



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0132544  
(43) 공개일자 2023년09월15일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>C07K 16/22 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)<br/>A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)<br/>G01N 33/574 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>C07K 16/22 (2013.01)<br/>A61P 35/00 (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-7027807</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2022년01월17일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2023년08월16일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/072297</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2022/152290<br/>국제공개일자 2022년07월21일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>PCT/CN2021/072397 2021년01월18일 중국(CN)<br/>PCT/CN2021/142043 2021년12월28일 중국(CN)</p> | <p>(71) 출원인<br/>쑤저우 트랜스젠타 테라퓨틱스 컴퍼니 리미티드<br/>중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218<br/>비6-501</p> <p>(72) 발명자<br/>치엔 쉬에밍<br/>중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218<br/>비6-501<br/>쿠이 셸리<br/>중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218<br/>비6-501<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>김진희, 김태홍</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 63 항

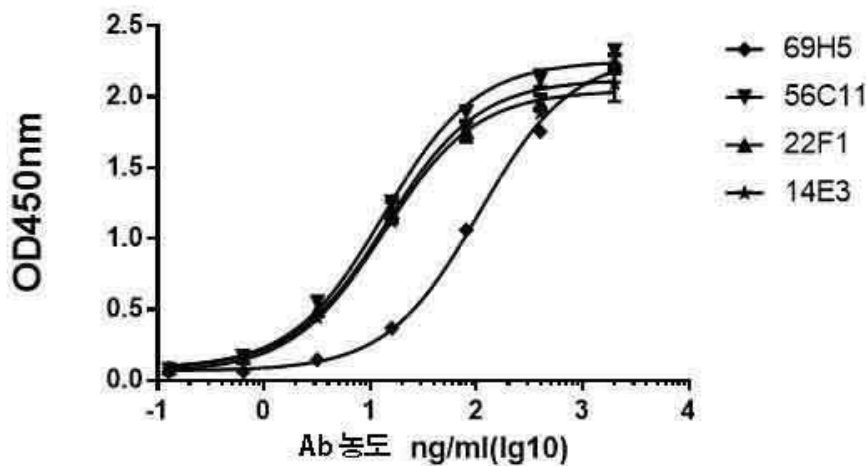
(54) 발명의 명칭 신규한 항-그렘린1 항체

(57) 요약

본 개시내용은 본원에서 항-그렘린1 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드, 이를 포함하는 약학 조성물, 및 이의 용도를 제공한다.

대표도 - 도1a

인간 그렘린-his에 대한 ELISA 결합



(52) CPC특허분류

*C07K 16/2827* (2013.01)  
*G01N 33/574* (2013.01)  
*A61K 2039/505* (2013.01)  
*C07K 2317/24* (2013.01)  
*C07K 2317/73* (2013.01)  
*C07K 2317/76* (2013.01)  
*C07K 2317/92* (2013.01)

(72) 발명자

**리 홍준**

중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218  
비6-501

**순 디**

중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218  
비6-501

**구오 후안후안**

중국 215123 장쑤 쑤저우 싱후 스트리트 218  
비6-501

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

다음 특징 중 적어도 하나를 갖는, 인간 그렘린1(hGREM1)에 대한 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- a) 비-암 세포보다 암 세포에서 선택적으로 BMP 신호전달에 대한 hGREM1-매개 억제를 감소시킬 수 있음;
- b) 비-암 세포에서 BMP 신호전달에 대한 hGREM1-매개 억제의 50% 이하의 감소를 나타냄;
- c) 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 키메라 hGREM1에 결합할 수 있음;
- d) hGREM1에 결합할 수 있지만 마우스 그렘린1에 특이적으로 결합하지 않고, 또는 다르게는 마우스 그렘린1에 교차 반응성임;
- e) 잔기 번호가 서열번호 69를 따르는 것인 잔기 Gln27 및/또는 잔기 Asn33을 포함하는 에피토프에서 hGREM1에 결합하거나, 잔기 Gln27 및/또는 잔기 Asn33을 포함하는 hGREM1 단편에 결합하며, 임의로 hGREM1 단편은 적어도 3 개(예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개) 아미노산 잔기의 길이를 가짐;
- f) 포르테비오(Fortebio)에 의해 측정될 때 1 nM 이하의  $K_D$ 에서 hGREM1에 결합할 수 있음;
- h) ELISA에 의해 측정될 때 50% 초과와 최대 차단 백분율로 BMP7에 대한 hGREM1의 결합을 차단할 수 있음;
- i) FGFR에 대한 hGREM1의 상호작용을 차단할 수 있음; 및/또는
- j) hGREM1과 DAN 둘 다에 결합할 수 있음.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 에피토프는 선형 에피토프 또는 형태적(conformational) 에피토프인, hGREM1에 대한 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 3

중쇄 가변(VH) 영역 및/또는 경쇄 가변(VL) 영역을 포함하는, 인간 그렘린1(hGREM1)에 대한 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로서, 중쇄 가변 영역은,

- a) 서열번호 1, 11, 21, 31, 114, 119 및 123으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR1,
  - b) 서열번호 2, 12, 22, 32 및 115로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR2, 및
  - c) 서열번호 3, 13, 23, 33, 116, 120 및 124로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고 /하거나,
- 경쇄 가변 영역은,
- d) 서열번호 4, 14, 24, 34, 117, 121, 122 및 125로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 LCDR1,
  - e) 서열번호 5, 15, 25 및 35로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 LCDR2, 및
  - f) 서열번호 6, 16, 26, 36 및 118로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 것인, 인간 그렘린1(hGREM1)에 대한 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 가변 영역은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- a) 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;

- b) 서열번호 11의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 12의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 13의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- c) 서열번호 21의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 22의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 23의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- d) 서열번호 31의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 32의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 33의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- e) 서열번호 114의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 116의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- f) 서열번호 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 120의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- g) 서열번호 123의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 124의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄 가변 영역은 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 항체 또는 이의 항원 결합 단편:

- a) 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- b) 서열번호 14의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 15의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 16의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- c) 서열번호 24의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 25의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 26의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- d) 서열번호 34의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 36의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- e) 서열번호 117의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- f) 서열번호 121의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- i) 서열번호 122의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및
- j) 서열번호 125의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.

**청구항 6**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

- a) 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;
- b) 중쇄 가변 영역은 서열번호 11의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 12의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 13의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 14의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 15의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 16의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;
- c) 중쇄 가변 영역은 서열번호 21의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 22의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 23의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 24의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호

25의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 26의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;

d) 중쇄 가변 영역은 서열번호 31의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 32의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 33의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 34의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 36의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;

e) 중쇄 가변 영역은 서열번호 114의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 116의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 117의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;

f) 중쇄 가변 영역은 서열번호 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 120의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 121의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;

g) 중쇄 가변 영역은 서열번호 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 120의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 122의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;

h) 중쇄 가변 영역은 서열번호 123의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 124의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 125의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;

i) 중쇄 가변 영역은 서열번호 114의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 116의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 117의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나;

j) 중쇄 가변 영역은 서열번호 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 120의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 121의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하거나; 또는

k) 중쇄 가변 영역은 서열번호 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 120의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 122의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 가변 영역은 서열번호 7, 서열번호 17, 서열번호 27, 서열번호 37, 서열번호 41, 서열번호 43, 서열번호 45, 서열번호 51, 서열번호 53, 서열번호 55, 서열번호 57, 서열번호 126, 서열번호 128, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 및 서열번호 134로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 및 적어도 80%의 서열 동일성을 갖지만 그래핀에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 유지하는 그의 상동성 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 경쇄 가변 영역은 서열번호 8, 서열번호 18, 서열번호 28, 서열번호 38, 서열번호 47, 서열번호 49, 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 127, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 135, 서열번호 136, 및 서열번호 137로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 및 적어도 80%의 서열 동일성을 갖지만 그래핀에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 유지하는 그의 상동성 서열을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

a) 서열번호 7의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

b) 서열번호 17의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 18의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

c) 서열번호 27의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 28의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

- d) 서열번호 37의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 38의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- e) 서열번호 126의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 127의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- f) 서열번호 128의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 129의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- g) 서열번호 128의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 130의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- h) 서열번호 41, 서열번호 43 및 서열번호 45로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 47 및 서열번호 49로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- i) 서열번호 41/47, 41/49, 43/47, 43/49, 45/47 및 45/49로 이루어진 군으로부터 선택된 한 쌍의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열; 또는
- j) 서열번호 51, 서열번호 53, 서열번호 55 및 서열번호 57로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 59 및 서열번호 61로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- k) 서열번호 51/59, 51/61, 53/59, 53/61, 55/59, 55/61, 57/59, 및 57/61로 이루어진 군으로부터 선택된 한 쌍의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열; 또는
- l) 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133 및 서열번호 134로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 135, 서열번호 136 및 서열번호 137로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- m) 서열번호 131/135, 131/136, 131/137, 132/135, 132/136, 132/137, 133/135, 133/136, 133/137, 134/135, 134/136, 및 134/137로 이루어진 군으로부터 선택된 한 쌍의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만 hGREM1에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 유지하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 치환 또는 변형 중 적어도 하나는 하나 이상의 CDR 서열에, 및/또는 VH 또는 VL 서열의 하나 이상의 비-CDR 영역에 있는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 12**

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 불변 영역, 임의로 인간 IgG의 불변 영역을 추가로 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 불변 영역을 포함하고, 임의로 불변 영역은 서열번호 138의 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 및/또는 서열번호 139의 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화된 것 또는 키메라형인 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 15**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 디아바디, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv 단편, 이황화 안정화된 Fv 단편(dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, 이중특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 이황화 안정화된 디아바디(ds diabody), 단일쇄 항체 분자(scFv), scFv 이량체(2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화된 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 및 2가 도메인 항체인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 16**

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 이중특이적인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 그래블린의 제1 및 제2 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있거나, 또는 hGREM1 및 제2 항원 둘다에 특이적으로 결합할 수 있는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 18**

제17항에 있어서, 제2 항원은 면역 관련 표적을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 제2 항원은 PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, TIM-3, LAG3, A2AR, CD160, 2B4, TGF $\beta$ , VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, OX40, CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD47, CD122, ICAM-1, IDO, NKG2C, SLAMF7, SIGLEC7, NKp80, CD160, B7-H3, LFA-1, ICOS, 4-1BB, GITR, BAFFR, HVEM, CD7, LIGHT, IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, CD3, CD16 또는 CD83을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 20**

제17항에 있어서, 제2 항원은 종양 항원을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 종양 항원은 종양 특이적 항원 또는 종양 관련 항원을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 22**

제20항에 있어서, 종양 항원은 전립선 특이 항원(PSA), CA-125, 강글리오사이드 G(D2), G(M2) 및 G(D3), CD20, CD52, CD33, Ep-CAM, CEA, 봄베신 유사 펩타이드, HER2/neu, 표피 성장 인자 수용체(EGFR), erbB2, erbB3/HER3, erbB4, CD44v6, Ki-67, 암 관련 뮤신, VEGF, VEGFR(예컨대 VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3), 에스트로겐 수용체, 루이스(Lewis)-Y 항원, TGF $\beta$ 1, IGF-1 수용체, EGF $\alpha$ , c-Kit 수용체, 트랜스페린 수용체, 클라우딘(Claudin) 18.2, GPC-3, 넥틴(Nectin)-4, ROR1, 메토텔린, PCMA, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15, BCR-ABL, E2APRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, IL-2R, CO17-1A, TROP2, 또는 LIV-1를 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 23**

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스 그래블린1에 대해 교차 반응성이 아닌, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 24**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 마우스 그래블린1에 대해 교차-반응성인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 25**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 접합체 부분에 연결된, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 접합체 부분은 제거-변형제(clearance-modifying agent), 화학요법제, 독소, 방사성 동위원소, 란타나이드, 발광 표지, 형광 표지, 효소-기질 표지, DNA-알킬화제, 토포이소머라제 억제제, 튜블린 결합제, 또는 안드로겐 수용체 억제제와 같은 기타 항암 약물을 포함하는 것인, 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

단편.

**청구항 27**

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편과, hGREM1에 대한 결합에 대해 경쟁하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편.

**청구항 28**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물 또는 키트.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 제2 치료제를 추가로 포함하는 약학 조성물 또는 키트.

**청구항 30**

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드.

**청구항 31**

제30항의 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

**청구항 32**

제31항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

**청구항 33**

제31항의 벡터가 발현되는 조건하에 제32항의 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현시키는 방법.

**청구항 34**

치료 유효량의 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제28항 또는 제29항의 약학 조성물의 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 GREM1 관련 질환 또는 병태를 치료하는 방법, 또는 이를 필요로 하는 대상체에서 FGFR1 활성화를 억제하는 방법, 또는 GREM1에 의해 매개되는 FGFR1 활성화와 관련된 질환 또는 병태를 치료하는 방법.

**청구항 35**

제34항에 있어서, GREM1-관련 질환 또는 병태는 암, 심유성 질환, 혈관신생, 녹내장 또는 망막 질환, 신장 질환, 폐동맥 고혈압 또는 골관절염(OA)으로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 GREM1 관련 질환 또는 병태는 경피증, 특발성 폐 섬유증, 당뇨병성 신병증, IgAN, 루푸스 신염, 알포트 증후군, 신경아교종, 두경부암, 전립선암, 폐암, 위암, 췌장암, 식도암, 방광암, 유방암 및 결장직장암으로 이루어진 군으로부터 선택된 GREM1의 증가된 수준과 관련된 것인 방법.

**청구항 36**

제35항에 있어서, 암은 GREM1-발현 암이고, 임의로 PD-L1-발현 암이거나 PD-L1-발현 암이 아니며, 추가로 임의로 PD-1/PD-L1 축 억제제를 사용한 치료에 대해 저항성 또는 불응성인 방법.

**청구항 37**

제34항에 있어서, 대상체는 GREM1-발현 암 세포를 갖거나, 암 미세환경에서 GREM1 발현을 갖는 것으로 확인되는 것인 방법.

**청구항 38**

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 고형 종양 또는 혈액암인 방법.

**청구항 39**

제38항에 있어서, 암은 전립선암, 위-식도암, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암), 간암, 췌장암, 유방암, 기관지암, 골암, 간 및 담관 암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 두경부암, 척추암, 뇌암, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막암, 결장암, 결장직장암, 직장암, 항문암, 위장관암, 피부암, 뇌하수체암, 위암, 질암, 갑상선암, 교모세포종, 성상세포종, 흑색종, 골수이형성 증후군, 육종, 기형종, 신경아교종, 선암종, 백혈병(예컨대 급성 림프구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML)), 림프종(예컨대 호지킨 림프종 또는 비호지킨 림프종(예컨대 발덴스트롬(Waldenstrom) 마크로글로불린혈증(WM))), 또는 골수종(예컨대 다발성 골수종(MM))인 방법.

**청구항 40**

제39항에 있어서, 암은 전립선암, 위암, 식도암, 위-식도 접합부암, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암), 간암, 결장암, 결장직장암, 신경아교종, 췌장암, 방광암, 유방암, 및 다발성 골수종으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

**청구항 41**

제40항에 있어서, 암은 전립선암, 유방암 또는 간암인 방법.

**청구항 42**

제40항에 있어서, 유방암은 삼중 음성 유방암인 방법.

**청구항 43**

제40항에 있어서, 암은 식도암이고, 임의로 PD-1/PD-L1 축 억제제를 사용한 치료에 대해 저항성 또는 불응성이며, 추가로 임의로 항-PD-1 항체(예컨대 니볼루맙)를 사용한 치료에 대해 저항성 또는 불응성인 방법.

**청구항 44**

제35항에 있어서, 섬유성 질환은 폐, 간, 신장, 눈, 피부, 심장, 장 또는 근육에서의 섬유성 질환인 방법.

**청구항 45**

제34항에 있어서, 대상체는 인간인 방법.

**청구항 46**

제34항에 있어서, 투여는 경구, 비강, 정맥내, 피하, 설하, 또는 근육내 투여를 통한 것인 방법.

**청구항 47**

제34항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 유효량의 제2 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 48**

제47항에 있어서, 제2 치료제는 항암 요법을 포함하고, 임의로 상기 항암 요법은 화학요법제(예를 들어, 시스플라틴), 방사선 요법, 면역요법제(예를 들어, 면역 체크포인트 조절제, 예를 들어, PD-1/PD-L1 축 억제제, TGF-베타 억제제), 항혈관형성제(예컨대 VEGFR-1, VEGFR-2 및 VEGFR-3과 같은 VEGFR의 길항제), 표적 치료제, 세포 치료제, 유전자 치료제, 호르몬 치료제, 사이토킨, 완화 치료, 암 치료를 위한 수술(예컨대 종양 절제술), 하나 이상의 항구토제, 화학 요법으로 인해 발생하는 합병증 치료제, 암 환자용 식이 보충제(예컨대 인돌-3-카르비놀), 종양 미세환경을 조절하는 제제(예컨대 PD-L1 결합 부분과 TGF-베타 수용체의 세포외 도메인을 포함하는 이중기능성 분자) 또는 항섬유화 요법(예컨대 BMP7 치료, ACE 억제제(또는 ARB), 항-MASP2 항체, 엔도텔린 수용체 길항제, NRF2 억제제 스테로이드, CTLA4-IgG 또는 TNF 억제제)으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 49**

제48항에 있어서, 항암 요법은 항-전립선암 약물을 포함하는 것인 방법.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 항-전립선암 약물은 안드로겐 축 억제제; 안드로겐 합성 억제제; PARP 억제제; 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

**청구항 51**

제50항에 있어서, 안드로겐 축 억제제는 황체형성 호르몬-방출 호르몬(LHRH) 작용제, LHRH 길항제 및 안드로겐 수용체 길항제로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

**청구항 52**

제50항에 있어서, 안드로겐 축 억제제는 데가렐릭스, 바이칼루타미드, 플루타미드, 닐루타미드, 아팔루타미드, 다룰루타미드, 엔잘루타미드, 또는 아비라테론인 방법.

**청구항 53**

제50항에 있어서, 항-전립선암 약물은 아비라테론 아세테이트, 아팔루타미드, 바이칼루타미드, 카바지탁셀, 카소텍스(Bicalutamide), 다룰루타미드, 데가렐릭스, 도세탁셀, 엘리가드(Leuprolide Acetate), 엔잘루타미드, 에를레아다(Apalutamide), 피르마곤(Degarelix), 플루타미드, 고세렐린 아세테이트, 제브타나(Cabazitaxel), 류프롤리드 아세테이트, 루프론(Leuprolide Acetate), 루프론 데포트(Leuprolide Acetate), 린파르자(Olaparib), 미톡산트론 하이드로클로라이드, 닐란드론(Nilutamide), 닐루타미드, 누베카(Darolutamide), 올라파립, 프로벤제(Sipuleucel-T), 라둠 223 디클로라이드, 루브라카(Rucaparib Camsylate), 루카파립 캄실레이트, 시플레우셀-T, 탁소테레(Docetaxel), 크소피고(Xofigo: Radium 223 Dichloride), 크탄디(Xtandi: Enzalutamide), 줄라텍스(Goserelin Acetate) 및 자이티가(Zytiga: Abiraterone Acetate)로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

**청구항 54**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키트.

**청구항 55**

샘플에서 그렐린의 존재 또는 양을 검출하는 방법으로서, 샘플을 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계, 및 샘플에서 그렐린의 존재 또는 양을 결정하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 56**

대상체에서 GREM1-관련 질환 또는 병태를 치료하기 위한 약제의 제조에서의, 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도.

**청구항 57**

제56항에 있어서, GREM1-관련 질환 또는 병태는 암인 용도.

**청구항 58**

제56항에 있어서, GREM1-관련 질환 또는 병태는 섬유성 질환, 혈관신생, 녹내장, 망막 질환, 신장 질환, 폐동맥 고혈압, 또는 골관절염(OA)인 용도.

**청구항 59**

BMP7 활성 증가, 또는 BMP7 활성에 대한 그렐린-매개 억제의 감소로부터 이익을 얻을 수 있는 질환을 치료하는 방법으로서, 치료 유효량의 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제28항 또는 제29항의 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 60**

제59항에 있어서, 질환은 섬유성 질환 및/또는 신장 질환인 방법.

**청구항 61**

제59항에 있어서, 질환은 허혈-재관류 손상, 허혈성 급성 신부전, 면역글로불린 A 신병증, 루푸스 신염, 알포트 증후군, 당뇨병성 신병증 및 고혈압성 신경화증, 신장 섬유증, 만성 신장 질환, 급성 신장 질환, 및 고혈압성 신경화증으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

**청구항 62**

치료 유효량의 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 제28항 또는 제29항의 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, BMP7 치료를 필요로 하는 대상체에서 BMP7 치료의 효능을 증가시키는 방법.

**청구항 63**

제62항에 있어서, 대상체는 섬유성 질환 및/또는 신장 질환으로 진단되고, BMP7 치료를 받는 중인 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 개시내용은 일반적으로 인간 그렘린1에 특이적으로 결합하는 신규한 항-그렘린1(GREM1) 항체에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 그렘린1(Gremlin1: GREM1)은 시스테인이 풍부한 영역 및 시스테인 매듭을 갖는 고도로 보존된 분비 단백질이다 (참조: *Wordinger et al., Exp Eye Res. 2008 August; 87(2): 78-79.*). 이는 골 형태형성 단백질(BMP)의 길항제 역할을 하는 신경모세포종(DAN) 계열에서 비정상적인 차등 선별-선택된 유전자의 구성원이다(참조: *Wordinger et al., Exp Eye Res. 2008 August; 87(2): 78-79.*). GREM1은 BMP-2, BMP-4 또는 BMP-7에 물리적으로 결합하여 이종이량체(heterodimer)를 형성하고 BMP 리간드가 해당 BMP 수용체와 상호 작용하는 것을 방지한다. BMP 신호전달 경로의 활성화를 억제할 수 있다.

[0003] GREM1은 신장, 폐, 간 및 망막의 섬유성 병변뿐만 아니라 췌장암, 결장암, 폐암, 신경아교종, 위암 및 전립선암을 비롯한 여러 종양 유형과 밀접한 관련이 있다(참조: *Sneddon et al., PNAS 2006 October; 103(40): 14842-14847*). 예를 들어 비정상적인 그렘린1 상향 조절은 줄기 세포 적소 외부의 결장 세포에 종양형성성(tumorigenicity)을 부여한다. 종양 줄기 세포는 신경아교종에서 줄기세포성을 유지하기 위해 그렘린1을 고도로 발현하고 분비하는 것으로 밝혀졌다(*Yan, K., et al., Genes Dev 28, 1085-1100 (2014)*). 따라서, 그렘린1은 그렘린 관련 질환을 치료하는데 있어서 치료 표적으로 사용되어 왔다.

[0004] 그러나 GREM1은 다른 정상 조직에서도 발현되기 때문에, 정상 조직에 대한 독성 등의 부작용으로 인해, 현재 GREM1 관련 질환에 대한 효과적인 치료법이 없는 실정이다. 따라서, 부작용이 적은 새로운 항그렘린1 항체가 필요하다.

**발명의 내용**

[0005] 본 명세서 전반에 걸쳐, 관사 "a", "an" 및 "the"는 관사의 문법적 대상 중 하나 또는 그 이상(즉, 적어도 하나)을 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 예로서, "항체"는 하나의 항체 또는 하나 이상의 항체를 의미한다.

[0006] 본 개시내용은 무엇보다도 신규한 단클론 항-그렘린1(GREM1) 항체, 이를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 이의 용도를 제공한다. 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체는 GREM1의 상이한 영역에 결합하고, 기존의 항-GREM1 항체와 비교할 때 골 형태형성 단백질(BMP) 결합에 대한 GREM1의 활성을 조절하는 데 차별적 효과를 갖는다. 특히, 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체는 비-암 세포에 비해 암 세포에서 선택적으로 BMP 신호전달에 대한 GREM1-매개 억제를 감소시킬 수 있다. 이는 예상치 못한 것이며 암 세포뿐만 아니라 비-암 세포에서도 그렘린의 보편적인 발현으로 인해 항-GREM1 항체로 인한 부작용의 오래 지속되는 문제를 해결한다.

- [0007] 하나의 양태에서, 본 개시내용은 하기 특징 중 적어도 하나를 갖는, 인간 그렘린1(hGREM1)에 대한 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다:
- [0008] a) 비-암 세포보다 암 세포에서 선택적으로 BMP 신호전달에 대한 hGREM1-매개 억제를 감소시킬 수 있음;
- [0009] b) 비-암 세포에서 BMP 신호전달에 대한 hGREM1-매개 억제의 50% 이하의 감소를 나타냄;
- [0010] c) 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 키메라 hGREM1에 결합할 수 있음;
- [0011] d) hGREM1에 결합할 수 있지만 마우스 그렘린1에 특이적으로 결합하지 않음;
- [0012] e) 잔기 번호매김이 서열번호 69를 따르는 것인 잔기 Gln27 및/또는 잔기 Asn33을 포함하는 에피토프에서 hGREM1에 결합하거나, 잔기 Gln27 및/또는 잔기 Asn33을 포함하는 hGREM1 단편에 결합하며, 임의로 hGREM1 단편은 적어도 3 개(예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개) 아미노산 잔기의 길이를 가짐;
- [0013] f) Fortebio에 의해 측정될 때 1 nM 이하의  $K_D$ 에서 hGREM1에 결합할 수 있음;
- [0014] h) ELISA에 의해 측정될 때 50% 초과와 최대 차단 백분율로 BMP7에 대한 hGREM1의 결합을 차단할 수 있음;
- [0015] i) FGFR에 대한 GREM1의 상호작용을 차단할 수 있음; 및/또는
- [0016] j) hGREM1과 DAN 둘 다에 결합할 수 있음.
- [0017] 특정 실시양태에서, 상기 에피토프는 선형 또는 형태적(conformational) 에피토프이다.
- [0018] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 중쇄 가변(VH) 영역 및/또는 경쇄 가변(VL) 영역을 포함하는, 인간 그렘린 1(hGREM1)에 대한 단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 다음:
- [0019] a) 서열번호 1, 11, 21, 31, 114, 119 및 123으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0020] b) 서열번호 2, 12, 22, 32 및 115로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR2,
- [0021] c) 서열번호 3, 13, 23, 33, 116, 120 및 124로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고 /하거나
- [0022] 경쇄 가변 영역은 다음:
- [0023] d) 서열번호 4, 14, 24, 34, 117, 121, 122 및 125로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0024] e) 서열번호 5, 15, 25 및 35로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 LCDR2,
- [0025] f) 서열번호 6, 16, 26, 36 및 118로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0026] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 hGREM1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0027] a) 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0028] b) 서열번호 11의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 12의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 13의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0029] c) 서열번호 21의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 22의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 23의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0030] d) 서열번호 31의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 32의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 33의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0031] e) 서열번호 114의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 116의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0032] f) 서열번호 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 120의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0033] 및

- [0034] g) 서열번호 123의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 124의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역.
- [0035] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 hGREM1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0036] a) 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0037] b) 서열번호 14의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 15의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 16의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0038] c) 서열번호 24의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 25의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 26의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0039] d) 서열번호 34의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 36의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0040] e) 서열번호 117의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0041] f) 서열번호 121의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0042] g) 서열번호 122의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0043] 및
- [0044] h) 서열번호 125의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역.
- [0045] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에서:
- [0046] a) 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며;
- [0047] b) 중쇄 가변 영역은 서열번호 11의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 12의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 13의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 14의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 15의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 16의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며;
- [0048] c) 중쇄 가변 영역은 서열번호 21의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 22의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 23의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 24의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 25의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 26의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며;
- [0049] d) 중쇄 가변 영역은 서열번호 31의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 32의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 33의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 34의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 36의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며;
- [0050] e) 중쇄 가변 영역은 서열번호 114의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 116의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 117의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며;
- [0051] f) 중쇄 가변 영역은 서열번호 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 120의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 121의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며;
- [0052] g) 중쇄 가변 영역은 서열번호 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 120의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 122의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며;

- [0053] 또는
- [0054] h) 중쇄 가변 영역은 서열번호 123의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 124의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 125의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0055] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 hGREM1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄 가변 영역은 서열번호 7, 서열번호 17, 서열번호 27, 서열번호 37, 서열번호 41, 서열번호 43, 서열번호 45, 서열번호 51, 서열번호 53, 서열번호 55, 서열번호 57, 서열번호 126, 서열번호 128, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133, 및 서열번호 134로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 및 적어도 80%의 서열 동일성을 갖지만 hGREM1에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 유지하는 그의 상동성 서열을 포함한다.
- [0056] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 hGREM1에 대한 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄 가변 영역은 서열번호 8, 서열번호 18, 서열번호 28, 서열번호 38, 서열번호 47, 서열번호 49, 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 127, 서열번호 129, 서열번호 130, 서열번호 135, 서열번호 136, 및 서열번호 137로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 및 적어도 80%의 서열 동일성을 갖지만 hGREM1에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 유지하는 그의 상동성 서열을 포함한다.
- [0057] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음을 포함한다:
- [0058] a) 서열번호 7의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 8의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0059] b) 서열번호 17의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 18의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0060] c) 서열번호 27의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 28의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0061] d) 서열번호 37의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 38의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0062] e) 서열번호 126의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 127의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0063] f) 서열번호 128의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 129의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0064] g) 서열번호 128의 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 130의 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0065] h) 서열번호 41, 서열번호 43 및 서열번호 45로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 47 및 서열번호 49로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0066] i) 서열번호 41/47, 41/49, 43/47, 43/49, 45/47, 및 45/49로 이루어진 군으로부터 선택된 한 쌍의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열; 또는
- [0067] j) 서열번호 51, 서열번호 53, 서열번호 55 및 서열번호 57로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 59 및 서열번호 61로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0068] k) 서열번호 51/59, 51/61, 53/59, 53/61, 55/59, 55/61, 57/59 및 57/61로 이루어진 군으로부터 선택된 한 쌍의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열; 또는
- [0069] l) 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133 및 서열번호 134로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 135, 서열번호 136 및 서열번호 137로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는
- [0070] m) 서열번호 131/135, 131/136, 131/137, 132/135, 132/136, 132/137, 133/135, 133/136, 133/137, 134/135, 134/136, 및 134/137로 이루어진 군으로부터 선택된 서열 한 쌍의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역.
- [0071] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 아미노산 잔기 치환 또는 변형을 추가로 포함하지만 hGREM1에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 유지한다.
- [0072] 특정 실시양태에서, 상기 치환 또는 변형 중 적어도 하나는 VH 또는 VL 서열의 하나 이상의 CDR 서열에, 및/또는 하나 이상의 비-CDR 영역에 있다.
- [0073] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 면역글로불린 불변 영역, 임의로 인간 Ig의 불변 영역, 또는 임의로 인간 IgG의 불변 영역을 추가로 포함한다.

- [0074] 특정 실시양태에서, 상기 불변 영역은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 불변 영역을 포함한다.
- [0075] 특정 실시양태에서, 상기 불변 영역은 서열번호 138의 서열을 포함하는 중쇄 불변 영역 및/또는 서열번호 139의 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 포함한다.
- [0076] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 인간화된다.
- [0077] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 디아바디, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv 단편, 이황화 안정화된 Fv 단편(dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, 이중특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 이황화 안정화된 디아바디(ds diabody), 단일쇄 항체 분자(scFv), scFv 이량체(2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화된 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 및 2가 도메인 항체이다.
- [0078] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 이중특이적이다.
- [0079] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 hGREM1의 제1 및 제2 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있거나, hGREM1 및 제2 항원 모두에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [0080] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 제2 항원은 면역 관련 표적이다.
- [0081] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원은 PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, TIM-3, LAG3, A2AR, CD160, 2B4, TGFβ, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, OX40, CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD47, CD122, ICAM-1, IDO, NKG2C, SLAMF7, SIGLEC7, NKp80, CD160, B7-H3, LFA-1, ICOS, 4-1BB, GITR, BAFRR, HVEM, CD7, LIGHT, IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, CD3, CD16 또는 CD83을 포함한다.
- [0082] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원은 종양 항원을 포함한다.
- [0083] 특정 실시양태에서, 상기 종양 항원은 종양 특이적 항원 또는 종양 관련 항원을 포함한다.
- [0084] 특정 실시양태에서, 상기 종양 항원은 전립선 특이 항원(PSA), CA-125, 강글리오사이드 G(D2), G(M2) 및 G(D3), CD20, CD52, CD33, Ep-CAM, CEA, 봄베신 유사 펩타이드, HER2/neu, 표피 성장 인자 수용체(EGFR), erbB2, erbB3/HER3, erbB4, CD44v6, Ki-67, 암 관련 뮤신, VEGF, VEGFRs(예컨대 VEGFR3), 에스트로젠 수용체, 루이스(Lewis)-Y 항원, TGFβ1, IGF-1 수용체, EGFα, c-Kit 수용체, 트랜스페린 수용체, 클라우딘(Claudin) 18.2, GPC-3, 넥틴(Nectin)-4, ROR1, 메토텔린, PCMA, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15, BCR-ABL, E2APRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, IL-2R, CO17-1A, TROP2, 또는 LIV-1을 포함한다.
- [0085] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 마우스 그렙린1에 대해 교차 반응성이 아니다.
- [0086] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 마우스 그렙린1에 대해 교차-반응성이다.
- [0087] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 접합체 부분에 연결된다.
- [0088] 특정 실시양태에서, 상기 접합체 부분은 제거-변형제(clearance-modifying agent), 화학요법제, 독소, 방사성 동위원소, 란타나이드, 발광 표지, 형광 표지, 효소-기질 표지, DNA-알킬화제, 토포이소머라제 억제제, 튜블린 결합제, 또는 안드로젠 수용체 억제제와 같은 기타 항암 약물을 포함한다.
- [0089] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 hGREM1에 대한 결합에 대해 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0090] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물, 또는 키트를 제공한다.
- [0091] 특정 실시양태에서, 상기 약학 조성물 또는 키트는 제2 치료제를 추가로 포함한다.
- [0092] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0093] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제공되는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공한다.
- [0094] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제공되는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

- [0095] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제공되는 백터가 발현될 수 있는 조건 하에 본원에서 제공되는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함하는, 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현시키는 방법을 제공한다.
- [0096] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 대상체에게 치료 유효량의 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 또는 약학 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 GREM1-관련 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0097] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 항-인간 GREM1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 GREM1 관련 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 항체 또는 이의 단편은:
- [0098] a) 잔기 번호가 서열번호 69를 따르는 것인 잔기 Gln27 및/또는 잔기 Asn33을 포함하는 에피토프에서 hGREM1에 결합할 수 있고/있거나;
- [0099] b) 잔기 Gln27 및/또는 잔기 Asn33을 포함하는 hGREM1 단편에 결합할 수 있고, 선택적으로 hGREM1 단편은 적어도 3개(예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개) 아미노산 잔기의 길이를 가지고/가지거나;
- [0100] c) 비-암 세포에 비해 암 세포에서 선택적으로 BMP 신호전달에 대한 hGREM1-매개 억제를 감소시킬 수 있고/있거나;
- [0101] d) 비-암 세포에서 BMP 신호전달에 대한 hGREM1-매개 억제의 50% 이하의 감소를 나타내고/내거나;
- [0102] e) 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 키메라 hGREM1에 결합할 수 있고/있거나;
- [0103] f) Fortebio에 의해 측정될 때 1 nM 이하의  $K_D$ 에서 hGREM1에 결합할 수 있고/있거나;
- [0104] h) ELISA에 의해 측정될 때 50% 초과와 최대 차단 백분율로 hGREM1과 BMP7의 결합을 차단할 수 있고/있거나;
- [0105] i) GREM1과 FGFR의 상호작용을 차단할 수 있다.
- [0106] 특정 실시양태에서, GREM1 관련 질환 또는 병태는 암, 섬유성 질환, 혈관신생, 녹내장 또는 망막 질환, 신장 질환, 폐동맥 고혈압, 또는 골관절염(OA)으로 이루어진 군에서 선택된다.
- [0107] 특정 실시양태에서, 상기 암은 GREM1-발현 암이다. 특정 실시양태에서, GREM1-발현 암은 또한 PD-L1-발현이다. 특정 실시양태에서, GREM1-발현 암은 PD-L1-발현 암이 아니다. 특정 실시양태에서, GREM1-발현 암은 PD-1/PD-L1 축 억제제를 사용한 치료에 대해 내성이거나 불응성이다.
- [0108] 특정 실시양태에서, 대상체는 GREM1-발현 암 세포를 갖거나, GREM1-발현 암 미세환경을 갖는 것으로 확인된다.
- [0109] 특정 실시양태에서, 암은 고형 종양 또는 혈액암이다.
- [0110] 특정 실시양태에서, 고형 종양은 부신피질 암종, 항문암, 정상세포종, 소아 소뇌 또는 대뇌, 기저 세포 암종, 담관암, 방광암, 골종양, 뇌암, 소뇌 정상세포종, 대뇌 정상세포종/악성 신경아교종, 뇌실막종, 수모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 시각 경로 및 시상하부 신경아교종, 유방암, 버킷 림프종, 자궁경부암, 결장암, 폐기종, 자궁내막암, 식도암, 유잉 육종(Ewing's sarcoma), 망막모세포종, 위(위)암, 신경아교종, 두경부암, 심장암, 호지킨 림프종, 섬 세포 암종(내분비 췌장), 카포시 육종, 신장암(신세포암), 후두암, 간암, 폐암, 신경모세포종, 비호지킨 림프종, 난소암, 췌장암, 인두암, 전립선암, 직장암, 신세포 암종(신장암), 망막모세포종, 유잉계 종양(Ewing family of tumor), 피부암, 위암, 고환암, 인후암, 갑상선암, 또는 질암이다.
- [0111] 특정 실시양태에서, 혈액암은 백혈병(예컨대 급성 림프구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML)), 림프종(예컨대 호지킨 림프종), 또는 비호지킨 림프종(예컨대 발덴스트롬(Waldenstrom) 마크로글로불린혈증(WM)), 또는 골수종(예컨대 다발성 골수종(MM))이다.
- [0112] 특정 실시양태에서, 암은 전립선암, 위식도암, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암), 간암, 췌장암, 유방암, 기관지암, 골암, 간 및 담관 암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 두경부암, 척추암, 뇌암, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막암, 결장암, 결장직장암, 직장암, 항문암, 위장관암, 피부암, 뇌하수체암, 위암, 질암, 갑상선암, 교모세포종, 정상세포종, 흑색종, 골수이형성 증후군, 육종, 기형종, 신경아교종, 또는 선암종이다.
- [0113] 특정 실시양태에서, 암은 전립선암, 위-식도암, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암), 간암, 결장암, 결장직장암, 신경아교종, 췌장암, 방광암 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 암은 삼중 음성

유방암이다. 특정 실시양태에서, 암은 다발성 골수종이다.

