



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년01월22일
(11) 등록번호 10-2755284
(24) 등록일자 2025년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) A61P 13/12 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01) C07K 7/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/22 (2013.01)
A61K 47/68 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2023-7042558(분할)
(22) 출원일자(국제) 2018년01월19일
심사청구일자 2024년01월08일
(85) 번역문제출일자 2023년12월08일
(65) 공개번호 10-2023-0172039
(43) 공개일자 2023년12월21일
(62) 원출원 특허 10-2019-7024021
원출원일자(국제) 2018년01월19일
심사청구일자 2021년01월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/014350
(87) 국제공개번호 WO 2018/136698
국제공개일자 2018년07월26일
(30) 우선권주장
62/448,763 2017년01월20일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020020026558 A*
KR1020150132262 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
젠자임 코퍼레이션
미국 메사추세츠주 02141 캠브리지 워터 스트리트 450
(72) 발명자
추, 화웨이
미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에이-505에이 코퍼레이트 드라이브 55 사노피 내
박, 성해
미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에이-505에이 코퍼레이트 드라이브 55 사노피 내
스테파노, 제임스
미국 08807 뉴저지주 브릿지워터 메일 코드: 55에이-505에이 코퍼레이트 드라이브 55 사노피 내
(74) 대리인
양영준, 임근실

전체 청구항 수 : 총 12 항

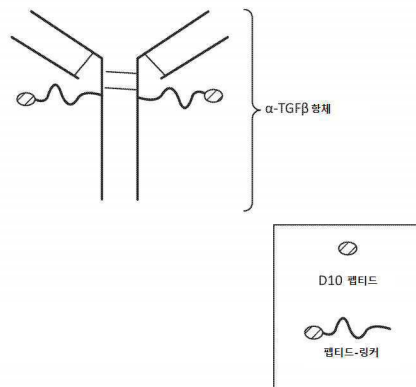
심사관 : 한정선

(54) 발명의 명칭 골 표적화 항체

(57) 요약

항체 또는 이의 단편의 골에 대한 국제화를 개선하고자 1종 이상의 폴리-아스파르트산염(폴리-D) 캡티드(예컨대, D10 서열)로 개질된 재조합 및 화학적으로 접합된 항체 및 이의 단편이 제공된다. 이들 항체 및 단편의 제조 방법 및 사용 방법 또한 개시된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 13/12 (2018.01)

A61P 19/08 (2018.01)

A61P 19/10 (2018.01)

A61P 35/04 (2018.01)

C07K 7/06 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

비스포스포네이트와 조합하여 불완전 골생성증, 골 손실, 또는 골다공증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 불완전 골생성증, 골 손실, 또는 골다공증을 치료하기 위한, 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약학적 조성물이며, 여기서 항체 또는 항원-결합 단편은 중쇄 및 경쇄를 포함하고, 1개 이상의 폴리-아스파르트산염(폴리-D) 펩티드가 중쇄의 N-말단 및 C-말단 중 하나 또는 둘 다에서 중쇄에 및/또는 경쇄의 C-말단에 일체화되게 연결되고,

상기 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 각각 서열번호 1을 포함하고,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은

각각 서열번호 33, 34, 및 35의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 1 내지 3 및 각각 서열번호 36, 37, 및 38의 경쇄 CDR 1 내지 3; 또는

서열번호 2의 중쇄 가변 도메인(V_H) 및 서열번호 6의 경쇄 가변 도메인(V_L)

을 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

(i) 중쇄의 N-말단과 일체화된 폴리-D 펩티드,

(ii) 중쇄의 C-말단과 일체화된 폴리-D 펩티드, 또는

(iii) (i) 및 (ii) 둘 다

를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

경쇄의 C-말단과 일체화된 폴리-D 펩티드

를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 폴리-D 펩티드(들)가 펩티드 링커를 통하여 중쇄 또는 경쇄에 융합되는 것인 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 IgG인 약학적 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가

서열번호 13의 잔기 1 내지 120에 상응하는 중쇄 가변 도메인(V_H) 아미노산 서열 및

서열번호 15의 잔기 1 내지 108에 상응하는 경쇄 가변 도메인(V_L) 아미노산 서열

을 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 위치 228(EU 넘버링)에서 프롤린을 갖는 인간 IgG₄ 불변 영역을 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 항체가 위치 228(EU 넘버링)에서 프롤린을 갖는 인간 IgG₄ 불변 영역을 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서,
항체의 중쇄가 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하고,
항체의 경쇄가 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 것인
약학적 조성물.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서,
중쇄가 서열번호 13, 14, 16, 또는 17의 아미노산 서열을 포함하고,
경쇄가 서열번호 15, 19, 21, 또는 22의 아미노산 서열을 포함하는 것인
약학적 조성물.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 항체가 각각 서열번호 2 및 6의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 것인 약학적 조성물.

청구항 12

비스포스포네이트와 조합하여 불완전 골생성증, 골 손실, 또는 골다공증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 불완전 골생성증, 골 손실, 또는 골다공증을 치료하기 위한, IgG₄ 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 약학적 조성물이며, 여기서
항체의 중쇄는 서열번호 14 또는 17의 아미노산 서열을 포함하고,
경쇄는 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 것인
약학적 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] [관련 출원에 대한 상호 참조]
- [0002] 본 출원은 개시 내용이 전체로서 본 명세서에 참고로 포함되는 2017년 1월 20일 출원된 미국 가출원 제 62/448,763호로부터 우선권을 주장한다.
- [0003] [서열목록]
- [0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다. 2018년 1월 11일에 생성된 상기 ASCII 카피는 명칭이 022548_W0012_SL.txt이며, 크기가 75,113 바이트이다.
- [0005] [기술분야]
- [0006] 본 발명은 골 표적화 펩티드로 개질된 항체 및 병리생리학적 골 퇴화 치료를 위한 이의 사용 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] 적절한 골 발달 및 유지는 정상적인 건강에 중요한 인자이다. 평균적인 인간의 경우, 골 발달은 골 밀도가 일반적으로 최대인 약 20세까지 일어난다. 그 이후, 골 밀도는 적절한 식이 및 신체 운동이 없으면 감소할 수 있다. 그러나 정상적인 골 유지는 오래된 뼈가 제거되고 새로운 뼈로 교체되는 항상성의 골 교체를 필요로 한다.
- [0008] 그러나 골 발달 및 유지에 영향을 미칠 수 있는 다수의 질환 및 병태가 있다. 예를 들어, 골 강도가 손상되어 쉽게 부서질 수 있는 취약한 뼈를 가진 소아로 이어지는 불완전 골생성증과 같은 질환에서 골 발달은 영향을 받는다. 더구나, 항상성 골 교체의 결여는 건강한 개체에서 나이가 들수록 발생할 수 있으며, 골 밀도가 시간 경과에 따라 위태로워지는 골다공증 및 궁극적으로는 취약한 뼈 및 골절을 초래한다.
- [0009] 더 나아가, 뼈 건강이 일차 질환에 부수적으로 영향을 받으며, 만성 신장 질환(CKD)에서와 같이, 다른 동반질환

후유증에 관여하는 특정 질환이 있다. CKD는 신장 기능이 시간이 지남에 따라 쇠퇴하는 진행성 질환으로, 불량한 뼈 건강 및 변경된 골 교체율과 관련된 심혈관 질환을 자주 초래한다. 뼈 건강을 개선하는 치료법은 관련된 심혈관 질환을 부수적으로 완화하는 것으로 나타났다. 이러한 보고는 정상적인 골 교체율이 다른 질환의 원인까지는 아니더라도 이에 영향을 미칠 수 있음을 시사한다. 따라서, 골 발달 및/또는 유지를 조절하는 개선된 방법은 다수의 이질적인 질환 및 병태를 앓는 개체들의 건강을 개선하는 데 광범위한 직접 또는 간접적인 영향을 미칠 수 있다.

[0010] TGF β 는 전환 성장 인자-베타(TGF β) 상과의 구성원으로, 포유동물 발달 중 골 형성에 중요하다(Chen *et al.*, Int. J. Biol. Sci. 8(2): 272-88 (2012) 참조). TGF β 는 항상성 골 유지에 동등하게 중요한 것으로 보인다. 흥미롭게도, TGF β 는 CKD를 앓는 개체에서 더 높은 수준으로 발현되는 것으로 나타나, 이것이 치료적 개입을 위한 성공 가능한 표적임을 시사한다. CKD의 *jck* 마우스 모델의 항-TGF β 항체로의 전신 치료는 높은 골 교체율 감소를 증명하였다(Liu *et al.*, J. Bone Miner Res. 29(5): 1141-57 (2014)). 그러나 이 연구는 뼈에서 어느 정도의 항-TGF β 항체의 국제화가 치료 효능을 개선할 수 있는지를 조사하지 않았다. TGF β 가 DNA 손상 반응, 알레르기 면역 반응 및 상처 상피화를 포함한 다수의 세포 과정에 관여한다는 점을 고려할 때, TGF β 활성을 제어하는 일부의 더욱 표적화된 접근법을 정확히 제시하는 것은 잠재적인 원치 않는 부작용을 최소화하는 데 바람직하다. 따라서, 골 발달 및/또는 유지 조절을 위한 개선된 치료법을 제공하기 위하여 TGF β 활성을 조절하기 위한 더욱 정확한 접근법이 필요하다.

발명의 내용

[0011] 본 명세서에서는 효과적으로 골 표적화되는 항-TGF β 항체와 같은 항체가 제공된다. 제1 양태에서, 본 개시는 중쇄, 경쇄, 및 1개 이상의 폴리-아스파르트산염(폴리-D) 펩티드를 포함하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제공한다. 일 특정 구현예에서, 이 항체 또는 항원-결합 단편은 중쇄, 경쇄, 및 중쇄 및/또는 경쇄의 C 말단에 연결된 1개 이상의 폴리-아스파르트산염(폴리-D) 펩티드를 포함한다.

[0012] 일 구현예에서, 이 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 동일한 중쇄 및 경쇄를 포함하나 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 결여된 항체와 비교하여 적어도 2배의 골 국제화 증가를 나타낸다.

[0013] 일 구현예에서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 화학적 접합에 의해 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 연결된다. 또 다른 구현예에서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 중쇄의 힌지 영역에서 연결된다. 추가의 구현예에서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 경쇄의 N 말단 또는 C 말단에 연결된다. 또 다른 구현예에서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 1개 이상의 스페이서/링커(예컨대, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 스페이서 및 펩티드 링커)에 의해 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 연결된다.

[0014] 일 구현예에서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 중쇄의 아미노산 서열과 일체화되고/일체화되거나, 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 경쇄의 아미노산 서열과 일체화된다. 아미노산 서열과 "일체화된" 폴리-D 펩티드는 동일한 폴리 펩티드 쇄에 포함된다. 예를 들어, 일체화된 폴리-D 펩티드는 재조합 DNA 플라스미드로부터 암호화될 수 있는 중쇄 또는 경쇄 서열과 동일한 RNA 쇄로부터 번역될 수 있다. 일 구현예에서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 중쇄의 N 말단과 일체화되고/일체화되거나 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 C 말단과 일체화된다. 0개, 1개 이상의 다른 아미노산 잔기(즉, 비 아스파르트산염 아미노산) 또는 중쇄의 N 말단 또는 C 말단에 대한 펩티드 링커에 의해 분리된 2개 이상의 폴리-D 펩티드는 나란히 연결될 수 있다. 추가의 구현예에서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 경쇄의 N 말단과 일체화되고/일체화되거나 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 C 말단과 일체화된다. 예를 들어, 0개, 1개 이상의 다른 아미노산 잔기(즉, 비 아스파르트산염 아미노산) 또는 경쇄의 N 말단 또는 C 말단에 대한 펩티드 링커에 의해 분리되는 2개 이상의 폴리-D 펩티드는 나란히 연결될 수 있다. 일 구현예에서, 폴리-D 펩티드는 중쇄의 C 말단과 일체화된다. 또 다른 구현예에서, 폴리-D 펩티드는 중쇄의 C 말단과 일체화되고, 폴리-D 펩티드는 중쇄의 N 말단과 일체화된다.

[0015] 일 구현예에서, 경쇄는 폴리-D 펩티드를 포함하지 않는다. 또 다른 구현예에서, 중쇄는 폴리-D 펩티드를 포함하지 않는다.

[0016] 일 구현예에서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드 각각은 독립적으로 2 내지 30개 아스파르트산 잔기를 포함한다. 예를 들어, 폴리-D 펩티드는 2, 또는 3, 또는 4, 또는 5, 또는 6, 또는 7, 또는 8, 또는 9, 또는 10, 또는 11, 또는 12, 또는 13, 또는 14, 또는 15, 또는 16, 또는 17, 또는 18, 또는 19, 또는 20, 또는 21, 또는 22, 또는 23, 또는 24, 또는 25, 또는 26, 또는 27, 또는 28, 또는 29, 또는 30개 아스파르트산 잔기를 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드 각각은 독립적으로 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개 아스파르트산 잔기를

포함한다. 또 다른 구현예에서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드 각각은 10개의 아스파르트산 잔기를 포함하며, 이러한 펩티드는 본 명세서에서 "D10"(서열번호 1)으로 지칭된다. 일부 구현예에서, 항체 또는 단편은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개, 또는 12개 초과 폴리-D 펩티드를 포함할 수 있다.

[0017] 또 다른 구현예에서, 항체는 이소형 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂, IgM, IgE, 또는 IgD 중 임의의 것이다. 또 다른 구현예에서, 항체는 IgG₁ 또는 IgG₄ 이소형이다. 또 다른 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 TGFβ1, TGFβ2, 및 TGFβ3 중 1종 이상, 예컨대, 인간 TGFβ1, TGFβ2, 및 TGFβ3 중 1종 이상과 특이적으로 결합한다.

[0018] 일 구현예에서, 1개 이상의 폴리-아스파르트산염(폴리-D) 펩티드를 갖는 항체 단편이 고려된다. 이 항체 단편은 이 1개 이상의 폴리-D 펩티드가 결합된 동일한 항체 단편과 비교하여 적어도 2배의 골 국재화 증가를 나타낼 것으로 예상된다. 이 항체 단편은 예를 들어, 다음 중 임의의 것 또는 그의 조합일 수 있다: Fab, F(ab')₂, 단일 특이적 Fab₂, 이중특이적 Fab₂, 삼중특이적 Fab₃, 1가 IgG, scFv, 이중특이적 디아바디, 삼중특이적 트리아바디, scFv-sc, 미니바디, IgNAR, V-NAR, hcIgG, 또는 VhH. 일 구현예에서, 이 항체 단편은 TGFβ1, TGFβ2, 및 TGFβ3 중 1종 이상, 예컨대, 인간 TGFβ1, TGFβ2, 및 TGFβ3 중 1종 이상과 결합한다. 본 명세서의 항체 또는 항체 단편은 완전 인간, 인간화, 또는 키메라 항체 또는 항체 단편일 수 있다.

[0019] 제2 양태에서, 본 개시는 항체 중쇄를 제공하는 단계, 항체 경쇄를 제공하는 단계, 이 중쇄에 부착된 1개 이상의 폴리-D 펩티드 및 이 경쇄에 부착된 1개 이상의 폴리-D 펩티드를 제공하는 단계, 및 중쇄와 경쇄를 조합하여 골 표적화된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생성하는 단계를 포함하는, 골 표적화된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 제조 방법을 제공한다.

[0020] 일 구현예에서, 중쇄에 부착된 1개 이상의 폴리-D 펩티드 및/또는 경쇄에 부착된 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 화학적 접합에 의해 부착된다. 또 다른 구현예에서, 중쇄에 부착된 1개 이상의 폴리-D 펩티드 및/또는 경쇄에 부착된 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 재조합에 의해 부착된다.

[0021] 제3 양태에서, 본 개시는 골 표적화된 항-TGFβ 항체를 제공하는데, 이는 서열번호 2, 3, 4, 및 5(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함) 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 6, 7, 8, 11, 및 12 중 임의의 것에 기재된 아미노산을 포함하는 경쇄를 포함하되, 경쇄 아미노산 서열이 서열번호 6일 때 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 2(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)가 아니다.

[0022] 제4 양태에서, 본 개시는 골 표적화된 항-TGFβ 항체를 제공하는데, 이는 서열번호 13, 14, 16, 및 17(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함) 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 15, 18, 19, 20, 21, 및 22 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하되, 경쇄 아미노산 서열이 서열번호 15일 때 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 13(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)이 아니다.

[0023] 제5 양태에서, 본 개시는 인간 IgG₄ 항체를 제공하는데, 이는 서열번호 14(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다(예컨대, mAb2 F6). 이 항체는 TGFβ1, TGFβ2, 및 TGFβ3 중 1종 이상과 특이적으로 결합한다. 일 구현예에서, 이 항체는 TGFβ1과 특이적으로 결합한다.

[0024] 제6 양태에서, 본 개시는 인간 IgG₄ 항체를 제공하는데, 이는 서열번호 17(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다(예컨대, mAb2 F16). 이 항체는 TGFβ1, TGFβ2, 및 TGFβ3 중 1종 이상과 특이적으로 결합한다. 일 구현예에서, 이 항체는 TGFβ1과 특이적으로 결합한다.

[0025] 제7 양태에서, 본 개시는 인간 IgG₄ 항체를 제공하는데, 이는 서열번호 16(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다(예컨대, mAb2 F11). 이 항체는 TGFβ1, TGFβ2, 및 TGFβ3 중 1종 이상과 특이적으로 결합한다. 일 구현예에서, 이 항체는 TGFβ1과 특이적으로 결합한다.

[0026] 제8 양태에서, 본 개시는 인간 IgG₄ 항체를 제공하는데, 이는 서열번호 17(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다(예컨대, mAb2 F17). 이 항체는 TGFβ1, TGFβ2, 및 TGFβ3 중 1종 이상과 특이적으로 결합한다. 일 구현예에서, 이 항체는

TGF β 1과 특이적으로 결합한다.

- [0027] 제9 양태에서, 본 개시는 인간 IgG₄ 항체를 제공하는데, 이는 서열번호 16(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다(예컨대, mAb2 F12). 이 항체는 TGF β 1, TGF β 2, 및 TGF β 3 중 1종 이상과 특이적으로 결합한다. 일 구현예에서, 이 항체는 TGF β 1과 특이적으로 결합한다.
- [0028] 제10 양태에서, 본 개시는 인간 IgG₄ 항체를 제공하는데, 이는 서열번호 14(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다(예컨대, mAb2 F7). 이 항체는 TGF β 1, TGF β 2, 및 TGF β 3 중 1종 이상과 특이적으로 결합한다. 일 구현예에서, 이 항체는 TGF β 1과 특이적으로 결합한다.
- [0029] 제11 양태에서, 본 개시는 인간 IgG₄ 항체를 제공하는데, 이는 서열번호 13(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다(예컨대, mAb2 F2). 이 항체는 TGF β 1, TGF β 2, 및 TGF β 3 중 1종 이상과 특이적으로 결합한다. 일 구현예에서, 이 항체는 TGF β 1과 특이적으로 결합한다.
- [0030] 제12 양태에서, 본 개시는 골 표적화된 항-TGF β 항체를 제공하는데, 이는 서열번호 23, 24, 25, 및 26(중쇄 C 말단 리신에 대한 코돈 포함 또는 불포함) 중 임의의 것에 기재된 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 27, 28, 29, 30, 31, 및 32 중 임의의 것에 기재된 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하되, 경쇄 아미노산 서열이 서열번호 27에 기재된 핵산 서열에 의해 암호화될 때 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 23(중쇄 C 말단 리신에 대한 코돈 포함 또는 불포함)에 기재된 핵산 서열에 의해 암호화되지 않는다.
- [0031] 제13 양태에서, 본 개시는 인간 IgG₄ 항체를 제공하는데, 이는 서열번호 25(중쇄 C 말단 리신에 대한 코돈 포함 또는 불포함)에 기재된 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 27에 기재된 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 이 항체는 TGF β 1, TGF β 2, 및 TGF β 3 중 1종 이상과 특이적으로 결합한다.
- [0032] 제14 양태에서, 본 개시는 인간 IgG₄ 항체를 제공하는데, 이는 서열번호 26(중쇄 C 말단 리신에 대한 코돈 포함 또는 불포함)에 기재된 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 27에 기재된 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 이 항체는 TGF β 1, TGF β 2, 및 TGF β 3 중 1종 이상과 특이적으로 결합한다.
- [0033] 제15 양태에서, 본 개시는 개체의 골 손실 치료 방법을 제공하는데, 이는 개체에 유효량의 골 표적화된 항-TGF β 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 투여하는 단계 및 TGF β 수준의 감소, TGF β 활성의 감소, 골 손실의 감소, 골 손실 속도의 감소, 골 밀도의 증가, 골 강도의 증가, 및 IL-11 수준의 감소 중 적어도 하나를 검출하는 단계를 포함한다.
- [0034] 일 구현예에서, 개체는 인간이다. 또 다른 구현예에서, 항-TGF β 항체 또는 항체 단편은 TGF β 1, TGF β 2, 및 TGF β 3 중 1종 이상과 특이적으로 결합한다. 추가적인 구현예에서, 항-TGF β 항체는 중쇄, 경쇄, 및 1개 이상의 폴리-아스파르트산염(폴리-D) 펩티드를 포함한다. 이 항체는 동일한 중쇄 및 경쇄를 포함하나 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 결여된 항체와 비교하여 적어도 2배의 골 국제화 증가를 나타낸다. 일 구현예에서, 항체는 이소형 IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂, IgM, IgE, 및 IgD 중 임의의 것이다. 또 다른 구현예에서, 항체는 IgG₁ 또는 IgG₄ 이소형이다. 일 구현예에서, 개체는 만성 신장 질환 및/또는 암의 골 전이를 포함한 골 질환을 앓고 있다. 골 질환은 불완전 골생성증 또는 골다공증일 수 있다. 일 구현예에서, 유효량의 골 표적화된 항-TGF β 항체 또는 항체 단편은 피하, 정맥 내, 또는 근육 내로 투여된다.
- [0035] 제16 양태에서, 본 개시는 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 예를 들어, 항체는 서열번호 2, 3, 4, 및 5(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함) 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 6, 7, 8, 11, 및 12 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있되, 경쇄 아미노산 서열이 서열번호 6일 때 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 2(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)가 아니다. 또 다른 구현예에서, 항체는 서열번호 13, 14, 16, 및 17(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함) 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열번호

호 15, 18, 19, 29, 21, 및 22 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함할 수 있되, 경쇄 아미노산 서열이 서열번호 15일 때 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 13(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)이 아니다.

[0036] 제17 양태에서, 본 개시는 골 표적화된 항-TGF β 항체의 중쇄, 경쇄, 또는 둘 다를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공하며, 이때, 항-TGF β 항체의 중쇄는 서열번호 13, 14, 16, 및 17(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함) 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하고, 항-TGF β 항체의 경쇄는 서열번호 15, 18, 19, 20, 21, 및 22 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하되, 경쇄 아미노산 서열이 서열번호 15일 때 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 13(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)이 아니다.

[0037] 제18 양태에서, 본 개시는 골 표적화된 항-TGF β 항체의 중쇄, 경쇄, 또는 둘 다를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터를 제공하며, 이때, 항-TGF β 항체의 중쇄는 서열번호 13, 14, 16, 및 17(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함) 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하고; 항-TGF β 항체의 경쇄는 서열번호 15, 18, 19, 20, 21, 및 22 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하되, 경쇄 아미노산 서열이 서열번호 15일 때 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 13(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)이 아니다.

[0038] 제19 양태에서, 본 개시는 골 표적화된 항-TGF β 항체를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 1개 이상의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공하며, 이때, 항-TGF β 항체의 중쇄는 서열번호 13, 14, 16, 및 17(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함) 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 15, 18, 19, 29, 21, 및 22 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하되, 경쇄 아미노산 서열이 서열번호 15일 때 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 13(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)이 아니다. 일 구현예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포 또는 원핵생물 세포이다. 또 다른 구현예에서, 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 에스케리치아 콜라이(E. 콜라이) 세포이다.

[0039] 제20 양태에서, 본 개시는 골을 표적화하는 항-TGF β 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 제조 방법을 제공한다. 이 방법은 이 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 제조를 가능하게 하는 조건 하에서 숙주 세포를 성장시키는 단계를 포함한다. 숙주 세포는 (i) 서열번호 13, 14, 16, 및 17(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함) 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 암호화하는 핵산 서열; 및 (ii) 서열번호 15, 18, 19, 29, 21, 및 22 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 암호화하는 핵산 서열을 포함하되, 경쇄 아미노산 서열이 서열번호 15일 때 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 13(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)이 아니다. 일 구현예에서, 이 방법은 이 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물로서 제형화하는 단계를 더 포함한다.

[0040] 제21 양태에서, 본 개시는 골 표적화된 항-TGF β 항체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 골 표적화된 항-TGF β 항체는 서열번호 2, 3, 4, 및 5(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함) 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 6, 7, 8, 11, 및 12 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하되, 경쇄 아미노산 서열이 서열번호 6일 때 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 2(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)가 아니거나, 골 표적화된 항-TGF β 항체는 서열번호 13, 14, 16, 및 17(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함) 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 15, 18, 19, 29, 21, 및 22 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하되, 경쇄 아미노산 서열이 서열번호 15일 때 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 13(중쇄 C 말단 리신 포함 또는 불포함)이 아니다. 일 구현예에서, 약학적 조성물은 액체 약품으로 제형화된다. 또 다른 구현예에서, 약학적 조성물은 동결건조된 약품으로 제형화된다.

[0041] 제22 양태에서, 본 개시는 골 표적화된 항-TGF β 항체를 제공한다. 이 항체의 중쇄는 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1), 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함한다. 이 항체의 경쇄는 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1), 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다. 그리고 이 항체는 중쇄의 N 말단, 중쇄의 C 말단, 경쇄의 N 말단, 및 경쇄의 C 말단 중 1개 이상에서 D10 폴리펩티드를 더 포함한다.

[0042] 제23 양태에서, 본 개시는 골 표적화된 항-TGF β 항체를 제공하는데, 이때, 이 항체의 중쇄는 서열번호 39의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 1 내지 3 및 서열번호 40의 경쇄 CDR1 내지 3을 포함하며, 이 항체는 중쇄의 N 말단, 중쇄의 C 말단, 경쇄의 N 말단, 및 경쇄의 C 말단 중 1개 이상에서 D10 폴리펩티드를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 이 항체는 서열번호 39의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인(V_H 또는 HCVD) 및 서열번호 40의

아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 도메인(V_L 또는 LCVD)를 포함한다.

- [0043] 제24 양태에서, 본 개시는 다음을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 제공한다: 골 표적화된 항-TGF β 항체로서, 이 항체의 중쇄는 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 이 항체의 경쇄는 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 37의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 38의 아미노산 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하고, 중쇄의 N 말단, 중쇄의 C 말단, 경쇄의 N 말단, 및 경쇄의 C 말단 중 1개 이상에서 D10 폴리펩티드를 더 포함하는 항체; 또는 골 표적화된 항-TGF β 항체로서, 이 항체의 중쇄는 서열번호 39의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 1 내지 3 및 서열번호 40의 경쇄 CDR1 내지 3을 포함하며, 중쇄의 N 말단, 중쇄의 C 말단, 경쇄의 N 말단, 및 경쇄의 C 말단 중 1개 이상에서 D10 폴리펩티드를 더 포함하는 항체.
- [0044] 제25 양태에서, 본 개시는 본 명세서에 기술된 치료 방법에 사용하기 위한 본 발명의 골 표적화 항체, 예컨대, 골 표적화 항-TGF β 항체 또는 항원-결합 단편을 제공한다.
- [0045] 제26 양태에서, 본 개시는 본 명세서에 기술된 치료 방법을 위한 의약의 제조를 위한 본 발명의 골 표적화 항체, 예컨대, 골 표적화 항-TGF β 항체 또는 항원-결합 단편의 용도를 제공한다.
- [0046] 본 명세서에서 고려되는 구체적인 구현예를 아래에서 더 설명한다. 본 발명의 위에 기술된 특징 및 장점과 기타 특징 및 장점은 첨부된 청구범위와 함께 아래의 상세한 설명으로부터 더 충분히 이해될 것이다. 청구범위의 범주는 본 명세서에 제시된 특징 및 장점에 대한 구체적인 설명에 의해 규정되는 것이 아니라, 청구범위에 인용된 내용에 의해 규정된다는 것을 주목한다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1은 항-TGF β (α -TGF β) 항체에 화학적으로 접합된 D10 펩티드를 도시한 것이다.
- 도 2는 링커(펩티드 링커) 및 말레이미드 기능기를 보유한 펩티드를 묶인 IgG1 항체의 환원된 힌지 영역 이황화물에 화학적으로 접합시키는 과정을 도시한 것이다.
- 도 3a는 D10 펩티드-링커의 항-TGF β 묶인 IgG1, mAb1과의 화학 접합체의 환원 SDS-PAGE 겔을 도시한 것이다. 위의 밴드(들)는 중쇄를 나타내고, 아래의 밴드는 경쇄를 나타낸다.
- 도 3b는 실시예 1의 화학적 접합 반응에서 펩티드 대 항체 비율(PAR) 값 대 펩티드-말레이미드:mAb 비율을 도시한 것으로, 이는 펩티드의 개수가 8 몰:몰 PAR까지 증가함에 따른 PAR의 선형적 증가를 보여준다.
- 도 4의 A 내지 G는 TGF β 1 및 트라스투주맙(허셉틴(Herceptin®)) 또는 항-TGF β 항체 mAb1과 D10 펩티드의 화학 접합체의 1:1 몰 혼합물의 크기 배제 크로마토그래피를 도시한 것이다. 도 4의 A는 D10 펩티드의 mAb1과의 화학 접합체의 SEC 프로파일을 도시한 것이다. 도 4의 B는 mAb1-D10 화학 접합체의 TGF β 1과의 1:1 몰 혼합물의 SEC 프로파일을 도시한 것이다. 도 4의 C는 개질되지 않은 mAb1의 SEC 프로파일을 도시한 것이다. 도 4의 D는 mAb1의 TGF β 1과의 1:1 몰 혼합물의 SEC 프로파일을 도시한 것이다. 도 4의 E는 허셉틴의 SEC 프로파일을 도시한 것이다. 도 4의 F는 D10 펩티드의 허셉틴과의 화학 접합체의 SEC 프로파일을 도시한 것이다. 도 4의 G는 TGF β 1과 1:1 비율로 혼합된 D10의 허셉틴과의 화학 접합체의 SEC 프로파일을 도시한 것이다.
- 도 5a는 mAb1 및 D10-mAb1 접합체의 수산화인회석 크로마토그래피로부터의 A_{280} 트레이스(trace)를 도시한 것이다(x축 = 분, y축 = (정규화된) 흡광도).
- 도 5b는 통과액(FT) 및 피크 4의 분획의 SDS-PAGE 겔을 도시한 것이다.
- 도 6a는 펩티드 개수의 증가에 따른 화학 접합체의 수산화인회석 크로마토그래피를 도시한 것이다. 각 접합체에 대한 용출액의 280 nm에서의 흡광도를 나타내었다(x축 = 분, y축 = (정규화된) 흡광도).
- 도 6b는 SDS-PAGE에 의해 결정된 접합된 펩티드 개수의 함수로서의 결합된 분석물의 비율(위의 곡선, 원형, 스케일 왼쪽) 및 체류 시간(아래의 곡선, 삼각형, 스케일 오른쪽)을 도시한 것이다.
- 도 7은 대조군 접합체(PAR=0) 및 평균 4 또는 9개 펩티드의 접합체와 A549 세포를 이용하여 수행한 시험관 내 TGF β 중화 분석을 개질되지 않은 mAb1과 비교하여 도시한 것이다.
- 도 8a는 형광단으로 라벨링한 mAb1 및 대략 4.5개 펩티드를 함유하는 1 mg/kg(1 mpk)의 화학 접합체의 시간 의존적 생물 분포를 도시한 것이다. 동물을 영상화한 시간을 각 패널에 표시하였다. 사진마다 왼쪽 마우스는 mAb1

을 받았고 오른쪽 마우스는 화학 접합체를 받았다. 영상 강도는 분포의 차이를 드러내도록 조정된 것이다.

도 8b는 도 8a에 도시된 영상에서 원위 대퇴골에 해당하는 관심 영역 및 심장에 해당하는 관심 영역에서 발견된 형광의 비율을 도시한 것이다. 원형은 mAb1 항체에 해당하고, 사각형은 mAb1과 접합된 D10 펩티드(D10 mAb1)에 해당한다.

도 9a는 제조합 방법을 이용하여 중쇄 및/또는 경쇄 말단에 D10 펩티드를 부착시켜 수득될 일련의 mAb1 융합 변이체 항체 생성을 위한 IgG 아형 항체 상의 D10 펩티드의 가능한 위치를 도식적으로 도시한 것이다. D10 펩티드의 첨가 부위는 원형으로 표시하였고, 펩티드 링커 서열의 사용은 물결선으로 표시하였다(긴 물결선은 짧은 물결선보다 긴 링커를 나타낸다).

도 9b는 도 9a에 도시된 바와 같이, 펩티드 배치로 유래된 일련의 융합 변이체 항체(융합 변이체)를 도시한 것이다. 부착 위치 및 펩티드 개수의 다양한 조합을 가진 제조합 융합 변이체가 생성되었다. 각 다이어그램 아래의 작은 숫자는 명확성을 위하여 본 명세서에 언급된 바와 같은 각각의 제조합 융합 변이체의 정체성을 도시한 것이다. 본 명세서에 언급된 바와 같이, 융합 변이체는 "융합" 또는 "F" 다음에 예정된 변이체 번호를 붙여 지명된다. 예를 들어, "융합 1" 및 "F1"은 D10 펩티드가 없는 항체 "1"의 배치를 갖는 항체를 지칭한다. 긴 물결선은 짧은 물결선보다 긴 링커를 나타낸다.

