, 예컨대 AlphaScreen® SureFire™(PerkinElmer), ThermoScientific(Waltham, MA, USA), Sigma Aldrich(St. Louis, MO, USA) 등이 이용 가능하다.
- [0106] 일부 경우에서, 수용체에 대한 작용제 결합은 G 단백질-매개된 신호전달을 유발하거나 G 단백질-매개된 신호전달을 늦추지 않고 어레스틴-매개된 신호전달을 개시할 수 있다. 세포 표면에서 GPCR과 베타-어레스틴(β-어레스틴)의 상호작용은 수용체에 대해 이중이량체성 G 단백질의 커플링을 해제하고 다른 세포 신호전달 캐스케이드로 이어질 수 있다. β-어레스틴은 세포내이입 및 ERK 경로의 활성화를 유발하는 것으로 알려져 있다. 하나의 예시적 분석에서, 생체발광 공명 에너지 전달 또는 BRET이 Renilla 루시퍼라제(Rlu)에 융합된 GPCR과 녹색 형광 단백질(GFP)에 융합된 β-어레스틴의 상호작용을 연구하기 위해 이용되었다. 상기 예에서, BRET은 이들이 루시퍼라제 기질 코엘렌트크라진의 첨가 후 가깝게 인접한 경우 재조합 발현된 GPCR-Rlu 및 β-어레스틴-GFP 간 에너지 전달에 기반하며, 이에 따라 전체 세포에서 이들 단백질-단백질 상호작용의 실시간 평가의 측정을 허용한다.
- [0107] 다른 분석, 예컨대 활성화된 GPCR과 β-어레스틴의 상호작용을 검출하여 GPCR 활성을 직접 측정하는 PathHunter® GPCR 분석(DiscoverX Corp., Fremont, CA, USA)이 개발되었다. 간략하게, GPCR은 소형 효소 단편 ProLink™와 같은 프레임으로 융합되고 β-어레스틴 및 β-갈락토시다제의 결실 변이체(즉, β-gal, 효소 수용체 또는 EA)의 융합 단백질을 안정적으로 발현하는 세포에서 공-발현된다. GPCR의 활성화는 ProLink-태그화된 GPCR에 대한 β-어레스틴의 결합을 자극하며, 두 효소 단편의 보완은 활성 β-gal 효소의 형성으로 이어진다. 효소 활성(즉, GPCR 활성화) 증가는 화학발광 검출 시약을 이용하여 측정될 수 있다.
- [0108] β-어레스틴 분자는 GPCR, 예컨대 APLNR의 활성화 후 GPCR 내재화(즉, 세포내이입)를 조절하는 것으로 나타났다. GPCR의 작용제-활성화는 입체형태 변화, 수용체의 인산화 및 β-어레스틴의 활성화 또는 다른 경로로 이어져서 세포 표면으로부터 수용체 격리를 매개한다. 격리 기전은 탈감작(즉, 수용체가 내재화 후 분해됨) 또는 재감작(즉, 수용체가 세포 표면으로 다시 재생됨)에 의할 수 있다. 검토를 위해, 예로 [Claing, A., et al. 2002, *Progress in Neurobiology* 66: 61-79]를 참고하라.
- [0109] APLNR 길항제는 수용체의 내재화를 차단할 수 있다. APLNR 작용제는 APLNR의 내재화 및/또는 재감작을 유도할 수 있다(Lee, DK, et al. 2010, *BBRC*, 395:185-189). 일부 구현예에서, APLNR 작용제는 내재화 분석에 의해 측정되는 증가된 APLNR 재감작을 나타내거나 유도한다. 다른 구현예에서, APLNR 작용제는 내재화 분석에서 측정되

는 APLNR의 증가된 세포-표면 수용체 카피를 나타내거나 유도한다. 임의의 내재화 분석에서의 수용체 내재화 정도(예컨대 증가)의 측정은 내재화되지 않은 측정(즉, 작용제에 대한 사전 노출이 없는 세포) 및 분석에서 작용제로 수득되는 측정 간 차이를 결정함으로써 수행된다.

[0110] 아펠린 수용체 격리 및 이에 따른 아펠린 수용체 카피는 당분야에 널리 공지된 여러 방법에 의해 측정될 수 있다. APLNR 작용제 자극은 특정 세포의 표면 상에서 증가되거나 감소된 수용체 카피로 이어질 수 있다. 예를 들어, 아펠린 수용체 작용제는 APLNR 내재화를 유도하여 혈압 효과를 가질 수 있다. 수용체 내재화 분석은, 예를 들어 형광-표지되거나 방사선 표지된 리간드, 또는 면역형광 표지(형광-태그화된 항-수용체 항체)에 이어 현미경 관찰 및 디지털 조영 기법을 채용하여 일상적으로 수행된다(예로, El Messari et al. 2004, *J Neurochem*, 90:1290-1301; Evans, N., 2004, *Methods of Measuring Internalization of G Protein-Coupled Receptors. Current Protocols in Pharmacology*. 24: 12.6.1-12.6.22 참고).

[0111] 아펠린 펩타이드

[0112] 아펠린은 절단되어 몇몇 더 짧은 생물학적 활성 단편, 또는 아펠린 펩타이드를 산출하는 77 개 아미노산의 프리프로펩타이드로 생성된다. 본원에서 기재되는 항-APLNR 항체는 APLNR에 대한 아펠린 펩타이드의 결합을 차단하거나 방해할 수 있다. 아펠린 펩타이드를 포함하는 항체-융합 단백질은 APLNR을 활성화하거나 APLNR 활성을 증강시킬 수 있다. 임의의 아펠린 펩타이드는 프리프로아펠린 폴리펩타이드(서열 목록 번호 227)로부터 유도될 수 있고, 본 발명의 항-APLNR 항체로 융합될 수 있다. 아펠린 펩타이드에는 C-말단 결실을 갖는 아펠린 펩타이드의 단편이 포함되며, 그 일부는 이들의 세포 활성을 보유하는 것으로 나타났다(Messari et al. 2004, *J Neurochem*, 90:1290-1301). 아펠린 펩타이드에는 또한 아펠린에 대한 내인성 활성에 비해 변형된 활성을 부여하는 본원에서 기재된 치환되고/되거나 개질된 아미노산이 포함된다. 이와 같이, 아펠린 유사체에는 잠재적 절단 부위를 제거하거나 다르게는 단백질을 안정화하는 치환되거나 개질된 아미노산(들)이 포함될 수 있다. 이와 같이, 아펠린-Fc-융합 단백질의 아펠린 펩타이드에 대한 하나 이상의 C-말단 아미노산의 결실 또는 부가는 증가된 안정성, 예컨대 분해에 대한 내성을 부여할 수 있다. 이러한 아펠린 펩타이드의 개질은 APLNR을 활성화하는 이들의 능력을 변경하지 않는다. 예시적인 개질된 아펠린 펩타이드, 예로 서열 목록 번호 261, 서열 목록 번호 262, 서열 목록 번호 270, 서열 목록 번호 271, 서열 목록 번호 272, 및 서열 목록 번호 273이 표 9 및 10A-D에 포함된다. 이러한 개질된 아펠린 펩타이드를 포함하는 본 발명의 예시적인 아펠린 융합 단백질이 본 발명에 포함된다.

[0113] 일부 구현예에서, 아펠린 펩타이드는 프리프로아펠린 폴리펩타이드(서열 목록 번호 227)의 단편 또는 유사체를 포함한다. 본원에서 이용되는 "아펠린 펩타이드"에는 당분야에 공지된 비제한적인 예시적 아펠린 단편 및 유사체, 예로 프리프로아펠린 폴리펩타이드(서열 목록 번호 227)의 아미노산 6-77, 40-77, 42-77, 43-77, 47-77, 59-77, 61-77, 63-77, 64-77, 65-77, 66-77, 67-77, 73-77, 1-25, 6-25, 42-64, 61-64, 61-74, 61-75, 61-76, 65-76, 65-75, 66-76, 67-76, 66-75, 67-75, 42-58, 42-57, 42-56, 42-55, 42-54, 42-53, 또는 피로글루타미드화된 아펠린65-77([Pyr¹]아펠린-13)을 포함하는 아펠린 펩타이드가 포함된다. 예로, 둘 다 본원에 참조로 도입되는, 2002년 12월 10일에 허여된 US 특허 번호 6,492,324, 및 [Messari et al. 2004, 상기 문헌]을 참고하라.

[0114] 일부 구현예에서, 아펠린 펩타이드는 아펠린40-77(아펠린-38), 아펠린42-77(아펠린-36), 아펠린43-77(아펠린-35), 아펠린47-77(아펠린-31), 아펠린59-77(아펠린-19), 아펠린61-77(아펠린-17), 아펠린63-77(아펠린-15), 아펠린64-77(아펠린-14), 아펠린65-77(아펠린-13), 아펠린66-77(아펠린-12, 또는 A12), 아펠린67-77(아펠린-11), 아펠린68-77(아펠린-10), 아펠린73-77(아펠린-5), 아펠린61-76(아펠린-K16P), 아펠린61-75(아펠린-K15M), 아펠린61-74(아펠린-K14P), 및 [Pyr¹]아펠린-13으로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 아펠린 펩타이드는 프리프로아펠린 폴리펩타이드(서열 목록 번호 227)의 절단 산물로 다양한 길이의 C-말단 프리프로아펠린을 산출한다. 이와 같이, 서열 목록 번호 227의 아미노산 42-77로 구성된 아펠린 펩타이드는 아펠린-36으로 불리며; 서열 목록 번호 227의 아미노산 61-77로 구성된 아펠린 펩타이드는 아펠린-17로 불리고; 서열 목록 번호 227의 아미노산 65-77로 구성된 아펠린 펩타이드는 아펠린-13으로 불리고; 서열 목록 번호 227의 아미노산 67-77로 구성된 아펠린 펩타이드는 아펠린-11로 불리는 등이다.

[0115] 일부 구현예에서, 아펠린 펩타이드, 또는 이들의 유사체는 아펠린-36(서열 목록 번호 230), 아펠린-17(서열 목록 번호 229), 아펠린-13(서열 목록 번호 228) 및 [Pyr¹]아펠린-13으로 구성된 군으로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 아펠린 펩타이드는 아펠린-13(서열 목록 번호 228), 또는 이들의 단편 또는 유사체를 포함한다.

[0116] 프리프로아펠린 폴리펩타이드의 C-말단에서 아펠린 펩타이드의 추가 개질은 펩타이드의 효소적 절단, 예를 들어 ACE2 절단을 제거하거나 방해할 수 있다. 일부 구현예에서, 아펠린 펩타이드는 분해를 최소화하고 혈청 안정성

을 강화하도록 개질된다. 특정 구현예에서, 개질된 아펠린 펩타이드는 서열 목록 번호 270(아펠린-Cter9), 서열 목록 번호 271(아펠린-Cter10), 서열 목록 번호 262(아펠린-Cter11), 서열 목록 번호 272(아펠린-Cter11+S), 서열 목록 번호 273(아펠린-V5-11), 서열 목록 번호 269(아펠린-13+5G), 서열 목록 번호 283(아펠린-13+R), 서열 목록 번호 284(아펠린-13+S), 및 서열 목록 번호 285(아펠린-13+H)로 구성되는 군으로부터 선택된다. 본 발명의 아펠린-항체 융합물은 특히 항체 중쇄 또는 경쇄(들)의 N-말단에서, 임의의 이들 개질된 펩타이드에 구속될 수 있다.

[0117] 아펠린 펩타이드는 순환으로부터 신속히 제거되며, 8 분 이하의 짧은 혈장 반감기를 갖는다(Japp, et al, 2008, *J of Amer College Cardiol*, 52(11):908-13). 본 발명의 아펠린 융합 단백질은 아펠린 펩타이드에 비해 증가된 반감기를 갖는다.

[0118] 다른 구현예에서, 아펠린 펩타이드, 또는 이들의 단편 또는 유사체는 항체의 하나 또는 두 중쇄 모두의 5'(N-말단) 말단 또는 3'(C-말단) 말단에 융합된다. 다른 구현예에서, 아펠린 펩타이드, 또는 이들의 유사체는 항체의 하나 또는 두 경쇄 모두의 5'(N-말단) 말단 또는 3'(C-말단) 말단에 융합된다.

[0119] 다른 구현예에서, 아펠린 펩타이드, 또는 이들의 단편 또는 유사체는 항원-결합 단편, 예컨대 Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fd 단편, Fv 단편, 단일쇄 Fv(scFv) 단편, dAb 단편, 및 단리된 상보성 결정 영역(CDR)으로 구성된 군으로부터 선택되는 APLNR-결합 단편을 포함하는 면역글로불린 분자의 5'(N-말단) 말단 또는 3'(C-말단) 말단에 융합된다.

[0120] 본 발명에는 비표준 아미노산 또는 개질된 아미노산을 포함하도록 개질된 아펠린 유사체가 포함된다. 비천연, 또는 천연이지만 코딩되지 않는 아미노산을 함유하는 이러한 펩타이드는 하나 이상의 코돈이 표준 아미노산 중 하나가 아닌 아미노산을 인코딩하도록 지정되는 인공 개질된 유전적 코드에 의해 합성될 수 있다. 예를 들어, 유전적 코드는 20 개의 표준 아미노산을 인코딩하지만, 특정 상황 하에서는 3 개의 추가 단백질성 아미노산이 자연에서 생성된다: 셀레노시스테인, 피로라이신 및 N-포르밀-메티오닌(Ambrogelly, et al. 2007, *Nature Chemical Biology*, 3:29-35; Boeck, A. et al, 1991, *TIBS*, 16(12): 463-467; 및 Theobald-Dietrich, A., et al., 2005, *Biochimie*, 87(9-10):813-817). 번역후 개질된 아미노산, 예컨대 카복시글루탐산(γ -카복시글루타메이트), 하이드록시프롤린 및 하이푸신이 또한 포함된다. 다른 비표준 아미노산에는 비제한적으로 시트룰린, 4-벤조일페닐알라닌, 아미노벤조산, 아미노헥산산, N α -메틸아르기닌, α -아미노-n-부티르산, 노르발린, 노르류신, 알로이소류신, t-류신, α -아미노-n-헵탄산, 피페콜산, α , β -디아미노프로피온산, α , γ -디아미노부티르산, 오르니틴, 알로트레오닌, 호모알라닌, 호모아르기닌, 호모아스파라긴, 호모아스파르트산, 호모시스테인, 호모글루탐산, 호모글루타민, 호모이소류신, 호모류신, 호모메티오닌, 호모페닐알라닌, 호모세린, 호모티로신, 호모발린, 이소니페코트산, β -알라닌, β -아미노-n-부티르산, β -아미노이소부티르산, γ -아미노부티르산, α -아미노이소부티르산, 이소발린, 사르코신, 나프틸알라닌, 니페코트산, N-에틸 글리신, N-프로필 글리신, N-이소프로필 글리신, N-메틸 알라닌, N-에틸 알라닌, N-메틸 β -알라닌, N-에틸 β -알라닌, 옥타하이드로인돌-2-카복실산, 페니실아민, 피로글루탐산, 사르코신, t-부틸글리신, 테트라하이드로-이소퀴놀린-3-카복실산, 이소세린, 및 α -하이드록시- γ -아미노부티르산이 포함된다. 유전적 코드를 전개하기 위한 다양한 포맷이 당분야에 공지되어 있으며, 본 발명의 실시에서 채용될 수 있다(예로 Wolfson, W., 2006, *Chem Biol*, 13(10): 1011-12 참고).

[0121] 이러한 비-표준 아미노산 또는 번역-후 개질을 도입하는 아펠린 유사체는 공지된 방법에 의해 합성될 수 있다. 예시적인 아펠린 유사체에는 N α -메틸아르기닌-아펠린-A12 유사체, [Nle75, Tyr]아펠린-36, [Glp65Nle75,Tyr77]아펠린-13, (Pyr1)[Met(O)11]-아펠린-13, (Pyr1)-아펠린-13, [d-Ala12]-A12, 및 N-알파-아세틸-노나-D-아르기닌 아미드 아세테이트가 포함된다.

[0122] 또한, 본 발명에는 절단, 예를 들어 안지오텐신 전환 효소 2(ACE2)에 의한 절단에 내성이 있도록 개질된 항체-융합 단백질의 아펠린 성분의 유사체가 포함된다. 이러한 아펠린 유사체는 허혈증에 대한 심근 반응의 생체내 모델에서 개질되지 않은 아펠린 리간드에 비해 현저한 효능 증가를 갖는 것으로 나타났다(Wang, et al. July 1, 2013, *J Am Heart Assoc*. 2: e000249).

[0123] 이러한 절단-보호된 항체-융합 단백질은 치환 변이체, 즉 단백질 내 하나 이상의 절단 부위에서 하나의 아미노산의 또 다른 것으로의 교환에 의해 제조되는 변이체를 포함하도록 개질되는 아펠린 펩타이드를 포함한다. 이러한 아미노산 치환은 단백질의 다른 기능 또는 특성의 손실 없이 증가된 안정성을 부여하는 것으로 고려된다. 다른 절단-보호된 항체-융합 단백질은 말단 아미드 또는 아세틸기를 포함하도록 개질된 아펠린 펩타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 절단-보호된 항체-융합 단백질은 단백질성 아미노산, 비표준 아미노산 또는 번역후 개질

된 아미노산을 포함한다. 일부 개질된 아펠린 펩타이드는 APLNR를 활성화하는 이들의 능력을 변경하지 않고 하나 이상의 C-말단 아미노산을 결실시키고/시키거나 부가하도록 개질된다. 본 발명의 예시적인 아펠린 융합 단백질에는 서열 목록 번호 270(아펠린-Cter9), 서열 목록 번호 271(아펠린-Cter10), 서열 목록 번호 262(아펠린-Cter11), 서열 목록 번호 272(아펠린-Cter11+S), 서열 목록 번호 269(아펠린-13+5G), 서열 목록 번호 283(아펠린-13+R), 서열 목록 번호 284(아펠린-13+S), 및 서열 목록 번호 285(아펠린-13+H)가 포함된다. 또한, 본원에 참조로 도입되는 2014년 9월 25일에 공개된 PCT 국제 공개 번호 W02014/152955 A1을 참고하라.

[0124] **항체-융합 단백질**

[0125] 본 발명은 또한 아펠린 펩타이드 서열에 융합된 항-APLNR 항체를 포함하는 항체-융합 단백질 또는 이들의 단편을 제공한다. 본원에 기재되고 당분야에 공지된 임의의 아펠린 펩타이드 또는 유사체는 프리프로아펠린 폴리펩타이드(서열 목록 번호 227)로부터 유도될 수 있다. 아펠린 펩타이드는 이들의 단백질 분해 절단에 대한 내성 또는 금속-이온 관련된 절단에 대한 내성을 개선하기 위해 일반적인 분자 생물학적 기법 및 합성 화학을 이용해서 개질될 수 있다. 이러한 폴리펩타이드의 유사체에는 하나의 아미노산의 또 다른 것으로의 교환 또는 천연 생성 L-아미노산 이외의 잔기, 예로 D-아미노산 또는 비-천연 생성 합성 아미노산을 이용한 치환에 의해 제조되는 치환 변이체가 포함된다.

[0126] 본 발명의 특정한 비제한적, 예시적인 항체-융합 단백질은 서열 목록 번호 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 및 210/218로 구성되는 군으로부터 선택된 중쇄 및 경쇄 가변 영역(HCVR/LCVR) 서열을 포함하며; 아펠린 펩타이드 서열, 예로 서열 목록 번호 227, 서열 목록 번호 228, 서열 목록 번호 229 또는 서열 목록 번호 230의 단편 또는 유사체를 추가로 포함한다.

[0127] 본 발명의 하나의 측면에서, 아펠린 수용체(APLNR) 조절물질은 아펠린 펩타이드 성분 및 Ig 분자, 예컨대 IgG 분자를 포함한다. 이와 같이, 아펠린 펩타이드 성분은 Ig 분자 중쇄의 N-말단 또는 C-말단에 같은 프레임으로 융합될 수 있다. 항체-아펠린 융합 단백질(다르게는 항체-아펠린 융합물로 알려져 있음)은 항체의 하나 또는 두 중쇄 모두의 N-말단 또는 C-말단으로 같은 프레임으로 융합된 2 개의 동일한 중쇄 도메인 및 아펠린 펩타이드 성분을 포함하는 동종이량체를 포함할 수 있다. 다른 경우, 항체-아펠린 융합 단백질은 항체의 하나 또는 두 경쇄 모두의 N-말단 또는 C-말단으로 같은 프레임으로 융합된 2 개의 동일한 중쇄 도메인 및 아펠린 펩타이드 성분을 포함하는 동종이량체일 수 있다. 일부 구현예에서, Ig 분자는 항-APLNR 항체이며, 이에 따라 중쇄 및 경쇄 가변 영역(HCVR/LCVR)은 APLNR로 결합할 수 있다. 본 발명의 예시적인 항체-융합 단백질은 서열 목록 번호 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 및 210/218로 구성되는 군으로부터 선택된 중쇄 및 경쇄 가변 영역(HCVR/LCVR) 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 항체-아펠린 융합물은, 예를 들어 아펠린 펩타이드 또는 유사체에 융합된 본원에서 언급된 가변 영역을 포함하는 항원-결합 단편을 포함할 수 있다. 이와 같이, 항체-아펠린 융합물은 Fab, F(ab')₂ 또는 scFv 단편을 포함한다. 당업자는 본원에 개시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열로 시작하여, 이들의 하나 이상의 아펠린 펩타이드를 포함하는 다양한 항체-아펠린 융합물을 쉽게 생성할 수 있다.

[0128] 항체 분자와 마찬가지로, 항체-아펠린 융합물은 단일특이적 또는 다중특이적(예로, 이중특이적)일 수 있다. 다중특이적 항체-아펠린 융합물은 전형적으로 적어도 2 개의 상이한 가변 도메인을 포함할 것이며, 여기서 하나의 가변 도메인은 APLNR에 특이적으로 결합할 수 있고, 제2 가변 도메인은 동일한 항원(즉, APLNR) 상의 상이한 에피토프에 대해 결합 또는 상이한 항원, 예컨대 아펠린에 대해 결합할 수 있다. 임의의 다중특이적 항체 포맷이 당분야에서 이용 가능한 일상적 기법을 이용하여 본 발명의 항체-융합 단백질의 맥락에서 사용하기 위해 채택될 수 있다.

[0129] 일부 구현예에서, 항체-융합 단백질의 성분 또는 펩타이드는 링커(또는 "스페이서") 펩타이드에 의해 분리된다. 이러한 펩타이드 링커는 당분야에 널리 공지되어 있고(예로, 폴리글리신) 전형적으로 융합 단백질의 하나 또는 두 성분 모두의 적절한 폴딩을 허용한다. 링커는 융합 단백질 성분의 가요성 접합 영역을 제공하여 분자의 두 말단이 독립적으로 운동할 수 있도록 하며, 두 모이어티의 적절한 기능을 각각 보유하는데 있어서 중요한 역할을 담당할 수 있다. 따라서, 접합 영역은 일부 경우 두 부분을 함께 조립하는 링커로서, 그리고 두 부분 각각이 그 고유한 생물학적 구조를 형성하고 다른 부분을 방해하지 않도록 하는 스페이서로서 모두 작용한다. 또한, 접합 영역은 대상체의 면역계에서 외래로 인식되지 않을, 다시 말하면 면역원성으로 간주되지 않을 에피토프를 생성해야 한다. 링커 선택은 또한 융합 분자의 결합 활성에 대해 효과를 가질 수 있다(Huston, et al., 1988, *PNAS*, 85:16:5879-83; Robinson & Bates, 1998, *PNAS* 95(11):5929-34; Arai, et al. 2001, *PEDS*, 14(8):529-32; 및 Chen, X. et al., 2013, *Advanced Drug Delivery Reviews* 65:1357-1369 참고). 하나의 구현예에서, 아

펩틴 펩타이드는 하나 이상의 펩타이드 링커를 통해 항체-융합 폴리펩타이드, 또는 이들의 단편의 N-말단 또는 C-말단으로 연결된다.

[0130] 링커 사슬의 길이는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 개 이상의 아미노산 잔기일 수 있지만, 전형적으로 5 내지 25 개 잔기이다. 링커의 예에는 폴리글리신 링커, 예컨대 Gly-Gly(2Gly), Gly-Gly-Gly(3Gly), 4Gly, 5Gly, 6Gly, 7Gly, 8Gly 또는 9Gly이 포함된다. 링커의 예에는 또한 Gly-Ser 펩타이드 링커, 예컨대 Ser-Gly(SG), Gly-Ser(GS), Gly-Gly-Ser(G2S), Ser-Gly-Gly(SG2), G3S, SG3, G4S, SG4, G5S, SG5, G6S, SG6, (G4S)_n, (S4G)_n이 포함되며, 여기서 n = 1 내지 10이다. (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃은 (G4S)₃(서열 목록 번호 233)으로도 알려져 있고, 여기서 n=3이어서 특정 서열이 3 번 반복됨을 시사한다. 본원에 기재된 임의의 하나의 링커는 필요에 따라 링커를 길게 하기 위해 반복될 수 있다.

[0131] 본 발명의 하나의 이러한 구현예에서, 아펠린 펩타이드는 하나 이상의 Gly-Ser 펩타이드 링커를 통해 항체-융합 단백질, 또는 이들의 단편의 N-말단 또는 C-말단으로 연결된다.

[0132] 일부 구현예에서, 펩타이드 링커는 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₁(서열 목록 번호 231), (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₂(서열 목록 번호 232), 및 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃(서열 목록 번호 233)으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0133] 다른 구현예에서, 신호 펩타이드는 발현 벡터에서 항체-융합 단백질의 상류에서 인코딩된다. 특정 구현예에서, 링커 또는 스페이서는 신호 펩타이드의 C-말단 및 항체-융합 단백질의 N-말단 사이에 같은 프레임으로 융합된다. 이러한 신호 펩타이드는 당분야에 공지되어 있으며, 폴리펩타이드를 세포의 분비 경로로 보내기 위해 채용될 수 있다.