- [0114] 특정 실시양태에서, 암은 전립선암이다.
- [0115] 특정 실시양태에서, 섬유성 질환은 폐, 간, 신장, 눈, 피부, 심장, 소화관 또는 근육의 섬유성 질환이다.
- [0116] 특정 실시예에서, 대상체는 인간이다.
- [0117] 특정 실시양태에서, 투여는 경구, 비강, 정맥내, 피하, 설하, 또는 근육내 투여를 통한 것이다.
- [0118] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 방법은 치료 유효량의 제2 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0119] 특정 실시양태에서, 상기 제2 치료제는 항암 요법을 포함하고, 임의로 상기 항암 요법은 화학요법제(예를 들어, 시스플라틴), 항암 약물, 방사선 요법, 면역요법제(예를 들어, 면역 체크포인트 조절제, 예를 들어 PD-1/PD-L1 축 억제제, 및 TGF-베타 억제제), 항혈관형성제(예컨대 VEGFR-1, VEGFR-2 및 VEGFR-3와 같은 VEGFR의 길항제), 표적 치료제, 세포 치료제, 유전자 치료제, 호르몬 치료제, 사이토킨, 완화 치료, 암 치료를 위한 수술(예컨대 종양 절제술), 하나 이상의 항구토제, 화학 요법으로부터 발생하는 합병증 치료, 암 환자를 위한 식이 보충제(예컨대 인돌-3-카르비놀), 종양 미세환경을 조절하는 제제(예컨대 PD-L1 결합 부분 및 TGF-베타 수용체의 세포 외 도메인을 포함하는 이중기능성 분자), 또는 항섬유화 요법(예를 들어, BMP7 치료, ACE 억제제(또는 ARB), 항-MASP2 항체, 엔도텔린 수용체 길항제, NRF2 억제제 스테로이드, CTLA4-IgG 또는 TNF 억제제)으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 제2 치료제는 시스플라틴을 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 치료제는 PD-1/PD-L1 축 억제제를 포함한다.
- [0120] 특정 실시양태에서, 항암 요법은 항-전립선암 약물을 포함한다.
- [0121] 특정 실시양태에서, 항-전립선암 약물은 안드로겐 축 억제제; 안드로겐 합성 억제제; 폴리 ADP-리보스 중합효소(PARP) 억제제; 또는 이들의 조합물을 포함한다.
- [0122] 특정 실시양태에서, 상기 안드로겐 축 억제제는 황체형성 호르몬 방출 호르몬(LHRH) 작용제, LHRH 길항제 및 안드로겐 수용체 길항제로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0123] 특정 실시양태에서, 안드로겐 축 억제제는 데가렐릭스, 바이칼루타미드, 플루타미드, 닐루타미드, 아팔루타미드, 다롤루타미드, 엔잘루타미드, 또는 아비라테론이다. 특정 실시양태에서, 안드로겐 합성 억제제는 아비라테론 아세테이트 또는 케토코나졸이다. 특정 실시양태에서, PARP 억제제는 올라파립, 또는 루카파립이다.
- [0124] 특정 실시양태에서, 항-전립선암 약물은 아비라테론 아세테이트, 아팔루타미드, 바이칼루타미드, 카바지탁셀, 카소텍스(Bicalutamide), 다롤루타미드, 데가렐릭스, 도세탁셀, 엘리가드(Leuprolide Acetate), 엔잘루타미드, 에를레아다(Erleada: Apalutamide), 피르마곤(Degarelix), 플루타미드, 고세렐린 아세테이트, 제브타나(Cabazitaxel), 류프롤리드 아세테이트, 루프론(Leuprolide Acetate), 루프론 데포트(Leuprolide Acetate), 린파르자(Olaparib), 미톡산트론 하이드로클로라이드, 닐란드론(Nilutamide), 닐루타미드, 누베카(Darolutamide), 올라파립, 프로벤제(Sipuleucel-T), 라둠 223 디클로라이드, 루브라카(Rucaparib Camsylate), 루카파립 캄실레이트, 시플레우셀-T, 탁소테레(Docetaxel), 크소피고(Xofigo: Radium 223 Dichloride), 크탄디(Xtandi: Enzalutamide), 졸라텍스(Goserelin Acetate) 및 자이티가(Zytiga: Abiraterone Acetate)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0125] 특정 실시양태에서, 제2 치료제는 인돌-3-카르비놀을 포함한다.
- [0126] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0127] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 샘플을 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키고, 샘플에서 GREM1의 존재 또는 양을 결정하는 것을 포함하는, 샘플에서 GREM1의 존재 또는 양을 검출하는 방법을 제공한다.
- [0128] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 대상체에서 GREM1-관련 질환 또는 병태를 치료하기 위한 약제의 제조에서의 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도를 제공한다.
- [0129] 특정 실시양태에서, 상기 GREM1 관련 질환 또는 병태는 암이다.
- [0130] 특정 실시양태에서, 상기 GREM1-관련 질환 또는 병태는 섬유성 질환, 혈관신생, 녹내장, 망막 질환, 신장 질환, 폐동맥 고혈압, 또는 골관절염(OA)이다.

**도면의 간단한 설명**

[0131]

도 1은 각각 ELISA에 의해 측정될 때와 같은, 인간 그렘린1(hGREM1)(도 1a, 1c) 및 마우스 그렘린1(도 1b, 1c)에 대한 항-그렘린1 항체 69H5, 56C11, 22F1 및 14E3의 결합, 및 인간 그렘린1(hGREM1)(도 1d, 1f) 및 마우스 그렘린1(도 1e, 1f)에 대한 항-그렘린1 항체 42B9, 36F5 및 67G11의 결합을 보여준다.

도 2는 ELISA에 의해 측정될 때와 같은, 그렘린-2, COCO, 및 DAN-hFc에 비해, 그렘린-1에 대한 항-그렘린1 항체 14E3의 결합 특이성을 보여준다.

도 3은 ELISA에 의해 측정될 때와 같은, BMP2/4/7에 대한 그렘린1 또는 XM5(그렘린 1-DAN 융합 단백질)의 결합 친화도(도 3a, 3d), 항-그렘린1 항체 69H5, 56C11, 14E3 또는 벤치마크 항체 6245P에 의한 BMP2(도 3b) 내지 BMP4(도 3c)에 대한 그렘린1에 대한 결합 활성의 차단, 및 항-그렘린1 항체 42B9, 36F5, 67G11, 및 14E3 HaLa 또는 벤치마크 항체 6245P에 의한 그렘린1의 BMP2(도 3e, 3h), 또는 BMP4(도 3f, 3h), 또는 BMP7(도 3g, 3h)에 대한 결합 활성 차단을 보여준다.

도 4는 BMP-유도된 리포터 검정에 의해 측정될 때와 같은, 항-그렘린1 항체 69H5, 56C11, 22F1, 14E3 및 벤치마크 항체 6245P에 의한 BMP4 신호전달에 대한 그렘린 매개 억제 효과의 차단을 보여준다.

도 5는 BMP4-유도된 ATDC-5 세포 분화에 의해 측정될 때와 같은, 벤치마크 항체 6245P에 비해, 항-그렘린1 항체 14E3(도 5a), 22F1(도 5b), 56C11(도 5c), 및 69H5(도 5d)에 의한 BMP4 신호전달에 대한 그렘린 매개 억제의 차단을 보여준다.

도 6은 웨스턴 블롯에 의해 측정될 때와 같은, 전립선 암 세포에서(도 6b), 그렘린1이 항-그렘린1 항체 14E3, 22F1, 56C11, 및 69H5에 의해 회복되는, 전립선암 세포(PC-3 세포)(도 6a)에서 BMP 4 유도된 smad 인산화의 수준을 감소시키는 것을 보여준다.

도 7은 암 세포 및 비-암 세포 상에서 항-그렘린1 항체 14E3에 의한 BMP4 신호전달에 대한 그렘린 매개 억제의 차단을 보여준다.

도 8은 ELISA에 의해 측정될 때와 같이, hGREM1에 대한 키메라 항-그렘린1 항체 56C11-C 및 14E3-C의 결합 친화도를 보여준다.

도 9는 Biacore에 의해 측정될 때와 같이, hGREM1에 대한 키메라 항-그렘린1 항체 14E3-C 및 22F1-C의 결합 동역학을 보여준다.

도 10은 에피토프 연구로부터의 결과를 보여주며, 여기서 도 10a-c는 경쟁 ELISA 검정에 의해 측정될 때와 같이 항-그렘린1 항체 14E3, 22F1, 56C11, 및 69H5의 에피토프 비닝 결과(도 10a), 항체 14E3-C, 22F1-C 및 벤치마크 항체 6245P에 대한 교차 경쟁 검정 결과(도 10b), 및 ELISA에 의해 측정될 때와 같이 항체 14E3-C 및 벤치마크 항체 6245P의 그렘린-DAN 융합 단백질 XM5에 대한 결합(도 10c)을 보여주며, 도 10d는 생물층 간섭계(BLI: Biolayer Interferometry) 검정에 의해 측정될 때와 같은 14E3의 에피토프 맵핑을 보여주고, 도 10e 및 10f는 ELISA에 의해 측정될 때와 같이 인간 그렘린 또는 그렘린-DAN 융합 단백질 XM5에 대한 항체 42B9, 36F5 및 67G11의 결합을 보여준다.

도 11a 및 도 11b는 Fortebio에 의해 측정될 때와 같이 본원에서 제공되는 항-그렘린1 항체 14E3, 56C11, 22F1, 69H5 및 벤치마크 항체 6245P의 에피토프 분석 결과를 보여준다. 그 결과는 14E3이 6245P보다 에피토프가 완전히 겹치지 않는 반면, 56C11은 6245P와 에피토프가 유사함을 보여주었다.

도 12는 벤치마크 항체 6245P와 비교하여, ELISA(도 12a-c) 또는 Fortebio(도 12d)에 의해 측정될 때와 같이 hGREM1에 대한 인간화된 항-hGREM 1 항체 14E3 및 22F1의 결합 친화도를 보여준다.

도 13은 항-GREM1 항체 14E3이 PC3 이종이식편 모델에서 전립선암의 종양 부피(도 13a) 및 종양 중량(도 13b)을 감소시켰음을 보여준다.

도 14는 CT-26 결장암 모델에 대한 항-GREM 1 항체 56C11의 항종양 효과를 보여준다.

도 15a 및 도 15b는 CT-26 모델에서 항-mGREM1 항체 및 면역 체크포인트 억제제(예를 들어, MPDL-3280A)를 사용한 병용 요법의 상승적 항종양 효과를 보여준다.

도 16은 항-GREM1 항체(14E3) 또는 항-PD-L1 항체(22C3)에 의한 E7 PDX 종양 샘플에서 GREM1 또는 PD-L1의 IHC

염색을 보여준다.

도 17a 및 도 17b는 인간화 14E3(hzd 14E3) 단독 또는 시스플라틴과의 조합이 그램린-양성 식도 PDX 모델에서 종양 성장을 억제함을 보여준다. 인간화된 14E3 단독으로 약 43%의 종양 성장 억제(TGI)를 달성했다. 시스플라틴 단독으로 약 60% TGI를 달성했다. 인간화 14E3과 시스플라틴의 조합은 약 64% TGI를 달성했다.

도 18은 ELISA에 의해 측정될 때와 같이, FGFR1에 대한 그램린의 결합(도 18a), 및 huIgG1, hIgG4, 항-그램린1 항체 42B9, 36F5, 67G11, 69H5-chi, 36F5-chi, 22F1-chi, 56C11-chi 및 14E3 HaLai의 FGFR1, 뿐만 아니라 벤치마크 항체 6245P 각각에 대한 그램린의 결합 차단 활성(도 18b, 18c)을 보여준다.

도 19는 그램린-his 및 DAN-his에 대한 하이브리도마 36F5(도 19a) 및 키메라 36F5(36F5-chi)(도 19b)의 ELISA 결합 활성을 보여준다.

도 20은 키메라 36F5(36F5-chi)가 DAN 단백질에 대한 BMP4 결합(도 20a) 및 DAN 단백질에 대한 BMP2 결합(도 20b)을 차단함을 보여준다.

도 21은 EMT6/hPD-L1 종양 모델에서 하이브리도마 36F5의 항종양 활성을 보여준다. 도 21a는 EMT6/hPD-L1 종양 모델이 항-PD-L1 항체 AM4B6에 대해 불량한 반응성을 가짐을 보여준다. 도 21b는 하이브리도마 36F5가 EMT6/hPD-L1 종양 모델에서 항종양 활성을 나타냄을 보여준다.

도 22는 E7 종양 모델에서 하이브리도마 14E3 또는 36F5의 항종양 활성을 보여준다. 도 22a는 E7 종양 모델이 항-PD-1 항체 니볼루맵에 대해 불량한 반응성을 가지며 하이브리도마 14E3이 E7 종양 모델에서 항종양 활성을 나타냄을 보여준다. 도 22b는 E7 종양 모델이 항-PD-1 항체 니볼루맵에 대해 불량한 반응성을 가지며 하이브리도마 36F5가 E7 종양 모델에서 항종양 활성을 나타냄을 보여준다.

도 23은 MC38/hPD-L1 종양 모델에서 항-PDL1 항체와 56C11의 병용 요법의 항-종양 활성을 보여준다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0132] 본 개시내용의 다음 설명은 단지 본 개시내용의 다양한 실시양태를 설명하기 위한 것이다. 이와 같이, 논의된 특정 변형은 본 개시내용의 범위에 대한 제한으로 해석되어서는 안 된다. 본 개시내용의 범위를 벗어나지 않고 다양한 등가물, 변경 및 수정이 가능함은 본 기술 분야의 통상의 기술자에게 자명하며, 이러한 균등한 실시양태는 본원에 포함되는 것으로 이해되어야 한다. 공보, 특허 및 특허 출원을 포함하여 본원에서 인용된 모든 참고 문헌은 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0133] **정의**

[0134] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "a", "an", "the" 및 본 발명의 맥락에서(특히 청구범위의 맥락에서) 사용된 유사 용어는 본원에서 달리 명시되지 않았거나 문맥에 의해 명백히 변박되지 않는 한 단수 및 복수형을 모두 포괄하는 것으로 간주된다.

[0135] 본원에서 사용되는 용어 "항체"는 특정 항원에 결합하는 임의의 면역글로불린, 단클론 항체, 다클론 항체, 다가 항체, 2가 항체, 1가 항체, 다중특이적 항체 또는 이중특이적 항체를 포함한다. 천연 무순상 항체는 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함한다. 포유류의 중쇄는 알파, 델타, 엡실론, 감마, 및 뮤로 분류되며, 각 중쇄는 가변 영역( $V_H$ )과 제1, 제2 및 제3 불변 영역(각각  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$ )으로 이루어지고; 포유류의 경쇄는  $\lambda$  또는  $\kappa$ 로 분류되는 반면, 각각의 경쇄는 가변 영역( $V_L$ )과 불변 영역으로 이루어져 있다. 항체는 이항화 결합을 통해 함께 결합된 2개의 중쇄의 제2 및 제3 불변 영역으로 이루어진 Y의 줄기가 있는 "Y" 모양을 가지고 있다. Y의 각 팔은 단일 경쇄의 가변 영역과 불변 영역에 결합된 단일 중쇄의 가변 영역과 제1 불변 영역을 포함한다. 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 항원 결합을 담당한다. 두 사슬에서 가변 영역은 일반적으로 상보성 결정 영역(CDR)(LCD1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 CDR, HCDR1, HCDR2, HCDR3을 포함하는 중쇄 CDR)으로 불리는 3개의 고도로 가변적인 루프를 포함한다. 본원에 개시된 항체 및 항원 결합 도메인에 대한 CDR 경계는 문헌: Kabat, IMGT, AbM, Chothia, 또는 Al-Lazikani(Al-Lazikani, B., Chothia, C., Lesk, A.M., J. Mol. Biol., 273(4), 927(1997), Chothia, C. 등, J Mol Biol. Dec 5;186(3):651-63(1985), Chothia, C. 및 Lesk, A.M., J.Mol.Biol., 196,901(1987), N. R. Whitelegg 등, Protein Engineering, v13(12), 819-824(2000), Chothia, C. 등, Nature.Dec 21-28; 342(6252):877-83 (1989), Kabat E.A. 등, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), Marie-Paule Lefranc 등, Developmental and Comparative Immunology, 27: 55-77 (2003) ); Marie-Paule Lefranc 등, Immunome Research, 1(3), (2005); Marie-Paule Lefranc, Molecular Biology of B cells

(second edition), chapter 26, 481-514, (2015))의 관례에 의해 정의되거나 확인될 수 있다. 3개의 CDR은 프레임워크 영역(FR)으로 알려진 측면 스트레치 사이에 삽입되며, 이는 CDR보다 더 고도로 보존되고 추가 변 루프를 지지하는 스캐폴드를 형성한다. 중쇄와 경쇄의 불변영역은 항원 결합에는 관여하지 않지만 다양한 이펙터 기능을 나타낸다. 항체는 그의 중쇄의 불변 영역의 아미노산 서열에 따라 분류된다. 항체의 5가지 주요 클래스 또는 동중형은 IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM이며, 이는 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마, 및 뮤 중쇄의 존재를 특징으로 한다. 몇 가지 주요 항체 부류는 IgG1(감마1 중쇄), IgG2(감마2 중쇄), IgG3(감마3 중쇄), IgG4(감마4 중쇄), IgA1(알파1 중쇄), 또는 IgA2(알파2 중쇄)로 나뉘어진다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체는 이의 임의의 항원 결합 단편을 포함한다.

- [0136] 본원에 사용된 용어 "항원 결합 단편"은 하나 이상의 CDR을 포함하는 항체의 단편, 또는 항원에 결합하지만 무손상 무접촉 항체 구조를 포함하지 않는 임의의 다른 항체 부분으로부터 형성된 항체 단편을 지칭한다. 항원 결합 단편의 예는 제한 없이, 디아바디, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv 단편, 이황화 안정화된 Fv 단편(dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, 이중특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 이황화 안정화된 디아바디(ds diabody), 단일 사슬 항체 분자(scFv), scFv 이량체(2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화된 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 및 2가 도메인 항체를 포함한다. 항원 결합 단편은 부모 항체가 결합하는 동일한 항원에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 항원 결합 단편은 특정 부모 항체로부터의 하나 이상의 CDR을 포함할 수 있다.
- [0137] 항체에 관한 "Fab"는 이황화 결합에 의해 단일 중쇄의 가변 영역 및 제1 불변 영역에 결합된 단일 경쇄(가변 및 불변 영역 모두)로 이루어진 항체의 1가 항원 결합 단편을 언급한다. Fab는 힌지 영역의 중쇄 사이에서 이황화 결합의 N-말단에 근접한 잔기에서 항체의 파괴인 분해에 의해 얻을 수 있다.
- [0138] "Fab'"는 힌지 영역의 중쇄 사이의 이황화 결합의 C-말단에 근접한 잔기에서 항체의 펩신 분해에 의해 수득될 수 있으며 따라서 힌지 영역에 있는 소수의 잔기(하나 이상의 시스테인 포함)가 Fab와 다른, 힌지 영역의 일부를 포함하는 Fab 단편을 언급한다.
- [0139] "F(ab')<sub>2</sub>"는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄의 일부를 포함하는 Fab'의 이량체를 언급한다.
- [0140] 항체에 관한 "Fv"는 완전한 항원 결합 부위를 보유하는 항체의 가장 작은 단편을 언급한다. Fv 단편은 단일 중쇄의 가변 영역에 결합된 단일 경쇄의 가변 영역으로 이루어져 있다. "dsFv"는 단일 경쇄의 가변 영역과 단일 중쇄의 가변 영역 사이의 연결이 이황화 결합인 이황화 안정화된 Fv 단편을 언급한다.
- [0141] "단일쇄 Fv 항체" 또는 "scFv"는 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역이 직접 또는 펩타이드 링커 서열을 통해서로 연결된 조작된 항체를 언급한다(참조: Huston JS et al. Proc Natl Acad Sci USA, 85:5879(1988)). "scFv 이량체"는 링커가 있는 2개의 중쇄 가변 영역 및 2개의 경쇄 가변 영역을 포함하는 단일 사슬을 언급한다. 특정 실시양태에서, "scFv 이량체"는 한 부분의 V<sub>H</sub>가 다른 부분의 V<sub>L</sub>과 배위되어 동일한 항원(또는 에피토프) 또는 다른 항원(또는 에피토프)을 표적으로 할 수 있는 2개의 결합 부위를 형성하도록 다른 V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 부분과 이량체화된 V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>(펩타이드 링커에 의해 연결됨)을 포함하는 2가 디아바디 또는 2가 ScFv(BsFv)이다. 다른 실시양태에서, "scFv 이량체"는 V<sub>H1</sub> 및 V<sub>L1</sub>이 배위되고 V<sub>H2</sub> 및 V<sub>L2</sub>가 배위되어 배위된 각 쌍은 다른 항원 특이성을 가지도록 V<sub>L1</sub>-V<sub>H2</sub>(펩타이드 링커에 의해 연결됨)와 회합된 V<sub>H1</sub>-V<sub>L2</sub>(또한 펩타이드 링커에 의해 연결됨)를 포함하는 이중특이적 디아바디이다.
- [0142] "단일쇄 Fv-Fc 항체" 또는 "scFv-Fc"는 항체의 Fc 영역에 연결된 scFv로 이루어진 조작된 항체를 언급한다.
- [0143] "낙타화된 단일 도메인 항체", "중쇄 항체", "나노바디" 또는 "HCAb"는 2개의 V<sub>H</sub> 도메인을 함유하고 경쇄를 함유하지 않는 항체를 언급한다(참조: Riechmann L. and Muyldermans S., *J Immunol Methods*. Dec 10;231(1-2):25-38 (1999), Muyldermans S., *J Biotechnol*. Jun;74(4):277-302 (2001), WO94/04678, WO94/25591, 미국 특허 제6,005,079호). 중쇄 항체는 원래 낙타과(낙타, 단봉낙타, 및 라마)에서 얻었다. 경쇄가 없지만 낙타화된 항체는 진정한 항원 결합 레퍼토리를 갖는다(참조: Hamers-Casterman C. et al., *Nature*. Jun 3;363(6428):446-8 (1993); Nguyen VK. et al. "낙타과의 중쇄 항체; 진화적 혁신 사례" *Immunogenetics*. Apr;54(1):39-47 (2002); Nguyen VK. et al. *Immunology*. May;109(1):93-101 (2003)). 중쇄 항체의 가변 도메인(V<sub>H</sub> 도메인)은 적응 면역 반응에 의해 생성된 알려진 가장 작은 항원 결합 단위를 나타낸다(참조: Koch-Nolte F. et al., *FASEB J*. Nov;21(13):3490-8. Epub 2007년 6월 15일(2007)). "디아바디"는 2개의 항원 결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 포함하며, 여기서 상기 단편은 단일 폴리펩타이드 사슬(V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 또는 V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>)에서 V<sub>L</sub>

도메인에 연결된  $V_H$  도메인을 포함한다(예를 들어, 문헌: Holliger P. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jul 15;90(14):6444-8 (1993); EP404097; WO93/11161 참조). 링커가 너무 짧기 때문에 동일한 사슬의 두 도메인은 쌍을 이룰 수 없으며, 따라서 상기 도메인은 다른 사슬의 상보적인 도메인과 강제로 쌍을 이루어, 이로써 2개의 항원 결합 부위를 생성하게 된다. 상기 항원 결합 부위는 다른 항원(또는 에피토프)과 동일한 것을 표적으로 할 수 있다.

- [0144] "도메인 항체"는 중쇄의 가변 영역 또는 경쇄의 가변 영역만을 포함하는 항체 단편을 언급한다. 특정 실시양태에서, 2개 이상의  $V_H$  도메인은 펩타이드 링커와 공유 결합되어 2가 또는 다가 도메인 항체를 형성한다. 2가 도메인 항체의 2개의  $V_H$  도메인은 동일하거나 상이한 항원을 표적으로 할 수 있다.
- [0145] 특정 실시양태에서, "(dsFv)<sub>2</sub>"는 3개의 펩타이드 사슬을 포함한다: 펩타이드 링커에 의해 연결되고 2개의  $V_L$  부분에 이황화 가교에 의해 결합된 2개의  $V_H$  부분.
- [0146] 특정 실시양태에서, "이중특이적 ds 디아바디"는  $V_{H1}$ 과  $V_{L1}$  사이의 이황화 가교를 통해  $V_{L1}$ - $V_{H2}$ (또한 펩타이드 링커에 의해 연결됨)에 결합된  $V_{H1}$ - $V_{L2}$ (펩타이드 링커에 의해 연결됨)를 포함한다.
- [0147] 특정 실시양태에서, "이중특이적 dsFv" 또는 "dsFv-dsFv"는 3개의 펩타이드 사슬을 포함한다: 중쇄가 펩타이드 링커(예를 들어, 긴 유연한 링커)에 의해 결합되고 이황화 가교를 통해 각각  $V_{L1}$  및  $V_{L2}$  부분에 쌍을 이루는  $V_{H1}$ - $V_{H2}$  부분. 각각의 이황화 쌍을 이룬 중쇄 및 경쇄는 상이한 항원 특이성을 갖는다.
- [0148] 본원에서 사용되는 용어 "인간화된"은 항체 또는 항원 결합 단편이 비-인간 동물로부터 유래된 CDR, 인간으로부터 유래된 FR 영역, 및 적용가능한 경우, 인간으로부터 유래된 불변 영역을 포함함을 의미한다. 특정 실시양태에서, 인간화된 그래핀 항체의 가변 영역 프레임워크의 아미노산 잔기는 서열 최적화를 위해 대체된다. 특정 실시양태에서, 인간화된 그래핀 항체 사슬의 가변 영역 프레임워크 서열은 상응하는 인간 가변 영역 프레임워크 서열과 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일하다.
- [0149] 본원에 사용된 용어 "키메라"는 한 종으로부터 유래된 중쇄 및/또는 경쇄의 일부, 및 다른 종으로부터 유래된 나머지 중쇄 및/또는 경쇄를 갖는 항체 또는 항원 결합 단편을 언급한다. 예시적인 예에서, 키메라 항체는 인간으로부터 유래된 불변 영역 및 마우스와 같은 비인간 종으로부터 유래된 가변 영역을 포함할 수 있다.
- [0150] "생식계열 서열"이라는 용어는 생식계열 번역글로불린 가변 영역 서열에 의해 코딩된 다른 모든 공지된 가변 영역과 비교하여 참조 가변 영역 아미노산 서열 또는 하위서열과 가장 높은 결정된 아미노산 서열 동일성을 공유하는 가변 영역 아미노산 서열 또는 하위서열을 코딩하는 핵산 서열을 언급한다. 생식계열 서열은 또한 모든 다른 평가된 가변 영역 아미노산 서열과 비교하여 참조 가변 영역 아미노산 서열 또는 하위 서열과 가장 높은 아미노산 서열 동일성을 갖는 가변 영역 아미노산 서열 또는 하위 서열을 언급할 수 있다. 생식계열 서열은 프레임워크 영역만, 상보성 결정 영역만, 프레임워크 및 상보성 결정 영역, 가변 절편(상기 정의된 바와 같음), 또는 가변 영역을 포함하는 서열 또는 하위서열의 다른 조합일 수 있다. 서열 동일성은 본원에 기재된 방법, 예를 들어 BLAST, ALIGN 또는 본 기술분야에 공지된 다른 정렬 알고리즘을 사용하여 2개의 서열을 정렬하여 결정될 수 있다. 생식계열 핵산 또는 아미노산 서열은 참조 가변 영역 핵산 또는 아미노산 서열과 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 가질 수 있다. 예를 들어, 공개적으로 이용 가능한 국제 ImMunoGeneTics 데이터베이스(IMG) 및 V-base를 통하여 생식계열 서열을 결정할 수 있다.
- [0151] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 "항-인간 그래핀1 항체", "항-hGREM1 항체" 또는 "인간 그래핀1에 대한 항체"는 예를 들어, 치료용으로 제공하기 위한 충분한 특이성 및/또는 친화도를 갖는 인간 그래핀1에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 언급한다.
- [0152] 본원에서 사용되는 용어 "친화도"는 번역글로불린 분자(즉, 항체) 또는 이의 단편과 항원 사이의 비공유 결합적 상호작용의 강도를 언급한다.
- [0153] 본원에서 사용되는 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하다"는 예를 들어 항체와 항원 사이와 같은 두 분자 사이의 비-무작위 결합 반응을 언급한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편은  $\leq 10^{-6}$  M(예를 들어,  $\leq 5 \times 10^{-7}$  M,  $\leq 2 \times 10^{-7}$  M,  $\leq 10^{-7}$  M,  $\leq 5 \times 10^{-8}$  M,  $\leq 2 \times 10^{-8}$  M,  $\leq 10^{-8}$  M,  $\leq 5 \times 10^{-9}$  M,  $\leq 4 \times 10^{-9}$  M,  $\leq 3 \times 10^{-9}$  M,  $\leq 2 \times 10^{-9}$  M, 또는  $\leq 10^{-9}$  M)의 결합 친화도( $K_D$ )로 인간 및/또는 비-인간 그래핀1에 특이

적으로 결합한다. 본원에서 사용되는  $K_D$ 는 해리율 대 회합율의 비율( $k_{off}/k_{on}$ )을 언급하며, 이는 표면 플라즈몬 공명법, 마이크로스케일 열영동 방법, HPLC-MS 방법 및 유세포 분석(예컨대 FACS) 방법을 포함하나 이에 제한되지 않는 관련 기술분야에 공지된 임의의 통상적인 방법을 사용하여 결정할 수 있다. 특정 실시양태에서,  $K_D$  값은 유세포 분석법을 사용하여 적절하게 결정될 수 있다. 다양한 면역검정 포맷을 사용하여 특정 단백질과 특이적으로 면역반응성인 항체를 선택할 수 있다. 예를 들어, 고체상 ELISA 면역분석은 단백질과 특이적으로 면역반응성인 항체를 선택하기 위해 일상적으로 사용된다(예를 들어, 특이적 면역반응성을 결정하는 데 사용할 수 있는 면역분석 형식 및 조건에 대한 설명은 문헌: Harlow & Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual(1998)을 참조한다). 전형적으로 특이적 또는 선택적 결합 반응은 배경 신호에 비해 적어도 2배, 보다 전형적으로는 배경에 비해 적어도 10 내지 100배의 신호를 생산할 것이다.

[0154] 본원에서 사용되는 용어 "아미노산"은 각 아미노산에 특이적인 측쇄와 함께 아민(-NH<sub>2</sub>) 및 카르복실(-COOH) 작용기를 함유하는 유기 화합물을 언급한다. 아미노산의 명칭도 본 개시내용에서 표준 1문자 또는 3문자 코드로 표시하며, 이를 정리하면 다음과 같다.

명칭	3 문자 코드	1 문자 코드
알라닌	Ala	A
아르기닌	Arg	R
아스파라긴	Asn	N
아스파르트산	Asp	D
시스테인	Cys	C
글루탐산	Glu	E
글루타민	Gln	Q
글리신	Gly	G
히스티딘	His	H
이소류신	Ile	I
류신	Leu	L
리신	Lys	K
메티오닌	Met	M
페닐알라닌	Phe	F
프롤린	Pro	P
세린	Ser	S
트레오닌	Thr	T
트립토판	Trp	W
티로신	Tyr	Y
발린	Val	V

[0155]

[0156] 아미노산 서열에 관한 "보존적 치환"은 아미노산 잔기를 유사한 물리화학적 특성을 갖는 측쇄를 갖는 다른 아미노산 잔기로 대체하는 것을 언급한다. 예를 들어, 소수성 측쇄가 있는 아미노산 잔기(예컨대 Met, Ala, Val, Leu 및 Ile), 중성 친수성 측쇄가 있는 잔기(예컨대 Cys, Ser, Thr, Asn 및 Gln), 산성 측쇄가 있는 잔기(예컨대 Asp, Glu), 염기성 측쇄가 있는 아미노산(예컨대 His, Lys 및 Arg) 또는 방향족 측쇄가 있는 잔기(예컨대 Trp, Tyr 및 Phe) 중에서 보존적 치환이 이루어질 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 보존적 치환은 일반적으로 단백질 형태 구조에 상당한 변화를 일으키지 않으므로, 단백질의 생물학적 활성을 유지할 수 있다.

[0157] 아미노산 서열(또는 핵산 서열)에 대한 "서열 동일성 백분율(%)"은 서열을 정렬하고, 최대 일치율을 달성하기 위하여, 필요한 경우 갭을 도입한 후, 후보 서열중 참고 서열의 아미노산(또는 핵산) 잔기와 동일한 아미노산(또는 핵산) 잔기의 백분율로 정의된다. 아미노산(또는 핵산) 서열 동일성을 결정하기 위한 목적의 정렬은 예를 들어 공개적으로 이용 가능한 도구, 예컨대 BLASTN, BLASTp(U.S. National Center for Biotechnology

Information(NCBI)의 웹사이트에서 이용 가능함, 또한, 문헌: Altschul S.F. 등, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990); Stephen F. 등, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1997)), ClustalW2(European Bioinformatics Institute, Higgins D.G. 등, Methods in Enzymology, 266:383-402 (1996); Larkin M.A. 등, Bioinformatics (Oxford, England), 23(21): 2947-8 (2007) 참조), 및 ALIGN 또는 Megaalign(DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 관련 기술분야에서의 통상의 기술자는 상기 도구에 의해 제공되는 기본값 매개변수를 사용할 수 있거나, 예를 들어 적합한 알고리즘을 선택함으로써 정렬에 적합하도록 매개변수를 맞춤화할 수 있다. 특정 실시양태에서, 동일하지 않은 잔기 위치는 보존적 아미노산 치환에 의해 달라질 수 있다. "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성(예를 들어, 전하 또는 소수성)을 갖는 측쇄(R 기)를 갖는 또 다른 아미노산 잔기로 치환되는 것이다. 일반적으로 보존적 아미노산 치환은 단백질의 기능적 특성을 실질적으로 변경하지 않는다. 2개 이상의 아미노산 서열이 보존적 치환에 의해 서로 다른 경우, 유사성의 백분율 또는 정도는 치환의 보존적 특성을 보정하기 위해 상향으로 조정될 수 있다. 이러한 조정을 하기 위한 수단은 관련 기술분야에서의 통상의 숙련자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 문헌: Pearson (1994) Methods Mol. Biol. 24: 307-331 를 참조하며, 이는 본원에서 참조로 인용된다.

[0158] 본원에 사용된 바와 같이, "상동성 서열"은 폴리뉴클레오티드 서열(또는 이의 상보적 가닥) 또는 선택적으로 정렬될 때 다른 서열에 대해 서열 동일성이 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%)인 아미노산 서열을 언급한다.

[0159] "단리된" 물질은 인간의 손에 의해 자연 상태에서부터 변경되었다. "단리된" 조성물 또는 물질이 자연에서 발생하는 경우, 이는 이의 원래 환경에서 변화되거나 제거되거나 둘 다인 것이다. 예를 들어, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드는 "단리"되지 않지만 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드가 자연 상태의 공존 물질로부터 충분히 분리되어 실질적으로 순수한 상태로 존재하는 경우 "단리"된다. 단리된 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 상호교환적으로 사용되며 단리된 핵산 분자의 서열을 언급한다. 특정 실시양태에서, "단리된 항체 또는 이의 항원 결합 단편"은 전기영동 방법(예컨대 SDS-PAGE, 등전 포커싱, 모세관 전기영동), 또는 크로마토그래피 방법(예컨대 이온 교환 크로마토그래피 또는 역상 HPLC)에 의해 측정될 때 순도가 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%인 항체 또는 항원 결합 단편을 언급한다.

[0160] 용어 "대상체"는 인간 및 비인간 동물을 포함한다. 비인간 동물은 모든 척추동물, 예를 들어 포유동물 및 비인간 영장류, 마우스, 래트, 고양이, 토끼, 양, 개, 소, 닭, 양서류 및 파충류와 같은 비포유류를 포함한다. 명시된 경우를 제외하고, "환자" 또는 "대상체"라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다.

[0161] 본원에서 사용된 병태의 "치료하는" 또는 "치료"는 병태를 예방 또는 완화하고, 병태의 개시 또는 발달 속도를 늦추며, 병태가 발생할 위험을 감소시키고, 관련된 증상의 발달을 예방하거나 지연시키는 것, 병태와 관련된 증상의 감소 또는 종료, 병태의 완전한 또는 부분적 퇴행 생성, 병태 치료 또는 이들의 일부 조합을 포함한다.

[0162] 본원에서 사용되는 용어 "벡터"는 유전적 요소가 작동 가능하게 삽입되어 유전적 요소에 의해 코딩되는 단백질, RNA 또는 DNA를 생성하는 것과 같이 유전적 요소의 발현을 야기하거나, 유전적 요소를 복제할 수 있는 비히클을 언급한다. 벡터는 숙주 세포 내에서 운반하는 유전적 요소의 발현을 일으키기 위해 숙주 세포를 형질전환, 형질도입 또는 형질감염시키는 데 사용될 수 있다. 벡터의 예로는 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 효모 인공 염색체(YAC), 박테리아 인공 염색체(BAC), 또는 P1 유래 인공 염색체(PAC)와 같은 인공 염색체, 람다 파지 또는 M13 파지와 같은 박테리오파지, 및 동물 바이러스가 있다. 벡터는 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 선택가능한 요소, 및 리포터 유전자를 포함하는, 발현 조절을 위한 다양한 요소를 함유할 수 있다. 또한, 벡터는 복제 원점을 포함할 수 있다. 벡터는 또한 바이러스 입자, 리포솜, 또는 단백질 코팅을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 세포로의 진입을 돕는 물질을 포함할 수 있다. 벡터는 발현 벡터 또는 클로닝 벡터일 수 있다. 본 개시내용은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는, 본원에서 제공되는 핵산 서열, 상기 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터(예를 들어, SV40, CMV, EF-1 $\alpha$ ), 및 적어도 하나의 선택 마커를 함유하는 벡터(예를 들어, 발현 벡터)를 제공한다.

[0163] 본원에서 사용되는 "숙주 세포"는 외인성 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터가 도입된 세포를 언급한다.

[0164] 용어 "그렘린1" 또는 "GREM1"은 그렘린의 변이체 1을 언급하고, 인간, 마우스, 원숭이 등과 같은 상이한 종의 그렘린1을 포함한다. GREM1은 진화적으로 보존되고 인간 그렘린1 유전자(*hGREM1*)는 염색체 15q13-q15에 매핑되었다(참조: Topol L Z et al., (1997) Mol. Cell Biol., 17: 4801-4810; Topol L Z et al., Cytogenet Cell Genet., 89: 79-84). *hGREM1*의 아미노산 서열은 수탁 번호 NP-037504의 GenBank 데이터베이스 또는 수탁 번호

O60565를 통한 Uniprot 데이터베이스에 의해 접근 가능하며, 본원에서는 서열번호 66으로 제공된다. 용어 "인간 그렘린1" 및 용어 "hGREM1"은 본 개시내용에서 상호교환적으로 사용된다.

[0165] 본원에서 사용된 "그렘린1-관련" 또는 "GREM1-관련" 질환 또는 병태는 GREM1의 증가된 발현 또는 활성화에 의해 야기되거나, 악화되거나, 그렇지 않으면 이와 연결된 임의의 질환 또는 병태를 언급한다. 일부 실시양태에서, 상기 GREM1 관련 병태는 예를 들어 녹내장, 암, 섬유성 질환, 혈관신생, 망막 질환, 신장 질환, 폐동맥 고혈압, 또는 골관절염(OA)이다.

[0166] 본원에서 사용되는 "암"은 악성 세포 성장 또는 신생물, 비정상적인 증식, 침윤 또는 전이를 특징으로 하는 임의의 의학적 병태를 언급하며, 양성 또는 악성일 수 있고, 고형 종양 및 백혈병과 같은 비고형 암(예를 들어, 혈액학적 악성종양)을 모두 포함한다. 본원에서 사용되는 "고형 종양"은 신생물 및/또는 악성 세포의 고형 덩어리를 언급한다.

[0167] "약학적으로 허용되는"이라는 용어는 지정된 담체, 비히클, 희석제, 부형제(들), 및/또는 염이 일반적으로 제형을 구성하는 다른 성분과 화학적 및/또는 물리적으로 상용성이며, 이의 수용자와 생리학적으로 호환 가능함을 나타낸다.