도 10은 환원(위의 겔) 또는 비환원(아래 겔) 조건 하에서의 표시된 정제 제조합 mAb1 융합 변이체의 SDS-PAGE를 도시한 것이다.

도 11은 시차 주사 형광측정법(DSF)으로 결정한 제조합 mAb1 융합 변이체의 열 안정성을 도시한 것이다. 각 온도에서 부분 변성 형태로의 전이는 염료 형광 증가에 의해 검출된다. 온도에 따른 형광 증가의 기울기($-d(RFU)/dT$)를 계산하였고, 샘플의 온도에 대하여 표시하였다. 변성 속도는 열 전이의 중간 지점(T_m)을 나타내는 곡선의 최저점에서 최대이다. 참조를 위하여, 제조합 mAb1 융합 변이체 각각의 구조를 도식적으로 나타내었다.

도 12a 및 12b는 도 9b에 도식적으로 나타낸 8종의 제조합 mAb1 융합 변이체에 의한 시험관 내에서의 A549 세포에 의한 IL-11 생성 유도에 있어서 TGF β 의 중화를 도시한 것이다.

도 13은 세라믹 수산화인회석 컬럼에서 컬럼 크로마토그래피로 평가한, 수산화인회석에 대한 제조합 mAb1 융합 변이체 및 mAb1 화학 접합체의 친화도를 도시한 것이다.

도 14는 투여 후 다양한 시간에서 라이브 영상화로 수득한, CD-1 마우스에서 선택된 형광단 라벨링된 제조합 mAb1 융합 변이체 및 mAb1 화학 접합체의 생물 분포를 도시한 것이다.

도 15는 CD-1 마우스에 대한 투여 후 척추 국제화된 형광 염료 라벨링된 항체, 제조합 mAb1 융합 변이체 및 mAb1 화학 접합체의 양을 도시한 것이다. 3주의 기간에 걸쳐 IVIS 기기로 형광을 측정하였다. ROI 내의 최대 형광의 로그를 나타내었다.

도 16은 10일 및 21일 후의 실시예 13 및 도 15에 기술된 연구에서 제조합 mAb1 융합 변이체인 mAb1 F6, mAb1 F16, 및 mAb1 F17, 그리고 mAb1 화학 접합체("접합체")를 투여한 마우스의 절제된 척추 및 대퇴골의 형광 영상을 도시한 것이다.

도 17a 및 17b는 실시예 15에 기술된 바와 같이 24시간 및 96시간 후 10 μ L 혈청, 그리고 절제된 척추의 요추 부분, 원위(섬유주) 대퇴골, 신장 및 심장에서의 mAb2 F1 및 mAb2 F6의 형광 수준을 도시한 것이다.

도 18a는 mAb1-D10(mAb1 F6)를 통한 골 표적화가 단일 용량 투여 후 혈청 PK에 깊이 영향을 미침을 보여준다. mAb1 F6은 ELISA로 측정된 바에 따르면 mAb1보다 13 내지 14배 더 낮은 혈청 노출(AUC), 더 빠른 혈청 청소율, 및 더 짧은 혈청 반감기($t_{1/2}$)를 나타낸다. 데이터는 평균 \pm SD로 표현하였다: 분산분석법(AVOVA), 던넛의 다중 비교 검정에 의해 측정된 바에 따르면 통계적 유의성이 관찰되었다(mAb1과 비교하여 mAb1 F6은 $*p \leq 0.05$). mAb1은 무린화 억제성 항-TGF β 단클론 항체이고, mAb1 F6은 mAb1의 중쇄의 C 말단에 아스파르트산염 폴리펩티드 D10이 부착된 제조합 무린화 억제성 항-TGF β 단클론 항체이다. 골당 영상화 AUC를 1.0으로 정규화하였다. 각각의 mAb1 F6 및 mAb1에 대하여 용량은 5 mg/kg이었다.

도 18b는 광학 영상화에 의해 측정된 바에 따르면 mAb1 F6이 mAb1에 비해 골에서 22배 더 높은 노출(AUC)을 나타냄을 보여준다. 데이터는 평균 \pm SD로 표현하였다: AVOVA, 던넛의 다중 비교 검정에 의해 측정된 바에 따르면 통계적 유의성이 관찰되었다(mAb1과 비교하여 mAb1 F6은 $*p \leq 0.05$). 각각의 mAb1 F6 및 mAb1에 대하여 용량은 1 mg/kg이었다.

도 19는 다중 용량 피크-트로프 PK 프로파일을 도시한 것이다. (mAb1 F6을 통한) 골 표적화는 다중 용량 피크-트로프 혈청 PK에 깊이 영향을 미친다. mAb1 F6은 투여 후 24시간 및 48시간에, 그리고 첫 번째 투여 및 투여 23 후에, mAb1보다 더 낮은 혈청 농도를 나타낸다. mAb1 F6의 경우 배수 차(fold-difference)는 24시간에서 3 내지 4.5배 더 낮았고, 48시간에서는 6 내지 9배 더 낮았다. 추적 또한, mAb1에서보다 mAb1 F6에서 덜 나타났다. 데이터는 평균 \pm SD로 표현하였다: 비쌍체 t-검정에 의해 측정된 바에 따르면 통계적 유의성이 관찰되었다(mAb1과 비교하여 mAb1 F6은 $*p \leq 0.05$). 혈청 농도를 질량 분광분석법을 통해 측정하였다.

도 20은 골 표적화(mAb1 F6) 및 mAb1이 G610C (OI) 마우스에서 용량 반응 방식으로 BV/TV(%)를 증가시킴을 보여준다. 대조 항체 13C4(마우스 IgG1 항체) 처리 G610C 마우스와 비교하여 두 처리군의 경우 1 및 5 mg/kg의 용량에서 BV/TV(%)의 유의미한 변화가 관찰되었다. 13C4로 처리한 G610C 마우스(13C4)는 WT 배경 주(WT 13C4)와 비교하여 BV/TV의 유의미한 감소를 나타내었다. 데이터는 평균 \pm SD로 표현하였다: 일원 분산분석에 의해 측정된 바에 따르면 통계적 유의성이 관찰되었다(mAb1과 비교하여 mAb1 F6은 $*p \leq 0.05$; WT 13C4와 비교하여 13C4는 $^{\#}p \leq 0.05$). BV/TV(%)는 μ CT 영상화를 통해 측정하였다.

도 21은 골 표적화(mAb1 F6) 및 mAb1이 G610C (OI) 마우스에서 용량 반응 방식으로 기능 상실까지의 최대 힘을 증가시킴을 보여준다. 13C4 처리 G610C 마우스와 비교하여 기능 상실까지의 최대 힘의 유의미한 변화가 mAb1 F6의 경우 1 및 5 mg/kg에서, 그리고 mAb1의 경우 5 mg/kg에서만 관찰되었다. 항체 대조군으로 처리한 G610C 마우스(13C4)는 WT 배경 주와 비교하여 기능 상실까지의 최대 힘의 유의미한 감소를 나타내었다. 데이터는 평균 \pm SD로 표현하였다: 일원 분산분석에 의해 측정된 바에 따르면 통계적 유의성이 관찰되었다(mAb1과 비교하여 mAb1 F6은 $*p \leq 0.05$; WT 13C4와 비교하여 13C4는 $^{\#}p \leq 0.05$). 기능 상실까지의 최대 힘은 생체역학적 압축 시험을 통해 측정하였다.

도 22는 G610C 마우스에서 BV/TV에 미치는 mAb1 및 mAb1 F6의 영향을 보여준다. 12주 동안 5 mg/kg으로 항체를 다양한 빈도로(매주 3회, 매주 1회, 2주마다 1회, 또는 4주마다 1회) 투여하였다. 항체 13C4를 대조군으로 사용하였다. 일원 분산분석에 의해 측정된 바에 따르면 통계적 유의성이 관찰되었다(mAb1과 비교하여 mAb1 F6은 $*p \leq 0.05$; WT 13C4와 비교하여 13C4는 $^{\#}p \leq 0.05$). BV/TV는 μ CT 영상화를 통해 측정하였다.

도 23은 G610C 마우스에서 기능 상실까지의 최대 힘에 미치는 mAb1 및 mAb1 F6의 영향을 보여준다. 12주 동안 5 mg/kg으로 항체를 다양한 빈도로(매주 3회, 매주 1회, 2주마다 1회, 또는 4주마다 1회) 투여하였다. 항체 13C4를 대조군으로 사용하였다. 일원 분산분석에 의해 측정된 바에 따르면 통계적 유의성이 관찰되었다(13C4와 비교하여 mAb1 또는 mAb1 F6은 $*p \leq 0.05$). 기능 상실까지의 최대 힘은 생체역학적 압축 시험을 통해 측정하였다.

도 24는 G610C 마우스에서 BV/TV(%) 및 항체들의 평균 혈청 수준에 미치는 mAb1 및 mAb1 F6의 영향을 보여준다. 12주 동안 5 mg/kg으로 항체를 2주마다 1회 또는 매주 1회 투여하였다. 항체 13C4를 대조군으로 사용하였다. 일원 분산분석에 의해 측정된 바에 따르면 통계적 유의성이 관찰되었다(13C4와 비교하여 mAb1 또는 mAb1 F6은 $*p \leq 0.05$; WT 13C4와 비교하여 13C4는 $^{\#}p \leq 0.05$). BV/TV(%)는 μ CT 영상화를 통해 측정하였다.

도 25는 G610C 마우스에서 BV/TV(%)에 미치는 mAb1 및 mAb1 F16의 영향을 보여준다. 8주 동안 5 mg/kg으로 항체를 매주 3회 투여하였다. 항체 13C4를 대조군으로 사용하였다. 일원 분산분석에 의해 측정된 바에 따르면 통계적 유의성이 관찰되었다(13C4와 비교하여 mAb1 또는 mAb1 F16은 $*p \leq 0.05$; WT 13C4와 비교하여 13C4는 $^{\#}p \leq 0.05$). BV/TV(%)는 μ CT 영상화를 통해 측정하였다.

도 26은 야생형 마우스에서 BV/TV(%)에 미치는 mAb1 및 mAb1 F11의 영향을 보여준다. 9주 동안 5 mg/kg으로 항체를 매주 3회 투여하였다. 일원 분산분석에 의해 측정된 바에 따르면 통계적 유의성이 관찰되었다(13C4와 비교하여 mAb1 또는 mAb1 F11은 $*p \leq 0.05$). BV/TV(%)는 μ CT 영상화를 통해 측정하였다.

도 27은 비히클 또는 형광 라벨링된 mAb1 또는 mAb1 F6을 1회 복강 내 투여 받은 후의 야생형 마우스 요추에서 총 복사 효율을 보여준다. 일원 분산분석에 의해 측정된 바에 따르면 통계적 유의성이 관찰되었다(mAb1과 비교하여 mAb1 F6은 $*p \leq 0.05$).

도 28은 비히클 또는 형광 라벨링된 mAb1 또는 mAb1 F6을 1회 복강 내 투여 받은 후의 야생형 마우스 심장에서 총 복사 효율을 보여준다. 일원 분산분석에 의해 측정된 바에 따르면 통계적 유의성이 관찰되었다(mAb1 F6과 비교하여 mAb1은 $*p \leq 0.05$).

도 29는 비히클 또는 형광 라벨링된 mAb1 또는 mAb1 F6을 1회 복강 내 투여 받은 후의 야생형 마우스 간에서 총

복사 효율을 보여준다. 일원 분산분석에 의해 측정된 바에 따르면 통계적 유의성이 관찰되었다(mAb1 F6과 비교하여 mAb1은 $*p \leq 0.05$).

도 30은 비히클 또는 형광 라벨링된 mAb1 또는 mAb1 F6을 1회 복강 내 투여 받은 후의 야생형 마우스 장에서 총 복사 효율을 보여준다.

도 31은 형광 라벨링된 mAb2 또는 mAb2 D10을 1회 복강 내 투여 받은 후 24시간 또는 96시간에서 야생형 마우스의 표시된 조직에서 총 복사 효율을 보여준다. t 검정법에 의해 측정된 바에 따르면 통계적 유의성이 관찰되었다(mAb1 F6과 비교하여 mAb1은 $*p \leq 0.05$).

도 32는 형광 라벨링된 mAb2 또는 mAb2 D10을 1회 복강 내 투여 받은 후 24시간 또는 96시간에서 야생형 마우스의 요추/혈청 총 복사 효율 비율을 보여준다.

도 33은 형광 라벨링된 mAb2 또는 mAb2 D10을 1회 복강 내 투여 받은 후 24시간 또는 96시간에서 야생형 마우스의 대퇴골/혈청 총 복사 효율 비율을 보여준다. t 검정법에 의해 측정된 바에 따르면 통계적 유의성이 관찰되었다(mAb2와 비교하여 mAb2 D10은 $*p \leq 0.05$).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0048] 본 발명은 1개 이상의 골 표적화 폴리-D 펩티드에 연결되는 항체 및 이의 항원-결합 단편을 제공하며, 따라서 이 항체 및 항원-결합 단편이 이를 필요로 하는 환자에서 우선적으로 골로 향하게 한다. 이러한 항체 또는 단편의 골 표적화 특징은 이 항체 및 단편이 골 조직을 특이적으로 표적화할 수 있게 하고 이 항체 또는 단편에 대한 환자의 전신 노출을 감소시켜, 원치 않는 부작용을 최소화하면서 약물의 효능을 증진시킨다.
- [0049] 본 명세서에 사용되는 용어 "폴리-D 펩티드"는 복수의 아스파르트산 또는 아스파르트산염 또는 "D" 아미노산, 예컨대, 약 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 20개, 30개, 또는 그 이상의 아스파르트산 아미노산 (잔기)를 갖는 펩티드 서열을 지칭한다. 일 구현예에서, 폴리-D 펩티드는 약 2개 내지 약 30개, 또는 약 3 내지 약 15개, 또는 약 4 내지 약 12개, 또는 약 5 내지 약 10개, 또는 약 6 내지 약 8개, 또는 약 7 내지 약 9개, 또는 약 8 내지 약 10개, 또는 약 9 내지 약 11개, 또는 약 12 내지 약 14개 아스파르트산 잔기를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 폴리-D 펩티드는 아스파르트산염 잔기만을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 폴리-D 펩티드는 1개 이상의 다른 아미노산 또는 비슷한 화합물을 포함할 수 있다. 본 명세서에 사용되는 용어 "D10"은 서열번호 1에서 보는 바와 같이, 인접한 10개의 아스파르트산 아미노산의 서열을 지칭한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항체 단편은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개, 또는 12개 초과 폴리-D 펩티드를 포함할 수 있다.
- [0050] 이 폴리-D 펩티드는 재조합 기술 또는 화학적 접합을 통하여 관심 항체 또는 항원-결합 단편에 연결될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 용어 "융합 변이체" 또는 "변이체"는 폴리-D 펩티드, 예컨대, D10 서열을 포함하거나 그렇지 않으면 이와 회합되어 있는 중쇄 또는 경쇄 또는 항체 단편 또는 하위 부분 중 적어도 1종을 포함하는 조립된 항체 구성체(도 9b 참조)를 지칭한다. 예를 들어, 폴리-D 펩티드는 재조합 기술(예컨대, 폴리-D 펩티드 서열이 중쇄, 경쇄, 또는 항체 단편 또는 하위 부분의 아미노산 서열과 일체화되는 경우), 화학적 접합, 또는 둘다에 의해 융합 변이체 중의 항체 쇠에 연결될 수 있다.
- [0051] 본 명세서에 사용되는 용어 "화학 접합체"는, 1개 이상의 폴리-D 펩티드가 예를 들어, 중쇄, 경쇄, 항체 단편, 또는 하위 부분의 아미노산 서열에 존재하는 시스테인 잔기와의 화학적 반응에 의해 연결되는, 중쇄 또는 경쇄 또는 항체 단편 또는 하위 부분 중 적어도 1종을 포함하는 조립된 항체를 지칭한다. 접합에 사용될 수 있는 예시적인 시스테인 잔기는 중쇄 힌지 영역의 시스테인 잔기들이다. 접합에 적합한 시스테인 잔기 또는 기타 잔기는 또한, 돌연변이 유발에 의해 항체 쇠로 도입될 수 있다. 스페이서/링커, 예컨대, 펩티드 링커 또는 화학적 모이어티(예컨대, 말레이미드 기능 기 및 폴리에틸렌 글리콜(PEG))가 접합에서 폴리-D 펩티드 및 항체 구성요소 사이에 사용될 수 있다. 항체에 대한 원하는 모이어티의 화학적 접합 방법은 당해 분야에 주지되어 있다. 예컨대, 문헌[Behrens and Liu, mAbs 6:1, 46-53 (2014)] 참조.
- [0052] 본 명세서에 사용되는 용어 "일체화"는 재조합 기술을 통한 폴리-D 펩티드의 항체 쇠와의 통합을 지칭하며, 따라서 이 폴리-D 펩티드는 항체 쇠와 동일한 RNA 전사체로부터 전사되고, 항체 쇠와 동일한 폴리펩티드 서열에 존재한다. 이러한 경우, 이 폴리-D 펩티드는 항체 쇠의 적절한 접합, 항체 분자의 조립, 또는 항체의 항원에 대한 결합에 영향을 미치지 않고, 이 항체 쇠의 한쪽 또는 양쪽 말단에서 임의의 펩티드 링커 또는 아미노산 스페이서로 또는 이들 없이 항체 쇠에 연결될 수 있거나, 항체 쇠에 대해 내부적으로 통합될 수 있다.

- [0053] 본 발명의 골 표적화 항체의 예시적인 형태를 도 9b(형태 F2 내지 F20)에 도시하였다. (원형으로 표시된) 골 표적화 펩티드는 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 한쪽 또는 양쪽 말단에 부착되거나 융합(예컨대, 일체화)될 수 있다. 일부 구현예에서, 골 표적화 펩티드는 경쇄의 N 말단을 통해 경쇄에 부착되지 않는다. 부착 또는 융합은 직접 연결(즉, 스페이서 또는 링커 없이)일 수 있거나 (물결선으로 표시된) 스페이서 또는 링커(예컨대, 펩티드 링커)를 통해서일 수 있다. 이러한 형태의 구체적인 예를 아래의 표 1 및 7에 나타내었다.
- [0054] 임의의 적합한 스페이서 또는 링커가 본 명세서에서 골 표적화 펩티드를 예컨대, 재조합 기술 또는 화학적 접합에 의해, 관심 항체에 부착시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, G4S 펩티드(서열번호 9)의 1개, 2개, 3개, 또는 그 이상의 반복부를 갖는 펩티드 링커가 이용될 수 있다. 기타 적합한 펩티드 링커 또한, 이용될 수 있다. 예컨대, 문헌[Chen *et al.*, Adv Drug Deliv Rev 65(10):1357-1369 (2013)] 참조.
- [0055] **예시적인 골 표적화 항체 및 이의 항원-결합 단편**
- [0056] 본 발명은 1개 이상의 폴리-D(폴리-아스파르스산염 또는 폴리-Asp) 펩티드(예컨대, D10 서열)가 부착된 항체 및 항원-결합 단편을 개시한다. 이러한 개질된 항체 및 단편은 개선된 골 국제화를 나타낸다. 일 특정 구현예에서, 이들 항체는 본 명세서에 기술되는 바와 같은 항-TGF β 항체이다. 이론에 구속되지 않지만, 1개 이상의 폴리-D 펩티드를 이용하여 항-TGF β 항체를 효과적으로 골 표적화하는 것은 TGF β 와 관련된 병리생리학적 골 퇴화를 특징으로 하는 질환을 앓는 개체를 위한 새로운 치료법을 제공할 수 있다.
- [0057] 그러나 본 명세서의 다수의 구현예 및 실시예가 α -TGF β 항체 및 D10 서열 이용의 맥락에서 표현되었으나, 비정상적인 골 병태 또는 골 질환 치료에 적합한 기타 항체 또는 단백질이 본 명세서에 기술되는 바와 같이 골 표적화 모이어티로 개질될 수 있음이 고려된다. 예를 들어, 골 손실 치료, 골 성장 자극, 또는 골의 비정상적인 세포(예컨대, 암세포) 표적화를 위한 치료적 항체가 본 명세서에서 기술되는 바와 같이 1종 이상의 골 표적화 펩티드에 연결될 수 있다. 이 치료적 항체는 골 형성 또는 유지와 관련된 단백질 또는 펩티드에 결합할 수 있다. 나아가, 다른 골 국제화 또는 표적화 펩티드가 사용될 수 있다.
- [0058] 본 명세서에 사용되는 용어 " α -TGF β 항체" 및 "항-TGF β 항체"는 상호 교환적으로 사용될 수 있고, TGF β 1, TGF β 2, 및/또는 TGF β 3에 대해 특이적인 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 지칭한다. 예를 들어, α -TGF β 항체의 적어도 하나의 항원-결합 부위(또는 파라토프), 또는 이의 항원-결합 단편은 인간 TGF β 1, TGF β 2, 및/또는 TGF β 3에서 발견되는 에피토프에 결합한다.
- [0059] 일 구현예에서, 고려되는 α -TGF β 항체-D10 구성체는 화학적 접합에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 화학적 접합은 각각이 참조로 포함되는 미국 특허 제7,763,712호, 제4,671,958호, 및 제4,867,973호에 기술된 방법과 같은 당해 분야에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 또 다른 예에서, 펩티드 또는 기타 링커가 항체에 D10 펩티드를 부착하기 위하여 사용될 수 있다(예컨대, 도 1 및 도 2 참조). 추가의 구현예에서, 항체의 힌지 영역(예컨대, 힌지 영역 시스테인 잔기)에서의 티올 기의 환원은 PEG 스페이서를 이용한 폴리-D 펩티드의 화학적 접합을 가능하게 한다. 마찬가지로, 고려되는 항체 및 단편에 선천적이거나 돌연변이 유발에 의해 도입된 항체 및 항체 단편의 다른 시스테인 잔기가 폴리-D 펩티드와 화학적으로 접합될 수 있다. D10 펩티드와 화학적으로 접합된 α -TGF β 항체의 한 가지 이러한 고려되는 조립 계획은 도 2에 예시되어 있다.
- [0060] 또 다른 구현예에서, 고려되는 α -TGF β 항체-D10 구성체는 재조합 발현에 의해 생성될 수 있는데, 여기서 D10 서열은 α -TGF β 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 아미노산 서열에 추가된다. 예를 들어, 중쇄 및/또는 경쇄의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열은 α -TGF β 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 N 말단, C 말단, 또는 N 말단과 C 말단 둘 다에서 발현될 D10 서열을 암호화하도록 개질될 수 있다. 마찬가지로, 1개 이상의 D10 서열이 힌지 영역 또는 힌지 영역 근처의 항체 중쇄의 아미노산 서열에 및/또는 항체 경쇄의 아미노산 서열 내에 추가될 수 있다. D10을 보유하는 중쇄 및/또는 경쇄에 대한 각각의 핵산 서열은 발현 벡터 내로 혼입될 수 있고, 이후에 상응하는 아미노산 서열 내로 이 핵산 서열을 발현 및 번역할 수 있는 숙주 세포로 형질감염될 수 있다. 더구나, 이 숙주 세포는 각각의 중쇄 및 경쇄를 이의 상보적인 서열과 조합하여 α -TGF β 항체-D10 구성체를 형성함으로써 발현된 아미노산 서열들을 기능적인 단백질로 조립할 수 있다. 고려되는 재조합 α -TGF β 항체-D10 융합 변이체의 예는 도 9a 및 9b에 예시되어 있다.
- [0061] 폴리-D 펩티드가 본 명세서에 논의되어 있지만, 기타 비슷한 펩티드 또한, 항체, 또 다른 단백질, 또는 펩티드의 골 표적화가 가능하도록 사용될 수 있다. 예를 들어, 아스파르트산 반복 서열은 D10 서열보다 더 많거나 더 적은 잔기, 예컨대, 약 2개, 또는 약 4개, 또는 약 6개, 또는 약 8개, 또는 약 12개, 또는 약 14개, 또는 약 16개, 또는, 약 18개, 또는 약 20개, 또는 약 30개, 또는 6, 7, 8, 9, 10 또는 11개 잔기 등을 가질 수 있다. 나

아가, 비슷한 화학적 성질을 가진 다른 천연 아미노산, 예컨대, 글루탐산염, 또는 비천연 아미노산 및/또는 기타 화학적으로 동등한 화합물이 아스파르트산을 대신할 수 있거나 아스파르트산과 조합하여서도 사용될 수 있다.

[0062] 일 구현예에서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드가 부착된 항체는 이 1개 이상의 폴리-D 펩티드가 없는 동일한 항체와 비교하여 적어도 약 2배, 또는 약 3배, 또는 약 5배, 또는 약 10배, 또는 약 20배 골 국제화 증가를 나타낼 것이다.

[0063] 나아가, α -TGF β 항체가 본 명세서에서 기술되어 있지만, 골 형성 또는 골 유지에 관련된 다른 단백질과 결합하는 임의의 항체는, 원하는 대로 이 항체를 골 표적화하기 위하여 비슷하게 변형될 수 있다. 본 명세서에서 고려되는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 임의의 종으로부터 유래할 수 있거나 상이한 종으로부터의 중쇄 및 경쇄를 조합하는 잡종 항체를 나타낼 수 있고, 임의의 원하는 에피토프에 대해 특이적일 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용될 수 있는 항체는 이소형에 의해 한정되지 않으며, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, IgA₂, IgM, IgE, 또는 IgD 중 임의의 것일 수 있다. 항체 단편 또한, 사용될 수 있다. 예를 들어, D10 서열 또는 기타 골 표적화 화합물이 본 명세서에 기술된 바와 같은 원하는 결과를 달성하기 위하여 Fab 및/또는 Fc 단편 또는 임의의 기타 항체 단편에 부착될 수 있다. 나아가, D10 서열은 scFv 단편 및 기타 비슷한 융합 단백질에 부착될 수 있다. 또 다른 구현예에서, D10 서열은 (EU 넘버링 시스템에 따라 넘버링된) S228P(또는 대안적으로 Kabat 시스템에 따른 S241P; Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th ed., United States Government Printing Office, 165-492 (1987); 및 Silva *et al.* Jour. Biol. Chem. 290:5462-5469 (2015) 참조) 코어-힌지 돌연변이를 갖는 항체에 부착될 수 있다.

[0064] 추가의 구현예에서, 본 명세서에서 고려되는 항체 및/또는 기타 단백질은 추가의 분자와 접합될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 고려되는 항체 또는 기타 단백질은 주사되거나 대상체에 도입될 때 항체/단백질의 추적 가능성을 하는 화학적 라벨과 접합될 수 있다. 예를 들어, 방사성 라벨, 형광 화합물 등이 생체 내에서의 항체/단백질의 추적을 돕기 위하여 항체/단백질에 부착될 수 있다. 나아가, 본 명세서에서 고려되는 항체 및/또는 기타 단백질은 또한, 치료적 효과를 갖는 추가 화합물, 예컨대, 소분자, 제약, 항신생물제, 성장 호르몬, 비타민 등과 접합될 수 있어, 이 항체 및/또는 기타 단백질이 이러한 화합물 중 1종 이상을 위한 비히클로서 기능할 수 있다.

[0065] 일부 구현예에서, 골 표적화 항-TGF β 항체는 서열번호 2, 3, 4, 및 5 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 6, 7, 8, 11, 및 12 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하되, 경쇄 아미노산 서열이 서열번호 6일 때 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 2가 아니다. 예시적인 항체는 mAb1 F3, mAb1 F4, mAb1 F5, mAb1 F6, mAb1 F8, mAb1 F9, mAb1 F10, mAb1 F11, mAb1 F13, mAb1 F14, mAb1 F15, mAb1 F16, mAb1 F18, mAb1 F19, 및 mAb1 F20이다(표 1).

[0066] 다른 구현예에서, 골 표적화 항-TGF β 항체는 서열번호 13, 14, 16, 및 17 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄, 및 서열번호 15, 18, 19, 20, 21, 및 22 중 임의의 것에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하되, 경쇄 아미노산 서열이 서열번호 15일 때 중쇄 아미노산 서열은 서열번호 13이 아니다. 예시적인 항체는 mAb2 F3, mAb2 F4, mAb2 F5, mAb2 F6, mAb2 F8, mAb2 F9, mAb2 F10, mAb2 F11, mAb2 F13, mAb2 F14, mAb2 F15, mAb2 F16, mAb2 F18, mAb2 F19, 및 mAb2 F20이다(표 7).

[0067] 일부 구현예에서, 본 발명의 항체, 예컨대, 항-TGF β 항체는 중쇄에 C 말단 리신을 보유하지 않는다. C 말단 리신은 제조 중에 또는 제조할 기술에 의해 제거될 수 있다(즉, 중쇄의 암호화 서열은 C 말단의 말단 리신을 위한 코돈을 포함하지 않는다). 따라서, C 말단 리신을 함유하지 않는 서열번호 2 또는 13의 중쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체 또한, 본 발명에서 고려된다. 폴리-D 펩티드는 C 말단 리신이 있거나 없는 중쇄의 C 말단에 부착될 수 있다.

[0068] 치료 방법

[0069] 일 특정 구현예에서, 개체, 예컨대, 인간 환자의 TGF β 와 관련된 골 손실의 치료 방법은 이 개체에 유효량의 골 표적화된 항-TGF β 항체를 투여하는 단계를 포함한다. 이 방법은 TGF β 수준 또는 활성의 감소, 골 손실 또는 골 손실 속도의 감소, 골 밀도의 증가, 및/또는 골 강도의 증가를 측정 또는 검출하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0070] 본 명세서에 사용되는 "유효량"은, 필요로 하는 개체에 투여될 때 예를 들어, 골과 관련된 TGF β 수준 또는 활

성 감소, 골 손실 또는 골 손실 속도의 감소, 골 밀도 증가, 및/또는 골 강도의 증가에 의해, 개체의 건강을 개선하는 치료제, 예컨대, α -TGF β 항체 또는 항체 단편의 양을 지칭한다.

[0071] 본 명세서에 사용되는 용어 "개체"는 동물을 지칭한다. 개체의 예로는 인간, 가축, 가정용 애완동물, 및 기타 동물을 제한 없이 포함한다. 추가적인 개체의 예로는 TGF β 와 관련된 골 질환을 앓는 동물을 포함한다.

[0072] 또 다른 구현예에서, 1종 이상의 골 표적화 항-TGF β 항체, 예컨대, 화학 접합체 또는 재조합 융합 변이체를 함유하는 수성 액체 약품 제형 및 동결건조 약품 제형을 포함하는 약학적 항체 제형 또는 조성물이 고려된다. 골 표적화 항-TGF β 항체 및/또는 항체 단편을 포함하는 약학적 조성물은 본 명세서에 참조로 포함되는 미국 특허 출원 공개 제US 2014/0286933 A9호에 기술된 바와 같이, 그렇지 않으면 당해 분야에 공지된 바와 같이 제형화될 수 있다.

[0073] 일 특정 구현예에서, 골 질환 치료 방법은 유효량의 골 표적화된 항-TGF β 항체를 골 질환, 예컨대, 만성 신장 질환과 관련된 골 질환, 골로의 암 전이, 또는 비정상적인 대사성 병태를 앓는 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 특정 구현예에서, 불완전 골생성증 치료 방법은 유효량의 골 표적화된 항-TGF β 항체를 불완전 골생성증을 앓는 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 추가의 특정 구현예에서, 골다공증 치료 방법은 유효량의 골 표적화된 항-TGF β 항체를 골다공증을 앓는 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0074] 일부 구현예에서, 환자는 본 발명의 골 표적화 항체 또는 항체 단편 및 또 다른 치료제, 예컨대, 골 손실 병태를 위한 치료제(예컨대, 비스포스포네이트)의 조합으로 치료된다. 이 항체 또는 항체 단편 및 다른 치료제는 환자에 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0075] 일부 구현예에서, 본 발명의 치료 방법에 사용되는 골 표적화 항체 및 기타 구성요소는 키트 또는 제조 물품으로 제공될 수 있다.

[0076] 항체 제조 방법

[0077] 본 발명의 항체 또는 단편은 당해 분야에서 잘 확립된 방법에 의해 제조될 수 있다. 이 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 DNA 서열은, 유전자가 필수적인 발현 제어 서열, 예컨대, 전사 및 번역 제어 서열에 작동 가능하게 연결되도록 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다. 발현 벡터는 플라스미드, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스(AAV), 식물 바이러스, 예컨대, 콜리플라워 모자이크 바이러스, 담배 모자이크 바이러스, 코스미드, YAC, EBV 유래 에피솜 등을 포함한다. 항체 경쇄 암호화 서열 및 항체 중쇄 암호화 서열은 개별적인 벡터 내로 삽입될 수 있고, 동일하거나 상이한 발현 제어 서열(예컨대, 프로모터)에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일 구현예에서, 둘 모두의 암호화 서열은 동일한 발현 벡터 내로 삽입되며, 동일한 발현 제어 서열(예컨대, 공통 프로모터), 개별적인 동일한 발현 제어 서열(예컨대, 프로모터), 또는 상이한 발현 제어 서열(예컨대, 프로모터)에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 항체 암호화 서열은 표준적인 방법(예컨대, 항체 유전자 단편과 벡터 상의 상보적인 제한 부위의 라이게이션, 또는 제한 부위가 존재하지 않는 경우 불린트 말단 라이게이션)에 의해 발현 벡터 내로 삽입될 수 있다.

[0078] 항체 쇄 유전자 이외에도, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 항체 쇄 유전자의 발현을 제어하는 조절 서열을 보유할 수 있다. 포유동물 숙주 세포 발현을 위한 조절 서열의 예로는 포유동물 세포에서 높은 수준의 단백질을 발현을 지시하는 바이러스 요소, 예컨대, 레트로바이러스 LTR, 사이토메갈로바이러스(CMV)(예컨대, CMV 프로모터/인핸서), 시미안 바이러스 40(SV40)(예컨대, SV40 프로모터/인핸서), 아데노바이러스, (예컨대, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터(adenovirus major late promoter, AdMLP)), 폴리오마로부터 유래된 프로모터 및/또는 인핸서 및 강한 포유동물 프로모터, 예컨대, 천연 면역글로불린 및 액틴 프로모터를 포함한다.