[0134] 본 발명의 예시적인 아펠린 융합 단백질은 아펠린 펩타이드 단독보다 안정하다. 본 발명의 일부 아펠린 융합 단백질은 효소 분해에 내성이 있다. 본 발명의 예시적인 항체-융합 단백질은 아펠린 펩타이드에 융합되고 선택적으로 링커에 융합된 중쇄 및 경쇄 가변 영역(HCVR/LCVR) 서열을 포함하며, 서열 목록 번호 130/235, 130/237, 239/138, 241/138, 243/138, 245/138, 247/122, 114/249, 114/251, 253/26, 255/26, 257/26, 259/26, 274/138, 275/138, 276/138, 277/138, 278/138, 279/26, 280/26, 281/26, 및 282/26으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0135] 에피토프 맵핑 및 관련 기술

[0136] 본 발명에는 APLNR의 하나 이상의 아미노산과 상호작용하는 항-APLNR 항체 및 항체-융합 단백질이 포함된다. 예를 들어, 본 발명에는 APLNR의 세포외 또는 막통과 도메인 내에 위치하는 하나 이상의 아미노산과 상호작용하는 항-APLNR 항체가 포함된다. 항체가 결합하는 에피토프는 APLNR의 3 개 이상(예로, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 개 이상) 아미노산의 단일 인접 서열로 구성될 수 있다. 대안적으로, 에피토프는 APLNR의 복수의 비-인접 아미노산(또는 아미노산 서열)으로 구성될 수 있다.

[0137] 항체가 폴리펩타이드 또는 단백질 내에서 "하나 이상의 아미노산과 상호작용하는지" 여부를 결정하기 위해 당업자에게 공지된 다양한 기법이 이용될 수 있다. 예시적인 기법에는, 예로 [Antibodies, Harlow and Lane(Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harb., NY)]에 기재된 바와 같은 일상적인 교차-차단 분석, 알라닌 스캐닝 돌연변이 분석, 펩타이드 블롯 분석(Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443-463), 및 펩타이드 절단 분석이 포함된다. 또한, 항원의 에피토프 절제, 에피토프 추출 및 화학적 개질과 같은 방법이 채용될 수 있다(Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487-496). 항체가 상호작용하는 폴리펩타이드 내의 아미노산을 확인하기 위해 이용될 수 있는 또 다른 방법은 질량 분광측정에 의해 검출되는 수소/중수소 교환이다. 일반적 용어에서, 수소/중수소 교환 방법에는 관심 단백질의 중수소-표지에 이어 중수소-표지된 단백질에 대한 항체의 결합이 관여된다. 다음으로, 단백질/항체 복합체가 물로 전달되어 항체에 의해 보호되는 잔기(중수소-표지되어 유지됨)를 제외한 모든 잔기에서 수소-중수소 교환이 일어날 수 있도록 한다. 항체의 해리 후, 표적 단백질은 프로테아제 절단 및 질량 분광측정 분석을 거쳐서 항체가 상호작용하는 특정 아미노산에 해당하는 중수소-표지된 잔기가 드러난다. 예로, [Ehring(1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252-259; Engen and Smith(2001) *Anal. Chem.* 73:256A-265A]를 참고하라.

[0138] 본 발명에는 본원에 기재된 임의의 특정한 예시적인 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항-APLNR 항체가 추가로 포함된다(예로 H1M9207N, H2aM9209N, H2aM9222N, H2aM9227N, H2aM9227N, H2aM9228N, H2aM9230N, H2aM9232N, H4H9092P, H4H9093P, H4H9101P, H4H9103P, H4H9104P, H4H9112P, H4H9113P 등). 마찬가지로, 본 발명에는 또한 본원에 기재된 임의의 특정한 예시적인 항체와 APLNR로의 결합에 대해 경쟁하는 항-APLNR 항체가 포함된다(예로 H1M9207N, H2aM9209N, H2aM9222N, H2aM9227N, H2aM9227N, H2aM9228N, H2aM9230N, H2aM9232N,

H4H9092P, H4H9093P, H4H9101P, H4H9103P, H4H9104P, H4H9112P, H4H9113P 등).

[0139] 당분야에 공지되고 본원에 예시된 일상적 방법을 이용하여, 항체가 참조 항-APLNR 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지 또는 이와 결합에 대해 경쟁하는지를 쉽게 결정할 수 있다. 예를 들어, 시험 항체가 본 발명의 참조 항-APLNR 항체와 동일한 에피토프에 결합하는지를 결정하기 위해, 참조 항체가 APLNR 단백질에 결합하도록 둔다. 다음으로, 시험 항체가 APLNR 분자에 결합하는 능력이 평가된다. 시험 항체가 참조 항-APLNR 항체와의 포화 결합 후 APLNR에 결합할 수 있는 경우, 시험 항체는 참조 항-APLNR 항체와 상이한 에피토프에 결합한다고 결론지을 수 있다. 다른 한 편, 시험 항체가 참조 항-APLNR 항체와의 포화 결합 후 APLNR 분자에 결합할 수 없는 경우, 시험 항체는 본 발명의 참조 항-APLNR 항체가 결합한 에피토프와 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 이어서 관찰된 시험 항체의 결합 부제가 실제로 참조 항체와 동일한 에피토프에 대한 결합 때문인지 아니면 입체 차단(또는 또 다른 현상)이 관찰된 결합의 부제에 관여하는지를 확인하기 위해 추가적인 일상적 실험(예로, 펩타이드 돌연변이 및 결합 분석)이 수행될 수 있다. 상기 종류의 실험은 ELISA, RIA, BIAcore™, 유세포 측정 또는 당분야에서 이용 가능한 임의의 다른 정량적 또는 정성적 항체-결합 분석을 이용해서 수행될 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 예로 1-, 5-, 10-, 20- 또는 100-배 과량의 하나의 항체가 경쟁적 결합 분석(예로, Junghans et al., 1990, *Cancer Res.* 50:1495-1502 참고)에서 측정되는 다른 항체의 결합을 적어도 50%, 그러나 바람직하게는 75%, 90% 또는 심지어 99% 억제하는 경우, 두 항체는 동일한(또는 중복되는) 에피토프에 결합한다. 대안적으로, 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 항원 내의 본질적으로 모든 아미노산 돌연변이가 다른 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우, 두 항체는 동일한 에피토프에 결합하는 것으로 간주된다. 하나의 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 아미노산 돌연변이의 하위세트만 다른 항체의 결합을 감소시키거나 제거하는 경우, 두 항체는 "중복되는 에피토프"를 갖는 것으로 간주된다.

[0140] 항체가 참조 항-APLNR 항체와의 결합에 대해 경쟁하는지(또는 결합에 대해 교차-경쟁하는지) 결정하기 위해, 상술된 결합 방법론은 두 방향으로 수행된다: 제1 방향에서는, 참조 항체가 포화 조건 하에 APLNR 단백질에 결합하도록 둔 후 APLNR 분자에 대한 시험 항체의 결합을 평가한다. 제2 방향에서는 시험 항체가 포화 조건 하에 APLNR 단백질에 결합하도록 둔 후 APLNR 분자에 대한 참조 항체의 결합을 평가한다. 두 방향 모두에서, 제1(포화) 항체만 APLNR 분자에 결합할 수 있는 경우, 시험 항체 및 참조 항체는 APLNR로의 결합에 대해 경쟁하는 것으로 결론지어진다. 당업자에게 이해될 바와 같이, 참조 항체와 결합에 대해 경쟁하는 항체는 반드시 참조 항체와 동일한 에피토프에 결합하지는 않을 수 있지만 중복되거나 인접한 에피토프의 결합에 의해 참조 항체의 결합을 입체적으로 차단할 수 있다.

[0141] 인간 항체의 제조

[0142] 완전 인간 모노클로날 항체를 포함하는 모노클로날 항체의 생성 방법은 당분야에 공지되어 있다. 임의의 이러한 공지된 방법은 인간 APLNR에 특이적으로 결합하는 인간 항체를 제조하기 위해 본 발명의 맥락에서 이용될 수 있다.

[0143] 예를 들어 VELOCIMMUNE™ 기술, 또는 완전 인간 모노클로날 항체를 생성하기 위한 임의의 다른 공지된 방법을 이용하여, 먼저 인간 가변 영역 및 마우스 불변 영역을 갖는 APLNR에 대한 고친화도 키메라성 항체가 단리된다. 아래의 실험 섹션에서와 같이, 항체는 친화도, 선택성, 에피토프 등을 포함하는 바람직한 특징에 대해 특성규명되고 선택된다. 필요한 경우, 마우스 불변 영역이 원하는 인간 불변 영역, 예를 들어 야생형 또는 개질된 IgG1, IgG2 또는 IgG4로 대체되어 완전 인간 항-APLNR 항체를 생성한다. 선택된 불변 영역은 특정 용도에 따라 변할 수 있지만, 고친화도 항원-결합 및 표적 특이성 특징은 가변 영역에 존재한다. 특정한 경우, 완전 인간 항-APLNR 항체가 항원-양성 B 세포로부터 직접 단리된다.

[0144] 생물학적 동등물

[0145] 본 발명의 항-APLNR 항체 및 항체 단편은 상술된 항체에서 변하지만 인간 APLNR에 대한 결합력을 보유하는 아미노산 서열을 갖는 단백질을 포괄한다. 이러한 변이체 항체 및 항체 단편은 모체 서열과 비교되는 경우 하나 이상의 아미노산 부가, 결실, 또는 치환을 포함하지만, 기재된 항체와 본질적으로 동등한 생물학적 활성을 나타낸다. 마찬가지로, 본 발명의 항-APLNR 항체-인코딩 DNA 서열은 개시된 서열과 비교되는 경우 하나 이상의 뉴클레오타이드 부가, 결실, 또는 치환을 포함하지만, 본 발명의 항-APLNR 항체 또는 항체 단편에 대해 본질적으로 생물학적 동등물인 항-APLNR 항체 또는 항체 단편을 인코딩하는 서열을 포괄한다. 이러한 변이체 아미노산 및 DNA 서열의 예는 위에서 논의된다.

[0146] 두 항원-결합 단백질, 또는 항체는, 예를 들어 이들이 단일 용량이면 다중 용량이면 유사한 실험 조건 하에 동

일한 몰 농도 용량으로 투여되는 경우 그 흡수 속도 및 정도가 유의차를 나타내지 않는 약학적 동등물 또는 약학적 대안물인 경우 생물학적 동등물로 간주된다. 일부 항체는 이들이 이들의 흡수 정도에서는 동등물이지만 이들의 흡수 속도에 있어서는 아닌 경우에도 그러한 흡수 속도의 차이가 의도적이고, 라벨링에 반영되고, 예로 만성 사용 시, 유효 신제 약물 농도의 획득에 필수적이지 아니고, 연구되는 특정 약물 제품에 대해 의학적으로 중요하지 않은 것으로 간주되므로, 생물학적 동등물로 간주될 수 있는 경우, 동등물 또는 약학적 대안물로 간주될 것이다.

[0147] 하나의 구현예에서, 두 항원-결합 단백질은 이들의 안전성, 순도 및 효력에서 임상적으로 의미있는 차이가 없는 경우 생물학적 동등물이다.

[0148] 하나의 구현예에서, 두 항원-결합 단백질은 환자가 스위칭 없이 연속되는 치료법에 비해 임상적으로 유의미한 면역원성에서의 변화 또는 감소된 효과를 포함하는 유해 효과의 위험에서 예상되는 증가 없이 참조 제품 및 생물학적 제품 간에 1 회 이상 스위치될 수 있는 경우, 생물학적 동등물이다.

[0149] 하나의 구현예에서, 두 항원-결합 단백질은 이들이 일반적 기전 또는 사용 조건 또는 조건들에 대한 작용 기전에 의해 이러한 기전들이 알려진 정도까지 모두 작용하는 경우, 생물학적 동등물이다.

[0150] 생물학적 동등성은 생체내 및 시험관내 방법에 의해 나타날 수 있다. 생물학적 동등성 측정에는, 예로 (a) 항체 또는 그 대사물질의 농도가 시간의 함수로 혈액, 혈장, 혈청, 또는 다른 생물학적 유체에서 측정되는 인간 또는 다른 포유류에서의 생체내 시험; (b) 인간 생체내 생체이용률 데이터와 관련되었고 이를 합리적으로 예측하는 시험관내 시험; (c) 항체(또는 그 표적)의 적절한 급성 약리학적 효과가 시간의 함수로 측정되는 인간 또는 다른 포유류에서의 생체내 시험; 및 (d) 항체의 안전성, 유효성 또는 생체이용률 또는 생물학적 동등성을 구축하는 잘 대조된 임상 시험이 포함된다.

[0151] 본 발명의 항-APLNR 항체의 생물학적 동등 변이체는, 예를 들어 잔기 또는 서열의 다양한 치환을 제조하거나 생물학적 활성을 위해 필요하지 않은 말단 또는 내부 잔기 또는 서열을 제거하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 생물학적 활성을 위해 필수적이지 아닌 시스테인 잔기는 재생 시 불필요하거나 부정확한 분자내 디설파이드 가교의 형성을 방지하기 위해 결실되거나 다른 아미노산으로 대체될 수 있다. 다른 맥락에서, 생물학적 동등 항체에는 항체의 글리코실화 특징을 개질하는 아미노산 변화, 예로 글리코실화를 없애거나 제거하는 돌연변이를 포함하는 항-APLNR 항체 변이체가 포함될 수 있다.

[0152] 종 선택성 및 종 교차-반응성

[0153] 특정 구현예에 따르면, 본 발명은 인간 APLNR에 결합하지만 다른 종의 APLNR에는 결합하지 않는 항-APLNR 항체를 제공한다. 본 발명에는 또한 인간 APLNR 및 하나 이상의 비-인간 종의 APLNR에 결합하는 항-APLNR 항체가 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 항-APLNR 항체는 인간 APLNR에 결합할 수 있고 가능한 바에 따라 하나 이상의 마우스, 래트, 기니아피, 햄스터, 저빌, 돼지, 고양이, 개, 토끼, 염소, 양, 소, 말, 낙타, 시아노물구스, 마모셋, 붉은털원숭이 또는 침팬지 APLNR에 결합할 수도 결합하지 않을 수도 있다. 본 발명의 특정한 예시적인 구현예에 따르면, 인간 APLNR(서열 목록 번호 225) 및 사이노물구스 원숭이(예로, *마카카 파시쿨라리스*(*Macaca fascicularis*)) APLNR(서열 목록 번호 226)에 특이적으로 결합하는 항-APLNR 항체가 제공된다.

[0154] 면역접합체

[0155] 본 발명은 치료 모이어티("면역접합체"), 예컨대 세포독소, 화학치료 약물, 면역억제제 또는 방사선동위원소에 접합된 항-APLNR 모노클로날 항체를 포괄한다. 세포독성제에는 세포에 해로운 임의의 체제가 포함된다. 면역접합체를 형성하기 적합한 세포독성제 및 화학치료제의 예는 당분야에 공지되어 있다(예를 들어, WO 05/103081 참고).

[0156] 다중특이적 항체

[0157] 본 발명의 항체는 단일특이적, 이중특이적, 또는 다중특이적일 수 있다. 다중특이적 항체는 하나의 표적 폴리펩타이드의 상이한 에피토프에 대해 특이적일 수도 있고, 또는 하나를 초과하는 표적 폴리펩타이드에 특이적인 항원-결합 도메인을 함유할 수도 있다. 예로, [Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244]를 참고하라. 본 발명의 항-APLNR 항체는 또 다른 기능적 분자, 예로 또 다른 펩타이드 또는 단백질에 연결되거나 공-발현될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 이들의 단편은 하나 이상의 다른 분자체, 예컨대 또 다른 항체 또는 항체 단편으로 기능적으로 연결되어(예로 화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유 연합 등에 의해) 제2 결합 특이성을 갖는 이중특이적 또는 다중특이적 항체를 생성할 수 있다. 예를 들어,

본 발명에는 면역글로불린의 하나의 팔은 인간 APLNR 또는 이들의 단편에 대해 특이적이며, 면역글로불린의 다른 팔은 제2 치료 표적에 대해 특이적이거나 치료 모이어티에 접합되는 이중특이적 항체가 포함된다.

[0158] 본 발명의 맥락에서 이용될 수 있는 예시적인 이중특이적 항체 포맷에는 제1 면역글로불린(Ig) C_H3 도메인 및 제2 Ig C_H3 도메인의 사용이 관여되며, 여기서 제1 및 제2 Ig C_H3 도메인은 적어도 하나의 아미노산이 서로 상이하며, 적어도 하나의 아미노산 차이는 아미노산 차이가 없는 이중특이적 항체에 비해 단백질 A에 대한 이중특이적 항체의 결합을 감소시킨다. 하나의 구현예에서, 제1 Ig C_H3 도메인은 단백질 A에 결합하며, 제2 Ig C_H3 도메인은 단백질 A 결합을 감소시키거나 폐지하는 돌연변이, 예컨대 H95R 개질(IMG T 엑손 넘버링에 의해; EU 넘버링에 의해서는 H435R)을 함유한다. 제2 C_H3은 Y96F 개질(IMG T에 의해; EU에 의해서는 Y436F)을 추가로 포함할 수 있다. 제2 C_H3 내에서 확인될 수 있는 추가 개질에는 하기가 포함된다: IgG1 항체의 경우 D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, 및 V82I(IMG T에 의해; EU에 의해서는 D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, 및 V422I); IgG2 항체의 경우 N44S, K52N, 및 V82I(IMG T; EU에 의해서는 N384S, K392N, 및 V422I); 및 IgG4 항체의 경우 Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, 및 V82I(IMG T에 의해; EU에 의해서는 Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, 및 V422I). 상술된 이중특이적 항체 포맷 상의 변이도 본 발명의 범위 내에 의도된다. 예로, 본원에서 참조로 도입되는 2010년 12월 30일에 공개된 U.S. 출원 공개 번호 US20100331527A1을 참고하라.

[0159] 일부 측면에서, 항체, 항체-융합 단백질 또는 항원-결합 단편은 이러한 분자 또는 항체의 각각의 항원-결합 단편이 LCVR 영역과 쌍을 이룬 HCVR을 포함하는 이중특이적 항체이다. 특정 구현예에서, 이중특이적 항체는 각각 상이하고 구별되는 LCVR 영역과 쌍을 이룬 HCVR을 포함하는 제1 항원-결합 단편 및 제2 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체는 제1 항원에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 단편(제1 항원-결합 단편은 제1 항원에 대해 유도된 제1 항체로부터 유래되는 HCVR/LCVR 쌍을 포함함), 및 제2 항원에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 단편(제2 항원-결합 단편은 제1 항체로부터 유래되는 LCVR(예로, 제1 항체의 항원 결합 단편에 포함되는 동일한 LCVR)과 쌍을 이룬 제2 항원에 대해 유도된 제2 항체로부터 유래되는 HCVR을 포함함)을 포함하여 구축된다. 일부 구현예에서, 이중특이적 항체에서 적어도 하나의 항체, 즉 제1 항체 또는 제2 항체 또는 두 항체 모두의 중쇄는 개질된 중쇄 불변 영역을 포함한다.

[0160] 본 발명의 일부 측면에서, 상이한 특이성을 갖는 두 항체, 또는 두 중쇄는 이중특이적 항체에서 동일한 경쇄를 이용한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 중쇄는 CH3 도메인에서 개질되어, 이중특이적 항체의 각각의 중쇄 및 단리의 용이성을 위한 친화도 시약, 예컨대 단백질 A 간 상이한 친화도로 이어진다. 또 다른 구현예에서, 이러한 이중특이적 항체에서 적어도 하나의 중쇄는 IMG T 넘버링 시스템의 i) 95R 또는 ii) 95R 및 96F(95R 및 96F는 EU 넘버링 시스템에서 435R 및 436F에 대응함)에서 아미노산 개질을 포함한다.

[0161] 또 다른 측면에서, 항체는 이중특이적 항체이며, 여기서 이중특이적 항체는 하기를 포함한다: (a) 제1 표적 항원을 인식하고 이에 결합할 수 있는 항원-결합 단편을 포함하는 제1 중쇄, (b) 제2 표적 항원을 인식하고 이에 결합할 수 있는 항원-결합 단편을 포함하는 제2 중쇄, (c) 제1 또는 제2 표적 항원을 인식하고 이에 결합할 수 있는 공통 경쇄 항원-결합 단편. 또 다른 측면에서, 본원의 상기 이중특이적 항체에서 (a) 또는 (b)의 적어도 하나의 중쇄는 IMG T 넘버링 시스템의 아미노산 개질 (i) 95R 또는 (ii) 95R 및 96F[(i) 435R 또는 (ii) 435R 및 436F(EU 넘버링)]를 포함한다.

[0162] 예시적인 이중특이적 포맷이 본원에 기재된 임의의 HCVR 및/또는 LCVR 서열을 포함하는 본 발명의 맥락에서 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 항원은 hAPLNR 상의 제1 에피토프이며, 제2 항원은 hAPLNR 상의 제2 에피토프이다. 다른 구현예에서, 제1 항원은 APLNR이고, 제2 항원은 아펠린이다. 특정 구현예에서, 제1 항체는 본원에 기재된 항-APLNR 항원-결합 단편을 포함한다. 다른 구현예에서, 제2 항체는 항-아펠린 항원-결합 단편을 포함한다. 이러한 항-아펠린 항원-결합 단편은 당분야에 공지되어 있다(예로 본원에 참조로 도입되는, 2013년 1월 24일에 공개된 PCT 국제 공개 번호 WO2013/012855를 참고하라).

[0163] 본 발명의 맥락에서 이용될 수 있는 다른 예시적인 이중특이적 포맷에는 비제한적으로, 예로 scFv-기재 또는 디아바디 이중특이적 포맷, IgG-scFv 융합물, 이중 가변 도메인(DVD)-Ig, Quadroma, 노브-인-홀(knobs-into-holes), 공통 경쇄(예로, 노브-인-홀을 갖는 공통 경쇄 등), CrossMab, CrossFab, (SEED)body, 류신 지퍼, Duobody, IgG1/IgG2, 이중 작용 Fab(DAF)-IgG, 및 Mab² 이중특이적 포맷(예로, 상기 포맷의 검토를 위해, Klein *et al.* 2012, *mAbs* 4:6, 1-11, 및 여기에서 언급된 참고문헌 참고)이 포함된다. 이중특이적 항체는 또한 펩타이드/핵산 접합을 이용해서 구축될 수 있고, 예로 직교(orthogonal) 화학 반응성을 갖는 비천연 아미노산을 이용해서 부위-특이적 항체-올리고뉴클레오타이드 콘주게이트를 생성한 뒤 정의된 조성, 공유가 및 기하구조를 갖는

다량체성 복합체로 자가-조립된다(예로, Kazane et al. 2013, *J. Am. Chem. Soc.* 9;135(1):340-6 [*Epub: Dec. 21, 2012*] 참고).

[0164] 추가적인 예시적 다중특이적 포맷이 본 발명의 맥락에서 이용될 수 있고, 비제한적으로, 예로 표적 분자에 특이적으로 결합하는 제1 항원-결합 도메인, 및 내재화 효과기 단백질에 특이적으로 결합하는 제2 항원-결합 도메인의 관여가 포함되며, 이러한 제2 항원-결합 도메인은 APLNR을 활성화 및 내재화할 수 있다(참조로 도입되는, 2013년 9월 19일에 공개된 U.S. 출원 공개 번호 2013/0243775A1을 참고하라).

[0165] pH-의존적 결합

[0166] 본 발명은 pH-의존적 방식으로 APLNR에 결합하는 항체, 항체-융합 단백질 및 이들의 항원-결합 단편을 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 항-APLNR 항체는 중성 pH에 비해 산성 pH에서 APLNR에 대해 감소된 결합을 나타낼 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 항-APLNR 항체는 중성 pH에 비해 산성 pH에서 그 항원에 대해 강화된 결합을 나타낼 수 있다.

[0167] 특정 경우에, "중성 pH에 비해 산성 pH에서 APLNR에 대해 감소된 결합"은 산성 pH에서 APLNR을 발현하는 세포에 대한 항체의 결합 비 대 중성 pH에서 APLNR을 발현하는 세포에 대한 항체의 결합 비(또는 반대)의 결합 지수의 관점으로 표현된다. 예를 들어, 항체 또는 이들의 항원-결합 단편은 항체 또는 이들의 항원-결합 단편이 약 3.0 이상의 산성/중성 결합 지수를 나타내는 경우, 본 발명의 목적을 위해 "중성 pH에 비해 산성 pH에서 APLNR에 대해 감소된 결합"을 나타내는 것으로 간주될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편에 대한 산성/중성 결합 지수는 약 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0, 13.5, 14.0, 14.5, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 100.0 이상일 수 있다.

[0168] 대안적으로, "중성 pH에 비해 산성 pH에서 APLNR에 대해 감소된 결합"은 산성 pH에서 APLNR에 대한 항체 결합의 K_D 값 대 중성 pH에서 APLNR에 대한 항체 결합의 K_D 값(또는 반대)의 비의 관점으로 표현된다. 본원에서 이용되는 용어 " K_D (M)"는 특정 리간드-수용체 상호작용의 해리 평형 상수를 나타낸다. K_D 및 결합 친화도 간에 역의 관계가 존재하며, 이에 따라 K_D 값이 적을수록 친화도가 높다. 따라서, 용어 "더 낮은 친화도"는 상호작용을 형성하는 더 낮은 능력, 그리고 이에 따라 더 큰 K_D 값에 관련된다. 예를 들어, 항체 또는 이들의 항원-결합 단편은 항체 또는 이들의 항원-결합 단편이 약 3.0 이상의 산성/중성 K_D 비를 나타내는 경우, 본 발명의 목적을 위해 "중성 pH에 비해 산성 pH에서 APLNR에 대해 감소된 결합"을 나타내는 것으로 간주될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편에 있어서, 산성/중성 K_D 비는 약 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0, 13.5, 14.0, 14.5, 15.0, 20.0, 25.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 100.0 이상일 수 있다.