[0168] 본 명세서에서 값 또는 매개변수 "약"에 대한 언급은 그 값 또는 매개변수 자체에 관한 실시양태를 포함(및 설명)한다. 예를 들어, "about X"에 대해 언급하는 설명은 "X"에 대한 설명을 포함한다. 숫자 범위에는 범위를 정의하는 숫자가 포함된다. 일반적으로, 용어 "약"은 변수의 지시된 값 및 지시된 값의 실험 오차 내에 있는 변수의 모든 값(예컨대 평균에 대한 95% 신뢰 구간 이내) 또는 표시된 값의 10% 이내 중 더 큰 값을 언급한다. 용어 "약"이 기간(년, 월, 주, 일 등)의 맥락에서 사용되는 경우, 용어 "약"은 다음 종속 기간의 한 양을 더하거나 짧은 기간(예컨대 약 1년은 11-13개월을 의미하고, 약 6개월은 6개월 ±1주를 의미하고, 약 1주는 6-8일을 의미하는 등) 또는 표시된 값의 10% 이내 중 더 큰 값을 의미한다.

[0169] **항-인간 그렘린1 항체**

[0170] 본 개시내용은 항-인간 그렘린1(hGREM1) 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체 및 항원 결합 단편은 하기 측면에서 기존의 항-hGREM1 항체와 독특하게 구별된다: a) 비-암 세포에 비해 암 세포에서 선택적으로 BMP 신호전달에 대한 hGREM1-매개 억제를 감소시킬 수 있음; b) 비-암 세포에서 BMP 신호전달에 대한 hGREM1-매개 억제의 50% 이하의 감소를 나타냄; c) 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 키메라 hGREM1에 결합할 수 있음; d) hGREM1에 결합할 수 있지만 마우스 그렘린1에는 특이적으로 결합하지 않음; e) 잔기 번호매김은 서열번호 69를 따르는 것인 잔기 Gln27 및/또는 잔기 Asn33을 포함하는 에피토프에서 hGREM1에 결합하거나, 잔기 Gln27 및/또는 잔기 Asn33을 포함하는 hGREM1 단편에 결합하며, 임의로 hGREM1 단편은 적어도 3개(예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개)의 아미노산 잔기 길이를 가짐; f) MAPK 신호전달에 대한 hGREM1-매개 활성화를 감소시킬 수 있음; g) Fortebio에 의해 측정될 때와 같이 1 nM 이하의 Kd에서 hGREM1에 결합할 수 있음; h) ELISA에 의해 측정될 때와 같이 적어도 50%의 최대 차단 백분율에서 BMP7에 대한 hGREM1의 결합을 차단할 수 있음; i) FGFR(예를 들어, FGFR1, 바람직하게는 인간 FGFR1(hFGFR1) 또는 마우스 FGFR1(mFGFR1))에 대한 GREM1(예를 들어, hGREM1 또는 mGREM1)의 상호작용을 차단할 수 있고/있거나 j) hGREM1 및 DAN 모두에 결합할 수 있음.

[0171] BMP 2, BMP 4 및 BMP 7과 같은 골 형태형성 단백질(BMP)은 형질전환 성장 인자 베타(TGF-β) 슈퍼패밀리의 글리코실화된 세포외 매트릭스(ECM) 관련 구성원으로 알려져 있으며, 형태 형성, 일반 기관 형성, 연골 및 사지 형성, 세포 증식, 분화 및 세포 사멸 동안 핵심 역할을 한다. BMP 신호전달은 BMP 리간드(예컨대 BMP 2, BMP 4 및 BMP7)가 BMP 수용체에 결합하여 활성화되어 수용체 인산화를 유발하고, R-Smads(예컨대 Smad 1/5/9)의 인산화 및 공동 Smad4와 복합체를 형성하도록 한다. 이어서, 상기 형성된 Smad 복합체는 핵으로 이동하여 BMP 표적 유전자의 발현을 조절한다. 따라서, BMP 신호전달의 활성화는 예를 들어 smads의 인산화 수준 및/또는 BMP 표적 유전자의 발현 수준을 측정함으로써 분석될 수 있다. BMP 신호전달의 활성화는 또한 분화 마커 유전자, 예를 들어 골아세포 분화의 초기 마커인 알칼리 포스파타아제의 발현 수준을 측정함으로써 검정될 수 있다.

[0172] BMP 신호전달은 노킨, 코르딘, 그렘린1, 및 꼬인 배엽형성(twisted gastrulation) 1과 같은 BMP 길항제에 의해 억제되는 것으로 알려져 있다. GREM1은 BMP-2, BMP-4 또는 BMP-7과 같은 BMP 리간드에 물리적으로 결합하여 이 종이량체를 형성하고 이들 BMP 리간드가 해당 BMP 수용체와 상호 작용하여, BMP 신호 전달 경로의 활성화를 억제하는 것을 방지할 수 있다. 따라서, GREM1의 제거 및/또는 GREM1의 활성 감소는 BMP 신호전달에 대한 억제를 역전시키거나 감소시킬 것으로 예상된다.

[0173] **i. 결합 친화도**

[0174] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체는 Fortebio에 의해 측정될 때와 같이 1 nM 이하의  $K_d$ 에서 hGREM1에 결합할 수 있다. 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체 및 항원 결합 단편의 결합 친화도는 항원과 항원 결합 분자 사이의 결합이 평형에 도달할 때 결합 비율에 대한 해리 비율의 비율( $k_{off}/k_{on}$ )을 나타내는  $K_D$  값으로 나타낼 수 있다. 항원 결합 친화도(예를 들어,  $K_D$ )는 예를 들어 운동 제외 검정법(Knetic Exclusion Assay: KinExA), Biacore, Fortebio 또는 유세포 분석을 포함하여 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법을 사용하여 적절하게 결정될 수 있다.

[0175] 특정 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 " $K_D$ " 또는 " $K_D$  값"은 실시양태에서 항 GREM1 항체의 용액 결합 친화도를 측정하는 하기 검정에 의해 설명된 바와 같이 항-GREM1 항체 및 GREM1을 사용하여 수행되는 Biacore 또는 Fortebio 검정에 의해 측정된다. 일반적으로, Biacore는 일정한 양의 하나의 결합 파트너(CBP)를 다양한 농도의 다른 결합 파트너(적정제)와 평형화한 다음, 짧은 접촉 시간에 형광 표지된 2차 항체에 의해 유리 CBP의 일부를 포획함으로써 작동하는데, 이는 미리 형성된 CBP-적정제 복합체의 해리에 필요한 시간보다 적다. 포획된 CBP에서 생성된 형광 신호는 평형화된 샘플의 유리 CBP 농도에 정비례하며, 연속 측정 시 결합 곡선(% 유리 CBP 대 총 적정제 농도)을 생성하는 데 사용된다. 자세한 내용은 문헌: Schreiber, G., Fersht, A.R. 자연 구조 생물학 (Nature Structural Biology). 1996, 3(5), 427-431으로부터 입수할 수 있다. 항 GREM1 항체를 CBP로 일정량 사용하면 GREM1 단백질이 적정제로 사용될 수 있으며 역으로도 가능하다. Fortebio는 일반적으로 Biacore와 유사한 방식으로 작동하며, 또한 일정한 양의 CBP(예컨대 GREM 1 단백질)를 다양한 농도의 적정제(예컨대 항-GREM1 항체)로 평형화한다. CBP와 적정제 간의 결합 동력학( $k_{on}$  및  $k_{off}$ ) 정보는 Fortebio에서 사용하는 바이오센서로부터 생성되는 간접 패턴의 변화로부터 얻을 수 있다. 자세한 내용은 문헌: Charles Wartchow, Frank Podlaski, Shirley Li, Karen Rowan, Xiaolei Zhang, David Mark, Kuo-Sen Huang "Biosensor-based Small Molecule Fragment Screening with Biolayer Interferometry: J Comput Aided Mol Des 2011, 25(7) , 669-76으로부터 입수할 수 있다.

[0176] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체의  $K_D$ 는 본 개시내용의 실시예 14에 기재된 방법에 따라 결정된다.

[0177]  $K_D$ 의 측정에 적합한 다른 방법, 예를 들어 방사성 표지된 항원 결합 검정(예를 들어, Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881 참조), 또는 Biacore 이외의 표면 플라즈몬 공명 분석이 적용가능한 상황하에서 사용될 수 있다.

[0178] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 Biacore 분석에 의해 측정될 때와 같이 100nM 이하(또는 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 29, 27, 20, 19, 또는 18nM 이하)의  $K_D$  값으로 인간 GREM1에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 Fortebio 분석에 의해 측정될 때와 같이 10nM 이하(또는 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 nM 이하)의  $K_D$  값으로 인간 GREM1에 특이적으로 결합한다.

[0179] 대안적으로, 인간 GREM1에 대한 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체 및 항원 결합 단편의 결합 친화도는 또한 "최대 유효 농도의 절반"(EC<sub>50</sub>) 값으로 나타낼 수 있으며, 이는 최대 효과(예를 들어, 결합)의 50%가 관찰되는 항체의 농도를 언급한다. 상기 EC<sub>50</sub> 값은 관련 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어 ELISA와 같은 샌드위치 분석, 웨스턴 블롯(Western Blot), 유세포분석 분석 및 기타 결합 분석에 의해 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체 및 이의 단편은 ELISA에 의해 측정될 때와 같이, 120ng/ml 이하(또는 100, 90, 80, 60, 40, 30, 20, 14.5, 14, 13.5, 13, 12.5, 12, 11.5, 11, 10.5, 10, 9, 8, 7, 6, 5.5, 5, 4.5, 4, 3, 2 또는 1ng/ml 이하)의 EC<sub>50</sub> 값에서 인간 GREM1(예를 들어, 인간 GREM1을 발현하는 세포)에 특이적으로 결합한다.

[0180] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 일부 항체 및 이의 항원 결합 단편은 ELISA에 의해 측정될 때와 같이 20ng/ml 이하의 EC<sub>50</sub> 값에서 마우스 GREM1에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 항체 및 이의 항원 결합 단편은 ELISA에 의해 측정될 때와 같이 4ng/ml 내지 20ng/ml(예를 들어, 4ng/ml 내지 9ng/ml, 5ng/ml 내지 8ng/ml, 6ng/ml 내지 7ng/ml, 6ng/ml 내지 14ng/ml, 6ng/ml 내지 12ng/ml, 4.564ng/ml, 7.713ng/ml, 8.512ng/ml 또는 17.2ng/ml)의 EC<sub>50</sub>에서 마우스 GREM1에 결합한다.

- [0181] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 및 이의 항원 결합 단편 중 일부는 마우스 GREM1에 특이적으로 결합하지 않는다.
- [0182] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 및 이의 항원 결합 단편은 GREM2에 특이적으로 결합하지 않는다.
- [0183] **항체 서열**
- [0184] 하나의 양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공하며, 여기서 중쇄 가변 영역은 다음:
- [0185] a) 서열번호 1, 11, 21, 31, 114, 119 및 123으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR1,
- [0186] b) 서열번호 2, 12, 22, 32 및 115로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR2,
- [0187] c) 서열번호 3, 13, 23, 33, 116, 120 및 124로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고 /하거나
- [0188] 경쇄 가변 영역은 다음:
- [0189] d) 서열번호 4, 14, 24, 34, 117, 121, 122 및 125로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 LCDR1,
- [0190] e) 서열번호 5, 15, 25 및 35로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 LCDR2,
- [0191] f) 서열번호 6, 16, 26, 36 및 118로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0192] 특정 실시양태에서, 본원에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역은 다음:
- [0193] a) 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0194] b) 서열번호 11의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 12의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 13의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0195] c) 서열번호 21의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 22의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 23의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0196] d) 서열번호 31의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 32의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 33의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0197] e) 서열번호 114의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 116의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0198] f) 서열번호 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 120의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;
- [0199] 및
- [0200] g) 서열번호 123의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 124의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0201] 특정 실시양태에서, 본원에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서 경쇄 가변 영역은 다음:
- [0202] a) 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0203] b) 서열번호 14의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 15의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 16의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0204] c) 서열번호 24의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 25의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 26의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0205] d) 서열번호 34의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 36의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0206] e) 서열번호 117의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을

포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;

- [0207] f) 서열번호 121의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0208] g) 서열번호 122의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역;
- [0209] 및
- [0210] h) 서열번호 125의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0211] 특정 실시양태에서, 본원에서 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 제공되며, 여기서:
- [0212] a) 중쇄 가변 영역은 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며;
- [0213] b) 중쇄 가변 영역은 서열번호 11의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 12의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 13의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 14의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 15의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 16의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며;
- [0214] c) 중쇄 가변 영역은 서열번호 21의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 22의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 23의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 24의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 25의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 26의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며;
- [0215] d) 중쇄 가변 영역은 서열번호 31의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 32의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 33의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 34의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 36의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며;
- [0216] e) 중쇄 가변 영역은 서열번호 114의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 116의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 117의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며;
- [0217] f) 중쇄 가변 영역은 서열번호 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 120의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 121의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며;
- [0218] g) 중쇄 가변 영역은 서열번호 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 120의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 122의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함하며; 그리고
- [0219] h) 중쇄 가변 영역은 서열번호 123의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 124의 서열을 포함하는 HCDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 서열번호 125의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0220] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체는 항-hGREM1 항체 14E3, 69H5, 22F1, 56C11, 36F5, 42B9 및 67G11의 1개 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개)의 CDR 서열을 포함한다.
- [0221] 본원에서 사용된 "14E3"은 서열번호 7의 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 8의 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 항체를 언급한다.
- [0222] 본원에서 사용된 "69H5"는 서열번호 27의 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 28의 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 항체를 언급한다.
- [0223] 본원에 사용된 "22F1"은 서열번호 17의 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 18의 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 항체를 언급한다.
- [0224] 본원에 사용된 "56C11"은 서열번호 37의 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 38의 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 항체를 언급한다.

[0225] 본원에 사용된 "36F5"는 서열번호 126의 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 127의 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 항체를 언급한다.

[0226] 본원에 사용된 "42B9"는 서열번호 128의 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 129의 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 항체를 언급한다.

[0227] 본원에 사용된 "67G11"은 서열번호 128 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 130의 경쇄 가변 영역을 갖는 마우스 항체를 언급한다.

[0228] 표 1은 이들 항-hGREM1 항체의 CDR 서열을 보여준다. CDR은 Kabat 번호매김법에 따라 결정된다. 통상의 기술자는 CDR 결정을 위한 다른 공지된 방법이 또한 본원에서 제공되는 항체에 적용될 수 있고, 이러한 CDR 서열이 또한 본 개시내용 내에 포함된다는 것을 이해할 것이다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열은 또한 하기 표 2에 제공된다.

[0229] [표 1]

[0230] 표 1. 항-hGREM1 항체의 CDR 영역의 서열

항체	영역	CDR1	CDR2	CDR3
14E3	HCDR	서열번호: 1 TYGMA	서열번호: 2 WINTLSGEPYADDFK G	서열번호: 3 EPMDY
	LCDR	서열번호: 4 KSSQSLDSDGKTYLS	서열번호: 5 LVSKLDS	서열번호: 6 WQGAHFPLT
22F1	HCDR	서열번호: 11 DYVMN	서열번호: 12 DINPKDGDGSGYSHKFK G	서열번호: 13 GFTTVVARGDY
	LCDR	서열번호: 14 KSSQSLDSDGKTYLN	서열번호: 15 LVSKLDS	서열번호: 16 WQGFHPYT
69H5	HCDR	서열번호: 21 DDYMH	서열번호: 22 WIDPENGDEYASKFQ G	서열번호: 23 WATVPDFDY
	LCDR	서열번호: 24 KSSQSLNRSNQKNYL A	서열번호: 25 FTSTRES	서열번호: 26 QQHYSTPFT
56C11	HCDR	서열번호: 31 DFVMN	서열번호: 32 DINPNNGGTSYNQKFK G	서열번호: 33 DPIYYDYDEVAY
	LCDR	서열번호: 34 RSSQLVHSNGNTYLH	서열번호: 35 KVSNRFS	서열번호: 36 SQSTHVPLT
36F5	HCDR	서열번호: 114 SSGIG	서열번호: 115 EYPRSGNTYNNEKFK G	서열번호: 116 EAYS <del>HH</del> YYAMD Y
	LCDR	서열번호: 117 RSSQSL <del>L</del> HSNGNTYLE	서열번호: 35 KVSNRFS	서열번호: 118 FQGSHPFT
42B9	HCDR	서열번호: 119 SYGIG	서열번호: 115 EYPRSGNTYNNEKFK G	서열번호: 120 EGYSN <del>NY</del> YAMD Y
	LCDR	서열번호: 121 ISSQSL <del>V</del> HSNGNTYLE	서열번호: 35 KVSNRFS	서열번호: 118 FQGSHPFT
67G11	HCDR	서열번호: 119 SYGIG	서열번호: 115 EYPRSGNTYNNEKFK G	서열번호: 120 EGYSN <del>NY</del> YAMD Y
	LCDR	서열번호: 122 RSSQSL <del>V</del> HSNGNTYLE	서열번호: 35 KVSNRFS	서열번호: 118 FQGSHPFT
36F5/42B9/67G11	HCDR	서열번호: 123 SX <sub>32</sub> GIG		서열번호: 124 EX <sub>27</sub> YSX <sub>28</sub> X <sub>29</sub> YYA MDY

[0231]

	LCDR	서열번호: 125 X <sub>30</sub> SSQSLX <sub>31</sub> HSNGNTYLE		
--	------	---	--	--

[0232]

[0233] 여기서 X<sub>32</sub>는 S 또는 Y이고; X<sub>27</sub>은 A 또는 G이며; X<sub>28</sub>은 H 또는 N이고; X<sub>29</sub>는 H 또는 N이며; X<sub>30</sub>은 R 또는 I이고;

X<sub>31</sub>은 L 또는 V이다.

[0234] [표 2]

[0235] 표 2. 마우스 항체 VH/VL의 서열

	VH	VL
14E3	서열번호: 7 QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKTSGSTFTTYGMAWMKQAPGKGLTWMGWINLDSGEPTYADDFKGRFAPS LKTSANTAYLQINNKNEDAATYFCAREPMDYWGQGSVIVSS	서열번호: 8 DVVMTQTPLTLSTITGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLSWLLQRPDQSPKRLISLVSKLDSGVPDRITGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGYVCWQGAHFPLTFGAGTKLELK
22F1	서열번호: 17 EAQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSTFDYYMNWLKQSHGKSLEWIGDINPKDGDGSGYSHKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCASGFTTVVARGDYWGQGTTLTVSS	서열번호: 18 DVVMTQTPLTLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSKLDSGFPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQTHFPYTFGGGKLEIK
69H5	서열번호:27 EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKDDYMHVVKRRPEQGL EWIGWIDPENGDTYASKFQGKATITADTSSNTAYLQLSLSLTSSEDTAVYYCTWATVPDFDYWGQGTTLTVSS	서열번호: 28 DIVMTQSPSSLAMSVGQKV TMSCKSSQSLNRSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVHFTSTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISNLQAEDLADYFCQQHYSTPFTFGSGTKLEIK
56C11	서열번호:37 EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDFYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPNNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCARDPIYYDYDEVAYWGQGTTLTVSA	서열번호: 38 DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCQSQTHVPLTFGAGTKLELK
36F5	서열번호: 126 QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYSTSSGIGWVKQRSGQGLEWIGEIYPRSGNTYNNKFKGKATL TADKSSRTVYMELRSLTSEDSAVYFCVREAYSHHYAMDYWGQGTSTVTVFS	서열번호: 127 DVLMTQTPLSLPVSLGGQASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRLSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVY YCFQGSHPVPTFGSGTKLEIN
42B9	서열번호: 128 QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGIGWVKQRITGQGLEWIGEIYPRSGNTYNNKFKGKATL TADKSSRTVYMELRSLTSEDSAVYFCAREGYSNNYAMDYWGQGTSTVTVFS	서열번호: 129 DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRLSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPTFGSGTKLEIK
67G11	서열번호: 128	서열번호: 130

[0236]

	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGIGWVKQRITGQGLEWIGEIYPRSGNTYNNKFKGKATL TADKSSRTVYMELRSLTSEDSAVYFCAREGYSNNYAMDYWGQGTSTVTVFS	DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRLSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVY YCFQGSHPVPTFGSGTKLEIK
--	--	---

[0237]

[0238] 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 단클론 항체, 다클론 항체, 인간화된 항체, 키메라 항체, 재조합 항체, 이종특이적 항체, 표지된 항체, 2가 항체, 또는 항-동종형 항체일 수 있다. 재조합 항체는 동물이 아닌 재조합 방법을 사용하여 체외에서 제조된 항체이다.

[0239] CDR은 항원 결합을 담당하는 것으로 알려져 있지만, 6개의 CDR 모두가 반드시 필수불가결하거나 변경불가능한 것은 아닌 것으로 밝혀졌다. 다시 말해서, 항-hGREM1 항체 14E3, 69H5, 22F1, 56C11, 36F5, 42B9 또는 67G11 (서열번호 1 내지 36 및 114 내지 125 중 임의의 하나에 상응)에서 1, 2, 또는 3개의 CDR이 대체 또는 변경될 수 있지만, hGREM1에 대한 특이적 결합 친화도를 실질적으로 유지한다.

[0240] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체 및 항원 결합 단편은 항-hGREM1 항체 14E3, 69H5, 22F1,

56C11, 36F5, 42B9 또는 67G11 중 하나의 중쇄 CDR3 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체 및 항원 결합 단편은 서열번호 3, 13, 23, 33, 116, 120 및 124의 중쇄 CDR3 서열을 포함한다. 중쇄 CDR3 영역은 항원 결합 부위의 중심에 위치하며, 따라서 항원과 가장 많이 접촉하고 항원에 대한 항체의 친화도에 가장 많은 유리 에너지를 제공하는 것으로 여겨진다. 또한, 중쇄 CDR3은 길이, 아미노산 조성 및 다중 다양화 메커니즘에 의한 형태 면에서 항원 결합 부위의 가장 다양한 CDR인 것으로 여겨진다(참조: Tonegawa S. *Nature*. 302:575-81). 중쇄 CDR3의 다양성은 대부분의 항체 특이성(참조: Xu JL, Davis MM. *Immunity*. 13:37-45)뿐만 아니라 바람직한 항원 결합 친화도(참조: Schier R 등 *J Mol Biol*. 263:551-67)를 생산하기에 충분하다.

[0241] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체 및 항원 결합 단편은 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 및/또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체 및 항원 결합 단편은 본원에서 제공되는 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부로 이루어진 단일 도메인 항체이다. 이러한 단일 도메인 항체에 대한 더 많은 정보는 관련 기술분야에서 입수할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,248,516호 참조).

[0242] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 및 이의 항원 결합 단편은 항체 및 이의 항원 결합 단편이 GREM1에 특이적으로 결합할 수 있는 한, 적합한 프레임워크 영역(FR) 서열을 포함한다. 표 1에 제공된 CDR 서열은 마우스 항체로부터 얻어지지만, 이들은 재조합 기법과 같은 관련 기술분야에 공지된 적합한 방법을 사용하여, 무엇보다도 마우스, 인간, 래트, 토끼와 같은 임의의 적합한 종의 임의의 적합한 FR 서열에 이식될 수 있다.

[0243] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 및 이의 항원 결합 단편은 키메라이다. VH/VL은 인간 IgG1 및 인간 카파 서열에 이식된다.

[0244] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 및 이의 항원 결합 단편은 인간화된다. 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편은 인간에서 감소된 면역원성 때문에 바람직하다. 비-인간 CDR 서열이 인간 또는 실질적으로 인간 FR 서열에 이식되기 때문에, 인간화된 항체는 이의 가변 영역에서 키메라이다. 항체 또는 항원 결합 단편의 인간화는 본질적으로 인간 면역글로불린 유전자에서 상응하는 인간 CDR 유전자를 비인간(마우스와 같은) CDR 유전자로 대체함으로써 수행될 수 있다(예를 들어, 문헌: Jones 등. (1986). *Nature* 321:522-525; Riechmann 등.(1988) *Nature* 332:323-327; Verhoeyen et al.(1988) *Science* 239:1534-1536 참조). 부모 비인간 항체의 가변 영역 또는 도메인의 3차원 구조의 시뮬레이션은 이 전 또는 후에 수행될 수 있다.

[0245] 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 CDR 이식을 수행하기 위해 적합한 인간 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 선택할 수 있다. 예시적인 예에서, 비인간(예를 들어, 설치류) 항체 가변 도메인 서열이 알려진 인간 가변 도메인 생식계열 서열의 데이터베이스(예를 들어, Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/>)에 대해 선별되거나 BLAST되는, "베스트-핏(best-fit)" 방법이 사용될 수 있으며, 상기 비-인간 의문의 서열에 가장 가까운 인간 서열이 확인되고 비-인간 CDR 서열을 이식하기 위한 인간 스캐폴드로서 사용된다(예를 들어, 문헌: Sims et al, (1993) *J. Immunol.* 151:2296; Chothia et al.(1987) *J. Mol. Biol.* 196:901 참조). 대안적으로, 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 프레임워크는 비-인간 CDR의 이식을 위해 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌: Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285;Presta et al.(1993) *J. Immunol.*, 151:2623 참조).

[0246] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편은 인간이 아닌 CDR 서열을 제외하고는 실질적으로 모든 인간 서열로 구성된다. 일부 실시양태에서, 가변 영역 FR 및 불변 영역(존재하는 경우)은 전적으로 또는 실질적으로 인간 면역글로불린 서열로부터 유래한다. 인간 FR 서열 및 인간 불변 영역 서열은 상이한 인간 면역글로불린 유전자, 예를 들어 하나의 인간 항체로부터 유래된 FR 서열 및 또 다른 인간 항체로부터 유래된 불변 영역으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편은 인간 중쇄/경쇄 FR1-4를 포함한다.

[0247] [표 3]

[0248] 하기 표 3은 22F1, 14E3 및 56C11에 대한 인간화된 항체의 HFR 아미노산 서열을 보여준다.

항체		FR1	FR2	FR3	FR4
hu2 2F1	Ha	서열번호: 73 QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCASGYSTFT	서열번호: 74 WVVRQAPGQ GLEWWMG	서열번호: 75 RVTMTTRDITSTST VYMESSLRSEDT AVYYCAS	서열번호: 76 WGQGTIVTV SS
	Hb	서열번호: 73 QVQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCASGYSTFT	서열번호: 74 WVVRQAPGQ GLEWWMG	서열번호: 78 RVTMTVDKSTST VYMESSLRSEDT AVYYCAS	서열번호: 76 WGQGTIVTV SS
	He	서열번호: 77 QAQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCASGYSTFT	서열번호: 74 WVVRQAPGQ GLEWWMG	서열번호: 79 RVTITVDKSTSTV YME <del>L</del> SLRSEDTA VYYCAS	서열번호: 76 WGQGTIVTV SS
	Hd	서열번호: 77 QAQLVQSGAEVKKPG ASVKVSCASGYSTFT	서열번호: 80 WLRQAPGQ GLEWJG	서열번호: 81 RATITVDKSTSTV YME <del>L</del> SLRSEDTA VYYCAS	서열번호: 76 WGQGTIVTV SS
hu1 4E3	Ha	서열번호: 82 QVQLVQSGSELKPPG ASVKVSCASGYTFT	서열번호: 83 WMRQAPG QGLEWWMG	서열번호: 84 RFVFLDTSVSTA YLQISSLKAEDTAV YYCAR	서열번호: 85 WGQGTIVT VSS
	Hb	서열번호: 86 QVQLVQSGSELKPPGA SVKVSCASGYTFT	서열번호: 83 WMRQAPG QGLEWWMG	서열번호: 87 RFVFLDTSVSTA YLQISSLKAEDTAV YYCAR	서열번호: 85 WGQGTIVT VSS
	He	서열번호: 88 QVQLVQSGSELKPPGA SVKVSCASGSTFT	서열번호: 89 WMKQAPG QGLTWWMG	서열번호: 87 RFVFLDTSVSTA YLQISSLKAEDTAV YYCAR	서열번호: 85 WGQGTIVT VSS
hu5 6C1 1	HO	서열번호: 90 QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCASGYTFT	서열번호: 74 WVVRQAPGQG LEWWMG	서열번호: 91 RVTMTTRDISISTAY MELSLRSDDTAVY YCAR	서열번호: 92 WGQGLTVTVSS
	Ha	서열번호: 90 QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSCASGYTFT	서열번호: 74 WVVRQAPGQG	서열번호: 93 RVTMTVDKISISTAY MELSLRSDDTAVY	서열번호: 92 WGQGLTVTVSS

[0249]

			LEWMG	YCAR	
	Hb	서열번호: 90 QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSKASGYTFT	서열번호: 95 WVLRQAPGQG LEWIG	서열번호: 94 RVTLTVDKSISTAYM ELSLRSDDTAVYYC AR	서열번호: 92 WGQGT <sup>L</sup> VTVSS
	Hc	서열번호: 90 QVQLVQSGAEVKKPGAS VKVSKASGYTFT	서열번호: 96 WVLRQAPGQG LEWIG	서열번호: 94 RVTLTVDKSISTAYM ELSLRSDDTAVYYC AR	서열번호: 92 WGQGT <sup>L</sup> VTVSS
		서열번호: 97 QX <sub>4</sub> QLVQSGX <sub>2</sub> EX <sub>3</sub> KKPG ASVKVSKASGX <sub>6</sub> X <sub>5</sub> FT	서열번호: 98 WX <sub>6</sub> X <sub>7</sub> QAPGX <sub>8</sub> GLX <sub>9</sub> WX <sub>10</sub> G	hu22F1 (서열번호: 99) RX <sub>11</sub> TX <sub>12</sub> TX <sub>13</sub> DX <sub>14</sub> STSTVYMELEX <sub>15</sub> SL RSED <sup>T</sup> AVYYCAS hu14E3 (서열번호: 140) RFX <sub>16</sub> FSLDTSVST AYLQISSLKAEDTA VYYCAR hu56C11 (서열번호: 141) RVTX <sub>17</sub> TX <sub>18</sub> DX <sub>19</sub> SIS TAYMELSLRSDDT AVYYCAR	서열번호: 100 WGQGT <sup>X<sub>20</sub></sup> VTV SS

[0250]

[0251]

[표 4]

[0252]

하기 표 4는 22F1, 14E3 및 56C11에 대한 인간화된 항체의 LFR 아미노산 서열을 보여준다.

hu22F1	La	서열번호: 101 DVVMTQSP <sup>L</sup> SLPVTLGQ PASISC	서열번호: 102 WLQQRPGQS PRRLIY	서열번호: 103 GV <sup>P</sup> DRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGV YYC	서열번호: 104 FG <sup>Q</sup> GTK <sup>L</sup> EIK
	Lb	서열번호: 101 DVVMTQSP <sup>L</sup> SLPVTLGQ PASISC	서열번호: 102 WLQQRPGQS PRRLIY	서열번호: 105 GF <sup>P</sup> DRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGV YYC	서열번호: 104 FG <sup>Q</sup> GTK <sup>L</sup> EIK
hu14E3	La	서열번호: 101 DVVMTQSP <sup>L</sup> SLPVTLGQ PASISC	서열번호: 102 WLQQRPGQS PRRLIY	서열번호: 103 GV <sup>P</sup> DRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGV YYC	서열번호: 106 FG <sup>Q</sup> GTK <sup>L</sup> EIK
	Lb	서열번호: 101 DVVMTQSP <sup>L</sup> SLPVTLGQ PASISC	서열번호: 107 WLQQRPGQS PRRLIS	서열번호: 103 GV <sup>P</sup> DRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGV YYC	서열번호: 106 FG <sup>Q</sup> GTK <sup>L</sup> EIK
hu56C11	L0	서열번호: 101 DVVMTQSP <sup>L</sup> SLPVTLGQ PASISC	서열번호: 108 WF <sup>Q</sup> QRPGQS PRRLIY	서열번호: 103 GV <sup>P</sup> DRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVG VYYC	서열번호: 106 FG <sup>Q</sup> GTK <sup>L</sup> EIK
	La	서열번호: 101 DVVMTQSP <sup>L</sup> SLPVTLGQ PASISC	서열번호: 109 WF <sup>Q</sup> QRPGQS PRRLIY	서열번호: 103 GV <sup>P</sup> DRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGV YYC	서열번호: 106 FG <sup>Q</sup> GTK <sup>L</sup> EIK
	Lb	서열번호: 101 DVVMTQSP <sup>L</sup> SLPVTLGQ PASISC	서열번호: 110 WY <sup>Q</sup> QRPGQS PRRLIY	서열번호: 103 GV <sup>P</sup> DRFSGSGSGTD FTLKISRVEAEDVGV YYC	서열번호: 106 FG <sup>Q</sup> GTK <sup>L</sup> EIK
			서열번호: 111 WX <sub>21</sub> QQRPG QSPRX <sub>22</sub> LX <sub>23</sub>	서열번호: 112 GX <sub>24</sub> PDRFSGSGSGT DFTLKISRVEAEDVG VYYC	서열번호: 113 FGX <sub>25</sub> GTKX <sub>26</sub> E IK

[0253]

[0254]

여기서 X<sub>1</sub>은 V, I 또는 A이고; X<sub>2</sub>는 A 또는 S이며; X<sub>3</sub>은 V 또는 L이고; X<sub>4</sub>는 Y 또는 S이며; X<sub>5</sub>는 T 또는 S이고; X<sub>6</sub>은 V, L 또는 M이며; X<sub>7</sub>은 R 또는 K이고; X<sub>8</sub>은 Q 또는 K이며; X<sub>9</sub>는 E 또는 T이고; X<sub>10</sub>은 M 또는 I이며; X<sub>11</sub>은 V

또는 A이고; X<sub>12</sub>는 M 또는 L이며; X<sub>13</sub>은 R 또는 V이고; X<sub>14</sub>는 T 또는 K이며; X<sub>15</sub>는 S 또는 R이고; X<sub>16</sub>은 V 또는 A이며; X<sub>17</sub>은 M 또는 L이고; X<sub>18</sub>은 R 또는 V이며; X<sub>19</sub>는 T 또는 K이고; X<sub>20</sub>은 T, M 또는 L이며; X<sub>21</sub>은 L, F 또는 Y이고; X<sub>22</sub>는 R 또는 L이며; X<sub>23</sub>은 Y 또는 S이고; X<sub>24</sub>는 V 또는 F이며; X<sub>25</sub>는 G 또는 Q이고; X<sub>26</sub>은 V 또는 L이다.

[0255] 일부 실시양태에서, 인간으로부터 유래된 FR 영역은 그것이 유래된 인간 면역글로불린과 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 FR의 하나 이상의 아미노산 잔기는 부모 비-인간 항체로부터의 상응하는 잔기로 치환된다. 이는 특정 실시양태에서 인간화된 항체 또는 이의 단편을 비-인간 부모 항체 구조에 근접하게 만들어 면역원성을 감소시키거나 피하고/피하거나 결합 활성 또는 결합 친화도를 개선 또는 유지하는 것이 바람직할 수 있다.

[0256] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편은 각각의 인간 FR 서열에서 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환, 또는 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 모든 FR에서 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아미노산 잔기의 이러한 변화는 중쇄 FR 영역에만, 경쇄 FR 영역에만, 또는 두 사슬 모두에 존재할 수 있다. 특정 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 잔기는 돌연변이되며, 예를 들어 CDR 서열이 유래된 비-인간 부모 항체에서 (예를 들어, 마우스 프레임워크 영역에서) 발견되는 상응하는 잔기로 역돌연변이된다. 돌연변이에 적합한 위치는 관련 기술분야에 공지된 원칙에 따라 통상의 기술자에 의해 선택될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이 위치는 다음과 같은 경우: 1) 인간 생식계열 서열의 프레임워크의 잔기가 희귀한 경우(예를 들어, 인간 가변 영역 서열에서 20% 미만 또는 10% 미만으로); 2) CDR의 잔기와 상호 반응할 가능성이 있으므로, 위치가 인간 생식계열 사슬의 1차 서열에서 3개의 CDR 중 하나 이상에 바로 인접해 있는 경우; 또는 3) 위치가 3차원 모델에서 CDR에 가깝고, 따라서 CDR에서 아미노산과 상호 반응할 가능성이 높은 경우 선택될 수 있다. 선택된 위치의 잔기는 부모 항체의 상응하는 잔기로, 또는 인간 생식계열 서열이나 부모 항체에서 상응하는 잔기가 아니라 인간 서열에 전형적인 잔기, 즉 인간 생식계열 서열과 동일한 하위그룹에 속하는 알려진 인간 서열의 해당 위치에서 더 빈번하게 발생하는 잔기로 다시 돌연변이될 수 있다(미국 특허 제5,693,762호 참조). 특정 실시양태에서, hu14E3의 경우, 중쇄 변이체 Ha, Hb 및 Hc는 모두 Kabat 번호매김을 기반으로, 각각, 중쇄 변이체 Ha에 대해 V37M의 역 돌연변이, 중쇄 변이체 Hb에 대해 V37M, V68A, V2I의 역 돌연변이, 및 중쇄 변이체 Hc에 대해 V37M, V68A, V2I, Y27S, R38K, E46T의 역 돌연변이를 갖는 그들의 생식계열 서열에 3개의 CDR을 직접 이식함으로써 획득되었고; 경쇄 변이체는 모두 Kabat 번호매김을 기반으로, 각각, 경쇄 변이체 La에 대해 F36L의 역 돌연변이 및 경쇄 변이체 Lb에 대해 F36L, Y49S의 역 돌연변이를 갖는 그들의 생식계열 서열에 3개의 CDR을 직접 이식하여 획득되었다. 특정 실시양태에서, hu22F1의 경우, 중쇄 변이체 Ha, Hb, Hc 및 Hd는 모두 Kabat 번호매김을 기반으로, 각각, 중쇄 변이체 Ha에 대한 역 돌연변이, 중쇄 변이체 Hb에 대한 R72V, T74K, T28S, R98S 역 돌연변이, 중쇄 변이체 Hc에 대한 R71V, T73K, T28S, R94S, S82AR, M69L, V2A의 역 돌연변이, 및 중쇄 변이체 Hd에 대한 R71V, T73K, T28S, R94S, S82AR, M69L, V2A, V67A, M48I, V37L의 역 돌연변이 없이 3개의 CDR을 생식계열 서열에 직접 이식하여 획득되었고; 경쇄 변이체는 모두 Kabat 번호매김을 기반으로, 각각, 경쇄 변이체 La에 대해 F36L의 역 돌연변이 및 경쇄 변이체 Lb에 대해 F36L, V58F의 역 돌연변이를 갖는 그들의 생식계열 서열에 3개의 CDR을 직접 이식하여 획득되었다. 특정 실시양태에서, hu56C11의 경우, 중쇄(HC) 변이체 1, 2, 3 및 4는 모두 Kabat 번호매김을 기반으로, 각각, 중쇄 변이체 H0에 대한 역 돌연변이, 중쇄 변이체 Ha에 대한 R71V, T73K의 역 돌연변이, 중쇄 변이체 Hb에 대한 R71V, T73K, M69L, M48I의 역 돌연변이, 및 중쇄 변이체 Hc에 대한 R71V, T73K, M69L, M48I, Q43K, R38K의 역 돌연변이 없이 3개의 CDR을 생식계열 서열에 직접 이식하여 획득되었고; 경쇄(LC) 변이체 1, 2 및 3은 모두 Kabat 번호매김을 기반으로, 각각, 경쇄 변이체 L0에 대한 역 돌연변이, 경쇄 변이체 La에 대한 R46L, 및 경쇄 변이체 Lb에 대한 F36Y, R46L의 역 돌연변이 없이 3개의 CDR을 생식계열 서열에 직접 이식하여 획득되었다.