[0079] 항체 쇄 유전자 및 조절 서열 이외에도, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 추가의 서열, 예컨대, 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열(예컨대, 복제 원점) 및 선택 가능한 마커 유전자를 보유할 수 있다. 예를 들어, 선택 가능한 마커 유전자는 이 벡터가 도입된 숙주 세포에 약물, 예컨대, G418, 하이그로마이신 또는 메토폭세이트에 대한 내성을 부여한다. 선택 가능한 마커 유전자는 (메토폭세이트 선택/증폭으로 dhfr-숙주 세포에 사용하기 위한) 디하이드로폴레이트 환원효소(DHFR) 유전자, (G418 선택을 위한) neo 유전자, 및 글루탐산염 합성 효소 유전자를 포함할 수 있다.

[0080] 본 발명의 항체를 암호화하는 발현 벡터는 발현을 위한 숙주 세포에 도입된다. 이 숙주 세포는 항체의 발현에 적합한 조건 하에 배양된 후, 수확 및 단리된다. 숙주 세포는 포유동물, 식물, 박테리아 또는 효모 숙주 세포를 포함한다. 발현을 위한 숙주로서 이용 가능한 포유동물 세포주는 당해 분야에 주지되어 있고, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC)으로부터 이용 가능한 여러 불멸화 세포주를 포함한다. 이는 그 중에서도, 중국 햄스터 난소

(CHO) 세포, NSO 세포, SP2 세포, HEK-293T 세포, 293 Freestyle 세포(Invitrogen), NIH-3T3 세포, HeLa 세포, 새끼 햄스터 신장(BHK) 세포, 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(COS), 인간 간세포 암종 세포(예컨대, Hep G2), A549 세포, 및 다수의 기타 세포주를 포함한다. 세포주는 그것들의 발현 수준을 기초로 하여 선택될 수 있다. 사용될 수 있는 기타 세포주는 곤충 세포주, 예컨대, Sf9 또는 Sf21 세포이다.

[0081] 나아가, 항체의 발현은 다수의 공지된 기술을 이용하여 증진될 수 있다. 예를 들어, 글루타민 합성효소 유전자 발현 시스템(GS 시스템)은 특정 조건 하에서 발현을 증진시키기 위한 일반적인 접근법이다.

[0082] 숙주 세포를 위한 조직 배양 배지는 동물 유래 구성요소(ADC), 예컨대, 소 혈청 알부민을 포함할 수 있거나, 포함하지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, ADC 불포함 배양 배지는 인간 안전성을 위해 바람직하다. 조직 배양은 유가식 방법, 연속 관류법, 또는 숙주 세포 및 원하는 수율에 적합한 임의의 기타 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0083] 약학적 조성물

[0084] 본 발명의 항체는 적합한 저장 안정성을 위해 제형화될 수 있다. 예를 들어, 이 항체는 약학적으로 허용 가능한 부형제를 이용하여 동결건조되거나 보관되거나 사용을 위하여 재구성될 수 있다. 병용 요법을 위하여, 2종 이상의 치료제, 예컨대, 항체가 공동 제형화, 예컨대, 혼합되어 단일 조성물로 제공될 수 있다.

[0085] 용어 "부형제" 또는 "담체"는 본 명세서에서 본 발명의 화합물(들) 이외의 임의의 성분을 설명하기 위하여 사용된다. 부형제(들)의 선택은 특정한 투여 방식, 용해도 및 안정성에 미치는 부형제의 영향, 및 투여 형태의 속성과 같은 인자들에 매우 의존할 것이다. "약학적으로 허용 가능한 부형제"는 모든 용매, 분산매, 코팅제, 항생균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연 작용제, 및 생리적으로 적합한 기타를 포함한다. 약학적으로 허용 가능한 부형제의 일부 예는 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등과 이의 조합이다. 일부 경우에, 등장화제, 예를 들어, 당류, 폴리알콜, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨이 조성물 중에 포함될 것이다. 약학적으로 허용 가능한 물질의 추가 예는 습윤제 또는, 항체의 저장 수명 또는 효과를 증진시키는 소량의 보조 물질, 예컨대, 습윤제 또는 유화제, 보존제 또는 완충제이다.

[0086] 본 발명의 약학적 조성물은 대량으로, 단일 단위 용량, 또는 다수의 단위 용량으로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 "단위 용량"은 소정량의 활성 성분을 포함하는 약학적 조성물의 분리된 양이다. 활성 성분의 양은 일반적으로 대상체에게 투여되는 활성 성분의 투여량 또는 이러한 투여량의 편리한 비율, 예를 들어 이러한 투여량의 1/2 또는 1/3과 같다.

[0087] 본 발명의 약학적 조성물은 일반적으로 비경구 투여에 적합하다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 약학적 조성물의 "비경구 투여"는 대상체의 조직에 물리적으로 구멍을 만들고 조직 내 구멍을 통해 약학적 조성물을 투여함으로써, 일반적으로 혈류, 근육 또는 내부 장기 내로 직접 투여하는 것을 특징으로 하는 임의의 투여 경로를 포함한다. 따라서, 비경구 투여는 조성물의 주사, 수술적 절개를 통한 조성물의 적용, 조직 투과성 비 수술적 상처를 통한 조성물의 적용에 의한 약학적 조성물의 투여 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특히, 비경구 투여는 피하, 복강 내, 근육 내, 흉골 내, 정맥 내, 동맥 내, 경막 내, 뇌실 내, 요도 내, 두개 내, 종양 내, 및 활막 내 주사 또는 주입; 및 신장 투석 주입 기술을 포함하나 이에 한정되지 않는 것으로 고려된다. 국소 관류법 또한 고려된다. 바람직한 구현예는 정맥 내 및 피하 경로를 포함할 수 있다.

[0088] 비경구 투여에 적합한 약학적 조성물의 제형은 일반적으로 약학적으로 허용 가능한 담체, 예를 들어 멸균수 또는 멸균 등장 식염수와 조합된 활성 성분을 포함한다. 이러한 제형은 볼러스(bolus) 투여 또는 연속 투여에 적합한 형태로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 주사 가능한 제형은 단위 투여 형태, 예컨대 앰플, 또는 보존제를 함유하는 다중 용량 용기로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 비경구 투여용 제형은 현탁액, 용액, 유성 또는 수성 비히클 내의 에멀전, 페이스트 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 제형은 현탁제, 안정화제, 또는 분산제를 포함하나 이에 한정되지 않는 1종 이상의 추가의 성분을 더 포함할 수 있다. 비경구 투여를 위한 제형의 일 구현예에서, 활성 성분은 재구성되는 조성물의 비경구 투여 전에 적합한 비히클(예를 들어, 발열원 불포함 멸균 수)로의 재구성을 위한 건조(즉, 분말 또는 과립) 형태로 제공된다. 비경구 제형은 또한, 부형제, 예를 들어 염, 탄수화물 및 완충제(예컨대, 3 내지 9의 pH)를 함유할 수 있는 수용액을 포함하지만, 일부 용도에서는 멸균수의 비 수성 용액으로서 또는 적합한 비히클, 예를 들어 발열원 불포함 멸균수와 함께 사용되는 건조 형태로서 더욱 적합하게 제형화될 수 있다. 예시적인 비경구 투여 형태는 멸균 수용액, 예를 들어, 수성 프로필렌 글리콜 또는 텍스트로스 용액 내의 용액 또는 현탁액을 포함한다. 이러한 투여 형태는 원하는 대로 적합하게 완충될 수 있다. 유용한 기타 비경구 투여 가능 제형은 미세결정질 형태로, 또

는 리포솜 제제 내에 활성 성분을 포함하는 제형을 포함한다. 비경구 투여를 위한 제형은 즉시 및/또는 변형된 방출 형태로 제형화될 수 있다. 변형된 방출 제형은 지연형, 지속형, 펄스형, 제어형, 표적화 및 프로그래밍된 방출을 포함한다.

[0089] 일부 구현예에서, 본 발명의 항체 또는 항원-결합 단편은 40, 20, 또는 15 mg/kg 또는 그 이하(예컨대 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 mg/kg)으로 투여될 수 있다. 일부 추가 구현예에서, 용량은 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 또는 0.5 mg/kg일 수 있다. 투여 빈도는 예를 들어, 매일, 2일마다, 3일마다, 4일마다, 또는 5일마다, 매주, 2주마다, 또는 3주마다, 매월, 2개월마다, 3개월마다, 6개월마다, 또는 12개월마다, 또는 필요에 따를 수 있다. 이 항체는 정맥 내(예컨대, 0.5 내지 8시간에 걸친 정맥 내 주입), 피하, 근육 내, 또는 병태 및 약물 제형에 적합한 임의의 기타 투여 경로로 투여될 수 있다.

[0090] 예시적인 구현예

[0091] 본 발명의 추가의 특정 구현예는 다음과 같이 기술된다.

[0092] 1. 중쇄, 경쇄, 및 (i) 중쇄, (ii) 경쇄의 C 말단, 또는 (iii) (i)과 (ii) 둘 다에 연결된 1개 이상의 폴리-아스파르트산염(폴리-D) 펩티드를 포함하는 항체, 또는 이의 항원-결합 단편.

[0093] 2. 구현예 1에 있어서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 화학적 접합에 의해 항체 또는 항원-결합 단편에 연결되는 것인, 항체 또는 항원-결합 단편.

[0094] 3. 구현예 2에 있어서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 힌지 영역에서 중쇄에 접합되는 것인, 항체 또는 항원-결합 단편.

[0095] 4. 구현예 2 또는 3에 있어서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 스페이서에 의해 항체 또는 항원-결합 단편에 접합되는 것인, 항체 또는 항원-결합 단편.

[0096] 5. 구현예 1에 있어서, 중쇄 또는 경쇄의 아미노산 서열과 일체화된 폴리-D 펩티드를 포함하는 항체 또는 항원-결합 단편.

[0097] 6. 구현예 5에 있어서, 중쇄의 N 말단과 일체화된 폴리-D 펩티드를 포함하는 항체 또는 항원-결합 단편.

[0098] 7. 구현예 5에 있어서, 중쇄의 C 말단과 일체화된 폴리-D 펩티드를 포함하는 항체 또는 항원-결합 단편.

[0099] 8. 구현예 5에 있어서, 중쇄의 N 말단과 일체화된 제1 폴리-D 펩티드 및 중쇄의 C 말단과 일체화된 제2 폴리-D 펩티드를 포함하는 항체 또는 항원-결합 단편.

[0100] 9. 구현예 5 내지 8 중 임의의 한 구현예에 있어서, 경쇄의 C 말단과 일체화된 폴리-D 펩티드를 포함하는 항체 또는 항원-결합 단편.

[0101] 10. 구현예 5 내지 9 중 임의의 한 구현예에 있어서, 폴리-D 펩티드(들)은 펩티드 링커를 통하여 중쇄 또는 경쇄에 융합되는 것인, 항체 또는 항원-결합 단편.

[0102] 11. 구현예 10에 있어서, 펩티드 링커는 아미노산 서열 GGGGS(서열번호 9)의 1 내지 3개 반복부를 포함하는 것인, 항체 또는 항원-결합 단편.

[0103] 12. 구현예 1 내지 11 중 임의의 한 구현예에 있어서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드 각각은 독립적으로 2 내지 30개 아스파르트산 잔기를 포함하는 것인, 항체 또는 항원-결합 단편.

[0104] 13. 구현예 12에 있어서, 1개 이상의 폴리-D 펩티드 각각은 10개의 아스파르트산 잔기(서열번호 1)를 포함하는 것인, 항체 또는 항원-결합 단편.

[0105] 14. 구현예 1 내지 13 중 임의의 한 구현예에 있어서, 항체는 IgG인, 항체 또는 항원-결합 단편.

[0106] 15. 구현예 15에 있어서, 항체는 IgG₁ 또는 IgG₄인, 항체 또는 항원-결합 단편.

[0107] 16. 구현예 1 내지 15 중 임의의 한 구현예에 있어서, 항체 또는 항원-결합 단편은 TGFβ1, TGFβ2, 및 TGFβ3 중 1종 이상에 특이적으로 결합하는 것인, 항체 또는 항원-결합 단편.

[0108] 17. 구현예 16에 있어서, 항체는 서열번호 13의 중쇄 상보성 결정 영역(CDR) 1 내지 3 및 서열번호 15의 경쇄 CDR1 내지 3을 포함하는 것인, 항체 또는 항원-결합 단편.

- [0109] 18. 구현예 17에 있어서, 항체는 서열번호 13의 잔기 1 내지 120에 상응하는 중쇄 가변 도메인(V_H) 아미노산 서열 및 서열번호 15의 잔기 1 내지 108에 상응하는 경쇄 가변 도메인(V_L) 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0110] 19. 구현예 17 또는 18에 있어서, 항체는 위치 228(EU 넘버링)에 프롤린을 갖는 인간 IgG₄ 불변 영역을 포함하는 것인, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0111] 20. 구현예 19에 있어서, 항체의 중쇄는 중쇄 C 말단 리신이 있거나 없는 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하고, 항체의 경쇄는 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0112] 21. 구현예 17에 있어서, 중쇄는 중쇄 C 말단 리신이 있거나 없는 서열번호 13, C 말단 D10 서열 직전에 리신이 있거나 없는 서열번호 14, 중쇄 C 말단 리신이 있거나 없는 서열번호 16, 또는 C 말단 D10 서열 직전에 리신이 있거나 없는 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열번호 15, 19, 21, 또는 22의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 항체.
- [0113] 22. 구현예 16에 있어서, 항체는 각각 C 말단 리신이 있거나 없는 서열번호 2 및 서열번호 6의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖는 마우스 항체 1D11인, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0114] 23. 인간 TGF β 1, TGF β 2, 및 TGF β 3과 결합하는 IgG₄ 항체로서, 이 항체의 중쇄는 (C 말단 D10 서열 직전에 리신이 있거나 없는) 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 것인, IgG₄ 항체.
- [0115] 24. 인간 TGF β 1, TGF β 2, 및 TGF β 3과 결합하는 IgG₄ 항체로서, 이 항체의 중쇄는 (C 말단 D10 서열 직전에 리신이 있거나 없는) 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하고, 경쇄는 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하는 것인, IgG₄ 항체.
- [0116] 25. 구현예 1 내지 24 중 임의의 한 구현예에 있어서, 항체 또는 항원-결합 단편은 동일한 중쇄 및 경쇄를 포함하나 폴리-D 펩티드(들)는 결여된 항체와 비교하여 적어도 2배의 골 국재화 증가를 나타내는 것인, 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0117] 26. 구현예 1 내지 25 중 임의의 한 구현예의 항체 또는 항원-결합 단편 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물.
- [0118] 27. TGF β 의 억제로부터 유익을 얻는 골 병태를 앓는 개체의 치료 방법으로, 개체에 유효량의 제16항 내지 제25항 중 어느 한 항의 항-TGF β 항체 또는 항원-결합 단편을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0119] 28. 구현예 27에 있어서, (1) TGF β 수준의 감소, (2) TGF β 활성의 감소, (3) 골 손실의 감소, (4) 골 손실 속도의 감소, (5) 골 밀도의 증가, (6) 골 강도의 증가, 및 (7) IL-11 수준의 감소 중 적어도 하나를 검출하는 단계를 더 포함하는 방법.
- [0120] 29. TGF β 의 억제로부터 유익을 얻는 골 병태를 앓는 개체를 치료하는 데 사용하기 위한 구현예 16 내지 25 중 임의의 한 구현예의 항체 또는 항원-결합 단편.
- [0121] 30. TGF β 의 억제로부터 유익을 얻는 골 병태를 앓는 개체 치료용 의약 제조를 위한 구현예 16 내지 25 중 임의의 한 구현예의 항체 또는 항원-결합 단편의 용도.
- [0122] 31. 개체는 인간인, 구현예 27의 방법, 구현예 29의 항체 또는 항원-결합 단편, 또는 구현예 30의 용도.
- [0123] 32. 구현예 31에 있어서, 인간은 불완전 골생성증을 앓는 것인, 방법, 항체 또는 항원-결합 단편, 또는 용도.
- [0124] 33. 구현예 31에 있어서, 인간은 골 손실 또는 골다공증을 앓는 것인, 방법, 항체 또는 항원-결합 단편, 또는 용도.
- [0125] 34. 구현예 31에 있어서, 인간은 만성 신장 질환을 앓는 것인, 방법, 항체 또는 항원-결합 단편, 또는 용도.
- [0126] 35. 구현예 31에 있어서, 인간은 골 전이를 나타내는 암 환자인, 방법, 항체 또는 항원-결합 단편, 또는 용도.

도.

- [0127] 36. 구현예 1 내지 25 중 임의의 한 구현예의 항체 또는 항원-결합 단편의 중쇄, 경쇄, 또는 둘 다를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 단리된 핵산 분자.
- [0128] 37. 구현예 36의 단리된 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.
- [0129] 38. 구현예 37의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0130] 39. 구현예 38에 있어서, 포유동물 세포인 숙주 세포.
- [0131] 40. 구현예 1 내지 25 중 임의의 한 구현예의 항체 또는 항원-결합 단편의 제조 방법으로,
- [0132] 항체 또는 항원-결합 단편의 중쇄 및 경쇄를 각각 암호화하는 제1 및 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 숙주 세포를 제공하는 단계,
- [0133] 이 항체 또는 항원-결합 단편의 제조를 가능하게 하는 조건 하에서 숙주 세포를 성장시키는 단계, 및
- [0134] 이 항체 또는 항원-결합 단편을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0135] 41. 구현예 40에 있어서, 제1 뉴클레오타이드 서열은 (중쇄 C 말단 리신에 대한 코돈이 있거나 없는) 서열번호 23, 24, 25, 또는 26을 포함하고, 제2 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 27, 29, 31, 또는 32를 포함하는 것인, 방법.
- [0136] 42. 골 표적화 항체 또는 항원-결합 단편의 제조 방법으로,
- [0137] 항체 또는 이의 항원-결합 단편 및 1개 이상의 폴리-D 펩티드를 제공하는 단계, 및
- [0138] 화학적 접합에 의한 공유 결합을 통해 폴리-D 펩티드를 항체에 부착시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0139] 43. 구현예 40 내지 42 중 임의의 한 구현예에 있어서, 항체 또는 항원-결합 단편을, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물로서 제형화하는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [0140] 44. 골 표적화 약학적 조성물의 제조 방법으로,
- [0141] 구현예 1 내지 25 중 임의의 한 구현예의 항체 또는 항원-결합 단편을 제공하는 단계, 및
- [0142] 항체 또는 항원-결합 단편을 약학적으로 허용 가능한 담체와 혼합하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0143] 본 발명은 다음의 실시예에서 더 설명되며, 이는 청구범위에 기술된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.
- [0144] 실시예
- [0145] 다음의 실시예는 본 발명의 특정 구현예 및 이의 다양한 용도를 예시하는 것이다. 본 실시예는 단지 설명 목적으로 개시되며, 본 발명을 한정하는 것으로 여겨져서는 안 된다.
- [0146] *TGF β 항체*
- [0147] 본 명세서에서 mAb1로 지칭되는 제1 항-TGF β 항체는 인간 TGF- β 1, TGF- β 2, 및 TGF- β 3에 대해 특이적인("범-특이적(pan-specific)") 마우스 IgG1 단클론 항체이고, R&D Systems(클론# 1D11, 미국 미네소타 주 미네아폴리스 소재)에서 입수 가능하다. mAb1 항체는 실시예에서 주형으로 작용하였다.
- [0148] 실시예에 사용되는, 본 명세서에서 mAb2로 지칭되는 제2 항-TGF β 항체는 힌지 돌연변이 S228P(EU 넘버링)가 있는 인간 항-TGF β IgG4 항체이다. mAb2 항체는 참조로 포함되는 미국 특허 제9,090,685호에 개시된 항체와 유사하다. 항체 mAb2는 글리코실화되지 않을 때 예상 분자량 144 KD을 나타낸다. 이의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열은 각각 서열번호 13과 15이다. 이들 두 서열을 아래에 나타내었다. 가변 도메인을 이탤릭체로 표기하였고, 본 명세서에서 중쇄 가변 도메인(HCVD, 서열번호 39) 및 경쇄 가변 도메인(LCVD, 서열번호 40)으로 표기하였다. CDR은 박스로 나타내었고, 중쇄 상보성 결정 영역 1(HCDR1, 서열번호 33); HCDR2(서열번호 34); 및 HCDR3(서열번호 35), 및 경쇄 상보성 결정 영역 1(LCDR1, 서열번호 36); LCDR2(서열번호 37); 및 LCDR3(서열번호 38)으로 표기하였다. 중쇄의 불변 도메인의 글리코실화 부위는 굵은 글자체로 표시하였다(N297).

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFS SNVISWVRQA PGQGLEWMGG VIPIVDIANY
AQRFGKRVTI TADESTSTTY MELSSLRSED TAVYYCASTL GLVLDAMDYW GQGTLVTVSS
 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS
 GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDPKPS NTKVDKRVES KYGPPCPPCP APEFLGGPSV
 FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY
 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK
 NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLD S DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG
 NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK (서열번호 13)

[0149]

ETVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSLG SSYLAWYQOK PGQAPRLLIY GASSRAFGIP
 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYQQYADSPITFG QGTRLEIKRT VAAPSVFIFP
 PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL
 TLSKADYEKH KVIACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEC (서열번호 15)

[0150]

[0151]

본 명세서에 기술된 바와 같이, 골 형성 또는 골 유지에 관련된 단백질과 결합하는 기타 항체, 항체 단편, 단백질, 또는 펩티드가 사용될 수 있다.

[0152]

실시예 1: D10 펩티드의 mAb1 α -TGF β 항체와의 화학 접합체의 제조

[0153]

α -TGF β 항체 mAb1의 D10 펩티드 화학 접합체를 도 2에 도시된 방식으로 제조하였다. mAb1(2.0 mg)을 Amicon® 울트라 50 kDa MWCO 원심분리 필터(EMD Millipore) 상에서의 한외여과 3회에 의해 탈기된 봉산염 완충액(25 mM 염화나트륨, 1 mM DTPA, 20 mM 봉산나트륨 pH 8.0)으로 교환하였다. 그런 다음, 힌지 영역 이황화물을 37°C에서 2시간 동안 mAb당 12 몰:몰 디티오프레이톨(DTT)로 환원시켰다. 생성물을 탈기된 봉산염 완충액과 함께 4 mL Amicon® 울트라 필터로 탈염시켰다. 분취량(1 nmol, 150 μ g)을 25°C에서 증가하는 양(1 내지 15 몰:몰)의 D10-말레이미드 펩티드(Ac-D10-C2-PEG12-C6-말레이미드, 여기서 PEG12는 12개의 에틸렌 옥사이드 기를 함유하는 한정된 길이의 PEG로 구성됨)와 반응시켰다. 1.5시간 후, 남아 있는 반응하지 않은 티올 기를 12당량의 N-에틸 말레이미드 첨가에 이어 1.5시간 동안의 인큐베이션에 의해 차단하였다. 생성물을 한외여과에 의해 탈염시켰다. 도 3a는 SimplyBlue™(Thermo Scientific)로 염색하고, Odyssey® 근적외선 스캐너(LiCor)에 의해 영상화한 4 내지 12% NuPAGE 겔 상의 각각의 생성물 0.5 μ g의 SDS-PAGE를 도시한 것이다. AlphaView 소프트웨어(ProteinSimple Corp.)를 이용하여 라인 형광 프로파일을 통합하고, 펩티드 대 항체 비율(PAR)을 결정하였다. 중쇄 또는 경쇄 각각의 이동성의 작은 변화는, 중쇄의 경우 최대 5개의 식별 가능한 밴드와 일치하고 경쇄의 경우 1개와 일치하며, 각각의 경우 힌지 영역 시스테인의 개수와 일치하는 단일 D10 펩티드의 첨가를 나타낸다고 추정되었다. 중쇄 및 경쇄 상의 펩티드의 평균 개수는 각각의 소수 밴드의 상대적인 존재도와 이의 지정된 펩티드 개수의 곱의 합으로부터 개별적으로 계산하였다. PAR은 각 쇠가 전체 IgG에서 두 번 나타나므로 중쇄 및 경쇄로부터의 이들 개수의 2배의 합으로부터 계산하였다. 화학적 접합 반응에서 PAR 값 대 펩티드-말레이미드:mAb 비율을 도 3b에 도시하였는데, 이는 접합된 펩티드의 개수가 8 몰:몰까지 증가함에 따른 PAR의 선형적 증가를 보여준다.

[0154]

실시예 2: mAb1-D10 화학 접합체의 TGF- β 1에 대한 결합

[0155]

이 실시예에서는, DTT의 비율을 8 내지 10 몰:몰로 달리 하였고, 말레이미드-펩티드:mAb가 3 또는 15 몰:몰이었다는 점을 제외하고, 변화하는 PAR의 화학 접합체 세트를 실시예 1에 기술된 것과 동일한 방식으로 제조하였다. 대조군으로, 인간 IgG1 (허셉틴(Herceptin®)) 화학 접합체를 아르곤 하의 37°C에서 2시간 동안 이의 힌지 이황화물을 3 몰:몰 트리스(2-카복시에틸포스핀)(TCEP)에 의해 환원시킨 후, 25°C에서 밤새 15 몰:몰 말레이미드-펩티드와 반응시켜 제조하고, 한외여과를 이용한 탈염에 의해 정제하였다.

[0156]

이들의 TGF- β 1과의 결합 능력을 평가하기 위하여, 화학 접합체를 TGF- β 1과 1:1 몰 비율로 혼합한 후, 인산염 완충 식염수(PBS) pH 7.2 중에서 Superdex 200(G.E. Healthcare) 상에서 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. mAb1-D10 화학 접합체 단독은 도 4의 A에 나타난 바와 같이 개질되지 않은 mAb1보다 먼저 용리되는 다소 불균일한 피크를 생성하였는데, 이는 접합된 펩티드에 의해 생성된 전하 효과로 인한 것일 수 있다. 접합체에 TGF- β 1을 첨가한 경우, mAb1 또는 mAb1-D10 화학 접합체보다 더 일찍 용리되는 피크를 생성하여, 더 큰 분자량의 복합체가 형성되었음을 나타내었다(도 4의 B). 마찬가지로, 개질되지 않은 mAb1 항체에 TGF- β 1을 첨가하자 더 이른 체류 시간으로의 변화가 생성되었다(도 4의 C, D). 대조적으로, 허셉틴에 대한 D10의 화학적 접합은 mAb1 접합체와 마찬가지로 항체 단독의 체류 시간의 변화를 초래하였지만(도 4의 E, F), 허셉틴-D10 접합체에 대한 TGF- β 1(1 몰:몰)의 첨가는 이의 용리 시간 또는 겔보기 MW에 어떠한 변화도 생성하지 못하여(도 4의 F,

G), 접합체에 대한 결합이 접합의 결과로서 발생하지 않았음을 나타내었다.

[0157] 실시예 3: mAb1-D10 화학 접합체의 수산화인회석에 대한 펩티드 의존적 결합

[0158] 이 실시예에서는, 37℃에서 2시간 동안 25 mM NaCl, 1 mM DTPA, 20 mM 붕산나트륨 pH 8 중 12당량 DTT로 힌지 영역 이황화물을 환원시킨 후, 유리 티올 일부를 다시 이황화물로 전환시키기 위해 2 몰:몰 2,2'-디피리딜 이황화물(Sigma)과 반응시켜 도 2에 도시된 바와 같은 mAb1과 D10의 화학 접합체를 생성하였다. 이어서, 이를 실시예 1에 기술된 D10-말레이미드 펩티드와 반응시켰다. 최종 생성물을 한외여과에 의해 정제하였다. 일부분(25 μg)을 스핀 컬럼 상에서 5 mM 인산나트륨 pH 7.4로 교환하고, 세라믹 수산화인회석(HT) 타입 II(BioRad) 100 μL 컬럼 상에서 크로마토그래피를 수행하고, 0.5 mL/분의 유속으로 5 내지 500 mM 인산나트륨 pH 7.4의 구배로 용리시켰다. 개질되지 않은 mAb1을 대조군으로 사용하였다. A₂₈₀ 컬럼 프로파일을 도 5a에 도시하였다. mAb1은 컬럼에 대해 극미량의 결합만을 보였으나, 접합체는 약 절반이 결합되어 0.2 M 인산염 주위로 용출되었다. 분획을 농축하고, SDS-PAGE에 의해 분석하였다(도 5b). 결합되지 않은(통과액 또는 "FT") 분획은 주로 개질되지 않은 mAb를 보여주었으나, 주요 피크 4는 SDS-PAGE에 의해 예상 PAR 6의 접합체를 함유하였다.

[0159] 실시예 4: 수산화인회석에 대한 결합에 미치는 펩티드 로딩 범위의 영향

[0160] 이 실시예에서는, 일련의 실시예 1에 기술된 다양한 개수의 펩티드와의 D10 펩티드 화학 접합체를 실시예 3에 기술된 바와 같이 HT 타입 II 컬럼 상에서 크로마토그래피로 분석하였다. A₂₈₀ 프로파일 및 결합된 접합체 분획 및 피크 체류 시간의 도표를 도 6a에 나타내었다. 도 6b에서 보는 바와 같이, 컬럼에 결합된 접합체의 양은 PAR 3.8까지 증가하였고, 안정화되었다가 펩티드 개수가 더 커지면서 감소하기 시작하였다. 대조적으로, 수지와 (상호 작용의 강도를 나타내는) 접합체의 체류 시간은 펩티드의 개수가 9까지 증가함에 따라 증가하였다.

[0161] 실시예 5: 시험관 내에서 TGF-β1을 중화하는 데 있어서 그 효능에 미치는 mAb1에 대한 D10 펩티드 화학적 접합의 영향

[0162] 이 실시예에서는, 도 2에 도시된 바와 같은 3종의 mAb1-D10 접합체 세트를 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조하였다. 접합시키는 동안 D10-말레이미드 펩티드를 생략하여 대조군 접합체를 제조하였다. 도 3에 도시된 바와 같이, SDS-PAGE 분석에 의해, 이러한 3종의 접합체에 대해 펩티드 로딩(PAR)을 0, 5 또는 9로 결정하였다. 그런 다음, 1시간 동안 TGF-β1과 공동 인큐베이션 시켜 이러한 접합체들의 TGF-β1 불활성화 능력을 결정하였다. 그 후, 성장 배지 중의 단계별 회석액을 인간 TGF-β1 수용체를 발현하는 인간 A549 세포에 적용한 다음, 밤새 인큐베이션 하였다. 그런 다음, 활성 TGF-β1에 대한 세포 반응을 성장 배지 내로의 IL-11의 방출에 의해 결정하였는데, IL-11의 방출은 IL-11에 특이적인 ELISA 분석에 의해 검출하였다. 3종의 접합체 및 mAb1 대조군에 대한 IL-11 반응을 도 7에 도시하였다. 모든 사례에서, IL-11 방출의 절반 최대 억제(half-maximal inhibition, EC₅₀)는 0.1 nM 항체 주위에서 발생하였다. 두 접합체(PAR=5 및 PAR=9) 및 펩티드가 결여된 모의 접합체(PAR=0)는 mAb1보다 약간 더 나은 억제를 보였다. 접합된 펩티드의 개수는 EC₅₀에 어떠한 영향도 미치지 않았다.

[0163] 실시예 6: 마우스에 투여된 mAb1의 생물 분포에 미치는 접합된 D10 펩티드의 영향

[0164] 도 2에 나타난 바와 같이, 실시예 1에 기술된 바와 비슷한 방식으로 D10-mAb1 화학 접합체를 제조하였다. mAb1(19.6 mg)을 탈기된 붕산염 완충액으로 교환하고, 37℃에서 1.5시간 동안 10.6당량(1.06 μmol) DTT와 반응시킨 후, 25℃에서 1.5시간 동안 아르곤 하에서 완충액 교환 없이 6당량 D10 펩티드(Ac-D10-C2-PEG12-C6-말레이미드)와 반응시켰다. 12당량 N-에틸말레이미드 첨가 후, 25℃에서 30분 동안 인큐베이션 하여 접합되지 않은 유리 티올을 차단하였다. 최종 생성물을 한외여과에 의해 정제하였다. 펩티드 대 항체 비율을 SDS-PAGE를 이용하여 결정하였다(PAR 약 4.8). 경쇄는 경쇄 시스테인 잔기에 대한 단일 펩티드의 첨가에 상응하는 극미량의 밴드를 보여주었다.

[0165] 제조사가 설명한 바와 같은 조건을 이용하여 접합체와 mAb1 항체 대조군을 따로따로 알렉사플루오르(AlexaFluor®) 750(Thermo Fisher)으로 라벨링하였다. 형광색의 시험 항목을 SKH-1 무모 마우스에 투여하였고, 이를 투여 직후(0.3 내지 1시간), 4시간 후, 그리고 1일, 2일, 3일, 4일, 7일, 8일 및 9일 후에 IVIS 기기(Perkin Elmer)로 영상화하였다. 1 mg/kg 라벨링된 mAb1 및 접합체를 주사한 마우스의 영상을 도 8a에 도시하였다. 라벨링된 mAb1의 형광은 몸 전체에 걸쳐 균일하게 분포되었고, 이 패턴은 유지되었으나 9일 동안 강도가 감소하였다. 대조적으로, 1일 후, mAb1-D10 접합체는 등쪽 중간선, 다리 및 꼬리에 또는 그 근처에 집중되어, 골 국제화와 일치하였으나, 신체의 다른 곳에서는 거의 검출 불가능한 수준이었다. 도 8a의 영상과 일관되게, 도 8a의 영상에서 측정된 심장 형광과 비교한 원위 대퇴골 형광의 비율은 24시간쯤에 대조군과 비교하여 mAb1-D10 접합체의 경

우 유의미하게 상승되었고($P < 0.05$), 168시간 내내 유의미하게 상승된 채로 유지되었다(도 8b 참조). 이 분포는 강도의 사소한 차이만 있을 뿐 9일 동안 유지되었다.