[0169] pH-의존적 결합 특징을 갖는 항체는, 예로 중성 pH에 비해 산성 pH에서 특정 항원에 대한 감소된(또는 강화된) 결합에 대해 항체 모집단을 스크리닝하여 수득될 수 있다. 추가적으로, 아미노산 수준에서 항원-결합 도메인의 개질은 pH-의존적 특징을 갖는 항체를 산출할 수 있다. 예를 들어, 항원-결합 도메인(예로, CDR 내에서)의 하나 이상의 아미노산을 히스티딘 잔기로 치환함으로써, 중성 pH 대비 산성 pH에서 감소된 항원-결합을 갖는 항체가 수득될 수 있다. 본원에서 이용되는 표현 "산성 pH"는 약 6.0 이하, 약 5.5 이하, 또는 약 5.0 이하의 pH를 의미한다. 표현 "산성 pH"에는 약 6.0, 5.95, 5.9, 5.85, 5.8, 5.75, 5.7, 5.65, 5.6, 5.55, 5.5, 5.45, 5.4, 5.35, 5.3, 5.25, 5.2, 5.15, 5.1, 5.05, 5.0 이하의 pH 값이 포함된다. 본원에서 이용되는 표현 "중성 pH"는 약 7.0 내지 약 7.4의 pH를 의미한다. 표현 "중성 pH"에는 약 7.0, 7.05, 7.1, 7.15, 7.2, 7.25, 7.3, 7.35, 및 7.4의 pH 값이 포함된다.

[0170] 치료 제형 및 투여

[0171] 본 발명은 본 발명의 항-APLNR 항체 또는 이들의 항원-결합 단편을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 본 발명의 약학 조성물은 적합한 담체, 부형제 및 개선된 이송, 전달, 관용성 등을 제공하는 다른 제제와 함께 제형화된다. 여러 적절한 제형이 모든 약학 화학자에게 공지된 제형학에서 확인될 수 있다: [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA]. 이들 제형에는, 예를 들어 분말, 페이스트, 연고, 젤리, 왁스, 오일, 지질, 소포(예컨대 LIPOFECTIN™, Life Technologies, Carlsbad, CA) 함유 지질(양이온성 또는 음이온성, DNA 콘주게이트, 무수 흡수 페이스트, 수중유 및 유중수 에멀전, 에멀전 카르보왁스(다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜), 반고체 겔 및 카르보왁스를 함유하는 반고체 혼합물이 포함된다. 또한

[Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA, 1998, *J Pharm Sci Technol* 52:238-311]을 참고하라.

- [0172] 환자에게 투여되는 항체의 용량은 환자의 연령 및 체격, 표적 질환, 병태, 투여 경로 등에 따라 변할 수 있다. 바람직한 용량은 전형적으로 체중 또는 체표면적에 따라 산출된다. 본 발명의 항체가 성인 환자에서 APLNR 활성화와 연관되는 병태 또는 질환을 치료하기 위해 이용되는 경우, 본 발명의 항체를 보통 약 0.01 내지 약 20 mg/체중kg, 보다 바람직하게는 약 0.02 내지 약 7, 약 0.03 내지 약 5, 또는 약 0.05 내지 약 3 mg/체중kg의 단일 용량으로 정맥내 투여하는 것이 유리할 수 있다. 병태의 중증도에 따라, 치료 빈도 및 기간이 조정될 수 있다. 항-APLNR 항체를 투여하기 위한 유효 투여량 및 투여 일정은 실험적으로 결정될 수 있다; 예를 들어, 환자의 진행이 주기적 평가에 의해 모니터링되고 용량이 이에 따라 조정될 수 있다. 또한, 중간 투여량 조정은 당분야에 널리 공지된 방법을 이용해서 수행될 수 있다(예로, Mordenti et al., 1991, *Pharmaceut. Res.* 8:1351).
- [0173] 다양한 전달 시스템, 예로 리포솜 내 캡슐화, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 돌연변이체 바이러스를 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체 매개된 세포내 이입(예로, Wu et al., 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 참고)이 공지되어 있고, 본 발명의 약학 조성물을 투여하기 위해 이용될 수 있다. 도입 방법에는 비제한적으로 피하, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 비강내, 경막외, 및 경구 경로가 포함된다. 조성물은 임의의 편리한 경로에 의해, 예를 들어 주입 또는 볼루스 주사, 상피 또는 점막 내층(예로 구강 점막, 직장 및 내장 점막 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고, 다른 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국소일 수 있다.
- [0174] 본 발명의 약학 조성물은 표준 바늘 및 주사기로 피하 또는 정맥내 전달될 수 있다. 또한, 피하 전달에 대해, 펜 전달 장치가 본 발명의 약학 조성물의 전달에서 적용된다. 이러한 펜 전달 장치는 재사용 가능하거나 일회용일 수 있다. 재사용 가능한 펜 전달 장치는 일반적으로 약학 조성물을 함유하는 대체 가능한 카트리지를 이용한다. 일단 카트리지 내의 모든 약학 조성물이 투여되고 카트리지가 비면, 빈 카트리지가 쉽게 폐기되고 약학 조성물을 함유하는 새로운 카트리지로 대체될 수 있다. 이어서 펜 전달 장치가 재사용될 수 있다. 일회용 펜 전달 장치에서는 대체 가능한 카트리지가 없다. 오히려, 일회용 펜 전달 장치는 장치 내의 용기에 보유된 약학 조성물로 사전 충전된다. 일단 용기에서 약학 조성물이 비면, 전체 장치가 폐기된다.
- [0175] 수많은 재사용 가능한 펜 및 자동주입기 전달 장치가 본 발명의 약학 조성물의 피하 전달에서 적용된다. 예에는 비제한적으로 일부만 들어보면 AUTOPEN™(Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), DISETRONIC™ 펜(Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Switzerland), HUMALOG MIX 75/25™ 펜, HUMALOG™ 펜, HUMALIN 70/30™ 펜(Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II 및 III(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), NOVOPEN JUNIOR™(Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark), BD™ 펜(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, 및 OPTICLIK™(sanofi-aventis, Frankfurt, Germany)이 포함된다. 본 발명의 약학 조성물의 피하 전달에 적용되는 일회용 펜 전달 장치의 예에는 비제한적으로 일부만 들어보면 SOLOSTAR™ 펜(sanofi-aventis), FLEXPEN™(Novo Nordisk), 및 KWIKPEN™(Eli Lilly), SURECLICK™ 자동주입기(Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™(Haselmeier, Stuttgart, Germany), EPIPEN(Dey, L.P.), 및 HUMIRA™ 펜(Abbott Labs, Abbott Park IL)이 포함된다.
- [0176] 특정 상황에서, 약학 조성물은 조절 방출 시스템에서 전달될 수 있다. 하나의 구현예에서, 펌프가 이용될 수 있다(Langer, 상기 문헌; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 참고). 또 다른 구현예에서, 중합체성 물질이 이용될 수 있다; [Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise(eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida]를 참고하라. 또 다른 구현예에서, 조절 방출 시스템은 조성물이 표적 근처에 배치되어 전신 용량의 일부만 필요할 수 있다(예로, Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, 상기 문헌, vol. 2, pp. 115-138 참고). 다른 조절 방출 시스템은 [Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533]의 리뷰에서 논의된다.
- [0177] 주사제 제조물에는 정맥내, 피하, 피내 및 근육내 주사, 드립 주입 등을 위한 투여형이 포함될 수 있다. 이들 주사제 제조물은 공개적으로 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 주사제 제조물은, 예로 항체 또는 상술된 그 염을 주사를 위해 통상적으로 이용되는 멸균 수성 매질 또는 유성 매질 중에 용해, 현탁 또는 유화시킴으로서 제조될 수 있다. 주사용 수성 매질로서, 예를 들어 생리 식염수, 글루코스 및 다른 보조제 등을 함유하는 등장성 용액이 있으며, 이는 적합한 가용화제, 예컨대 알코올(예로, 에탄올), 폴리알코올(예로, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜), 비이온성 계면활성제[예로, 폴리소르베이트 80, HCO-50(수소화된 피마자유의 폴리옥시에틸렌(50 mol) 부가물)] 등과 조합 이용될 수 있다. 유성 매질로서, 예로 참기름, 대두유 등이 채용되며, 이는 가용화제, 예컨대 벤질 벤조에이트, 벤질 알코올 등과의 조합으로 이용될 수 있다. 이렇게 제조되는 주사

제는 바람직하게는 적절한 애플에 충전된다.

- [0178] 유리하게는, 상술되는 경구 또는 비경구 이용을 위한 약학 조성물은 활성 성분 용량에 맞도록 맞춰진 단위 용량의 투여형으로 제조된다. 이러한 단위 용량의 투여형에는, 예를 들어 정제, 알약, 캡슐, 주사(애플), 좌약 등이 포함된다. 함유되는 상기 항체의 양은 일반적으로 단위 용량 중; 특히 주사 형태 중 투여형 당 약 5 내지 약 500 mg이며; 상기 언급된 항체가 약 5 내지 약 100 mg, 다른 투여형에 대해서는 약 10 내지 약 250 mg으로 함유되는 것이 바람직하다.
- [0179] **항체의 치료적 이용**
- [0180] 본 발명자에 의해 수행된 것과 같은 마우스 모델 시스템을 이용하는 실험은 APLNR의 길항성에 의해 치료, 예방 및/또는 완화될 수 있는 다양한 질환 및 병태의 확인에 기여하였다. 예를 들어, 아펠린(-/-) 녹아웃 마우스는 눈에서 정상 발달 혈관신생의 명백한 손상을 나타낸다. 또한, APLNR(-/-) 마우스는 변경된 유체 항상성 및 삼투압에 대해 변경된 반응을 갖는다(Roberts, Em et al. 2009, *J Endocrinol* 202:453-462; Roberts, EM, et al. 2010, *J Endocrinol* 22:301-308). 또 다른 예에서, APLNR^{-/-} 마우스는 정상 기준선 혈압 및 심박을 나타내었지만, 아펠린에 대한 저혈압 반응이 없다(Charo, et al. 2009, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1904-H1913[2009년 9월 18일 전자공개]). 또한, 예시적인 항-APLNR 항체는 수용체의 길항제이며, 망막 혈관 발달(RVD) 모델에서 측정되는 눈 혈관계에서 APLNR-매개된 항-혈관신생 효과를 나타낸다.
- [0181] 수용체의 길항제, 예컨대 아펠린-13을 그 C-말단 페닐알라닌(F)에서 알라닌(A)으로 개질하여 유도된 기능적 길항제(즉, 아펠린-13(F13A))는 APLNR의 강압 작용을 차단하는 것으로 나타났다(Lee, et al. *Endocrinol* 2005, 146(1):231-236).
- [0182] 아펠린 펩타이드는 지방 조직 증식을 통해 비만을 촉진할 수 있다. 아펠린은 저산소증에 의해 유도되며 증식하는 지방 조직의 저산소증 내부 내에서 혈관신생을 유도한다(Kunduzova O, et al., 2008, *FASEB J*, 22:4146-4153). 항-APLNR 항체는 조직 특이적 방식으로 상기 기전의 억제체로서 작용하며, 체중 감소를 촉진하거나 비만을 치료할 수 있다. 따라서, 항-APLNR 항체는 비만을 치료하고 체중 감소를 촉진하기 위해 투여될 수 있다.
- [0183] 망막에서 신생혈관화의 촉진 또는 종양 성장에 관여되는 병리적 혈관신생은 아펠린 또는 APLNR 길항제에 반응할 수 있다(Kojima, Y. and Quertermous, T., 2008, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28:1687-1688; Rayalam, S. et al. 2011, *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 6(3):367-72). 이와 같이, 항-APLNR 항체는 종양 성장 또는 전이를 지연시키거나 암 및 전이성 질환을 치료하기 위해 투여될 수 있다.
- [0184] 아펠린은 VEGF 및 GFAP의 진행성 과발현과 연관될 수 있어서, 당뇨병성 망막병증(DR)의 증식기로의 진행에서 아펠린-매개된 신호전달에 대한 역할을 제시한다. 항-APLNR 항체는 DR의 조기 예방 및 치료를 위해 투여될 수 있다(Lu, Q. et al, 2013, *PLoS One* 8(7):e69703).
- [0185] APLNR 길항제는 또한 병리적 질환에 의해 유도되는 과활성 아펠린 시스템의 효과를 완화시킴으로써, 예컨대 섬유성 조직에서 혈관신생을 감소시키고 기능을 개선할 수 있다(Principe, et al., 2008, *Hepatology*, 48(4):1193-1201; Reichenbach, et al., 2012, *JPET* 340(3):629-637). 임의의 하나의 이론에 의해 구애받지 않고, 아펠린 시스템의 차단, 예컨대 경화와 같은 병리적 병태에서 보수성 또는 반응성 공정에서 기관 또는 조직 내 과도한 섬유성 연결 조직의 형성을 지연할 수 있다. 이와 같이, 항-APLNR 항체는 섬유증의 진행을 지연 또는 예방하기 위해, 또는 섬유증을 치료하기 위해 투여되는 억제체로서 이용될 수 있다.
- [0186] 본 발명의 항체는 특히, APLNR 발현, 신호전달, 또는 활성과 연관되거나 매개되는, 또는 APLNR 및 APLNR 리간드(예로, 아펠린) 간 상호작용의 차단 또는 다르게는 APLNR 활성 및/또는 신호전달의 억제에 의해 치료 가능한 임의의 질환 또는 장애의 치료, 예방 및/또는 완화에 유용하다. 예를 들어, 본 발명은 비만, 암, 전이성 질환, 망막병증, 섬유증, 및 병리적 혈관신생으로 구성된 군으로부터 선택되는 질환 또는 장애의 치료 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, APLNR 조절물질은 체중 감소를 촉진한다. 또 다른 구현예에서, APLNR 조절물질은 병리적 혈관신생 또는 신생혈관화를 감소시킨다. 다른 구현예에서, APLNR 조절물질은 종양 성장을 감소시키거나 억제한다.
- [0187] 동물 모델 시스템을 이용하는 실험을 포함하는 다른 상황에서, 다양한 질환 및 병태의 치료는 APLNR 작용성 또는 부분 작용성에 의해 효과적인 것으로 나타났다. APLNR의 작용제, 예컨대 아펠린은 심혈관 병태의 관리를 위해, 예컨대 수축촉진제, 구체적으로 양성 수축촉진제가 투여되었다. 특정 이론에 구애받지 않고, 양성 수축촉진제는 심근 수축성을 증가시키며 병태, 예컨대 울혈성 심부전, 심근 경색, 심근병증 등에서 심장 기능을 지지하

기 위해 이용된다(Dai, et al., 2006, *Eur J Pharmacol* 553(1-3): 222-228; Maquire, et al, *Hypertension*. 2009;54:598-604; 및 Berry, M., et al., 2004 *Circulation*, 110:II187-II193 참고). 아펠린-유도된 혈관확장은 허혈증-재관류 부상에서 보호성일 수 있다. 아펠린 펩타이드에 의한 혈관신생의 촉진 및 더 큰 비누출성 혈관의 유도는 허혈증으로부터의 기능적 회복에 기여할 수 있다(Eyries M, et al., 2008, *Circ Res* 103:432-440; Kidoya H, et al., 2010, *Blood* 115:3166-3174).

[0188] 아펠린 수용체 작용제는 심장 출력을 증가시키거나, 심장 기능을 개선하거나, 심장 기능을 안정화하거나, 심장 기능의 감소를 제한하거나, 심장 또는 다른 조직의 허혈성 또는 손상된 영역에서 새로운 혈관 성장을 촉진하기 위해 투여되는 친-혈관신생제로 간주된다. 따라서, 본 발명의 작용성 APLNR 조절물질은 혈관신생을 촉진하고, 이에 따라 허혈증을 치료하고, 허혈성 기관 및 조직으로의 혈류를 복원하고, 예를 들어 수족 허혈증, 말초 허혈증, 신장 허혈증, 눈 허혈증, 뇌 허혈증, 또는 임의의 허혈성 질환을 치료하는데 유용하다.

[0189] 아펠린은 또한 비만 인슐린 내성 마우스에서 글루코스 관용성을 개선하고 근육 조직에 의한 글루코스 이용을 강화하는 것으로 나타났다(Dray et al., 2008, *Cell Metab* 8:437-445). 아펠린 KO 마우스는 감소된 인슐린 감수성을 갖는다(Yue et al., 2010, *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298:E59-E67). 이와 같이, 작용성 항체-아펠린 융합 단백질은 인슐린-내성 당뇨병의 치료에서 글루코스-관용성을 개선할 수 있고, 이에 따라 당뇨병에 관련된 대사성 병태의 관리를 위해 투여될 수 있다.

[0190] 근육 아펠린 mRNA 수준의 변화도 전신 인슐린 감수성 개선과 관련된다(Besse-Patin, A. et al., 2013 Aug 27, *Int J Obes(Lond)*. doi: 10.1038/ijo.2013.158, [인쇄 전에 전자공개됨]). 근육 조직, 및 아펠린-유도된 혈관 확장에서의 이러한 대사성 개선으로 인해, 작용성 항체-아펠린 융합 단백질은 또한 근육 성장 및 내구성을 자극하기 위해 투여될 수 있다.

[0191] 공-수용체 및 합성 아펠린 펩타이드가 CD4-APLNR-발현 세포 내로의 HIV-1 진입을 억제하였으므로, 일차 HIV-1 단리체도 APLNR을 이용할 수 있는 것으로 나타났다(Cayabyab, M., et al., 2000, *J. Virol.*, 74: 11972-11976). 작용성 항체-아펠린 융합 단백질은 또한 HIV 감염을 치료할 수 있다. 또한 아펠린 펩타이드가 신경 생존을 촉진하기 위한 신호 전달 경로를 통해 작용하는 아펠린-신경보호도 나타났다(Cheng, B, et al., 2012, *Peptides*, 37(1):171-3). 따라서, 항체-아펠린 융합 단백질은 신경 생존을 촉진하거나 증가시킬 수도 있고, 또는 신경 부상 또는 신경변성을 치료할 수도 있다. 아펠린 수용체 작용제는 일과성 열감 억제제로 기재되었으며 (2012년 10월 4일 공개된 WO2012/133825 참고), 이에 따라 본 발명의 항체-아펠린 융합 단백질은 또한 대상체에서 일과성 열감 증상을 치료하거나, 개선하거나, 억제하기 위해 투여될 수 있다.

[0192] 본 발명의 항체-융합 단백질은, 특히 APLNR 발현, 신호전달, 또는 활성의 활성화 또는 자극과 연관되거나 매개되는 임의의 질환 또는 장애의 치료, 예방 및/또는 완화에 유용하다. 예를 들어, 본 발명은 심혈관 질환, 급성 탈보상 심부전, 울혈성 심부전, 심근 경색, 심근병증, 허혈증, 허혈증/재관류 부상, 폐 고혈압, 당뇨병, 신경 부상, 신경변성, 일과성 열감 증상, 유체 항상성, 및 HIV 감염으로 구성된 군으로부터 선택되는 질환 또는 장애의 치료 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, APLNR 조절물질은 허혈증 및 재관류 부상을 치료하거나 완화하는데, 예컨대 허혈증/재관류(I/R) 부상을 제한하거나 심장 조직의 괴사 개시를 지연하는데 또는 예방적 치료를 제공하는데, 예를 들어 심장을 허혈증/재관류(I/R) 부상으로부터 보호하거나, 심장 기능을 개선하거나, 심근 경색의 발생을 제한하는데 유용하다.

[0193] 본원에 기재된 치료 방법의 맥락에서, APLNR 조절물질은 단일치료법으로(즉, 유일한 치료제로) 또는 하나 이상의 추가 치료제와의 조합으로(그 예는 본원에서 다른 곳에 기재됨) 투여될 수 있다.

[0194] 조합 치료법 및 제형

[0195] 본 발명에는 하나 이상의 추가적인 치료 활성 성분과의 조합으로 본원에 기재된 임의의 APLNR 조절물질을 포함하는 조성물 및 치료 제형, 그리고 이를 필요로 하는 대상체에 대한 이러한 조합의 투여 단계를 포함하는 치료 방법이 포함된다.

[0196] 본 발명의 APLNR 조절물질은, 예로 소-분자 혈관신생 억제제, 및 사이토카인, 예컨대 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-21, IL-23, IL-26에 결합하는 항체, 또는 이들 각 수용체의 길항제를 포함하는 VEGF 억제제와 공동-제형화되고/되거나 조합되어 투여될 수 있다. 다른 추가적인 치료 활성 성분에는 혈압 약제, 칼슘 채널 차단제, 디기탈리스, 항-부정맥제, ACE 억제제, 항-응고제, 면역억제제, 통증 완화제, 혈관확장제 등이 포함될 수 있다.

[0197] 추가적인 치료 활성 성분(들)은 본 발명의 APLNR 조절물질의 투여 직전, 이와 동시에, 또는 직후에 투여될 수

있다(본 개시의 목적을 위해, 이러한 투여 방식은 추가적인 치료 활성 성분"과 조합된" APLNR 조절물질의 투여로 간주됨). 본 발명에는 본 발명의 APLNR 조절물질이 본원에서 다른 곳에 기재되는 하나 이상의 추가적인 치료 활성 성분(들)과 공동-제형화되는 약학 조성물이 포함된다.

[0198] 투여 방식

[0199] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 다중 용량의 APLNR 조절물질(또는 APLNR 조절물질 및 본원에서 언급된 임의의 추가적인 치료 활성제의 조합을 포함하는 약학 조성물)은 정의된 시간 경과에 걸쳐 대상체에 투여될 수 있다. 본 발명의 상기 측면에 따른 방법은 대상체에 다중 용량의 본 발명의 APLNR 조절물질을 순차적으로 투여하는 단계를 포함한다. 본원에서 이용되는 "순차적으로 투여하는"은 각 용량의 APLNR 조절물질이 대상체로 상이한 시점에, 예로 소정 간격(예로 수 시간, 수 일, 수 주 또는 수 개월)에 의해 분리되는 상이한 날에 투여됨을 의미한다. 본 발명에는 환자에게 단일 1차 용량의 APLNR 조절물질, 이어서 하나 이상의 2차 용량의 APLNR 조절물질, 그리고 이어서 선택적으로 하나 이상의 3차 용량의 APLNR 조절물질을 순차적으로 투여하는 단계를 포함하는 방법이 포함된다.

[0200] 용어 "1차 용량", "2차 용량" 및 "3차 용량"은 본 발명의 APLNR 조절물질의 시간적 투여 순서를 나타낸다. 따라서, "1차 용량"은 치료 방식의 개시 시 투여되는 용량("기준선 용량"으로도 불림)이며; "2차 용량"은 1차 용량 후 투여되는 용량이고; "3차 용량"은 2차 용량 후 투여되는 용량이다. 1차, 2차, 및 3차 용량은 모두 동일한 양의 APLNR 조절물질을 함유할 수 있지만, 일반적으로 투여 빈도의 관점에서 서로 상이할 수 있다. 그러나 특정 구현예에서, 상기 1차, 2차, 및/또는 3차 용량에 함유되는 APLNR 조절물질의 양은 치료 과정 동안 서로 변한다(예로, 적절한 바에 따라 상향 또는 하향 조절됨). 특정 구현예에서, 2 개 이상의(예로, 2, 3, 4, 또는 5 개) 용량이 "로딩 용량"으로서 치료 방식의 개시 시 투여된 후, 덜 빈번한 기준으로 투여되는 후속 용량(예로, "관리 용량")이 투여된다.

[0201] 본 발명의 특정한 예시적 구현예에서, 각각의 2차 및/또는 3차 용량은 바로 앞 용량 후 1 내지 26(예로, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10, 10.5, 11, 11.5, 12, 12.5, 13, 13.5, 14, 14.5, 15, 15.5, 16, 16.5, 17, 17.5, 18, 18.5, 19, 19.5, 20, 20.5, 21, 21.5, 22, 22.5, 23, 23.5, 24, 24.5, 25, 25.5, 26, 26.5 이상의) 주에 투여된다. 본원에서 이용되는 어구 "바로 앞 용량"은 여러 투여 순서에서 환자에게 개재 용량 없이 순서에서 바로 다음 용량의 투여 전에 환자에게 투여된 APLNR 조절물질의 용량을 나타낸다.

[0202] 본 발명의 상기 측면에 따른 방법은 환자에게 임의의 수의 2차 및/또는 3차 용량의 APLNR 조절물질을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 예를 들어 특정 구현예에서, 하나의 2차 용량만 환자에게 투여된다. 다른 구현예에서, 2 개 이상의(예로, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 개 이상의) 2차 용량이 환자에게 투여된다. 마찬가지로 특정 구현예에서, 하나의 3차 용량만 환자에게 투여된다. 다른 구현예에서, 2 개 이상의(예로, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 개 이상의) 3차 용량이 환자에게 투여된다.

[0203] 다중 2차 용량이 관여되는 구현예에서, 각각의 2차 용량은 다른 2차 용량과 동일한 빈도로 투여될 수 있다. 예를 들어, 각각의 2차 용량은 환자에게 바로 앞 용량의 1 내지 2 주 또는 1 내지 2 개월 후 투여될 수 있다. 유사하게 다중 3차 용량이 관여되는 구현예에서, 각각의 3차 용량은 다른 3차 용량과 동일한 빈도로 투여될 수 있다. 예를 들어, 각각의 3차 용량은 환자에게 바로 앞 용량의 2 내지 12 주 후 투여될 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, 2차 및/또는 3차 용량이 환자에게 투여되는 빈도는 치료 방식의 과정에 걸쳐 변할 수 있다. 투여 빈도는 또한 임상 검사 후 개별 환자의 필요성에 따라 의사에 의해 치료 과정 동안 조정될 수 있다.

[0204] 본 발명에는 2 내지 6 개의 부하 용량이 환자에게 제1 빈도(예로, 1 주 1 회, 2 주 1 회, 3 주 1 회, 1 개월 1 회, 2 개월 1 회 등)로 투여된 후 환자에게 덜 빈번한 기준으로 2 개 이상의 관리 용량의 투여되는 투여 방식이 포함된다. 예를 들어, 본 발명의 상기 측면에 따르면, 부하 용량이 1 개월 1 회의 빈도로 투여되는 경우, 관리 용량은 6 주 1 회, 2 개월 1 회, 3 개월 1 회 등으로 환자에게 투여될 수 있다.