[0257] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 인간화된 경쇄 및 중쇄는 인간에서 실질적으로 비-면역원성이고 hGREM1에 대한 부모 항체와 실질적으로 동일하거나 심지어 더 높은 친화도를 유지한다. 구체적으로, 본원에서 제공되는 인간화된 항체(예를 들어, Hu22F1 및 Hu56C11) 및 69H5, 36F5, 42B9 및 67G11로부터 유래된 인간화된 항-hGREM1 항체는 유사한 특성(예를 들어, 인간 그래핀1 및/또는 마우스 그래핀1에 대한 높은 결합 친화도, BMP4 신호전달에 대한 그래핀 매개 억제에 대한 높은 차단 효과, FGFR1에 대한 그래핀1의 결합에 대한 높은 차단 활성, 및/또는 높은 항종양 효과) 또는 이의 부모 항체보다 훨씬 더 좋은 특성을 나타낼 것으로 예상된다.

[0258] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 인간화된 항체 및 이의 항원 결합 단편은 인간 생식계열 프레임워크 서열 IGKV/2-30의 하나 이상의 경쇄 FR 서열, 및/또는 역 돌연변이가 있거나 없는, 인간 생식계열 프레임워크 서

열 IGHV/7-4 또는 IGHV/1-46 또는 IGHV1-2의 하나 이상의 중쇄 FR 서열을 포함한다. 필요한 경우, 인간 생식계열 프레임워크 서열에 역돌연변이를 도입할 수 있다.

- [0259] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 41, 서열번호 43, 서열번호 45, 서열번호 51, 서열번호 53, 서열번호 55, 서열번호 57, 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133 및 서열번호 134로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 및 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%)의 서열 동일성을 갖지만 hGREM1에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 유지하는 이의 상동성 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0260] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 47, 서열번호 49, 서열번호 59, 서열번호 61, 서열번호 135, 서열번호 136 및 서열번호 137로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 및 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖지만 hGREM1에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 유지하는 이의 상동성 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 추가로 포함한다.
- [0261] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 41, 서열번호 43, 및 서열번호 45로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 및 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖지만 hGREM1에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 보유하는 이의 상동성 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 47, 및 서열번호 49로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 및 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖지만 hGREM1에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 유지하는 이의 상동성 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0262] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 41/47, 41/49, 43/47, 43/49, 45/47, 및 45/49로 이루어진 군으로부터 선택된 한 쌍의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열, 또는 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖지만 hGREM1에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 유지하는 한 쌍의 서열을 추가로 포함한다.
- [0263] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 51, 서열번호 53, 서열번호 55 및 서열번호 57로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 및 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖지만 hGREM1에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 보유하는 이의 상동성 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 59 및 서열번호 61로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 및 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖지만 hGREM1에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 유지하는 이의 상동성 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0264] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 51/59, 51/61, 53/59, 53/61, 55/59, 55/61, 57/59, 및 57/61로 이루어진 군으로부터 선택된 한 쌍의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열, 또는 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖지만 hGREM1에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 유지하는 한 쌍의 서열을 추가로 포함한다.
- [0265] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 인간화된 항체 또는 항원 결합 단편은 서열번호 131, 서열번호 132, 서열번호 133 및 서열번호 134로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 및 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖지만 hGREM1에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 보유하는 이의 상동성 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열번호 135, 서열번호 136 및 서열번호 137로 이루어진 군으로부터 선택된 서열, 및 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖지만 hGREM1에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 유지하는 이의 상동성 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0266] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 서열번호 131/135, 131/136, 131/137, 132/135, 132/136, 132/137, 133/135, 133/136, 133/137, 134/135, 134/136, 및 134/137로 이루어진 군으로부터 선택된 한 쌍의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 서열, 또는 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%)의 서열 동일성을 갖지만 hGREM1에 대한 특이적 결합 특이성 또는 친화성을 유지하는 한 쌍의 서열을 추가로 포함한다.
- [0267] [표 5]

[0268] 표 5. 인간화된 14E3(Hu14E3), 인간화된 22F1(Hu22F1) 및 인간화된 56C11(Hu56C11)의 서열

항체사슬	서열
Hu14E3-Ha VH	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYGMAWMR QAPQGLEWMGWINTLSGEPTYADDFKGRFVSLDTSVS TAYLQISSLKAEDTAVYYCAREPMDYWGQGMVTVSS (서열번호: 41)
Hu14E3-Hb VH	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTTYGMAWMRQ APGQGLEWMGWINTLSGEPTYADDFKGRFAFSLDTSVST AYLQISSLKAEDTAVYYCAREPMDYWGQGMVTVSS (서열번호: 43)
Hu14E3-Hc VH	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGSTFTTYGMAWMKQ APGQGLTWMGWINTLSGEPTYADDFKGRFAFSLDTSVST AYLQISSLKAEDTAVYYCAREPMDYWGQGMVTVSS (서열번호: 45)
Hu14E3-La VL	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLSW LQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCWQGAHFPLTFGQGTKLEIK (서열번호: 47)
Hu14E3-Lb VL	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLSW LQQRPGQSPRRLISLVSKLDSGVPDRFSGSGGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCWQGAHFPLTFGQGTKLEIK (서열번호: 49)
Hu22F1-Ha VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYIMNWVR QAPQGLEWMGDINPKDGDGSGYSHKFKGRVTMTRDTS TVYMELSSLRSEDVAVYYCASGFTTVVARGDYWGQGIT VTVSS (서열번호: 51)
Hu22F1-Hb VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYIMNWVR QAPQGLEWMGDINPKDGDGSGYSHKFKGRVTMTVDKST STVYMELSSLRSEDVAVYYCASGFTTVVARGDYWGQGIT VTVSS (서열번호: 53)

[0269]

Hu22F1-Hc VH	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYIMNWVR QAPGQGLEWMGDINPKDGDGSGYSHKFKGRVTLTVDKSTS TVYMELRSLRSEDVAVYYCASGFTTVVARGDYWGQGT TVSS (서열번호: 55)
Hu22F1-Hd VH	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSTFDYIMNWL QAPGQGLEWIGDINPKDGDGSGYSHKFKGRATLTVDKST VYMELRSLRSEDVAVYYCASGFTTVVARGDYWGQGT TVSS (서열번호: 57)
Hu22F1-La VL	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNW LQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGTKVEIK (서열번호: 59)
Hu22F1-Lb VL	DVVMTQSPSLPVTLGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNW LQQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGFPDRFSGSGGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCWQGTFFPYTFGGGTKVEIK (서열번호: 61)
Hu56C11-H0 VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYIMNWVR QAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNQKFKGRVTMTRDTSIS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARDPIYYDYDEVAYWGQGT LTVSS (서열번호: 131)
Hu56C11-Ha VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYIMNWVR QAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNQKFKGRVTMTVDKTSIS TAYMELRSLRSDDTAVYYCARDPIYYDYDEVAYWGQGT LTVSS (서열번호: 132)
Hu56C11-Hb VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYIMNWVR QAPGQGLEWIGDINPNNGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSIST AYMELRSLRSDDTAVYYCARDPIYYDYDEVAYWGQGT LTVSS (서열번호: 133)
Hu56C11-Hc VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFYIMNVK QAPGQGLEWIGDINPNNGGTSYNQKFKGRVTLTVDKSIST AYMELRSLRSDDTAVYYCARDPIYYDYDEVAYWGQGT LTVSS (서열번호: 133)

[0270]

	TVSS (서열번호: 134)
Hu56C11-L0 VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHW FQQRPGQSPRRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCSQSTHVPLTFGQGTKLEIK (서열번호: 135)
Hu56C11-La VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHW FQQRPGQSPRRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCSQSTHVPLTFGQGTKLEIK (서열번호: 136)
Hu56C11-Lb VL	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHW YQQRPGQSPRRLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKIS RVEAEDVGVYYCSQSTHVPLTFGQGTKLEIK (서열번호: 137)

[0271]

[0272]

본원에서 제공되는 인간화된 항-hGREM1 항체는 hGREM1에 대한 특이적 결합 친화도를 보유하고, 그 측면에서, 부모 항체에 적어도 필적하거나 심지어 더 우수하다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체 및 이의 단편은 면역글로불린 불변 영역, 임의로 인간 Ig의 불변 영역, 또는 임의로 인간 IgG의 불변 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역글로불린 불변 영역은 중쇄 및/또는 경쇄 불변 영역을 포함한다. 상기 중쇄 불변 영역은 CH1, 힌지, 및/또는 CH2-CH3 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 중쇄 불변 영역은 Fc 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 경쇄 불변 영역은 C<sub>K</sub> 또는 C<sub>L</sub>를 포함한다.

[0273]

특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체 및 이의 단편은 인간 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4의 불변 영역을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 IgG1 동종형의 불변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 IgG2b 동종형의 불변 영역을 포함한다.

[0274]

특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 인간화된 항체는 인간 IgG1 동종형의 불변 영역에 융합된 중쇄 가변 영역 및 인간 카파 사슬의 불변 영역에 융합된 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

[0275]

**항체 변이체**

[0276]

본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 또한 본원에서 제공되는 항체 서열의 다양한 유형의 변이체를 포함한다.

[0277]

특정 실시양태에서, 상기 변이체는 표 1에 제공된 바와 같은 1, 2 또는 3개의 CDR 서열, 하나 이상의 FR 서열, 본원에서 제공되는 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 서열, 및/또는 불변 영역(예를 들어, Fc 영역)에서 하나 이상의 변형(들) 또는 치환(들)을 포함한다. 그러한 항체 변이체는 이들 부모 항체의 hGREM1에 대한 특이적 결합 친화도를 유지하지만, 상기 변형(들) 또는 치환(들)에 의해 부여된 하나 이상의 바람직한 특성을 갖는다. 예를 들어, 상기 항체 변이체는 개선된 항원 결합 친화도, 개선된 글리코실화 패턴, 감소된 글리코실화 위험, 감소된 탈아미노화, 감소 또는 증가된 이펙터 기능(들), 개선된 FcRn 수용체 결합, 증가된 약동학적 반감기, pH 민감성, 및/또는 접합에 대한 호환성(예를 들어, 하나 이상의 도입된 시스테인 잔기) 등 더 많이 있지만 이 정도 가질 수 있다.

[0278]

부모 항체 서열은 관련 기술분야에 공지된 방법, 예를 들어 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발"을 사용하여 변형 또는 치환될 적합하거나 바람직한 잔기를 확인하기 위해 선별될 수 있다(예를 들어, 문헌: Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085 참조). 간략해서, 표적 잔기(예컨대 Arg, Asp, His, Lys 및 Glu와 같은 하전된 잔기)를 확인하고 중성 또는 음전하를 띤 아미노산(예컨대 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 대체할 수 있으며, 변형된 항체가 생산되고 관심 있는 특성에 대해 선별된다. 특정 아미노산 위치에서의 치환이 관심 있는 기능적 변화를 입증하는 경우, 해당 위치는 변형 또는 치환을 위한 잠재적인 잔기로 확인될 수 있다. 상기 잠재적인 잔기

는 다른 유형의 잔기(예컨대 시스테인 잔기, 양전하를 띤 잔기 등)로 대체하여 추가로 평가될 수 있다.

[0279] **i. 친화도 변이체**

[0280] 친화도 변이체는 부모 항체의 hGREM1에 대한 특이적 결합 친화도를 유지하거나, 심지어 부모 항체에 비해 개선된 hGREM1 특이적 결합 친화도를 갖는다. 관련 기술분야에 공지된 다양한 방법이 이러한 목적을 달성하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 변이체(예컨대 Fab 또는 scFv 변이체)의 라이브러리를 생성하고 파지 디스플레이 기술로 발현한 다음, 인간 GREM1에 대한 결합 친화도를 선별할 수 있다. 또 다른 예로, 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 인간 GREM1에 대한 항체의 결합을 가상으로 시뮬레이션하고, 결합 인터페이스를 형성하는 항체의 아미노산 잔기를 확인할 수 있다. 그러한 잔기는 결합 친화도의 감소를 방지하기 위해 치환에서 회피되거나, 더 강한 결합을 제공하기 위하여 치환에 대해 표적화될 수 있다.

[0281] 특정 실시양태에서, CDR 서열, FR 서열, 또는 가변 영역 서열에서 치환(들) 중 적어도 하나(또는 모두)는 보존적 치환을 포함한다.

[0282] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체 또는 항원 결합 단편은 하나 이상의 CDR 서열, 및/또는 하나 이상의 FR 서열에서 하나 이상의 아미노산 잔기 치환을 포함한다. 특정 실시양태에서, 친화도 변이체는 하나 이상의 CDR 서열 및/또는 FR 서열에서 총 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 치환을 포함한다.

[0283] 특정 실시양태에서, 항-hGREM1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 표 1에 나열된 것(또는 것들)에 대해 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%) 서열 동일성을 갖는 1, 2 또는 3개의 CDR 서열을 포함하며, 한편 이의 부모 항체와 유사한 수준에서 또는 훨씬 더 높은 hGREM1에 대한 결합 친화도를 유지한다.

[0284] **ii. 글리코실화 변이체**

[0285] 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체 및 항원 결합 단편은 또한 항체 또는 항원 결합 단편의 글리코실화 정도를 증가시키거나 감소시키기 위해 수득될 수 있는 글리코실화 변이체를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "글리코실화"는 푸코스, 자일로스, 만노스 또는 GlcNAc 포스포세린 글리칸과 같은 글리칸을 단백질, 지질, 또는 다른 유기 분자에 부착시키는 효소 과정을 언급한다. 글리칸에 연결된 탄소에 따라, 글리코실화는 N-연결된 글리코실화, O-연결된 글리코실화, 포스포-글리코실화, C-연결된 글리코실화, 및 글리피화를 포함하는 5가지 부류로 나눌 수 있다.

[0286] 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결되는 것이다. N-연결은 아스파라긴 잔기, 예를 들어 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌과 같은 트리펩타이드 서열 내의 아스파라긴 잔기의 측쇄에 대한 탄수화물 부분의 부착을 언급하며, 여기서 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스, 또는 자일로스 중 하나가 하이드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 언급한다.

[0287] 특정 실시양태에서, 상기 항체 글리코실화 변이체는 더 이상 항체 또는 Fc 서열에 존재하지 않는 N-연결된 글리코실화 부위에 대한 트리펩타이드 서열 또는 O-연결된 글리코실화 부위에 대한 세린 또는 트레오닌 잔기가 되도록, 예를 들어 천연 글리코실화 부위의 제거(예를 들어 N297A 치환에 의해)에 의해 수득될 수 있다. 대안적으로, 특정 실시양태에서, 항체 글리코실화 변이체는 선택된 당 그룹(들)을 항체의 성숙 코어 탄수화물 구조에 첨가하는 데 결합이 있는 숙주 세포주에서 항체를 생산함으로써 수득될 수 있다.

[0288] **iii. 시스테인-조작된 변이체**

[0289] 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체 및 항원 결합 단편은 또한 하나 이상의 도입된 유리 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 시스테인-조작된 변이체를 포함한다.

[0290] 유리 시스테인 잔기는 이황화 가교의 일부가 아닌 것이다. 시스테인-조작된 변이체는 예를 들어 말레이미드 또는 할로아세틸을 통해 조작된 시스테인의 부위에서 예를 들어, 그중에서도, 세포독성 및/또는 영상화 화합물, 표지, 또는 방사성동위원소와의 접합에 유용하다. 유리 시스테인 잔기를 도입하기 위한 항체 또는 항원 결합 단편을 조작하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 W02006/034488을 참조한다.

[0291] **항원 결합 단편**

[0292] 항-hGREM1 항원 결합 단편이 또한 본원에서 제공된다. 다양한 유형의 항원 결합 단편이 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 그의 CDR 서열이 표 1에 제시된 예시적인 항체 및 이의 상이한 변이체(예를 들어, 친화도

변이체, 글리코실화 변이체, Fc 변이체, 시스테인-조작된 변이체 등)를 포함하여, 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체를 기본으로 개발될 수 있다.

[0293] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항원 결합 단편은 디아바디, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv 단편, 이황화 안정화된 Fv 단편(dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, 이중특이적 dsFv(dsFv-dsFv'), 이황화 안정화된 디아바디(ds diabody), 단일쇄 항체 분자(scFv), scFv 이량체(2가 디아바디), 다중특이적 항체, 낙타화된 단일 도메인 항체, 나노바디, 도메인 항체, 또는 2가 도메인 항체가 있다.

[0294] 이러한 항원 결합 단편의 생산을 위해 다양한 기술이 사용될 수 있다. 예시적인 방법은 무순상 항체의 효소 분해법(예를 들어, 문헌: Morimoto 등, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); 및 Brennan 등, *Science*, 229:81 (1985) 참조), E. Coli와 같은 숙주 세포에 의한 재조합 발현(예컨대 Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편의 경우), 위에서 논의된 과지 디스플레이 라이브러리로부터 선별법(예컨대 ScFv의 경우), 및 2개의 Fab'-SH 단편을 화학적 커플링시켜 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 형성하는 방법(문헌: Carter 등, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992))을 포함한다. 항체 단편 생산을 위한 다른 기술은 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0295] 특정 실시양태에서, 상기 항원 결합 단편은 scFv이다. scFv의 생성은 예를 들어 WO 93/16185; 미국 특허 제 5,571,894호; 및 제5,587,458호에 기재되어 있다. scFv는 아미노 또는 카르복실 말단에서 이펙터 단백질에 융합되어 융합 단백질을 제공할 수 있다(예를 들어, 문헌: *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck 참조).

[0296] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 2가, 4가, 6가, 또는 다가이다. 본원에서 사용되는 용어 "가(valent)"는 주어진 분자에서 특정 수의 항원 결합 부위의 존재를 언급한다. 이와 같이, "2가", "4가", 및 "6가"라는 용어는 항원 결합 분자에 각각 2개의 결합 부위, 4개의 결합 부위, 및 6개의 결합 부위가 존재하는 것을 의미한다. 2가 이상인 임의의 분자는 예를 들어 3가, 4가, 6가 등을 포함하는 다가인 것으로 간주된다.

[0297] 2가 분자는 2개의 결합 부위가 모두 동일한 항원 또는 동일한 에피토프에 대한 결합에 대해 특이적일 경우 단일 특이적일 수 있다. 이는 특정 실시양태에서, 1가 대응물보다 항원 또는 에피토프에 대한 더 강한 결합을 제공한다. 유사한, 다가 분자도 단일특이적일 수 있다. 특정 실시양태에서, 2가 또는 다가 항원 결합 부분에서, 결합 부위의 제1가 및 결합 부위의 제2가는 구조적으로 동일하거나(즉, 동일한 서열을 가짐), 또는 구조적으로 상이하다(즉, 동일하지만 상이한 특이성을 갖는 서열을 가짐).

[0298] 2가는 또한 2개의 결합 부위가 상이한 항원 또는 에피토프에 대해 특이적일 경우 이중특이적일 수 있다. 이는 다가 분자에도 적용된다. 예를 들어, 3가 분자는 2개의 결합 부위가 제1 항원(또는 에피토프)에 대해 단일특이적이고 제3 결합 부위가 제2 항원(또는 에피토프)에 대해 특이적일 때 이중특이적일 수 있다.

[0299] **에피토프**

[0300] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 결합하는 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 hGREM1에 대한 결합에 대해 본원에 제공된 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 경쟁하는 항체를 제공한다.

[0301] 본원에서 사용되는 용어 "에피토프"는 항체가 결합하는 항원 상의 원자 또는 아미노산의 특정 그룹을 언급한다. 에피토프는 항체와 직접 접촉하는 특정 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 또는 술폰릴 그룹을 포함할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 둘이 GREM1 항원 폴리펩타이드에 결합하기 위해 경쟁하는지 여부를 확인함으로써 항체가 본 개시내용의 항체와 동일하거나 중복되거나 인접한 에피토프(예를 들어, 하이브리도마/키메라 또는 인간화된 항체 14E3, 69H5, 22F1, 56C11, 36F5, 42B9 및 67G11 및 본원에서 제공되는 이들의 임의의 키메라 및 인간화된 변이체)에 결합하는지, 과도한 실험없이 결정할 수 있음을 인식할 것이다.

[0302] 2개의 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체)과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "결합을 위해 경쟁하다"는 경쟁적 결합 검정에 의해 결정된 바와 같이, 하나의 항원 결합 단백질이 항원(예를 들어, 인간/마우스 GREM1)에 대한 다른 단백질의 결합을 차단하거나 감소시키는 것을 의미한다. 경쟁적 결합 검정은 관련 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 직접 또는 간접 방사성면역검정(RIA), 직접 또는 간접 효소 면역검정(EIA), Fortebio, 경쟁 ELISA 검정, 및 샌드위치 경쟁 검정을 포함한다(예를 들어, 문헌: Stahli 등, 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253 참조). 전형적으로, 그러한 검정은 고체 표면 또는 항원을 함유하는 세포에 결합된 정제된 항원, 표지되지 않은 시험 항체 및 표지된 참조 항체의 사용을 포함한다. 경쟁적 억제 시험 항체의 존재 하에 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 결정함으로써 측정된다. 일반적으로 테스트 항체는 과량으로 존재한다. 2개

의 항체가 hGREM1에 결합하기 위해 경쟁하는 경우, 2개의 항체는 동일하거나 중복되는 에피토프, 또는 다른 항체에 의해 결합된 에피토프에 충분히 근접한 인접한 에피토프에 결합하여 입체 장애가 발생하게 된다. 일반적으로, 경쟁 항체가 과량으로 존재하는 경우, 공통 항원에 대한 테스트 항체의 특이적 결합을 적어도 50 내지 55%, 55 내지 60%, 60 내지 65%, 65 내지 70%, 70 내지 75%, 75 내지 80%, 80 내지 85%, 85 내지 90%, 또는 그 이상 만큼 억제(예컨대 감소)한다.

[0303] **생물학적 특성에 의해 분류된 항체 그룹**

[0304] 본원에서 제공되는 항체는 특정한 고유의 생물학적 특성을 갖는다. 따라서 항체는 특정한 고유의 생물학적 특성을 공유하므로 여러 그룹으로 분류할 수 있다.

[0305] **i) BMP 신호전달에 대한 hGREM1-매개 억제의 암 세포-선택적 감소를 갖는 항체**

[0306] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체는 비-암 세포보다 암 세포에서 선택적으로 BMP 신호전달에 대한 hGREM1-매개 억제를 감소시킬 수 있고, 14E3, 22F1, 56C11, 69H5, 42B9, 36F5 및 67G11로 이루어진 군으로부터 선택된 항체의 중쇄 CDR1(HCDR1), HCDR2 및 HCDR3 및 경쇄 CDR1(LCDR1), LCDR2, 및 LCDR3를 포함한다. 이들 항체는 암 치료 방법에 특히 유용하다.

[0307] 본 개시내용은 예기치 않게 본원에서 제공되는 특정 항-GREM1 항체를 사용한 GREM1의 중화가 암 세포에서 BMP 신호전달에 대한 GREM1-매개 억제를 선택적으로 억제하지만, 그러한 억제를 나타내지 않거나 비-암세포에서 매우 제한된 억제만을 나타낸다는 것을 발견하였다.

[0308] 암 세포에서 GREM1을 제거 및/또는 GREM1의 활성을 감소시키는 것이 바람직한데, 이는 암 세포 증식 및 구체 형성에 억제 영향을 미치고, 또한 암 세포 세포자살(apoptosis)을 유도할 것이기 때문이다. 그러나, 일반적으로 GREM1의 억제는 마우스에서 GREM1의 기존 녹아웃이 장관의 비정상적인 발달과 조혈 시스템의 장애를 일으키기 때문에 바람직하지 않을 수 있다(참조: Rowan, S. C. et al. *생체내 그렘린1 고갈은 심각한 장질환 및 골수부전을 일으킨다. J Pathol 251, 117-122*). 이는 기존의 GREM1 제거 및/또는 이의 활성 감소가 필연적으로 다른 정상 조직에 해로운 영향을 미칠 것임을 시사한다. 이와 관련하여, 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체에 의한 BMP 신호전달에 대한 GREM1-매개 억제의 예상치 못한 암 특이적 조절은 정상 조직에 대한 바람직하지 않은 부작용을 피함으로써 유리하다.

[0309] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체는 비 암 세포에서 BMP 신호 전달에 대한 GREM1-매개 억제의 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% 또는 5% 이하의 감소를 나타낸다.

[0310] 본원에서 사용되는 "BMP 신호전달"이라는 어구는 GREM1에 의해 억제될 수 있는 하나 이상의 BMP 리간드의 신호 전달을 언급한다. 특정 실시양태에서, BMP 신호전달은 BMP-2 신호전달 및/또는 BMP-4 신호전달이다.

[0311] 본원에서 사용되는 "비-암 세포"라는 어구는 암 세포가 아닌 세포를 언급한다. 비-암 세포는 대상체로부터 분리된 일차 세포인 세포주일 수 있다.

[0312] BMP 신호전달에 대한 GREM1-매개 억제는 각각 GREM1의 존재 및 부재하에 BMP 리간드(들)의 BMP 신호전달을 측정함으로써 결정될 수 있으며, 여기서 그 차이는 GREM1-매개 억제의 지표이다. 그러나, 항-GREM1 항체는 BMP 신호전달에 대한 GREM1-매개 억제를 감소시킬 수 있거나, 다른 말로, BMP 신호전달을 회복시킬 수 있다. BMP 신호전달의 GREM1-매개 억제 감소 또는 회복은 항-GREM1 항체가 없는 경우에 비해 항-GREM1 항체가 있는 경우 BMP 신호전달이 증가하는 것으로 계산할 수 있다. 그러한 감소 또는 그러한 회복의 백분율은 총 GREM1-매개 억제에 대한 GREM1-매개 억제의 감소 비율로 계산할 수 있다. BMP 신호전달에 대한 GREM1-매개 억제의 100% 감소는 BMP 신호전달이 GREM1이 없을 때의 수준과 실질적으로 동일한 수준으로 복원됨을 의미하며, 0% 감소는 BMP 신호전달이 복원되지 않음을 의미한다.

[0313] **ii) 키메라 hGREM1에 결합하는 항체(즉, XM5)**

[0314] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 특정 항-GREM1 항체는 BMP-결합 루프 외부의 에피토프에서 GREM1에 결합한다. 특정 실시양태에서, BMP-결합 루프는 서열번호 63의 아미노산 서열을 포함한다.

[0315] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체는 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 키메라 GREM1에 결합할 수 있다(본원에서 "XM5"라고도 함). 키메라 GREM1 XM5는 BMP의 결합 루프(즉, hGREM1의 123-143번째 아미노산 잔기(NSFYIPRHIRKEEGSFQSCSF, 서열번호 63))가 BMP에 결합하지 않는, DAN의 63~83번째 아미노산(FSYSVPNTFPQSTESLVHCDS, 서열번호 64)으로 대체된 hGREM1의 돌연변이 버전을 포함한다. 따라서, 이 키메라

hGREM1은 BMP에 결합하지 않는다. 특정 기존 항-GREM1 항체는 이 키메라 hGREM1에 결합할 수 없으며, 이는 hGREM1에 대한 결합에는 hGREM1의 BMP 결합 루프가 필요함을 시사한다. 대조적으로, 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체는 상기 키메라 hGREM1에 결합할 수 있으며, 이는 이들이 이 BMP-결합 루프 외부에 있는 에피토프에서 hGREM1에 결합함을 나타낸다.

- [0316] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체는 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 키메라 hGREM1에 결합할 수 있고, 14E3, 42B9, 67G11, 36F5, 56C11, 22F1 및 69H5로 이루어진 군으로부터 선택된 항체의 중쇄 CDR1(HCDR1), HCDR2, 및 HCDR3 및 경쇄 CDR1(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)을 포함한다.
- [0317] 벤치마크 항체 6245P는 X5에 결합할 수 없다.
- [0318] **iii) 마우스 GREM1에 대해 교차 반응성이 있거나 교차 반응성이 없는 항체**
- [0319] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체 중 일부는 hGREM1에 결합할 수 있지만 마우스 GREM1에 특이적으로 결합할 수 없다.
- [0320] hGREM1 및 마우스 GREM1은 98%의 서열 동일성을 공유하고, 상이한 아미노산 잔기는 hGREM1의 Gln27 및 Asn33을 포함하는 hGREM1의 N-말단 부분에서만 발견되며, 여기서 잔기 번호매김은 서열번호 69에 따른다. 따라서, 마우스 GREM1과 교차 반응하지 않는 항-GREM1 항체의 경우, 이들은 잔기 번호매김이 서열번호 69에 따르는, hGREM1의 Gln27 및/또는 Asn33을 포함하는 에피토프에서 hGREM1에 결합할 수 있을 것으로 예측되거나, 잔기 Gln27 및/또는 잔기 Asn33을 포함하는 hGREM1 단편에 결합하고, 임의로 hGREM1 단편은 적어도 3개(예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개)의 아미노산 잔기의 길이는 갖는다. 상기 에피토프는 형태적 에피토프 또는 선형 에피토프일 수 있다.
- [0321] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체는 hGREM1에 결합할 수 있지만 마우스 그램린1에 특이적으로 결합할 수 없으며, 69H5, 22F1 및 14E3으로 이루어진 군에서 선택된 항체의 중쇄 CDR1(HCDR1), HCDR2, 및 HCDR3 및 경쇄 CDR1(LCDR1), LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다.
- [0322] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체는 마우스 GREM1에 대해 교차 반응성이고, 56C11, 42B9, 36F5 및 67G11로 이루어진 군에서 선택된 항체의 중쇄 CDR1(HCDR1), HCDR2, 및 HCDR3 및 경쇄 CDR1(LCDR1), LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다.
- [0323] 벤치마크 항체 6245P는 마우스 GREM1에 대해 교차 반응성이다.
- [0324] **iv) hGREM1과 BMP7의 결합을 차단하는 항체**
- [0325] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체는 ELISA에 의해 측정될 때와 같이 적어도 50%의 최대 차단 백분율로 BMP7에 대한 hGREM1의 결합을 차단할 수 있다.
- [0326] 본원에서 사용되는 용어 "차단 백분율"은 차단제가 없을 때 두 단백질 사이의 상호작용에 비해, 차단제(예컨대 항-그램린 1 항체)의 존재 하에 두 단백질 사이의 감소된 상호작용(예컨대 BMP7에 대한 인간 그램린 1의 감소된 결합)의 백분율을 언급한다.
- [0327] 본원에서 사용되는 용어 "최대 차단 백분율"은 두 단백질(예컨대 인간 그램린 1 및 BMP7) 사이의 상호작용을 차단하기 위하여 차단제(예컨대 항-그램린 1 항체)에 의해 달성할 수 있는 최대(즉, 고원기의) 차단 백분율을 언급한다. 일반적으로, 차단 백분율은 차단제(예컨대 항-그램린 1 항체)의 농도가 증가함에 따라 증가하지만, 차단제(예컨대 항그램린 1 항체)의 농도가 더 증가하더라도 더 이상 차단할 수 없는 고원에 도달할 수 있다. 최대 차단 백분율이 더 높을수록 차단 효과가 더 높아진다. 최대 차단 백분율은 경쟁 ELISA 분석 및 경쟁 FACS 분석과 같은 다양한 분석에 따라 어느 정도 달라질 수 있다.
- [0328] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 특정 항-그램린 1 항체는 경쟁 ELISA 검정에 의해 측정될 때와 같이 hGREM1-BMP7 상호작용에 대해 적어도 50%의 최대 차단 백분율을 갖는다. 상기 검정 조건은 본 개시내용의 실시예 6에서 제공되는 것과 유사할 수 있다(인간 그램린 1의 농도는 1 $\mu$ g/ml이고, BMP7의 농도는 0.5 $\mu$ g/ml이다). hGREM1-BMP7 상호작용에 대한 상기 언급된 차단 활성을 갖는 예시적인 항-그램린 1 항체는 14E3(예를 들어, 14E3HaLa), 42B9, 36F5 및 67G11을 포함한다.
- [0329] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 특정 항-그램린 1 항체는 경쟁적 ELISA 검정에 의해 측정될 때와 같이 hGREM1-BMP7 상호작용에 대해 적어도 60%, 적어도 70%, 또는 적어도 75%의 최대 차단 백분율을 갖는다. 상기 검정 조건은 본 개시내용의 실시예 6에서 제공되는 것과 유사할 수 있다(인간 그램린 1의 농도는 1 $\mu$ g/ml이고,

BMP7의 농도는 0.5 $\mu$ g/ml이다). hGREM1-BMP7 상호작용에 대한 상기 언급된 차단 활성을 갖는 예시적인 항-그렘린 1 항체는 42B9, 36F5 및 67G11을 포함한다.

[0330] BMP-7은 신장을 포함하는 몇몇 성인 기관에서만 선택적으로 발현되는 시스테인-매듭을 갖는 동종이량체 단백질이다(Rui 등, 신장 섬유증에서 골 형태형성 단백질 7의 역할, *Front. Physiol.*, 23 April. 2015). 정상 신장에서 BMP-7의 발현은 성인 기관에서 가장 높으며, 허혈-재관류 손상, 당뇨병성 신증 및 고혈압성 신경화증 환자의 신장에서 하향 조절된다(Dudley 등, 포유류의 신장과 눈의 발달 중 골 형태형성 단백질-7의 요구(A requirements for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye). *Genes Dev.* 9, 2795-2807, 1995; Luo et al., BMP-7은 신장 생성의 유도제이며 눈 발달 및 골격 패턴에도 필요하다. *Genes Dev.* 9, 2808- 2820. 1995; Simon et al., 정상 및 허혈성 성체 래트 신장에서 골 형태형성 단백질-7 mRNA의 발현. *Am. J. Physiol.* 276, F382-F389, 1999; Wang et al., 당뇨병성 신증에서 관형 골 형태형성 단백질-7의 소실. *J. Am. Soc. Nephrol.* 12, 2392-2399, 2001; Bramlage et al., 인간 고혈압성 신경화증에서 골 형태형성 단백질(BMP)-7 발현이 감소된다. *BMC Nephrol.* 11:31. , 2010; Vukicevic et al., 골형성 단백질-1(골 형태형성 단백질-7)은 래트에서 허혈성 급성 신부전 후 손상의 중증도를 감소시킨다. *J. Clin. Invest.* 102, 202-214., 1998; Simon 등, 정상 및 허혈 성체 래트 신장에서 골 형태형성 단백질-7 mRNA의 발현. *Am. J. Physiol.* 276, F382-F389., 1999).

[0331] BMP7은 TGF $\beta$  수퍼패밀리의 주요 사이토킨 중 하나로서 세포외 매트릭스(ECM) 생성을 증가시키고 이의 분해를 감소시킴으로써 신장 섬유화를 매개하는 TGF- $\beta$  신호전달 경로를 상쇄함으로써 만성 신장 질환에서 항섬유화 역할을 한다(Rui et al., 신장 섬유증에서 골 형태형성 단백질-7의 역할, *Front. Physiol.*, 2015년 4월 23일). 신장 손상의 여러 동물 모델에서 BMP7 치료는 신장 섬유증을 역전시키고, 신장 기능을 회복시키는 것으로 보고되었다(Hruska et al., 골 형태형성 단백질-1은 요관 폐색과 관련된 신장 섬유증을 방지한다. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 279, F130-F143. (2000); Jeremiah et al., 골 형태형성 단백질-7은 신장 섬유증을 개선하고 신장 기능의 회복을 가속화한다, *J Am Soc Nephrol.* 2002 Jan:).

[0332] 그러나, 신장에서 BMP7의 활성은 BMP7 자체의 이용가능성에 의해 결정될 뿐만 아니라 작용제와 길항제(예컨대 그렘린)의 균형에 의해 결정된다. BMP7을 신장 섬유증 및 기타 신장 질환(예컨대 급성 및 만성 신장 손상) 치료에 사용하는 경우, BMP7 길항제(예컨대 그렘린)의 존재를 이의 치료 효능에 대해 고려해야 한다(Michael et al., BMP7에 의한 실험적 신장 섬유증의 역전은 만성 신장 질환에 대한 새로운 치료 전략에 대한 통찰력을 제공한다, *Pediatr Nephrol.* 2008 Sep;23(9): 1395-8).

[0333] 본 개시내용은 그렘린 1이 BMP7에 결합하고, 본원에서 제공되는 항-그렘린 1 항체(예를 들어, 42B9, 36F5, 67G11 및 14E3HaLa)가 벤치마크 항체와 비교하여, BMP7에 결합하는 그렘린 1에 대해 보다 강력한 차단 활성을 갖는다는 것을 보여준다. 본원에서 사용되는 용어 "벤치마크 항체"는 W02014159010에 개시된 H4H6245P의 서열에 따라 생산된 임의의 기존 항-GREM1 항체, 예를 들어 6245P를 언급하며, 이의 개시내용은 이의 전문이 참조로 인용된다. 다시 말해서, 본원에서 제공되는 항-그렘린 1 항체(예컨대 42B9, 36F5, 67G11 및 14E3HaLa)는 BMP7-발현 기관(예컨대 신장) 기능에서 BMP7 활성을 복원할 수 있다. 따라서, 본원에서 제공되는 항-그렘린 1 항체(예를 들어, 42B9, 36F5, 67G11 및 14E3HaLa)가 섬유성 질환 및 신장 질환(예를 들어, 신장 섬유증)에 대한 치료 효능을 개선할 수 있다는 것이 합리적으로 예상될 수 있다.

[0334] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체는 ELISA에 의해 측정될 때와 같이 적어도 50%의 최대 차단 백분율로 BMP7에 대한 hGREM1의 결합을 차단할 수 있고, 42B9, 36F5 및 67G11로 이루어진 군으로부터 선택된 항체의 중쇄 CDR1(HCDR1), HCDR2 및 HCDR3 및 경쇄 CDR1(LCDR1), LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체는 ELISA에 의해 측정될 때와 같이 30% 내지 50%의 최대 차단 백분율로 BMP7에 대한 hGREM1의 결합을 차단할 수 있고, 항체 14E3의 중쇄 CDR1(HCDR1), HCDR2 및 HCDR3 및 항체 14E3의 경쇄 CDR1(LCDR1), LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.

[0335] v) GREM1에 대한 FGFR의 결합을 차단하는 항체

[0336] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체는 FGFR(예를 들어, FGFR1, 바람직하게는 인간 FGFR1(hFGFR1) 또는 마우스 FGFR1(mFGFR1))에 대한 GREM1(예를 들어, hGREM1 또는 mGREM1)의 차단 상호작용의 결합을 차단할 수 있으며, 14E3, 42B9, 67G11 및 36F5로 이루어진 군으로부터 선택된 항체의 중쇄 CDR1(HCDR1), HCDR2 및 HCDR3 및 경쇄 CDR1(LCDR1), LCDR2 및 LCDR3을 포함한다. 이들 항체는 FGFR 또는 FGFR 활성화에 결합하는 GREM1과 관련된 병태 또는 질환을 치료하는 방법에 특히 유용하다.