[0166] 실시예 7: 재조합 류린 항-TGF β -D10 항체 융합 변이체의 제조

[0167] 도 9a 및 9b에 도시된 바와 같이 재조합 항-TGF β -D10 펩티드 융합 변이체 세트를 아래와 같이 제조하였다.

[0168] 중쇄 및 경쇄 발현 벡터 구성체

[0169] 다양한 위치에 D10 펩티드가 있는 mAb1 중쇄 및 경쇄를 발현시키기 위한 플라스미드 패널을 생성하였다. 또한, D10 펩티드가 없는 야생형 mAb1 중쇄 및 경쇄를 위한 두 가지 플라스미드도 생성하였다. 클로닝 목적을 위하여 인프레임(in-frame) 설계된 적절한 제한 효소 부위가 양 옆에 있는, 모든 코돈 최적화 서열을 합성에 의해 생성하였다(GeneArt). C 말단 D10 펩티드가 있거나 없는 마우스 IgG1 불변 영역 및 mAb1 야생형 완전 경쇄를 암호화하는 3개의 유전자 단편을 문헌[Durocher *et al.*, (2002, *Nucl. Acids Res.* 30(2): E9)]에서 설명된 pTT 벡터의 유사체인 빈 에피솜 포유동물 발현 벡터 pFF 내로 클로닝하여 ApaLI/HindIII 제한 효소 및 후속 라이게이션을 이용하여 "mIgG1_CH123_pFF", "mIgG1_CH123D10_pFF," 및 "mAb1_VLCL_pFF"를 생성하였다. N 말단 D10 펩티드가 있거나 없는 가변 영역을 암호화하는 유전자 단편들을 중쇄의 경우 ApaLI/EagI를 이용하여 그리고 경쇄의 경우 ApaLI/MfeI를 이용하여 벡터 내로 클로닝하였다. C 말단 D10 및 상이한 길이의 G4S(서열번호 9) 스페이서가 있는 마우스 Ig 카파 경쇄의 불변 영역을 암호화하는 유전자 단편을 MfeI/HindIII를 이용하여 "mAb1_VLCL_pFF" 내로 클로닝하여 야생형 불변 영역을 교체하였다. 각 구성체의 예측된 정확한 DNA 서열을 DNA 시퀀싱에 의해 확인하였다(ACGT, Inc.).

[0170] 융합 변이체 조립 및 발현

[0171] 표 1에 기술된 바와 같이 융합 변이체 및 펩티드 불포함 대조군을 생성하기 위하여 공동 형질감염을 위한 각각의 중쇄 및 경쇄 벡터 중 하나를 선택하여 융합 변이체를 생성하였다. "PAR"(펩티드 대 항체 비율)은 중쇄 및 경쇄 상의, 최종 발현된 항체에 부가될 것으로 예상된 펩티드의 총 개수를 반영한다. 융합 변이체 ID "mAb1 F1"은 개질 없이 mAb1 서열과 실질적으로 동일한 "야생형"("wt") 구성체를 나타낸다. "HC"는 mAb1의 중쇄를 나타내고, "LC"는 mAb1의 경쇄를 나타내고, "D10"은 D10 펩티드(서열번호 1)를 나타내고, "G4S"는 일부 구성체에 포함된 gly-gly-gly-gly-ser(서열번호 9)로 구성된 스페이서 서열을 나타낸다.

표 1

[0172] D10과의 mAb1의 재조합 융합 변이체

변이체 ID	중쇄 구성체	서열 번호	경쇄 구성체	서열 번호	PAR
mAb1 F1	HC	2	LC	6	0
mAb1 F2	HC	2	D10-LC	7	2
mAb1 F3	HC	2	LC-D10	8	2
mAb1 F4	HC	2	LC-(G4S)-D10	11	2
mAb1 F5	HC	2	LC-(G4S) ₂ -D10	12	2
mAb1 F6	HC-D10	3	LC	6	2
mAb1 F7	HC-D10	3	D10-LC	7	4
mAb1 F8	HC-D10	3	LC-D10	8	4
mAb1 F9	HC-D10	3	LC-(G4S)-D10	11	4
mAb1 F10	HC-D10	3	LC-(G4S) ₂ -D10	12	4
mAb1 F11	D10-HC	4	LC	6	2
mAb1 F12	D10-HC	4	D10-LC	7	4
mAb1 F13	D10-HC	4	LC-D10	8	4
mAb1 F14	D10-HC	4	LC-(G4S)-D10	11	4
mAb1 F15	D10-HC	4	LC-(G4S) ₂ -D10	12	4
mAb1 F16	D10-HC-D10	5	LC	6	4
mAb1 F17	D10-HC-D10	5	D10-LC	7	6
mAb1 F18	D10-HC-D10	5	LC-D10	8	6
mAb1 F19	D10-HC-D10	5	LC-(G4S)-D10	11	6

mAb1 F20	D10-HC-D10	5	LC-(G4S) ₂ -D10	12	6
----------	------------	---	----------------------------	----	---

[0173] 발현되는 원하는 재조합 융합 변이체의 능력을 평가하기 위하여, 표 1로부터의 16종의 변이체를 제조사가 설명한 바와 같은 조건 하에 Expi293F™ 세포(Life Technologies) 로의 공동 형질감염에 의해 평가하였다. 4일 후, 조정 배지의 SDS-PAGE에 의해 발현을 결정하였다. 모든 변이체가 10 내지 30 $\mu\text{g/mL}$ 로 추정되는 수준으로 발현되었다. 5일 후 및 7일 후에는 약간 더 높은 수준이 관찰되었으나, 발현 수준은 변이형에 의존적이었다. WT(mAb1 F1), HC-D10:LC-D10(mAb1 F8), 및 HC-D10: LC-G4S-D10(mAb1 F9)은 특히 높은 발현을 보인 반면, D10-HC:D10-LC(mAb1 F12)는 저조하게 발현되었다.

[0174] 더 큰 규모의 발현

[0175] 모든 20종의 재조합 mAb1-D10 융합 변이체를 30 mL 규모의 Expi293-F 세포에서 발현시켰다. 조정 배지(CM)를 6 일제에 수확하였고, 발현 수준을 비환원 SDS-PAGE에 의해 평가하였다. 초기 평가와 비교하여 다소 높은 수준의 발현(30 내지 150 $\mu\text{g/mL}$)이 관찰되었지만, 상대적인 발현 수준은 소규모 형질감염과 일치하였다.

[0176] 실시예 8: 재조합 mAb1-D10 융합 변이체 특성 분석

[0177] 발현 수준 및 TGF- β 1 결합

[0178] 발현 수준의 정량화 및 재조합 mAb1-D10 융합 변이체가 TGF- β 1과 결합하는 능력을 옥텟(Octet®) QK384를 이용하여 평가하였다. 뮤린 IgG에 대한 옥텟 바이오 센서를 샘플 희석제(0.01% BSA 및 0.02% 트윈 20을 함유하는 PBS, pH 7.4) 또는 1.25 내지 100 $\mu\text{g/mL}$ 범위에 걸친 정제된 mAb1 표준물질의 2배 연속 희석액 중 1:10으로 희석된 조정 배지에 침지시켰다. 500 rpm에서 샘플을 진탕시키면서 2분 동안 결합 데이터를 수집하였다. 초기 결합 속도의 4-파라미터 적합성 및 표준물질로부터 수득된 것들과의 비교를 통해 역가를 계산하였다. 그런 다음, 바이오 센서를 1분 동안 희석제로 세척하여 임의의 배지를 제거하고, 기준선을 재확립한 다음, 1000 rpm에서 40 nM TGF- β 1를 함유하는 웰에 3분 동안 침지시켜 결합을 수행하였다. 이어서, 센서를 희석제로 이동시켜 해리 단계를 1000 rpm에서 3분 동안 수행하였다. 표 2에서 보는 바와 같이, 배지 중의 융합 변이체의 농도는 11 내지 178 $\mu\text{g/mL}$ ("옥텟 농도") 범위였고, 일반적으로 SDS-PAGE에 의해 관찰된 경향("발현 수준")과 일치하였다. 또한, 모든 융합 변이체가 TGF- β 1과 결합할 수 있어, 표시된 위치 중 임의의 위치에서의 D10 펩티드의 존재가 항원 결합에 심각하게 영향을 미치지 않았음을 시사하였다.

[0179] 마우스 FcRn 결합

[0180] 옥텟 QK384를 이용하여 재조합 mAb1-D10 융합 변이체에 의한 마우스 FcRn 결합을 평가하였다. 모든 단계를 1000 rpm에서 수행하였다. 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 항체 농도를 달성하도록 희석된 조정 배지를 5분 동안 항-뮤린 IgG Fv 바이오 센서와 접촉시켰다. 그런 다음, 바이오 센서를 PBSP pH 6.0(50 mM 인산나트륨 pH 6.0, 150 mM 염화나트륨, 0.005% 계면활성제 P20)에 침지시켜 기준선을 확립하였다. 그런 다음, PBSP pH 6.0 중에 1 μM 까지 희석된 가용성 마우스 FcRn을 함유하는 웰로 센서를 3분 동안 이동시키고, PBSP pH 6.0을 함유하는 웰에서 3분 해리를 수행하였다. 표 2에 표시된 바와 같이, 변이체 전부가 마우스 FcRn과 결합하였다.

[0181] 단백질 G 결합

[0182] 옥텟 QK384를 이용하여 재조합 mAb1-D10 융합 변이체의 단백질 G에 대한 결합을 평가하였다. 단백질 G 바이오 센서를 샘플 희석제 중 10 $\mu\text{g/mL}$ 항체까지 희석된 조정 배지를 함유하는 웰에 침지시켜, 1000 rpm에서 3분 동안 신호를 지켜보았다. 표 2에 표시된 바와 같이, 변이체 전부가 단백질 G와 결합하였다.

표 2

[0183] mAb1-D10 융합 변이체의 특성 분석

변이체 ID	중쇄	경쇄	PAR	옥텟(Octet®) 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	발현 수준	TGF- β 1 결합	마우스 FcRn 결합	단백질 G 결합
mAb1 F1	wt-HC	wt-LC	0	85	++	+	+	+++
mAb1 F2	wt-HC	D10-LC	2	53	++	+	+	++
mAb1 F3	wt-HC	LC-D10	2	50	++	+	+	+
mAb1 F4	wt-HC	LC-(G4S)-D10	2	52	++	+	+	+

mAb1 F5	wt-HC	LC-(G4S) ₂ -D10	2	34	+	+	+	+
mAb1 F6	HC-D10	wt-LC	2	178	+	+	+	+
mAb1 F7	HC-D10	D10-LC	4	46	+	+	+	+
mAb1 F8	HC-D10	LC-D10	4	117	+	+	+	+
mAb1 F9	HC-D10	LC-(G4S)-D10	4	156	+	+	+	+
mAb1 F10	HC-D10	LC-(G4S) ₂ -D10	4	100	+	+	+	+
mAb1 F11	D10-HC	wt-LC	2	36	+	+	+	+
mAb1 F12	D10-HC	D10-LC	4	11	+	+	+	+
mAb1 F13	D10-HC	LC-D10	4	36	+	+	+	+
mAb1 F14	D10-HC	LC-(G4S)-D10	4	34	+	+	+	+
mAb1 F15	D10-HC	LC-(G4S) ₂ -D10	4	27	+	+	+	+
mAb1 F16	D10-HC-D10	wt-LC	4	36	+	+	+	+
mAb1 F17	D10-HC-D10	D10-LC	6	23	+	+	+	+
mAb1 F18	D10-HC-D10	LC-D10	6	31	+	+	+	+
mAb1 F19	D10-HC-D10	LC-(G4S)-D10	6	40	+	+	+	+
mAb1 F20	D10-HC-D10	LC-(G4S) ₂ -D10	6	28	+	+	+	+

[0184] SDS-PAGE

[0185] 정제된 WT 구성체 및 재조합 융합 변이체 mAb1 F2, mAb1 F6, mAb1 F7, mAb1 F11, mAb1 F12, mAb1 F16, 및 mAb1 F17을 환원 및 비환원 조건 하에서 4 내지 20% 트리스-글리신 SDS-PAGE 겔(Novex, Life Sciences) 상에서 분석하고, 쿠마시 블루로 염색하였다. ProteinSimple® 영상 장치에 의해 수집된 가시광선 영상을 도 10에 도시하였다. 각 중쇄 및/또는 경쇄 상의 D10 펩티드의 예상된 존재 및 개수와 일치하는 중쇄 및/또는 경쇄의 이동도의 작은 감소가 관찰되었다. 불순물 및 공유 결합 응집체는 검출되지 않았다.

[0186] 시차 주사 형광측정법(DSF)에 의한 열 안정성

[0187] 중쇄 및 경쇄 상의 말단에서의 모든 가능성 있는 D10 펩티드의 조합을 대표하는 몇몇 재조합 mAb1-D10 융합 변이체의 열 안정성을 리포터 염료로서 SYPRO® 오렌지(Thermo Scientific)를 이용하여 시차 주사 형광측정법으로 결정하였다. 높은 온도에서의 단백질의 안정성은 일반적인 저장 조건 하에서의 단백질 안정성을 예측하므로, 일반적으로 이는 제조 및 치료제로서의 용도를 위한 단백질의 적합성을 평가하는 데 사용될 수 있다고 인정된다. 열 안정성은 실시간 PCR 기기 상에서 단백질 구조의 언폴딩(unfolding)에 의해 노출된 소수성 영역과의 결합 시 형광 증가를 나타내는 염료를 이용하여 평가할 수 있다(Lo et al., 2004, Anal. Biochem. 332(1): 153-9). CFX96 실시간 PCR 검출 시스템에서 온도를 상승시키면서 SYPRO® 오렌지의 1:1000 희석액을 함유하는 샘플(0.5 mg/ml 단백질, 10 µL)의 형광을 관찰하였다. CFX Manager 3.0(Bio-Rad Laboratories)을 이용하여 데이터를 분석하였다. 도 11은 몇몇 변이체에 대한 온도에 따른 형광의 변화 속도를 도시한 것이다. 구조 전이에 의해 영향 받지 않는 단백질 구조 부분에 대한 염료의 결합을 분리하기 위하여 일반적으로 절대 형광보다는 변화 속도가 사용된다. 음의 변위는 형광 변화의 속도의 증가를 반영하고, 최소점은 언폴딩된 상태로의 전이의 중간점("T_m")을 나타낸다. 시험한 몇몇 변이체(mAb1 F6, mAb1 F11, mAb1 F16)는 개질되지 않은 항체 대조군("WT" = mAb1 F1)과 구별할 수 없는 T_m 프로파일을 보여주었다. 다른 두 변이체(mAb1 F2 및 mAb1 F7)는 주요 전이에 대한 T_m의 유의미한 감소를 보여주었다. 2개의 변이체(mAb1 F12 및 mAb1 F17)는 가장 낮은 T_m 값을 보여주었다. 특히, 경쇄의 N 말단에 D10 펩티드를 함유하는 재조합 mAb1-D10 융합 변이체 4종 전부는 T_m의 유의미한 감소를 보여주어, mAb1 항체 상 이 위치에서의 펩티드의 배치가 그 구조를 불안정하게 만듦을 시사한다. 역으로, 중쇄의 어느 한 말단 상의 D10 펩티드의 배치는 T_m의 어떠한 변화와도 상관이 없었다. 도 11에 도시된 바와 같이 관찰된 몇몇 융합 변이체에 대한 두드러진 전이의 T_m 값을 표 3으로 작성하였다.

표 3

[0188]

발현된 재조합 융합 변이체의 시차 주사 형광측정법

변이체 ID ^A	(5'-HC-3'):(5'-LC-3')	PAR	T _m
mAb1 F1 ^B	WT	0	72.5
mAb1 F2	WT-HC:D10-LC	2	64.0
mAb1 F6	HC-D10:WT-LC	2	72.3
mAb1 F7	HC-D10:D10-LC	4	64.0
mAb1 F11	D10-HC: WT-LC	2	72.0
mAb1 F12	D10-HC: D10-LC	4	62.7
mAb1 F16	D10-HC-D10: WT-LC	4	72.0
mAb1 F17	D10-HC-D10: D10-LC	6	62.5

[0189]

^A 표 2 참조; ^B mAb1 F1은 mAb1의 재조합 버전이다.

[0190]

실시예 9: 시험관 내에서 TGF-β1를 중화시키는 데 있어서 재조합 mAb1-D10 융합 변이체의 효능

[0191]

배지에 첨가된 TGF-β1에 대한 시험관 내에서의 A549 종양 세포에 의한 IL-11의 분비 억제에 의해 TGF-β1 활성을 중화시키는 데 있어서 재조합 mAb1-D10 융합 변이체의 효능을 결정하였다. 절차를 실시예 3에 기술된 바와 같이 수행하였다. (정제 용이성의 지표로서) 단백질 G에 대한 친화도를 기반으로 하여 실시예 7로부터 몇몇 대표적인 융합 변이체를 선택하였다. 8종의 변이체(mAb1 F1, mAb1 F2, mAb1 F6, mAb1 F7, mAb1 F11, mAb1 F12, mAb1 F16, 및 mAb1 F17)에 대한 TGF-β1 억제 프로파일을 도 12a 및 12b에 도시하였다. 모든 융합 단백질은 mAb1 대조군과 비슷한 EC₅₀을 보여주었다.

[0192]

실시예 10: 재조합 융합 변이체에 의한 TGF-β1의 결합

[0193]

실시예 7의 재조합 mAb1-D10 융합 변이체 또한, 비아코어(Biacore®)에 의해 검출된 바와 같이 표면 플라스몬 공명(SPR)을 이용하여 TGF-β1 결합에 대해 정량적으로 평가하였다. 정제된 변이체를 함유하는 샘플을 아민 커플링된 TGF-β1이 있는 센서 칩 위로 통과시켜 평형 상수 K_D를 결정하였다. 칩에서 인접한 TGF-β1 분자들과의 결합으로부터 발생하는 결합 효과에 대한 가능성을 최소화하기 위하여 TGF-β1의 100 반응 단위(RU) 미만의 표적 고정화 수준을 선택하였다. 고정화 수준은 칩 표면의 NHS/EDC 활성화 이후, 그러나 에탄올아민으로의 퀵칭 이전의 반응 단위의 변화에 의해 결정하였다. 융합 변이체, WT 융합 변이체 F1, 및 mAb1 대조군을 HBS-EP 완충액 중에 30, 10, 3, 1 및 0.37 nM까지 희석하고, 3분 동안 30 μL/분으로 TGF-β1 칩 위를 통과시키고, 이어서 동일한 완충액 중에서 5분 해리를 수행하였다. 런(run) 사이에서, 75 μL/분의 유속으로 칩 위를 40 mM HCl의 30초 주사를 2회 통과시켜 칩 표면을 재생시켜 임의의 결합된 항체를 제거하였다. 표 4에 나타난 바와 같이, 모든 융합 변이체 및 WT 구성체(F1)에 대한 평형 상수(K_D)는 mAb1 대조군의 2.4배 이내였다. 예상 외로, 융합 변이체에 의해 유도된 최대 신호(RU)는 펩티드의 개수 증가에 따라 감소하였으며, 변이체 F17(D10-HC-D10/D10-LC, PAR=6)이 최저 신호를 나타내었다. 이는 모든 시험한 융합 변이체가 TGF-β1을 중화하는 데 있어서 mAb1 또는 WT 구성체와 비슷하거나 더 강력한 것으로 나타났던 실시예 9에 기술된 바와 같은 A549 세포 효능 분석과 대조적이다. 이러한 감소에 대한 가능한 설명은 칩 매트릭스(카복시메틸 텍스트란)와 음으로 하전된 D10 펩티드 사이의 정전기적 반발력을 반영할 수 있다.

표 4

[0194]

비아코어 분석에 의한 TGF-β1에 대한 mAb1-D10 융합 변이체 결합의 평형 상수

변이체 ID ^A	샘플	PAR	동역학 적합 농도 범위	K _a (x10 ⁵ M ⁻¹ s ⁻¹)	K _d (x10 ⁻³ s ⁻¹)	TGF β 1 K _D (nM)
mAb1	개질되지 않은 mAb	0	90-3 nM	1.67	1.00	6.00
mAb1 F1	WT-HC: WT-LC	0	30-3 nM	3.38	0.85	2.51
mAb1 F2	WT-HC: D10-LC	2	90-3 nM	1.66	1.00	6.01
mAb1 F6	HC-D10: WT-LC	2	90-3 nM	1.82	0.84	4.58
mAb1 F7	HC-D10: D10-LC	4	90-3 nM	1.72	0.94	5.43

mAb1 F11	D10-HC: WT-LC	2	90-3 nM	1.64	0.92	5.62
mAb1 F12	D10-HC: D10-LC	4	90-3 nM	1.71	0.93	5.41
mAb1 F16	D10-HC-D10: WT-LC	4	90-3 nM	1.59	1.10	6.88
mAb1 F17	D10-HC-D10: D10-LC	6	90-3 nM	1.91	0.79	4.15

^A 표 2 참조

[0196] 실시예 11: 재조합 mAb1-D10 융합 변이체의 수산화인회석에 대한 결합

[0197] 또한, 실시예 7로부터의 재조합 mAb1-D10 융합 변이체를 골의 무기질 구조에 대한 결합 잠재력을 평가하기 위하여 실시예 3에 기술된 바와 같이 세라믹 수산화인회석(HT) 컬럼 결합에 대해 시험하였다. 재조합 mAb1-D10 융합 변이체(5 mM 인산 Na pH 7.4 중 각각 25 µg)를 수산화인회석 100 µL 컬럼(HT 타입 II, BioRad)에 적용하고, 0.005 내지 0.5 M의 인산 Na⁺ pH 7.4의 구배를 이용하여 용리시켰다. 컬럼으로부터 용리되는 이동상 중의 단백질을 A₂₈₀에 의해 추적하였다. 컬럼 성능의 일관성을 보증하기 위하여 각 런 세트의 시작 및 종료 시에 표준 물질(보통 mAb1-D10 화학 접합체)을 실행하였다. 도 13은 각 런에 대한 A₂₈₀ 프로파일을 도시한 것이다. 체류 시간(RT) 및 결합된 비율을 아래 표 5에 나타내었다. 재조합 융합 변이체 중 하나를 제외하고는 모두 거의 정량적으로 결합되었으나, 그들의 체류 시간에 반영된 바와 같이 친화도의 차이를 보였다. 체류 시간의 순위는 PAR과 상관 관계를 잘 보여주지 않아, 펩티드 위치의 결합에 미치는 유의미한 영향을 시사하였다. 특히, 가장 강한 결합(가장 큰 RT)은 변이체 F7(PAR4)에서 관찰된 반면, 변이체 F17(PAR6)은 약간 더 약한 결합을 보여주었다. 한 변이체(F6, PAR2)는 대부분의 PAR4 변이체보다 더 약한 결합을 보여주었으나, 다른 PAR2 변이체(F2 및 F11)보다는 유의미하게 더 나왔다. 경쇄의 N 말단에만 펩티드가 있는 한 변이체(F2)는 그의 RT 및 결합 비율(23%)로 반영된 바와 같이 약한 결합만을 보여주었다. mAb1-D10 화학 접합체("CC"; PAR 약 4)는 두 개의 피크를 생성하였는데, 84%는 모든 PAR4 융합 변이체보다 이른 RT에 용리되었다.

표 5

[0198] mAb1-D10 재조합 융합 변이체 및 화학 접합체에 의한 수산화인회석 결합

변이체 ID ^A	설명	PAR	RT(분)
mAb1	개질되지 않은 mAb	0	Nd*
F7	HC-D10 / D10-LC	4	7.58
F16	D10-HC-D10 / wt LC	4	7.53
F17	D10-HC-D10 / D10-LC	6	7.44
F6	HC-D10 / wt-LC	2	7.07
CC ^B	NA ^C	4.8	6.57 (84% [†])
F12	D10-HC / D10-LC	4	6.27
F11	D10-HC / wt LC	2	5.39
F2	wt HC / D10-LC	2	5.17 (23%)
*검출되지 않음, [†] 결합된 비율(< 100%인 경우); ^A 표 2 참조; ^B mAb1-D10 화학 접합체(인지 영역 시스테인 및 경쇄 C 말단 시스테인 상에 접합됨, 도 3a 참조); ^C 해당 없음.			

[0199] 실시예 12: 마우스에서 재조합 융합 변이체의 생물 분포

[0200] 선택된 재조합 mAb1-D10 융합 변이체 하위 세트(F6, F16, 및 F17) 및 실시예 6에 기술된 바와 같이 생성된 mAb1-D10 화학 접합체의 생물 분포를 CD-1 마우스로의 꼬리 정맥 주사 후에 결정하였다. 발현 및 정제 수율, TGF-β1 결합 친화도, 세포 기반 효능, 및 수산화인회석에 대한 결합을 포함한 몇몇 인자를 기반으로 하여 재조합 변이체를 선택하였다. 이들 변이체는 표적화가 수산화인회석에 대한 결합을 반복하는지 또는 그것이 펩티드 개수의 함수인지를 평가하기 위하여 2개, 4개 또는 6개의 D10 펩티드를 함유하는 예를 포함하였다. 단백질을 HEK293 세포에서 발현시키고, 단백질을 A로 정제하였다. 3종의 재조합 mAb1 융합 변이체의 특성을 시험관 내 및

생체 내에서 상세하게 분석하였다. 이들에서, D10 펩티드는 오로지 중쇄의 C 말단에(mAb1 F6), 중쇄의 N 말단과 C 말단에(mAb1 F16), 또는 중쇄의 N 말단 및 C 말단과 경쇄의 C 말단에(mAb1 F17) 재조합으로 첨가되었다. mAb1 F6, F16 및 F17 재조합 변이체는 각각 2, 4, 및 6의 펩티드 대 항체 비율(PAR)을 나타낸다. 실시예 6의 연구에서 골 표적화를 보여주었던 mAb1-D10 펩티드 화학 접합체(약 4.8 PAR)를 양성 대조군으로 선택하였다.

[0201] 재조합 융합 변이체 및 화학 접합체를 50 mM 붕산나트륨 pH 8.65 중 Dylight® 800-4xPEG NHS 에스테르(Thermo Scientific)와 대략 5:1의 염료:단백질 몰 비율로 반응시켜 라벨링하였다. 염료:단백질 비율을 조정하여 라벨링 정도(DOL)를 20% 이내(약 1.2 몰:몰)로 유지하였다. 그런 다음, 라벨링된 단백질을 꼬리 정맥 주사에 의해 CD-1 마우스에 1 mg/kg으로 투여하였다. 이후 마취된 동물을 투여 후 24시간, 48시간, 168시간 및 504시간(3주)째에 IVIS 소 동물 근적외선 영상 장치(Perkin Elmer) 상에서 영상화하였다. 골 전달을 확인하기 위하여 240시간 및 504시간째의 각 군의 동물로부터 대퇴골 및 척추를 채취하였다.

[0202] 도 14의 등쪽 영상에 나타난 바와 같이, mAb1-D10 융합 변이체 및 화학 접합체 모두 척추 근처의 등쪽 중간선에 집중되어 있었고, 시험 항목에 대한 신호 강도 사이에 유의미한 차이가 있었지만 그곳에 3주(504시간) 동안 남아 있었다. 도 14에 나타난 바와 같이, 어깨와 골반 사이의 척추 일부분을 포함한 관심 영역(ROI)을 정량화에 사용하였다. DOL에 대해 정규화된 ROI 내의 최대 복사 효율을 계산하였고, 도 15에 나타난 바와 같이 도표화하였다. 연구 전체 과정(3주)에 걸쳐 모든 구성체 중 중쇄 C 말단 각각에 D10 펩티드가 있는 재조합 융합 변이체 F6은 척추에서 가장 높은 수준을 보여주었다. 48시간 이후, ROI 내의 신호 강도 순위는 변이체 F6 > 변이체 F16 > 변이체 F17 ≍ 화학 접합체였고, 이 순서는 연구 과정 전반에 걸쳐 유지되었다(도 15). Phoenix® WinNonlin® 소프트웨어(Pharsight)를 이용하여 계산한 (비허를 단독 대조군 동물로부터의) 배경 자기형광을 뺀, 시간 경과에 따른 ROI 내의 최대 복사 효율에 대한 곡선 하 면적(AUC)을 표 6에 나타내었다. mAb1 대조군과 비교하여 골 노출(AUC)이 8 내지 22 배 증가하였고, D10 함유 구성체 간에는 약간의 차이(최대 2.5 배)가 있었다. 변이체 F6은 mAb1과 비교하여 가장 큰 증가를 보여주었다(21.8배, $p < 0.05$). WinNonlin®을 이용하여 계산한 바에 따른 조직 반감기는 마찬가지로, mAb1과 비교하여 변이체 F6의 경우 골에서의 반감기의 >10배 증가를 보여주었다($p < 0.05$).

[0203] 각 코호트의 대표적인 동물들로부터의 척추 및 대퇴골을 240시간 및 504시간 이후에 분리하였고, 주변 조직으로부터 분리하여 영상화하였다(도 16). 이들 샘플의 상대적인 형광 강도는 살아 있는 동물에서 관찰된 등쪽 영상 신호와 일치하여, 이것들이 골에 대한 재조합 융합 변이체 및 화학 접합체의 존재를 반영함을 나타내었다.

표 6

[0204] **형광 AUC 데이터로부터의 척추 노출**

변이체 ID	AUC _{inf} (norm) ^A	조직 t _{1/2} (d) ^A
mAb1	(1.0)	2.3 ± 0.1
F6	21.8 ± 9.1 [*]	25.4 ± 9.9 [*]
F16	10.0 ± 1.6	14.2 ± 2.4
F17	9.5 ± 3.1	19.0 ± 3.7
CC ^B	7.7 ± 1.0	17.9 ± 3.4
^A DOL을 조정하고 mAb1로 정규화한 평균 ± SEM; ^B mAb1-D10 화학 접합체 [*] mAb1과 비교하여 $P < 0.05$		

[0205] **실시예 13: 재조합 인간 항-TGFβ-D10 항체 융합 변이체의 제조**

[0206] 중쇄 상에 C 말단 D10 서열을 보유하는 mAb2(힌지 돌연변이 S228P가 있는 인간 항-TGFβ IgG4 항체)(즉, mAb2 HC-D10/mAb2 wt LC (서열번호 14/서열번호 15), 이는 변이체 F6에서처럼 상응하는 구조를 가지며(도 9b 참조), 이하에서 mAb2 F6이라 지칭됨; 표 7 참조)를 제조하기 위한 발현 벡터를 실시예 7에 기술된 바와 동일한 방식으로 생성하였다. 그런 다음, Expi293F 세포를 미니프렙(miniprep) DNA로 형질감염시키고, 6일 후에 조정 배지(60 mL)를 수확하였고, 생성물 단백질을 HiTrap 단백질 A(G.E. Healthcare)로 정제하였다.

표 7

[0207] D10과의 mAb2의 재조합 융합 변이체

변이체 ID	중쇄 구성체	서열 번호	경쇄 구성체	서열 번호
mAb2 F1	HC	13	LC	15
mAb2 F2	HC	13	D10-LC	18
mAb2 F3	HC	13	LC-D10	19
mAb2 F4	HC	13	LC-(G4S)-D10	21
mAb2 F5	HC	13	LC-(G4S) ₂ -D10	22
mAb2 F6	HC-D10	14	LC	15
mAb2 F7	HC-D10	14	D10-LC	18
mAb2 F8	HC-D10	14	LC-D10	19
mAb2 F9	HC-D10	14	LC-(G4S)-D10	21
mAb2 F10	HC-D10	14	LC-(G4S) ₂ -D10	22
mAb2 F11	D10-HC	16	LC	15
mAb2 F12	D10-HC	16	D10-LC	18
mAb2 F13	D10-HC	16	LC-D10	19
mAb2 F14	D10-HC	16	LC-(G4S)-D10	21
mAb2 F15	D10-HC	16	LC-(G4S) ₂ -D10	22
mAb2 F16	D10-HC-D10	17	LC	15
mAb2 F17	D10-HC-D10	17	D10-LC	18
mAb2 F18	D10-HC-D10	17	LC-D10	19
mAb2 F19	D10-HC-D10	17	LC-(G4S)-D10	21
mAb2 F20	D10-HC-D10	17	LC-(G4S) ₂ -D10	22

[0208] 실시예 14: 마우스에서 인간 항-TGFβ-D10 항체 융합 단백질의 생물 분포

[0209] 재조합 mAb2 변이체 F6(mAb2 F6) 및 mAb2 대조군 항체를 AlexaFluor® 647(Thermo Scientific)로 라벨링하였고, 1 mg/kg의 용량으로 C57BL/6 마우스에 복강 내 투여하였다. 24시간 및 96시간 후, 일부 마우스를 희생시키고, 척추와 대퇴골을 절제하고, IVIS 기기 상에서 영상화하였다. 희생 시 얻은 혈청 샘플(10 μL)을 동시에 영상화하였다. 원위 대퇴골(섬유주) ROI 및 요추에 대한 평균 총 복사 효율을 도 17a 및 17b에 나타내었다. 상대적인 강도를 표 8로 작성하였다. 이러한 결과는 mAb2에 대한 D10의 재조합 부가의 결과로서 96 시간 후에 요추 및 대퇴골에서는 항체량의 상당한 증가를, 혈청에서는 유의미하게 적은 양을 보여준다.