[0205] 항체의 진단적 이용

[0206] 본 발명의 항-APLNR 항체는 또한, 예로 진단 목적을 위해, 샘플 중 APLNR, 또는 APLNR-발현 세포를 검출하고/하거나 측정하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 항-APLNR 항체, 또는 이들의 단편은 APLNR의 부적절한 발현(예로, 과발현, 저발현, 발현 부재 등)을 특징으로 하는 병태 또는 질환을 진단하기 위해 이용될 수 있다. APLNR에 대한 예시적인 진단 분석은, 예로 환자로부터 수득되는 샘플을 본 발명의 항-APLNR 항체와 접촉시키는 단계를 포함할 수 있고, 여기서 항-APLNR 항체는 검출 가능한 표지 또는 리포터 분자로 표지된다. 본 발명의 항체-용합

단백질은 이러한 분석에서 채용될 수 있고, 여기서 아펠린 융합 성분 또는 항체 성분은 검출 가능한 표지 또는 리포터 분자로 표지된다. 대안적으로, 표지되지 않은 항-APLNR 항체는 그 자체가 검출 가능하게 표지되는 2차 항체와의 조합으로 진단 적용에서 이용될 수 있다. 검출 가능한 표지 또는 리포터 분자는 방사선동위원소, 예컨대 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , 또는 ^{125}I ; 형광 또는 화학발광 모이어티, 예컨대 플루오레신 이소티오시아네이트, 또는 로다민; 또는 효소, 예컨대 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 홀스래디쉬 퍼옥시다제, 또는 루시페라제일 수 있다. 샘플 중 APLNR을 검출하거나 측정하기 위해 이용될 수 있는 특정한 예시적 분석에는 효소-연관 면역흡착 분석(ELISA), 방사선면역분석(RIA), 및 형광-활성화 세포 정렬(FACS)이 포함된다.

[0207] 본 발명에 따른 APLNR 진단 분석에서 이용될 수 있는 샘플에는 정상 또는 병리적 조건 하에 검출 가능한 양의 APLNR 단백질, 또는 이들의 단편을 함유하는 환자로부터 획득 가능한 임의의 조직 또는 유체 샘플이 포함된다. 일반적으로, APLNR의 기준선 또는 표준 수준을 최초 구축하기 위해, 건강한 환자(예로, 비정상 APLNR 수준 또는 활성과 연관되는 질환 또는 병태를 겪지 않는 환자)로부터 획득되는 특정 샘플 중의 APLNR 수준이 측정될 것이다. 이어서 APLNR의 상기 기준선 수준이 APLNR 관련 질환 또는 병태를 갖는 것으로 추정되는 개인으로부터 획득되는 샘플 중에서 측정되는 APLNR 수준에 대해 비교될 수 있다.

[0208] 실시예

[0209] 하기 실시예는 본 발명의 방법 및 조성물을 어떻게 제조하고 이용하는지에 대한 전체 개시 및 설명을 당업자에게 제공하기 위해 주어지며, 본 발명자가 자신의 발명에 대해 간주하는 범위를 제한하려는 것이 아니다. 이용되는 수치(예로, 양, 온도 등)에 대해 정확성을 보장하기 위한 노력을 수행하였으나, 일부 실험 오차 및 일탈이 고려되어야 한다. 달리 나타내지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 평균 분자량이며, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압이나 그 근처이다.

[0210] 실시예 1. 인간 APLNR에 대한 인간 항체의 생성

[0211] 인간 APLNR을 포함하는 면역원을 인간 면역글로불린 중쇄 및 카파 경쇄 가변 영역을 인코딩하는 DNA를 포함하는 VELOCIMMUNE® 마우스로, 면역 반응을 자극하기 위한 보강제와 함께 직접 투여하였다. 항체 면역 반응을 항-APLNR 면역분석에 의해 모니터링하였다. 원하는 면역 반응이 달성되는 경우, 비장세포를 수확하고 마우스 골수 중 세포와 융합시켜 이들의 생활성을 보존하고 하이브리도마 세포주를 형성하였다. 하이브리도마 세포주를 스크리닝하고 선택하여 항-APLNR 항체를 생성하는 세포주를 확인하였다. 상기 기법을 이용해서, 몇몇 항-APLNR 키메라성 항체(즉, 인간 가변 도메인 및 마우스 불변 도메인을 보유하는 항체)를 획득하였다; 상기 방식으로 생성된 예시적인 항체를 하기와 같이 명명하였다: H1M9207N, H2aM9230N, 및 H2aM9232N. 이어서 키메라성 항체로부터의 인간 가변 도메인을 인간 불변 도메인 상으로 클로닝하여 본원에서 기재되는 완전 인간 항-APLNR 항체를 제조하였다.

[0212] 항-APLNR 항체를 또한, 2007년 12월 6일에 공개된 US 특허 출원 공개 번호 2007/0280945A1에 기재되는 골수종 세포로의 융합 없이, 항원-양성 B 세포로부터 직접 단리하였다. 상기 방법을 이용하여, 몇몇 완전 인간 항-APLNR 항체(즉, 인간 가변 도메인 및 인간 불변 도메인을 보유하는 항체)를 획득하였다; 상기 방식으로 생성된 예시적인 항체를 하기와 같이 명명하였다: H4H9092P, H4H9093P, H4H9101P, H4H9103P, H4H9104P, H4H9112P, 및 H4H9113P.

[0213] 본 실시예의 방법에 따라 생성된 예시적인 항-APLNR 항체의 특정한 생물학적 특성이 아래에 나타난 실시예에서 상세히 기재된다.

[0214] 실시예 2. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열

[0215] 표 1은 선택된 항-APLNR 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 쌍, 및 CDR 서열 그리고 이들의 대응하는 항체 식별자를 나타낸다.

표 1

항체 명칭	서열 목록 번호							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M9207N	2	4	6	8	10	12	14	16
H2aM9209N	18	20	22	24	26	28	30	32
H2aM9222N	34	36	38	40	42	44	46	48
H2aM9227N	50	52	54	56	58	60	62	64
H2aM9228N	66	68	70	72	74	76	78	80
H2aM9230N	82	84	86	88	90	92	94	96
H2aM9232N	98	100	102	104	106	108	110	112
H4H9092P	114	116	118	120	122	124	126	128
H4H9093P	130	132	134	136	138	140	142	144
H4H9101P	146	148	150	152	154	156	158	160
H4H9103P	162	164	166	168	170	172	174	176
H4H9104P	178	180	182	184	186	188	190	192
H4H9112P	194	196	198	200	202	204	206	208
H4H9113P	210	212	214	216	218	220	222	224

항체는 전형적으로 하기 명명법에 따라 본원에서 불린다: Fc 접두어(예로 "H1M" 또는 "H4H")에 이어, 수치 식별자(예로, 표 1에 나타내는 "9207", "9209" 또는 "9230"), 이어서 "P" 또는 "N" 접미사. 따라서, 상기 명명법에 따르면, 본원에서 항체는, 예로 "H1M9207N", "H2aM9209N", "H4H9113P" 등으로 불릴 수 있다. 본원에서 이용되는 항체 명칭에서의 H1M, H2aM, 및 H4H 접두어는 항체의 특정 Fc 영역 이소형을 시사한다. 예를 들어, "H1M" 항체는 마우스 IgG1 Fc를 가지며, "H2aM" 항체는 마우스 IgG2a Fc를 가지는 반면, "H4H" 항체는 인간 IgG4 Fc를 갖는다. 당업자에 의해 이해될 바와 같이, 특정 Fc 이소형을 갖는 항체는 상이한 Fc 이소형을 갖는 항체로 전환될 수 있지만(예로, 마우스 IgG1 Fc를 갖는 항체가 인간 IgG4를 갖는 항체로 전환될 수 있는 등), 어느 경우에도, 가변 도메인(CDR 포함) - 표 1에 나타난 수치 식별자로 나타냄 - 은 동일하게 유지될 것이고, 결합 특성은 Fc 도메인의 성질과 무관하게 동일하거나 실질적으로 유사할 것으로 예상된다. 하나의 예에서, H2aM9209N으로 명명된 항체는 인간 IgG4 Fc 도메인을 갖도록 조작되었다. 따라서 본원에서 H4H9209N으로 명명된 항체는 인간 IgG4 도메인을 가지고 동일한 중쇄(HC) 또는 경쇄(LC)를 가지며, 이에 따라 항체 H2aM9209N와 실질적으로 동일한 결합 및 세포 활성 특징을 갖는다.

실시예 3. 항체-융합 단백질의 생성

본 발명의 항체 융합 단백질을 인코딩하는 핵산을 제조하기 위해, 선택된 항-APLNR 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 쌍, 및 CDR 서열을 폴리머라제 연쇄 반응을 통해 증폭하고, 중쇄(HC) 또는 경쇄(LC)를 아펠린-13(서열 목록 번호 228)을 인코딩하는 서열, 또는 개질된 아펠린 펩타이드, 예컨대 C-말단 절단된 아펠린-Cter9(서열 목록 번호 270), 아펠린-Cter10(서열 목록 번호 271), 또는 아펠린-Cter11(서열 목록 번호 262)로 결합하였다. 표 2A 및 표 2B의 아펠린-함유 항체-융합 단백질을 인코딩하는 인접 핵산 서열을 표준 PCR 및 제한 엔도뉴클레아제 클로닝 기법을 이용해서 발현 벡터 내로 클로닝하였다.

표 2A는 선택된 항체-융합 단백질의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 쌍, 중쇄 Fc 영역, 및 아펠린 융합 패턴, 그리고 이들의 대응하는 항체-융합물 명명을 나타낸다. 일부 예시된 항체-융합 단백질에서, 아펠린 펩타이드는 중쇄 가변 영역(HCVR)으로 융합되며, 다른 예에서, 아펠린 펩타이드는 경쇄 가변 영역(LCVR) 또는 경쇄(경쇄 불변 영역을 포함할 수도 포함하지 않을 수도 있음)로 융합된다. 일부 예에서, 아펠린 펩타이드는 링커를 통해 폴리펩타이드로 융합된다. 표 2B는 특정한 예시된 서열 쌍을 예시하며, 예를 들어 중쇄 또는 경쇄 서열이 아펠린 서열로 융합된다(융합물).

[0222]

표 2A

항체-융합물 명칭	HCVR 서열 목록 번호	HC 불변 영역	LCVR 서열 목록 번호	LC 또는 HC로 융합된 아펠린-13(서열 목록 번호 228)
H4H9093P-1-NVK3	130	인간 IgG4 Fc	138	(G4S)3 링커 함유 N-말단 LC
H4H9093P-2-CVK3	130	인간 IgG4 Fc	138	(G4S)3 링커 함유 C-말단 LC
H4H9093P-3-NVH3	130	인간 IgG4 Fc	138	(G4S)3 링커 함유 N-말단 HC
H4H9093P-4-NVH0	130	인간 IgG4 Fc	138	링커 비함유 N-말단 HC
H4H9093P-5-NVH1	130	인간 IgG4 Fc	138	G4S 링커 함유 N-말단 HC
H4H9093P-6-NVH2	130	인간 IgG4 Fc	138	(G4S)2 링커 함유 N-말단 HC
H4H9092P-1-NVH3	114	인간 IgG4 Fc	122	(G4S)3 링커 함유 N-말단 HC
H4H9092P-2-NVK3	114	인간 IgG4 Fc	122	(G4S)3 링커 함유 N-말단 LC
H4H9092P-3-CVK3	114	인간 IgG4 Fc	122	(G4S)3 링커 함유 C-말단 LC
H4H9209N-1-NVH0	18	인간 IgG4 Fc	26	링커 비함유 N-말단 HC
H4H9209N-2-NVH1	18	인간 IgG4 Fc	26	G4S 링커 함유 N-말단 LC
H4H9209N-3-NVH2	18	인간 IgG4 Fc	26	(G4S)2 링커 함유 N-말단 HC
H4H9209N-4-NVH3	18	인간 IgG4 Fc	26	(G4S)3 링커 함유 N-말단 HC
항체-융합물 명칭	HCVR 서열 목록 번호	HC 불변 영역	LCVR 서열 목록 번호	HC로 융합된 개질된 아펠린
H4H9093P-APX9-(G4S)3	130	인간 IgG4 Fc	138	(G4S)3 링커 함유 아펠린-Cter9(서열 목록 번호 270) N-말단 HC 융합물
H4H9093P-APX10- (G4S)3	130	인간 IgG4 Fc	138	(G4S)3 링커 함유 아펠린- Cter10(서열 목록 번호 271) N-말단 HC 융합물
H4H9093P-APX11- (G4S)3	130	인간 IgG4 Fc	138	(G4S)3 링커 함유 아펠린- Cter11(서열 목록 번호 262) N-말단 HC 융합물
H4H9093P-APX11+S- (G4S)3	130	인간 IgG4 Fc	138	(G4S)3 링커 함유 아펠린- Cter11+S(서열 목록 번호 272) N- 말단 HC 융합물
H4H9093P-APXV5-11- (G4S)3	130	인간 IgG4 Fc	138	(G4S)3 링커 함유 아펠린-V5링커- Cter11(서열 목록 번호 273) N-말단 HC 융합물
H4H9209N-APX9-(G4S)3	18	인간 IgG4 Fc	26	(G4S)3 링커 함유 아펠린-Cter9(서열 목록 번호 270) N-말단 HC 융합물
H4H9209N-APX10- (G4S)3	18	인간 IgG4 Fc	26	(G4S)3 링커 함유 아펠린- Cter10(서열 목록 번호 271) N-말단 HC 융합물
H4H9209N-APX11- (G4S)3	18	인간 IgG4 Fc	26	(G4S)3 링커 함유 아펠린- Cter11(서열 목록 번호 262) N-말단 HC 융합물
H4H9209N-APX11+S- (G4S)3	18	인간 IgG4 Fc	26	(G4S)3 링커 함유 아펠린- Cter11+S(서열 목록 번호 272) N- 말단 HC 융합물

[0223]

[0224] 표 2B

항체-융합물 명칭	아미노산 서열 쌍	
	HCVR 융합물 또는 HCVR 서열 목록 번호	LC 융합물, LCVR 융합물 또는 LCVR 서열 목록 번호
H4H9093P-1-NVK3	130(HCVR)	235(LCVR 융합물)
H4H9093P-2-CVK3	130(HCVR)	237(LC 융합물)
H4H9093P-3-NVH3	239(HCVR 융합물)	138(LCVR)
H4H9093P-4-NVH0	241(HCVR 융합물)	138(LCVR)
H4H9093P-5-NVH1	243(HCVR 융합물)	138(LCVR)
H4H9093P-6-NVH2	245(HCVR 융합물)	138(LCVR)
H4H9092P-1-NVH3	247(HCVR 융합물)	122(LCVR)
H4H9092P-2-NVK3	114(HCVR)	249(LCVR 융합물)
H4H9092P-3-CVK3	114(HCVR)	251(LC 융합물)
H4H9209N-1-NVH0	253(HCVR 융합물)	26(LCVR)
H4H9209N-2-NVH1	255(HCVR 융합물)	26(LCVR)
H4H9209N-3-NVH2	257(HCVR 융합물)	26(LCVR)
H4H9209N-4-NVH3	259(HCVR 융합물)	26(LCVR)
H4H9093P-APN9-(G4S)3	274(HCVR 융합물)	138(LCVR)
H4H9093P-APN10-(G4S)3	275(HCVR 융합물)	138(LCVR)
H4H9093P-APN11-(G4S)3	276(HCVR 융합물)	138(LCVR)
H4H9093P-APN11+S-(G4S)3	277(HCVR 융합물)	138(LCVR)
H4H9093P-APNV5-11-(G4S)3	278(HCVR 융합물)	138(LCVR)
H4H9209N-APN9-(G4S)3	279(HCVR 융합물)	26(LCVR)
H4H9209N-APN10-(G4S)3	280(HCVR 융합물)	26(LCVR)
H4H9209N-APN11-(G4S)3	281(HCVR 융합물)	26(LCVR)
H4H9209N-APN11+S-(G4S)3	282(HCVR 융합물)	26(LCVR)

[0225]

[0226] 이들 방법에 따라 생성된 예시적인 항체-융합 단백질의 특정한 생물학적 특성이 아래에 나타난 실시예에 상세히 기재된다.

[0227] **실시예 4. FACS 분석에 의해 결정되는 인간 APLNR에 대한 항체 및 항체-융합 단백질 결합**

[0228] 정제된 항-APLNR 모노클로날 항체로의 인간 APLNR 결합에 대한 결합 비를 형광-활성화 세포 정렬(FACS) 결합 분석에 의해 결정하였다. 루시퍼라제 리포터[cAMP 반응 요소(CRE, 4X)-루시퍼라제-IRES-GFP]와 함께 전장 인간 APLNR(hAPLNR; 서열 목록 번호 225) 또는 전장 사이노물구스 APLNR(MfAPLNR; 서열 목록 번호 226)을 안정적으로 발현하는 HEK293 세포주를 널리 공지된 방법에 의해 생성하였다. 생성된 안정한 세포주, HEK293/CRE-luc/hAPLNR 및 HEK293/CRE-luc/MfAPLNR을 hAPLNR 세포에 대해 100 µg/mL 하이그로마이신 B 또는 MfAPLNR 세포에 대해 500 µg/mL G418과 함께 10% FBS, NEAA, 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 중에 유지하였다.

[0229] FACS 분석을 위해, HEK293 모체, HEK293/CRE-luc/hAPLNR, 및 HEK293/CRE-luc/mfAPLNR 세포를 효소 비함유 해리 시약(#S-004, Millipore, Billerica, MA, USA)을 이용해서 해리하였고, 10⁶ 세포/웰을 1% FBS 함유 PBS 중 96-웰 v-형 바닥 플레이트 상에 평판중하였다. 이어서 세포를 4°C에서 30 분 동안 10 µg/mL의 항-APLNR 항체 또는 음성 이소형 대조군 항체와 인큐베이션한 뒤 1% FBS 함유 PBS로 세정하고, 4°C에서 30 분 동안 Alexa 647이 접합된 항-마우스 IgG 항체(#115-607-003, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) 또는 Alexa 488이 접합된 항-인간 IgG 항체(#109-547-003, Jackson ImmunoResearch) 4 µg/mL과 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 여과하고 Accuri 유세포측정기(BD Biosciences, San Jose, CA, USA) 상에서 분석하였다. 비염색 및 2차 항체 단독 대조군을 또한 모든 세포주로의 결합에 대해 시험하였다. 결과를 FlowJo version 9.52 소프트웨어(Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA)를 이용해서 분석하고, 생활성 세포에 대한 기하 평균 형광을 결정하였다. 그 뒤, 각 항체에 대한 기하 평균(Geom. 평균) 형광을 각 세포 유형: HEK293(모체), HEK293/CRE-luc/hAPLNR 및 HEK293/CRE-luc/MfAPLNR 별로 항체의 상대 결합(결합 비)을 수득하기 위해 비염색 세포의 기하 평균에 대해 정상화하였다.

[0230] 상이한 항-APLNR 모노클로날 항체에 대한 결합 비를 표 3 및 4에 나타낸다. 표 3에 나타난 바와 같이, 7 개의 항-APLNR 항체는 HEK293/CRE-luc/hAPLNR 세포로 452 내지 4098 배 범위의 결합 비로, 그리고 HEK293/CRE-luc/MfAPLNR 세포로 31 내지 1438 배 범위의 결합 비로 결합하였다. 시험한 항-APLNR 항체는 HEK293 모체 세포

로 2 내지 9 배 범위의 결합 비로 결합하였다. 항-마우스 IgG 2차 항체 단독 및 마우스 IgG(mIgG) 대조군 항체는 1 내지 7 배 범위의 결합 비로 세포에 결합하였다. 표 4에 나타난 바와 같이, 7 개의 추가적인 항-APLNR 항체는 HEK293/CRE-luc/hAPLNR 세포로 2 내지 61 배 범위의 결합 비로, 그리고 HEK293/CRE-luc/MfAPLNR 세포로 1 내지 31 배 범위의 결합 비로 결합하였다. 시험한 항-APLNR 항체는 HEK293 모체 세포로 1 내지 3 배 범위의 결합 비로 결합하였다. 항-인간 IgG 2차 항체 단독 및 이소형 대조군 항체는 세포로 1 내지 2 배 범위의 결합 비로 결합하였다.

표 3: HEK293, HEK293/CRE-luc/hAPLNR 및 HEK293/CRE-luc/MfAPLNR 세포주에 대한 항-APLNR 항체의 결합.

항체	비염색 세포에 대한 기하 평균 결합 비		
	HEK293 모체	293/Cre-luc/hAPLNR	293/Cre-luc/MfAPLNR
H1M9207N	4	2179	1307
H2aM9209N	9	1643	818
H2aM9222N	2	452	31
H2aM9227N	4	4098	1438
H2aM9228N	3	1491	108
H2aM9230N	3	2938	658
H2aM9232N	6	2857	678
mIgG 대조군	2	7	6
2차 항체 단독	2	4	3
비염색	1	1	1

표 4: HEK293, HEK293/CRE-luc/hAPLNR 및 HEK293/CRE-luc/MfAPLNR 세포주에 대한 항-APLNR 항체의 결합.

항체	비염색 세포에 대한 기하 평균 결합 비		
	HEK293 모체	293/Cre-luc/hAPLNR	293/Cre-luc/MfAPLNR
H4H9092P	3	37	20
H4H9093P	3	61	31
H4H9101P	1	3	2
H4H9103P	2	3	2
H4H9104P	1	2	1
H4H9112P	1	2	2
H4H9113P	1	2	1
이소형 대조군	1	2	2
2차 항체 단독	1	2	2
비염색	1	1	1

표 3 및 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 몇몇 항-APLNR 항체는 APLNR에 특이성을 가지고 결합한다.

또한, 이들의 N- 또는 C-말단에 융합된 아펠린을 함유하는 13 개 항체를 HEK293/CRE-luc/hAPLNR 및 HEK293/CRE-luc/MfAPLNR 세포에 결합하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 표 5에 나타난 바와 같이, 그 N- 또는 C-말단에 융합된 아펠린을 함유하는 H4H9093P는 HEK293/CRE-luc/hAPLNR 세포로 31 내지 151 배 범위의 결합 비로, 그리고 HEK293/CRE-luc/MfAPLNR 세포에 16 내지 54 배 범위의 결합 비로 결합을 나타낸 반면, 모체 항체, H4H9093P는 HEK293/CRE-luc/hAPLNR 세포에 61 배의 결합비로, 그리고 HEK293/CRE-luc/MfAPLNR 세포로 31 배의 결합 비로 결합하였다. 표 5에 나타난 바와 같이, 그 N- 또는 C-말단에 융합된 아펠린을 함유하는 H4H9092P는 HEK293/CRE-luc/hAPLNR 세포로 16 내지 79 배 범위의 결합 비로, 그리고 HEK293/CRE-luc/MfAPLNR 세포로 6 내지 31 배 범위의 결합 비로 결합을 나타낸 반면, 모체 항체, H4H9092P는 HEK293/CRE-luc/hAPLNR 세포로 37 배의 결합 비로 그리고 HEK293/CRE-luc/MfAPLNR 세포로 20 배의 결합 비로 결합하였다. 표 5에 나타난 바와 같이, 그 N-말단에 융합된 아펠린을 함유하는 H4H9209N은 HEK293/CRE-luc/hAPLNR 세포로 106 내지 121 배 범위의 결합 비로 그리고 HEK293/CRE-luc/MfAPLNR 세포로 43 내지 52 배 범위의 결합 비로 결합을 나타낸 반면, 모체 항체, H4H9209N은 HEK293/CRE-luc/hAPLNR 세포로 82 배의 결합 비로 그리고 HEK293/CRE-luc/MfAPLNR 세포로 42 배의 결합 비로 결합하였다.

항체-아펠린 융합물 및 대조군 항체는 상기 분석에서 HEK293 모체 세포로 2 내지 16 배 범위의 결합 비로 결합을 나타내었다. 항-인간 IgG 2차 항체 단독, N-말단에서 아펠린에 융합된 항-myc 항체, 및 이소형 대조군 항체는 세포에 1 내지 12 배 범위의 결합 비로 결합하였다.

[0238] 표 5: HEK293, HEK293/CRE-luc/hAPLNR 및 HEK293/CRE-luc/MfAPLNR 세포주에 대한 항체-융합 단백질의 결합.

모체 항체	개질의 설명	비염색 세포의 기하 평균 결합 비		
		HEK293 모체	293/Cre-luc/hAPLNR	293/Cre-luc/MfAPLNR
H4H9093P	개질 비함유	3	61	31
H4H9093P-1-NVK3	(G4S)3 링커 함유 Nter Vk 융합물	2	31	16
H4H9093P-2-CVK3	(G4S)3 링커 함유 Cter Vk 융합물	3	60	28
H4H9093P-3-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	3	130	49
H4H9093P-4-NVH0	링커 비함유 Nter VH 융합물	4	140	52
H4H9093P-5-NVH1	G4S 링커 함유 Nter VH 융합물	3	151	54
H4H9093P-6-NVH2	(G4S)2 링커 함유 Nter VH 융합물	3	139	47
H4H9092P	개질 비함유	3	37	20
H4H9092P-1-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	2	79	31
H4H9092P-2-NVK3	(G4S)3 링커 함유 Nter Vk 융합물	2	16	6
H4H9092P-3-CVK3	(G4S)3 링커 함유 Cter Vk 융합물	2	31	15
H4H9209N	개질 비함유	16	82	42
H4H9209N-1-NVH0	링커 비함유 Nter VH 융합물	9	106	43
H4H9209N-2-NVH1	G4S 링커 함유 Nter VH 융합물	15	107	51
H4H9209N-3-NVH2	(G4S)2 링커 함유 Nter VH 융합물	12	121	52
H4H9209N-4-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	14	121	51
항-myc 9E10	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	1	12	3
	이소형 대조군	1	2	2
	2차 항체 단독	1	2	2
	비염색	1	1	1

[0239]

[0240] 표 5에 나타난 바와 같이, 본 발명의 몇몇 항체-융합 단백질은 APLNR에 특이성을 가지고 결합한다.