- [0337] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체는 FGFR(예를 들어, FGFR1, 바람직하게는 인간 FGFR1(hFGFR1) 또는 마우스 FGFR1(mFGFR1))에 대한 GREM1(예를 들어, hGREM1 또는 mGREM1)의 차단 상호작용의 결합을 차단하지 않으며, 56C11로 이루어진 군으로부터 선택된 항체의 중쇄 CDR1(HCDR1), HCDR2 및 HCDR3 및 경쇄 CDR1(LCDR1), LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.
- [0338] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체는 FGFR(예를 들어, FGFR1, 바람직하게는 인간 FGFR1(hFGFR1) 또는 마우스 FGFR1(mFGFR1))에 대한 GREM1(예를 들어, hGREM1 또는 mGREM1)의 차단 상호작용의 결합을 부분적으로 차단하고(적어도 2nM, 적어도 3nM, 적어도 4nM, 적어도 5nM, 적어도 6nM 또는 적어도 7nM의 IC<sub>50</sub>으로), 항체 22F1 또는 69H5의 중쇄 CDR1(HCDR1), HCDR2 및 HCDR3 및 경쇄 CDR1(LCDR1), LCDR2, 및 LCDR3을 포함한다.
- [0339] **vi) MAPK 신호전달에 대한 GREM1-매개 활성화를 감소시키는 항체**
- [0340] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체는 MAPK 신호전달에 대한 GREM1-매개 활성화를 감소시킬 수 있다. MAPK 신호전달이 종양 세포 증식, 이동, 혈관신생 및 상피-중간엽 전이(EMT)를 유지하기 위한 중요한 신호 경로라는 것은 관련 기술분야에 잘 알려져 있다. MAPK 신호전달은 표피 성장 인자(EGF) 수용체를 통해 EGF로 불리는 리간드에 의해, 또는 섬유아세포 성장 인자(FGF) 수용체를 통해 FGF로 불리는 리간드에 의해 활성화될 수 있다는 것이 관련 기술분야에 알려져 있다. 본 개시내용은 놀랍게도 GREM1이 MAPK 신호전달의 활성화에서 역할을 하는 것으로 보이며, 아마도 FGFR의 신규 리간드로서 작용한다는 것을 발견하였다. 본 개시내용은 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체가 MAPK 신호전달에 대한 GREM1-매개 활성화를 감소시킬 수 있고, 특히 FGFR에 대한 GREM1의 상호작용을 차단할 수 있다는 것을 추가로 발견하였다.
- [0341] **vii) hGREM1 및 DAN 둘 다에 결합하는 항체**
- [0342] 본 개시내용에서 제공되는 항체는 GREM1을 포함하는 1개 이상(예를 들어, 1, 2, 3개 이상)의 DAN 계열 구성원에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체는 hGREM1 및 DAN 둘 다에 결합할 수 있다. 본원에서 사용되는 "DAN"이라는 용어는 DAN 계열의 창립 구성원(Nb11 및 DAND1이라고도 함)을 언급하며, 이는 BMP 신호전달을 조절하기 위한 보통의 길항제이다. DAN은 처음에 신경모세포종에서 종양 억제 유전자로 작용했다. BMP 신호전달과 DAN 억제 사이의 균형을 잘못 조절하면, 암, 신장 신증, 및 폐동맥 고혈압을 비롯한 수많은 질병 상태가 발생할 수 있다. 그렘린은 강력한 길항제 역할을 하고 DAN은 보통의 길항제 역할을 한다. 둘 다 BMP2, BMP4 및 BMP7을 길항할 수 있지만, 그들은 ~20%의 동일성만 공유한다.
- [0343] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체는 hGREM1 및 DAN 둘 다에 결합할 수 있고, 36F5, 42B9 및 67G11로 이루어진 군에서 선택된 항체의 중쇄 CDR1(HCDR1), HCDR2 및 HCDR3 및 경쇄 CDR1(LCDR1), LCDR2 및 LCDR3을 포함한다. 이들 항체는 GREM1 및 DAN 둘 다와 관련된 병태 또는 질환을 치료하는 방법에 특히 유용하다.
- [0344] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체는 hGREM1에 결합할 수 있지만 DAN에는 결합할 수 없으며, 항체 14E3, 22F1, 56C11 또는 69H5의 중쇄 CDR1(HCDR1), HCDR2 및 HCDR3 및 경쇄 CDR1(LCDR1), LCDR2 및 LCDR3을 포함한다.
- [0345] **이중특이적 항체**
- [0346] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 항체 및 이의 항원 결합 단편은 이중특이적이다. 본원에서 사용되는 용어 "이중특이적"은 2개 이상의 특이성을 갖는 분자 및 2개 이상의 특이성을 갖는 분자, 즉 다중특이성을 갖는 분자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 이중특이적 항체 및 이의 항원 결합 단편은 hGREM1의 제1 및 제2 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있거나, hGREM1 및 제2 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, hGREM1의 제1 에피토프 및 제2 에피토프는 서로 구별되거나 중첩되지 않는다. 특정 실시양태에서, 상기 이중특이적 항체 및 이의 항원 결합 단편은 제1 에피토프 및 제2 에피토프 둘 다에 동시에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 제2 항원은 hGREM1과 상이하다.
- [0347] 특정 실시양태에서, 제2 항원은 면역 관련 표적이다. 본원에서 사용되는 면역 관련 표적은 면역 반응, 임의로 세포 면역 반응의 생성, 억제 또는 조절에 관여하는 생물학적 분자를 포함한다. 면역 관련 표적의 예는 면역 체크포인트 분자이다
- [0348] 면역 체크포인트 분자는 공동 자극 신호를 매개하여 면역 반응을 증가시키거나, 공동 억제 신호를 매개하여 면역 반응을 억제할 수 있다. 면역 체크포인트 분자의 예는 PD-L1, PD-L2, PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG3, A2AR, CD160, 2B4, TGF β VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, OX40, CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD47, CD122, ICAM-1,

IDO, NKG2C, SLAMF7, SIGLEC7, NKp80, CD160, B7-H3, LFA-1, ICOS, 4-1BB, GITR, BAFRR, HVEM, CD7, LIGHT, IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, CD3, CD16 및 CD83이다. 특정 실시양태에서, 제2 항원은 PD-1, PD-L1, CTLA-4, 또는 LAG-3을 포함한다.

[0349] 특정 실시양태에서, 상기 제2 항원은 종양 항원을 포함한다. 본원에서 사용되는 "종양 항원"은 종양 특이적 항원(예를 들어, 종양 세포에 독특하고 정상적으로 비종양 세포에서는 발견되지 않는 것), 및 종양 관련 항원(예를 들어, 종양 및 비종양 세포 모두에서 발견되지만, 종양 세포에서 상이하게 발현되거나, 종양 미세 환경에서 발견됨)을 언급한다. 종양 특이적 항원은 또한 종양 신생항원(예를 들어, 단백질 서열을 변경하거나 2개의 관련 없는 서열 사이에 융합 단백질을 생성하는 체세포 돌연변이 때문에 암 세포에서 발현됨)을 포함할 수 있다.

[0350] 종양 항원의 예는 제한 없이, 전립선 특이 항원(PSA), CA-125, 강글리오사이드 G(D2), G(M2) 및 G(D3), CD20, CD52, CD33, Ep-CAM, CEA, 봄베신 유사 펩타이드, HER2/neu, 표피 성장 인자 수용체(EGFR), erbB2, erbB3/HER3, erbB4, CD44v6, Ki-67, 암 관련 뮤신, VEGF, VEGFRs(예컨대 VEGFR3), 에스트로젠 수용체, 루이스(Lewis)-Y 항원, TGF1, IGF-1 수용체, EGF, c-Kit 수용체, 트랜스페린 수용체, 클라우딘 18.2, GPC-3, 넥틴-4, ROR1, 메토텔린, PCMA, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15, BCR-ABL, E2APRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, IL-2R, CO17-1A, TROP2, 또는 LIV-1을 포함한다.

[0351] 특정 실시양태에서, 상기 종양 항원은 전립선 특이 항원(PSA), CA-125, 강글리오사이드 G(D2), G(M2) 및 G(D3), CD20, CD52, CD33, Ep-CAM, CEA, 봄베신 유사 펩타이드, HER2/neu, 표피 성장 인자 수용체(EGFR), erbB2, erbB3/HER3, erbB4, CD44v6, Ki-67, 암 관련 뮤신, VEGF, VEGFRs(예컨대 VEGFR3), 에스트로젠 수용체, 루이스(Lewis)-Y 항원, TGF1, IGF-1 수용체, EGF, c-Kit 수용체, 트랜스페린 수용체, 클라우딘(Claudin) 18.2, GPC-3, 넥틴(Nectin)-4, ROR1, 메토텔린, PCMA, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15, BCR-ABL, E2APRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, IL-2R, CO17-1A, TROP2, 또는 LIV-1을 포함한다.

[0352] 본원에서 제공되는 이중특이적 항체 및 이의 항원 결합 단편은 관련 기술분야에 공지된 적합한 형식일 수 있다. 예를 들어, 예시적인 이중특이적 형식은 이중특이적 디아바디, scFv 기반 이중특이적 형식, IgG-scFv 융합, 이중 가변 도메인(DVD)-Ig, 퀴드로마(Quadroma), 노브-인투-홀(knob-into-hole), 공통 경쇄(예컨대 노브-인투-홀이 있는 공통 경쇄 등), BiTE, 크로스Mab, 크로스Fab, 듀오바디(Duobody), SEED바디, 류신 지퍼, 이중 작용 Fab(DAF)-IgG, 및 Mab<sup>2</sup> 이중특이적 형식(예를 들어, 문헌: Brinkmann et al. 2017, Mabs, 9(2): 182-212 참조)일 수 있다. 상기 이중특이적 분자는 대칭 또는 비대칭 구조일 수 있다.

[0353] 본원에서 제공되는 이중특이적 항체 및 항원 결합 단편은 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법으로 제조될 수 있다.

[0354] 하나의 실시양태에서, 상이한 항원 특이성을 갖는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍은 재조합 방식으로 이중특이적 항체를 생성하기 위해 숙주 세포에서 공동 발현되고(예를 들어, 문헌: Milstein and Cuello, Nature, 305: 537 (1983) 참조), 이어서 친화성 크로마토그래피로 정제된다.

[0355] 또 다른 실시양태에서, 2개의 특이성에 대한 항체 중쇄 가변 도메인을 코딩하는 서열은 각각 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된 후, 하나 이상의 발현 벡터(들)에 삽입되는데, 이는 경쇄 서열의 경우 이중특이적 항체의 재조합 발현에 적합한 숙주 세포로 삽입되거나/공동-형질감염된다(예를 들어, WO 94/04690; Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986) 참조). 유사하게, scFv 이량체는 또한 숙주 세포로부터 재조합적으로 작제되고 발현될 수 있다(예를 들어, 문헌: Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994) 참조).

[0356] 다른 방법에서, Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩타이드는 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결될 수 있다. 연결된 항체는 힌지 영역에서 4개의 절반 항체(즉, 단량체)로 환원된 다음 재산화되어 이중이량체를 형성한다(문헌: Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)).

[0357] 2개의 항원 결합 도메인은 또한 접합되거나 가교결합되어 이중특이적 항체 또는 항원 결합 단편을 형성할 수 있다. 예를 들어, 하나의 항체는 비오틴에 커플링될 수 있고 다른 항체는 아비딘에 커플링될 수 있으며, 비오틴과 아비딘 사이의 강한 회합은 두 항체가 함께 복합체화하여 이중특이적 항체를 형성할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,676,980호; WO 91/00360, WO 92/00373, 및 EP 03089 참조). 또 다른 예로, 2개의 항체 또는 항원 결합 단편은 관련 기술분야에 공지된 통상의 방법, 예를 들어 미국특허 제4,676,980호에 개시된 바와 같이, 가교-결합될 수 있다.

[0358] 이중특이적 항원 결합 단편은 예를 들어, 단백질분해 절단에 의해, 또는 화학적 연결에 의해 이중특이적 항체로

부터 생성될 수 있다. 예를 들어, 항체의 항원 결합 단편(예를 들어, Fab')을 제조하고 Fab'-티올 유도체로 전환한 다음, 상이한 항원 특이성을 갖는 또 다른 전환된 Fab' 유도체와 혼합 및 반응시켜 이중특이적 항원 결합 단편을 형성할 수 있다(예를 들어, 문헌: Brennan et al., Science, 229: 81(1985) 참조).

[0359] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 노브-인트루-홀 회합이 형성되어 2개의 상이한 항원 결합 부위의 이중이량체화를 촉진할 수 있도록 인터페이스에서 조작될 수 있다. 이는 제조할 세포 배양에서 회수되는 이중이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 본원에서 사용된 "노브-인트루-홀"은 2개의 폴리펩타이드(예컨대 Fc) 사이의 상호작용을 의미하며, 여기서 하나의 폴리펩타이드는 부피가 큰 측쇄를 갖는 아미노산 잔기(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)의 존재로 인해 돌기(즉, "노브")를 가지며, 다른 폴리펩타이드는 작은 측쇄 아미노산 잔기(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)가 존재하는 공동(즉, "구멍")을 가지고, 돌출부는 2개의 폴리펩타이드의 상호작용을 촉진하여 이중이량체 또는 복합체를 형성하기 위해 공동에 위치할 수 있다. 노브-인트루-홀을 갖는 폴리펩타이드를 생성하는 방법은 예를 들어 미국 특허 제5,731,168호에 기재된 바와 같이, 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0360] **접합체**

[0361] 일부 실시양태에서, 항-hGREM1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 하나 이상의 접합체 부분에 연결된다. 접합체는 항체 또는 이의 항원 결합 단편에 부착될 수 있는 부분이다. 다양한 접합체가 본원에서 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편에 연결될 수 있음이 고려된다(예를 들어, "접합체 백신", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse 및 R. E. Lewis, Jr. (eds.), Carger Press, New York, (1989) 참조). 이들 접합체는 다른 방법 중에서 공유 결합, 친화성 결합, 치윤(intercalation), 배위 결합, 복합체화, 회합, 블렌딩, 또는 첨가에 의해 항체 또는 항원 결합 단편에 연결될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 링커를 통해 하나 이상의 접합체에 연결된다. 특정 실시양태에서, 상기 링커는 하이드라존 링커, 이황화 링커, 이중기능성 링커, 디펩타이드 링커, 글루쿠로나이드 링커, 티오에테르 링커이다.

[0362] 특정 실시양태에서, 본원에서 개시되는 항-hGREM1 항체 및 항원 결합 단편은 하나 이상의 접합체에 결합하기 위해 이용될 수 있는 에피토프 결합 부분 외부의 특정 부위를 함유하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 이러한 부위는 접합체에 대한 공유 결합을 용이하게 하기 위해, 예를 들어, 시스테인 또는 히스티딘 잔기와 같은 하나 이상의 반응성 아미노산 잔기를 포함할 수 있다.

[0363] 접합체는 제거-변형제, 치료제(예를 들어, 화학요법제), 독소, 방사성 동위원소, 검출가능한 표지(예를 들어, 란타나이드, 발광 표지, 형광 표지 또는 효소-기질 표지), 약동학 변형 부분, DNA-알킬화제, 토포이소머라제 억제제, 튜불린 결합제, 안드로젠 수용체 억제제와 같은 다른 항암 약물일 수 있다.

[0364] 검출가능한 라벨의 예는 형광 라벨(예를 들어, 플루오레세인, 로다민, 단실, 피코에리트린 또는 텍사스 레드), 효소-기질 라벨(예를 들어, 서양고추냉이 퍼옥시다아제, 알칼리 포스파타아제, 루세리페라아제, 글루코아미라아제, 라이소자임, 사카라이드 옥시다아제 또는 β 갈락토시다아제), 방사성 동위원소, 기타 란타나이드, 발광 표지, 발색 부분, 디곡시제닌, 비오틴/아비딘, 검출용 DNA 분자 또는 금을 포함할 수 있다.

[0365] 방사성 동위원소의 예는 <sup>123</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>3</sup>H, <sup>111</sup>In, <sup>112</sup>In, <sup>14</sup>C, <sup>64</sup>Cu, <sup>67</sup>Cu, <sup>86</sup>Y, <sup>88</sup>Y, <sup>90</sup>Y, <sup>177</sup>Lu, <sup>211</sup>At, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>153</sup>Sm, <sup>212</sup>Bi, 및 <sup>32</sup>P를 포함할 수 있다. 방사성 동위원소 표지 항체는 수용체 표적 영상화 실험에 유용하다.

[0366] 특정 실시양태에서, 상기 접합체는 항체의 반감기를 증가시키는 데 도움이 되는 PEG와 같은 약동학적 변형 부분일 수 있다. 다른 적합한 중합체는 예를 들어, 카르복시메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체 등을 포함한다.

[0367] 특정 실시양태에서, 상기 접합체는 자기 비드 또는 나노입자와 같은 정제 부분일 수 있다.

[0368] **약학 조성물**

[0369] 본 개시내용은 항-hGREM1 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0370] 본원에 개시되는 약학 조성물에 사용하기 위한 약학적으로 허용되는 담체는 예를 들어, 약학적으로 허용되는 액체, 겔 또는 고체 담체, 수성 비히클, 비수성 비히클, 항미생물제, 등장화제, 완충제, 항산화제, 마취제, 현탁제/분배제, 봉쇄제 또는 킬레이트제, 희석제, 애주버트, 부형제 또는 비-독성 보조 물질, 관련 기술분야에 공

지된 기타 성분, 또는 이들의 다양한 조합을 포함할 수 있다.

[0371] 적합한 성분은 예를 들어 항산화제, 충전제, 결합제, 붕해제, 완충제, 방부제, 윤활제, 향료, 증점제, 착색제, 유화제 또는 안정제, 예컨대 당 및 사이클로덱스트린을 포함할 수 있다. 적합한 항산화제는 예를 들어 메티오닌, 아스코르브산, EDTA, 티오황산나트륨, 백금, 카탈라제, 시트르산, 시스테인, 티오글리세롤, 티오글리콜산, 티오소르비톨, 부틸화 하이드록시아니솔, 부틸화 하이드록시톨루엔 및/또는 프로필 갈레이트를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 바와 같이, 본원에서 제공되는 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편 및 접합체를 포함하는 조성물에 메티오닌과 같은 하나 이상의 항산화제를 포함시키면 항체 또는 항원 결합 단편의 산화가 감소된다. 이러한 산화 감소는 결합 친화도의 손실을 방지하거나 감소시켜, 항체 안정성을 개선하고 유통기한을 최대화한다. 따라서, 특정 실시양태에서 본원에 개시된 바와 같은 하나 이상의 항체 또는 항원 결합 단편 및 메티오닌과 같은 하나 이상의 항산화제를 포함하는 조성물이 제공된다. 항체 또는 항원 결합 단편을 메티오닌과 같은 하나 이상의 항산화제와 혼합함으로써 본원에서 제공되는 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편의 산화를 방지하고, 유통 기한을 연장하고/하거나 효능을 개선하는 방법이 추가로 제공된다.

[0372] 추가 예시를 위해, 약학적으로 허용되는 담체는 예를 들어, 염화나트륨 주사, 링거 주사, 등장 텍스트로스 주사, 멸균수 주사, 또는 텍스트로스와 젖산 링거 주사와 같은 수성 비히클, 식물성 고정유, 면실유, 옥수수유, 참기름 또는 땅콩기름과 같은 비수성 비히클, 정균 또는 진균 농도의 항미생물제, 염화나트륨 또는 텍스트로스 와 같은 등장제, 인산염 또는 구연산염 완충제와 같은 완충제, 황산수소나트륨과 같은 항산화제, 프로카인 하이 드로클로라이드와 같은 국소 마취제, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스, 또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 현탁 및 분산제, 폴리소르베이트 80(TWEEN-80)과 같은 유화제, EDTA(에틸렌디아민테트라 아세트산) 또는 EGTA(에틸렌 글리콜 테트라아세트산)와 같은 격리제 또는 킬레이트제, 에틸 알코올, 폴리에틸 렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 수산화나트륨, 염산, 구연산 또는 젖산을 포함할 수 있다. 담체로 사용되는 항미 생물제는 페놀 또는 크레졸, 수은, 벤질 알코올, 클로로부탄올, 메틸 및 프로필 p-하이드록시벤조산 에스테르, 티메로살, 염화벤잘코늄 및 염화벤제토늄을 포함하는 다중 용량 용기의 약학 조성물에 첨가될 수 있다. 적합한 부형제는 예를 들어 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤 또는 에탄올을 포함할 수 있다. 적합한 무독성 보조 물질은 예를 들어 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정제, 용해도 향상제, 또는 나트륨 아세테이트, 소르비탄 모노 라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트 또는 사이클로덱스트린과 같은 제제를 포함할 수 있다.

[0373] 약학 조성물은 액체 용액, 현탁액, 에멀전, 알약, 캡슐, 정제, 지속 방출 제형 또는 분말일 수 있다. 경구 제형 은 만니톨, 락토스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 폴리비닐 피롤리돈, 사카린나트륨, 셀룰로스, 탄산마그네슘 등과 같은 약학적 등급의 표준 담체를 포함할 수 있다.

[0374] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 주사용 조성물로 제형화된다. 주사 가능한 약학 조성물은 예를 들어 액체 용 액, 현탁액, 에멀전 또는 액체 용액, 현탁액 또는 에멀전을 생성하기에 적합한 고체 형태와 같은 임의의 통상적 인 형태로 제조될 수 있다. 주사용 제제에는 주사용 멸균 및/또는 비발열성 용액, 피하 정제를 포함하여 사용 직전에 용매와 혼합할 수 있는 동결건조 분말과 같은 멸균 건조 가용성 제품, 주사용 멸균 현탁액, 사용 직전에 비히클과 결합할 준비가 된 멸균 건조 불용성 제품, 및 멸균 및/또는 비발열성 유제가 포함될 수 있다. 용액은 수성 또는 비수성일 수 있다.

[0375] 특정 실시양태에서, 단위 용량 비경구 제제는 앰플, 바이알 또는 바늘이 있는 주사기에 포장된다. 비경구 투여 를 위한 모든 제제는 관련 기술분야에 공지되고 실행되는 바와 같이 멸균되어야 하고 발열성이 아니어야 한다.

[0376] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편을 적합한 용매에 용해시켜 멸균 동결건 조 분말을 제조한다. 용매는 안정성을 향상시키는 부형제 또는 분말로부터 제조된 분말 또는 재구성 용액의 다 른 약리학적 성분을 함유할 수 있다. 사용될 수 있는 부형제는 물, 텍스트로스, 소르비탈, 과당, 옥수수 시럽, 자일리톨, 글리세린, 글루코스, 수크로스 또는 기타 적합한 제제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 용매는 구연산염, 인산나트륨 또는 인산칼륨과 같은 완충제 또는 하나의 실시양태에서 대략 중성 pH에서, 관련 기술분 야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 그러한 완충제를 함유할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공 지된 표준 조건 하에서 용액의 후속 멸균 여과에 이은 동결건조는 바람직한 제형을 제공한다. 하나의 실시양태 에서, 상기 생성된 용액은 동결건조를 위해 바이알에 분배될 것이다. 각각의 바이알은 단일 투여량 또는 다중 투여량의 항-hGREM1 항체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이의 조성물을 함유할 수 있다. 1회 용량 또는 용량 세트에 필요한 것을 넘는 적은 양(예컨대 약 10%)으로 바이알을 과도하게 채우는 것은 정확한 샘플 회수 및 정 확한 투약을 용이하게 하기 위해 허용된다. 동결건조된 분말은 약 4°C 내지 실온과 같은 적절한 조건 하에 보관 될 수 있다.

- [0377] 주사용 물로 동결건조된 분말을 재구성하면 비경구 투여에 사용하기 위한 제형이 제공된다. 하나의 실시양태에서, 재구성을 위해 멸균 및/또는 비-발열수 또는 기타 적절한 액체 담체가 동결건조 분말에 첨가된다. 정확한 양은 제공되는 선택된 요법에 따라 다르며 경험적으로 결정될 수 있다.
- [0378] 특정 실시양태에서, 상기 약학 조성물은 제2 치료제를 추가로 포함한다.
- [0379] 특정 실시양태에서, 제2 치료제는 암을 치료하기 위한 제제, 예를 들어 화학요법제, 항암제, 방사선 요법, 면역요법, 항혈관형성제(예를 들어, VEGFR의 길항제, 예컨대 VEGFR-1, VEGFR-2 및 VEGFR-3), 표적 치료제, 세포 치료제, 유전자 치료제, 호르몬 치료제, 사이토킨, 완화 치료, 암 치료를 위한 수술(예컨대 종양 절제술), 또는 하나 이상의 항구토제 또는 화학 요법에서 발생하는 합병증에 대한 기타 치료법일 수 있다.
- [0380] 특정 실시양태에서, 제2 치료제는 항혈관형성제, 예를 들어 VEGFR 또는 VEGF의 길항제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 치료제는 항-VEGFR 항체 또는 항-VEGF 항체를 포함한다. 특정 실시양태에서, 제2 치료제는 항-VEGFR-2 항체를 포함한다.
- [0381] 특정 실시양태에서, 제2 치료제는 섬유성 질환 치료제일 수 있다.
- [0382] 특정 실시양태에서, 제2 치료제는 섬유증 또는 암과 관련된 적어도 하나의 합병증을 관리하거나 치료한다.
- [0383] **폴리뉴클레오티드 및 재조합체 방법**
- [0384] 본 개시내용은 항-hGREM1 항체 및 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본원에서 사용되는 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA) 및 이들의 중합체를 언급한다. 달리 나타내지 않는 한, 특정 폴리뉴클레오티드 서열은 또한 이의 보존적으로 변형된 변이체(예를 들어, 축퇴 코돈 치환), 대립유전자, 오르토로그, SNP 및 상보적 서열뿐만 아니라 명시적으로 표시된 서열을 함축적으로 포함한다. 구체적으로, 축퇴 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 세 번째 위치가 혼합 염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다(문헌: Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991), Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); 및 Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994) 참조).
- [0385] 특정 실시양태에서, 상기 단리된 폴리뉴클레오티드는 서열번호 9, 10, 19, 20, 29, 30, 39, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 및 142 내지 147에 나타낸 바와 같은 하나 이상의 뉴클레오티드 서열, 및/또는 적어도 80%(예를 들어, 적어도 85%, 88%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%) 서열 동일성을 갖는 서열, 및/또는 축퇴 치환만을 갖는 이의 변이체를 포함하며, 본원에서 제공되는 예시적인 항체의 가변 영역을 코딩한다.
- [0386] 단클론 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여(예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 단리되고 서열분석된다. 상기 코딩하는 DNA는 합성 방법으로도 얻을 수 있다.
- [0387] 본 개시내용은 본원에서 제공되는 단리된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터(예를 들어, 발현 벡터)를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 발현 벡터는 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터(예를 들어, SV40, CMV, EF-1 $\alpha$ ), 및 적어도 하나의 선택 마커를 포함한다. 벡터의 예는 레트로바이러스(렌티바이러스 포함), 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스, 헤르페스바이러스(예컨대 단순 헤르페스 바이러스), 폭스바이러스, 바쿨로바이러스, 유두종바이러스, 파포바이러스(예컨대 SV40), 람다 파지, 및 M13 파지, 플라스미드, 예컨대 pcDNA3.3, pMD18-T, pOptivec, pCMV, pEGFP, pIRES, pQD-Hyg-GSeu, pALTER, pBAD, pcDNA, pCal, pL, pET, pGEMEX, pGEX, pCI, pEGFT, pSV2, pFUSE, pVITRO, pVIVO, pMAL, pMONO, pSELECT, pUNO, pDUO, Psg5L, pBABE, pWPXL, pBI, p15TV-L, pPro18, pTD, pRS10, pLexA, pACT2.2, pCMV-SCRIPT.RTM., pCDM8, pCDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, PCR 2.1, pEF-1, pFB, pSG5, pXT1, pCDEF3, pSVSPORT, pEF-Bos 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0388] 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터는 클로닝 또는 유전자 발현을 위해 숙주 세포에 도입될 수 있다. 본원의 벡터에서 DNA를 클로닝하거나 발현시키기에 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 효모 또는 진핵생물 고등 진핵생물 세포이다. 이러한 목적에 적합한 원핵생물은 진정세균, 예를 들어 그람 음성 또는 그람 양성 유기체, 예를 들어 에스케리키아(*Escherichia*)와 같은 엔테로박테리아과(*Enterobacteriaceae*), 예컨대 대장균(*E. coli*), 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클렙시엘라

(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 살모넬라(Salmonella), 예를 들면, 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium), 세라티아(Serratia), 예를 들면, 세라티아 마르세스칸스(Serratia marcescans), 및 쉬겔라(Shigella), 뿐만 아니라 B. 서브틸리스(subtilis) 및 B. 리체니포르미스(licheniformis)와 같은 바실리(Bacilli), P. 아에루기노사(aeruginosa)와 같은 슈도모나스(Pseudomonas) 및 스트렙토마이세스(Streptomyces)이다.

[0389] 원핵생물 외에, 사상 진균(filamentous fungi) 또는 효모와 같은 진핵 미생물은 항-hGREM1 항체-코딩 벡터에 대해 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로미세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae) 또는 일반 빵 효모는 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 일반적으로 사용된다. 그러나, 수 많은 다른 속, 종, 및 균주가 일반적으로 입수가 가능하며 본원에서 유용한데, 예컨대 쉬조사카로미세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe); 클루이베로미세스(Kluyveromyces) 숙주, 예를 들어 K. 락티스(lactis), K. 프라길리스(fragilis) (ATCC 12,424), K. 불가리쿠스(bulgaricus) (ATCC 16,045), K. 비케라미(wickeramii) (ATCC 24,178), K. 왈티(waltii) (ATCC 56,500), K. 드로스필라룸(drosophilum) (ATCC 36,906), K. 써모톨레란스(thermotolerans), 및 K. 마르시아누스(marxianus); 야로위아(yarrowia)(EP 402,226); 피키아 파스토리스(Pichia pastoris)(EP 183,070); 칸디다(Candida); 트리코더마 리시아(Trichoderma reesia)(EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(Neurospora crassa); 슈바니오미세스 오시덴탈리스(Schwanniomyces occidentalis)와 같은 슈바니오미세스(Schwanniomyces); 및 사상균류, 예를 들어 뉴로스포라(Neurospora), 페니실리움 톨리포클라디움(Penicillium, Tolypocladium), 및 A. 니들란스(nidulans) 및 A. 니저(niger)와 같은 아스퍼길러스(Aspergillus) 숙주가 있다.

[0390] 본원에서 제공되는 글리코실화된 항체 또는 항원-단편의 발현에 적합한 숙주 세포는 무척추 동물 세포와 같은 다세포 유기체, 예를 들어 식물 및 곤충 세포로부터 유래된다. 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda; 애벌레), 아에데스 아에집티(Aedes aegypti; 모기), 아에데스 알보픽투스(Aedes albopictus; 모기), 드로스필라 멜라노가스테르(Drosophila melanogaster; 초파리) 및 봄빅스 모리(Bombyx mori)와 같은 숙주로부터 수많은 바큘로바이러스 변종 및 변이체 및 해당 허용 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주가 공개적으로 이용 가능하며, 예를 들면, 오토그라파 칼리포르니카(Autographa californica) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리(Bombyx mori) NPV의 Bm-5 균주가 있으며, 이러한 바이러스는 본 발명에 따라서 본원에서 바이러스로서, 특히 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) 세포의 형질감염을 위해 사용될 수 있다. 목화, 옥수수, 감자, 대두, 피튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양물도 숙주로 활용할 수 있다.

[0391] 그러나, 척추동물 세포에 대한 관심이 가장 컸고, 배양(조직 배양)에서 척추동물 세포의 번식이 일상적인 절차가 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주(COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 계열(293 또는 현탁 배양에서 성장을 위해 서브클로닝된 293 세포, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); 새끼 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 중국 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); 마우스 세르톨리 세포(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개의 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 베팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양(MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포(Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 세포주(Hep G2)가 있다. 일부 바람직한 실시양태에서, 숙주 세포는 CHO, BHK, NS0, 293 및 이들의 유도체와 같은 포유동물 배양 세포주이다.

[0392] 숙주 세포는 항-hGREM1 항체 생산을 위해 상기 기술된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되고, 프로모터 유도, 형질전환체 선택, 또는 원하는 서열을 코딩하는 유전자 증폭에 적합하도록 변형된 통상의 영양 배지에서 배양된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항체는 관련 기술분야에 공지된 상동적 재조합에 의해 생산될 수 있다.

[0393] 본원에서 제공되는 항체 또는 항원 결합 단편을 생산하는 데 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 숙주세포 배양에는 상업적으로 입수가 가능한 배지, 예컨대 Ham's F10(Sigma), 최소 필수 배지(MEM),(Sigma), RPMI-1640(Sigma), 돌베코 개질된 이글 배지(DMEM, Sigma)가 적합하다. 또한, 문헌: Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), 미국 특허 제4,767,704호; 제4,657,866호; 제4,927,762호; 제4,560,655호; 또는 제5,122,469호; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 등록 제30,985호에 기재된 임의의 배지가 숙주 세포용 배양 배지로 사용될 수 있다. 임의의 이러한 배지는 필요에 따라 호르몬 및/또는 기타 성장 인자(예컨대 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염(예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 완충제(예컨대 HEPES), 뉴클레오티드(예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제

(예컨대 GENTAMYCIN<sup>TM</sup> 약물), 미량 원소(일반적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로 정의됨), 및 포도당 또는 동등한 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충물이 또한 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 알려져 있는 적절한 농도로 포함될 수 있다. 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것이며, 통상의 기술자에게 자명할 것이다.

[0394] 재조합 기술을 사용하는 경우, 항체는 주변세포질 공간에서 세포내로 생산되거나 배지로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생산되는 경우, 첫 번째 단계로, 숙주 세포 또는 용해된 단편인 미립자 부스러기가 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거된다. 문헌: Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)에는 대장균의 주변 세포질 공간으로 분비되는 항체를 분리하는 과정이 기술되어 있다. 간략하게, 세포 페이스트는 아세트산나트륨(pH 3.5), EDTA 및 페닐메틸술폰플루오라이드(PMSF)의 존재 하에서 약 30분에 걸쳐 해동된다. 세포 부스러기는 원심분리로 제거할 수 있다. 항체가 배지로 분비되는 경우, 그러한 발현 시스템으로부터의 상청액은 일반적으로 상업적으로 입수가 가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 사용하여 먼저 농축된다. PMSF와 같은 프로테아제 억제제는 단백질 분해를 억제하기 위해 상기 단계 중 임의의 단계에 포함될 수 있고 항생제는 우발적 오염물의 성장을 방지하기 위해 포함될 수 있다.

[0395] 세포로부터 제조된 항-hGREM1 항체 및 이의 항원 결합 단편은 예를 들어 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, DEAE-셀룰로오스 이온 교환 크로마토그래피, 황산암모늄 침전, 염석 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제될 수 있고, 친화성 크로마토그래피가 선호되는 정제 기술이다.

[0396] 특정 실시양태에서, 고체상에 고정된 단백질 A는 항체 및 이의 항원 결합 단편의 면역친화성 정제에 사용된다. 친화성 리간드로서 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 동종형에 따른다. 단백질 A는 인간 감마1, 감마2, 또는 감마4 중쇄에 기반한 항체를 정제하는 데 사용될 수 있다(참조: Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). 단백질 G는 모든 마우스 동종형 및 인간 감마3에 권장된다(참조: Guss et al., EMBO J. 5:1567 1575 (1986)). 친화성 리간드가 부착된 매트릭스는 대부분 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 사용할 수 있다. 제어진 공극 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠과 같은 기계적으로 안정적인 매트릭스는 아가로스로 달성할 수 있는 것보다 더 빠른 유속과 더 짧은 처리 시간을 허용한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, Bakerbond ABX.TM. 수지(J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.)가 정제에 유용하다. 이온 교환 컬럼에서의 분별, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 크로마토그래피, 헤파린 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지(예컨대 폴리아스파르트산 컬럼)에서의 SEPHAROSE<sup>TM</sup> 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전과 같은 단백질 정제를 위한 기타 기술도 회수하고자 하는 항체에 따라 이용가능하다.

[0397] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물은 약 2.5 내지 4.5 사이의 낮은 pH에서, 바람직하게는 낮은 염 농도(예를 들어, 약 0 내지 0.25M 염)에서 수행되는, 용출 완충액을 사용하는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용될 수 있다.

[0398] **사용 방법**

[0399] 하나의 양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제공되는 항체의 치료적 용도를 제공한다.