표 8

[0210] C57BL/6에서 인간 항-TGFβ-D10 융합 단백질에 대한 마우스에서의 상대적인 골 노출

골/혈청 신호 비율*			
	골	24시간	96시간
mAb2 F1	요추	(1.00)	1.2
	원위 대퇴골	0.82	0.70
mAb2 F6	요추	12.6	189
	원위 대퇴골	19.0	147

*24시간의 mAb2 요추로 정규화함

[0211] 실시예 15: 마우스에서의 류린 항-TGFβ-D10 항체 융합 단백질의 단일 용량 혈청 및 골 약물동역학

[0212] 이 실시예에서, 류린 항-TGFβ-D10 항체 융합 단백질의 약물동역학을 마우스에서 측정하였다.

[0213] 단일 용량의 mAb1 또는 재조합 mAb1 F6(표 2 참조)을 G610C 마우스(불완전 골생성증 동물 모델; 시점당 n=12)에 복강 내 투여하였고, 투여 후 4시간 또는 2일, 7일, 15일, 22일 및 43일째에 혈액 샘플을 수집하였다. 관련 항

체의 혈청 농도를 검출하고 정량화하기 위하여 최적화된 ELISA를 활용하였다.

[0214] 골 영상화를 위하여, 단일 용량의 형광단 라벨링된 mAb1, 제조합 mAb1 F6 또는 다양한 다른 D10 대체제를 누드 CD-1 마우스(시점당 n=3)에 정맥 내 투여하였고, 투여 후 4시간 또는 1일, 2일, 4일, 7일, 10일 및 21일째에 생체 내 광학 영상화를 수행하였다. 골에서의 mAb1 및 mAb1 F6 사이의 상대적인 시험 항목 비교를 가능하게 하는 마우스 척추의 형광 영상을 생성하였다(미도시).

[0215] 혈청 및 골에서의 약물동역학 프로파일은 각각 도 18a 및 18b에서 볼 수 있으며, 그에 따른 약물동역학 파라미터는 아래 표 9에서 볼 수 있다.

[0216] 이 결과는 단일 용량 후 혈청 및 골에서의 mAb1 및 mAb1 F6 사이의 약물동역학의 근본적인 차이를 증명하였다. mAb1 F6은 mAb1과 비교하여 혈청에서 13배 더 적은 AUC(노출) 및 골에서 22배 더 높은 노출을 나타내었다. 추가적으로, mAb1 F6은 mAb1보다 혈청에서 14배 더 짧은 $t_{1/2}$ 및 이에 비례하여 13배 더 빠른 청소율을 나타내었다. 마지막으로 골의 경우, mAb1 F6은 mAb1보다 11배 더 긴 $t_{1/2}$ 및 이에 비례하여 17배 더 느린 청소율을 나타내었다. 이러한 속성은, 안전성의 관점에서 TGF β 의 말초(혈청) 억제제 바람직하지 않을 수 있지만 골에서의 더 높은 노출이 효능을 증진시킬 수 있는 임상적인 영역에서 인간형의 mAb1-D10에 유리할 수 있다.

표 9

단일 용량 PK 파라미터

시험 항목	방법/분석물	AUC	$t_{1/2}$ (일)	청소율
mAb1	ELISA/혈청	740 + 91.6	12.6+ 2.51	0.14 + 0.034
mAb1 F6		56.3 + 13.1*	0.91 + 0.21*	1.78 + 0.27*
mAb1	영상화/골	(1.0) [#]	2.3 ± 0.1	1.82 ± 0.08
mAb1 F6		21.8 + 9.1*	25.4 + 9.9*	0.11 + 0.03*

[0218] * mAb1과 비교하여 $p<0.05$; [#] mAb1에 대해 1.0으로 정규화한 AUC

[0219] 실시예 16: 마우스에서의 류린 항-TGF β -D10 항체 용합 단백질의 다중 용량 피크 트로프 혈청 약물동역학

[0220] 이 실시예에서는, 불완전 골생성증의 동물 모델에서 다중 용량 피크 트로프 약물동역학 연구를 수행하였다.

[0221] mAb1 및 mAb1 F6(표 2 참조)을 G610C 마우스(n=10)에 8주 동안 매주 3회(총 24회 투여) 0.3 mg/kg 및 1 mg/kg의 농도로 복강 내 투여하였고, 투여 1 및 투여 23(연구의 시작 및 종료) 후 투약 후 24시간 및 48시간째에 혈액 샘플을 채취하였다. 결과는 1 mg/kg 용량에 대해서만 나타내었다(도 19 참조). 관련 항체의 혈청 농도를 검출하고 정량화하기 위하여 최적화된 질량 분광분석법을 활용하였다.

[0222] 결과를 아래의 표 10에 정량화하였다. 이 결과는 투여 1 및 투여 23 이후 혈청에서의 mAb1 및 mAb1 F6 사이의 약물동역학의 근본적인 차이를 증명하였다. 투여 1 및 투여 23에 대하여 투약 후 24시간 및 48시간째에 mAb1과 비교하여 mAb1 F6의 경우, 유의미하게 더 낮은 혈청 농도가 관찰되었다. 추가적으로, 투여 1 및 투여 23에서 mAb1과 비교하여 mAb1 F6에 대한 투약 후 24시간과 48시간 사이의 경사가 더 기울어져, 아마도 mAb1 F6의 높은 골(수산화인회석) 친화도로 인하여, mAb1보다 더 빠른 속도로 mAb1 F6이 혈청을 떠남을 시사한다(체순환). 마지막으로, mAb1 F6 및 mAb1은 투여 1부터 투여 23까지 혈청에 축적되는 것으로 보이거나, mAb1 F6은 mAb1과 비교하여 감소된 농도로 축적되는 것으로 보인다(투여 1부터 23까지 mAb1 F6: 2.5 내지 3.5배 축적 및 mAb1: 4 내지 5.5배 축적). 이러한 속성은, 안전성의 관점에서 TGF β 의 말초(혈청) 억제제 바람직하지 않을 수 있는 임상적인 영역에서 인간형의 mAb1 F6에 유리할 수 있다.

표 10

mAb1 투여 연구 결과

투여군 (1 mg/kg)	평균 혈청 (μ g/mL)	
	24시간	48시간
mAb1 F6 투여 1	3.24 ± 1.25*	1.60 ± 0.68*

<i>mAb1</i> 투여 1	9.60 ± 1.72	9.03 ± 1.51
<i>mAb1</i> F6 투여 23	$8.52 \pm 2.61^*$	$4.86 \pm 1.85^*$
<i>mAb1</i> 투여 23	40.07 ± 5.43	44.95 ± 7.58

[0224]

* *mAb1*과 비교하여 $p \leq 0.05$

[0225]

실시예 17: *mAb1* 및 *mAb1* F6을 이용한 요추골에서의 다중 용량 효능 연구

[0226]

이 실시예에서는, 골 표적화(*mAb1* F6) 대 비표적화 *mAb1*의 골 밀도 및 강도에 미치는 효과를 결정하기 위하여 불완전 골생성증의 동물 모델에서 다중 용량 효능 연구를 수행하였다.

[0227]

8주 동안 G610C 마우스에 *mAb1* 및 *mAb1* F6을 0.3, 1, 및 5 mg/kg으로 매주 3회 복강 내 투여하였다. 최종 투여 후, 마우스를 부검하고 6번째 요추골을 μ CT를 통해 영상화하여 총 부피에 대한 골 부피(BV/TV)를 결정하고, 생체역학적 시험을 하여 기능 상실까지의 최대 힘(골 강도)을 확인하였다.

[0228]

결과를 도 20 및 도 21에 나타내었다. 13C4 처리 G610C 마우스와 비교하여 두 처리군의 경우 1 및 5 mg/kg에서 BV/TV(%)의 유의미한 변화가 관찰되었다. 13C4 처리 G610C 마우스와 비교하여 기능 상실까지의 최대 힘의 유의미한 변화가 *mAb1* F6의 경우 1 및 5 mg/kg에서, *mAb1*의 경우 1 mg/kg에서만 관찰되었다. 항체 대조군으로 처리한 G610C 마우스(13C4)는 WT 배경 주와 비교하여 BV/TV 및 기능 상실까지의 최대 힘 둘 다의 유의미한 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 매주 3회 투약의 이 계획에서 두 처리군이 G610C 마우스에서 BV/TV 및 기능 상실까지의 최대 힘의 비슷한 용량 관련 변화를 유도함을 증명한다. 5 mg/kg에서의 마우스 코호트의 절반이 1 mg/kg 또는 5 mg/kg의 *mAb1*로 처리한 마우스에서보다 실질적으로 더 높은 기능 상실까지의 최대 힘 값(40뉴턴 이상)을 나타내었으므로, 골 강도에 미치는 *mAb1* F6의 증진된 효능에 대한 경향은 존재하였다.

[0229]

실시예 18: *mAb1* 및 *mAb1* F6을 이용한 요추골에서의 투여 빈도 연구

[0230]

이 실시예에서, 골 표적화된 항체의 최적 효과를 달성하기 위한 *mAb1* F6 투여의 적절한 빈도를 결정하기 위하여 불완전 골생성증의 동물 모델에서 투여 빈도 연구를 수행하였다.

[0231]

12주 동안 5 mg/kg으로 *mAb1* 및 *mAb1* F6을 다양한 빈도로(매주 3회, 매주 1회, 2주마다 1회, 또는 4주마다 1회) G610C 마우스에 복강 내 투여하였다. *mAb1* 및 *mAb1* F6에 대한 피크 및 트로프 값을 확인하기 위하여 연구의 시작 및 종료 시에 약물동역학(PK) 혈청 샘플을 채취하였다. 최종 투여 후, 마우스를 부검하고 6번째 요추골을 μ CT를 통해 영상화하여 총 부피에 대한 골 부피(BV/TV)를 결정하고, 생체역학적 시험을 하여 기능 상실까지의 최대 힘(골 강도)을 확인하였다.

[0232]

결과를 도 22, 23 및 24에 나타내었다. *mAb1*의 경우 매주 3회, 매주 1회, 2주마다 1회, 및 4주마다 1회에서 13C4 처리된 G610C 마우스와 비교하여 BV/TV(%)의 유의미한 변화가 관찰되었다. *mAb1* F6의 경우 매주 3회 및 매주 1회에서 13C4 처리된 G610C 마우스와 비교하여 BV/TV(%)의 유의미한 변화가 관찰되었다. *mAb1* 처리는 *mAb1* F6 처리와 비교하여 2주마다 1회 및 4주마다 1회 투여 빈도에서 유의미하게 더 높은 BV/TV를 나타내었다. *mAb1*의 경우 매주 3회, 매주 1회 및 2주마다 1회에서 13C4 처리된 G610C 마우스와 비교하여 기능 상실까지의 최대 힘의 유의미한 변화가 관찰되었다. *mAb1* F6의 경우 매주 3회 및 매주 1회에서 13C4 처리된 G610C 마우스와 비교하여 기능 상실까지의 최대 힘의 유의미한 변화가 관찰되었다. 대조군 항체로 처리한 G610C 마우스(13C4)는 WT 배경 주와 비교하여 BV/TV의 유의미한 감소 및 더 작은 기능 상실까지의 최대 힘의 경향을 나타내었다.

[0233]

이러한 결과는 *mAb1*과 *mAb1* F6 둘 다 G610C 마우스에서 BV/TV의 유사한 최대 효과 및 기능 상실까지의 최대 힘을 유도할 수 있음을 증명한다. *mAb1*은 *mAb1* F6과 비교하여 효능의 지속성 측면에서 장점이 있는 것으로 보이며, BV/TV의 경우 4주마다 1회 투여될 때 그리고 기능 상실까지의 최대 힘의 경우 2주마다 1회 투여될 때 유의미한 효능을 유지한다. 그러나 동등하게 효과적인 투여 계획(*mAb1*, 2주마다 1회 및 *mAb1* F6, 매주 1회)에서 PK 혈청 샘플 평균은 *mAb1* 및 *mAb1* F6 각각의 경우 대략 38 μ g/mL 및 8 μ g/mL을 나타냈다. 이는 혈청 노출이 *mAb1* F6의 경우 더 적을 수 있으며, 이는 OI 환자에게 안전성의 장점을 제공할 수 있음을 시사한다.

[0234]

실시예 19: *mAb1* F16을 이용한 요추골에서의 투여 빈도 연구

[0235]

이 실시예에서, 골 밀도에 대한 최적의 영향력을 달성하기 위한 *mAb1* F16 투여의 적절한 빈도를 결정하기 위하여 불완전 골생성증의 동물 모델에서 투여 빈도 연구를 수행하였다.

[0236]

8주 동안 G610C 마우스에 *mAb1* 및 *mAb1* F16을 5 mg/kg으로 매주 3회 복강 내 투여하였다. 최종 투여 후, 마우스

를 부검하고 6번째 요추골을 μ CT를 통해 영상화하여 총 부피에 대한 골 부피(BV/TV)를 결정하였다.

[0237] 결과를 도 25에 나타내었다. 13C4 처리 G610C 마우스와 비교하여 mAb1 및 mAb F16의 경우 5 mg/kg에서 BV/TV(%)의 유의미한 변화가 관찰되었다. 대조군 항체로 처리한 G610C 마우스(13C4)는 WT 배경 주와 비교하여 BV/TV의 유의미한 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 mAb1 및 mAb F16 둘 다 이 투여 계획 하에 G610C 마우스에서 유사한 투여 관련 BV/TV의 변화를 유도함을 증명한다.

[0238] **실시예 20: mAb1 F11을 이용한 골에서의 투여 빈도 연구**

[0239] 이 실시예에서, 골 밀도에 대한 최적의 영향력을 달성하기 위한 mAb1 F11 투여의 적절한 빈도를 결정하기 위하여 야생형 마우스에서 투여 빈도 연구를 수행하였다.

[0240] 11주 동안 야생형 마우스에 mAb1 및 mAb1 F11을 5 mg/kg으로 매주 3회 복강 내 투여하였다. 연구의 생전 부분 중 여러 생체 내 μ CT 시점을 선택하였다. 투여 후 9주차에서만 총 부피에 대한 골 부피(BV/TV%)에 대한 데이터를 나타내었다.

[0241] 결과를 도 26에 나타내었다. 13C4 처리 야생형 마우스와 비교하여 두 처리군의 경우 5 mg/kg에서 BV/TV(%)의 유의미한 변화가 관찰되었다. 이러한 결과는 mAb1 및 mAb F11 둘 다 이 투여 계획에서 야생형 마우스에서 유사한 투여 관련 BV/TV의 변화를 유도함을 증명한다.

[0242] **실시예 21: 마우스에서 마우스 및 인간 골 표적화 항-TGF β 항체 mAb1 F6 및 mAb2 F6의 생물 분포**

[0243] 이 실시예에서는, 야생형 마우스에서 형광 라벨링된 mAb1, mAb1 F6, mAb2, 및 mAb2 D10(mAb2의 중쇄 C 말단에 접합된 D10; mAb2 F6)의 생물 분포를 비교하기 위하여 연구를 수행하였다. 각 시험 항목 및 비히클의 단일 복강 내 용량을 마우스에 투여하였고, 조직 수집을 위하여 다양한 시점에서 마우스를 안락사시켰다. 채취한 다른 조직 중에서도(데이터 미도시), 요추, 심장, 간, 및 장을 mAb1 및 mAb1 F6 투여 1일, 4일, 10일, 20일, 43일 및 98일 후에 수집하였다. 24시간 및 96시간째에 mAb2 및 mAb2 D10을 투여한 후 조직을 또한 샘플링하였다.

[0244] 결과를 도 27 내지 33에 나타내었다. 도 27 내지 30은 투여 후 1 내지 98일에서의, mAb1, mAb1 F6, 또는 비히클을 투여한 마우스로부터의 조직에서의 총 복사 효율(TRE)을 보여준다. 요추는 mAb1와 비교하여 mAb1 F6의 강력하고 지속적인 존재를 보여주며, 모든 시점에서 유의미하게 높은 총 복사 효율(TRE)을 나타낸다. 심장 및 간에서, mAb1 F6은 mAb1에 비해 훨씬 더 낮은 TRE를 나타낸다. 마지막으로, 장에서는 비히클 및 시험 항목 사이에 어떠한 유의미한 차이도 관찰되지 않았다.

[0245] 이러한 결과는 mAb1 F6이 역으로 다른 조직(예컨대, 심장 및 간)에서는 더 낮은 노출을 초래하는 높은 골 친화도를 특징으로 함을 증명한다. 이 결과는 또한, 전신적인 TGF- β 억제를 제한하며 부작용을 감소시키면서, 골에서 TGF- β 억제 부위를 표적화하는 안전성의 장점을 나타낸다. 장에서 비히클에 대한 임의의 TRE의 결여는 형광단이 각각의 항체에 대한 그것의 라벨링을 유지하였음을 증명한다. 이전의 데이터는 형광단이 항체에 대하여 라벨을 유지하지 않았을 경우, 장에서 검출됨을 보여주었다.

[0246] 도 31 내지 33은 mAb2 또는 mAb2 D10을 투여한 마우스로부터의 조직에서의 TRE를 보여준다. 도 31은 mAb2와 비교하여 mAb2 D10의 높은 골 친화도를 증명한다. 중요하게도, mAb2와 비교하여 mAb2 D10의 경우 더 높은 TRE가 대퇴골에서 관찰된다. 동일한 전반적인 경향은 요추에서 관찰되었다. 또한, mAb2 D10 투여 마우스에서의 요추/혈청 및 대퇴골/혈청 비율은 mAb2 투여 마우스에서의 요추/혈청 및 대퇴골/혈청 비율과 비교하여 mAb2 D10의 골 표적화 능력을 강력하게 뒷받침한다(도 32 및 도 33).

[0247]

[0248] 본 발명을 상세하게 그리고 이의 특정 구현예를 참고로 하여 기술하였지만, 첨부된 청구범위에 정의된 본 발명의 범주로부터 벗어나지 않고서 변형 및 변화가 가능함이 명백하다. 더 구체적으로, 본 명세서에서 본 발명의 일부 양태가 특히 유리한 것으로 확인되지만, 본 발명은 본 발명의 이러한 특정 양태에 반드시 한정될 필요는 없다고 생각된다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기술된 값은 대안적으로 개시된 값으로부터 ± 10 , 20 또는 30% 만큼 양이 달라질 수 있으며, 고려된 본 발명의 범위 내에 있다.

[0249] 본 명세서에서 달리 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용되는 과학적 및 기술적 용어는 당업자가 일반적으로 이해하는 의미를 가질 것이다. 예시적인 방법 및 물질이 아래에 기술되지만, 본 명세서에 기술된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수도 있다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물 및 기타 참고문헌은 전문이 참조로 포함된다. 상충하는 경우에, 정의를 포함하는 본 명세서가 좌우할 것이

다. 다수의 문헌이 본 명세서에 인용되어 있지만, 이 인용 문헌은 이들 문헌 중 임의의 것이 당해 분야의 통상적인 지식의 일부를 형성한다는 인정을 구성하지는 않는다. 나아가, 문맥에 의해 달리 요구되지 않는 한, 단수형 용어는 복수형을 포함할 것이고, 복수형 용어는 단수형을 포함할 것이다. 일반적으로, 본 명세서에 기술된 세포 및 조직 배양, 분자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학, 분석 화학, 합성 유기 화학, 의약 및 약학 화학, 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화와 관련하여 사용되는 명명법 및 이의 기술은 당해 분야에서 주지되고 일반적으로 사용되는 것들이다. 효소 반응 및 정제 기술은 당해 분야에서 일반적으로 성취되는 바와 같거나 본 명세서에 설명된 바와 같이 제조사의 명세서에 따라 수행된다. 본 명세서 및 구현에 전반에 걸쳐, 단어 "가지다" 및 "포함하다", 또는 "갖다", "가지고 있는", "포함한다", 또는 "포함하는"과 같은 변형은 언급된 정수 또는 정수군을 포함하되, 임의의 기타 정수 또는 정수군을 배제하지 않는 것을 암시하는 것으로 이해될 것이다. 나아가, 단수형("a", "an", 및 "the")은 문맥에서 명백하게 달리 지시하지 않는 한, 복수의 언급 대상을 포함한다. 예를 들어, "항체"에 대한 언급은 1개 이상의 항체를 의미한다.

[0250] 본 발명을 기술하고 정의할 목적으로, 본 명세서에서 "실질적으로"라는 용어는 임의의 정량적 비교, 값, 측정, 또는 다른 묘사에 기인할 수 있는, 내재하는 불확실성의 정도를 나타내기 위하여 이용된다는 점을 주지하여야 한다. 본 명세서에서 "실질적으로"라는 용어는 또한, 정량적 묘사가 논쟁 중인 대상의 기본적인 기능을 변화시키지 않고서 진술된 언급 대상에서 벗어날 수 있는 정도를 나타내기 위하여 이용된다.

[0251] 본 명세서에 사용되는 용어 "약"은 주어진 양의 $\pm 10\%$ 를 지칭하지만, 문제의 양이 불가분의 대상, 예컨대, 아미노산을 지칭하거나 그 정체를 상실할 기타 대상이 세분될 때에는 "약"은 불가분의 대상의 ± 1 을 지칭한다. 예를 들어, 약 2% 물은 1.8% 내지 2.2% 물을 지칭하지만, 약 6개 아미노산 잔기는 5 내지 7개 아미노산 잔기를 지칭한다.

[0252] 본 명세서에 사용되는 용어 "또는" 및 "및/또는"은 서로 조합되거나 서로를 제외하는 다수의 성분들을 기술하는데 사용된다. 예를 들어, "x, y, 및/또는 z"는 "x" 단독, "y" 단독, "z" 단독, "x, y, 및 z", "(x 및 y) 또는 z", "x 또는 (y 및 z)", 또는 "x 또는 y 또는 z"를 지칭할 수 있다.

[0253] 명세서에서 지칭된 서열은 서열 목록뿐만 아니라 아래의 표 11에도 제공된다.

표 11

서열

D10 의 아미노산 서열(서열번호 1)	DDDDDDDDDD
mAb1 중쇄(WT HC)의 아미노산 서열(서열 번호 2)	HVQLQQSGPELVIRPGASVKLSCKASGYIFITYWMNWKQRPGQGLEWIGQIFPASGSTNYNEMFEGKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGNALDAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQT KPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK
C 말단 D10 이 있는 mAb1 중쇄(HC-D10)의 아미노산 서열(서열 번호 3)	HVQLQQSGPELVIRPGASVKLSCKASGYIFITYWMNWKQRPGQGLEWIGQIFPASGSTNYNEMFEGKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGNALDAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQT KPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGKDDDDDDDDDD
N 말단 D10 이 있는 mAb1 중쇄(D10-HC)의 아미노산 서열(서열 번호 4)	DDDDDDDDDDHVQLQQSGPELVIRPGASVKLSCKASGYIFITYWMNWKQRPGQGLEWIGQIFPASGSTNYNEMFEGKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGNALDAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQT KPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK
N 말단 및 C 말단 D10 이 있는 mAb1 중쇄(D10-HC-D10)의 아미노산 서열	DDDDDDDDDDHVQLQQSGPELVIRPGASVKLSCKASGYIFITYWMNWKQRPGQGLEWIGQIFPASGSTNYNEMFEGKATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGNALDAMDYWGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTLGCLVKG

[0254]

(서열 번호 5)	YFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPS STWPSQTVTCNVAHPASSTKVDDKIVPRDCGCKPCICTVPE VSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVWDISKDDPEVQFSWFV DDVEVHTAQTKPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEF KCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD KVS LTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDG SYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSL HSPGKDDDDDDDDDD
mAb1 경쇄(WT LC)의 아미노산 서열 (서열 번호 6)	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNSFMHWYQ QKSGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVE ADDAATYYCQNNEDPLTFGAGTKLELKRADAAPTVISIFPP SSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLN SWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTDEYERHNSYTCEATHKTST SPIVKSFNNEC
N 말단 D10 이 있는 mAb1 경쇄(D10-LC)의 아미노산 서열 (서열 번호 7)	DDDDDDDDDDNIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDS YGNSFMHWYQKQSGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGS RTDFTLTIDPVEADDAATYYCQNNEDPLTFGAGTKLELKR ADAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKID GSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTDEYERHNS YTCEATHKTSTSPIVKSFNNEC
C 말단 D10 이 있는 mAb1 경쇄(LC-D10)의 아미노산 서열 (서열 번호 8)	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNSFMHWYQ QKSGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVE ADDAATYYCQNNEDPLTFGAGTKLELKRADAAPTVISIFPP SSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLN SWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTDEYERHNSYTCEATHKTST SPIVKSFNNECDDDDDDDDDD
1X 펩티드 링커(G4S)의 아미노산 서열 (서열 번호 9)	GGGG
2X 펩티드 링커 ((G4S)x2)의 아미노산 서열 (서열 번호 10)	GGGGSGGGGS
1X 링커 및 C 말단 D10 이 있는 mAb1 경쇄(LC-G4S- D10)의 아미노산 서열 (서열 번호 11)	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNSFMHWYQ QKSGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVE ADDAATYYCQNNEDPLTFGAGTKLELKRADAAPTVISIFPP SSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLN SWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTDEYERHNSYTCEATHKTST SPIVKSFNNECGGGGSDDDDDDDDD
2X 링커 및 C 말단 D10 이 있는 mAb1 경쇄(LC- (G4S) ₂ -D10)의 아미노산 서열 (서열 번호 12)	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGNSFMHWYQ QKSGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVE ADDAATYYCQNNEDPLTFGAGTKLELKRADAAPTVISIFPP SSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLN SWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTDEYERHNSYTCEATHKTST SPIVKSFNNECGGGGSGGGGSDDDDDDDDD
mAb2 중쇄 WT(WT HC)의 아미노산 서열 (서열 번호 13)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYTFSSNVISWVRQA PGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYME LSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGLTVTVSSAST KGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVTVPSSSLGKTYTCNV

[0255]

	HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVWVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
C 말단 D10 이 있는 mAb2 중쇄(HC-D10)의 아미노산 서열 (서열 번호 14)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFGKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTPSSSLGKTYTCNVDDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVWVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKDDDDDDDD
mAb2 경쇄 (WT(WT LC)의 아미노산 서열 (서열 번호 15)	ETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQYADSPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
N 말단 D10 이 있는 mAb2 중쇄(D10-HC)의 아미노산 서열 (서열 번호 16)	DDDDDDDDDDQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFGKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTPSSSLGKTYTCNVDDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
N 말단 D10 및 C 말단 D10 이 있는 mAb2 중쇄(D10-HC-D10)의 아미노산 서열 (서열 번호 17)	DDDDDDDDDDQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFGKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTPSSSLGKTYTCNVDDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKDDDDDDDDDD
N 말단 D10 이 있는 mAb2	DDDDDDDDDDQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFSSNVISWVRQAPGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFGKGRVTITADESTSTTYMELSSLRSEDTAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVWTPSSSLGKTYTCNVDDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGKDDDDDDDDDD

[0256]

경쇄(D10-LC)의 아미노산 서열 (서열 번호 18)	SSYLAWYQQKPGQAPRLIIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
C 말단 D10 이 있는 mAb2 경쇄(LC-D10)의 아미노산 서열 (서열 번호 19)	ETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKP GQAPRLIIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGECDDDDDDDDDD
N 말단 D10 및 C 말단 D10 이 있는 mAb2 경쇄(D10-LC-D10)의 아미노산 서열 (서열 번호 20)	DDDDDDDDDET VLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLG SSYLAWYQQKPGQAPRLIIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTD FTLTISRLEPEDFAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGECDDDDDDDDDD
1X 링커 및 C 말단 D10 이 있는 mAb2 경쇄(LC-G4S-D10)의 아미노산 서열 (서열 번호 21)	ETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKP GQAPRLIIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGECGGGGSDDDDDDDDD
2X 링커 및 C 말단 D10 이 있는 mAb2 경쇄(LC-(G4S)2-D10)의 아미노산 서열 (서열 번호 22)	ETVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKP GQAPRLIIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYADSPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGECGGGGSGGGGSDDDDDDDDD
mAb2 중쇄 WT(WT HC)의 핵산 서열 (서열 번호 23)	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA GCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGG ATACACCTTCAGTAGCAATGTTATCAGCTGGGTGCGCCA GGCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGGGGGGTCA TCCCTATTGTTGATATTGCGAACTACGCACAGAGATTCAA GGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACTAGTAC AACTTACATGGAGTTGAGCAGCCTGAGGTCTGAGGACAC GGCCGTGTATTACTGTGCGAGCACACTTGGTCTCGTCCT GGATGCTATGGACTACTGGGGTCAGGGTACGTTAGTGAC GGTCTCGAGTGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCC CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAG CCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC AGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGACAAAGAGAGTTGAGTCC AAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAG TTCCTGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAA CCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGA

[0257]

	GGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCA GGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCCGTCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACA CCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGGTGGACTCCGA CGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCTGGGGAATGA
N 말단 D10 이 있는 mAb2 중쇄(D10-HC)의 핵산 서열 (서열 번호 24)	GACGACGATGATGACGATGACGACGACGATCAGGTGCAG CTGGTGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCT CAGTAGCAATGTTATCAGCTGGGTGCGCCAGGCCCTGG ACAAGGGCTCGAGTGGATGGGGGGGGTTCATCCCTATTGT TGATATTGCGAACTACGCACAGAGATTCAAGGGCAGAGT CACGATTACCGCGGACGAATCCACTAGTACAACCTTACATG GAGTTGAGCAGCCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGTAT TACTGTGCGAGCACACTTGGTCTCGTCCCTGGATGCTATG GACTACTGGGGTCAGGGTACGTTAGTGACGGTCTCGAGT GCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCC TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGT GTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCGGTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCT CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA CGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTGACAAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTC CCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGG GACCATCAGTCTTCTGTTCCTCCCCCAAACCCAAGGACA CTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTC AACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGC CTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCCC ATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACA AGACCACGCCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCTGGGGAATGA
C 말단 D10 이 있는 mAb2	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA

[0258]

<p>중쇄(HC-D10)의 서열 (서열 번호 25)</p>	<p>GCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGG ATACACCTTCAGTAGCAATGTTATCAGCTGGGTGCGCCA GGCCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGGATGGGGGGGGTCA TCCCTATTGTTGATATTGCGAACTACGCACAGAGATTCAA GGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACTAGTAC AACTTACATGGAGTTGAGCAGCCTGAGGTCTGAGGACAC GGCCGTGTATTACTGTGCGAGCACACTTGGTCTCGTCCT GGATGCTATGGAATACTGGGGTCAGGGTACGTTAGTGAC GGTCTCGAGTGCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCC CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAG CCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAAC CGGTGACGGTGTCGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGTTGACCGTGCCCTCCAGC AGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCAC AAGCCCAGCAACACCAAGGTGCAACAAGAGAGTTGAGTCC AAATATGGTCCCCCATGCCACCATGCCAGCACCTGAG TTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAA CCCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTG ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGA GGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAG CACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCA GGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTC CAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACA CCCTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGAATCCGA CGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTAACCCTGGACAA GAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCTGGGGAAAGACGACGATGATGACGA TGACGACGACGATTGA</p>
<p>N 말단 D10 및 C 말단 D10 이 있는 mAb2 중쇄(D10-HC-D10)의 핵산 서열 (서열 번호 26)</p>	<p>GACGACGATGATGACGATGACGACGACGATCAGGTGCAG CTGGTGAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTG CTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTT CAGTAGCAATGTTATCAGCTGGGTGCGCCAGGCCCTGG ACAAGGGCTCGAGTGGATGGGGGGGGTTCATCCCTATTGT TGATATTGCGAACTACGCACAGAGATTCAAGGGCAGAGT CACGATTACCGCGGACGAATCCACTAGTACAACCTACATG GAGTTGAGCAGCCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTGTAT TACTGTGCGAGCACACTTGGTCTCGTCCTGGATGCTATG GACTACTGGGGTCAGGGTACGTTAGTGACGGTCTCGAGT GCTTCCACCAAGGGCCCATCCGTCTTCCCCCTGGCGCCC TGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGT GTCGTGGAATCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA CCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCT CAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCA</p>

[0259]

	CGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCA ACACCAAGGTCGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTC CCCCATGCCCACCATGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGG GACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACA CTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGG TGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTC AACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGT GTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTG AACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGC CTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAA GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCC ATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCTGAC CTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA AGACCACGCCTCCCGTGTCTGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGC AGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTGT CTCTGGGGAAAGACGACGATGATGACGATGACGACGACG ATTGA
mAb2 경쇄 WT(WT LC)의 핵산 서열 (서열 번호 27)	GAAACGGTACTCACGCAGTCTCCAGGTACCCTGTCTTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTCTTGGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTATCAGCAG AAACCTGGTCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCACCTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGC AGTGGGTCTGGTACCGACTTCACTCTCACCATCAGCCGA CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGT ATGCTGACTCACCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGAC TGGAGATTAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT CTTCCC GCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
N 말단 D10 이 있는 mAb2 경쇄(D10-LC)의 핵산 서열 (서열 번호 28)	GACGACGATGATGACGATGACGACGACGATGAAACGGTA CTCACGCAGTCTCCAGGTACCCTGTCTTTGTCTCCAGGG GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTCTT GGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGT CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGATCCAGCAGG GCACCTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCT GGTACCGACTTCACTCTCACCATCAGCCGACTGGAGCCT GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATGCTGACT CACCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA AACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGT GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTA CAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC

[0260]

	CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC CTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGA CTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCA TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAG GGGAGAGTGTTAG
C 말단 D10 이 있는 mAb2 경쇄(LC-D10)의 핵산 서열 (서열 번호 29)	GAAACGGTACTCACGCAGTCTCCAGGTACCCTGTCTTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTCTTGGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTATCAGCAG AAACCTGGTCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCACCTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGTACCGACTTCACTCTCACCATCAGCCGA CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGT ATGCTGACTCACCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGAC TGGAGATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT CTTCCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTGACGACGATGATGACGATGAC GACGACGATTAG
N 말단 D10 및 C 말단 D10 이 있는 mAb2 경쇄(D10-LC-D10)의 핵산 서열 (서열 번호 30)	GACGACGATGATGACGATGACGACGACGATGAAACGGTA CTCACGCAGTCTCCAGGTACCCTGTCTTTGTCTCCAGGG GAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAAGTCTT GGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGT CAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGG GCACCTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCT GGTACCGACTTCACTCTCACCATCAGCCGACTGGAGCCT GAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATGCTGACT CACCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATT AACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGT GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTA CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCC CAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC CTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGA CTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCA TCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAG GGGAGAGTGTGACGACGATGATGACGATGACGACGACG ATTAG
1X 링커 및 C 말단 D10 이 있는 mAb2 경쇄(LC-G4S- D10)의 핵산 서열 (서열 번호 31)	GAAACGGTACTCACGCAGTCTCCAGGTACCCTGTCTTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTCTTGGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTATCAGCAG AAACCTGGTCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCACCTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGTACCGACTTCACTCTCACCATCAGCCGA CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGT ATGCTGACTCACCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGAC TGGAGATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT

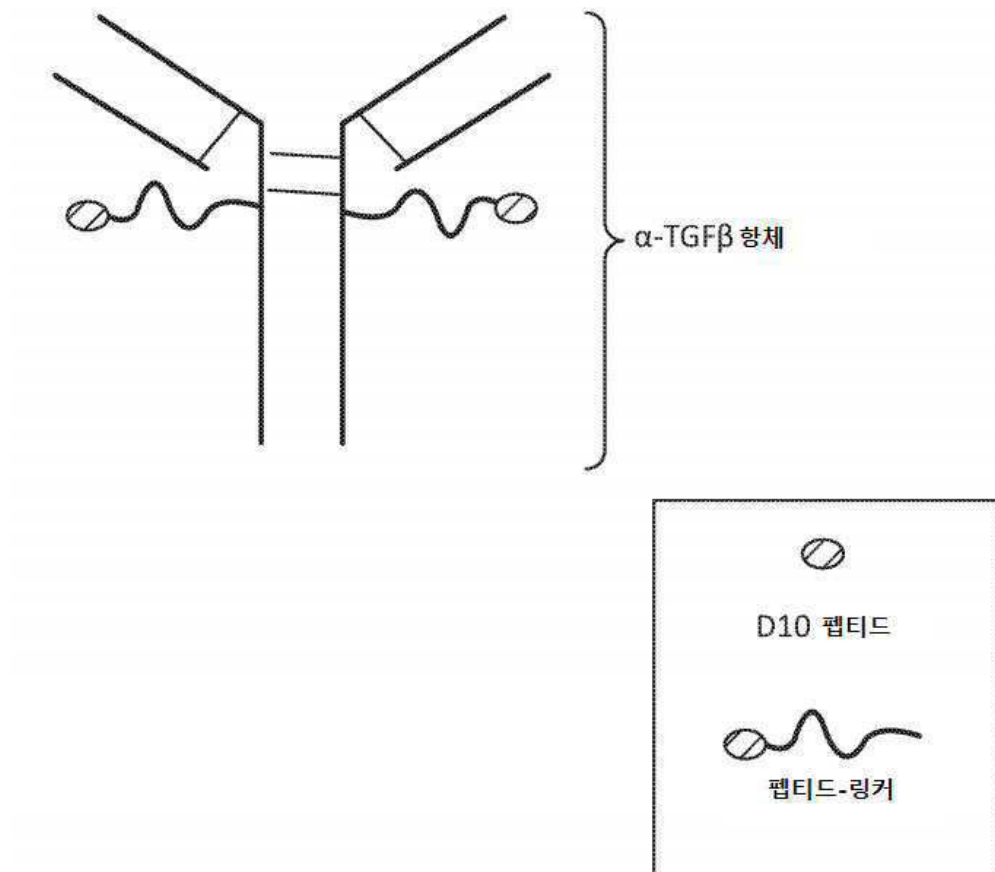
[0261]

	CTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTGGCGGAGGCGGCAGCGACGA CGATGATGACGATGACGACGACGATTAG
2X 링커 및 C 말단 D10 이 있는 mAb2 경쇄(LC- (G4S)2-D10)의 핵산 서열 (서열 번호 32)	GAAACGGTACTCACGCAGTCTCCAGGTACCCTGTCTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGT CAGAGTCTTGGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTATCAGCAG AAACCTGGTCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCA TCCAGCAGGGCACCTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGC AGTGGGTCTGGTACCGACTTCACTCTCACCATCAGCCGA CTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGT ATGCTGACTCACCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGAC TGGAGATTAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCAT CTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGC CTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAG GCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG GGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGC AAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAA GTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTGGCGGAGGCGGCAGCGGCGG AGGCGGCAGCGACGACGATGATGACGATGACGACGACG ATTAG
mAb2 HCDR1 (서열 번호 33)	SNVIS
mAb2 HCDR2 (서열 번호 34)	GVIPIVDIANYAQRFKG
mAb2 HCDR3 (서열 번호 35)	TLGLVLDAMDY
mAb2 LCDR1 (서열 번호 36)	RASQSLGSSYLA
mAb2 LCDR2 (서열 번호 37)	GASSRAP
mAb2 LCDR3 (서열 번호 38)	QQYADSPIT
mAb2 HCVD (서열 번호 39)	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFSSNVISWVRQA PGQGLEWMGGVPIVDIANYAQRFKGRVTITADESTSTTYME LSSLRSEDVAVYYCASTLGLVLDAMDYWGQGTLLTVSS
mAb2 LCVD (서열 번호 40)	ETVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLGSSYLAWYQQKP GQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYADSPITFGQGRLEIK

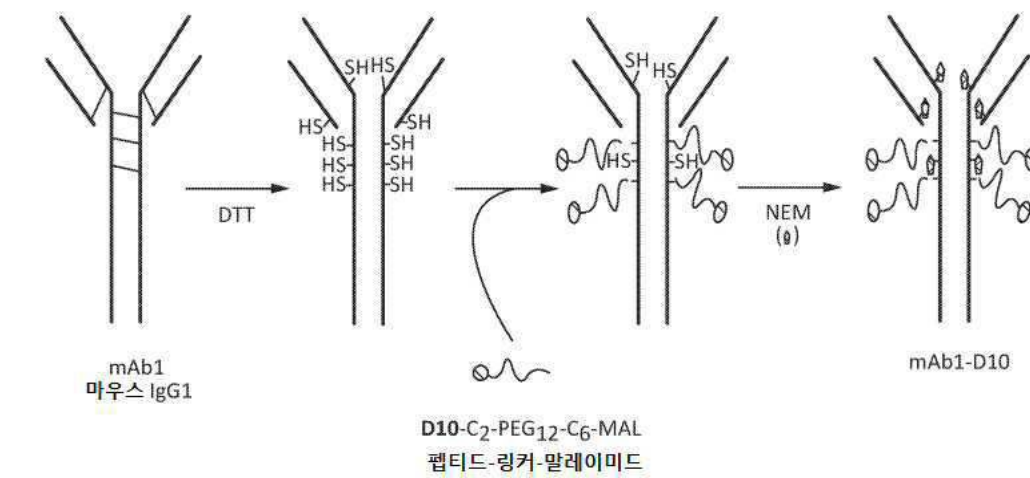
[0262]

도면

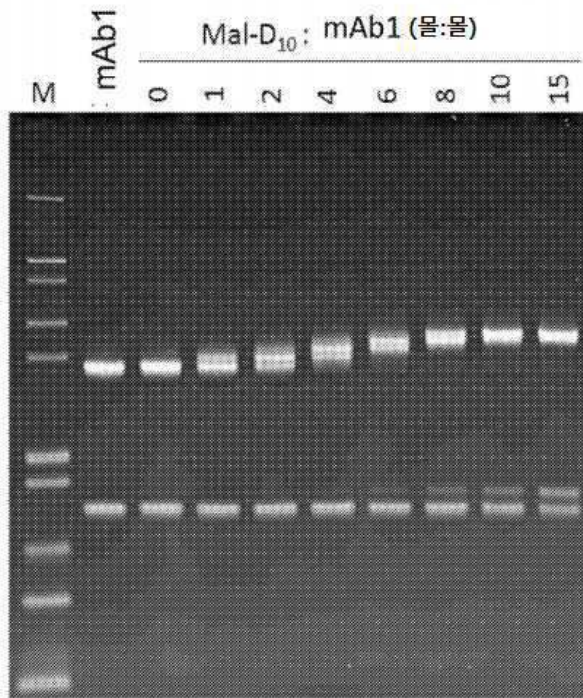
도면1



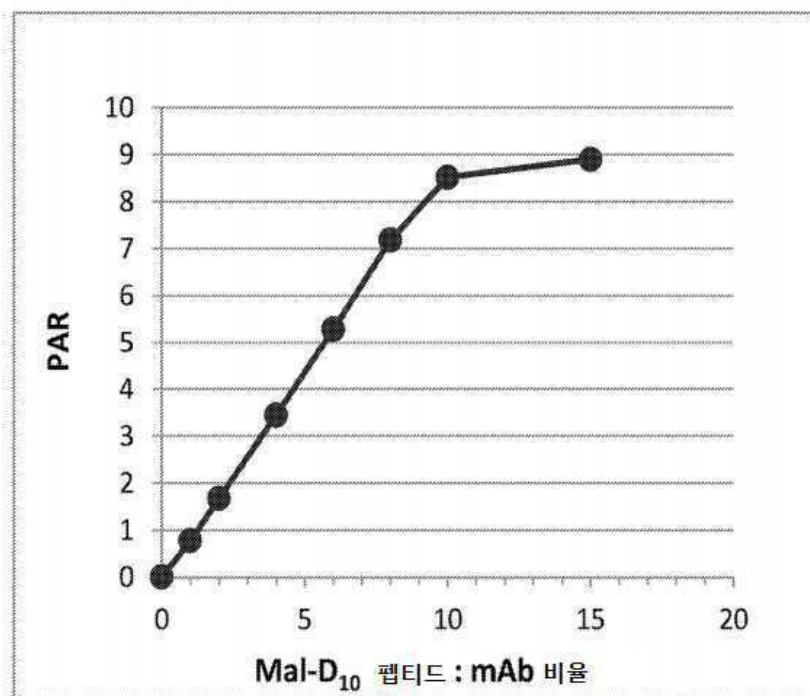
도면2



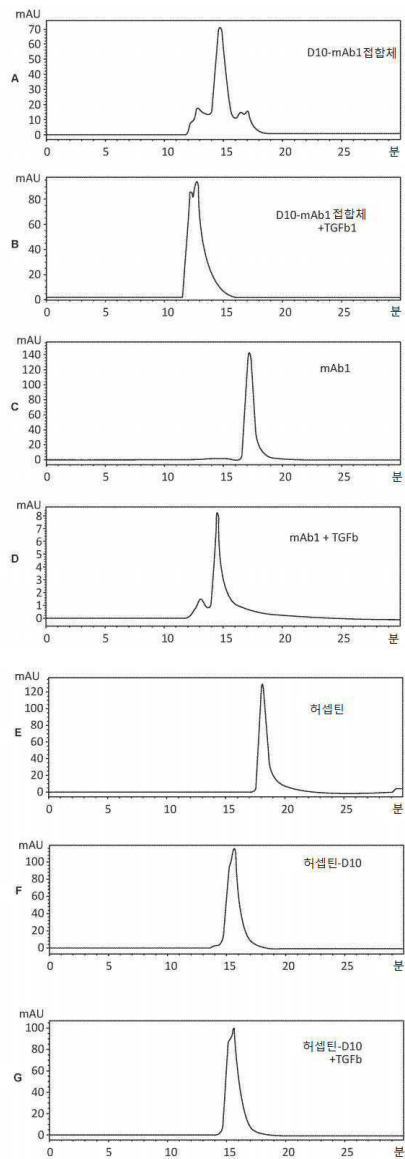
도면3a



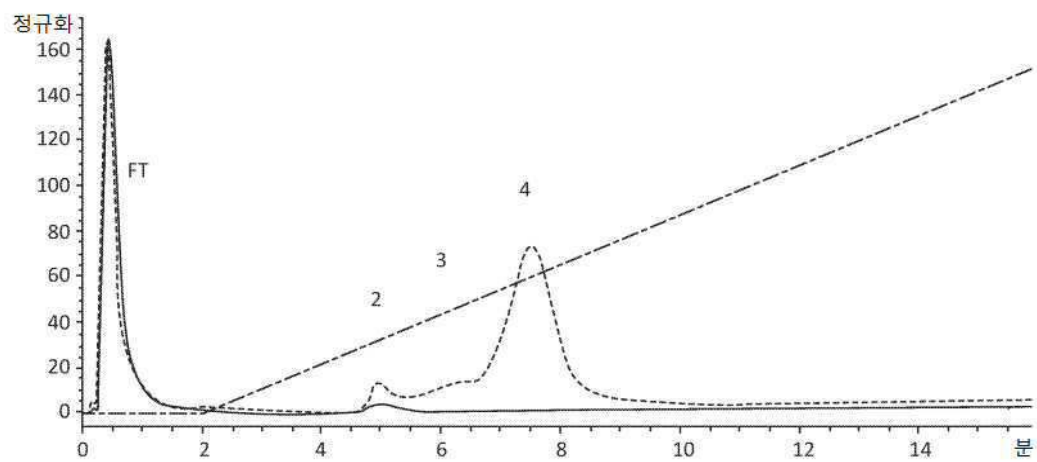
도면3b



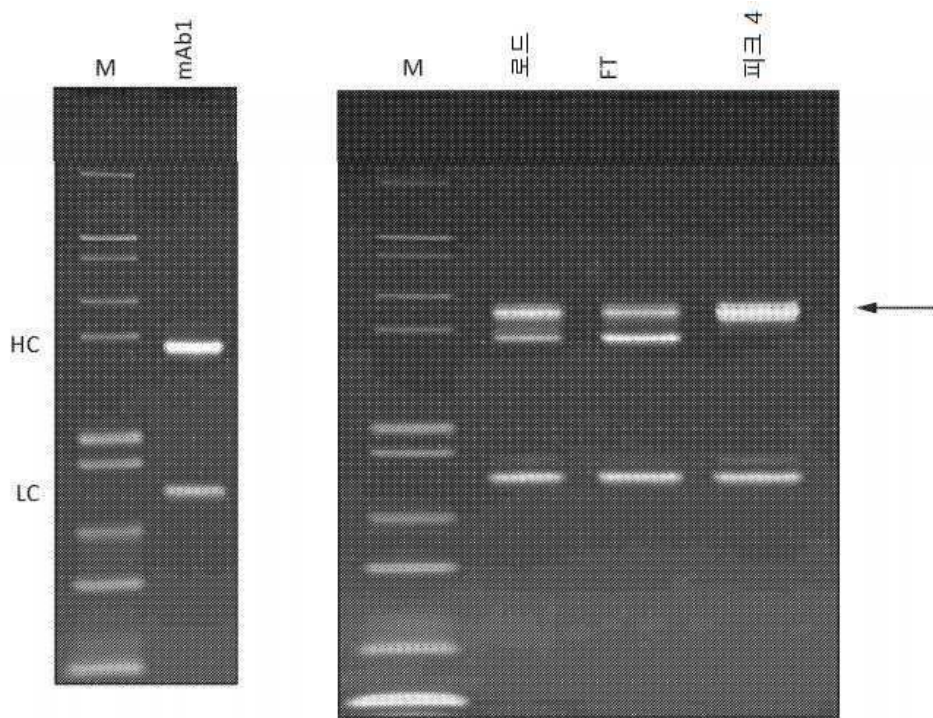
도면4



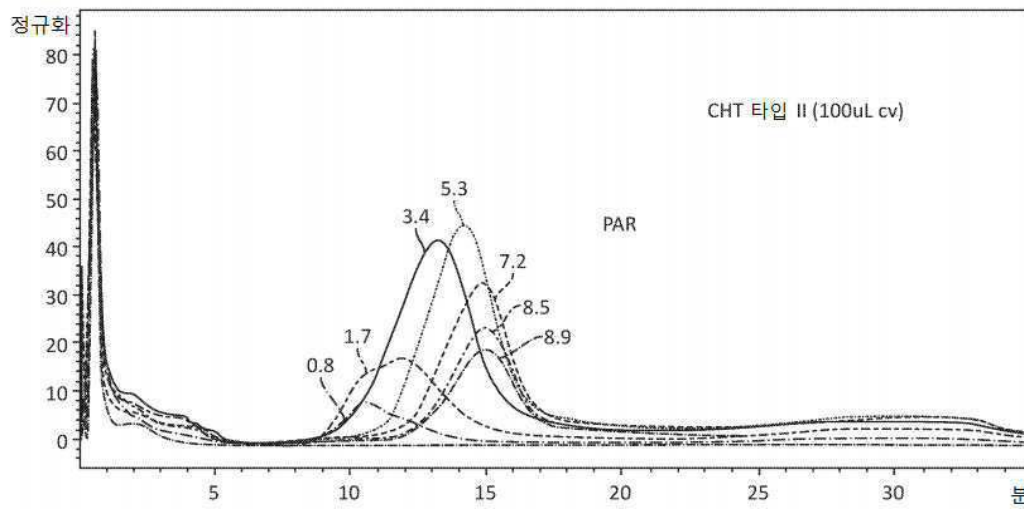
도면5a



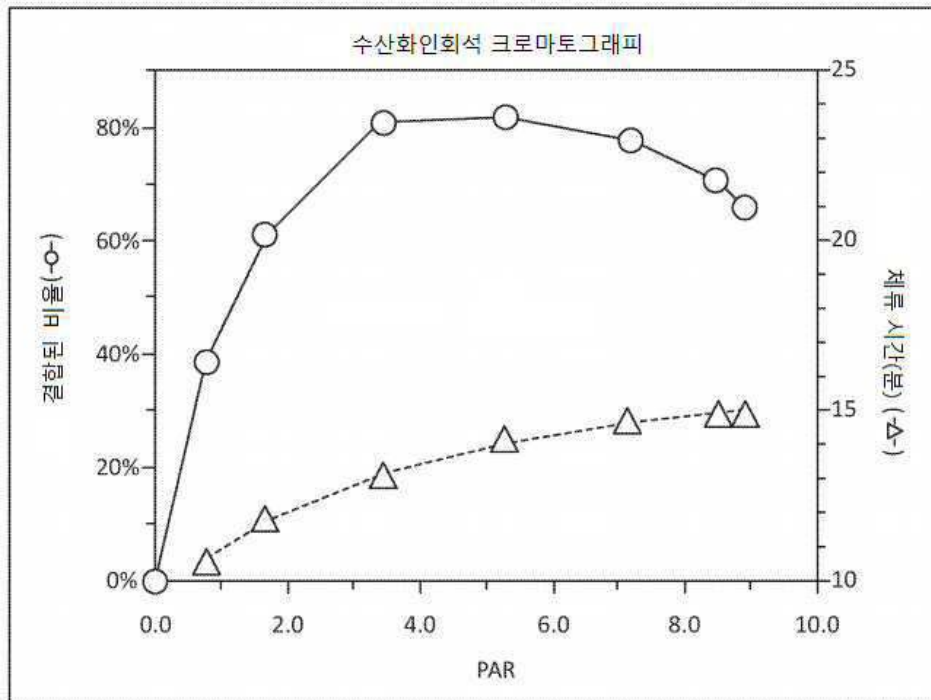
도면5b



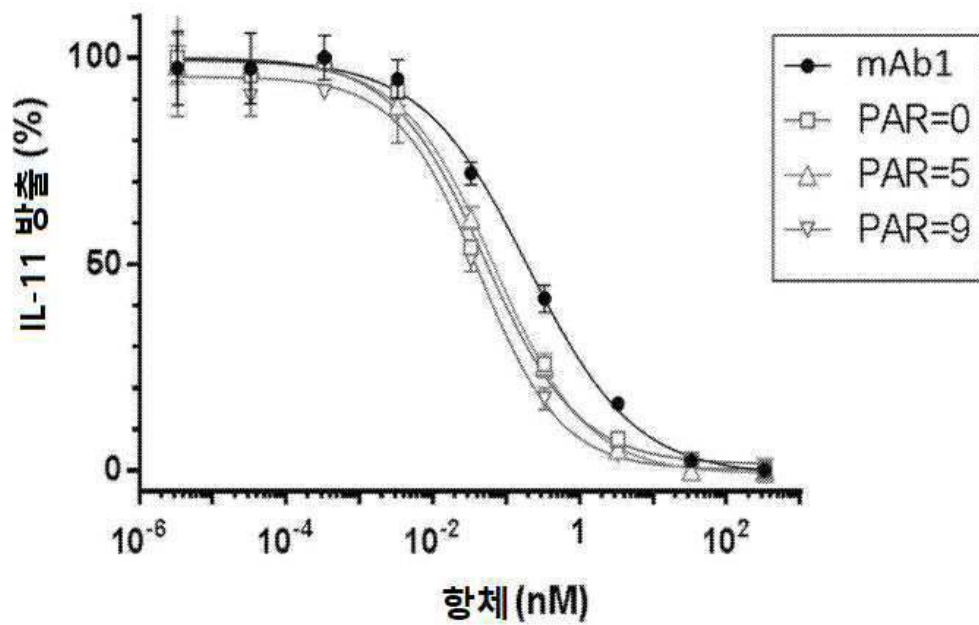
도면6a



도면6b

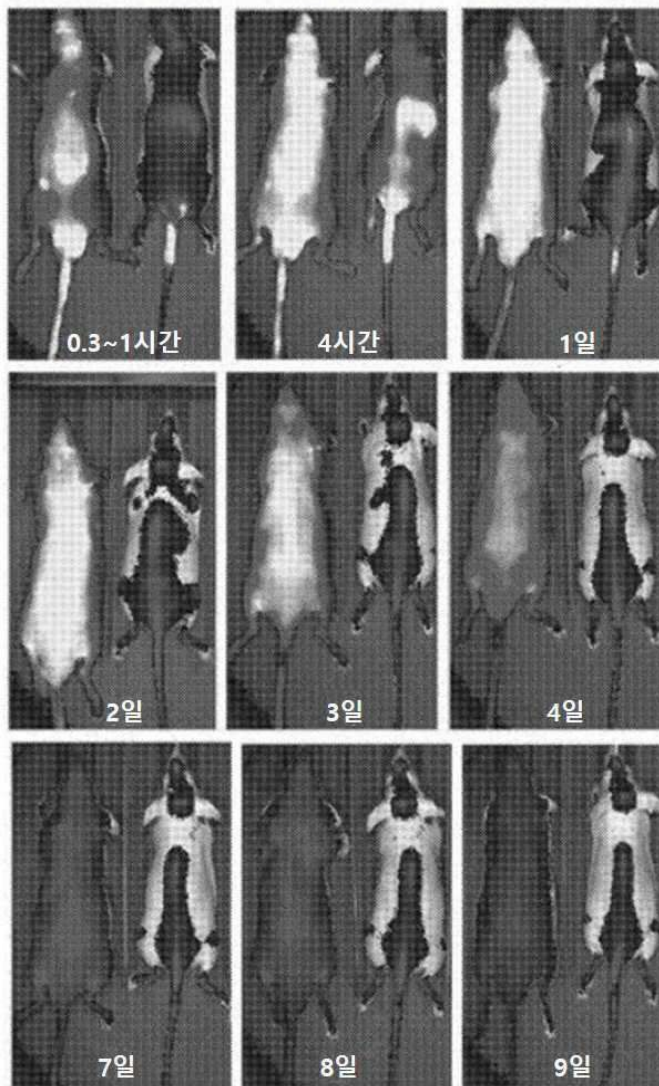


도면7

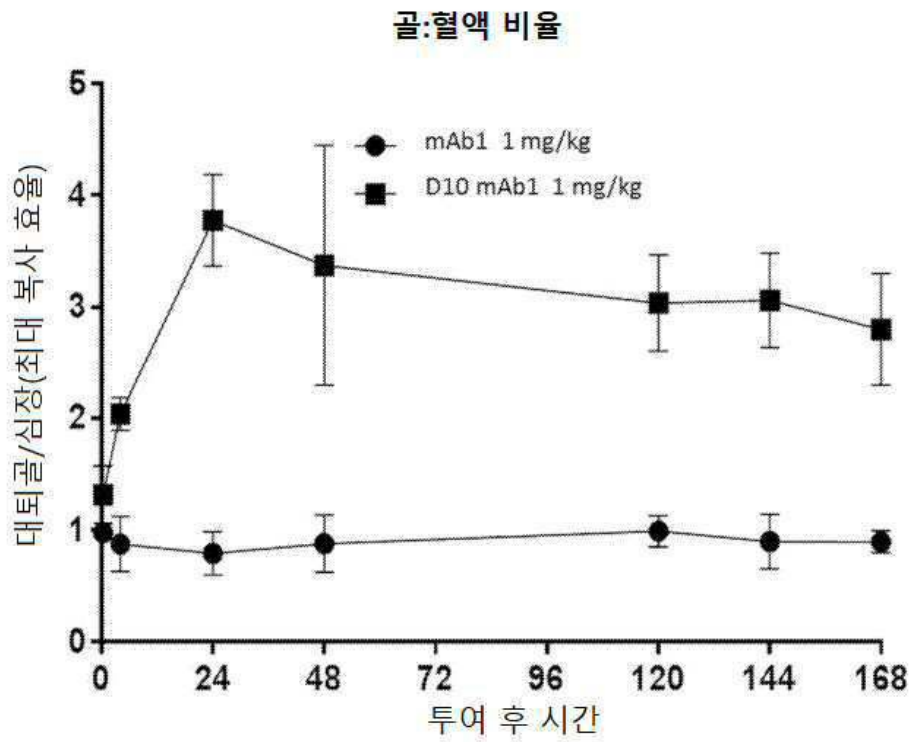


도면8a

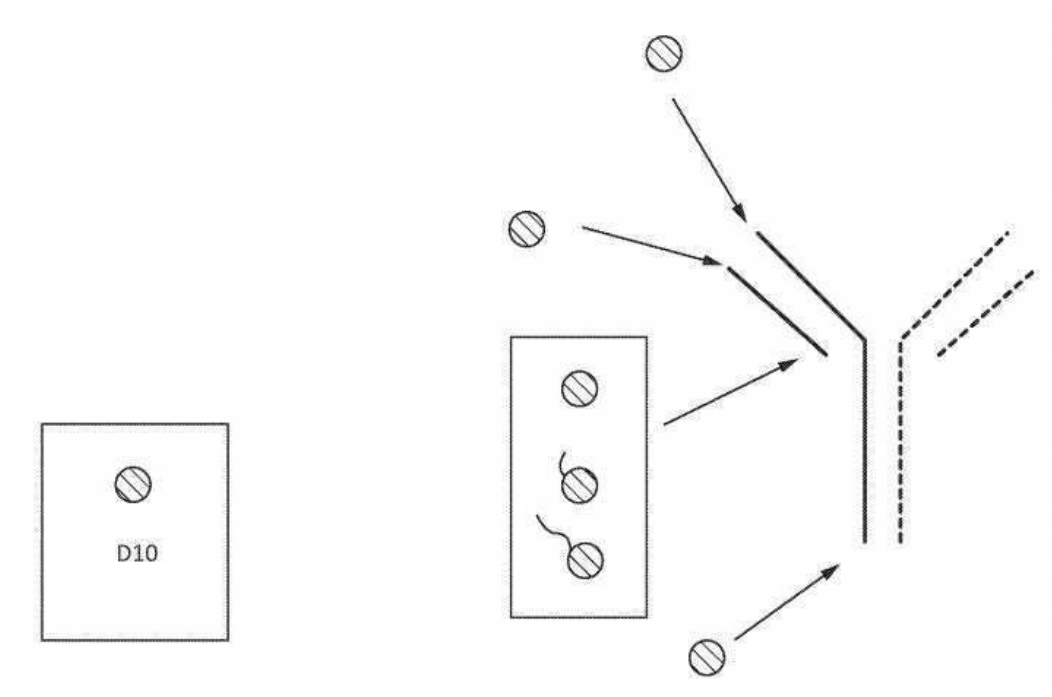
알렉사플루오르 750이 라벨링된 PAR 4.5, 1 mpk



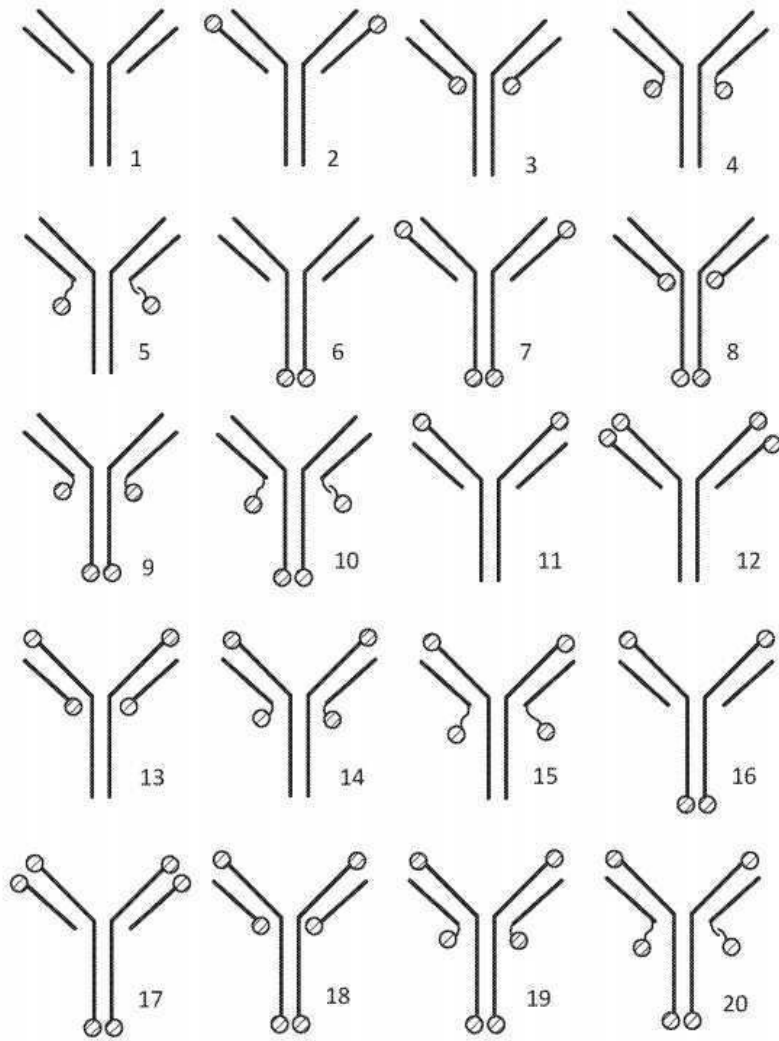
도면8b



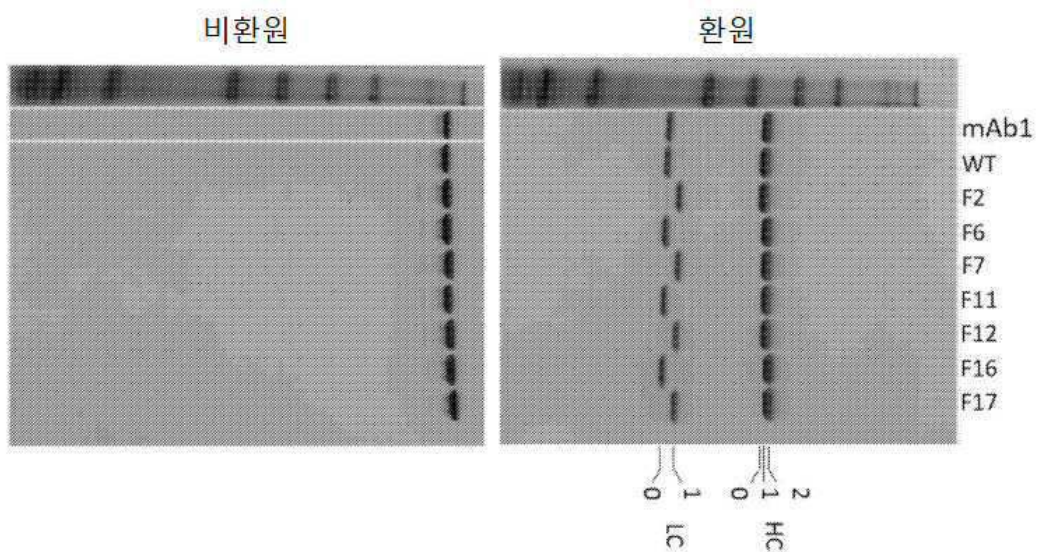
도면9a



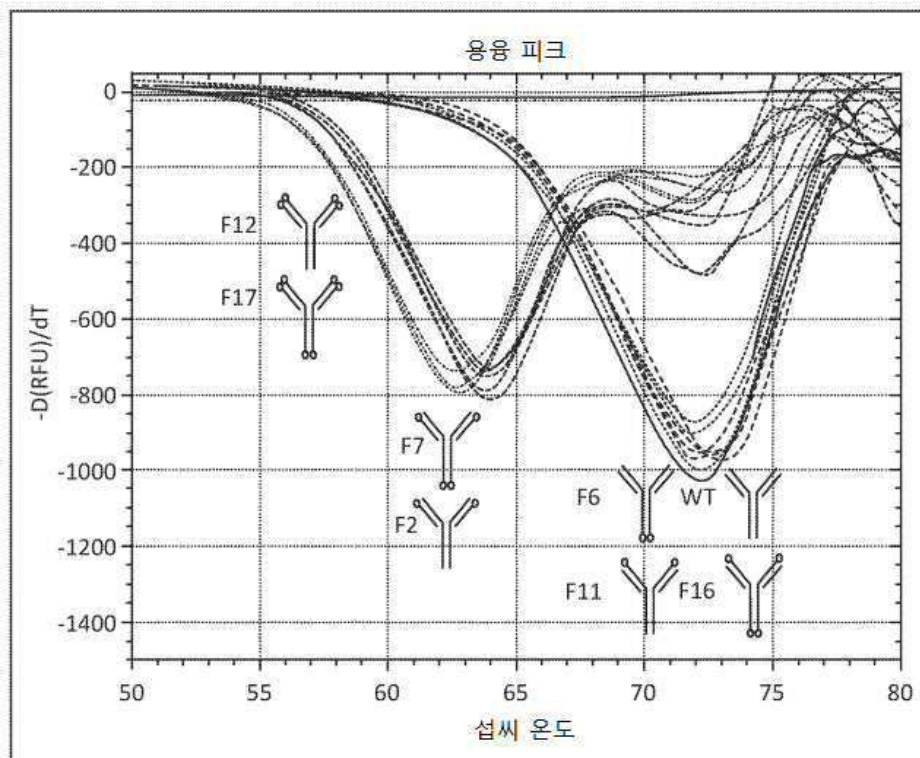
도면9b



도면10

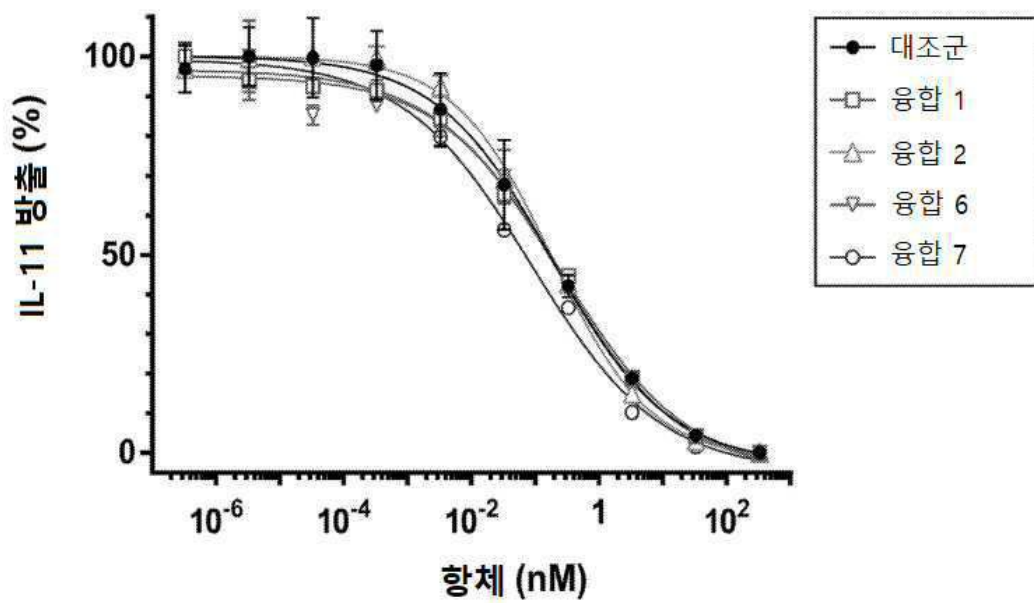


도면11

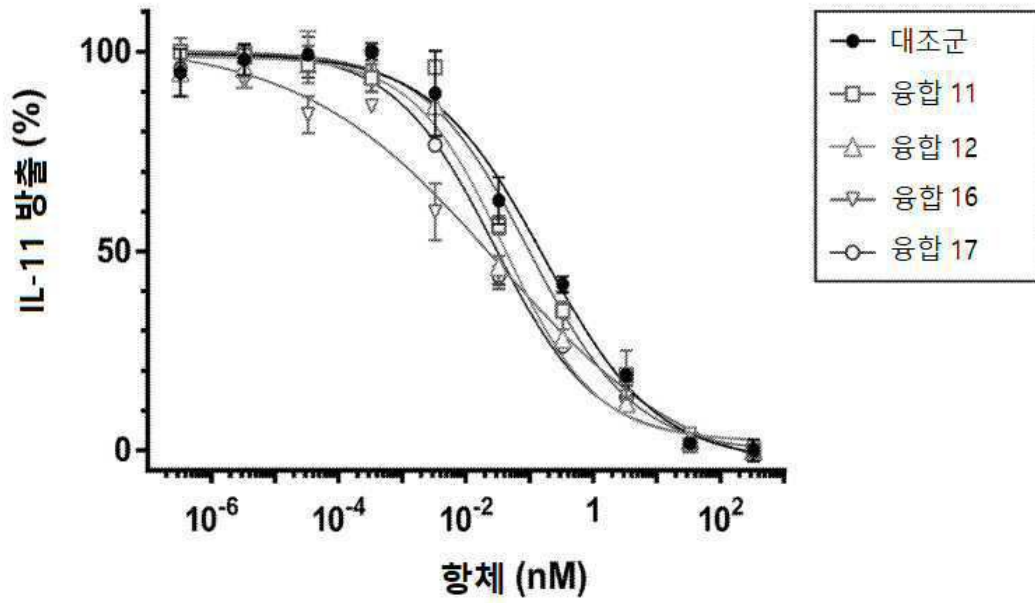


SyPRO 오렌지; 접합체(PAR 4.5)는 광범위한 T_m (65-72°C)을 보여주었다.