[0241] 실시예 5. 항-APLNR 항체가 APLNR을 통해 세포 신호전달을 조정함

[0242] 항-APLNR 항체가 hAPLNR-매개된 세포 신호전달을 활성화하는 능력을 고리형 AMP 분석을 이용해서 측정하였다. hAPLNR은 7-막통과 G-단백질 커플링된 수용체(GPCR)이다. 그 내인성 리간드, 아펠린에 의해 활성화되는 경우, 이는 cAMP 생성을 억제하여, 억제성 G-단백질(G_i)에 커플링됨을 시사한다(Pitkin et al, 2010, *Pharmacol. Rev.* 62(3):331-342). 아펠린은 프리프로펩타이드로부터 여러 이소형으로 가공되고, 피로글루타밀 아펠린-13, (Pyr¹)아펠린-13(본 실시예에서 '아펠린'으로 불림)이 hAPLNR을 활성화하는 것으로 공지된 더 강력한 이소형 중 하나이다.

[0243] HEK293 세포주를 루시퍼라제 리포터와 함께 전장 인간 hAPLNR(접근 번호 NP_005152.1의 아미노산 1-380; 서열 목록 번호 225)을 안정적으로 발현하도록 전달감염하였다[cAMP 반응 요소(CRE, 4X)-루시퍼라제-IRES-GFP]. 생성 세포주, HEK293/CRE-luc/hAPLNR을 10% FBS, NEAA, 페니실린/스트렙토마이신 및 100 μ g/mL 하이그로마이신 B를 함유하는 DMEM 중에 유지하였다.

[0244] hAPLNR에 의한 G_i -커플링된 활성화를 시험하기 위해, HEK293/CRE-luc/hAPLNR 세포를 0.1% FBS, 페니실린/스트렙토마이신, 및 L-글루타민을 함유하는 OPTIMEM(Invitrogen, #31985-070) 중 20,000 세포/웰로 96-웰 분석 플레이트 상에 접종하고, 하룻밤 동안 5% CO₂ 중 37°C에서 인큐베이션하였다. 다음 날 아침에, 폴스콜린-유도된 cAMP의 억제를 통해 hAPLNR 활성화를 측정하기 위해, 아펠린((Pyr¹)아펠린-13, Bachem, # H-4568)을 100 nM부터 0.002 nM까지 연속 희석하고(1:3) (아펠린 비함유 대조군 샘플 포함), 세포에 5 μ M, 7.5 μ M, 또는 10 μ M 폴스콜린(Sigma, # F6886)을 첨가하였다. 항체 또는 아펠린-항체 융합물(또한 실시예 9 참고)이 hAPLNR을 활성화하는 능력을 측정하기 위해, 항체를 500 nM부터 0.03 nM까지 1:3으로, 100 nM부터 0.002 nM까지 1:3으로, 100 nM부터 0.0001 nM까지 1:4로, 또는 10 nM부터 0.00001 nM까지 1:4로 연속 희석한 뒤 5 μ M, 7.5 μ M, 또는 10 μ M 폴스콜린과 혼합하고, 세포에 외인성 아펠린 없이 첨가하였다. 항체 시험에는 항체 대조군이 포함되지 않았다. 항체 또는 아펠린-항체 융합물이 hAPLNR을 억제하는 능력을 측정하기 위해, 항체 대조군을 포함하지 않고 항체를 500 nM부터 0.03 nM까지, 또는 100 nM부터 0.002 nM까지 1:3으로, 100 nM부터 .0001 nM까지 1:4로, 또는 10 nM부터 .00001 nM까지 1:4로 연속 희석하고, 1 시간 동안 실온에서 세포와 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 5 μ M 폴스콜린 및 100 pM 아펠린과의 혼합물을 세포에 첨가하였다. 루시퍼라제 활성은 37°C 및 5% CO₂ 중 5.5 시간 인큐베이션 후 Victor X 장비(Perkin Elmer) 상에서 OneGlo 기질(Promega, # E6051)의 첨가에 의

해 검출되었다.

[0245] 모든 분석 결과를 Prism 5 소프트웨어(GraphPad) 내에서 비선형 회귀(4-과라미터 로지스틱)를 이용해서 분석하였다. 항체에 의한 활성화를 아펠린 용량 반응에서 나타나는 최대 활성화 백분율로 산출하였다. 항체에 의한 억제율을 0 - 100 pM 아펠린의 RLU 범위 백분율로 각 항체에 대해 최대 및 최소 RLU 간 차이로 산출하였다.

[0246] 개질되지 않은 항-APLNR 항체를 HEK293/CRE-luc/hAPLNR 세포에서 폴스콜린 활성화의 조절을 측정함으로써 hAPLNR을 활성화하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 표 6A에 나타낸 바와 같이, 아펠린 없이 시험했을 때, 개질되지 않은 14 개의 항-APLNR 항체 중 13 개는 시험한 최대 항체 용량 100 nM에서 hAPLNR의 활성화를 나타내지 않은 반면, 하나의 항체, H2aM9227N은 100 nM에서 12%의 최대 아펠린 활성화를 나타내었다. 표 6B에 나타낸 바와 같이, 아펠린 없이 시험된 경우, 개질되지 않은 5 개의 항-APLNR 항체 중 4 개는 시험한 최대 항체 용량 500 nM에서 21 내지 52%의 최대 아펠린 활성화를 나타낸 반면, 하나의 항체, H2aM9232N은 시험한 어느 농도에서도 hAPLNR의 임의의 측정 가능한 활성화를 나타내지 않았다. 아펠린 단독은 표 6A 및 6B에 나타낸 바와 같이, 35 pM 내지 44 pM 범위의 EC₅₀ 값으로 hAPLNR을 활성화하였다. 이소형 대조군 항체는 어느 것도 임의의 hAPLNR 활성화를 나타내지 않았다.

[0247] 개질되지 않은 항-APLNR 항체를 100 pM 아펠린의 존재 하에 HEK293/CRE-luc/hAPLNR 세포에서 폴스콜린 활성화의 조절을 측정함으로써 hAPLNR을 억제하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 표 6C 및 6D에 나타낸 바와 같이, 아펠린의 존재 하에 시험한 경우, 몇몇 개질되지 않은 항-APLNR 항체는 100 pM 아펠린 활성화의 26 내지 98% 억제(2.4 nM 내지 100 nM 초과 범위의 IC₅₀ 값)를 나타내었다. 시험한 3 개 항체, H2aM9209N, H2aM9222N, 및 H4H9093P는 6 내지 11% 범위의 아펠린의 약한 최대 차단을 나타내지만, IC₅₀ 값은 결정할 수 없었다. 시험한 6 개 항체(H4H9092P, H4H9101P, H4H9103P, H4H9104P, H4H9112P, 및 H4H9113P)는 hAPLNR 신호전달의 임의의 측정 가능한 차단을 나타내지 않았다. 아펠린 단독은 표 6C 및 6D에 나타낸 바와 같이, 41 pM 내지 44 pM 범위의 EC₅₀ 값으로 hAPLNR을 활성화하였다. 이소형 대조군 항체 중 어느 것도 임의의 hAPLNR 억제를 나타내지 않았다.

[0248] 표 6A: 100 nM의 개질되지 않은 항-APLNR 항체에 의한 hAPLNR의 활성화

폴스콜린을 이용한 아펠린의 EC ₅₀ (M)	3.5E-11 (10 uM 폴스콜린에서)	4.4E-11 (5 uM 폴스콜린에서)
시험한 항체	100 nM mAb(10 uM 폴스콜린)에서 활성화%	100 nM mAb(5 uM 폴스콜린)에서 활성화%
H1M9207N	활성화 없음	시험하지 않음
H2aM9209N	활성화 없음	시험하지 않음
H2aM9222N	활성화 없음	시험하지 않음
H2aM9227N	12%	시험하지 않음
H2aM9228N	활성화 없음	시험하지 않음
H2aM9230N	활성화 없음	시험하지 않음
H2aM9232N	활성화 없음	시험하지 않음
H4H9092P	시험하지 않음	활성화 없음
H4H9093P	시험하지 않음	활성화 없음
H4H9101P	시험하지 않음	활성화 없음
H4H9103P	시험하지 않음	활성화 없음
H4H9104P	시험하지 않음	활성화 없음
H4H9112P	시험하지 않음	활성화 없음
H4H9113P	시험하지 않음	활성화 없음
이소형 대조군 1	활성화 없음	시험하지 않음
이소형 대조군 2	시험하지 않음	활성화 없음

[0249]

[0250] 표 6B: 500 nM의 개질되지 않은 항-APLNR 항체에 의한 hAPLNR의 활성화

폴스콜린을 이용한 아펠린의 EC ₅₀ (M)	6.3E-12 (7.5 uM 폴스콜린에서)
시험한 항체	500 nM mAb(7.5 uM 폴스콜린)에서 활성화%
H2aM9222N	21%
H2aM9227N	45%
H2aM9228N	49%
H2aM9230N	52%
H2aM9232N	활성화 없음
이소형 대조군 1	활성화 없음

[0251]

[0252] 표 6C: 개질되지 않은 항-APLNR 항체에 의한 hAPLNR의 억제

폴스콜린을 이용한 아펠린의 EC ₅₀ (M)	4.1E-11 (5 uM 폴스콜린에서)
시험한 항체	100 pM 아펠린(5 uM 폴스콜린)의 존재 하에 100 nM 항체의 억제%(IC ₅₀ [M])
H1M9207N	83%(3.0E-09)
H2aM9209N	7%(IC)
H2aM9222N	11%(IC)
H2aM9227N	33%(4.3E-09)
H2aM9228N	26%(>1.0E-07)
H2aM9230N	49%(2.4E-09)
H2aM9232N	98%(4.2E-09)
이소형 대조군 1	억제 없음

[0253]

IC=IC₅₀ 값을 결정할 수 없음

[0254]

표 6D: 개질되지 않은 항-APLNR 항체에 의한 hAPLNR의 억제

폴스콜린을 이용한 아펠린의 EC ₅₀ (M)	4.4E-11 (5 uM 폴스콜린에서)
시험한 항체	100 pM 아펠린(5 uM 폴스콜린)의 존재 하에 100 nM 항체의 억제%
H4H9092P	억제 없음
H4H9093P	6%
H4H9101P	억제 없음
H4H9103P	억제 없음
H4H9104P	억제 없음
H4H9112P	억제 없음
H4H9113P	억제 없음
이소형 대조군 2	억제 없음

[0255]

[0256] 실시예 6. pERK 분석에서 측정되는 항-APLNR 항체에 의한 APLNR-매개된 수용체 신호전달

[0257] APLNR 신호전달 경로 상에서 본 발명의 항-APLNR 항체의 효과를 추가로 측정하기 위해, APLNR 발현 세포주로부터 인산화된 ERK1/2(pERK1/2) 및 총 ERK의 양을 정량하기 위한 분석(본원에서 "pERK 분석"으로 불림)을 이용하였다. 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주를 전달감염시켜 전장 인간 APLNR(hAPLNR; 서열 목록 번호 225)을 안정적으로 발현시켰다. 생성 세포주, CHO/hAPLNR을 10% FBS, 페니실린/스트렙토마이신, L-글루타민, 및 250 µg/mL 하이그로마이신 B를 함유하는 Ham's F12 중에 유지하였다.

[0258] 분석을 위해, CHO/hAPLNR 세포를 10% FBS, 페니실린/스트렙토마이신, L-글루타민, 및 250 µg/mL 하이그로마이신

B를 함유하는 Ham's F12 중에 10,000 세포/웰로 96 웰 분석 플레이트 상에 접종하였다. 다음날, APLNR의 발현을 유도하고 pERK 분석용 세포를 제조하기 위해, 플레이트를 세정한 후 1% BSA, 0.1% FBS, 페니실린/스트렙토마이신, L-글루타민 및 0.5 µg/mL 독시사이클린을 함유하는 Ham's F12 중에 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 다시 세정한 뒤 1×10^{-6} 내지 1×10^{-13} M 범위의 항-APLNR 항체, 아펠린-13 펩타이드(Celtek Peptides 맞춤 합성, Lot# 110712), 또는 이소형 대조군 항체의 연속 희석물을 세포에 첨가하였다. 세포를 15 분 동안 5% CO₂ 중 37°C에서 인큐베이션하였다. 그 뒤 세포를 세정하고, ELISAone 용해 완충액 믹스(Cat. #EBF001, TGR BioSciences, Adelaide, Australia)를 플레이트에 첨가하고 300 rpm에서 진탕하면서 10 분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 이어서 40 µl의 세포 용해액을 하나는 pERK1/2를 측정하기 위한, 그리고 또 하나는 총 ERK를 측정하기 위한 각각의 ELISA 플레이트로 전달하였다. pERK1/2를 검출하기 위한 ELISA(ELISAone #EKT001, TGR BioSciences), 그리고 총 ERK를 검출하기 위한 ELISA(ELISAone #EKT011, TGR BioSciences)를 제조업체의 사양에 따라 수행하였다. 그 뒤 형광 신호를 Spectramax 플레이트 판독기(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용해서 측정하였다. 측정된 pERK1/2 대 측정된 총 ERK의 비를 산출하고, 결과를 GraphPad Prism 소프트웨어를 이용해서 분석하였다.

[0259] 표 7에 나타낸 바와 같이, 시험한 두(2) 개의 항-APLNR 항체, H2aM9222N 및 H2aM9228N는 각각 47.61 nM 및 64.12 nM의 EC₅₀ 값으로 pERK1/2 대 총 ERK1/2의 비를 증가시킨 반면, 아펠린-13 단독은 38.86 pM의 EC₅₀ 값으로 pERK1/2 대 총 ERK1/2의 비를 증가시켰다. 2 개 항체에 대한 pERK1/2 대 총 ERK1/2 비의 최대 증가는 아펠린-13에서보다 작았다. 하나의 항-APLNR 항체, H2aM9232N은 208.7 nM의 IC₅₀ 값으로 pERK1/2 대 총 ERK의 비를 감소시켰다.

[0260] 표 7: pERK/총 ERK 분석에서 항-APLNR 항체 및 아펠린-13 펩타이드의 활성

시험한 항체	활성화 EC ₅₀ (M)	억제 IC ₅₀ (M)
H2aM9222N	4.7861E-08	-
H2aM9228N	6.412E-08	-
H2aM9232N	-	2.087E-07
아펠린-13	3.886E-11	-

[0261]

[0262] 실시예 7. 시각장애 망막 혈관 발달(RVD) 모델에서 항-APLNR 길항제 항체(50 mg/kg)의 전신 투여 효과

[0263] 본 발명의 선택된 항-APLNR 항체의 생체내 특징을 평가하기 위해, 눈 혈관계에서 APLNR-매개된 혈관신생을 차단하는 이들의 능력을 측정하였다.

[0264] 망막 혈관 발달(RVD) 모델을 이용해서 혼혈 배경 계통(75% C57BL6 및 25% Sv129)이고 마우스 APLNR 대신 인간 APLNR의 발현에 대해 동종접합성인 마우스(인간화된 APLNR 마우스) 새끼의 정상 발달 망막에서 혈관 증식에 대한 길항성 항-APLNR 항체의 효과를 평가하였다. 새끼에 생후 2 일(P2)에 50 mg/kg의 항-APLNR 길항제 항체, H2aM9232N, 또는 관련되지 않은 인간 Fc(hFc) 대조군을 피하 주사하였다. 실험적 편견을 방지하기 위해, 시약을 가리고 용액 A 및 용액 B로 표지하였다. 생후 5 일째에, 조직 샘플을 수집한 뒤 4% 포름알데하이드 함유 PBS 중 에 고정하였다. 고정된 조직 샘플을 15 분 동안 PBS로 3 회 세정한 뒤 25°C에서 하룻밤 동안 0.25% Triton-X 100 중 1% BSA를 함유하는 1xPBS 중에 1:200으로 희석한 GS 렉틴 I(Vector Laboratories, #FL-1101)로 염색하여 망막 혈관계를 가시화하였다. 다음날, 염색된 샘플을 각각 15 분 동안 PBS로 3 회 행구고, 슬라이드 상에 평판-실장한 뒤, Prolong Gold(Invitrogen, #P36930)를 이용해서 커버슬립을 실장하였다. 에피-형광 현미경(Nikon Eclipse 80)을 이용해서 20 배 배율로 영상을 얻었다. Adobe Photoshop CS6 확장판을 이용해서 상기 분석에서 입수한 영상으로부터 망막 내 혈관화된 면적을 측정하였다. IgG 대조군 항체 및 H2aM9232N 처리된 샘플에서 수득한 결과 간 통계적 차이를 투-테일, 페어링하지 않은 Student T-테스트(**, p < 0.001)를 이용해서 평가하였다. 망막 혈관계 면적 측정 및 통계 분석을 완료한 다음에만 가렸던 샘플의 정체를 확인하였다.

[0265] 표 8: RVD 모델에서 항-APLNR 항체의 효과 분석

항체	동물 #	눈	망막 혈관 증식(mm ²)
IgG 대조군 항체	마우스 1	OD	4.09
	마우스 1	OS	4.44
	마우스 2	OD	3.80
	마우스 2	OS	3.66
	마우스 3	OD	3.87
	마우스 3	OS	4.11
	마우스 4	OD	4.95
	마우스 4	OS	3.24
		평균	4.02
		SEM	0.18
H2aM9232N	마우스 5	OD	2.49
	마우스 5	OS	3.04
	마우스 6	OD	3.57
	마우스 6	OS	3.32
	마우스 7	OD	2.23
	마우스 8	OD	2.36
		평균	2.84
		SEM	0.23

[0266]

[0267]

도 1에 나타난 바와 같이, 길항성 항-APLNR 항체, H2aM9232N의 단회 피하 주사는 발달 마우스 망막에서의 망막 혈관 증식에서 약 30%의 통계적으로 유의미한 평균 감소를 일으켜서, APLNR 차단이 생후 5 일째에 유의미한 항-혈관신생 효과를 가짐을 시사하였다.

[0268]

표 8에 나타난 바와 같이, 길항성 항-APLNR 항체, H2aM9232N을 주사한 마우스에서 얻은 눈은 대략 2.23 내지 3.57 mm² 범위의 망막 혈관 성장을 나타내었다. 대조적으로, 인간 Fc를 주사한 마우스에서 얻은 눈은 대략 3.24 내지 4.95 mm² 범위의 망막 혈관 성장을 나타내었다.

[0269]

실시예 8-CRE 분석에서 개질된 아펠린 펩타이드의 효력 및 효능

[0270]

N-말단 또는 C-말단에서 결실되거나 이에 부가된 하나 이상의 아미노산(들)을 갖는 개질된 아펠린-13 펩타이드, 예컨대 아펠린-13 펩타이드를 hAPLNR의 활성화를 검출하기 위해 개발한 생체분석에서 APLNR 활성화에 대한 이들의 상대 효력에 대해 시험하였다(또한 본원에 참조로 도입되는, 2014년 9월 25일에 공개된 PCT 국제 공개 번호 WO2014/152955 A1 참고). 선택된 항-APLNR 항체의 N-말단 또는 C-말단에 속박된 아펠린-13, 또는 개질된 아펠린 펩타이드를 갖는 다양한 항체 융합 단백질을 또한 제조하고, 후술되는 실시예 9에 나타난 바와 같이 활성화에 대해 시험하였다.

[0271]

간략하게, HEK293 세포주를 루시퍼라제 리포터[cAMP 반응 요소(CRE, 4X)-루시퍼라제]와 함께 전장 인간 hAPLNR (접근 번호 NP_005152.1의 아미노산 1-380)을 안정적으로 발현하도록 전달감염시켰다. 생성 세포주, HEK293/CRE-luc/hAPLNR을 10% FBS, NEAA, 페니실린/스트렙토마이신, 및 100 µg/mL 하이그로마이신 B 함유 DMEM 중에 유지하였다. 생체분석을 위해, HEK293/CRE-luc/hAPLNR 세포를 0.1% FBS 및 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민이 보강된 80 µl OPTIMEM 중 20,000 세포/웰로 96-웰 분석 플레이트 상에 접종하고, 5% CO2 중 37°C에서 16 시간 동안 인큐베이션하였다. 다음날 아침에, hAPLNR 활성화를 통해 폴스콜린-유도된 cAMP 생산의 억제를 측정하기 위해, 개질되지 않은 아펠린 펩타이드 및 개질된 아펠린 펩타이드(표 9 참고)를 연속 희석한 뒤(1:3) 분석 완충액(5 µM 최종 폴스콜린 농도) 중 폴스콜린(Sigma, # F6886)과 혼합하고 세포에 첨가하였다. 5% CO2 중 37°C에서 5 시간 동안 인큐베이션 후, Victor X 장비(Perkin Elmer)를 이용해서 One Glo 시약(Promega, # E6051)의 첨가 후 발광을 측정하였다. 데이터는 Prism 5 소프트웨어(GraphPad)를 이용한 4-파라미터 로지스틱 공식에 대한 비선형 회귀에 의해 피팅시켰다.

[0272]

표 9에 나타난 바와 같이, 아펠린-13은 CRE 분석에서 N-말단 및 C-말단 모두로부터의 아미노산 결실을 관용할 수 있으면서도 전체 효능을 여전히 보유하고 아펠린-13에 비해 상이한 정도의 감소된 효력을 나타낸다. 또한, 아펠린-13은 그 C-말단에 대한 아미노산 잔기, 예컨대 5 개 글리신 잔기(예로 아펠린-13+5G)의 부가를 관용할

수 있고, 여전히 전체 효능을, 그러나 아펠린-13에 비해 감소된 효력과 함께 보유할 수 있다.

표 9: CRE 분석에서 시험한 개질된 아펠린 펩타이드

아펠린 펩타이드	아미노산 서열	EC ₅₀ (M)
아펠린-13	QRPRLSHKGPMF (서열 목록 번호 228)	1.403e-013
아펠린-F13A	QRPRLSHKGMPA (서열 목록 번호 260)	1.027e-010
아펠린65-76 / 아펠린-Cter12	QRPRLSHKGMP (서열 목록 번호 261)	5.713e-011
아펠린65-75 / 아펠린-Cter11	QRPRLSHKGPM (서열 목록 번호 262)	3.604e-012
아펠린-12	RPRLSHKGPMF (서열 목록 번호 263)	8.704e-013
아펠린-11	PRLSHKGPMF (서열 목록 번호 264)	4.379e-010
아펠린66-76	RPRLSHKGMP (서열 목록 번호 265)	5.194e-012
아펠린67-76	PRLSHKGMP (서열 목록 번호 266)	1.137e-013
아펠린66-75	RPRLSHKGPM (서열 목록 번호 267)	2.174e-012
아펠린67-75	PRLSHKGPM (서열 목록 번호 268)	3.738e-007
아펠린-13 + 5G	QRPRLSHKGPMFGGGGG (서열 목록 번호 269)	1.469e-010

실시예 9. 항체-융합 단백질이 APLNR을 활성화함

항체-아펠린 융합물이 hAPLNR-매개된 세포 신호전달을 활성화하는 능력을 실시예 5에 상술된 분석과 유사하게 고리형 AMP 분석을 이용하여 측정하였다. 항체의 N- 또는 C-말단에서 3 개의 상이한 항-APLNR 항체(H4H9092P, H4H9093P 및 H4H9209N)에 융합된 다양한 길이의 아펠린 펩타이드, 및 대조군 항체(항-myc)의 N-말단에 융합된 아펠린을 HEK293/CRE-luc/hAPLNR 세포에서 폴스콜린 활성화의 조절을 측정하여 hAPLNR을 활성화하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 몇몇 아펠린-항체 융합물은 아펠린에서와 유사한 활성화 수준으로 hAPLNR의 활성화를 나타내었다. 아펠린-항체 융합물은 각각 표 10A 및 10B에 나타낸 바와 같이, 10 μ M 또는 7.5 μ M 폴스콜린으로 27 pM 내지 29 nM 범위의 EC₅₀ 값을 가졌다. 아펠린 단독은 10 μ M 폴스콜린으로 25 pM 및 7.5 μ M 폴스콜린으로 39 pM의 EC₅₀ 값으로 hAPLNR을 활성화하였다. 임의의 링커가 없는 2 개의 아펠린-항체 융합물은 임의의 측정 가능한 hAPLNR 활성화를 나타내지 않았다. 또한, 아펠린-cter11뿐만 아니라 아펠린-cter11+세린 융합물은 완전 활성화를 유도하였다(7.5 μ M 폴스콜린으로 시험함). 그러나, 아펠린 펩타이드가 C-말단에서 10 개 아미노산으로 절단되는 경우 활성화가 감소하는 경향이 있었고, 아펠린 길이가 그 C-말단에서 9 개 아미노산으로 감소되는 경우, 활성화는 나타나지 않았다. 무관한 항체(항-myc 항체)에 융합된 아펠린은 별도 실험에서 100 nM에서 37% 및 53%의 활성화를 나타내어, 무관한 항체에 융합된 아펠린이 활성화시키지만 아펠린 단독 또는 항-APLNR 항체에 융합된 아펠린에 비해 약하게 활성화시킴을 시사하였다.

아펠린-항체 융합물을 또한 HEK293/CRE-luc/hAPLNR 세포에서 폴스콜린 활성화의 조절을 측정함으로써 hAPLNR을 억제하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 표 10C 및 10D를 참고하라. 5 개의 아펠린-항체 융합물은 시험한 최고 농도에서 13 내지 29%의 hAPLNR의 약한 차단을 나타내었다. 무관한 항체(항-myc 항체) 및 이소형 대조군의 N-말단에 융합된 아펠린은 임의의 측정 가능한 hAPLNR의 억제를 나타내지 않았다.