[0400] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 이를 필요로 하는 대상체에서 GREM1 관련 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하는 방법으로서, 치료 유효량의 본원에서 제공되는 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편 및/또는 본원에서 제공되는 약학 조성물을 투여하여, 이로써 GREM1-관련 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

[0401] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 치료 유효량의 항-인간 GREM1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 GREM1 관련 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며. 여기서 상기 항체 또는 이의 단편은:

[0402] a) 잔기 번호가 서열번호 69를 따르는 것인 잔기 Gln27 및/또는 잔기 Asn33을 포함하는 에피토프에서 hGREM1에 결합할 수 있고/있거나;

[0403] b) 잔기 Gln27 및/또는 잔기 Asn33을 포함하는 hGREM1 단편에 결합할 수 있고, 임의로 hGREM1 단편은 적어도 3 개(예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개) 아미노산 잔기의 길이를 가지고/가지거나;

- [0404] c) 비-암 세포에 비해 암 세포에서 선택적으로 BMP 신호전달에 대한 hGREM1-매개 억제를 감소시킬 수 있고/있거나;
- [0405] d) 비-암 세포에서 BMP 신호전달에 대한 hGREM1-매개 억제의 50% 이하의 감소를 나타내고/내거나;
- [0406] e) 서열번호 68의 아미노산 서열을 포함하는 키메라 hGREM1에 결합할 수 있고/있거나;
- [0407] g) Fortebio에 의해 측정될 때 1 nM 이하의  $K_D$ 에서 hGREM1에 결합할 수 있고/있거나;
- [0408] h) ELISA에 의해 측정될 때 50% 초과와 최대 차단 백분율로 hGREM1과 BMP7의 결합을 차단할 수 있고/있거나;
- [0409] i) GREM1(예를 들어, hGREM1 또는 mGREM1)과 FGFR(예를 들어, FGFR1, 바람직하게는 인간 FGFR1(hFGFR1) 또는 마우스 FGFR1(mFGFR1))의 상호작용을 차단할 수 있다.
- [0410] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 대상체에게 치료 유효량의 항-인간 GREM1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 FGFR1 활성화를 억제하는 방법, 또는 GREM1에 의해 매개 되는 FGFR1 활성화와 관련된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 항-인간 GREM1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:
- [0411] a) 서열번호 1의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 2의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 3의 서열을 포함하는 HCDR3; 서열번호 4의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 5의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 6의 서열을 포함하는 LCDR3;
- [0412] b) 서열번호 11의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 12의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 13의 서열을 포함하는 HCDR3; 서열번호 14의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 15의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 16의 서열을 포함하는 LCDR3;
- [0413] c) 서열번호 21의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 22의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 23의 서열을 포함하는 HCDR3; 서열번호 24의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 25의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 26의 서열을 포함하는 LCDR3;
- [0414] d) 서열번호 31의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 32의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 33의 서열을 포함하는 HCDR3; 서열번호 34의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 36의 서열을 포함하는 LCDR3;
- [0415] e) 서열번호 114의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 116의 서열을 포함하는 HCDR3; 서열번호 117의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3;
- [0416] f) 서열번호 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 120의 서열을 포함하는 HCDR3; 서열번호 121의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0417] g) 서열번호 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 120의 서열을 포함하는 HCDR3; 서열번호 122의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0418] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 대상체에게 치료 유효량의 항-인간 GREM1 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 FGFR1 활성화를 억제하는 방법, 또는 GREM1에 의해 매개 되는 FGFR1 활성화와 관련된 질환 또는 병태를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 상기 항-인간 GREM1 항체 또는 이의 항원 결합 단편은:
- [0419] a) 서열번호 123의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열번호 124의 서열을 포함하는 HCDR3; 서열번호 125의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3,
- [0420] b) 서열번호 114의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열번호 116의 서열을 포함하는 HCDR3; 서열번호 117의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3;

- [0421] c) 서열번호 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열번호 120의 서열을 포함하는 HCDR3; 서열번호 121의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3; 또는
- [0422] d) 서열번호 119의 서열을 포함하는 HCDR1, 서열번호 115의 서열을 포함하는 HCDR2, 서열번호 120의 서열을 포함하는 HCDR3; 서열번호 122의 서열을 포함하는 LCDR1, 서열번호 35의 서열을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 118의 서열을 포함하는 LCDR3을 포함한다.
- [0423] GREM1 관련 질환 또는 병태는 GREM1 활성의 조절(예를 들어, GREM1 활성의 감소)로부터 이익을 얻을 수 있는 질환 또는 병태일 수 있다. 일부 실시양태에서, GREM1 관련 질환 또는 병태는 GREM1 발현 또는 과발현을 특징으로 한다.
- [0424] 본원에서 사용되는 GREM1에 대한 용어 "과발현"은 기준 수준에 비해 증가된 발현 수준을 언급한다. 기준 수준은 동일한 조직 유형의 정상 세포에서 발견되는 GREM1 발현 수준일 수 있으며, 선택적으로 다른 유전자(예컨대 세포 유지유전자(house keeping gene))의 발현 수준으로 정규화된다. 대안적으로, 참고 수준은 건강한 대상체에서 발견되는 GREM1 발현 수준일 수 있다. 일부 실시양태에서, GREM1-발현 암은 GREM1 발현 수준이 참고 수준보다 적어도 10% (예를 들어, 적어도 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, 50%, 또는 1배, 2배, 3배 또는 훨씬 더) 높다.
- [0425] GREM1의 발현은 핵산 수준 또는 단백질 수준을 기반으로 결정될 수 있다. GREM1의 발현 수준은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 제한 없이, 증폭 분석(예컨대 폴리머라제 연쇄 반응, 정량적 실시간 PCR, 롤링 서클 복제, 등은 증폭 등), 혼성화 분석(예컨대 노던 블로팅, 마이크로어레이, 형광 제자리(in situ) 하이브리드화(FISH) 등), 또는 서열화 분석(예컨대 RNA 서열분석)에 의해 핵산 수준에서 측정될 수 있다. 대안적으로, GREM1의 발현 수준은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 제한 없이, 면역분석법(예컨대 웨스턴 블롯팅, 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA), 효소 면역분석법(EIA), 방사성 면역분석법(RIA), 샌드위치 분석, 경쟁적 분석, 면역형광 염색 및 영상화, 면역조직화학(IHC) 및 형광 활성화 세포 분류(FACS)에 의해 측정할 수 있다.
- [0426] 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 임의로 대상체로부터 얻은 생물학적 샘플에서 GREM1-발현 또는 과발현을 갖는 것으로 확인된다.
- [0427] 일부 실시양태에서, GREM1 관련 질환 또는 병태는 암, 섬유성 질환, 혈관신생, 녹내장 또는 망막 질환, 신장 질환, 폐동맥 고혈압, 및 골관절염(OA)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. GREM1의 증가된 수준은 경피증, 당뇨병성 신증, 신경아교종, 두경부암, 전립선암 및 결장직장암과 같은 많은 질환 및 병태와 관련이 있다.
- [0428] **i) 암 치료**
- [0429] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제공되는 항체를 사용하여 암을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0430] 일부 실시양태에서, 암은 GREM1-발현 암이다. 본원에서 사용되는 "GREM1-발현 암"이라는 어구는 GREM1-발현 암 세포 및/또는 암 미세환경에서 GREM1 발현을 갖는 것을 특징으로 하는 암을 언급한다. 일부 실시양태에서, 상기 GREM1-발현 암은 암 세포 및/또는 암 미세환경에서 GREM1 과발현을 갖는다.
- [0431] GREM1은 GREM1을 발현하는 종양 세포의 성장을 촉진하기 위해 자가분비 방식을 통해 작용할 수 있다. GREM1은 또한 암세포 자체가 반드시 GREM1을 발현하지 않더라도, 암세포의 성장 또는 생존에 적합한 틈새를 만들기 위해 암 미세 환경 내부 또는 주변에 있는 비암 세포에 의해 분비될 수 있다.
- [0432] 본원에서 사용되는 암 미세환경은 암 세포를 둘러싸는 조직, 세포 및 환경을 의미한다. 암 미세환경은 섬유모세포, 혈관주위세포, 내피 세포, 지방 세포, 및 골수 중간엽 간질 세포(MSC)와 같은 간질 세포를 포함할 수 있다. 암 미세환경은 또한 암 세포와 회합되거나 암 세포를 둘러싸는 간질 세포와 회합된 세포의 매트릭스를 포함할 수 있다. 세포외 매트릭스는 주로 프로테오글리칸 응집체로 만들어진 다공성의 수화된 겔인 바닥 물질과 결합 조직 섬유로 주로 구성된다. 암 미세환경에서 GREM1의 발현은 예를 들어 기질 세포 또는 세포외 기질에서 관찰될 수 있다. 특정 실시양태에서, GREM1-발현 암은 기질(예를 들어, 결합조직형성 기질) 또는 기질 세포에서 GREM1 발현 또는 과발현을 갖는다.
- [0433] 특정 실시양태에서, 대상체는 GREM1-발현 암 세포를 갖거나, 암 미세환경에서 GREM1 발현을 갖는 것으로 확인된다. 암 세포 또는 암 미세환경에서 GREM1의 존재 및/또는 발현 수준은 대상체로부터 얻은 생물학적 샘플을 사용하여 관련 기술분야에 공지되거나 본원에서 제공되는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다. 암 세포를 함유하게

나 또는 암 미세환경으로부터 함유하는 것으로 의심되는 생물학적 샘플, 예를 들면 포르말린 고정 파라핀 내장 (FFPE) 조직, 새로운 생검, 혈액(순환 종양 세포를 함유하는 것으로 의심됨), 또는 기타 체액은 대상체로부터 얻거나 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 암 세포, 간질 세포 및/또는 세포의 매트릭스는 생물학적 샘플로부터 분리될 수 있다. 특정 실시양태에서, 생물학적 샘플은 예를 들어, 핵산 또는 단백질과 같은 분석물을 분리하기 위해 추가로 처리될 수 있다.

- [0434] GREM1-발현 암은 임의 유형의 암일 수 있다. 특정 실시양태에서, 암은 고형 종양 또는 혈액학적 종양으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 고형 종양은 부신피질 암종, 향문암, 성상세포종, 소아 소뇌 또는 대뇌, 기저 세포 암종, 담관암, 방광암, 골종양, 뇌암, 소뇌 성상세포종, 대뇌 성상세포종/악성 신경아교종, 상의세포종, 수 모세포종, 천막상 원시 신경외배엽 종양, 시각 경로 및 시상하부 신경교종, 유방암, 버킷 림프종, 자궁경부암, 결장암, 폐기종, 자궁내막암, 식도암, 유행 육종, 망막모세포종, 위장(위)암, 신경교종, 두경부암, 심장암, 호지킨 림프종, 섬 세포 암종(내분비 췌장), 카포시 육종, 신장암(신세포암), 후두암, 간암, 폐암, 신경모세포종, 비호지킨 림프종, 난소암, 췌장암, 인두암, 전립선암, 직장암, 신세포 암종(신장암), 망막모세포종, 유잉계 종양, 피부암, 위암, 고환암, 인후암, 갑상선암, 또는 질암이다.
- [0435] 특정 실시양태에서, GREM1-발현 암은 또한 PD-L1-발현이다. 특정 실시양태에서, GREM1-발현 암은 PD-L1 발현 암이 아니다. 본원에서 사용되는 암과 관련하여 용어 "PD-L1 발현"은 관련 기술분야에 공지된 임의의 검출 방법, 예를 들어 면역조직화학(IHC), 유세포 분석법(예를 들어 FACS) 등을 사용하여 PD-L1 발현에 대해 양성인 암을 언급한다. 예를 들어, PD-L1-발현 암은 IHC 데이터에 기반한 간단한 이진 양성/음성 특성 분석 접근법을 사용하여 PD-L1 발현에 대해 양성인 암을 언급할 수 있으며, 양성 결과는 PD-L1의 세포 표면 막 염색을 나타낸 종양 조직 절편에서 암세포의 백분율이 전체 암세포의 적어도 1%, 2%, 3%, 4% 또는 5% 이상일 경우 정의된다. 자세한 설명은 다음 문헌에서 알 수 있다: Thompson, R.H. 등, PNAS 101(49): 17174-17179(2004); Thompson, R.H. 등, Cancer Res. 66:3381-3385 (2006); Gadiot, J. 등, Cancer 117:2192-2201 (2011); Taube, J. M. et al., Sci Transl Med 4, 127ra37 (2012); 및 Toplian, S.L. 등, New Eng. J Med. 366(26): 2443-2454(2012). PD-L1-발현 암은 또한 WO2014165422A1에 기재된 채점 과정을 사용하여 PD-L1 발현에 대해 양성인 암을 언급할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 GREM1-발현 암은 PD-1/PD-L1 축 억제제를 사용한 치료에 대해 내성이거나 불응성이다.
- [0436] 특정 실시양태에서, 혈액 종양은 백혈병(예컨대 급성 림프구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML)), 림프종(예컨대 호지킨 림프종), 또는 비호지킨 림프종(예컨대 발덴스트롬(Waldenstrom) 마크로글로불린혈증(WM)), 또는 골수종(예컨대 다발성 골수종(MM))이다.
- [0437] 특정 실시양태에서, 암은 전립선암, 위식도암, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암), 간암, 췌장암, 유방암, 기관지암, 골암, 간 및 담관 암, 난소암, 고환암, 신장암, 방광암, 두경부암, 척추암, 뇌암, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막암, 결장암, 결장직장암, 직장암, 향문암, 위장관암, 피부암, 뇌하수체암, 위암, 질암, 갑상선암, 교모세포종, 성상세포종, 흑색종, 골수이형성 증후군, 육종, 기형종, 신경아교종, 선암종, 백혈병(예컨대 급성 림프구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML)), 림프종(예컨대 호지킨 림프종 또는 비호지킨 림프종(예컨대 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(WM))), 또는 골수종(예컨대 다발성 골수종(MM))이다.
- [0438] 특정 실시양태에서, 암은 전립선암, 위-식도암, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암), 간암, 결장암, 결장직장암, 신경아교종, 췌장암, 방광암 및 유방암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 암은 삼중 음성 유방암이다. 특정 실시양태에서, 암은 다발성 골수종이다.
- [0439] 특정 실시양태에서, 암은 전이성이다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제공되는 항체를 사용하여 암 전이를 치료 또는 예방하는 방법을 추가로 제공한다. 암 전이는 암세포가 원래 부위에서 체내 다른 부위로 퍼지는 과정이다.
- [0440] 특정 실시양태에서, 암은 전립선암, 유방암 또는 간암이다.
- [0441] 특정 실시양태에서, 유방암은 삼중 음성 유방암이다. "삼중 음성 유방암" 또는 "TNBC"라는 용어는 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 및 과잉 HER2 단백질에 대해 음성으로 검사된 유방암을 언급한다. TNBC는 호르몬 요법이나 HER2를 표적으로 하는 약물에 무-반응성일 수 있다.
- [0442] 특정 실시양태에서, 암은 다발성 골수종(MM)이다. GREM1은 골수(BM) 중간엽 간질 세포의 하위집합에 의해 풍부하게 분비되는 것으로 밝혀졌으며, MM 질병 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 간주된다. 정량적 PCR에 의한 인간 및 마우스 BM 간질 샘플의 분석은 GREM1/Grem1 발현이 건강한 대조군에 비해 MM 종양 보유 코호트에서 유의

적으로 더 높다는 것을 보여주었다. 항-GREM1 항체는 마우스에서 MM 종양 부담을 감소시키는 것으로 나타났다 (문헌: K. Clark et al., *Cancers* 2020, 12, 2149 참조).

[0443] **ii. 섬유성 질환 치료**

[0444] 일부 실시양태에서, GREM1 관련 질환 또는 병태는 섬유성 질환이다. 섬유성 질환은 섬유증과 관련된 질환 또는 병태이다. 섬유증은 예를 들어 폐, 간, 신장, 피부, 심장, 소화관 또는 근육과 같은 만성 기관 손상의 일반적인 특징인 반흔 형성 과정이다. 섬유증은 형질전환 성장 인자-베타(TGF-β)의 활성 증가로 인해 세포외 매트릭스 및 기타 섬유증 관련 단백질의 침착이 증가 및 변경되는 것을 특징으로 한다. 상승된 GREM1 발현은 많은 섬유성 질환에서 발견되었으며, 이는 GREM1이 섬유증의 중요한 마커일 수 있음을 시사한다(문헌: Costello, et al., 2010, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 42: 517-523; Lappin, et al., 2002, *Nephrol.Dial.Transplant.*17:65-67; Boers et al., 2006, *J.Biol.Chem.*281:16289-16295 참조).

[0445] 섬유성 질환은 폐, 간, 신장, 눈, 피부, 심장, 소화관 또는 근육의 섬유성 질환을 포함할 수 있다. 폐의 섬유성 질환의 예로는 폐 섬유증, 낭포성 섬유증, 폐 고혈압, 진행성 거대 섬유증, 폐쇄성 세기관지염, 만성 천식과 관련된 기도 개조 또는 특발성 폐가 있다. 간의 섬유성 질환의 예로는 간경화 또는 비알코올성 지방간염이 있다. 신장의 섬유성 질환의 예는 신장 섬유증, 허혈성 신장 손상, 세뇨관간질 섬유증, 당뇨병성 신병증, 신장경화증 또는 신독성과 같은 것을 포함한다. 눈의 섬유성 질환의 예는 각막 섬유증, 망막하 섬유증과 같은 것을 포함한다. 피부의 섬유성 질환의 예는 신원성 전신 섬유증, 켈로이드 또는 경피증과 같은 것을 포함한다. 심장의 섬유성 질환의 예로는 심내막 심근 섬유증 또는 오래된 심근 경색증이 있다.

[0446] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 또한 대상체에게 치료 유효량의 본원에서 제공되는 항-그렘린 1 항체를 투여함을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 섬유성 질환(예를 들면, 신장 섬유증)에 있어서 BMP7 치료의 효과를 개선하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 대상체는 BMP7 치료를 받고 있다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 또한 BMP7 치료와 조합하여 본원에서 제공되는 항-그렘린 1 항체의 치료 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서 섬유성 질환(예를 들어, 신장 섬유증)을 치료하는 방법을 제공한다. 본원에서 사용되는 용어 "BMP7 치료"는 이를 필요로 하는 대상체에서 BMP7 수준을 증가시키는 것과 관련된 임의의 치료일 수 있다. 예를 들어, BMP7 치료는 재조합 BMP7 또는 BMP7의 펩타이드 모방체의 투여일 수 있다. BMP7 치료는 또한 예를 들어 BMP7의 길항제(예를 들어, 노긴(noggin) 또는 자궁 감각 관련 유전자-1(USAG-1))의 수준 및/또는 활성을 감소시키거나 BMP7의 작용제(예를 들어, 키엘린/코르딘-유사 단백질(KCP) 또는 BMP 수용체)의 수준 및/또는 활성을 증가시킴으로써 내인성 BMP7을 복원하는 것을 포함할 수 있다(문헌: Michael 등, *BMP7에 의한 실험적 신장섬유증의 역전은 만성 신장질환에 대한 새로운 치료 전략으로서 통찰을 제공한다, *Pediatr Nephrol.* 2008 Sep; 23(9): 1395-8* 참조). 특정 실시양태에서,

[0447] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 또한 치료 유효량의 본원에서 제공되는 항-그렘린 1 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, BMP7 활성을 증가시키거나 BMP7 활성에 대한 그렘린-매개 억제제를 감소시키는 것으로부터 이익을 얻을 수 있는 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 상기 질환은 섬유성 질환 및/또는 신장 질환이다. 특정 실시양태에서, 상기 질환은 허혈-재관류 손상, 허혈성 급성 신부전, 당뇨병성 신병증 및 고혈압성 신경화증, 신장 섬유증, 만성 신장 질환, 급성 신장 질환, 고혈압성 신경화증, 면역글로불린 A 신병증(IgAN) 및 루푸스 신염 또는 전신성 홍반성 루푸스(SLE)와 같은 다른 자가면역 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0448] **iii. 다른 질환의 치료**

[0449] 일부 실시양태에서, GREM1 관련 질환 또는 병태는 폐동맥 고혈압(PAH)이다. 용어 "폐동맥 고혈압"("PAH")은 폐동맥압의 지속적인 상승을 특징으로 하는 진행성 폐 장애를 언급한다. GREM1은 저산소증 동안 마우스의 작은 폐내 혈관 벽에서 상승하는 것으로 밝혀졌다. 항-GREM1 항체는 PAH와 관련된 하나 이상의 증상을 완화 또는 개선하는 것으로 밝혀졌으며, 예를 들어, 폐동맥의 비대증을 억제하고, 박출량 및/또는 박출량 대 수축기말용적 비율("SV/ESV")을 증가시키며, 우심실 심박출량 및/또는 심박수(CI)를 증가시키고, PAH를 갖는 대상체에서 다른 혈류역학적 측정, 예를 들어 우심방 압력, 폐동맥 압력, 호기말 압력의 존재 하에 폐 모세관 췌기 압력, 전신 동맥압, 심장 박동, 폐 혈관 저항 및/또는 전신 혈관 저항을 개선한다(자세한 내용은 미국 특허 출원 제 20180057580A1호를 참조한다).

[0450] 일부 실시양태에서, GREM1 관련 질환 또는 병태는 골관절염(OA)이다. GREM1은 연골 세포에서 기계적 부하 유도 인자로 보고되고 있으며, 주기적 변형 또는 정수압 부하 후 연골의 중간 및 깊은 층에서 높은 수준으로 검출된

다. GREM1은 골관절염에서 상향조절되는 것으로 보고되고, 혈청 및 운할액 내 GREM1 농도는 무릎 OA의 발병 및 중증도와 상관관계가 있다(문헌: J. Yi, et al., Med Sci Monit, 2016; 22: 4062-4065 참조). GREM1은 핵 인자- $\kappa$ B 신호전달을 활성화하여, 이화 효소의 후속 유발을 유도한다. 마우스에서 GREM1 항체의 관절내 투여 또는 GREM1의 연골세포 특이적 결실은 골관절염 발생을 감소시키는 것으로 보고되었다(문헌: S.H. Chang et al., Nature Communications, (2019) 10: 1442 참조).

[0451] 일부 실시양태에서, GREM1 관련 질환 또는 병태는 혈관신생이다. GREM1은 주요 혈관신생 수용체 혈관 내피 성장 인자 수용체-2(VEGFR-2)의 작용제이다. 항응고 효과로 알려진 헤파린 술페이트(HS)와 헤파린, 글리코사미노글리칸(GAG)은 GREM1에 결합하는 것으로 나타났다. GREM1은 헤파린에 결합하고 BMP 독립적인 방식으로 VEGFR-2를 활성화한다(문헌: Chiodelli et al 2011; Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 31: e116-e127 참조). 항-GREM1 항체는 혈관신생 또는 헤파린 매개 혈관신생과 관련된 하나 이상의 증상을 완화 또는 개선하는 것으로 밝혀졌다(자세한 내용은 미국 특허 출원 제20200157194호 참조).

[0452] 일부 실시양태에서, GREM1 관련 질환 또는 병태는 녹내장이다. 녹내장은 눈에서 하나 이상의 BMP 계열 유전자의 변형된 발현으로 인해 발생할 수 있으며, 이는 안압 상승 및/또는 녹내장성 시신경병증을 유발한다. GREM1은 녹내장 섬유주대 세포에서 발현이 증가하는 것으로 밝혀졌다. GREM1 길항제는 혈관신생 또는 녹내장과 관련된 하나 이상의 증상을 완화 또는 개선하는 것으로 밝혀졌다(자세한 내용은 미국 특허 제7744873호 참조).

[0453] 일부 실시양태에서, GREM1 관련 질환 또는 병태는 망막 질환이다. 일부 실시양태에서, GREM1 관련 질환 또는 병태는 신장 질환이다.

[0454] **투여 경로 및 투약 요법**

[0455] 본원에서 제공되는 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편은 치료 유효 투여량으로 투여될 수 있다. 본원에서 제공되는 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편의 치료 유효량은 예를 들어 체중, 연령, 과거 병력, 현재 약물, 대상체의 건강 상태 및 교차 반응에 대한 잠재성, 알레르기, 민감성 및 부작용, 뿐만 아니라 투여 경로 및 질병 발달 정도와 같은 관련 기술분야에 공지된 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 투여량은 이들 및 기타 상황 또는 요건에 의해 지시되는 바와 같이 통상의 기술자(예를 들어, 의사 또는 수의사)에 의해 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다.

[0456] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편은 약 0.01mg/kg 내지 약 100mg/kg의 치료 유효 투여량으로 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 투여 용량은 치료 과정에 걸쳐 변할 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 투여 용량은 대상체의 반응에 따라 치료 과정에 걸쳐 변할 수 있다.

[0457] 최적의 원하는 반응(예를 들어, 치료 반응)을 제공하기 위해 투약 요법을 조정할 수 있다. 예를 들어, 단일 용량이 투여될 수 있거나 시간에 따라 여러 분할 용량이 투여될 수 있다.

[0458] 본원에 개시된 항체 및 항원 결합 단편은 관련 기술분야에 공지된 임의의 경로, 예를 들어 비경구(예컨대 피하, 복강내, 정맥내 주사를 포함하는 정맥내, 근육내 또는 피내 주사) 또는 비경구(예컨대 경구, 비강내, 안구내, 설하, 직장 또는 국소) 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0459] **병용 요법**

[0460] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편은 단독으로 또는 치료할 질환 또는 병태에 기반하여 선택될 수 있는 하나 이상의 추가 치료 수단 또는 작용제와 함께 투여될 수 있다.

[0461] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편은 제2 항암 약물, 예를 들어 화학요법제, 항암 약물, 방사선 요법, 면역요법, 항혈관신생제, 표적 치료제, 세포 치료제, 유전자 치료제, 호르몬 치료제, 사이토 킨, 완화 치료, 암 치료를 위한 수술(예컨대 종양 절제술), 하나 이상의 항구토제, 화학 요법으로 인해 발생하는 합병증에 대한 치료제, 암 환자를 위한 식이 보충제 또는 종양 미세 환경을 조절하는 제제와 조합하여 암을 치료하기 위해 투여될 수 있다.

[0462] 용어 "화학요법 약물"은 암을 치료하는데 사용될 수 있는 생물학적(거대분자) 또는 화학적(소분자) 화합물이다. 화학요법 약물의 유형은 히스톤 데아세틸라제 억제제(HDACI), 알킬화제, 항대사제, 알칼로이드, 세포독성/항암 항생제, 토포이소머라제 억제제, 튜블린 억제제, 단백질, 항체, 키나제 억제제 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 화학요법 약물의 예에는 에플로티닙, 아파티닙, 도세탁셀, 아드리아마이신, 5-FU(5-플루오로우라실), 파노비노스타트, 쯔시타빈, 시스플라틴, 카보플라틴, 파클리탁셀, 베바시주맙, 트라스투주맙, 페르투주맙, 메트포르민, 테모졸로마이드, 타목시펜, 독소루비신, 라파마이신, 라파티닙, 하이드록시캄토테신, 트리메티닙이 포

함되나, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 상기 화학요법 약물은 시스플라틴이다.

- [0463] 본원에서 사용되는 용어 "면역요법"은 암과 같은 질병에 맞서 싸우기 위해 면역 체계를 자극하거나 일반적인 방식으로 면역 체계를 강화하는 유형을 언급한다. 면역요법에는 직접적 또는 간접적으로 항종양 효과를 매개할 수 있고 무손상 숙주 면역 체계에 반드시 따르는 것은 아닌 확립된 종양-면역 반응성을 갖는 약제(예컨대 이펙터 세포)를 전달하는 것에 의한 수동적 면역요법(예컨대 항체 요법 또는 CAR-T 세포치료)을 포함한다. 면역요법은 능동적 면역요법을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 치료는 면역 반응-조절제의 투여로 병에 걸린 세포에 대해 반응하는 내인성 숙주 면역 체계의 생체내 자극에 의존한다.
- [0464] 면역요법의 예는 체크포인트 조절제, 입양 세포 전달, 사이토킨, 종양용해성 바이러스 및 치료 백신을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0465] 체크포인트 조절제는 면역 체계 공격을 피하는 암 세포의 능력을 방해할 수 있고, 면역 체계가 종양에 더 강력하게 반응하도록 도울 수 있다. 면역 체크포인트 분자는 공동 자극 신호를 매개하여 면역 반응을 증가시키거나, 공동 억제 신호를 매개하여 면역 반응을 억제할 수 있다. 체크포인트 조절제의 예는 PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, TIM-3, LAG3, A2AR, CD160, 2B4, TGFβ, VISTA, BTLA, TIGIT, LAIR1, OX40, CD2, CD27, CD28, CD30, CD40, CD47, CD122, ICAM-1, IDO, NKG2C, SLAMF7, SIGLEC7, NKp80, CD160, B7-H3, LFA-1, 1COS, 4-1BB, GITR, BAFRR, HVEM, CD7, LIGHT, IL-2, IL-7, IL-15, IL-21, CD3, CD16 및 CD83을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 면역 체크포인트 조절제는 PD-1/PD-L1 축 억제제를 포함한다.
- [0466] 암과 싸우는 T 세포의 자연적 능력을 증진시키려는 치료법인 입양 세포 전달. 이 치료에서는 환자에게서 T 세포를 채취하여 시험관 내에서 확장 및 활성화한다. 특정 실시양태에서, T 세포는 시험관내에서 CAR-T 세포로 변형된다. 암에 대해 가장 활동적인 T 세포 또는 CAR-T 세포는 2 내지 8주 동안 시험관 내에서 대규모 배지로 배양된다. 이 기간 동안 환자들은 신체의 면역력을 감소시키기 위해 화학 요법 및 방사선 요법과 같은 치료를 받게 된다. 이러한 치료 후 시험관내 배양된 T 세포 또는 CAR-T 세포는 환자에게 다시 제공된다. 특정 실시양태에서, 면역요법은 CAR-T 요법이다.
- [0467] 사이토킨 요법은 또한 면역 체계에 대한 종양 항원 제시를 향상시키기 위해 사용될 수 있다. 암 치료에 사용되는 두 가지 주요 유형의 사이토킨은 인터페론과 인터류킨이다. 사이토킨 요법의 예에는 인터페론-α, -β 및 -γ와 같은 인터페론, 대식세포-CSF, 과립구 대식세포 CSF 및 과립구-CSF와 같은 집락 자극 인자, 인슐린 성장 인자(IGF-1), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 형질전환 성장 인자(TGF), 섬유아세포 성장 인자(FGF), IL-1, IL-1α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 및 IL-12와 같은 인터류킨, TNF-α 및 TNF-β와 같은 종양 괴사 인자 또는 이들의 조합을 포함하나 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0468] 종양 용해 바이러스는 암 세포를 죽일 수 있는 유전적으로 변형된 바이러스이다. 종양 용해 바이러스는 종양 세포를 특이적으로 감염시킬 수 있어, 종양 세포 용해를 유도한 다음 면역 체계를 유발하여 그러한 종양 항원을 가진 암세포를 표적으로 하고 제거하는 종양 항원을 대량으로 방출하도록 할 수 있다. 종양 용해 바이러스의 예는 탈리모겐 라헤르파렙백을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0469] 치료 백신은 암 세포에 대한 면역 체계의 반응을 부스팅함으로써 암에 작용한다. 치료용 백신은 비병원성 미생물(예컨대 *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin, BCG), 종양 세포를 표적으로 하는 유전적으로 변형된 바이러스, 또는 하나 이상의 면역원성 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, BCG는 카테터로 방광에 직접 삽입할 수 있으며 방광암 세포에 대한 면역 반응을 일으킬 수 있다.
- [0470] 항혈관신생제는 종양 성장을 지원하는 혈관의 성장을 차단할 수 있다. 항혈관신생제의 일부는 VEGF 또는 이의 수용체 VEGFR을 표적으로 한다. 항혈관신생제의 예는 악시티닙, 베바시주맙, 카보잔티닙, 에베로리무스, 레날리도마이드, 렌바티닙 메실레이트, 파조파닙, 라무시루맙, 레고라페닙, 소라페닙, 수니티닙, 탈리도마이드, 반데타닙, 및 지브-아플리버셉트를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0471] "표적 요법"은 암 세포에 존재하지만 정상 세포에는 존재하지 않거나 암 세포에 더 풍부한 특정 단백질과 같은 암과 관련된 특이적 분자, 또는 암의 성장과 생존에 기여하는 암 미세 환경의 표적 분자에 작용하는 요법 유형이다. 표적 요법은 치료제를 종양에 표적으로 하여, 치료제의 영향으로부터 정상 조직을 보호한다.
- [0472] 표적 요법은 예를 들어 티로신 키나아제 수용체 및 핵 수용체를 표적으로 할 수 있다. 그러한 수용체의 예로는 erbB1(EGFR 또는 HER1), erbB2(HER2), erbB3, erbB4, FGFR, 혈소관 유래 성장 인자 수용체(PDGRF), 및 인슐린 유사 성장 인자-1 수용체(IGF-1R), 에스트로겐 수용체(ER), 핵 수용체(NR) 및 PR을 포함한다.

- [0473] 표적 요법은 Erk 및 PI3K/Akt, AP-2 $\alpha$ , AP-2 $\beta$ , AP-2 $\gamma$ , 미토겐-활성화 단백질 키나제(MAPK), PTEN, p53, p19ARF, Rb, Apaf-1, CD-95/Fas, TRAIL-R1/R2, 카스파제-8, 포크헤드(Forkhead), Box 03A, MDM2, IAPs, NF-kB, Myc, P13K, Ras, FLIP, 헤레굴린(HRG) (gp30이라고도 함), Bcl-2, Bcl-xL, Bax, Bak, Bad, Bok, Bik, Blk, Hrk, BNIP3, BimL, Bid, 및 EGL-1과 같은 티로신 키나아제 또는 핵 수용체 신호전달 캐스캐이드의 분자를 표적으로 할 수 있다.
- [0474] 표적 요법은 또한 에스트로겐, 에스트라디올(E2), 프로게스테론, 에스트로겐, 안드로겐, 글루코코르티코이드, 프로락틴, 갑상선 호르몬, 인슐린, P70 S6 키나제 단백질(PS6), 서마이빈, 섬유모세포 성장 인자(FGF), EGF, Neu 분화 인자(NDF), 형질전환 성장 인자 알파(TGF- $\alpha$ ), IL-1A, TGF-베타, IGF-1, IGF-II, IGFbps, IGFBP 프로테아제, 및 IL-10과 같은 종양 관련 리간드를 표적으로 할 수 있다.
- [0475] 특정 실시양태에서, 제2 치료제는 종양 미세환경을 조절한다. 특정 실시양태에서, 제2 치료제는 PD-L1 결합 부분 및 TGF-베타 수용체의 세포외 도메인을 포함하는 이중기능성 분자이다.
- [0476] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편은 제2 항암 약물과 조합하여 전립선암을 치료하기 위해 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 항암 약물은 항-전립선암 약물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-전립선암 약물은 안드로겐 축 억제제; 안드로겐 합성 억제제; ADP-리보스 중합효소(PARP) 억제제; 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0477] 특정 실시양태에서, 상기 안드로겐 축 억제제는 황체형성 호르몬 방출 호르몬(LHRH) 작용제, LHRH 길항제 및 안드로겐 수용체 길항제로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0478] 특정 실시양태에서, 안드로겐 축 억제제는 데가렐릭스, 바이칼루타미드, 플루타미드, 닐루타미드, 아팔루타미드, 다롤루타미드, 엔잘루타미드, 또는 아비라테론이다.
- [0479] 특정 실시양태에서, 상기 안드로겐 합성 억제제는 아비라테론 아세테이트 또는 케토코나졸이다.
- [0480] 특정 실시양태에서, 상기 PARP 억제제는 올라파립 또는 루카파립이다.
- [0481] 특정 실시양태에서, 항-전립선암 약물은 아비라테론 아세테이트, 아팔루타미드, 바이칼루타미드, 카바지탁셀, 카소텍스(바이칼루타미드), 다롤루타미드, 데가렐릭스, 도세탁셀, 엘리가르드(류프롤라이드 아세테이트), 엔잘루타미드, 에를리다(아팔루타미드), 피르마곤(데가렐릭스), 플루타미드, 고세렐린 아세테이트, 제브타나(카바지탁셀), 류프롤라이드 아세테이트, 루프론(류프롤라이드 아세테이트), 루프론 데포트(류프롤라이드 아세테이트), 린파르자(올라파립), 미톡산트론 하이드로클로라이드, 닐란드론(닐루타미드), 닐루타미드, 누베카(다롤루타미드), 올라파립, 프로벤지(시플레우셀-T), 라뎀 223 디클로라이드, 루브라카(루카파립 캄실레이트), 루카파립 캄실레이트, 시플레우셀-T, 탁소테레(도세탁셀), 엑소피고(라뎀 223디클로라이드), 크탄디(엔잘루타미드), 줄라텍스(고세렐린 아세테이트) 및 자이티가(아비라테론 아세테이트)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0482] 특정 실시양태에서, 암 환자를 위한 식이 보충제는 암에 대해 보호 효과를 갖는 적합한 보충제일 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 식이 보충제는 인돌-3-카르비놀을 포함하거나 섭취 후 인돌-3-카르비놀을 발생시키는 이의 유도체를 포함한다. 인돌-3-카르비놀은 암에 대한 보호 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 또한 전암 상태를 예방할 수 있다.
- [0483] 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편은 섭취 후 인돌-3-카르비놀 또는 인돌-3-카르비놀을 발생시키는 이의 유도체와 함께 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 조합은 그랜린 관련 질환을 치료하는 데 유용하다. 특정 실시양태에서, 이러한 조합은 암, 예를 들어 유방암, 간세포 암종, 및 결장직장암을 치료하는데 유용하다. 특정 실시양태에서, 이러한 조합은 유방암, 예를 들어 삼중 음성 유방암을 치료하는데 유용하다.
- [0484] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편은 제2 치료제, 예를 들어, 제2 항섬유화제(예를 들어, 재조합 BMP7 또는 BMP7의 펩타이드 모방체)와 조합으로 섬유성 질환을 치료하기 위하여 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 제2 항섬유화제는 ACE 억제제(또는 ARB), 항-MASP2 항체, 엔도텔린 수용체 길항제, NRF2 억제제 스테로이드, CTLA4-IgG 또는 TNF 억제제이다.
- [0485] 다른 실시양태에서, 상기 제2 치료제는 피르페니돈과 같은 항섬유화제, 항염증 약물, NSAID, 프레드니손과 같은 코르티코스테로이드, 영양 보충제, 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 길항제[예를 들어, 애플리베르셉트와 같은 "VEGF-트랩(VEGF-Trap)" 또는 미국 특허 제7,087,411호에 기재된 바와 같은 다른 VEGF-억제 융합 단백질, 또는

항-VEGF 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 베바시주맙 또는 라니비주맙)], IL-1, IL-6, IL-13, IL-4, IL-13, IL-25, IL-33 또는 TGF-β와 같은 사이토킨에 대한 항체, TGF-β/Smad 신호전달 경로의 음성 조절제(제조합 BMP7 또는 BMP7의 펩타이드 모방체), 및 섬유증 관련 병태 또는 암과 관련된 증상 중 적어도 하나를 완화 시키는데 유용한 임의의 기타 완화 요법으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 제2 치료제는 항-인테그린 억제제이다.

[0486] 일부 실시양태에서, 상기 제2 치료제는 섬유증 또는 암과 관련된 적어도 하나의 합병증을 관리하거나 치료하기 위해 투여될 수 있다.

[0487] 이들 중 특정 실시양태에서, 하나 이상의 추가 치료제와 함께 투여되는 본원에 개시된 바와 같은 항체 또는 항원 결합 단편은 하나 이상의 추가 치료제와 동시에 투여될 수 있고, 이들 중 특정 실시양태에서 항체 또는 항원 결합 단편과 상기 추가 치료제(들)는 동일한 약학 조성물의 일부로 투여될 수 있다. 그러나, 또 다른 치료제와 "조합으로" 투여되는 항체 또는 항원 결합 단편은 치료제와 동시에 또는 동일한 조성물로 투여될 필요는 없다. 항체 또는 항원 결합 단편 및 제2 제제가 상이한 경로를 통해 투여되더라도, 다른 제제 이전 또는 이후에 투여되는 항체 또는 항원 결합 단편은 본원에서 사용되는 어구로서 해당 제제와 "조합"으로 투여되는 것으로 간주된다. 가능한 경우, 본원에 개시된 항체 또는 항원 결합 단편과 함께 투여되는 추가 치료제는 추가 치료제의 제품 정보 시트에 나열된 일정에 따라 또는 문헌: Physicians' Desk Reference 2003(Physicians' Desk Reference, 57th Ed; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57판(2002년 11월)) 또는 관련 기술분야에 잘 알려진 프로토콜에 따라 투여된다.

[0488] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 제2 치료제를 포함하는 키트 또는 약학 조성물을 제공하며, 이는 하나의 조성물 또는 상이한 조성물로 제형화될 수 있다. 병용 요법을 수행하는 방법에 대한 정보를 제공하기 위해 사용 지침 또는 적응증을 추가로 포함할 수 있다.

[0489] **검출 및/또는 진단 방법**

[0490] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 샘플을 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키고, 샘플중 GREM1의 존재 또는 양을 결정하는 것을 포함하는, 대상체로부터 유래된 샘플에서 GREM1의 존재 또는 양을 검출하는 방법을 제공한다.

[0491] 샘플에서 GREM1의 존재 또는 양은 또한, 제한 없이, RNA 서열분석(RNA-seq) 및 RNAscope(Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-seq: 전사체학을 위한 혁신적인 도구. Nature Reviews Genetics, 10(1), 57-63, Wang et al., RNAscope: 포르말린-고정된, 파라핀-내장된 조직에 대한 신규한 제자리 RNA 분석 플랫폼, J Mol Diagn. 2012 Jan;14(1): 22-9.)를 포함한 기술을 사용하여 GREM1의 mRNA 수준을 측정함으로써 검출할 수 있다. 간략하게, RNA-seq은 표적 mRNA를 cDNA로 역전사하고, cDNA를 단편화하고 서열분석하여, mRNA 정량화를 위해 서열 데이터를 분석하는 것을 포함하며; 상기 RNAscope는 표적 mRNA를 형광 프로브와 접합된 하나 이상의 올리고뉴클레오티드와 제자리 혼성화하고 형광 강도를 측정하여 mRNA의 수준을 검출하는 것을 포함한다.

[0492] 특정 실시양태에서, 상기 생물학적 샘플은 암 세포 또는 종양 미세환경(예를 들어 간질 세포 또는 간질)으로부터의 샘플을 포함한다.