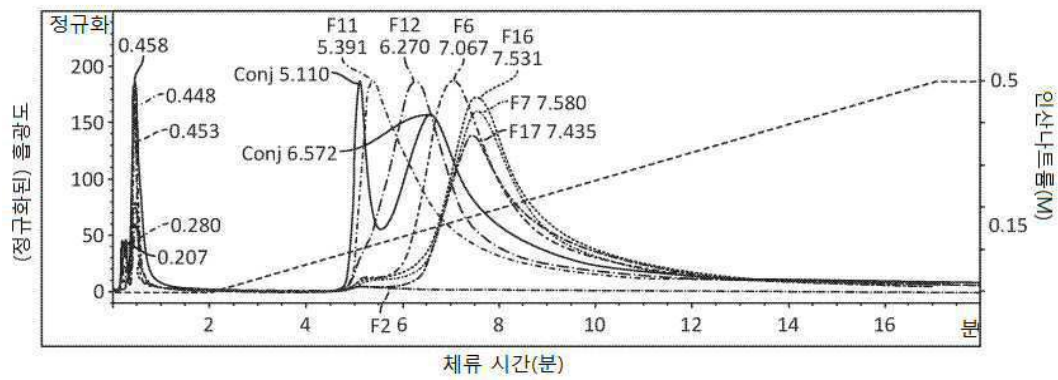
도면12a



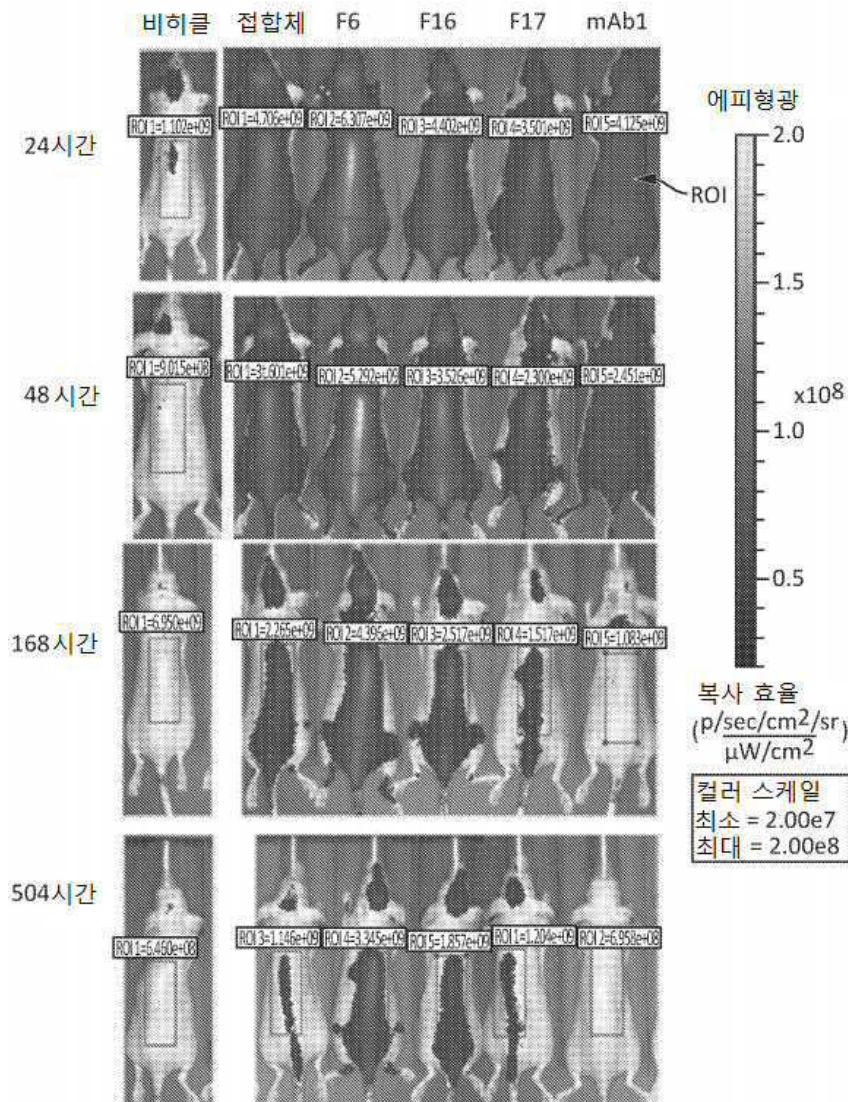
도면12b



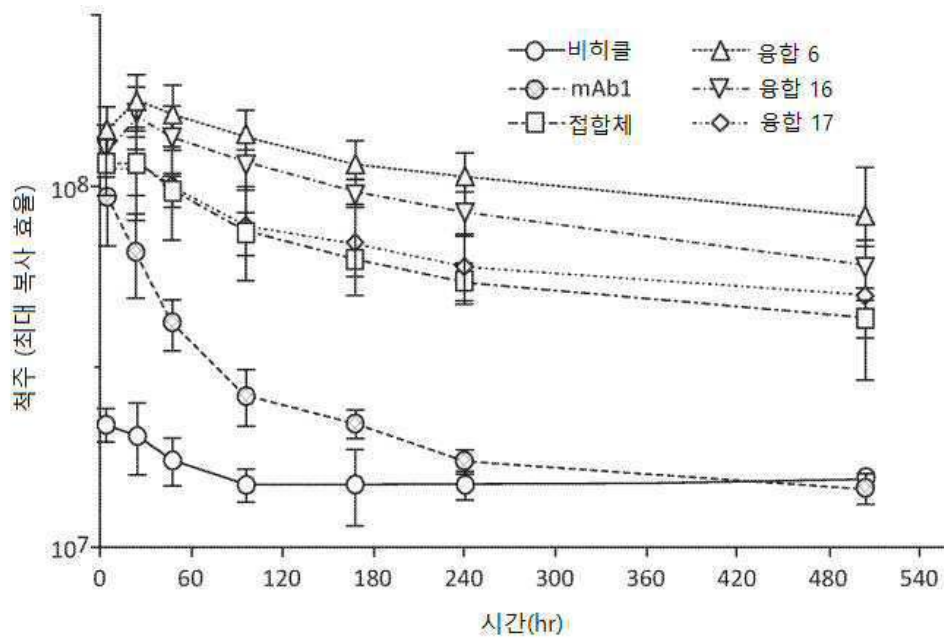
도면13



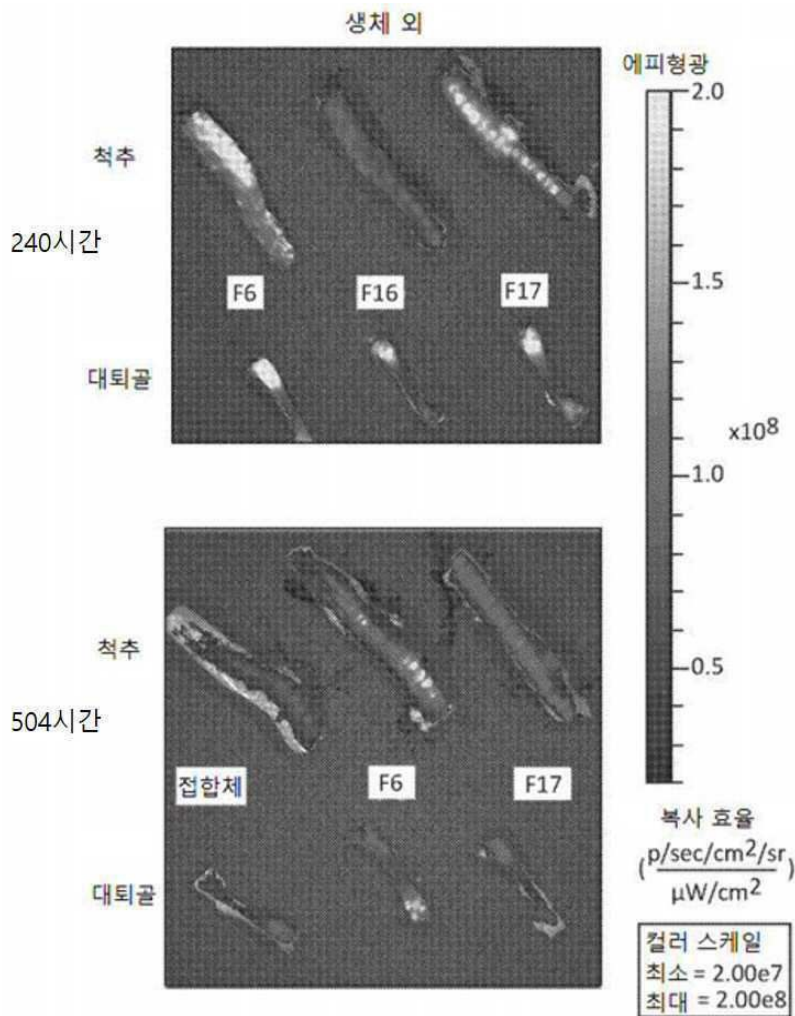
도면14



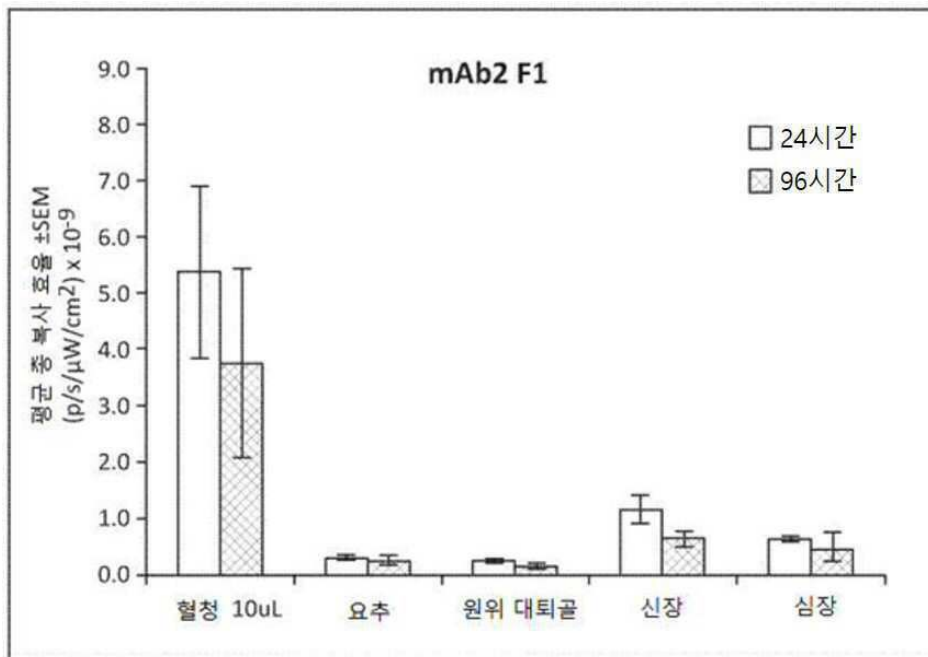
도면15



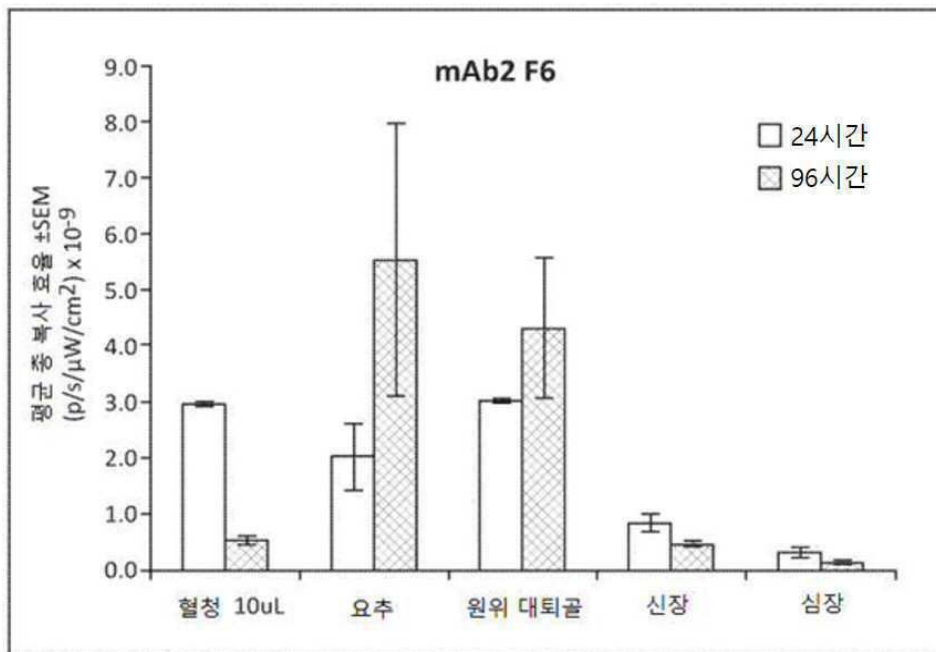
도면16



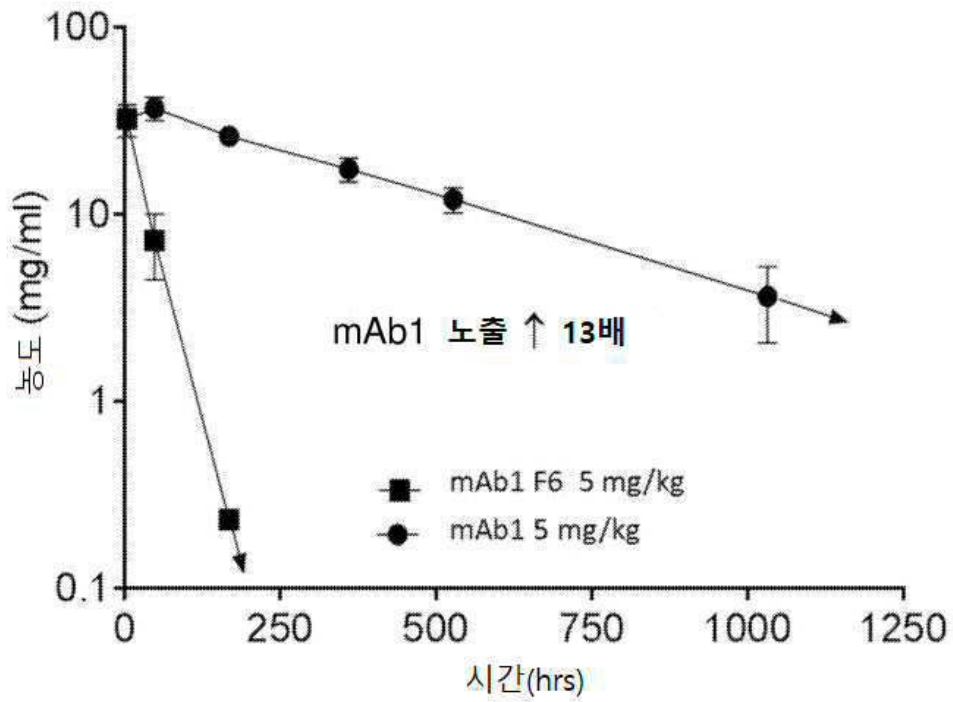
도면17a



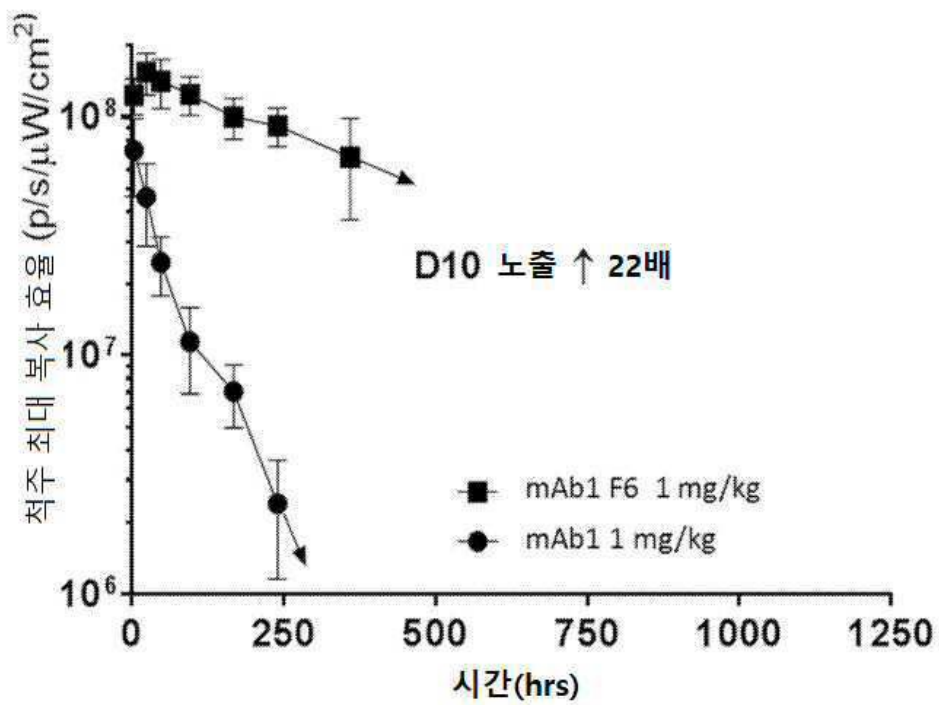
도면17b



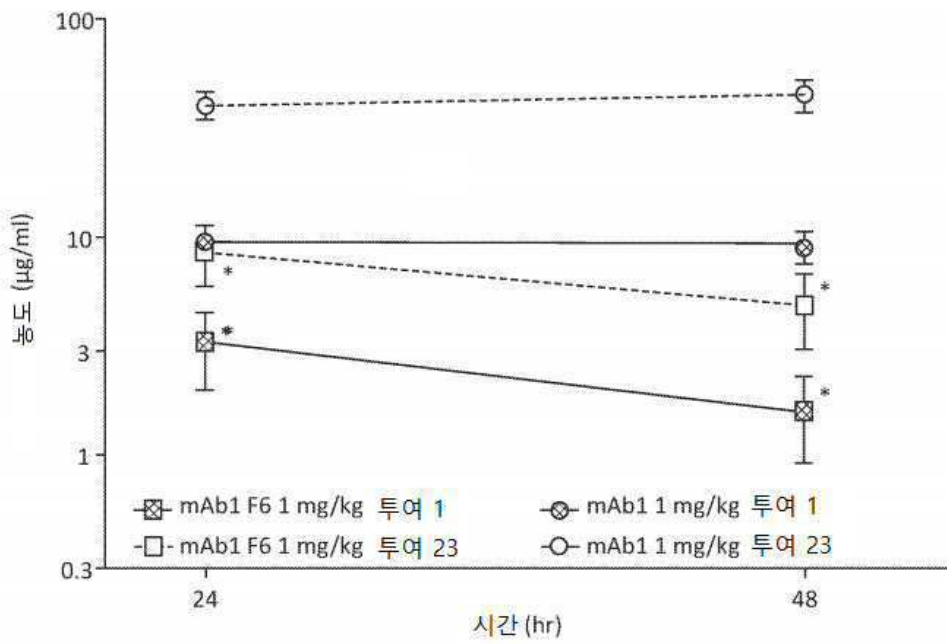
도면18a



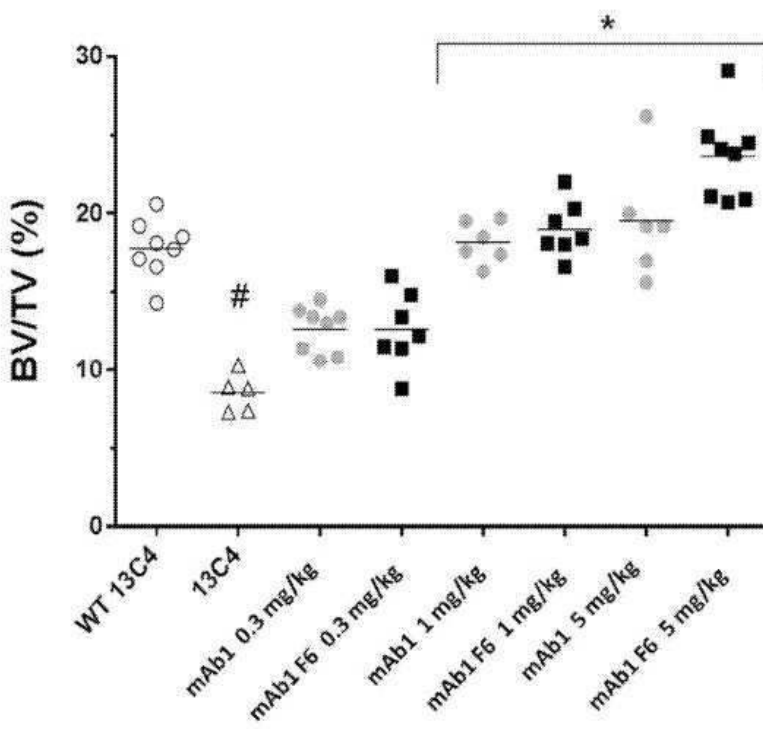
도면18b



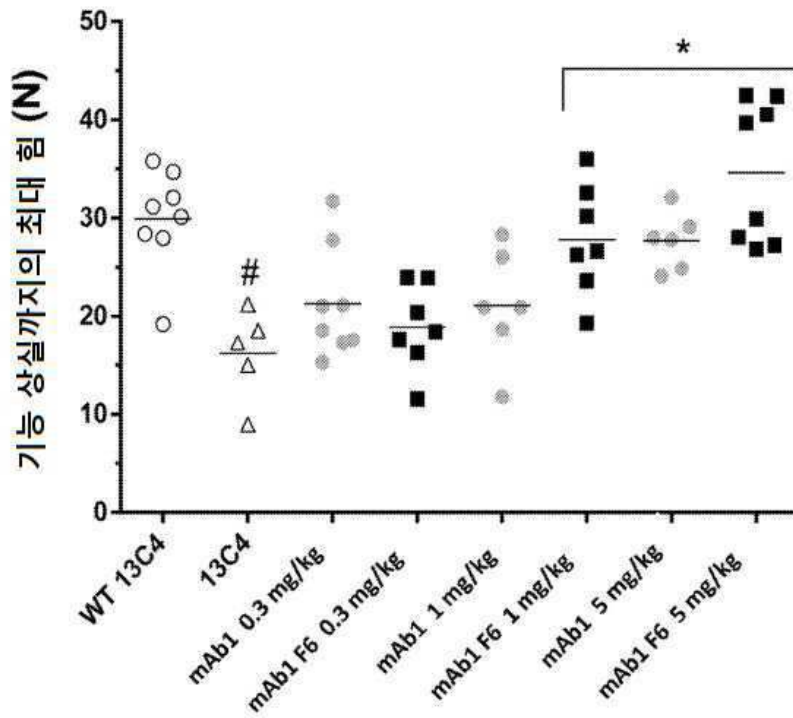
도면19



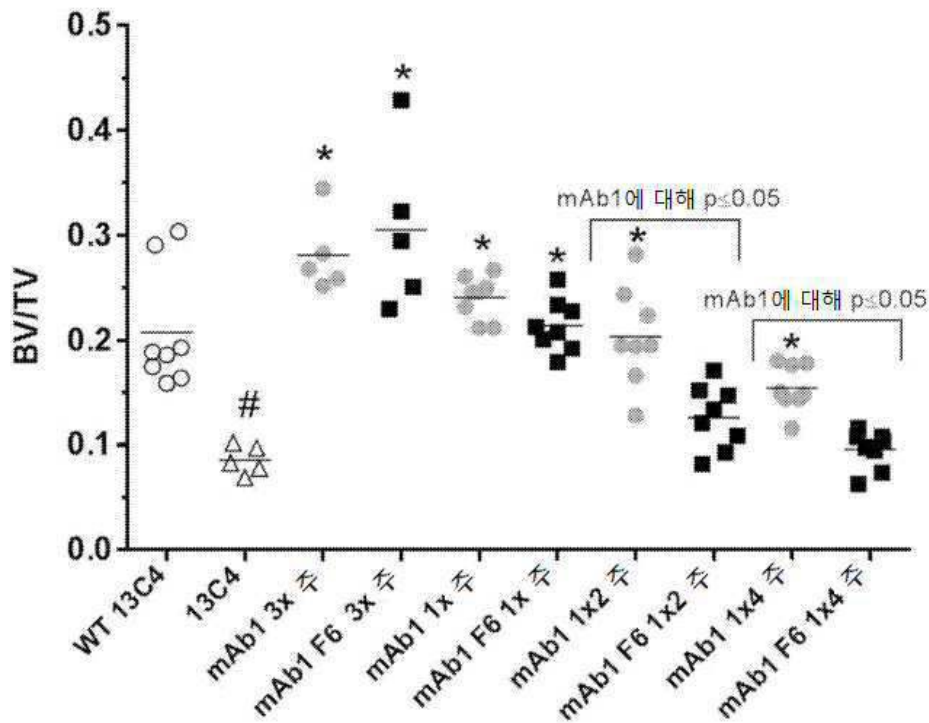
도면20



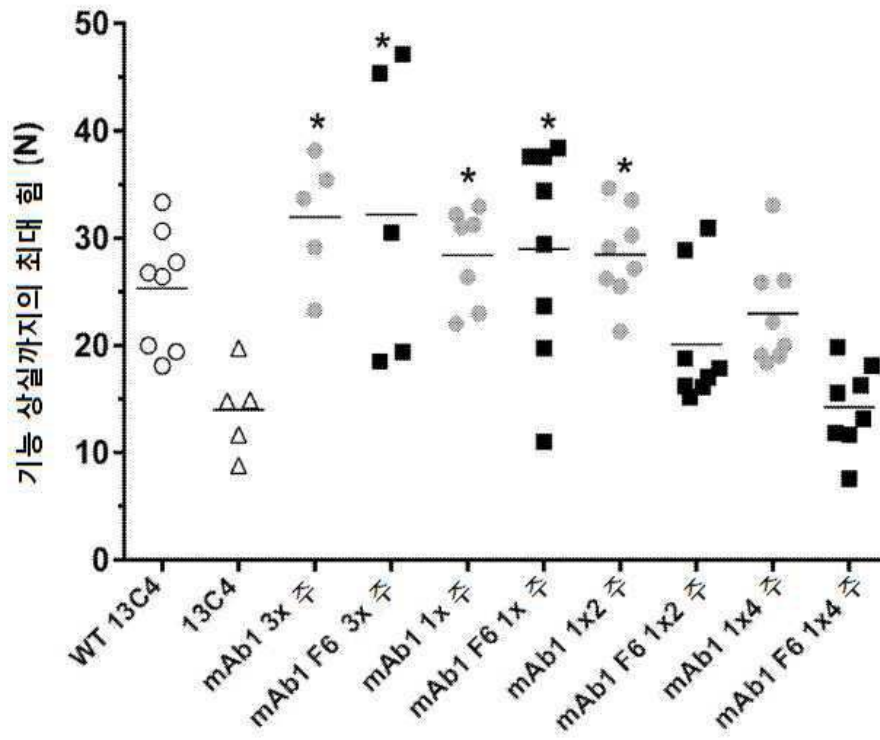
도면21



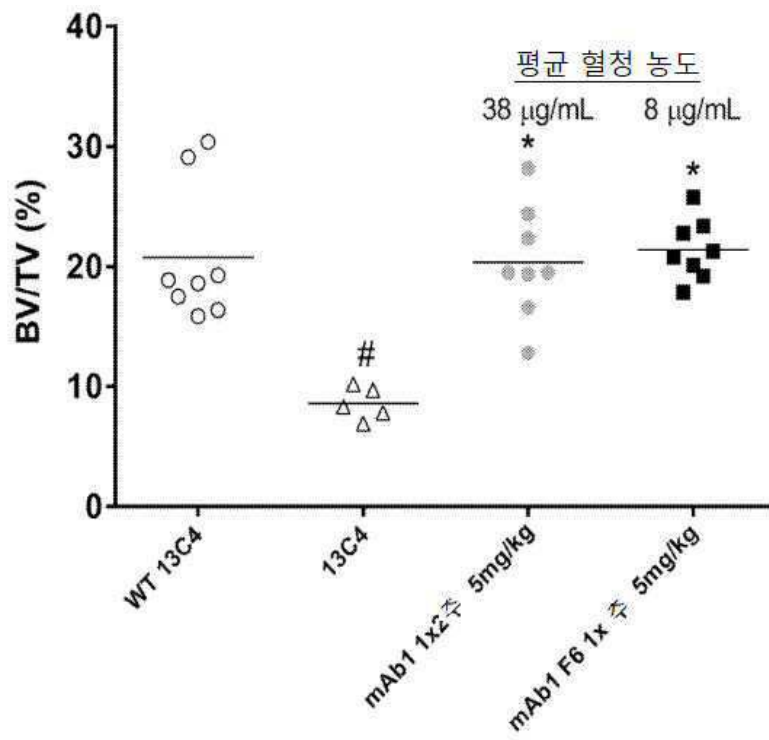
도면22



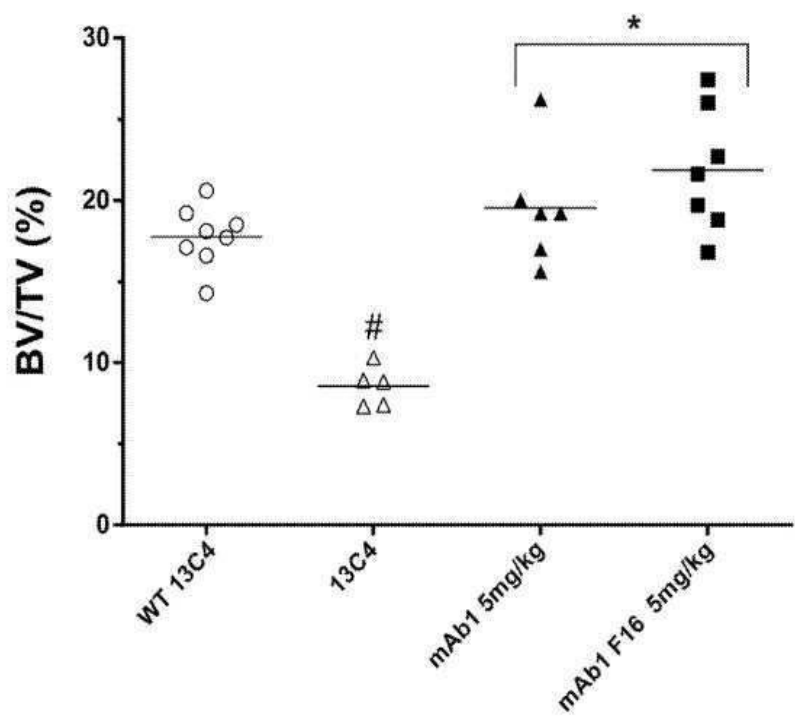
도면23



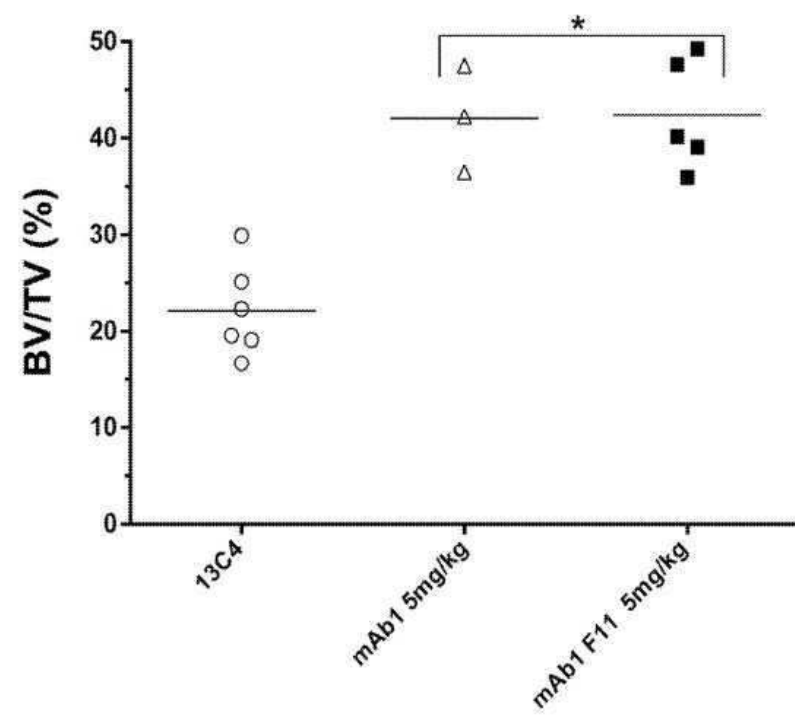
도면24



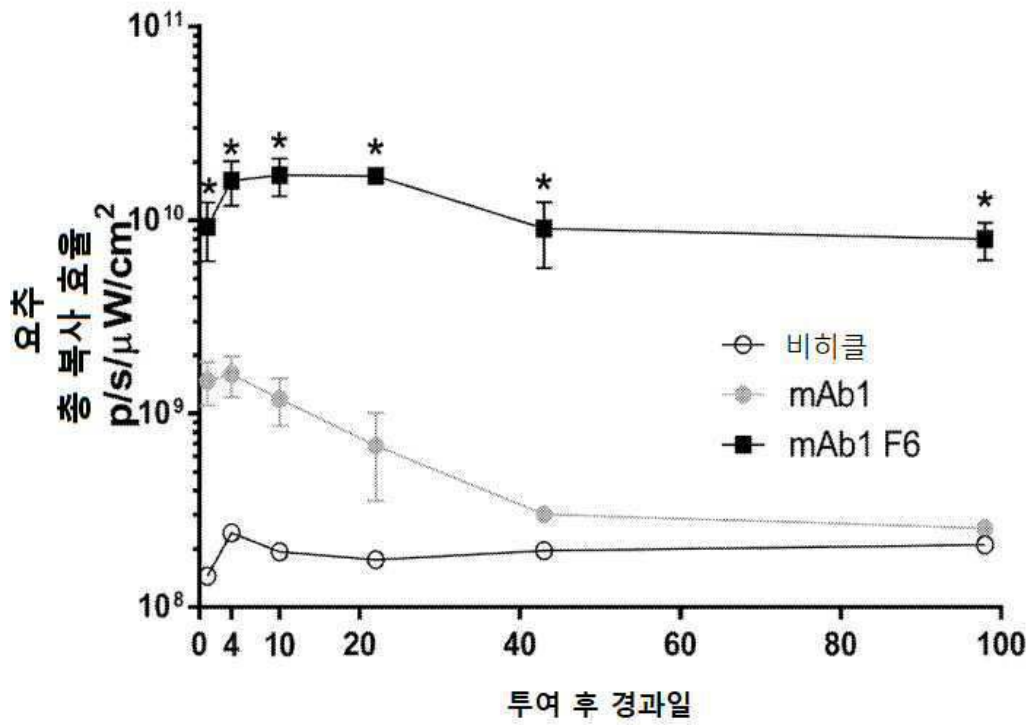
도면25



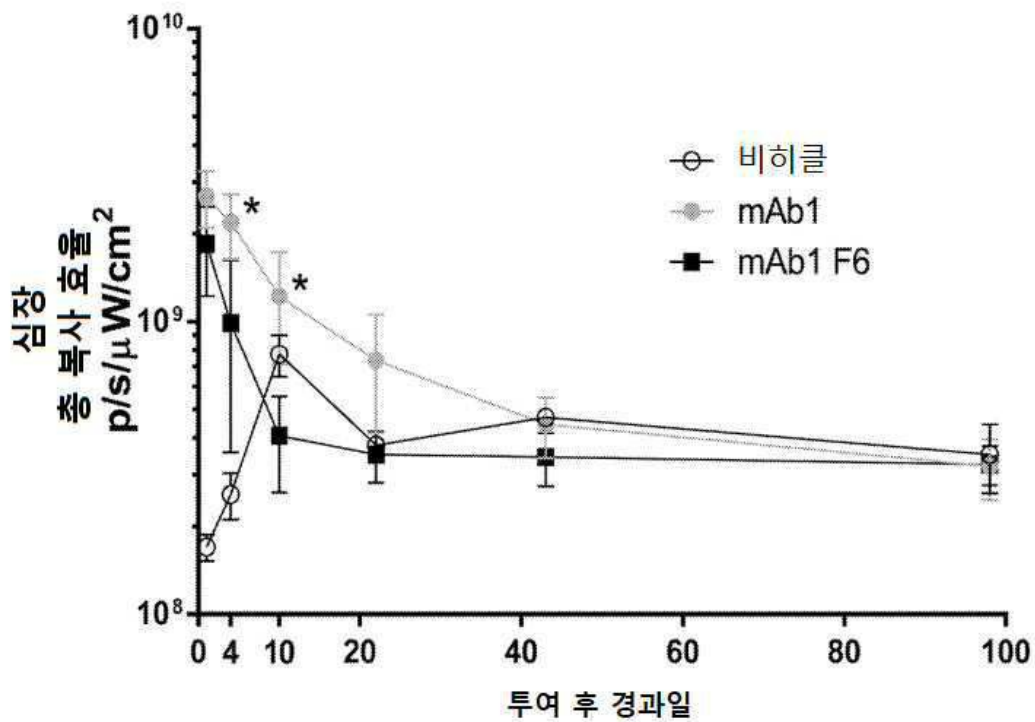
도면26



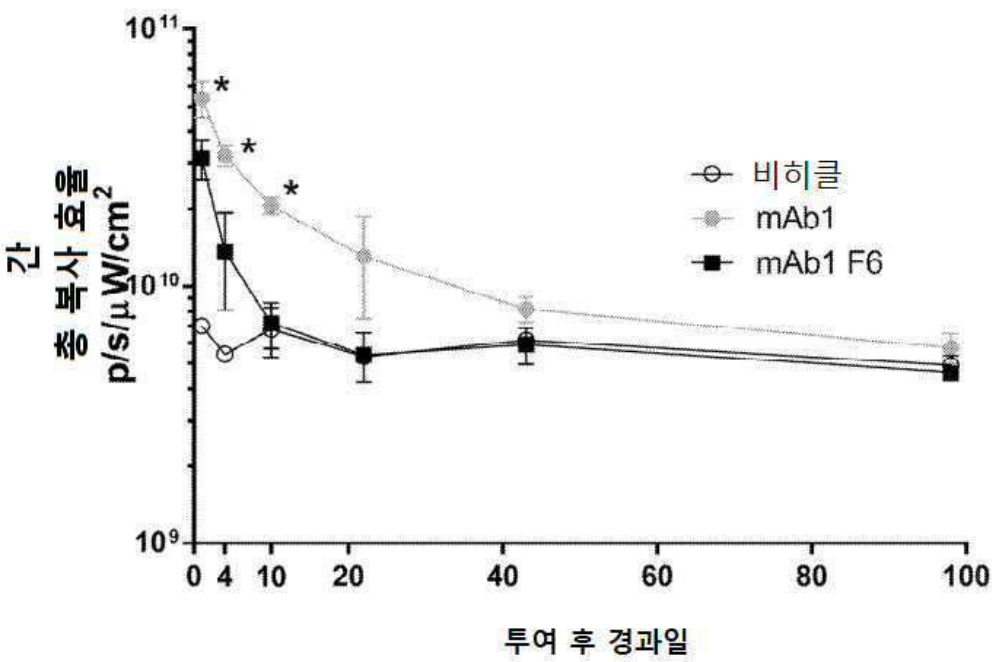
도면27



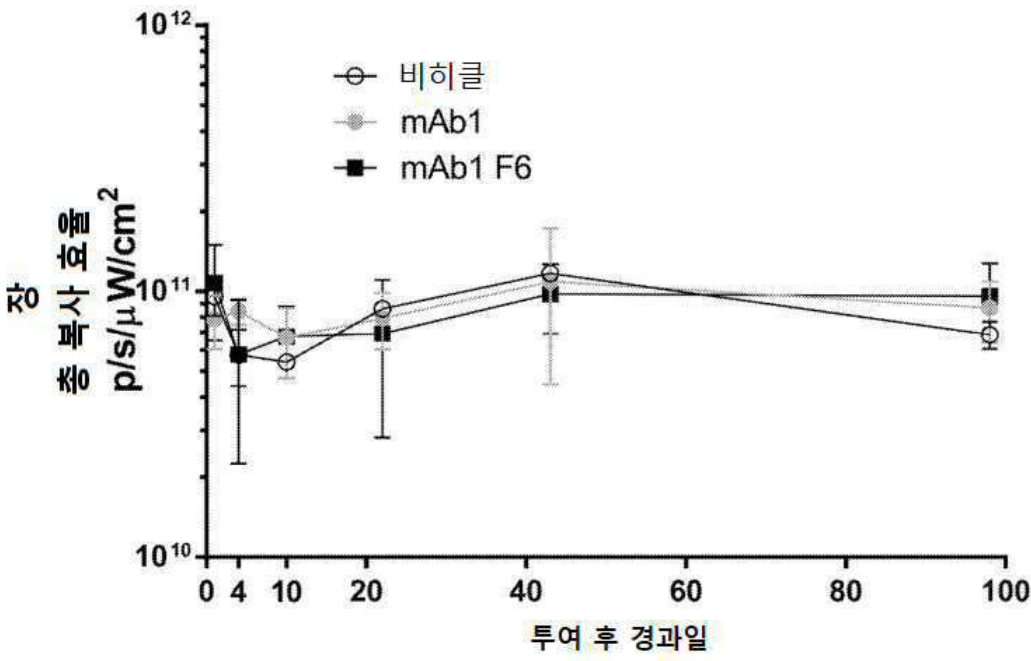
도면28



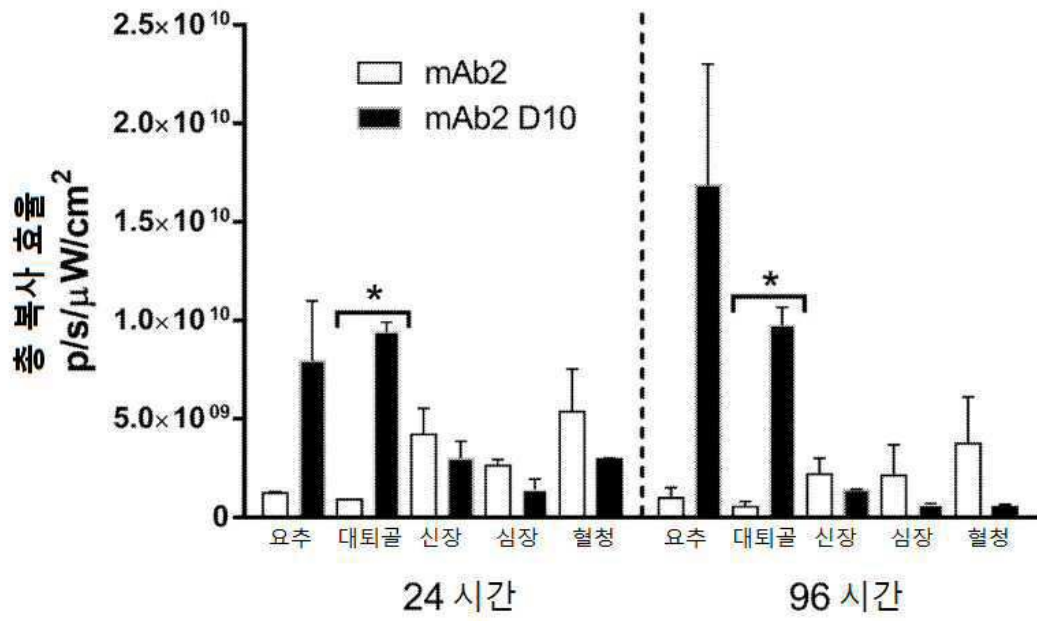
도면29



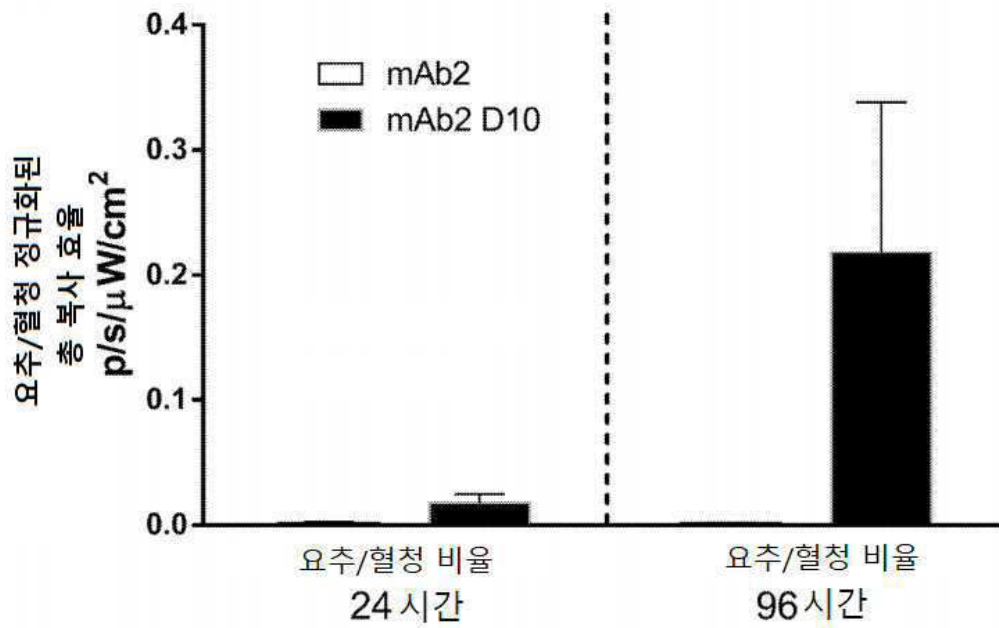
도면30



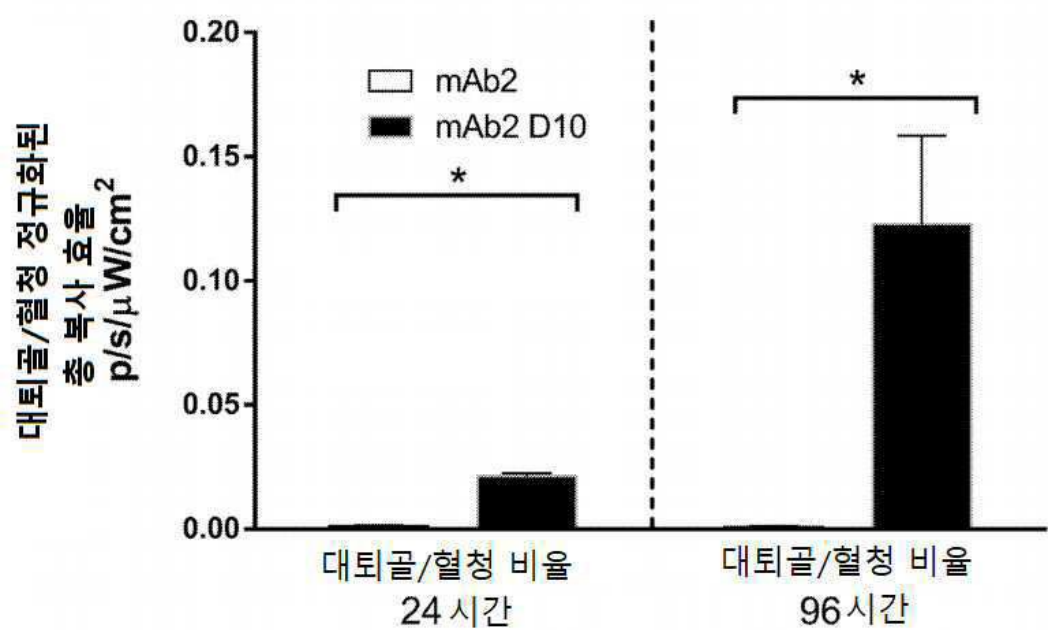
도면31



도면32



도면33



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENZYME CORPORATION

<120> BONE-TARGETING ANTIBODIES

<130> 022548.W0012

<140><141><150> 62/448,763

<151> 2017-01-20

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 1

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

1 5 10

<210> 2

<211> 445

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 2

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

1 5 10 15

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

 20 25 30

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

 35 40 45

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

 50 55 60

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

65 70 75 80

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

 85 90 95

Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Ala Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly

 100 105 110

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

 115 120 125

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

 130 135 140

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

145 150 155 160

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

 165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro

195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly

210 215 220

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys

275 280 285

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

290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg

305 310 315 320

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

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

340 345 350

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr

355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln

370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly

385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu

405 410 415

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

420 425 430
His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys

435 440 445
<210> 3
<211> 455
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"
<400> 3
His Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60
Glu Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Ala Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
115 120 125
Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
130 135 140
Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro

195 200 205

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly

210 215 220

Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys

275 280 285

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

290 295 300

Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg

305 310 315 320

Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

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

340 345 350

Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr

355 360 365

Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln

370 375 380

Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly

385 390 395 400

Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu

405 410 415
Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn

420 425 430
His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Asp Asp Asp

435 440 445
Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

450 455

<210> 4

<211> 455

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 4

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp His Val Gln Leu Gln Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Phe Pro Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu

85 90 95

Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Gly Asn

100 105 110

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

115 120 125

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro

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

Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
420 425 430

Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser
435 440 445

Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 5

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 5

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp His Val Gln Leu Gln Gln
1 5 10 15

Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys
20 25 30

Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr Trp Met Asn Trp Val Lys
35 40 45

Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gln Ile Phe Pro Ala
50 55 60

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

Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu
85 90 95

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

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

115 120 125

Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro

130 135 140

Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser

195 200 205

Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val

210 215 220

Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys

225 230 235 240

Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys

245 250 255

Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val

260 265 270

Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp

275 280 285

Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

290 295 300

Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp

305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe

325 330 335

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

340 345 350

Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys

355 360 365
Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp

370 375 380
Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys
385 390 395 400
Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser
405 410 415
Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr
420 425 430
Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser

435 440 445
Leu Ser His Ser Pro Gly Lys Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
450 455 460

Asp

465

<210> 6

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 6

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

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

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

65				70				75				80			
Pro	Val	Glu	Ala	Asp	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn
				85				90				95			
Glu	Asp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg
100				105				110							
Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln
115				120				125							
Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
130				135				140							
Pro	Lys	Asp	Ile	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln
145				150				155				160			
Asn	Gly	Val	Leu	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr
165				170				175							
Tyr	Ser	Met	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg
180				185				190							
His	Asn	Ser	Tyr	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	Pro
195				200				205							
Ile	Val	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys						
210				215											
<210> 7															
<211> 228															
<212> PRT															
<213> Artificial Sequence															
<220><221> source															
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"															
<400> 7															
Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asn	Ile	Val	Leu	Thr	Gln
1				5				10				15			
Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser
20				25				30							

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

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

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

 Arg Asn Glu Cys
 225
 <210> 8
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 8

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg

180 185 190

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro

195 200 205

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Asp Asp Asp Asp Asp

210 215 220

Asp Asp Asp Asp

225

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 10

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10

<210> 11

<211> 233

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 11

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro

35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala

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

115 120 125
Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
145 150 155 160
Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg

180 185 190
His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
195 200 205
Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Asp
210 215 220
Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

225 230

<210> 12

<211> 238

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 12

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Gln Pro Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg

180 185 190

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro

195 200 205

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly

210 215 220

Gly Gly Gly Ser Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

225 230 235

<210> 13

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro		
210	215	220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val		
225	230	235
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		
260	265	270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
340	345	350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
405	410	415
Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
420	425	430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 14

<211> 457

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 14

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

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

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

165	170	175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
180	185	190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys		
195	200	205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro		
210	215	220
Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val		
225	230	235
		240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu		
260	265	270
Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile		
325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro		
340	345	350
Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu		
355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
405	410	415

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

420 425 430

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

435 440 445

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

450 455

<210> 15

<211> 215

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 16

<211> 457

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 16

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gln Val Gln Leu Val Gln

1 5 10 15

Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys

20 25 30

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

35 40 45

Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Val Ile Pro Ile

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu

85 90 95

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

100 105 110

Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met

355 360 365
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

370 375 380
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

385 390 395 400
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

405 410 415
Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val

420 425 430
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

435 440 445
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

450 455

<210> 17

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 17

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Gln Val Gln Leu Val Gln

1 5 10 15
Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys

20 25 30
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn Val Ile Ser Trp Val Arg

35 40 45
Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Gly Val Ile Pro Ile

50 55 60

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

65 70 75 80

Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Thr Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu

85 90 95

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

100 105 110

Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

 325 330 335
Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln

 340 345 350
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met

 355 360 365
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

 370 375 380
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn

385 390 395 400
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

 405 410 415
Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val

 420 425 430
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln

 435 440 445
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

 450 455 460
Asp Asp Asp

465

<210> 18

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 18

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Glu Thr Val Leu Thr Gln

1 5 10 15

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