[0278] [표 10A: HEK293/CRE-luc/hAPLNr 세포주에서 항체-아펠린 융합물(10 μ M 폴스콜린)에 의한 hAPLNr의 활성화

아펠린의 EC ₅₀			2.5E-11(10 μ M 폴스콜린)	
시험 항체(- 융합물)	개질(융합) 설명	아펠린 길이(서열)	EC ₅₀ [M]	100 nM mAb에서 활성화%(10 μ M 폴스콜린)
H4H9093P	개질 비함유	아펠린 없음	활성화 없음	활성화 없음
H4H9093P-1-NVK3	(G4S)3 링커 함유 Nter Vk 융합물	13	7.7E-09	100%
H4H9093P-2-CVK3	(G4S)3 링커 함유 Cter Vk 융합물	13	9.2E-11	100%
H4H9093P-3-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	5.9E-11	100%
H4H9093P-4-NVH0	링커 비함유 Nter VH 융합물	13	활성화 없음	활성화 없음
H4H9093P-5-NVH1	G4S 링커 함유 Nter VH 융합물	13	4.6E-10	100%
H4H9093P-6-NVH2	(G4S)2 링커 함유 Nter VH 융합물	13	8.7E-11	100%
H4H9093P-APN9- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	9(서열 목록 번호 270)	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-APN10- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	10(서열 목록 번호 271)	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-APN11- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	11(서열 목록 번호 262)	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P- APN11+S-(G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	11+S(서열 목록 번호 272)	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-APNV5- 11-(G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	V5-11(서열 목록 번호 273)	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9092P	개질 없음	아펠린 없음	활성화 없음	활성화 없음
H4H9092P-1-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	7.3E-11	100%
H4H9092P-2-NVK3	(G4S)3 링커 함유 Nter Vk 융합물	13	2.9E-08	100%
H4H9092P-3-CVK3	(G4S)3 링커 함유 Cter Vk 융합물	13	7.5E-10	100%
H4H9209N	개질 없음	아펠린 없음	활성화 없음	활성화 없음
H4H9209N-1-NVH0	링커 비함유 Nter VH 융합물	13	활성화 없음	활성화 없음
H4H9209N-2-NVH1	G4S 링커 함유 Nter VH 융합물	13	2.9E-09	100%
H4H9209N-3-NVH2	(G4S)2 링커 함유 Nter VH 융합물	13	6.5E-11	100%
H4H9209N-4-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	2.8E-11	100%
H4H9209N-APN9- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	9(서열 목록 번호 270)	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9209N-APN10- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	10(서열 목록 번호 271)	시험하지 않음	시험하지 않음

[0279]

H4H9209N-APN11- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	11(서열 목록 번호 262)	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9209N- APN11+S-(G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	11+S(서열 목록 번호 272)	시험하지 않음	시험하지 않음
항-myc 9E10	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	>1.0E-07	37%
이소형 대조군 3	개질 없음	아펠린 없음	활성화 없음	활성화 없음

[0280]

[0281]

표 10B: HEK293/CRE-luc/hAPLNr 세포주에서 항체-아펠린 융합물(7.5 μ M 폴스콜린)에 의한 hAPLNr의 활성화

아펠린의 EC ₅₀			3.9E-11(7.5 μ M 폴스콜린)	
시험한 항체(- 융합물)	개질(융합) 설명	아펠린 길이(서열)	EC ₅₀ [M]	100 nM mAb에서 활성화%(7.5 μ M 폴스콜린)
H4H9093P	개질 없음	아펠린 없음	활성화 없음	활성화 없음
H4H9093P-1-NVK3	(G4S)3 링커 함유 Nter Vk 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-2-CVK3	(G4S)3 링커 함유 Cter Vk 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-3-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	8.7E-11	100%
H4H9093P-4-NVH0	링커 비함유 Nter VH 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-5-NVH1	G4S 링커 함유 Nter VH 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-6-NVH2	(G4S)2 링커 함유 Nter VH 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-APN9- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	9(서열 목록 번호 270)	활성화 없음	활성화 없음
H4H9093P-APN10- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	10(서열 목록 번호 271)	1.4E-09	50%
H4H9093P-APN11- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	11(서열 목록 번호 262)	1.6E-10	100%
H4H9093P-APN11+S- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	11+S(서열 목록 번호 272)	9.2E-11	100%
H4H9093P-APN5- 11-(G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	V5-11(서열 목록 번호 273)	5.8E-09	100%
H4H9092P	개질 없음	아펠린 없음	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9092P-1-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9092P-2-NVK3	(G4S)3 링커 함유 Nter Vk 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9092P-3-CVK3	(G4S)3 링커 함유 Cter Vk 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9209N	개질 없음	아펠린 없음	활성화 없음	활성화 없음
H4H9209N-1-NVH0	링커 비함유 Nter VH 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9209N-2-NVH1	G4S 링커 함유 Nter VH 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9209N-3-NVH2	(G4S)2 링커 함유 Nter VH 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9209N-4-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	2.4E-11	100%
H4H9209N-APN9- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	9(서열 목록 번호 270)	활성화 없음	활성화 없음
H4H9209N-APN10- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	10(서열 목록 번호 271)	1.2E-09	38%
H4H9209N-APN11-	(G4S)3 링커 함유 Nter VH	11(서열 목록	2.7E-11	100%

[0282]

(G4S)3	융합물	번호 262)		
H4H9209N-APN11+S- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	11+S(서열 목록 번호 272)	1.1E-10	100%
항-myc 9E10	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	1.1E-08	53%
이소형 대조군 3	개질 없음	아펠린 없음	활성화 없음	활성화 없음

[0283]

[0284]

표 10C: HEK293/CRE-luc/hAPLNr 세포주에서 항체-아펠린 융합물(10 μ M 폴스콜린)에 의한 hAPLNr의 억제

시험한 항체(- 융합물)	아펠린의 EC ₅₀		2.5E-11(10 μ M 폴스콜린)	
	개질(융합) 설명	아펠린 길이(서열)	IC ₅₀ [M]	100 pM 아펠린의 존재 하 100 nM mAb의 억제%(10 μ M 폴스콜린)
H4H9093P	개질 없음	아펠린 없음	IC	16%
H4H9093P-1-NVK3	(G4S)3 링커 함유 Nter Vk 융합물	13	억제 없음	억제 없음
H4H9093P-2-CVK3	(G4S)3 링커 함유 Cter Vk 융합물	13	억제 없음	억제 없음
H4H9093P-3-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	억제 없음	억제 없음
H4H9093P-4-NVH0	링커 비함유 Nter VH 융합물	13	IC	29%
H4H9093P-5-NVH1	G4S 링커 함유 Nter VH 융합물	13	억제 없음	억제 없음
H4H9093P-6-NVH2	(G4S)2 링커 함유 Nter VH 융합물	13	억제 없음	억제 없음
H4H9093P-APX9- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	9(서열 목록 번호 270)	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-APX10- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	10(서열 목록 번호 271)	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-APX11- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	11(서열 목록 번호 262)	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P- APX11+S-(G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	11+S(서열 목록 번호 272)	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-APXV5- 11-(G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	V5-11(서열 목록 번호 273)	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9092P	개질 없음	아펠린 없음	IC	5%
H4H9092P-1-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	억제 없음	억제 없음
H4H9092P-2-NVK3	(G4S)3 링커 함유 Nter Vk 융합물	13	억제 없음	억제 없음
H4H9092P-3-CVK3	(G4S)3 링커 함유 Cter Vk 융합물	13	억제 없음	억제 없음
H4H9209N	개질 없음	아펠린 없음	5.9E-09	16%
H4H9209N-1-NVH0	링커 비함유 Nter VH 융합물	13	IC	13%
H4H9209N-2-NVH1	G4S 링커 함유 Nter VH 융합물	13	억제 없음	억제 없음
H4H9209N-3-NVH2	(G4S)2 링커 함유 Nter VH 융합물	13	억제 없음	억제 없음
H4H9209N-4-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	억제 없음	억제 없음
H4H9209N-APX9- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	9(서열 목록 번호 270)	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9209N-APX10- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	10(서열 목록 번호 271)	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9209N-APX11-	(G4S)3 링커 함유 Nter	11(서열 목록	시험하지 않음	시험하지 않음

[0285]

(G4S)3	VH 융합물	번호 262)	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9209N- APX11+S-(G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	11+S(서열 목록 번호 272)	시험하지 않음	시험하지 않음
항-myc 9E10	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	억제 없음	억제 없음
이소형 대조군 3	개질 없음	아펠린 없음	억제 없음	억제 없음

IC=IC₅₀ 값을 결정할 수 없음

[0286]

[0287]

표 10D: HEK293/CRE-luc/hAPLNr 세포주에서 항체-아펠린 융합물(7.5 μ M 폴스콜린)에 의한 hAPLNr의 억제

시험한 항체(- 융합물)	아펠린의 EC ₅₀		3.9E-11(7.5 μ M 폴스콜린)	
	개질(융합) 설명	아펠린 길이(서열)	IC ₅₀ [M]	100 pM 아펠린의 존재 하 100 nM mAb의 억제%(7.5 μ M 폴스콜린)
H4H9093P	개질 없음	아펠린 없음	IC	3%
H4H9093P-1-NVK3	(G4S)3 링커 함유 Nter Vk 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-2-CVK3	(G4S)3 링커 함유 Cter Vk 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-3-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	억제 없음	억제 없음
H4H9093P-4-NVH0	링커 비함유 Nter VH 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-5-NVH1	G4S 링커 함유 Nter VH 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-6-NVH2	(G4S)2 링커 함유 Nter VH 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9093P-APX9- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	9 (서열 목록 번호 270)	1.3E-08	27%
H4H9093P-APX10- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	10 (서열 목록 번호 271)	3.2E-08	15%
H4H9093P-APX11- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	11 (서열 목록 번호 262)	억제 없음	억제 없음
H4H9093P-APX11+S- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	11+S (서열 목록 번호 272)	억제 없음	억제 없음
H4H9093P-APXV5-11- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	V5-11 (서열 목록 번호 273)	억제 없음	억제 없음
H4H9092P	개질 없음	아펠린 없음	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9092P-1-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9092P-2-NVK3	(G4S)3 링커 함유 Nter Vk 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9092P-3-CVK3	(G4S)3 링커 함유 Cter Vk 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9209N	개질 없음	아펠린 없음	억제 없음	억제 없음
H4H9209N-1-NVH0	링커 비함유 Nter VH 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9209N-2-NVH1	G4S 링커 함유 Nter VH 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9209N-3-NVH2	(G4S)2 링커 함유 Nter VH 융합물	13	시험하지 않음	시험하지 않음
H4H9209N-4-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	억제 없음	억제 없음
H4H9209N-APX9- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	9 (서열 목록 번호 270)	9.3E-09	14%

[0288]

H4H9209N-APX10- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	10 (서열 목록 번호 271)	억제 없음	억제 없음
H4H9209N-APX11- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	11 (서열 목록 번호 262)	억제 없음	억제 없음
H4H9209N-APX11+S- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	11+S (서열 목록 번호 272)	억제 없음	억제 없음
항-myc 9E10	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 융합물	13	억제 없음	억제 없음
이소형 대조군 3	개질 없음	아펠린 없음	억제 없음	억제 없음

[0289]

[0290]

실시예 10: pERK 분석에서 항체-융합 단백질에 의한 APLNR-매개된 수용체 신호전달의 활성화

[0291]

본질적으로 상술되는 실시예 6에 나타난 바와 같이 실험을 수행하였다. 표 11에 나타난 바와 같이, 본 발명의 2 개의 항체-아펠린 융합물은 542.2 pM 및 271.4 pM의 EC50 값으로 pERK1/2 대 총 ERK1/2의 비를 증가시킨 반면, 아펠린-13은 32.48 pM의 EC50 값 pERK1/2 대 총 ERK1/2의 비를 증가시켰다.

[0292] 표 11: pERK/총 ERK 분석에서 항체-아펠린 융합물 및 아펠린-13 펩타이드의 활성

시험한 샘플	활성화 EC ₅₀ (M)
(G4S)3 링커 함유 H4H9093P Nter VH 융합물 (H4H9093P-3-NVH3)	5.422E-10
(G4S)3 링커 함유 H4H9209N Nter VH 융합물 (H4H9209N-4-NVH3)	2.714E-10
아펠린-13(융합 없음)	3.248E-11

[0293]

[0294] 실시예 11: β -어레스틴 분석에서 항체-융합 단백질에 의한 APLNR-매개된 수용체 신호전달의 활성화

[0295]

PathHunter® eXpress AGTRL1 CHO-K1 β -어레스틴 GPCR 세포 기반 분석(DiscoverX, # 93-0250E2)을 이용해서 활성화된 인간 아펠린 수용체(hAPLNR)에 의한 β -어레스틴의 모집을 통한 신호전달을 평가하였다. hAPLNR 활성화 시 β -어레스틴 모집을 시험하기 위해, PathHunter® eXpress AGTRL1 CHO-K1 β -어레스틴 세포를 제조업체의 프로토콜에 따라 8500 세포/웰로 96-웰 분석 플레이트 상에 접종하고, 2 일 동안 5% CO₂ 중 37°C에서 인큐베이션하였다. 분석 당일에, 아펠린, 피로글루타미드 아펠린-13, (Bachem, # H-4568)을 500 nM부터 0.08 nM까지(아펠린 비함유 대조군 샘플 포함) 연속 희석하고(1:3) 세포에 첨가하였다.

[0296]

hAPLNR을 활성화하는 아펠린-항체 융합물 및 항체의 능력을 측정하기 위해, 아펠린-항체 융합물 및 항체를 500 nM부터 0.08 nM까지 연속 희석하고(1:3) 외인성 아펠린 비함유 세포에 첨가하였다. 아펠린-항체 융합물 및 항체의 시험에는 항체 비함유 대조군이 포함되었다. 5% CO₂ 중 37°C에서 1.5 시간 동안 인큐베이션 후, PathHunter® 검출 시약의 첨가 후 화학발광 활성을 Victor X 장비(Perkin Elmer) 상에서 검출하였다.

[0297]

모든 분석 결과를 Prism 5 소프트웨어(GraphPad) 내에서 비선형 회귀(4-파라미터 로지스틱)를 이용해서 분석하였다. 항체 및 아펠린-항체 융합물에 의한 활성화를 아펠린 용량 반응에서 나타난 최대 활성화 백분율로 산출하였다. PathHunter® eXpress AGTRL1 CHO-K1 β -어레스틴 세포 기반 분석에서, 시험한 아펠린 펩타이드에 융합된 모든 11 개의 항-APLNR 항체는 2 - 64% 범위의 최대 아펠린 활성화, 및 970 pM 내지 100 nM 초과 범위의 대응하는 EC₅₀ 값으로 hAPLNR의 부분 활성화를 나타내었다. 아펠린 융합 비함유 항-APLNR 항체는 활성화를 거의 또는 전혀 나타내지 않았다. 아펠린은 1.5 nM의 EC₅₀ 값으로 hAPLNR을 활성화하였다. 관련되지 않은 항-myc 항체에 융합된 아펠린은 측정 가능한 EC₅₀ 없이 시험한 최대 농도 500 nM에서 6%에서 hAPLNR의 약한 활성화를 나타낸 반면, 이소형 대조군 항체는 상기 분석에서 임의의 측정 가능한 활성화를 나타내지 않았다.

[0298]

표 12: PathHunter® eXpress AGTRL1 CHO-K1 β -어레스틴 세포 기반 분석에서 항체-아펠린 융합물 및 항체에 의한 hAPLNR의 활성화

시험한 세포주:			PathHunter® eXpress AGTRL1 CHO-K1 β- 어레스틴 세포	
아펠린의 EC ₅₀ (M):			1.5E-09	
항체-아펠린 용합물 설명				
시험한 항체(- 용합물)	개질(용합) 설명	아펠린 길이(서열)	EC ₅₀ [M]	500 nM 항체 또는 아펠린-항체 용합물에서의 활성화%
H4H9093P	개질 없음	아펠린 없음	IC	2%
H4H9093P-3-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 용합물	13	2.1E-09	54%
H4H9093P-APX9- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 용합물	9 (서열 목록 번호 270)	8.3E-09	4%
H4H9093P-APX10- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 용합물	10 (서열 목록 번호 271)	6.5E-09	5%
H4H9093P-APX11- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 용합물	11 (서열 목록 번호 262)	5.8E-09	64%
H4H9093P- APX11+S-(G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 용합물	11+S (서열 목록 번호 272)	2.7E-09	37%
H4H9093P-APNV5- 11-(G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 용합물	V5-11 (서열 목록 번호 273)	> 1E-07	47%
H4H9209N	개질 없음	아펠린 없음	활성화 없음	활성화 없음
H4H9209N-4-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 용합물	13	1.5E-09	30%
H4H9209N-APX9- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 용합물	9 (서열 목록 번호 270)	3.5E-09	3%
H4H9209N-APX10- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 용합물	10 (서열 목록 번호 271)	4.0E-09	2%
H4H9209N-APX11- (G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 용합물	11 (서열 목록 번호 262)	9.7E-10	44%
H4H9209N- APX11+S-(G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 용합물	11+S (서열 목록 번호 272)	3.1E-09	25%
항-myc 9E10	(G4S)3 링커 함유 Nter VH 용합물	13	IC	6%
이소형 대조군 항체			활성화 없음	활성화 없음

IC=IC₅₀ 값을 결정할 수 없음

실시예 12 - 항체-아펠린-11 용합물이 혈청 중 증가된 안정성을 나타냄

혈청 중 아펠린 펩타이드 용합 항체의 안정성 및 활성을 측정하기 위해, 용합 항체를 상이한 시간(0, 6, 24 시간) 동안 마우스 혈청에 노출시켰다. 혈청으로부터의 항체 정제 후, 샘플을 질량 분광측정에 의해 분석하여, 아펠린 단편의 존재를 평가하였다. 노출된 아펠린-항체 용합물의 활성을 시험하기 위해, 정제되지 않은 항체 용합물을 포함하는 희석된 혈청을 또한 베타-어레스틴 활성 분석에서 시험하였다. 수컷 C57b1/6 마우스로부터 수득한 혈청을 1 대 1의 비로 PBS와 희석하였다. 총 100 μ g의 아펠린-항체 용합물을 혈청에 첨가하였다. 250 μ l 또는 25%의 상기 혼합물을 즉시 제거하고 -20°C에 두었다(t=0 시점). 나머지 혼합물을 37°C 인큐베이터에 넣고, 250 μ l의 혼합물을 6 및 24 시간 후 제거하였다.

단백질 A 비드를 통한 샘플 정제: Dynabead™ 단백질 A 비드(Invitrogen Cat# 10001D)를 PBS로 3 회 세정하였다. 25 μ l의 Dynabead™ 슬러리를 225 μ l의 혈청 및 아펠린-항체 용합 혼합물에 첨가하였다. 새로운 혼합물을 3 시간 동안 회전시키며 4°C에서 인큐베이션하여 단백질 A 비드에 대해 항체 용합물이 결합하도록 두었다. 인큐베이션 후, 비드를 PBS로 3 회 세정하였다. 60 μ l의 Laemilli 염료/완충액을 세정하고 펠렛화된 단백질 A 비드에 첨가하였다. 상기 혼합물을 5 분 동안 90°C에서 인큐베이션하여 단백질 A 비드로부터 정제된 항체를 해리시켰다.

질량 분광측정 제조: 5 μ l의 베타-머캅토에탄올을 정제된 항체에 첨가하고, 10 분 동안 95°C에서 변성시켰다. 정제된 항체의 전체 부피를 트리스-글리신 겔 상으로 로딩하고 1 hr 동안 150 V에서 진행하였다. 쿠마시 블루를 이용해서 겔을 염색하였다. 중쇄 단편에 대응하는 50 kDa 밴드를 겔로부터 절단해서 미세하게 잘게 썰었다. 절단된 밴드를 2 개의 500 μ l 튜브 내로 나누었다. 100 μ l의 100 mM 암모늄 바이카보네이트/50% 아세토니트릴을 첨가하고, 1 hr 동안 37°C에서 인큐베이션하여 겔의 염색을 제거하였다. 탈염색 용액을 제거하고, 100 μ l의 100% 아세토니트릴을 첨가하여 상온에서 5 분 동안 겔을 탈수시켰다. 탈수 용액을 겔로부터 제거하고, 75 μ l의 50 mM 암모늄 바이카보네이트 중 10 mM DTT를 첨가하고, 30 분 동안 37°C에서 인큐베이션하여 단백질을 환원시켰다. 환원 용액을 제거하고 75 μ l의 50 mM 암모늄 바이카보네이트 중 55 mM 요오도아세트아미드를 첨가하고, 암소 중 상온에서 인큐베이션하여 단백질을 알킬화하였다. 알킬화 용액을 제거하고, 100 μ l의 50 mM 암모늄 바

이카보네이트를 첨가하여 겔을 세정하였다. 세정 용액을 제거하고, 100 μ l의 100% 아세토니트릴을 첨가하여 상온에서 5 분 동안 겔을 탈수시켰다. 탈수 용액을 제거하고, 30 μ l의 LYS-C 효소 혼합물을 첨가하고, 37°C에서 하룻밤 동안 소화시킨다. 하룻밤 소화 후, 샘플을 10 mg/ml 알파-시아노-4-하이드록시신남산/70% 아세토니트릴/0.1% TFA 용액 중에 ZipTip 필터를 통해 정제하고, 스폿을 MALDI 표적 상으로 용출하고 질량 분광측정기에서 관독한다.

[0304] 질량 분광측정 분석: 아펠린 펩타이드를 APLN-R 항체의 N-말단부로 융합시킨다. Lys-C는 아미노산 라이신의 C-말단쪽에서 단백질을 인식하고 소화시킨다. 관심 펩타이드는 융합 항체의 Lys-C 소화 후, QRPRLSHK 서열(서열 목록 번호 228의 아미노산 잔기 번호 1 내지 8)을 가져서, 1004에서 질량 전하 비 피크를 보고한다.

[0305] 표 13: 질량 분광측정에 의해 온전한 융합을 확인하기 위한 0, 6, 및 24 시간째의 혈청 안정성 시험(1004에서의 펩타이드 단편 피크)

시험한 융합물	개질(융합) 설명	0 시간 안정성	6 시간 안정성	24 시간 안정성
H4H9093P-3-NVH3	(G4S)3 링커 함유 Nter APN13	있음	없음	없음
H4H9209N-APN11+S-(G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter APN-Cter11+S	있음	있음(약함)	없음
H4H9209N-APN11-(G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter APN-Cter11	있음	있음	있음
H4H9209N-APN10-(G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter APN-Cter10	있음	있음(약함)	없음
H4H9209N-APN9-(G4S)3	(G4S)3 링커 함유 Nter APN-Cter9	있음	있음	있음(약함)

[0306]

[0307] 표 13에 나타난 바와 같이, 절단된 아펠린 융합 항체는 혈청 노출 6 시간 후 질량 분광측정 상에 온전한 아펠린 펩타이드 피크를 보고한다. 아펠린-cter11 융합 항체는 혈청 노출 24 시간 후 잔여 아펠린 피크를 갖는다. 또한 도 2를 참고하라.

[0308] 노출된 아펠린-항체 융합물의 활성을 시험하기 위해, 정제되지 않은 항체 융합물(H4H9093P-3-NVH3, H4H9209N-APN11-(G4S)3, 또는 H4H9209N-APN11+S-(G4S)3)을 함유하는 희석된 혈청을 실시예 11에서 상술된 바와 같은 베타-에레스틴 활성 분석에서 시험하였다(DiscoverX B-에레스틴 활성 분석 키트에 기반한 프로토콜). 각각의 정제되지 않은 아펠린-항체 융합물의 처리 농도는 1 μ g/mL였다.

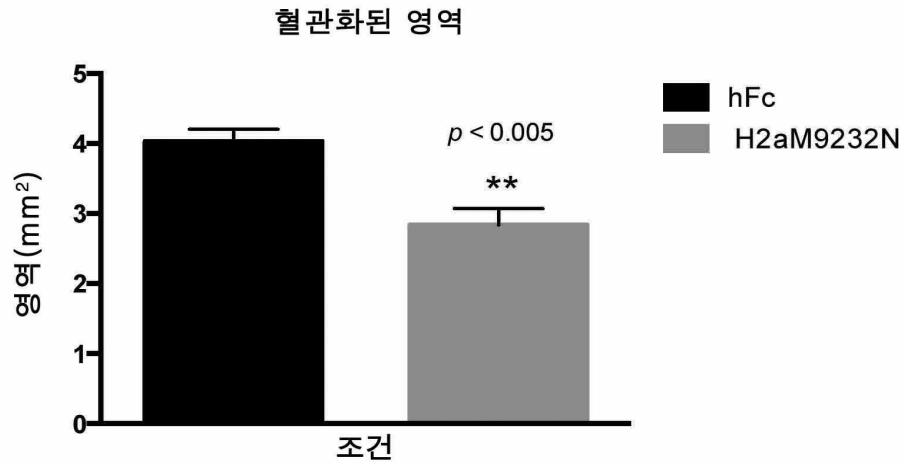
[0309] 이들의 C-말단에서 아펠린-Cter11 및 아펠린-Cter11+S를 갖는 항체 융합물은 혈청 노출 6 h 후에도 β -에레스틴 활성을 보유한다. 시점 0, 6 및 24 시간째의 β -에레스틴 활성 결과를 도 3에 도시한다. 6 h 시점 값은 0 h 시점 대비 활성화 백분율을 나타내거나, 각각 H4H9093P-3-NVH3, H4H9209N-APN11-(G4S)3, 또는 H4H9209N-APN11+S-(G4S)3에 대해 2.4%, 70.4% 및 33.6%를 나타낸다.

[0310] 본 발명은 본원에 기재된 특정 구현예에 의해 범위가 제한되는 것이 아니다. 실제로, 본원에 기재된 것들에 부가하여 본 발명의 다양한 개질은 상기 설명 및 수반된 도면으로부터 당업자에게 명확해질 것이다. 이러한 개질은 첨부된 청구범위의 범위 내에 속하는 것이다.