[0493] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 샘플 중 GREM1의 존재 또는 양을 검출하거나, 대상체에서 GREM1 관련 질환 또는 병태를 진단하는 방법을 제공하며, 이 방법은: a) 대상체로부터 얻은 샘플을 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계; b) 샘플에서 GREM1의 존재 또는 양을 결정하는 단계; 및 임의로 c) GREM1의 존재 또는 양을 대상체에서 GREM1 관련 질병 또는 병태의 존재 또는 상태와 상관시키는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 생물학적 샘플은 암 세포, 간질 세포, 간질 또는 섬유증 세포를 포함한다.

[0494] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 임의로 검출가능한 부분과 접합된, 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 생물학적 샘플에서 GREM1의 존재 또는 양을 검출하는 데 유용할 수 있거나, 본원에서 제공되는 진단 방법에 유용할 수 있다.

[0495] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편 및 제2 치료제를 포함하는 키트를 제공한다. 키트는 GREM1 관련 질환의 치료, 예방 및/또는 개선에 유용할 수 있다.

[0496] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 또한 대상체에서 GREM1 관련 질환 또는 병태를 치료하거나 진단하기 위한 약제의 제조에서 본원에서 제공되는 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 용도를 제공한다.

- [0497] **실시예**
- [0498] 본 개시내용이 특정 실시양태(그 중 일부는 바람직한 실시양태임)를 참조하여 구체적으로 도시되고 설명되었지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 형태 및 세부사항의 다양한 변경이 본 명세서에 개시된 바와 같은 개시내용의 사상 및 범위로부터 벗어나지 않고 그 안에서 이루어질 수 있음을 이해해야 한다.
- [0499] **실시예 1: 항원의 준비**
- [0500] **HGREM1-His(R&D):** 재조합 HGREM1 단백질(수탁번호 060565)을 NS-0 세포에서 발현시켰다. 간략하면, C-말단에 10×his 태그가 있는 Lys25-Asp184로부터의 hGREM1 유전자의 코딩 영역을 형질감염에 사용했다. His-tag 친화도 컬럼을 사용하여 상청액을 정제하였다. 생성된 정제된 단백질을 SDS PAGE 겔을 사용하여 특성화하였다. 단백질은 R&D 시스템(Cat#5190-GR)에서 구입하였다.
- [0501] **마우스 그렙린-His(R&D):** 재조합 마우스 그렙린(수탁번호 070326) Lys25-Asp184는 C-말단에서 10×His 태그와 융합되었고 NS-0 세포에서 생산되었다. 형질감염 상청액을 His-태그 친화성 컬럼을 사용하여 정제하였다. 생성된 정제된 단백질을 SDS PAGE 겔을 사용하여 특성화하였다. 단백질은 R&D 시스템(Cat#956-GR)에서 구입하였다.
- [0502] **HGREM1-His(ACRO):** 재조합 hGREM1 단백질 Lys25-Asp184(수탁 번호 NP\_037504)는 C-말단에서 폴리히스티딘 태그와 융합되었고 인간 293 세포(HEK293)에서 생산되었다. HEK293 세포의 형질감염 상청액을 His-tag 친화성 컬럼을 사용하여 정제하였다. 생성된 정제된 단백질을 SDS PAGE 겔을 사용하여 특성화하였다. 이 단백질은 ACRO 바이오시스템스(Cat#GR1-H52H3)에서 구입하였다.
- [0503] **HGREM1-Fc(ACRO):** 재조합 hGREM1 단백질 Lys25-Asp184(수탁 번호 NP\_037504)는 C-말단에서 hIgG1 Fc 태그와 융합되었고 인간 293 세포(HEK293)에서 생산되었다. 생성된 정제된 단백질을 SDS PAGE 겔을 사용하여 특성화하였다. 이 단백질은 ACRO 바이오시스템스(Cat#GR1-H5254)에서 구입하였다.
- [0504] 위의 그렙린 단백질은 다음 실험에서 사용되었다.
- [0505] **실시예 2: 항체 생성**
- [0506] **1. 항원 접합 및 면역화**
- [0507] 면역화를 위해, 재조합 h그렙린-His 단백질을 다양한 MabSpace 면역 강화 펩타이드와 접합시켰다. 간략하게 2 내지 8배 몰 과량의 펩타이드를 술폰-SMCC(술폰숙신이미딜 4-[N-말레이미도메틸] 사이클로hex산-1-카르복실레이트, Pierce, Cat#22322)-활성화된 h그렙린 단백질과 혼합하고 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 반응을 중지하고 SDS-PAGE 겔을 사용하여 접합된 단백질을 분석하고 QC하였다.
- [0508] 위에서 접합된 h그렙린-His 단백질을 완전 프로인트 애주번트(Pierce, Cat#77140)를 사용하여 각각 1:1 비율로 유화한 다음, C57B/L6 마우스에 피하 및 복강 내로 면역화하였다. CpG 및 Alum을 사용하여 추가 면역화를 수행하여 단백질의 고유 형태를 보존하였다. 면역화는 적어도 2주마다 이루어졌고 ELISA 분석에 의한 항-h그렙린 역가 분석을 위해 1차 면역화 후에 마우스로부터 항혈청을 취하였다.
- [0509] 혈청 역가를 결정하기 위해, 각각의 면역화된 마우스로부터 20 $\mu$ l의 마우스 혈청을 제조하였다. 고결합 투명 폴리스티렌 96개웰 플레이트(Nunc)를 높은 pH 코팅 완충액(0.16% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.3% NaHCO<sub>3</sub>, pH9.8)에서 hGREM1-His로 구성된 1 $\mu$ g/ml 용액을 100 $\mu$ l/웰로 코팅하였다. 플레이트를 4°C에서 밤새 배양한 다음, 세척 완충액 PBS + 0.1% Tween 20(Sigma)을 사용하여 자동 플레이트 세척기에서 한 번 세척하였다. 차단 완충액(PBS + 1% BSA + 1% 염소 혈청 + 0.05% Tween 20) 200 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 그런 다음 차단 완충액을 흡인하고 희석 완충액(PBS+1% BSA+1% 염소 혈청+0.01% Tween 20)에 연속 희석된 혈청 100 $\mu$ l를 ELISA 플레이트의 각 웰로 옮기고 실온에서 60분 동안 배양하였다. 그런 다음 플레이트를 위에서 설명한 방법을 사용하여 3회 세척하였다. 그런 다음 희석 완충액에 희석된 HRP 접합된 염소 항-마우스 Fc 항체(Abcam, Cat#Ab98808) 용액 100 $\mu$ l/웰을 플레이트의 각 웰에 첨가하였다. ELISA 플레이트를 실온에서 60분 동안 배양시킨 후, 플레이트를 250 $\mu$ l/웰 세척 완충액으로 3회 세척하였다. 마지막으로, 각 웰에 TMB 100 $\mu$ l/웰을 첨가하고 0.64M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 사용하여 반응을 종결시켰다. 플레이트는 450nm에서 Thermo Multiscan FC에서 판독하였다.
- [0510] **2. 융합**
- [0511] 융합 4일 전에, 각각의 마우스는 PBS에서 접합되지 않은 h그렙린-His 단백질로 복강내로 부스팅되었다. 융합일에 비장을 무균적으로 제거하고 장기를 단일 세포 현탁액으로 처리하였다. 적혈구를 용해시키고 비장 세포를

DMEM(Gibco)으로 세척하였다. 생존 가능한 대수 성장 골수종 세포(SP2/0)를 무린 비장 세포와 1:4 비율로 혼합하였다. 이어서 세포를 PEG로 융합전에 2회 세척하였다. 융합 후 세포를 DMEM으로 세척하고 10% FBS+HFCS+OPI+1X HAT가 보충된 세포 성장 배지에 현탁시켰다. 이 세포 현탁액의 웰당 200 $\mu$ l를 96웰 세포 배양 플레이트에 플레이팅하고 37 $^{\circ}$ C 가습된 10% CO<sub>2</sub> 배양기에서 밤새 배양하였다. 배양물을 7일 동안 배양한 후 성장 배지를 웰 밖으로 흡인하고 신선한 성장 배지로 교환하였다. 하이브리도마 상청액의 선별은 배지 교체 2 내지 3 일 후에 시작되었다.

[0512] **3. ELISA 검정에 의한 항체 선별**

[0513] 상기 혈청 역가를 결정하는 동일한 프로토콜을 사용하였다. 간단히 말해서, 1 $\mu$ g/ml h그렙린-His를 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 코팅하였다. 세척 후 하이브리도마 상청액 100 $\mu$ l를 첨가하여 완전히 결합시켰다. 결합된 그렙린 항체를 검출하기 위해 HRP 접합된 염소 항-마우스 Fc 항체를 첨가하였다. 마지막으로, 플레이트는 TMB 반응 및 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 종료 후 450nm에서 Thermo Multiscan FC에서 관독하였다. ELISA 양성 하이브리도마 웰로부터의 세포는 이후 추가 특성화 연구를 위해 세포 배양에서 확장되었다.

[0514] **실시예 3: 양성 하이브리도마 클론의 서브클로닝 및 소규모 항체 생산**

[0515] **1. 양성 하이브리도마 클론의 서브클로닝**

[0516] 원하는 결합 프로파일 및 차단 활성을 갖는 ELISA 양성 하이브리도마 웰로부터의 세포를 선택하고 각각 96웰 플레이트에서 제한된 희석을 사용하여 각각 플레이팅하였다. 이들 세포를 7일 동안 성장시켰다. 적절한 세포 덩어리에 도달하면, 각 웰의 상청액을 수집하고 항원 결합 능력에 대해 다시 선별하였다(실시예 2의 선별 참조).

[0517] 각각의 96웰 플레이트로부터, 가장 높은 항원 결합 활성을 갖는 클론을 확인하고 웰당 200 $\mu$ l의 하이브리도마 성장 배지를 갖는 96웰 플레이트로 추가로 제한된 희석으로 확장시켰다. 7일 후, 96웰 플레이트로부터의 세포를 항원 결합에 대해 시험하였다. 서브클로닝은 2회 이상 수행하였다. 90개 이상의 웰이 양성 결합 신호를 나타낼 때, 항원 결합 활성이 가장 높은 2개의 클론을 확인하고 배지가 있는 24웰 플레이트로 옮기고 추가로 2 일 동안 성장시켰다. 일단 24웰 플레이트가 컨플루언트되면, 세포를 6웰 플레이트로 옮겼다. 배양 5일 후, 세포의 일부를 동결시켰다. 나머지 세포를 플라스크로 옮기고 팽창시켰다. 플라스크가 컨플루언트되면, 추가 백업을 위해 세포의 절반을 동결시켰다(클론당 3개의 바이알). 나머지 절반은 항체 생산을 위한 배지가 있는 플라스크에서 더 확장되도록 하였다. 동종형은 표준 방법론을 사용하여 결정되었다.

[0518] **2. 소규모 항체 생산**

[0519] 하이브리도마 세포를 물러 병에 접종하고 200 내지 300ml의 하이브리도마 배양 배지(Invitrogen)로 14일 동안 배양하였다. 그렙린 단클론 항체(mAbs)는 다음과 같이 하이브리도마 세포 배양물로부터 정제되었다. 모든 정제 과정은 실온에서 수행하였다. 하나의 정제 방식을 사용하여 다양한 mAb를 정제하고 친화성 크로마토그래피를 사용하였다.

[0520] 숙주 세포 배양액(CCF)을 원심분리하여 세포 부스러기를 제거하였다. CCF 상청액을 여과하고 희석한 다음 컬럼 형태의 단백질 G 크로마토그래피 매질, 단백질 G 고성능(Bio-Rad)에 부하하고 평형화하였다.

[0521] 부하 후, 통과액의 280nm에서의 흡광도가 기준선으로 돌아올 때까지 단백질 G 컬럼을 세척하였다. 그런 다음 그렙린 mAb를 글리신(pH 2.5)을 사용하여 컬럼에서 용출하고 용출 부피 ml당 1M Tris 염기 스톱 용액 50 $\mu$ l를 첨가하여 즉시 중화시켰다. 용출액의 280nm에서의 흡광도를 모니터링하고 단백질을 함유하는 분획을 수집하여 단백질 A 풀을 만들었다.

[0522] 정제 후, 그렙린 mAb는 10,000 MWCO 막(Pierce Slide-A-Lyzer 또는 투석 튜브)을 사용한 투석에 의해 PBS에서 제형화되었다. 제형화 후, 그렙린 mAbs를 여과하였다.

[0523] **실시예 4: ELISA에 의한 포획된 인간 및 마우스 그렙린에 대한 정제된 하이브리도마 항-그렙린1 항체의 결합 분석**

[0524] 투명 폴리스티렌 플레이트(BEAVER)를 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 높은 pH 코팅 완충액에서 0.5 $\mu$ g/ml hGREM1(ACRO) 및 마우스 그렙린(R&D) 100 $\mu$ l/웰로 코팅하였다. 그런 다음 플레이트를 PBS + 0.1% Tween 20(Sigma)을 사용하여 자동 플레이트 세척기에서 한 번 세척하였다. PBS + 1% BSA + 1% 정상 염소 혈청 + 0.5% Tween 20(Sigma)으로 이루어진 차단 용액 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 그런 다음 PBS + 1% BSA + 1% 정상 염소 혈청 + 0.01% Tween 20을 포함하는 항체 희석 완충액중 항체 100 $\mu$ l를 2 $\mu$ g/ml에서 시작하여 연속 희석액을 플레

이트의 각 웰에 첨가하고 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 그 후 플레이트를 200 $\mu$ l의 PBS + 0.1% Tween20으로 3회 세척한 다음 100 $\mu$ l/웰 1:10000 염소 항 마우스 IgG-HRP(abcam)를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 그런 다음 그들을 PBS + 0.1% Tween20으로 3회 세척하였다. 마지막으로, 100 $\mu$ l/웰의 TMB(Pierce)를 각 웰에 첨가하고 몇 분 후에 각 웰에 중지 용액 50 $\mu$ l를 첨가하였다. 플레이트는 450nm에서 Multiscan FC 마이크로플레이트 판독기(Thermo Scientific)에서 판독되었다. 도 1에 도시된 바와 같이, 56C11, 42B9, 36F5 및 67G11은 hGREM1 및 마우스 그렙린 모두에 대해 높은 결합 친화도를 나타냈다(56C11의 경우 각각 EC50 값이 13.42ng/ml 및 17.2ng/ml이고, 42B9의 경우 각각 EC50 값이 8.058ng/ml 및 8.512ng/ml이며, 36F5의 경우 각각 EC50 값이 5.869ng/ml 및 4.564ng/ml이고, 67G11의 경우 EC50 값이 각각 7.841ng/ml 및 7.713ng/ml임) 반면, 69H5, 22F1 및 14E3은 마우스 그렙린에 비해 hGREM1에 대해 선택적으로 결합 친화도를 나타낸다(각각 105.9ng/ml, 14.13ng/ml 및 13.6ng/ml의 EC50 값을 가짐).

[0525] 본원에서 제공되는 인간화된 항체(예를 들어, Hu14E3, Hu22F1 및 Hu56C11)는 hGREM1 및/또는 mGREM1에 대해 유사한 높은 결합 친화도를 나타냈다.

[0526] **실시예 5: ELISA에 의한 포획된 hGREM1 또는 관련 패밀리 단백질에 결합하는 하이브리도마 항체의 결합 특이성의 특성화**

[0527] 또한, 14E3 및 벤치마크 항체의 결합 특이성을 ELISA로 평가하였다. 간략하게 설명하면, 투명 폴리스티렌 플레이트(BEAVER)를 높은 pH 코팅 완충액에서 0.5 $\mu$ g/ml hGREM1(ACRO), 또는 인간 그렙린-2(R&D), 인간 COCO(R&D) 및 인간 DAN 단백질(R&D) 100 $\mu$ l/웰로 밤새 4 $^{\circ}$ C에서 코팅하였다. 그런 다음 플레이트를 PBS +0.1% Tween 20(Sigma)을 사용하여 자동 플레이트 세척기에서 한 번 세척하였다. PBS + 1% BSA + 1% 정상 염소 혈청 + 0.5% Tween 20(Sigma)으로 구성된 차단 용액 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 그런 다음 PBS + 1% BSA + 1% 정상 염소 혈청 + 0.01% Tween 20을 포함하는 항체 희석 완충액 중 항체 100 $\mu$ l를 2 $\mu$ g/ml에서 시작하여 5배 연속 희석액을 플레이트의 각 웰에 첨가하고 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 그 후 플레이트를 200 $\mu$ l의 PBS + 0.1% Tween20으로 3회 세척한 다음 100 $\mu$ l/웰 1:10000 염소 항 마우스 IgG-HRP(Abcam)를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 그런 다음 PBS + 0.1% Tween20으로 3회 세척하였다. 마지막으로, TMB(Pierce) 100 $\mu$ l/웰을 각 웰에 첨가하고 5분 후에 중지 용액 50 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트는 450nm에서 Multiscan FC 마이크로플레이트 판독기(Thermo Scientific)에서 판독되었다. 결과는 14E3가 hGREM1에 특이적으로 결합하지만 구조적으로 높은 상동성을 공유하는 인간 그렙린-2, COCO 및 DAN 단백질에는 결합하지 않음을 보여주었다(도 2).

[0528] **실시예 6: 포획된 BMP 2/4/7에 결합하는 그렙린을 차단하는데 있어 항체 활성의 특성화**

[0529] 그렙린은 BMP 단백질에 결합할 수 있는 것으로 알려져 있으며 본 개시내용에 의해 검증된다. 간략하게, 그렙린-Fc는 플레이트에 고정된 BMP 2/4/7에 대한 결합 능력에 대해 테스트되었다. 간략하게, 플레이트를 0.5 $\mu$ g/ml의 재조합 인간 BMP2, BMP4(hBMP4, Peprotech) 또는 인간 BMP7(R&D)로 밤새 코팅하고 야생형 그렙린-1을 상기 코팅된 플레이트에 첨가하고 실온에서 추가로 1시간 동안 배양하였다. 그런 다음 플레이트를 세척하고 플레이트 결합된 비오틴-h그렙린을 HRP(thermo)와 접합된 뉴트라비딘으로 검출하였다. 그런 다음 TMB 용액으로 플레이트를 현상하고 중지 용액을 첨가하여 중지하였다. 플레이트는 450nm에서 플레이트 판독기에서 판독되었다. 도 3a 및 도 3d는 야생형 그렙린이 BMP 2, BMP 4 및 BMP 7에 결합할 수 있고, BMP 2 및 4에 대한 결합 친화성이 BMP7에 대한 것보다 더 강함을 보여준다.

[0530] 돌연변이된 버전의 그렙린 XM5는 또한 BMP 2/4/7에 대한 그렙린과의 결합 능력에 대해 테스트되었다. XM5는 Mabspace에 의해 작제되고 발현되었으며, 여기서 BMP의 결합 루프에 알려진, 그렙린(NSFYIPRHIRKEEGSFQSCSF, 서열번호 63)의 123 내지 143개 아미노산이 BMP에 결합하지 않는, DAN(FSYSVPNTFPQSTESLVHCDS)의 63 내지 83개 아미노산으로 대체되었다. His-tag 또는 Fc-tag는 단백질의 C-말단에 작제되었다. XM5와 그렙린의 점착성을 확인하기 위해 정제되지 않은 상청액을 이 분석에 사용하였다. 간략하게, 항-인간 Fc 항체(1 $\mu$ g/ml)를 코팅하고 XM5-Fc 또는 그렙린-Fc(1:32 희석)의 상청액을 첨가하였다. 배양 후, his-tag가 있는 일련의 희석된 BMP(BMP2/4/7)를 첨가한 다음 2차 항체 항-his-HRP를 결합 검출에 사용하였다.

[0531] 도 3a에 도시된 바와 같이, 그렙린과 달리, BMP는 XM5에 결합하지 않았으며, 이는 그렙린 상의 서열번호 63을 포함하는 BMP의 결합 루프에서 적어도 하나의 아미노산이 BMP에 결합하는데 있어서 XM5에 필수적이라는 것을 예상하고 검증하였다. 인간 골 형태형성 단백질 2 및 4(hBMP2, hBMP4)에 결합하는 그렙린을 차단하는 항체의 능력을 ELISA를 통해 조사하였다. 플레이트를 재조합 인간 BMP 2 및 BMP 4(0.25 $\mu$ g/ml)(hBMP2, hBMP4, Peprotech)로 밤새 코팅한 다음, 이 복합체를 코팅된 플레이트에 첨가하고 실온에서 추가 시간 동안 실온에서 배양하기

전에 항체의 연속 희석물을 비오틴 태그로 변형된 0.1 $\mu$ g/ml hGREM1(Peprotech)와 함께 1시간 동안 배양하였다. 그런 다음 플레이트를 세척하고 플레이트 결합된 비오틴-h그렘린을 HRP(thermo)와 결합된 뉴트라비딘으로 검출하였다. 그런 다음 TMB 용액으로 플레이트를 현상하고 중지 용액을 추가하여 중지하였다. 플레이트는 450nm에서 플레이트 판독기에서 판독되었다. 그 결과는 도 3b 및 도 3c에 나타나 있으며, 이는 본원에서 제공되는 항-그렘린 1 항체(예를 들어, 14E3, 56C11 및 69H5 뿐만 아니라 그 전체 내용이 참조로 인용되는 WO2014159010에 개시된 H4H6245P의 서열에 따라 생산된 벤치마크 항체 6245P)가 그렘린이 BMP2 및 BMP4에 결합하는 것을, 정도는 다르지만 용량 의존적 방식으로 억제할 수 있음을 시사한다.

[0532] 또한, 인간 BMP2/4/7에 결합하는 그렘린을 차단하는 본원에서 제공되는 항체의 연속 희석액의 능력을 ELISA를 통해 조사하였다. 플레이트를 재조합 인간 BMP2/4/7(0.5 $\mu$ g/ml)로 밤새 코팅한 다음, 이 복합체를 코팅된 플레이트에 첨가하고 실온에서 추가 시간 동안 실온에서 배양하기 전에 항체의 연속 희석액을 1 $\mu$ g/ml의 인간 그렘린-his 변형물과 함께 RT에서 1시간 동안 배양하였다. 그런 다음 플레이트를 세척하고 항-his HRP(GenScript)를 첨가하였다. 그런 다음 TMB 용액으로 플레이트를 현상하고 중지 용액을 추가하여 중지시켰다. 플레이트는 450nm에서 플레이트 판독기에서 판독되었다. 그 결과는 도 3e 내지 도 3h에 나타나 있으며, 이는 본원에서 제공되는 항-그렘린 1 항체(예를 들어, 42B9, 36F5, 67G11, 14E3 HaLa, 키메라 항체 69H5(69H5-chi), 키메라 항체 56C11(56C11-chi) 및 키메라 항체 22F1(22F1-chi))뿐만 아니라 벤치마크 항체 6245P는 그렘린이 BMP2(도 3e 참조), BMP4(도 3f 참조) 및 BMP 7(도 3g 참조)에 결합하는 것을 억제할 수 있음을 시사한다. 상기 키메라 항그렘린 1 항체(69H5-chi) 및 키메라 항그렘린 1 항체(22F1-chi)는 또한 그렘린이 BMP2 및 BMP4에 결합하는 것을 억제할 수 있다(도 3e 및 도 3f 참조). 상기 키메라 항그렘린 1 항체(56C11-chi)는 그렘린과 BMP2의 결합을 억제할 수 있다(도 3e 참조).

[0533] 특히, 도 3g에 도시된 바와 같이, 본원에서 제공되는 항-그렘린 1 항체(42B9, 36F5, 67G11 및 14E3 HaLa)는 BMP7에 대한 그렘린의 결합을 상당히 차단할 수 있고, 적어도 50% 또는 심지어 적어도 70%의 최대 차단 백분율을 나타냈다. 대조적으로, 벤치마크 항체 6245P는 BMP7에 대한 인간 그렘린의 결합에 대해 단지 최대 30% 미만의 차단을 나타냈으며, 이는 6245P가 BMP7 차단에 훨씬 덜 효과적인 것을 시사한다.

[0534] **실시예 7: BMP 반응성 리포터 검정을 사용한 그렘린 매개 BMP 신호전달의 차단에 있어서 항체 활성의 특성화**

[0535] 이들 정제된 하이브리도마 항체는 또한 BRITER(BMP 반응성 골아세포 리포터 세포주, Abmgood, T3105)에서 BMP4-유도된 루시페라제 리포터 검정을 사용하여 BMP 신호전달의 그렘린-매개 억제를 감소시키는 능력에 대해 테스트되었다. 간략하게, BRITER 세포를 96개-웰 플레이트에 10000개 세포/웰로 플레이팅하고 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 밤새 배양하였다. 다음날, 세포를 대조물 배지, 또는 30ng/ml BMP 4(BMP4 30) 또는 30ng/ml BMP 4 + 그렘린 200ng/ml(B 30 + 그렘린 200)가 포함된 배지, 또는 도 4의 x 축에 도시된 바와 같이 본원에서 제공되는 상이한 농도의 항체(B + G + 0.096/0.048/0.24/1.2/6/30 $\mu$ g/ml)와 함께 30ng/ml BMP 4 + 그렘린 200ng/ml로 자극하였다. 플레이트 판독기(Thermo Scientific Varioskan Flash)를 사용하여 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 3시간 배양한 후 각 웰에 있는 세포의 루시페라제 활성을 측정하였다.

[0536] 도 4에 도시된 바와 같이, 벤치마크 항체와 대조적으로, 상기 항체는 암 세포 기원이 아닌 리포터 세포에서 BMP 신호전달의 그렘린-매개 억제를 감소시키는 활성을 나타내지 않은 반면, 벤치마크 항체는 BMP 신호전달의 그렘린-매개된 억제를 감소시키거나 역전시킬 수 있다.

[0537] **실시예 8: BMP 신호전달 및 세포 분화의 그렘린-매개 억제를 감소시키는데 있어서 항체 활성의 특성화**

[0538] 정제된 하이브리도마 항체는 또한 BMP4-유도된 ATDC-5 세포 분화를 사용하여 BMP 신호전달에 대한 그렘린 매개 억제를 감소시키는 능력에 대해 테스트되었다. ATDC-5는 연골 형성 세포주이며 BMP4 신호전달에 반응하여 분화할 수 있다. 연골 형성 세포주의 분화는 알려진 BMP 억제제인 그렘린에 의해 차단될 수 있다. 그렘린을 차단하면 이 분석에서 BMP4 억제가 역전된다. 골아세포 분화의 초기 마커인 알칼린 포스파타제(ALP)의 내인성 발현을 검출하기 위해 기질을 사용하여 분화를 비색법으로 측정할 수 있다. 분화 수준은 BMP4 신호전달의 활성을 긍정적으로 반영할 수 있다.

[0539] ATDC-5 세포를 96개-웰 플레이트에 3000개 세포/웰로 플레이팅하고 DMEM/F12, 10%FBS + 1%PS에서 100 $\mu$ l/웰의 부피로 성장시키고 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 밤새 배양하였다. 다음날, hGREM1을 무혈청 배지에서 연속적으로 희석된 항체와 혼합하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 배양하였다. 무혈청 배지에 희석된 인간 BMP4(Peprotech)를 그렘린/항체 혼합물에 첨가한 다음 37 $^{\circ}$ C에서 추가로 30분 동안 배양하였다. 배양 후, 100 $\mu$ l의 혼합물을 100 $\mu$ l의 완전 배지에 플레이팅된 ATDC-5 세포에 첨가하였다. 각 웰의 세포에 대한 hBMP4 및 h그렘린의 최종 농도는 각각 100ng/ml 및

400ng/ml였다. 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 3일 동안 성장시킨 후, 배지를 흡인하고 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 세포를 M-PER 완충액(Thermo) + 단백질 억제제(Roche)로 용해시켰다. ALP는 p-니트로페닐 포스페이트(PNPP)(Sigma)를 이용하여 측정하였다. OD405는 Multiscan FC 마이크로플레이트 판독기(Thermo Scientific)에서 측정되었다.

[0540] 도 5에 나타난 바와 같이, 벤치마크 항체 6245P는 세포 분화에서 BMP 신호전달에 대한 그렘린-매개 억제를 감소시킬 수 있는 반면, 항체 14E3(도 5a), 22F1(도 5b), 56C11(도 5c) 및 69H5(도 5d)는 그러한 효과를 나타내지 않았다. 즉, 본원에서 제공되는 항체는 암 기원이 아닌 세포 분화에 관여하는 BMP 신호전달에 대한 그렘린 억제를 회복시킬 수 없었다.

[0541] **실시예 9: PC3 전립선암 세포에서 BMP 신호전달의 그렘린 매개 억제의 특성화 및 PC3 세포에서 BMP 신호전달에 대한 그렘린 매개 억제를 역전시키는데 있어서 본원에서 제공되는 항체의 평가**

[0542] PC3 전립선암 세포를 DMEM/10% FBS, 1%PS(완전 배지)에 100000개/웰로 12개-웰 플레이트에 플레이팅하고 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 90% 컨플루언스로 성장시켰다. 밤새 무혈청 배지로 굵긴 후, PC3 세포를 그렘린과 함께 또는 없이 BMP4로 30분 동안 자극하였다. 웨스턴 블롯 분석을 위해 세포를 RIPA 완충액(CST)에 용해시켰다. 세포 용해물을 4% 내지 12% SDS-PAGE(Genscript)를 사용하여 분리하고 PVDF 막(Millipore)으로 옮겼다. 상기 막을 BMP 신호전달의 활성을 긍정적으로 반영하는 smad 인산화에 특이적인 항체(p-smad1/5/9)(1:1000, CST)와 대조물로서 β 액틴에 특이적인 항체(1:5000, Abbkine)와 함께 각각 밤새 4°C에서 배양한 다음, 해당하는 2차 항체와 함께 배양하였다. 발색은 Pierce ECL 웨스턴 블로팅 기질(Thermo Scientific)을 사용하여 수행되었으며 화학발광 영상화기(Cheniluminescent Imager; MiniChemi, Sagecreation)를 사용하여 시각화되었다.

[0543] 결과는 그렘린이 용량 의존 방식으로 BMP 유도된 p-smad1/5/9의 수준을 감소시켰음을 보여주었고, 이는 그렘린이 실제로 BMP 신호전달을 억제할 수 있음을 제시한다(도 6a).

[0544] BMP 유도된 p-smad1/5/9에 대한 그렘린-매개 억제를 차단하는 본원에서 제공되는 상이한 항체의 능력을 추가로 평가하였다. 그렘린은 37°C에서 30분 동안 다양한 농도의 본원에서 제공되는 항체와 함께 배양되었고, 그렘린과 항체의 혼합물은 플레이팅된 PC3 세포에 첨가되기 전에 BMP4와 함께 30분 동안 37°C에서 배양되었다. 30분 후, 상기 언급된 프로토콜을 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 위해 세포를 RIPA 완충액(CST)에서 용해시켰다.

[0545] 도 6b에 나타난 바와 같이, GREM1-매개 억제로부터 회복된 p-smad 1/5/9 또는 pSMAD1/5/9의 강도는 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체(예를 들어, 14E3, 22F1, 56C11, 69H5)의 농도가 증가됨에 따라 증가했다. 이 실험은 본원에서 제공되는 이들 항체가 용량 의존적 방식으로 BMP 신호전달에 대한 그렘린-매개 억제를 조절할 수 있음(예를 들어, 감소시킬 수 있음)을 보여주었다.

[0546] **실시예 10: 상이한 세포 유형에서 본원에서 제공되는 항-그렘린1 항체에 의한 BMP 신호전달에 대한 그렘린-매개 억제의 차별적 역전의 특성화**

[0547] 그렘린은 다수의 생리학적 조직에서 발현되고 다수의 세포 유형에 영향을 미치기 때문에, 본원에서 제공되는 항-그렘린1 항체가 BMP 신호전달에 대한 그렘린-매개 억제에 반응하는 상이한 세포 유형에 대해 유사한 효과를 갖는지 여부를 평가하였다. 간단히 말해서, 골아세포 ATDC-5, 신장 섬유아세포 NRK49F, 신장 상피 세포 HK2 세포 뿐만 아니라 종양 세포 PC3를 포함하는, 다양한 기원의 여러 세포 유형을 BMP4로 자극하거나 그렘린과 함께 BMP4로 자극하였다. 이어서, BMP4와 그렘린으로 자극된 세포에 1 또는 10μg/ml 그렘린 항체 또는 대조물 IgG를 공급하였다. 여기서 테스트한 항체에는 14E3 및 벤치마크 항체 6245P가 포함된다. 도 7에서 볼 수 있듯이, 그렘린은 BMP4 유도된 pSMAD1/5/9를 강력하게 억제할 수 있고 벤치마크 항체 6245P는 테스트한 모든 세포 유형에서 BMP4 유도된 pSMAD1/5/9의 그렘린 매개 억제를 역전시킬 수 있는 반면, 14E3은 PC3 세포와 같은 종양 세포에서 BMP4 신호 전달에 대한 그렘린 매개 억제를 역전시키지만 다른 세포 유형(예컨대 ATDC-5 골아세포, NRK-49F 신장 섬유아세포, HK-2-신장 상피 세포)에서는 그렇지 않았다. 이러한 예상치 못한 결과는 본원에서 제공되는 항-그렘린1 항체(14E3, 22F1, 56C11, 42B9, 36F5, 67G11 및 69H5, Hu14E3, Hu22F1 및 Hu56C11)가 그들의 생물학적 활성에서 벤치마크 항체와 매우 상이하며, 이는 실시예 8에 기재된 바와 같이 ATDC-5 세포에서 ALP 분석을 사용한 그들의 차등적 활성과 일치한다. 그러한 비암세포보다는 암세포에서의 BMP 신호전달 역전에 대한 선택성은 본원에서 제공되는 항-hGREM1 항체(예를 들면, 14E3, 22F1, 56C11, 42B9, 67G11 및 69H5, Hu14E3, Hu22F1 및 Hu56C11)은 암세포에 선택적으로 영향을 미칠 수 있는 반면 비암세포에는 거의 독성이 없음을 나타낸다.

[0548] **실시예 11: 하이브리도마 항체의 클로닝 및 서열분석**

[0549] 원하는 프로파일을 나타낸 4개의 선도(lead) 항체를 유전자 클로닝을 위해 선택하였다. 뮤린 항-hGREM1 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 서열은 5' RACE(cDNA 말단의 급속 증폭)로 알려진 증합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭 기술에 의해 획득하였다. 하이브리도마 세포를 생산하는 그래핀 항체로부터의 전체 RNA는 트리졸(Trizol; Invitrogen)을 사용하여 분리되었고 cDNA는 올리고(dT)12-18 프라이머와 함께 Superscript 제1 가닥 합성 시스템(Invitrogen)을 사용하여 합성되었다. 마우스 IgG 유전자의 가변 영역은 중쇄 가변 영역에 대한 MuIgG VH3'-2 및 MuIg-5' 선두 프라이머 및 경쇄 가변 영역에 대한 MuIgK VL3'-1 및 MuIg-5" 선두 프라이머(NOVAGEN)를 사용하여 PCR에 의해 클로닝되었다. 생성된 밴드를 TOPO TA 클로닝 벡터에 클로닝하고 10개 이상의 클론의 DNA를 서열분석용으로 추출하고 ABI DNA 서열분석 기기(Perkin Elmer)를 사용하여 결정하였다. 공통 서열은 벡터 NTI 어드밴스 10 소프트웨어(Invitrogen)를 사용하여 결정되었다. 염기서열 분석 및 확인 후, 항체 생산 및 정제를 위해 그래핀 유전자의 가변 영역을 재조합 발현 벡터(pCP-mCK에 VL, pCP-mCg2a에 VH)에 클로닝하였다. 이들 하이브리도마 항체의 서열을 표 10에 나타내었다. 표 10은 본 출원에서 사용된 모든 서열을 나타낸다.

[0550] 항체는 마우스 IgG2b로 동형화되었다. 항체의 분비를 촉진하기 위해 항체의 N-말단에 신호 펩타이드(MGWSCIILFLVATGVHS(서열번호 65))를 융합시켰다.

[0551] **실시예 12: 293E6 세포에서 재조합 항체 단백질의 발현 및 정제**

[0552] 재조합 항체 단백질의 발현 및 정제는 하기 방법에 의해 수행되었다:  $1 \times 10^6$  개 세포/ml에서 10% Pluronic F-68을 포함하는 프리스타일 293 발현 배지에서 배양된 HEK293E 세포를 동일한 양의 중쇄 벡터 및 경쇄 벡터 DNA를 사용하여 0.5µg/ml의 최종 농도 및 1.0µg/ml의 PEI(폴리에틸렌이민-선형, Polyscience)에서 형질감염시켰다. DNA 대 PEI 비율은 1:2였다. 최적 MEM에서 DNA와 PEI 복합체가 형성되는 기간은 실온에서 15분이어야 한다. 형질감염된 세포는 플라스크에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 및 125rpm 진탕 속도로 배양되었다. 1% 펩톤 배지를 형질감염 후 22 내지 26시간에 첨가하였다. 조정된 배지를 6일째에 하베스트하고 상청액을 30분 동안 3,000rpm에서 원심분리하였다. 그런 다음 정화된 조절 배지를 nProteinA 컬럼(G.E. Healthcare)에 부하하고 PBS + 0.1% triton-X100으로 세척하여 마지막으로 결합된 IgG를 pH 3.5에서 0.1M 글리신을 함유하는 용액으로 용출하였다. 용출된 항체 단백질은 PBS에 투석하여 -80°C에 보관하였다. 내독소를 제거하기 위해 정제된 단백질을 Hitrap DEAE 세파로스 F.F. 컬럼을 통해 통과시킴으로써 추가 처리하고 생성된 항체를 크기 배제 크로마토그래피(Superdex 200 5/150 GL, G.E. Healthcare)를 사용하여 순도 수준을 결정하기 위해 분석하였다.

[0553] 상기 기술된 방법에 따라 제조된 재조합 키메라 항-그래핀1 항체의 결합 분석이 도 8에 나타나 있으며, 여기서 항체 56C11-C(즉, 56C11의 키메라 항체) 및 14E3-C(즉, 14E3의 키메라 항체)는 벤치마크 항체 6245P(115.2 ng/ml)와 비교하여 더 낮은 EC50 값(14E3-C의 경우 5.240ng/ml 및 56C11-C의 경우 4.887ng/ml)으로 상당히 더 높은 결합 친화도를 나타냈다.

[0554] **실시예 13: 생체내 연구를 위해 선택된 항체의 대규모 생산**

[0555] 이들 클로닝된 항체 각각은 신부전 모델에서 생체내 시험을 위한 다량의 항체를 생산하도록 규모를 키웠다.

[0556] 하이브리도마 세포를 시험관내 생산 배지와 함께 롤러 병에서 배양한 다음, 조정 배지에서 생산된 단클론 항체를 처리하고 낮은 내독소 절차에 의해 단백질 A 친화성 컬럼에 의해 정제할 것이다.

[0557] 간략하게, 하이브리도마 세포를 회수하고 확장하여 세포를 하이브리도마 생산 배지(DMEM +2% 낮은 IgG FBS)에서 성장하도록 적응시키고 각각 300ml의 배양 배지가 있는 롤러 병에 접종하였다. 그런 다음 세포를 롤러 병에서 2 내지 3주 동안 배양하고 하베스트하여 정제된 배양 배지를 정화한다. 그런 다음 배양 배지로부터 생산된 mAb를 단백질 A 친화성 컬럼으로 정제하고, PBS(pH 7.4)에 대해 투석하여, 필요한 경우 1.0mg/ml 이상으로 농축하였다. 품질 관리를 위해 다음 매개변수를 측정하였다: 항체 제품 순도, 내독소 수준, 응집 수준 및 표적 항원에 대한 결합.