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

Cys

225

<210> 19

<211> 225

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

210 215 220

Asp

225

<210> 20

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 20

Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Glu Thr Val Leu Thr Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln

35 40 45

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

50 55 60

Arg Ala Pro Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu

165 170 175

Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu

180 185 190

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

195 200 205

His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu

210 215 220

Cys Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp

225 230 235

<210> 21

<211> 230

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro

85 90 95

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

100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Asp Asp Asp Asp
 210 215 220
 Asp Asp Asp Asp Asp Asp
 225 230

<210> 22

<211> 235

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 22

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro
85 90 95
Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

115 120 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180 185 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
210 215 220
Ser Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp
225 230 235

<210> 23

<211> 1344

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223

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

<400> 23

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttctggata caccttcagt agcaatgtta tcagctgggt gcgccaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatggggggg gtcaccccta ttgttgatat tgcgaactac 180
gcacagagat tcaagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccactag tacaacttac 240
atggagttag gcagcctgag gtctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagcacactt 300
ggctctcgcc tggatgctat ggactactgg ggtcagggtg cgttagtgac ggtctcgagt 360

gcttcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 420
agcacagccg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 480
tggaaactcag gcgcccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 540
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 600
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tcgacaagag agttgagtcc 660
aaatatggtc ccccatgccc accatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 720
ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 780

tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 900
cgtgtggtca gcgtctcac cgtctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggctt ccaacaaagg cctcccgctc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 1080
aaccaggtca gctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc 1200

gacggtcctt tcttctcta cagcaggcta accgtggaca agagcagggt gcaggagggg 1260
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1320
ctctccctgt ctctggggaa atga 1344

<210> 24
<211> 1374
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"
<400> 24
gacgacgatg atgacgatga cgacgacgat caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag 60
gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc tcctgcaagg cttctggata caccttcagt 120

agcaatgtta tcagctgggt gcgccaggcc cctggacaag ggctcgagt gatggggggg 180
gtcatcccta ttgtgatat tgcgaactac gcacagagat tcaagggcag agtcacgatt 240
accgcggacg aatccactag tacaacttac atggagtga gcagcctgag gtctgaggac 300
acggccgtgt attactgtgc gagcacactt ggtctcgtcc tggatgctat ggactactgg 360
ggtcagggtta cgttagtgac ggtctcgagt gcttcacca agggcccatc cgtcttcccc 420
ctggcgccct gctccaggag cacctccgag agcacagccg ccctgggctg cctggtaag 480
gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg 540

cacaccttcc cggtgtcct acagtctca ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc 600
gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc tacacctgca acgtagatca caagcccagc 660
aacaccaagg tcgacaagag agttgagtcc aaatatggtc ccccatgccc accatgcca 720
gcacctgagt tcttgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact 780
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac 840
cccagggtcc agttcaactg gtacgtggat ggctggagg tgcataatgc caagacaaag 900
ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac 960

caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc 1020
tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc 1080
ctgcccccat ccaggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctggtaaa 1140
ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1200
tacaagacca cgctcccggt gctggactcc gacggctcct tcttctcta cagcaggcta 1260
accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1320
gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctggggaa atga 1374

<210> 25

<211> 1374

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 25

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcttgcgaagg ctcttgata caccttcagt agcaatgtta tcagctgggt gcgccaggcc 120
cctggacaag ggctcgagt gatggggggg gtcatcccta ttgtgatat tgcgaactac 180

gcacagagat tcaagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccactag tacaacttac 240
atggagttag gcagcctgag gtctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagcacactt 300

ggctctcgcc tggatgctat ggactactgg ggtcagggtta cgtagtgac ggtctcgagt 360
gcttcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 420
agcacagccg ccttgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg 480
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtctct acagtcctca 540
ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 600
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tcgacaagag agttgagtc 660
aaatatggtc ccccatgccc accatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 720

ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 780
tgcgtggtgg tggagctgag ccaggaagac ccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 900
cgtgtggtca gcgtctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag 1080
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1140

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1200
gacggctcct tcttctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1260
aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1320
ctctccctgt ctctggggaa agacgacgat gatgacgatg acgacgacga ttga 1374

<210> 26
<211> 1404
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"
<400> 26
gacgacgatg atgacgatga cgacgacgat caggtgcagc tgggtcagtc tggggctgag 60
gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc tctgcaagg cttctggata caccttcagt 120
agcaatgtta tcagctgggt gcgccaggcc cctggacaag ggctcgagtg gatggggggg 180

gtcaccccta ttgttgatat tgcgaactac gcacagagat tcaagggcag agtcacgatt 240
 accgcggacg aatccactag tacaacttac atggagtga gcagcctgag gtctgaggac 300
 acggccgtgt attactgtgc gagcacactt ggtctcgtcc tggatgctat ggactactgg 360
 ggtcagggtg cgttagtac ggtctcagat gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc 420
 ctggcgccct gctccaggag cactccgag agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag 480

 gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg 540
 cacaccttcc cggtgttctt acagtcttca ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc 600
 gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc tacacctgca acgtagatca caagcccagc 660
 aacaccaagg tcgacaagag agttgagtcc aaatatggtc ccccatgccc accatgccc 720
 gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact 780
 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac 840
 cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 900

 ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac cgtgtgttca gcgtcctcac cgtcctgcac 960
 caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc 1020
 tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc 1080
 ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa 1140
 ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1200
 tacaagacca cgctccctg gctggactcc gacggctcct tcttctctca cagcaggcta 1260
 accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag 1320

 gctctgcaca accactacac acagaagagc ctctccctgt ctctggggaa agacgacgat 1380
 gatgacgatg acgacgacga ttga 1404

 <210> 27
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"
 <400> 27
 gaaacggtac tcacgcagtc tccaggtacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctctctgca gggccagtca gactcttggc agcagctact tagcctggta tcagcagaaa 120

cctggtcagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggcacc tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctggtacc gacttcactc tcaccatcag ccgactggag 240

cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag cagtatgctg actcacgat caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg 540

acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgctac aaagagcttc aacaggggag agtgtag 648

<210> 28

<211> 678

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 28

gacgacgatg atgacgatga cgacgacgat gaaacggtac tcacgcagtc tccaggtacc 60

ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc ctctctgca gggccagtca gagtcttggc 120

agcagctact tagcctggta tcagcagaaa cctggtcagg ctcccaggct cctcatctat 180

ggtgcatcca gcagggcacc tggcatccca gacaggttca gtggcagtgg gtctggtacc 240

gacttcactc tcaccatcag ccgactggag cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag 300

cagtatgctg actcacgat caccttcggc caagggacac gactggagat taaacgtacg 360

gtggctgcac catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact 420

gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatcccagag aggccaaagt acagtggaag 480

gtggataacg cctccaatc gggtactcc caggagagtg tcacagagca ggacagcaag 540

gacagcacct acagcctcag cagcacctg acgtgagca aagcagacta cgagaaacac 600

aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag ggcctgagct cgcccgctac aaagagcttc 660

aacaggggag agtgtag 678

<210> 29

<211> 678

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 29

gaaacggtac tcacgcagtc tccaggtacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtca gagtcttggc agcagctact tagcctggta tcagcagaaa	120
cctggtcagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggcacc tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctggtacc gacttcactc tcaccatcag ccgactggag	240
cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag cagtatgctg actcaccgat caccttcggc	300
caagggacac gactggagat taaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg	360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
tatcccagag aggccaaagt acagtgggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc	480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg	540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag	600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtgacga cgatgatgac	660
gatgacgacg acgattag	678

<210> 30

<211> 708

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 30

gacgacgatg atgacgatga cgacgacgat gaaacggtac tcacgcagtc tccaggtacc	60
ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc ctctcctgca gggccagtca gagtcttggc	120
agcagctact tagcctggta tcagcagaaa cctggtcagg ctcccaggct cctcatctat	180
ggtgcatcca gcagggcacc tggcatccca gacaggttca gtggcagtgg gtctggtacc	240
gacttcactc tcaccatcag ccgactggag cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag	300
cagtatgctg actcaccgat caccttcggc caaggacac gactggagat taaacgtacg	360

gtggctgcac catctgtctt catcttcccg ccatctgatg agcagttgaa atctggaact 420
gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc tatccagag aggccaaagt acagtggaag 480
gtggataacg ccctccaatc gggttaactcc caggagagtg tcacagagca ggacagcaag 540
gacagcacct acagcctcag cagcaccttg acgctgagca aagcagacta cgagaaacac 600
aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc 660

aacaggggag agtgtgacga cgatgatgac gatgacgacg acgattag 708

<210> 31

<211> 693

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 31

gaaacggtac tcacgcagtc tccaggtacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtc gagtcttggc agcagctact tagcctggta tcagcagaaa 120
cctggtcagg ctcccaggt cctcatctat ggtgcatcca gcagggcacc tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt gtctggtacc gacttcactc tcaccatcag cgcactggag 240

cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag cagtatgctg actcaccgat caccttcggc 300
caagggacac gactggagat taaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggttaactcc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccttg 540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtggcgg aggcggcagc 660

gacgacgatg atgacgatga cgacgacgat tag 693

<210> 32

<211> 708

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polynucleotide"

<400> 32

gaaacggtac tcacgcagtc tccaggtacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60
ctctcctgca gggccagtc gagtcttggc agcagctact tagcctggta tcagcagaaa	120
cctggtcagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggcacc tggcatccca	180
gacaggttca gtggcagtgg gtctggtacc gacttcactc tcaccatcag ccgactggag	240
cctgaagatt ttgcagttta ttactgtcag cagtatgctg actcacgat caccttcggc	300
caaggagac gactggagat taaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc	360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtactcc	480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg	540
acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag	600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtggcgg aggcggcagc	660
ggcggaggcg gcagcgacga cgatgatgac gatgacgacg acgattag	708

<210> 33

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 33

Ser Asn Val Ile Ser

1	5
---	---

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 34

Gly Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 35

Thr Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 36

Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 37

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro

1 5
 <210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 38

Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro Ile Thr

1 5
 <210> 39
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 39

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

1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

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

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

100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 40
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 40
 Glu Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Gly Ser Ser
 20 25 30

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

 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105