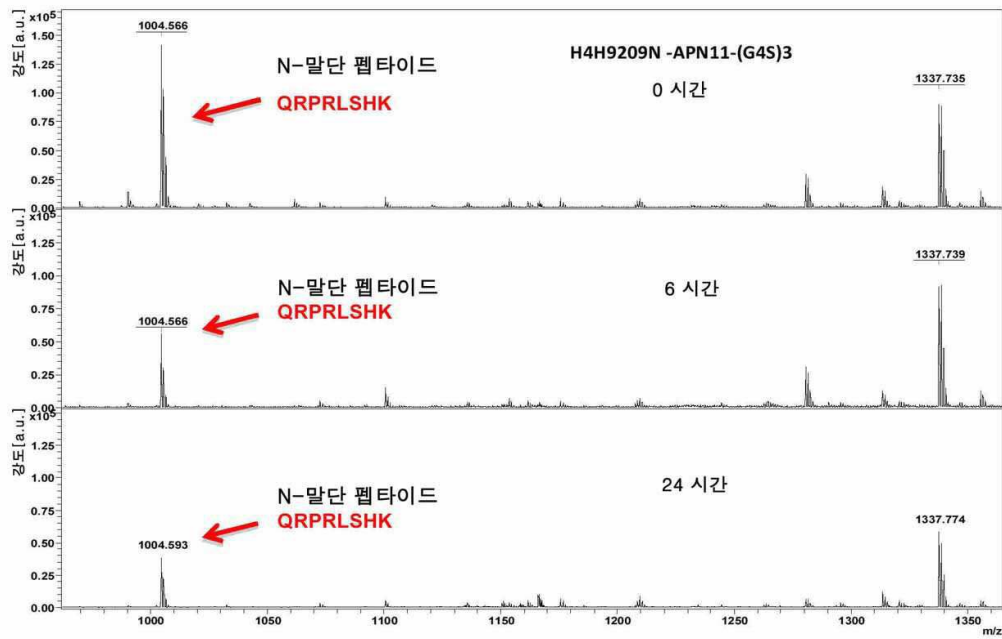
도면

도면1

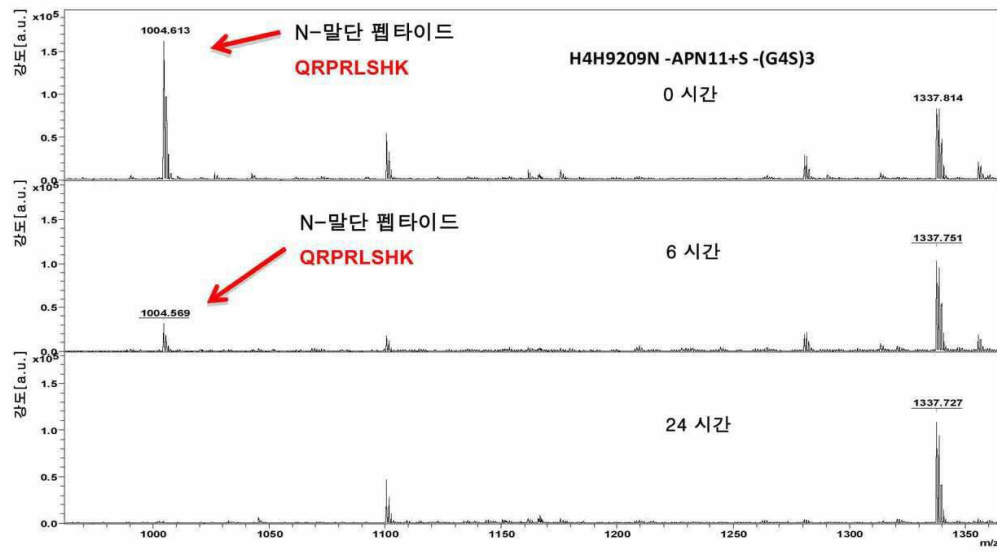
RVD 모델에서 항-APLNR의 효과에 대한 통계 분석



도면2a

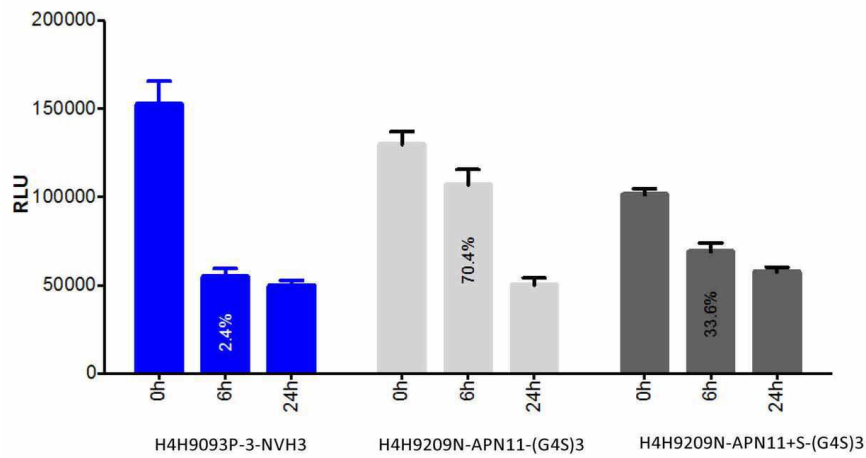


도면2b



도면3

혈청 노출된 아펠린인라인 주입으로부터의 B-아레스틴 활성



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
- <120> APLNR MODULATORS AND USES THEREOF
- <130> 7410W001
- <150> US 61/906,568
- <151> 2013-11-20
- <160> 285
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 384
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 1
 gaggtacaac tgggtggagtc tggggggaggc ttggcccagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag ccctctggttt cactttcagt aactattgga tgagctgggt cgcagggt 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaat ataaaacaag atgggagtga gaaatactat 180

 ttggagtctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa tttattgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgttt ttactgtgc gagacctgga 300
 ctattacgct ttttggagcc tgggaggcgc tactactccg gtatgaacgt ctggggccaa 360
 gggaccacgg tcaccgtctc ctca 384
 <210> 2
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 2
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Leu Glu Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys

 85 90 95
 Ala Arg Pro Gly Leu Leu Arg Phe Leu Glu Pro Gly Arg Arg Tyr Tyr
 100 105 110

Ser Gly Met Asn Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 3

ggtttcactt tcagtaacta ttgg 24

<210> 4

<211>

> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 4

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp

1 5

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 5

ataaaacaag atgggagtga gaaa 24

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 6

Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys

1 5

<210> 7

<211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 7
 gcgagacctg gactattacg ctttttggag cctgggagge gctactactc cggtatgaac 60
 gtc 63
 <210> 8
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 8
 Ala Arg Pro Gly Leu Leu Arg Phe Leu Glu Pro Gly Arg Arg Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Ser Gly Met Asn Val
 20
 <210> 9
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 9
 gacatccagt tgaccacgtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggccagtcg gggcattcgc agttatttag cctggatatca gcaaaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccgtggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321
 <210> 10
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 11

cagggcattc gcagttat

18

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 12

Gln Gly Ile Arg Ser Tyr

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic

<400> 13
 gctgcatcc

9

<210> 14

<211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic

<400> 14
 Ala Ala Ser

1

<210> 15

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic

<400> 15

caacagttta atagttaccc gtggacg

27

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic

<400> 16

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Trp Thr

1

5

<210

> 17

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic

<400> 17
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggttcagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc aactatgcca tgaactgggt ccgccaggct 120
ccagggaggg ggctggagtg ggtctcagct attcattatg atggtagtaa ttcataattac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaagac acggccattt attactgtgc gatattgtca 300
agggtctact ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct ca 342

<210> 18
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic
<400> 18
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile His Tyr Asp Gly Ser Asn Ser 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 Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Ile Leu Ser Arg Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 19
<211> 24
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 19

ggattcacct ttagcaacta tgcc

24

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 20

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala

1 5

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 21

attcattatg atggtagtaa ttca

24

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 22

Ile His Tyr Asp Gly Ser Asn Ser

1 5

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 23

gcgatatattgt caaggggtcta c 21

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 24

Ala Ile Leu Ser Arg Val Tyr

1 5

<210> 25

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 25

gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcgagtc gggcattaac aattatttag cctggtttca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagtcctt gatctatgct acatccagtt taaaaagtg ggtcccatca 180

aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg cgacttatta ctgccaacag tataatagtt atccgctcac tticggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 26

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

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

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

<210> 27
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 27

cagggcatta acaattat 18

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 28

Gln Gly Ile Asn Asn Tyr

1 5
<210> 29
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 29

gctacatcc 9

<210> 30
<211> 3
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> synthetic

<400> 30

Ala Thr Ser

1

<210> 31

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 31

caacagtata atagttatcc gctcact

27

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 32

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1

5

<210> 33

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 33

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc

60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt aattattgga tgagctgggt ccgccaggct

120

ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gagatactat

180

gtgggctctg tgaagggccg attcaccatc tccagaggcg acgccgagaa ctctctgtat

240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaagac acggctgtat attactgtgc gagagatcga

300

tttggatata gtcctacga taagggggta cgctactact acggtatgga cgtctggggc

360

caagggacca cggtcaccgt ctcctca

387

<210> 34

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 34

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Arg Tyr Tyr Val Gly Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Gly Asp Ala Glu Asn Ser 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 Asp Arg Phe Gly Tyr Ser Ala Tyr Asp Lys Gly Val Arg Tyr

100 105 110

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 35

ggattcacct ttagtaatta ttgg

24

<210> 36

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 36
 Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp

1 5
 <210> 37
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic
 <400> 37

ataaagcaag atggaagtga gaga 24

<210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic
 <400> 38
 Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Arg

1 5
 <210> 39
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic
 <400> 39
 gcgagagatc gatttgata tagtgcctac gataaggggg tacgtacta ctacggtatg 60

gacgtc 66

<210> 40
 <211> 22
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 40

Ala Arg Asp Arg Phe Gly Tyr Ser Ala Tyr Asp Lys Gly Val Arg Tyr

1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Met Asp Val

20

<210> 41

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 41

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtc gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagcgct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt accctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 42

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 43
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic

<400> 43
 cagggcatta gaaatgat 18

<210> 44
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 44

Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 1 5

<
 210> 45
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 45

gctgcatcc 9
 <210> 46
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic

<400> 46

Ala Ala Ser

1

<210> 47

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 47

ctacagcata atagttaccc tcggacg

27

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 48

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1

5

<210> 49

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 49

gagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggt ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc

60

tcctgtgcag ccctctggatt caccttttagt agctttttgga tgagttgggt cgcgcaggtt

120

ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaatactat

180

gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat

240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagataga

300

tttgatata gtttctacga taagggggta cgttactact acggtatgga cgtctggggc

360

caagggacca cggtcacctg ctctctca

387

<210> 50

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 50

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

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

100 105 110

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 51

ggattcacct ttagtagctt ttgg

24

<210

> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Trp

1 5

<210> 53

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 53

ataaagcaag atggaagtga gaaa

24

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 54

Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys

1 5

<210> 55

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 55

gcgagagata gatttggata tagtttctac gataaggggg tacgttacta ctacggtatg

60

gacgtc

66

<210> 56

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 56

Ala Arg Asp Arg Phe Gly Tyr Ser Phe Tyr Asp Lys Gly Val Arg Tyr
1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Met Asp Val
20

<210> 57

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 57

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgtat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag ggtggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagcgcct gatctatgct acatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcgg cctgcagcct 240
gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt accctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 58

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 58

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 59

<211> 18

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 59

cagggcatta gaaatgat

18

<210> 60

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 60

Gln Gly Ile Arg Asn Asp

1

5

<210> 61

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 61

gctacatcc

9

<210> 62

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 62

Ala Thr Ser

1

<210> 63

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 63

ctacagcata atagttaccc tcggacg 27

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 64

Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210>

> 65

<211> 387

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 65

gaggtgcagc tggtaggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt aactattgga tgagctgggt cgcctggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gagatactat 180

gtgggctctg tgaagggccg attcaccatc tccagaggcg acgccaagaa ctactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcga 300

tttggatata gtgccttcga taagggggta cgctactact acggtatgga cgtctggggc 360

caagggacca cggtcaccgt ctcttca 387

<210> 66

<211> 129

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Leu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Arg Tyr Tyr Val Gly Ser Val

50 55 60

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

100 105 110

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser

<210> 67

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 67

ggattcacct ttagtaacta ttgg

24

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 68

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Trp

1 5

<210> 69

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 69

ataaagcaag atggaagtga gaga 24

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 70

Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Arg

1 5

<210> 71

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 71

gcgagagatc gatttggata tagtgccttc gataagggg tacgtacta ctacggtatg 60

gacgtc 66

<210> 72

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 72

Ala Arg Asp Arg Phe Gly Tyr Ser Ala Phe Asp Lys Gly Val Arg Tyr

1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Met Asp Val

20

<210> 73

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 73

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtc gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagcgct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataatagtt accctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 74

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 74

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 75

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 75

cagggcatta gaaatgat

18

<210> 76

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 76

Gln Gly Ile Arg Asn Asp

1

5

<

210> 77

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 77

gctgcatcc

9

<210> 78

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 78

Ala Ala Ser

1

<210> 79

<211> 27

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 79
 ctacagcata atagttaccc tcggacg

27

<210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 80
 Leu Gln His Asn Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210> 81
 <211> 387
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 81

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggt ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag ccctctggatt cacctttagt agcttttga tgagttgggt cgcgcagggt 120
 ccaggaagg ggctgcagtg ggtggccaac ataaagcaag atggaagtga gaaatactat 180

gtggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctacactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagataga 300
 ttgggatata gtgtctacga taagggggta cgctactact acggtatgga cgtctggggc 360
 caagggacca cggtcacctg ctccctca 387

<210> 82
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 82

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val

50 55 60

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

100 105 110

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser

115 120 125

Ser

<210> 83

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 83

ggattcacct ttagtagctt ttgg

24

<210

> 84

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 84

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Trp

1 5

<210> 85
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic

<400> 85
 ataaagcaag atggaagtga gaaa 24

<210> 86
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 86

Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys

1 5
 <210> 87
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 87
 gcgagagata gatttgata tagtgtctac gataaggggg tacgctacta ctacggtatg 60
 gacgtc 66

<210> 88
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 88
 Ala Arg Asp Arg Phe Gly Tyr Ser Val Tyr Asp Lys Gly Val Arg Tyr

1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Met Asp Val

20

<210> 89
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 89
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgtat ctgiaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtc gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcgg cctgcagtct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtctacag cataagagtt accctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 90
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 90

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Lys Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 91

<211> 18
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 91
 cagggcatta gaaatgat 18
 <210> 92
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 92
 Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 1 5
 <210> 93
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 93
 gctgcatcc 9
 <210> 94

 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 94
 Ala Ala Ser
 1
 <210> 95
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 95

ctacagcata agagttaccc tcggacg 27

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 96

Leu Gln His Lys Ser Tyr Pro Arg Thr

1 5

<210>

> 97

<211> 378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 97

caggtgaagt tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactatgtca tacactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcggtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca actccaagaa tacgctgtat 240

ttgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcgg 300

tggttcggg gactcgatta ctactactac tacggtttgg acgtctgggg ccaagggacc 360

tcggtcaccg tctcctca 378

<210> 98

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 98

Gln Val Lys 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 Asn Tyr

20 25 30
Val Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

115 120 125

<210> 99
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 99

ggattcacct tcagtaacta tgtc

24

<210> 100
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 100

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Val

1 5
<210> 101
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223>

> synthetic

<400> 101

atatggtatg atggaagtaa taaa 24

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 102

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys

1 5

<210> 103

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 103

gcgagagatc ggggtggttcg gggagtcgat tactactact actacggttt ggacgtc 57

<210> 104

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 104

Ala Arg Asp Arg Val Val Arg Gly Val Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr Gly

1 5 10 15

Leu Asp Val

<210> 105

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 105

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttaga agcaacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggtcct catctatggt gcatectcca gggccactgg tatcccagcc 180
aggttcagtg gcactgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag cctgcagtct 240
gacgattttg cagtttatta ctgtcagcaa tataataagt ggcctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa g 321

<210> 106
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 106

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Asn
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Thr Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Lys Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 107
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 107

cagagtgtta gaagcaac

18

<210> 108

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 108

Gln Ser Val Arg Ser Asn

1 5

<210> 109

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 109

ggtgcatcc

9

<210> 110

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 110

Gly Ala Ser

1

<210> 111

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 111

cagcaatata ataagtgccc tcggacg

27

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 112

Gln Gln Tyr Asn Lys Trp Pro Arg Thr

1 5

<210> 113

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 113

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaaac ctggggggtc ccttagactc 60

tcctgtgcag cctctggaat cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggttggccgt attaaaagca aagttgatgg tgggacaata 180

gactacgtg caccctgaa aggcagattc accatctcaa gagatgattc aaaaaacacg 240

ctgtatctgc aaatgaacag cctgaaaacc gaggacacag ccgtttatta ctgtaccaca 300

ggtcgaatta ctatggttcg gggagttttg ggctactggg gccaggaac cctggtcacc 360

gtctcctca 369

<210> 114

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 114

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ala

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

85 90 95
 Tyr Cys Thr Thr Gly Arg Ile Thr Met Val Arg Gly Val Leu Gly Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 115

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 115

ggaatcactt tcagtaacgc ctgg 24

<210> 116

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 116

Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ala Trp

1 5

<210> 117

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 117

attaaaagca aagttgatgg tgggacaata 30

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 118

Ile Lys Ser Lys Val Asp Gly Gly Thr Ile

1 5 10

<210> 119

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 119

accacaggtc gaattactat gggtcgggga gttttgggct ac

42

<210> 120

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 120

Thr Thr Gly Arg Ile Thr Met Val Arg Gly Val Leu Gly Tyr

1 5 10

<210> 121

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

synthetic

<400> 121

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc

60

atcaactgca agtccagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct

120

tgggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgtcga tttactgggc atctaccgg

180

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc

240

atcagcagcc tgcaggetga agatgtggct gtttattact gtcagcaata ttatagtact

300

tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaa

336

<210> 122

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 122

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 123

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> synthetic

<400> 123

cagagtgttt tatacagctc caacaataag aactac

36

<210> 124

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 124
Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 125
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic

<400> 125
tgggcatct

9

<210> 126
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic

<400> 126
Trp Ala Ser

1
<210> 127
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic

<400> 127
cagcaatatt atagtactta cact

24

<210> 128
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic

<400> 128
Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Tyr Thr
1 5

<210> 129
 <211> 369
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 129
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctggggggtc ccttagactc 60
 tcctgtgcag cctctggaat cactttcagt aacgcctgga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggttggccgt tttaaaggca aagctgatgg tgggacagtt 180
 gactatgctg caccctgaa aggagattc accatctcaa gagatgattc gaaaaacacg 240
 ctgtatctgc aaatgaacag tctgaaaaac gaggacacag ccgtgtatta ctgcaccaca 300
 ggctgaatta ctatggttcg gggagttttg ggctactggg gccaggaac cctggtcact 360

gtctcctca 369

<210> 130
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 130

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Phe Lys Gly Lys Ala Asp Gly Gly Thr Val Asp Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Thr Gly Arg Ile Thr Met Val Arg Gly Val Leu Gly Tyr

100	105	110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
115	120	
<210> 131		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> synthetic		
<400> 131		
ggaatcactt tcagtaacgc ctgg	24	
<210> 132		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> synthetic		
<400> 132		
Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ala Trp		
1 5		
<210> 133		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> synthetic		
<400> 133		
tttaaaggca aagctgatgg tgggacagtt	30	
<210> 134		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> synthetic		
<400> 134		
Phe Lys Gly Lys Ala Asp Gly Gly Thr Val		
1 5 10		

<210> 135
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 135
 accacaggtc gaattactat gggtcgggga gttttgggct ac 42

<210> 136
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 136
 Thr Thr Gly Arg Ile Thr Met Val Arg Gly Val Leu Gly Tyr
 1 5 10

<210> 137
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 137
 gacatcgtga tgacccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60
 atcaactgca agtcagccca gagtgtttta tacacctcca acaataagaa ctacttagct 120
 tggtagcagc agaaaccagg acagcctcct aaactgctca tttactgggc atctaccgg 180

gaatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300
 tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaa 336

<210> 138
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 138

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Thr
 20 25 30
 Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 139

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 139

cagagtgttt tatacacctc caacaataag aactac

36

<210> 140

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 140

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

1 5 10

<210> 141

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 141

tgggcatct

9

<210> 142

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 142

Trp Ala Ser

1

<210> 143

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 143

cagcaatatt atagtactta cact

24

<210> 144

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 144

Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Tyr Thr

1

5

<210> 145

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 145

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtggaggtc

60

tcctgcaagg ctcttgata caccttcacc gactactata tacactggat acgacaggcc 120
cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccctg acagtggctg cacaactat 180

gcacagaagt ttcaggtcag ggtcacatg accagggaca cgtccatcac cacagcctac 240
atggaactga acagactgaa atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaggaccc 300
ctacgtggat atagcggcta cgattttttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360
gtctcctca 369

<210> 146

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 146

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 147

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 147

ggatacacct tcaccgacta ctat

24

<210> 148

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 148

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 149

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 149

atcaaccctg acagtggctg caca

24

<210> 150

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 150

Ile Asn Pro Asp Ser Gly Arg Thr

1 5

<210> 151

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 151

gcgagaggac ccctacgtgg atatagcggc tacgattttt ttgactac

48

<210> 152

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 152

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

1 5 10 15

<210> 153

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 153

gacatccagt tgacccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcacttgct gggccagtc gggcattagc agttatttag cctggatatca gcaaaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccactt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttactctca caatcagcag cctgcagcct	240
gaagattttg caagttattt ctgtcaacag cttaatagta accctcggac gttcggccaa	300
gggaccaagg tggaaatcaa a	321

<210> 154

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 154

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

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

<210> 155
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 155

cagggcatta gcagttat 18

<210> 156
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 156

Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
1 5

<210> 157
<211> 9
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 157

gctgcatcc 9

<210> 158
<211> 3
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 158

Ala Ala Ser

1

<210> 159

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 159

caacagctta atagtaaccc tcggacg

27

<210> 160

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 160

Gln Gln Leu Asn Ser Asn Pro Arg Thr

1

5

<210> 161

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 161

gaagtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggcaggtc cctgagactc

60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatgcca tgcaactgggt ccggcaagtt

120

ccagggaagg gcctggagtg ggtctcaggt attacttgga atagtgggtga cataggctat

180

gcggactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctatat

240

ctgcaaatga acagtctaag agctgaggac acggccttgt attactgtac aaaagataaa

300

gatagcagtg gctactacgg tattgacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc

360

tca

363

<210> 162

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 162

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Thr Trp Asn Ser Gly Asp Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Lys Asp Lys Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Gly Ile Asp Val Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 163

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 163

ggattcacct ttgatgatta tgcc

24

<210> 164

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 164

Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala

1 5

<210> 165

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 165

attacttgga atagtgggtga cata

24

<210> 166

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 166

Ile Thr Trp Asn Ser Gly Asp Ile

1 5

<210> 167

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 167

acaaaagata aagatagcag tggctactac ggtattgacg tc

42

<210> 168

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 168

Thr Lys Asp Lys Asp Ser Ser Gly Tyr Tyr Gly Ile Asp Val

1 5 10

<210> 169

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 169

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcgagtc gggatattcg accctggtag cctggatatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgca gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtgaatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tccattcac ttctggccct 300

gggaccaaag tggatatcaa a 321

<210> 170

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 170

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys

100

105

<210> 171

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 171

cagggtattc gcacctgg

18

<210> 172

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 172

Gln Gly Ile Arg Thr Trp

1

5

<210> 173

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 173

gcagcatcc

9

<210> 174

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 174

Ala Ala Ser

1

<210> 175

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 175

caacaggcta acagtttccc attcact 27

<210> 176

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 176

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Phe Thr

1 5

<210> 177

<211> 384

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 177

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagac ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag ccctctggatt caccttcagt gactactaca tgaactggat cgcgcaggct 120

ccagggaagg gcctggagtg ggtttcatat attagtagta gtggcagtac catacactac 180

gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa tttagtgtat 240

ctgcgaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gagagagaga 300

gaggtccatg actacagtga tccttacttc ttcttctacg gtatggacgt ctggggccaa 360

gggaccacgg tcaccgtctc ctca 384

<210> 178

<211> 128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 178

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

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

 20 25 30
 Tyr Met Asn Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Val Tyr
 65 70 75 80
 Leu Arg Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Arg Glu Val His Asp Tyr Ser Asp Pro Tyr Phe Phe Phe
 100 105 110
 Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

 115 120 125

<210> 179
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 179

ggattcacct tcagtgacta ctac

24

<210> 180
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 180

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 181
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 181
 attagtagta gtggcagtac cata 24
 <210> 182
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 182
 Ile Ser Ser Ser Gly Ser Thr Ile
 1 5
 <210> 183
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 183
 gcgagagaga gagaggtcca tgactacagt gatccttact tcttcttcta cggatatggac 60
 gtc 63
 <210> 184
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 184
 Ala Arg Glu Arg Glu Val His Asp Tyr Ser Asp Pro Tyr Phe Phe Phe
 1 5 10 15
 Tyr Gly Met Asp Val
 20
 <210> 185
 <211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 185

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttggaga cagagtcacc	60
atcacttgtc gggcgagtc ggaagttagc agctggtag cctggatca acacaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctttgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcacgc gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcagtct	240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctaacagtt tcccgtcac tticggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 186

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 186

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly	
1 5 10 15	
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Trp	
20 25 30	
Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
35 40 45	
Phe Ala Ala Ser Ser 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 Ser Ser Leu Gln Ser	
65 70 75 80	
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu	
85 90 95	
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
100 105	

<210> 187

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 187

caggatgtta gcagctgg 18

<210> 188
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 188

Gln Asp Val Ser Ser Trp

1 5
 <210> 189
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 189

gctgcatcc 9

<210> 190
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic
 <400> 190

Ala Ala Ser

1
 <210> 191
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 191

caacaggcta acagtttccc gctcact

27

<210> 192

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 192

Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 193

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 193

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtggaggtc 60

tcctgcaagg ctcttgata cacttcacc gactactata tacactggat acgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccctg acagtggtcg cacaaactat 180

gcacagaagt ttcaggtcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcac cacagcctac 240

atggaactga acagactgaa atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaggaccc 300

ctacgtggat atagcggcta cgattttttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360

gtctcctca 369

<210> 194

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 194

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Asp Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Val Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Asn Arg Leu Lys Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Pro Leu Arg Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Phe Phe Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 195

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 195

ggatacacct tcaccgacta ctat

24

<210> 196

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 196

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr

1 5

<210> 197

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 197
atcaaccctg acagtggtcg caca 24

<210> 198
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 198
Ile Asn Pro Asp Ser Gly Arg Thr
1 5
<210> 199
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 199
gcgagaggac ccctacgtgg atatagcggc tacgattttt ttgactac 48

<210> 200
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 200
Ala Arg Gly Pro Leu Arg Gly Tyr Ser Gly Tyr Asp Phe Phe Asp Tyr
1 5 10 15
<210> 201
<211> 321
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 201
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ttgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagtattagt agttatttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc cgaaactcct gatctatact gcatccactt tgcaaagagg ggtcccatca 180
 aggttcagag gcagtgggtc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ttgtcatcag acttacagta tcccatcac cttcggccaa 300
 gggacacgac tggagattaa a 321

<210> 202
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 202

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Thr Ala Ser Thr Leu Gln Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 203
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 203

cagagtatta gtagttat 18

<210> 204

<211> 6

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 204
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 205
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 205

actgcatcc 9

<210> 206
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 206

Thr Ala Ser
 1
 <210> 207
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 207
 catcagactt acagtatccc catcacc 27

<210> 208
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic

<400> 208

His Gln Thr Tyr Ser Ile Pro Ile Thr

1 5

<210> 209

<211> 369

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 209

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtggaggtc 60

tcctgcaagg ctcttgata caccttcacc gactactata tacactggat acgacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggatgg atcaaccctg acagtggtcg cacaaactat 180

gcacagaagt ttcaggtcag ggtcaccatg accagggaca cgtccatcac cacagcctac 240

atggaactga acagactgaa atctgacgac acggccgtgt attactgtgc gagaggaccc 300

ctacgtggat atagcggcta cgattttttt gactactggg gccagggaac cctggtcacc 360

gtctcctca 369

<210> 210

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 210

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85

90

95

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

100

105

110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

120

<210> 211

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 211

ggatacacct tcaccgacta ctat

24

<210> 212

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 212

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr

1

5

<210> 213

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 213

atcaaccctg acagtggtcg caca

24

<210> 214

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 214

Ile Asn Pro Asp Ser Gly Arg Thr

1 5

<210> 215

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 215

gcgagaggac ccctacgtgg atatagcggc tacgattttt ttgactac 48

<210> 216

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 216

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

1 5 10 15

<210> 217

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 217

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaaccgcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcatcct 240

gaggattttg caacttattc ctgtctacag cataatagtt tcccgtcac ttctggcggg 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 218

<211> 107

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 218
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Arg Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu His Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Ser Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 219
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 219

cagggcatta gaaatgat

18

<210> 220
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 220
 Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 1 5

<210> 221
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 221

gctgcatcc

9

<210> 222

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 222

Ala Ala Ser

1

<210> 223

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 223

ctacagcata atagtttccc gtcact

27

<210> 224

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 224

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Leu Thr

1

5

<210> 225

<211> 380

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 225

Met Glu Glu Gly Gly Asp Phe Asp Asn Tyr Tyr Gly Ala Asp Asn Gln

1 5 10 15

Ser Glu Cys Glu Tyr Thr Asp Trp Lys Ser Ser Gly Ala Leu Ile Pro

20 25 30

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

35 40 45

Val Leu Trp Thr Val Phe Arg Ser Ser Arg Glu Lys Arg Arg Ser Ala

50 55 60

Asp Ile Phe Ile Ala Ser Leu Ala Val Ala Asp Leu Thr Phe Val Val

65 70 75 80

Thr Leu Pro Leu Trp Ala Thr Tyr Thr Tyr Arg Asp Tyr Asp Trp Pro

85 90 95

Phe Gly Thr Phe Phe Cys Lys Leu Ser Ser Tyr Leu Ile Phe Val Asn

100 105 110

Met Tyr Ala Ser Val Phe Cys Leu Thr Gly Leu Ser Phe Asp Arg Tyr

115 120 125

Leu Ala Ile Val Arg Pro Val Ala Asn Ala Arg Leu Arg Leu Arg Val

130 135 140

Ser Gly Ala Val Ala Thr Ala Val Leu Trp Val Leu Ala Ala Leu Leu

145 150 155 160

Ala Met Pro Val Met Val Leu Arg Thr Thr Gly Asp Leu Glu Asn Thr

165 170 175

Thr Lys Val Gln Cys Tyr Met Asp Tyr Ser Met Val Ala Thr Val Ser

180 185 190

Ser Glu Trp Ala Trp Glu Val Gly Leu Gly Val Ser Ser Thr Thr Val

195 200 205

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

210 215 220

Ala Gln Thr Ile Ala Gly His Phe Arg Lys Glu Arg Ile Glu Gly Leu
 225 230 235 240
 Arg Lys Arg Arg Arg Leu Leu Ser Ile Ile Val Val Leu Val Val Thr
 245 250 255
 Phe Ala Leu Cys Trp Met Pro Tyr His Leu Val Lys Thr Leu Tyr Met
 260 265 270
 Leu Gly Ser Leu Leu His Trp Pro Cys Asp Phe Asp Leu Phe Leu Met
 275 280 285
 Asn Ile Phe Pro Tyr Cys Thr Cys Ile Ser Tyr Val Asn Ser Cys Leu
 290 295 300
 Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Phe Phe Asp Pro Arg Phe Arg Gln Ala Cys
 305 310 315 320
 Thr Ser Met Leu Cys Cys Gly Gln Ser Arg Cys Ala Gly Thr Ser His
 325 330 335
 Ser Ser Ser Gly Glu Lys Ser Ala Ser Tyr Ser Ser Gly His Ser Gln
 340 345 350
 Gly Pro Gly Pro Asn Met Gly Lys Gly Gly Glu Gln Met His Glu Lys
 355 360 365
 Ser Ile Pro Tyr Ser Gln Glu Thr Leu Val Val Asp
 370 375 380
 <210> 226
 <211> 380
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 226
 Met Glu Glu Gly Gly Asp Phe Asp Asn Tyr Tyr Gly Ala Asp Asn Gln
 1 5 10 15
 Ser Glu Cys Glu Tyr Thr Asp Trp Lys Ser Ser Gly Ala Leu Ile Pro
 20 25 30
 Ala Ile Tyr Met Leu Val Phe Leu Leu Gly Thr Thr Gly Asn Gly Leu
 35 40 45

Val Leu Trp Thr Val Phe Arg Ser Ser Arg Glu Lys Arg Arg Ser Ala
50 55 60

Asp Ile Phe Ile Ala Ser Leu Ala Val Ala Asp Leu Thr Phe Val Val
65 70 75 80

Thr Leu Pro Leu Trp Ala Thr Tyr Thr Tyr Arg Asp Tyr Asp Trp Pro
85 90 95

Phe Gly Thr Phe Ser Cys Lys Leu Ser Ser Tyr Leu Ile Phe Val Asn
100 105 110

Met Tyr Ala Ser Val Phe Cys Leu Thr Gly Leu Ser Phe Asp Arg Tyr
115 120 125

Leu Ala Ile Val Arg Pro Val Ala Asn Ala Arg Leu Arg Leu Arg Val
130 135 140

Ser Gly Ala Val Ala Thr Ala Val Leu Trp Val Leu Ala Ala Leu Leu
145 150 155 160

Ala Met Pro Val Met Val Phe Arg Thr Thr Gly Asp Leu Glu Asn Thr
165 170 175

Thr Lys Val Gln Cys Tyr Met Asp Tyr Ser Met Val Ala Thr Val Ser
180 185 190

Ser Asp Trp Ala Trp Glu Val Gly Leu Gly Val Ser Ser Thr Thr Val
195 200 205

Gly Phe Val Val Pro Phe Thr Ile Met Leu Thr Cys Tyr Phe Phe Ile
210 215 220

Ala Gln Thr Ile Ala Gly His Phe Arg Lys Glu Arg Ile Glu Gly Leu
225 230 235 240

Arg Lys Arg Arg Arg Leu Leu Ser Ile Ile Val Val Leu Val Val Thr
245 250 255

Phe Ala Leu Cys Trp Met Pro Tyr His Leu Val Lys Thr Leu Tyr Met
260 265 270

Leu Gly Ser Leu Leu His Trp Pro Cys Asp Phe Asp Leu Phe Leu Met
275 280 285

Asn Val Phe Pro Tyr Cys Thr Cys Ile Ser Tyr Val Asn Ser Cys Leu
290 295 300

Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Phe Phe Asp Pro Arg Phe Arg Gln Ala Cys

305 310 315 320

Thr Ser Met Leu Cys Cys Gly Gln Ser Arg Cys Ala Gly Thr Ser His

325 330 335

Ser Ser Ser Gly Glu Lys Ser Ala Ser Tyr Ser Ser Gly His Ser Gln

340 345 350

Gly Pro Gly Pro Asn Met Gly Lys Gly Gly Glu Gln Met His Glu Lys

355 360 365

Ser Ile Pro Tyr Ser Gln Glu Thr Leu Val Val Asp

370 375 380

<210> 227

<211> 77

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 227

Met Asn Leu Arg Leu Cys Val Gln Ala Leu Leu Leu Trp Leu Ser

1 5 10 15

Leu Thr Ala Val Cys Gly Gly Ser Leu Met Pro Leu Pro Asp Gly Asn

20 25 30

Gly Leu Glu Asp Gly Asn Val Arg His Leu Val Gln Pro Arg Gly Ser

35 40 45

Arg Asn Gly Pro Gly Pro Trp Gln Gly Gly Arg Arg Lys Phe Arg Arg

50 55 60

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe

65 70 75

<210> 228

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 228

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe

1 5 10

<210> 229

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 229

Lys Phe Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro

1 5 10 15

Phe

<210> 230

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 230

Leu Val Gln Pro Arg Gly Ser Arg Asn Gly Pro Gly Pro Trp Gln Gly

1 5 10 15

Gly Arg Arg Lys Phe Arg Arg Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly

20 25 30

Pro Met Pro Phe

35

<210> 231

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 231

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 232

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 232

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

<210> 233
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 233

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 234
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> synthetic
 <400> 234

caaagaccaa gactttcaca caaaggacct atgccattcg gtggtggtgg aagcggaggg 60
 ggaggatctg gaggtggtgg atcagacatc gtgatgaccc agtctccaga ctccctggct 120
 gtgtctctgg gcgagagggc caccatcaac tgcaagtcca gccagagtgt ttatacacc 180
 tccaacaata agaactactt agcttggtac cagcagaaac caggacagcc tcctaaactg 240
 ctcatcttact gggcatctac ccgggaatcc ggggtccctg accgattcag tggcagcggg 300
 tctgggacag atttcactct caccatcagc agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtttat 360

 tactgtcagc aatattatag tacttacact ttggccagg ggaccaagct ggagatcaaa 420
 420

<210> 235
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 235

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met

20 25 30

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

35 40 45

Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Thr Ser Asn Asn Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

100 105 110

Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr

115 120 125

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

130 135 140

<210> 236

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 236

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60

atcaactgca agtcagcca gagtgtttta tacacctcca acaataagaa ctacttagct 120

tggtagcagc agaaaccagg acagctcct aaactgtca tttactgggc atctaccgg 180

gaatccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggca gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300

tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaagaa ctgtggctgc accatctgtc 360

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccttccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540

agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
gtcaccctac agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgtgga 660
ggtggtggat caggaggagg gggctccggg ggaggaggta gccaaagacc acgattgtct 720
cacaagagac caatgccatt ttaa 744

<210> 237

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 237

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Thr
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Arg Pro Arg Leu Ser

225 230 235 240

His Lys Gly Pro Met Pro Phe

245

<210> 238

<211> 453

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

$\langle 220 \rangle \langle 223 \rangle$ synthetic

<400> 238

caaagaccaa gactttcaca caaaggacct atgccattcg gtggtggtgg aagcggaggg 60

ggaggatctg gaggtggtgg atcagaggtg cagctggtgg agtctggggg aggcttggtg 120

aagcctggggg ggtcccttag actctcctgt gcagcctctg gaatcacttt cagtaacgcc 180

tggatgagct ggggtccgcca ggctccaggg aaggggctgg agtgggttgg ccgtttttaa 240

ggcaaagctg atggtgggac agttgactat gctgcacccg tgaaaggcag attcaccatc 300

tcaagagatg attcgaaaaa cacgctgtat ctgcaaatga acagtctgaa aaacgaggac 360

acagccgtgt attactgcac cacaggtcga attactatgg ttcggggagt tttgggctac 420

tggggccagg gaacctggt cacygtctcc tca 453

<210> 239

<211> 151

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 239

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Gly Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu

35 40 45

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp

50 55 60

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Phe Lys

65 70 75 80

Gly Lys Ala Asp Gly Gly Thr Val Asp Tyr Ala Ala Pro Val Lys Gly

85 90 95

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

100 105 110

Met Asn Ser Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr

115 120 125

Gly Arg Ile Thr Met Val Arg Gly Val Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly

130 135 140

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

145 150

<210> 240

<211> 408

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 240

caaagaccaa gactttcaca caaaggacct atgcccttcg aggtgcagct ggtggagtct 60

gggggaggct tggtaaagcc tggggggtcc cttagactct cctgtgcagc ctctggaatc 120

actttcagta acgcctggat gagctgggtc cgccaggctc cagggaaggg gctggagtgg 180

gttggccgtt ttaaaggcaa agctgatggt gggacagttg actatgctgc acccgtgaaa 240

ggcagattca ccatctcaag agatgattcg aaaaacacgc tgtatctgca aatgaacagt 300

ctgaaaaacg aggacacagc cgtgtattac tgcaccacag gtcgaattac tatggttcgg 360

ggagtttttg gctactgggg ccaggaacc ctggtcacyg tctcctca 408

<210> 241

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 241

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Glu Val Gln

1 5 10 15

Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg

20 25 30

Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser

35 40 45

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Asp Gly Gly Thr Val Asp Tyr Ala Ala Pro Val Lys

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Gly Arg Ile Thr Met Val Arg Gly Val Leu Gly Tyr Trp Gly Gln

115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 242

<211> 423

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 242

caaagaccaa gactctcaca taaaggtcca atgcccttcg gtggtggcgg gtccgaggtg 60
cagctggtgg agtctggggg aggcttggta aagcctgggg ggtcccttag actctcctgt 120
gcagcctctg gaatcacttt cagtaacgcc tggatgagct gggtcgcca ggctccaggg 180

aaggggctgg agtgggttgg ccgtttttaa ggcaaagctg atggtgggac agttgactat 240
gctgcacccg tgaaggcag attcaccatc tcaagagatg attcgaaaaa cacgctgtat 300
ctgcaaatga acagtctgaa aaacgaggac acagccgtgt attactgcac cacaggtcga 360
attactatgg ttcggggagt tttgggctac tggggccagg gaaccctggt cacygtctcc 420
tca 423

<210> 243
<211> 141
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 243

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Gly Gly Gly

1	5	10	15
Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro			
20	25	30	
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser			
35	40	45	
Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu			
50	55	60	
Trp Val Gly Arg Phe Lys Gly Lys Ala Asp Gly Gly Thr Val Asp Tyr			
65	70	75	80

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

<210> 244
<211> 438
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 244

caaagaccta gactttcaca taaaggaccc atgcccttcg gaggaggagg atctggaggc	60
ggaggttctg aggtgcagct ggtggagtct gggggaggct tggtaaagcc tgggggggtcc	120
cttagactct cctgtgcagc ctctggaatc actttcagta acgcctggat gagctgggtc	180
cgccaggctc caggggaaggg gctggagtgg gttggccgtt ttaaaggcaa agctgatggt	240
gggacagttg actatgctgc acccgtgaaa ggcagattca ccattcaag agatgattcg	300
aaaaacacgc tgtatctgca aatgaacagt ctgaaaaacg aggacacagc cgtgtattac	360

tgcaccacag gtcgaattac tatggttcgg ggagttttgg gctactgggg ccaggggaacc	420
ctggtcacgy tctctca	438

<210> 245

<211> 146

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 245

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Gly Gly Gly

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

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

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

Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

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

Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro

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

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Phe Lys Gly Lys Ala Asp Gly

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

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

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

Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys

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

145

<210> 246

<211> 453

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 246

caaagaccaa gactttcaca caaaggacct atgccattcg gtggtggtgg aagcggaggg 60

ggaggatctg gaggtggtgg atcagaggtg cagctggtgg agtctggggg aggcttggtg 120

aaacctgggg ggtcccttag actctcctgt gcagcctctg gaatcacttt cagtaacgcc 180

tggatgagct gggtcgccca ggctccaggg aaggggctgg agtgggttgg ccgtattaaa 240

agcaaagttg atggtgggac aatagactac gctgcaccgc tgaaaggcag attcaccatc 300

tcaagagatg attcaaaaaa cacgtgtgat ctgcaaatga acagcctgaa aaccgaggac 360

acagccgttt attactgtac cacaggtcga attactatgg ttcggggagt ttgggctac 420

tggggccagg gaaccctggt cactgtctcc tca 453

<210> 247

<211> 151

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 247

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Gly Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu

35 40 45

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr

115 120 125

Gly Arg Ile Thr Met Val Arg Gly Val Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly

130 135 140

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

145 150

<210> 248

<211> 420

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 248

caaagaccaa gactttcaca caaaggacct atgccattcg gtggtggtgg aagcggaggg 60

ggaggatctg gaggtggtgg atcagacatc gtgatgacct agtctccaga ctccctggct 120

gtgtctctgg gcgagagggc caccatcaac tgcaagtcca gccagagtgt ttatatacagc 180

tccaacaata agaactactt agcttgggtac cagcagaaac caggacagcc tcctaagctg 240

ctcatttact gggcatctac ccgggaatcc ggggtccctg accgattcag tggcagcggg 300

tctgggacag atttactct caccatcagc agcctgcagg ctgaagatgt ggctgtttat 360

tactgtcagc aatattatag tacttacact ttggccagg ggaccaagct ggagatcaaa 420

420

<210> 249

<211> 140

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 249

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met

20 25 30

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

35 40 45

Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

100 105 110

Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr

115 120 125

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

130 135 140

<210> 250

<211> 744

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400>

250

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc 60

atcaactgca agtcagcca gagtgtttta tacagctcca acaataagaa ctacttagct 120

tggtaccagc agaaaccagg acagcctcct aagctgtca ttactgggc atctaccgg 180

gaatccgggg tcctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagcc tgcaggctga agatgtggct gtttattact gtcagcaata ttatagtact 300
tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
agcagcaccc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 600
gtcaccatc agggcctgag ctgccccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgtgga 660
ggtggtggat caggaggagg gggctccggg ggaggaggta gccaaagacc acgattgtct 720
cacaaaggac caatgccatt ttaa 744

<210> 251

<211> 247

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 251

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser
210 215 220
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Arg Pro Arg Leu Ser
225 230 235 240
His Lys Gly Pro Met Pro Phe

245

<210> 252

<211> 381

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 252

caaagaccaa gactttcaca caaaggacct atgcccttcg aggtgcagct gttggagtct 60

gggggaggct tgggttcagcc tgggggggtcc ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc 120

acctttagca actatgccat gaactgggtc cgccaggctc caggaggagg gctggagtgg 180

gtctcagcta ttcattatga tggtagtaat tcatattacg cagactccgt gaagggccgg 240

ttcaccatct ccagagacaa ttccaagaac acgtgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga 300

gccgaagaca cggccattta ttactgtgcg atattgtcaa gggcttactg gggccaggga 360

accctgggtca ccgtctcctc a 381

<210> 253

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 253

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Glu Val Gln

1	5	10	15
Leu	Leu	Glu	Ser
Gly	Gly	Gly	Leu
Val	Gln	Pro	Gly
Gly	Ser	Leu	Arg
20	25	30	
Leu	Ser	Cys	Ala
Ala	Ser	Gly	Phe
Thr	Phe	Ser	Asn
Tyr	Ala	Met	Asn
35	40	45	
Trp	Val	Arg	Gln
Ala	Pro	Gly	Arg
Gly	Leu	Glu	Trp
Val	Ser	Ala	Ile
50	55	60	
His	Tyr	Asp	Gly
Ser	Asn	Ser	Tyr
Tyr	Ala	Asp	Ser
Val	Lys	Gly	Arg
65	70	75	80

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

<210> 254

<211> 396

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 254

caaagaccaa gactctcaca taaaggtcca atgcccttcg gtggtggcgg gtctgaggtg	60
cagctgttgg agtctggggg aggccttggtt cagcctgggg ggtccctgag actctcctgt	120
gcagcctctg gattcacctt tagcaactat gccatgaact gggtcgcga ggctccaggg	180
agggggcttg agtgggtctc agctattcat tatgatggtg gtaattcata ttacgcagac	240
tccgtgaagg gccggttcac catctccaga gacaattcca agaacacgct gtatctgcaa	300
atgaacagcc tgagagccga agacacggcc atttattact gtgcgatatt gtcaagggtc	360
tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc tcctca	396

<210> 255
<211> 132
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 255

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Gly Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Trp Val Ser Ala Ile His Tyr Asp Gly Ser Asn Ser Tyr Tyr Ala Asp

65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr

85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr

100 105 110

Tyr Cys Ala Ile Leu Ser Arg Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

115 120 125

Thr Val Ser Ser

130

<210> 256

<211> 411

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 256

caaagaccta gactttcaca taaaggaccc atgcccttcg gaggaggagg atctggaggc 60

ggaggttctg aggtgcagct gttggagtct gggggaggct tggttcagcc tgggggggtcc 120

ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttagca actatgcat gaactgggtc 180
cgccaggctc caggaggagg gctggagtgg gtctcagcta ttcattatga tggtagtaat 240
tcatattacg cagactccgt gaagggccgg ttcaccatct ccagagacaa ttccaagaac 300

acgctgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga gccgaagaca cggccattta ttactgtgcg 360
atattgtcaa ggggtctactg gggccaggga accctggtea ccgtctctc a 411

<210> 257

<211> 137

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 257

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Gly Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

35 40 45

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro

50 55 60

Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile His Tyr Asp Gly Ser Asn

65 70 75 80

Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

85 90 95

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

100 105 110

Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ile Leu Ser Arg Val Tyr Trp Gly

115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135

<210> 258

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 258

caaagaccaa gactttcaca caaaggacct atgccattcg gtggtggtgg aagcggaggg 60

ggaggatctg gaggtggtgg atcagagggtg cagctgttgg agtctggggg aggcttggtt 120

cagcctgggg ggtccctgag actctcctgt gcagcctctg gattcacctt tagcaactat 180

gccatgaact gggtcgccca ggctccaggg agggggctgg agtgggtctc agctattcat 240

tatgatggta gtaattcata ttacgcagac tccgtgaagg gccggttcac catctccaga 300

gacaattcca agaacacgct gtatctgcaa atgaacagcc tgagagccga agacacggcc 360

atttattact gtgcgatatt gtcaagggtc tactggggcc aggggaaccct ggtcaccgtc 420

tcctca 426

<210> 259

<211> 142

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 259

Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Gly Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Asn Trp

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Asp Gly Ser Asn Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe

85 90 95

Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn

100 105 110

Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ile Leu Ser

115 120 125
Arg Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135 140
<210> 260
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 260
Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Ala

1 5 10
<210> 261
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 261
Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro

1 5 10
<210> 262

<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 262
Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met

1 5 10
<210> 263
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 263

Pro Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe

1 5 10

<210> 264

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 264

Pro Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe

1 5 10

<210> 265

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 265

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

1 5 10

<210> 266

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 266

Pro Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro

1 5 10

<210> 267

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 267

Pro Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met

1	5	10
<210>	268	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic	
<400>	268	
Pro Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met		
1	5	10
<210>	269	
<211>	19	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic	
<400>		
>	269	
Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Gly Gly		
1	5	10
		15
Gly Gly Gly		
<210>	270	
<211>	10	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic	
<400>	270	
Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly		
1	5	10
<210>	271	
<211>	11	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic	
<400>	271	

Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro

1 5 10

<210> 272

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 272

Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Ser

1 5 10

<210> 273

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 273

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Gln Arg

1 5 10 15

Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met

20 25

<210> 274

<211> 148

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 274

Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala

35 40 45

Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln
50 55 60

Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Phe Lys Gly Lys Ala
65 70 75 80

Asp Gly Gly Thr Val Asp Tyr Ala Ala Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr
85 90 95

Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
100 105 110

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

Thr Met Val Arg Gly Val Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
130 135 140

Thr Val Ser Ser
145

<210> 275
<211> 149
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 275

Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu
20 25 30

Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys
35 40 45

Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg
50 55 60

Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Phe Lys Gly Lys
65 70 75 80

Ala Asp Gly Gly Thr Val Asp Tyr Ala Ala Pro Val Lys Gly Arg Phe
85 90 95

Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn
100 105 110
Ser Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Arg
115 120 125
Ile Thr Met Val Arg Gly Val Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
130 135 140
Val Thr Val Ser Ser
145
<210> 276
<211> 150
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 276

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

Leu Val Thr Val Ser Ser

145 150

<210> 277

<211> 151

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 277

Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu

35 40 45

Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp

50 55 60

Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Phe Lys

65 70 75 80

Gly Lys Ala Asp Gly Gly Thr Val Asp Tyr Ala Ala Pro Val Lys Gly

85 90 95

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

100 105 110

Met Asn Ser Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr

115 120 125

Gly Arg Ile Thr Met Val Arg Gly Val Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly

130 135 140

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

145 150

<210> 278

<211> 163

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 278

Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr Gln Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala

50 55 60

Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala

65 70 75 80

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Phe Lys Gly Lys Ala Asp

85 90 95

Gly Gly Thr Val Asp Tyr Ala Ala Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile

100 105 110

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu

115 120 125

Lys Asn Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Thr Gly Arg Ile Thr

130 135 140

Met Val Arg Gly Val Leu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

145 150 155 160

Val Ser Ser

<210> 279

<211> 139

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 279

Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

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

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

50 55 60
Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile His Tyr Asp Gly
65 70 75 80
Ser Asn Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
85 90 95
Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg
100 105 110
Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ile Leu Ser Arg Val Tyr
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130 135
<210> 280
<211> 140
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic
<400> 280

Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu
20 25 30
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys

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

85 90 95
Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
100 105 110

Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ile Leu Ser Arg Val
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 281

<211> 141

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 281

Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

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

20 25 30
Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser

35 40 45

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Asn Trp Val
50 55 60

Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile His Tyr
65 70 75 80

Asp Gly Ser Asn Ser Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
85 90 95

Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser
100 105 110

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Ile Leu Ser Arg
115 120 125

Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

<210> 282

<211> 142

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 282

Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Ser Gly Gly Gly

1	5	10	15
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu			
20	25	30	
Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu			
35	40	45	
Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala Met Asn Trp			
50	55	60	
Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Val Ser Ala Ile His			
65	70	75	80

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

<210> 283

<211> 15

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 283

Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Arg

1	5	10	15
<210>	284		

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 284

Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe Ser

1 5 10 15

<210> 285

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic

<400> 285

Pro Gln Arg Pro Arg Leu Ser His Lys Gly Pro Met Pro Phe His

1 5 10 15