[0558] 예상되는 제품 사양:

[0559] a. 완충액: 인산염 완충 식염수(PBS), pH 7.2-7.4, 멸균 여과 및 방부제 없음.

[0560] b. 농도: 1.0mg/ml 이상

[0561] c. 순도: SDS-PAGE 및 HPLC에 의해 90% 이상

[0562] d. 응집: HPLC에 의해 10% 미만

[0563] e. 내독소 3EU/mg 이하

[0564] **실시예 14: 포획된 hGREM1에 대한 선택된 그램린 항체의 결합 친화도 측정의 특성화**

[0565] 항체의 친화도는 25°C에서 Biacore T200에 의해 측정되었다. HGREM1(Peprotech)를 Biacore 센서 칩에 고정시켰다. HBS-EP+를 러닝 완충액과 샘플 완충액 모두로 사용하여 동역학 실험을 수행하였다. 포획된 hGREM1 표면에 다양한 농도(12.5 내지 400nM 범위, 2배 희석)의 항체를 주입하여 항체-항원 회합율을 측정하였다. 항체-항원 회합을 180초 동안 모니터링하는 한편 완충액에서의 해리를 360초 동안 모니터링하였다.  $K_a$  및  $K_d$  값을 결정하기 위해 Biacore T200 평가 소프트웨어를 사용하여 동역학 분석을 수행하였다.  $K_D$ 는 실험적으로 결정된  $K_a$  및  $K_d$  값으로부터  $K_D=K_d/K_a$ 로 계산되었다. 도 9에 나타낸 바와 같이, 재조합 키메라 항그렘린1 항체 14E3(14E3-C)의  $K_D$  값은 17.68nM이고 키메라 항그렘린1 항체 22F1(22F1-C)의  $K_D$  값은 27.28nM이다.

[0566] **실시예 15: 에피토프 연구**

[0567] 경쟁 ELISA 검정에 의한 에피토프 비닝 분석

[0568] 경쟁 ELISA 검정을 사용하여 항-그램린 하이브리도마 항체의 에피토프 비닝을 수행하였다. 투명 폴리스티렌 플레이트(BEAVER)를 4°C에서 밤새 높은 pH 코팅 완충액에서 0.5µg/ml hGREM1(ACRO)를 100µl/웰로 코팅하였다. 그런 다음 플레이트를 PBS + 0.1% Tween 20(Sigma)을 사용하여 자동 플레이트 세척기에서 한 번 세척하였다. PBS + 1% BSA + 1% 정상 염소 혈청 + 0.05% Tween 20(Sigma)으로 구성된 차단 용액 100µl를 각 웰에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 그런 다음 항체 희석 완충액(PBS+1%BSA+1% 정상 염소 혈청+0.01% Tween 20) 중 포화된 항체(하이브리도마 항체) 20µg/ml의 50µl/웰을 플레이트의 각 웰에 첨가하고 1시간 동안 배양하였다. 그런 다음 플레이트의 각 웰에 40ng/ml 경쟁 항체(키메라 항체, 예컨대 14E3-C, 22F1-C, 56C11-C 및 69H5-C) 50µl/웰을 첨가하고 실온에서 1시간 더 배양하였다. 그런 다음, 이들을 PBS + 0.1% Tween20으로 3회 세척한 다음 100µl의 1:10000 염소 항-인간 IgG-HRP(abcam)를 첨가하고 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로, 각 웰에 50µl의 중지 용액을 첨가한 후 5분 후에 100µl/웰의 TMB(Pierce)를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트는 450nm에서 플레이트 판독기에서 판독되었다. 포화량의 제1 항체의 존재 하에 제2 항체가 결합하지 못하는 것은 2개의 항체가 동일한 에피토프 빈에 있었다는 것을 나타내고; 포화량의 제1 항체의 존재 하에 결합하는 제2 항체의 성공은 2개의 항체가 상이한 에피토프 빈에 있음을 나타낸다. 완전한 데이터 세트를 기반으로, 여러개의 항체 빈이 있다. 데이터의 예는 도 10a에 나와 있다.

[0569] 도 10a에 나타낸 바와 같이, 14E3 및 22F1은 서로 경쟁하고 또한 69H5-C 결합을 차단할 수 있었는데, 이는 이들 3개의 항체가 하나의 에피토프 빈에 있음을 나타낸다. 한편, 그램린에 대한 56C11의 결합은 14E3, 22F1 또는 69H5에 의해 경쟁되지 않았으며, 이는 56C11이 14E3, 22F1 및 69H5의 에피토프 빈과 다른 에피토프 빈에 있음을 나타낸다. 이 결과는 56C11이 마우스 그램린에 결합할 수 있는 반면, 14E3, 22F1 및 69H5는 결합할 수 없는 도 1의 데이터와 동일하다.

[0570] 14E3/22F1이 벤치마크 항체 6245P와 다른 에피토프에 결합하는지 여부를 분석하기 위해 교차 경쟁 실험도 수행하였다. 요약하면, 고정량의 키메라 항체 14E3-C/22F1-C 또는 6245P를 첨가한 후 증가하는 양의 하이브리도마 항체 14E3 및 22F1을 첨가하였다. 그램린에 결합된 키메라 항체의 양을 측정하였다. 도 10b에 도시된 바와 같이, 14E3 및 22F1은 서로 경쟁하지만 100배 과량에서도 6245P 결합과 경쟁할 수 없으며, 이는 14E3-C 및 22F1-C가 6245P와 다른 에피토프에 결합함을 나타낸다.

[0571] 14E3의 에피토프 맵핑

[0572] 인간 그램린 및 마우스 그램린의 서열을 정렬하고 2개의 상이한 아미노산만이 관찰되었다: Q27(인간)-P27(마우스) 및 N33(인간)-T33(마우스), 여기서 번호매김은 각각 서열번호 69 및 서열번호 70을 참조한다. 14E3은 인간 그램린에 결합하지만 마우스 그램린에는 결합하지 않으므로, 이 2개의 상이한 아미노산이 항체 결합에 영향을 미치는 핵심 아미노산일 수 있다고 추측한다. 14E3 결합에 대한 2개의 중요한 잔기를 확인하기 위해, 신호 펩타이드(서열번호 71) 및 C-말단 His-태그가 있는 인간 그램린<sub>WT</sub>, 인간 그램린<sub>Q27P</sub>, 인간 그램린<sub>N33T</sub> 및 인간 그램린<sub>Q27P/N33T</sub>를 포함한 4개의 변이체를 pcDNA3.1(+)백터에 클로닝하고, 모든 작제물은 DNA 서열분석에 의해 확인되었다. QIAGEN 플라스미드 미디 키트를 사용하여 정제된 4개의 작제물의 플라스미드를 ExpiCHO 형질감염 키트를 사용하여 3ml 규모의 ExpiCHO 세포에 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 8% CO<sub>2</sub> 및 37°C 배양기에서 125rpm으로 진탕 플라스크에서 배양하였다. 세포 배양물을 4일째 하베스트하고, 8000rpm에서 30분 동안 원심분리한 다음, 상청액을 항체 결합 분석에 사용하였다.

- [0573] 신호 펩타이드가 없는 인간 그램린1 서열:
- [0574] KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRARGRGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGQCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLQPPTKKKRVTRVKQCRCISIDLD(서열번호 69)
- [0575] 신호 펩타이드가 없는 마우스 그램린1 서열:
- [0576] KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRZRGRGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGQCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLQPPTKKKRVTRVKQCRCISIDLD(서열번호 70)
- [0577] 주: 인간 그램린과 마우스 그램린 사이의 2개의 다른 아미노산은 굵게 표시되고 밑줄이 그어져 있다. 인간 그램린1의 신호 펩타이드 서열은 서열번호 71에 제시되어 있고, 마우스 그램린1의 신호 펩타이드 서열은 서열번호 72에 제시되어 있다.
- [0578] 생체층 간섭계(BLI) 검정
- [0579] 인간 그램린 Ab, 14E3 및 6245p를 동역학 완충제(PBS pH 7.4, 0.1% BSA+0.2% Tween-20)으로 희석하여 96개-웰 반면적 마이크로플레이트(Greiner Bio-one)의 부하 컬럼에 100nM의 농도, 웰당 100 $\mu$ l로 만들었다. 테스트할 그램린 WT 및 돌연변이체에 대한 상청액을 웰당 100 $\mu$ l씩 플레이트의 회합 컬럼에 첨가하였다. 배지 또는 KD 완충액을 참조 대조물로 사용하였다. AHC 센서를 60초 동안 1차 기준선 컬럼에 넣어 1차 기준선을 얻은 다음 부하 컬럼에서 300초 동안 그램린 항체를 포획하였다. 그런 다음 센서를 2차 기준선 컬럼에 60초 동안 두어 2차 기준선을 얻었다. 그런 다음 300초 동안 회합 컬럼에 넣어 그램린/그램린 Ab가 완전히 회합되도록 하고, 센서를 해리 컬럼에 300초 동안 넣었다. ForteBio(Octet96)로 그룹 데이터를 분석한다.
- [0580] 도 10d는 14E3이 Asn33이 Thr(즉, N33T)로 치환된 인간 그램린 1 변이체에 여전히 결합할 수 있지만, 결합은 부분적으로 감소되었음을 보여준다. 그러나 인간 그램린 1에서 Gln27을 Pro(즉, Q27P)로 치환하면 14E3 결합이 상당히 감소하며, 이러한 감소는 N33T 및 Q27P 둘 다 치환된 인간 그램린 1 변이체에서도 관찰되었다. 대조적으로, 인간 그램린 1에서 N33T 또는 Q27P 단일 돌연변이는 6245P의 결합을 유의적으로 감소시키지 않았으며, 이는 6245P가 인간 그램린 1에서 N33 또는 Q27을 포함하지 않는 에피토프에 결합함을 나타낸다. 이는 N33T 및 Q27P 돌연변이를 모두 갖는 인간 그램린 1에서 관찰된 결합 결과와 일치했다. 이들 데이터는 14E3이 서열번호 69의 Q27을 포함하는 에피토프에 결합함을 시사한다. 14E3이 결합하는 에피토프는 서열번호 69의 N33을 더 낮은 정도로 포함할 수 있다.
- [0581] **실시예 16: 그램린-DAN 융합 단백질 XM5에 대한 결합**
- [0582] 14E3이 6245P와 다른 에피토프에 결합한다는 것을 추가로 입증하기 위하여, 실시예 6에 기술된 바와 같이 야생형 그램린 단백질 또는 XM5에 대한 이들 항체의 결합을 평가하였다.
- [0583] 위에서 언급한 유사한 ELISA 프로토콜을 사용하여, XM5 또는 그램린에 대한 키메라 항체 14E3의 결합을 테스트하였다. 간략하게, 14E3-C 또는 6245P를 코팅하고(1 $\mu$ g/ml) 연속 희석된 XM5-his 상청액 또는 그램린-his(2 $\mu$ g/ml에서 0.49 $\mu$ g/ml로)를 결합을 위해 첨가하였다. 2차 항체 항-his-HRP를 검출에 사용하였다. 도 10c에 나타낸 바와 같이, 14E3-C와 6245P 모두 그램린에 결합할 수 있다. 그러나 6245P가 아닌 14E3-C만이 XM5에 결합할 수 있다. 이는 14E3-C와 6245P가 다른 에피토프에 결합한다는 것을 나타내며, 이는 위에서 언급한 에피토프 비닝 결과와 일치한다.
- [0584] hGREM1 및 XM5에 대한 결합 친화도를 또한 비교하였다. 간략하게, XM5-Fc 또는 그램린-his(1 $\mu$ g/ml)를 코팅하였다. PBS + 1% BSA + 1% 정상 염소 혈청 + 0.5% Tween 20(Sigma)으로 구성된 차단 용액 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 2 $\mu$ g/ml의 4배 연속 항체 희석액을 첨가하였다. 그 후 플레이트를 200 $\mu$ l의 PBS + 0.1% Tween20으로 3회 세척한 다음 100 $\mu$ l/웰 1:10000 염소 항 마우스 IgG-HRP(abcam)를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 그런 다음 PBS + 0.1% Tween20으로 3회 세척하였다. 마지막으로 TMB(InnoReagents) 100 $\mu$ l/웰을 각 웰에 첨가하고 2분 후에 중지 용액 50 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트는 450nm에서 Multiscan FC 마이크로플레이트 판독기(Thermo Scientific)에서 판독되었다. EC50 값은 아래 표에 나와 있다.
- [0585] 도 10e 및 도 10f에 나타낸 바와 같이, 42B9, 36F5 및 67G11은 0.012ng/ml 내지 0.015ng/ml의 EC50 값으로 hGREM1에 결합하고, 0.006ng/ml 내지 0.008ng/ml의 EC50 값으로 XM5에 결합한다.
- [0586] **실시예 17: Fortebio에 의한 에피토프 분석**

[0587] 본원에서 제공되는 항-그렙린1 항체의 에피토프 분석은 Fortebio에 의해 추가로 수행되었다. 요약하면, 첫 번째 항-그렙린1 항체(1차 Ab)를 마이크로플레이트(Greiner Bio-one)의 부하 컬럼에서 동역학 완충액(PBS)에 250 $\mu$ l/웰로 희석하였다. h그렙린-his는 250 $\mu$ l/웰의 플레이트의 회합 컬럼에서 동역학 완충액에 있었고; AHC 센서는 60 초 동안 1차 기준선 컬럼에 넣어 1차 기준선을 얻은 다음, 부하 컬럼에서 300초 동안 첫 번째 항-그렙린1 항체를 포획하였다. 그 후, 센서를 180초 동안 2차 기준선 컬럼에 배치하여 2차 기준선을 얻은 다음, 300초 동안 회합 컬럼에 배치하여 그렙린을 1차 항-그렙린1 항체와 완전히 회합시켰다. 센서는 2차 항-그렙린1 항체(2차 Ab) 컬럼에 300초 동안 넣어 2차 항-그렙린1 항체가 1차 항체와 경쟁하거나 경쟁하지 않도록 하였다. 데이터는 ForteBio(Octet96)로 분석하였다.

[0588] 2차 항-그렙린1 항체가 그렙린에 결합할 수 없는 경우, 이는 1차 항-그렙린1 항체와 유사한 에피토프에 결합함을 나타내고; 2차 항그렙린1 항체가 1차 항그렙린1 항체에 의해 아무런 영향 없이 결합할 수 있다면, 에피토프가 다르다는 것을 나타낸다. 도 11a에 나타난 바와 같이, 2차 항-그렙린1 항체로서 6245P는 여전히 그렙린에 결합할 수 있으며, 이는 14E3과 경쟁할 수 없고 다른 에피토프에 결합할 수 있음을 나타내고; 반면 22F1/69H5는 14E3의 존재 하에서 그렙린에 결합할 수 없었으며, 이는 22F1/69H5 및 14E3이 유사한 에피토프 부위에 결합할 수 있음을 나타낸다. 반대로, 1차 항그렙린1 항체인 6245P는 항원에 대한 14E3/22F1 결합을 차단할 수 없었지만 56C11/69H5의 결합은 완전히 차단했다(도 11b). 따라서 에피토프의 유형에 따라, 아마도 3개의 그룹이 있을 것이다: 한 그룹은 14E3과 22F1을 포함하고, 다른 그룹은 56C11과 69H5를 포함하며, 이들의 에피토프는 6245P의 에피토프와 중복될 수 있다(표 6).

[0589] [표 6]

		센서 상의 1차 Ab				
		14E3	22F1	56C11	69H5	6245P
용액 중의 2차 Ab	14E3	+	+	-	부분적	-
	22F1	+	+	-	부분적	-
	56C11	+	+	+	부분적	+
	69H5	+	+	+	+	+
	6245P	-	-	+	-	+

[0590] 참고: +: 경쟁자; -: 비경쟁자; 부분적: 부분적 경쟁자

[0592] **실시예 18: 항-GREM 1 항체의 인간화**

[0593] **인간화된 14E3**

[0594] 14E3의 인간화된 항체는 3차원 구조 시뮬레이션 및 CDR-이식에 의한 인간화를 사용하여 하기 프로토콜로 디자인되었다.

[0595] 항체 인간화의 첫 번째 단계는 14E3의 가변 도메인의 3차원 구조의 시뮬레이션이다. 무린 항체의 각 가변 도메인(Vk 및 Vh)의 서열은 PDB 데이터베이스(Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/>)에 블래스팅되어 알려진 고해상도 구조로 가장 상동적인 항체 서열을 확인하였다. 14E3을 모델링하기 위해 선택된 구조 템플릿은 표적 항체와 가장 유사했다. 표적 서열을 수동으로 충족시키기 위해 구조의 각 잔기를 변경하였다. 주쇄 형태가 유지되면서 특정 측쇄 형태가 조정되었다. 부모 구조와 시뮬레이션된 구조가 동일한 잔기를 갖는 위치에서, 측쇄 구조는 변경되지 않고 유지되며; 잔기가 일부 위치에서 템플릿 구조와 모델링된 구조 간에 다른 경우, 측쇄 형태는 템플릿 구조 및 패키징 고려 사항에 따라 돌연변이되고 개선된다.

[0596] 우리는 또한 인간화된 항체의 개발가능성 및 안정성의 역돌연변이 설계 및 평가를 안내하기 위해 CDR 이식된 14E3의 구조를 시뮬레이션하였다. 구조 시뮬레이션도 유사한 방식으로 수행되었다.

[0597] CDR-이식에 의해 인간화를 수행하였다. IMGT의 인간 면역글로불린 유전자 데이터베이스에서 무린 14E3의 서열을 블래스팅한 후, 측쇄에 대한 인간 생식계열 프레임워크 서열 IGHV/7-4 및 경쇄에 대한 IGKV/2-30을 각각 CDR 이식에 사용하였고, 역돌연변이가 없는 인간화된 14E3를 얻었다. 인간화된 14E3의 활성을 추가로 유지하기 위해,

인간화된 항체의 프레임워크 서열과 그에 상응하는 무린 항체의 프레임워크 서열을 정렬하였다. 무린 항체 구조 모델에서 다른 잔기를 두 번 확인하였다: 그들 중 임의의 것이 CDR 잔기와 상호 작용하고 영향을 미칠 수 있는 위치에 있는 경우, 이는 무린 잔기로 역돌연변이되어야 한다. 본 개시내용은 각각 Hu14E3\_Ha VH, Hu14E3\_Hb VH 및 Hu14E3\_Hc VH로 표시된 상이한 역 돌연변이를 갖는 3개의 인간화된 중쇄 가변 영역, 및 Hu14E3-La VL 및 Hu14E3-Lb VL로 표시되는 상이한 역 돌연변이를 갖는 2개의 인간화된 경쇄 가변 영역을 획득하였다(표 5 참조). 이들 인간화된 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 cDNA를 hIgG1 및 hKappa 불변 영역에 융합시키고 포유동물 벡터에 삽입하였다. 각각의 인간화된 중쇄는 인간화된 경쇄와 함께 발현되어 6가지 버전의 인간화된 항체, 즉 Hu14E3\_HaLa, Hu14E3\_HaLb, Hu14E3\_HbLa, Hu14E3\_HbLb, Hu14E3\_HcLa 및 Hu14E3\_HcLb를 얻었다. 발현 및 정제 절차는 키메라 항체와 동일하다.

[0598] **인간화된 22F1**

[0599] 22F1의 인간화된 항체는 유사한 프로토콜로 디자인되었다. 요약하면, 중쇄에 대한 인간 생식계열 프레임워크 서열 IGHV/1-46 및 경쇄에 대한 IGKV/2-30을 각각 CDR 이식에 사용한 다음, 컴퓨터 모델링을 사용하여 CDR 이식 및 역돌연변이를 갖는 인간화된 변이체를 디자인하였다. 본 개시내용은 역 돌연변이를 갖는 4개의 인간화된 중쇄 가변 영역, 즉 Hu22F1\_Ha VH, Hu22F1\_Hb VH, Hu22F1\_Hc VH 및 Hu22F1\_Hd VH 및 상이한 역 돌연변이를 갖는 2개의 경쇄 가변 영역, 즉 Hu22F1-La VL 및 Hu22F1-Lb VL을 획득하였다( 표 5 참조). 각각의 인간화된 중쇄는 인간화된 경쇄와 공동 발현되어 22F1에 대한 8가지 버전의 인간화된 항체, 즉 Hu22F1\_HaLa, Hu22F1\_HaLb, Hu22F1\_HbLa, Hu22F1\_HbLb, Hu22F1\_HcLa, Hu22F1\_HcLb, Hu22F1\_HdLa 및 Hu22F1\_HdLb를 획득하였다. 발현 및 정제 절차는 키메라 항체와 동일하다.

[0600] 재조합 항체 단백질의 발현 및 정제는 다음 단계에 의해 수행되었다: ExpiCHO 세포를 ExpiCHO 발현 배지에 5 내지  $6 \times 10^6$  개 세포/ml로 접종하였다. 이어서, ExpiCHO 세포를 등량의 중쇄 벡터 및 경쇄 벡터 DNA와 최종 농도  $1.0 \mu\text{g/ml}$ 로 포함하는 ExpiCHO 형질감염 키트를 사용하여 형질감염시켰다. 형질감염된 세포를 8% CO<sub>2</sub>가 보충된 37°C 배양기에서 125rpm의 진탕 플라스크에서 배양하였다. 형질감염 후 18 내지 22시간 후에 ExpiCHO 피드를 추가하였다. 세포 배양물을 10일째에 하베스트하였다. 하베스트된 세포 배양액(HCCF)을 원심분리에 의해 획득하였다. 그런 다음 HCCF를 rProteinA 컬럼(G.E. Healthcare)에 부하하고 PBS로 세척하였다. 최종 IgG 항체는 pH3.2에서 20mM 구연산을 포함하는 용액으로 용출되었다. 마지막으로, 용출된 항체 단백질을 중화하여 장기간 사용을 위해 -80°C에 보관하였다. 생성된 항체를 SDS-PAGE 및 크기 배제 크로마토그래피(TSKgel G3000SWXL, TOSOH)를 사용하여 순도 수준을 결정하기 위해 분석하였다.

[0601] **인간화된 56C11**

[0602] 56C11의 인간화된 항체를 유사한 프로토콜로 디자인하였다. 간략하게, 중쇄에 대한 인간 생식계열 프레임워크 서열 IGHV1-2\*02 및 경쇄에 대한 IGKV2-30\*02를 각각 CDR 이식에 사용하였다.

[0603] 중쇄(HC) 변이체 1, 2, 3 및 4는 3개의 CDR을 생식계열 서열에 직접 이식하여 획득하였다. 상기 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역의 조합은 다음 인간화된 56C11 항체를 생성한다: 56C11-H0L0, 56C11-HaL0, 56C11-HbL0, 56C11-HcL0, 56C11-H0La, 56C11-HaLa, 56C11-HbLa, 56C11-HcLa, 56C11-H0Lb, 56C11-HaLb, 56C11-Hb Lb, 56C11-HcLb.

[0604] 56C11의 중쇄 및 경쇄의 인간화된 변이체는 하기 나타낸 바와 같이 인간 IgG1 중쇄 불변 영역 및 카파 경쇄 불변 영역에 연결된다:

[0605] 인간 IgG1 중쇄 불변 영역(서열번호 138):

[0606] ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS  
CDKTHCTPPCPAPPELLGGPVFVLPKPKDITLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC  
KVSNAKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF  
SCSVMHEALHNYHTQKSLSPGK

[0607] 인간 카파 경쇄 불변 영역(서열번호 139):

[0608] RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF  
NRGEC

[0609] 상기 중쇄 및 경쇄 cDNA의 가변 영역을 합성하고 인간 IgG1 및 인간 카파의 불변 영역과 융합시켰다. 선택된 항

체 유전자의 증쇄 및 경쇄를 발현 벡터로 클로닝하고 대규모 DNA를 Qiagen의 Plasmid Maxiprep System을 사용하여 제조하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 Invitrogen의 ExpiFectamine™CHO 시약을 사용하여 형질감염을 수행하였다. 세포 생존율이 약 60%일 때 상청액을 하베스트하였다. 세포 배양 상청액을 0.22 $\mu$ m 여과 캡슐을 통해 여과하여 세포 부스러기를 제거하였다. 상청액을 미리 평형화된 단백질-A 친화성 컬럼에 부하한다. 그런 다음 컬럼 내부의 단백질 A 수지를 평형화 완충액(PBS)으로 세척하고, 25mM 시트레이트(pH 3.5)를 사용하여 항체를 용출시켰다. pH는 1M 트리스-염기(pH 9.0)로 약 6.0 내지 7.0으로 조정하였다. 내독소는 1EU/mg 이하로 제어되었다. 이어서 정제된 항체를 SDS-PAGE 및 SEC-HPLC로 특성화하였다.

[0610] **실시예 19: ELISA 및 Fortebio에서 h그렘린에 대한 인간화된 항체의 결합**

[0611] 실시예 4의 동일한 프로토콜. 도 12a에 도시된 바와 같이, 14E3의 인간화된 변이체는 키메라 14E3(예를 들어, 14E3 hIgG1 또는 14E3-C)과 유사한 결합 활성을 유지하였고, 이는 생물학적 활성이 아마도 인간화에 의해 영향을 받지 않았음을 나타낸다. 그러나, 22F1의 대부분의 인간화된 변이체는 상당히 결합력을 잃었고 22F1-HdLa 및 22F1-HdLb만이 여전히 양호한 친화도를 가졌다(도 12b 및 c).

[0612] 인간화된 항체의 친화도는 또한 Fortebio에 의해 측정되었다. 인간 그렘린 단백질을 동역학 완충액으로 희석하여 2 $\mu$ g/ml의 농도를 얻었다. 0nM을 기준 대조군으로 사용하였다. 테스트할 항체를 ForteBio 동역학 완충액(PBS pH 7.4, 0.1% BSA + 0.002% Tween-20)으로 100nM, 50nM, 및 25nM의 농도로 희석하였다. 인간 그렘린-his는 NTA 바이오센서에 고정되었다. 기준선을 60초 동안 탐지한 다음,  $K_{on}$  인자 데이터를 얻기 위해 항 그렘린 항체 결합을 120초 동안 탐지하였다.  $K_{off}$  인자 데이터를 얻기 위해 90초 동안 동역학 완충액에서 해리시켰다. 도 12d에 나타낸 바와 같이, 인간화된 항그렘린1 항체 14E3은 1 nM 미만의 KD 값을 가지며, 이는 벤치마크 항체보다 훨씬 낮다.

[0613] **실시예 20: PC-3 이종이식 종양 모델에서 인간화된 항체 14E3의 종양 성장 억제 활성**

[0614] 간략해서, 인간 전립선암 PC3 세포는 10% 열 불활성화된 태아 소 혈청(ExCell Biology), 100U/ml 페니실린, 100ug/ml 스트렙토마이신(Hyclone), 및 1ug/ml 푸로마이신(Gibco)이 보충된 RPMI1640 배지(Thermo Fisher), 37 °C에서 공기 중 5% CO<sub>2</sub>가 있는 대기에서 단층 배양물로서 시험관 내에서 유지시켰다. 종양 세포는 트립신-EDTA 처리(Hyclone)에 의해 매주 2회 일상적으로 계대배양되었다. 기하급수적 성장기에서 성장하는 세포를 하베스트하고 종양 접종을 위해 계수하였다. SPF 등급 수컷 누드 마우스에 50% 매트릭스-젤이 포함된 혼합 1\*10<sup>6</sup> PC3 세포를 피하 접종하였다. 10일 후, 접종된 마우스를 고환절제술로 거세하였다. 종양 크기가 약 200mm<sup>3</sup>에 도달했을 때, 종양이 있는 마우스를 선택하여 무작위로 2개 그룹(n=8)으로 나누었다. 동물에게 10mg/kg hIgG1 대조물 및 10mg/kg Hu14E3\_HaLa를 3주 동안 4일마다 복강내 주사하였다. 종양 크기는 캘리퍼(INSIZE)를 사용하여 4일마다 2차원으로 측정되었고 부피는 다음 식을 사용하여 mm<sup>3</sup>으로 표시되었다:  $V=0.5 a*b^2$  여기서 a와 b는 각각 종양의 장경과 단경이다. Prism GraphPad를 사용하여 결과를 분석하고 평균±S.E.M로 표시한다. 두 그룹 간의 비교는 T-test로 이루어졌으며, p가 \*<0.05이고 \*\*<0.01이면 차이가 유의적인 것으로 간주된다. 그 결과, Hu14E3\_HaLa는 부피 또는 중량 평가로부터 종양 성장을 효과적으로 억제할 수 있었다(도 13a 및 13b).

[0615] **실시예 21: BALB/c에 대한 CT-26 종양 모델(MSB-Pharm2018025)에 대한 56C11의 효능**

[0616] 그렘린1은 종양 세포 및 간질 섬유아세포 세포 둘 다에서 발현될 수 있으므로, 종양 미세환경을 조절하는 그렘린1의 기여도 및 종양 성장을 단독으로 또는 체크포인트 억제제와 조합하여 조절하는 이의 잠재력을 평가하였다. 따라서 우리는 동계 종양 모델인 CT-26 모델에서 56C11의 항종양 활성을 평가하였다. 간략하게, 5 내지 6주령의 24마리의 암컷 Balb/c 마우스에 2×10<sup>6</sup>개의 CT26 종양 세포를 접종하였다. 종양 부피가 약 100mm<sup>3</sup>에 도달했을 때, 동물을 무작위로 분류하여 아래와 같이 그룹화하였다: 1) 동종형 대조물 20mg/kg, 및 2) 20mg/kg에서 56C11. 항체를 2주 동안 매주 2회 복강내(IP) 주사하였다. 도 14에 제시된 결과는 항-GREM1 항체 56C11(마우스 GREM1에 대해 교차 반응성임) 단독으로 전체 체중에 상당한 영향을 미치지 않으면서 상당한 항종양 활성을 가질 수 있음을 입증하였다. 본원에서 제공되는 인간화된 항-GREM1 항체(예를 들어, Hu14E3, Hu14E3, Hu22F1 및 Hu56C11)는 전체 체중에 상당한 영향 없이 유의적인 항종양 활성을 나타내는 점에서 키메라 대응물과 마찬가지로 인간에서 유사한 기술적 효과를 나타낼 것으로 예상된다.

[0617] **실시예 22: CT26 종양 모델(MSB-Pharm2018004)에 대한 MPDL-3820A 및 항-GREM 1 항체 조합의 효능**

[0618] 항-GREM 1 항체와 면역 체크포인트 억제제의 조합의 항종양 효능을 추가로 시험하기 위해, 우리는 MPDL-3820A 및 대응 항-마우스 GREM 1 항체(항-mGREM 1 항체) 조합의 항-종양 활성을 CT26 종양 모델에서 평가하였다. 간략

하게, 5 내지 6주령의 암컷 Balb/c 마우스에  $5 \times 10^5$ /마우스 CT26 세포를 접종하였다. 동물을 무작위화하였다. 종양 부피가 약 100mm<sup>3</sup>에 도달하면 마우스를 4개 그룹으로 나누어 하기와 같이 처리하였다: 1) 10 mpk에서 대조물 IgG1 단독, 2) 3 mpk에서 MPDL3280A 단독, 3) 10 mpk에서 항-mGREM 1 항체 단독, 또는 4) 3 mpk의 MPDL3280a 및 10 mpk의 항-mGREM 1 항체의 조합, IP에 의해 2주 동안 주 2회. 도 15a 및 도 15b에 나타난 바와 같이, 항-mGREM 1 항체와 면역 체크포인트 억제제(예를 들어, PD-L1에 대한 항체)의 조합은 항-mGREM 1 항체 단독 또는 면역 체크포인트 억제제 단독과 비교하여 상당히 더 높은 항종양 활성(종양 부피 또는 종양 중량의 관점에서)을 초래하였다. 이는 항-mGREM 1 항체가 면역 체크포인트 억제제의 항종양 활성을 강화할 수 있음을 시사한다.

[0619] **실시예 23: 식도암 PDX 모델에서 시스플라틴과 조합된 인간화된 14E3의 효능**

[0620] 인간 그래핀 IHC 특이적으로 양성인 식도 종양 조직(E7)을 NOD/SCID 마우스에서 베이징 암 병원 계대로부터 수득하고 PDX 뱅크를 확립하였다. 항 GREM1 항체(14E3) 또는 항 PD-L1 항체(22C3)를 사용하여 면역조직화학법에 의해 E7 식도 PDX 모델에서 GREM1 발현 및 PD-L1 발현을 테스트하였다. 도 16은 식도암 PDX 모델 E7이 GREM1 발현에서 양성이었지만 PD-L1 발현을 나타내지 않았음을 보여준다.

[0621] 각각의 마우스에 종양을 포함하는 마우스로부터 통합된 종양 박리로부터 전단된 직경 약 3mm의 작은 종양 조직 블록을 피하 접종하였다. 접종 18일 후 종양 크기가 약 70mm<sup>3</sup>인 동물을 선택하여 무작위로 4개의 그룹으로 나누었고 각 그룹은 8마리의 마우스로 구성되었다. 그런 다음 마우스를 동종형 대조물 + PBS, 인간화된 14E3(hzd14E3) 20mg/kg 용량, 시스플라틴 3mg/kg 용량 및 hzd14E3과 시스플라틴의 조합으로 처리하였다. 동종형 대조물과 hzd14E3는 i.p. 주사 및 PBS에 의해 4주 동안 주 2회 투여되었으며, 시스플라틴은 4주 동안 주 1회 i.v. 주사에 의해 투여되었다. 연구 종료 시 동물을 CO<sub>2</sub> 흡입으로 희생시켰다. 종양 크기는 캘리퍼(INSIZE)를 사용하여 일주일에 2회 또는 3회 2차원으로 측정하고 부피는 다음 공식을 사용하여 mm<sup>3</sup>으로 표시하였다:  $V=0.5 a*b^2$  여기서 a와 b는 각각 종양의 장경과 단경이다. Prism GraphPad를 사용하여 결과를 분석하고 평균±S.E.M으로 표시하였다. 두 그룹 간의 비교는 T-test로 이루어졌으며, p가 \* $<0.05$ 이고 \*\* $<0.01$ 이면 차이가 유의적인 것으로 간주된다.

[0622] 도 17a 및 도 17b는 인간화된 14E3 단독이 42.92% TGI를 갖는 동종형 대조물과 비교하여 본 실험에서 사용되었을 때, 상당히 향상된 종양 성장 억제를 보여준다. 인간화된 14E3과 시스플라틴의 조합은 인간화된 14E3 단독(63.97% TGI vs 42.92% TGI) 또는 시스플라틴 단독(63.97% TGI vs 59.79% TGI)과 비교할 때 종양 성장을 추가로 억제했으며, 이는 인간화된 14E3과 시스플라틴의 조합의 식도암에 대한 상승 효과를 시사한다.

[0623] 현재까지, 식도암에 대한 1차 요법은 일반적으로 식도절제술, 화학요법, 표적 요법, 면역요법(예를 들어, PD-1 또는 PD-L1 표적화), 및/또는 이들의 조합을 포함한다. 식도암에 대한 2차 및 후속 요법에는 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 수용체를 표적으로 하는 라무시루맙 또는 HER2를 과발현하는 전이성 선암종에 대한 트라스투주맙과 같은 표적 요법이 포함될 수 있다(종양학의 NCCN 임상 진료 지침. 식도 및 식도위 접합부 암. 국립 종합 암 네트워크. VI. 2020). 상기 기술된 우리의 데이터는 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체가 PD-L1을 발현하지 않는 종양, 예를 들어 PD-L1을 과발현하지 않는 식도암을 효과적으로 치료할 수 있고, 화학요법, 예를 들어 시스플라틴과 병용할 때 추가로 상승 효과를 달성할 수 있음을 보여준다. 이것은 본원에서 제공되는 항-GREM1 항체가 식도암에 대한 1차 요법 또는 2차 요법을 위한 새로운 옵션으로 작용할 수 있음을 시사한다.

[0624] **실시예 24: 식도암 PDX 모델에 대한 hzd14E3(DC101과의 조합) 및 6245P의 효능**

[0625] 인간 그래핀 IHC 특이적으로 양성인 식도 종양 조직(E7)을 NOD/SCID 마우스에서 베이징 암 병원 계대로부터 수득하고 PDX 뱅크를 확립하였다. 각각의 마우스에 종양을 포함하는 마우스로부터 통합된 종양 박리로부터 전단된 직경 약 3mm의 작은 종양 조직 블록을 피하 접종하였다. 접종 18일 후 종양 크기가 약 70mm<sup>3</sup>인 동물을 선택하여 무작위로 4개의 그룹으로 나누었고, 각 그룹은 8마리의 마우스로 구성되었다. 그런 다음 마우스를 동종형 대조물, 20mg/kg 용량의 hzd14E3 및 6245P, 10mg/kg 용량의 DC101 및 hzd14E3과 DC101의 조합으로 처리하였다. DC101은 마우스 VEGFR-2와 반응하는 단클론 항체이며 상업적으로 입수 가능하다(예컨대 BioXell의 카탈로그 #BE0060). 대조물 및 시험 물품을 i.p. 주사에 의해 4주 동안 주 2회 투여하였다. 연구 종료 시 동물을 CO<sub>2</sub> 흡입으로 희생시켰다. 종양 크기는 캘리퍼(INSIZE)를 사용하여 일주일에 2회 또는 3회 2차원으로 측정하고 부피는 다음 공식을 사용하여 mm<sup>3</sup>으로 표시하였다:  $V=0.5 a*b^2$  여기서 a와 b는 각각 종양의 장경과 단경이다. Prism GraphPad를 사용하여 결과를 분석하고 평균±S.E.M으로 표시하였다. 두 그룹 간의 비교는 T-test로 이루어졌으며, p가 \* $<0.05$ 이고 \*\* $<0.01$ 이면 차이가 유의적인 것으로 간주된다. 본원에서 제공되는 다른 인간화된 항-GREM1

항체(예를 들어, Hu22F1 및 Hu56C11)는 유사한 기술적 효과를 나타낼 것으로 예상된다.

[0626] **실시예 25: 포획된 FGFR1에 결합하는 그렘린의 차단에서 항체 활성의 특성화**

[0627] 그렘린-his를 플레이트에 고정된 FGFR1에 대한 결합 능력에 대해 테스트하였다. 간략하게, 플레이트를 2 $\mu$ g/ml의 재조합 인간 FGFR1-Fc(Sino-Biological)로 밤새 코팅한 다음 2 $\mu$ g/ml의 그렘린-his(ACRO)의 2배 연속 희석액을 코팅된 플레이트에 첨가하고 RT(실온)에서 1시간 동안 배양하였다. 그런 다음 플레이트를 세척하고 플레이트에 결합된 그렘린-his를 항-his HRP(GenScript)로 검출하였다. 그런 다음 TMB 용액으로 플레이트를 현상하고 중지 용액을 첨가하여 중지시켰다. 플레이트는 450nm에서 플레이트 판독기에서 판독되었다. 배양 시간은 약 20분이었다. 도 18a에 나타낸 바와 같이, hGREM1은 FGFR1에 결합할 수 있다.

[0628] 다음으로, 차단 활성을 테스트하기 위해 0.25 $\mu$ g/ml의 그렘린을 선택하였다. 인간 FGFR1-Fc에 결합하는 그렘린을 차단하는 항체의 능력을 ELISA를 통해 조사하였다. 플레이트를 재조합 FGFR1-Fc(2 $\mu$ g/ml)로 밤새 코팅한 다음, 이 복합체를 코팅된 플레이트에 첨가하고 추가로 1시간 동안 RT에서 배양하기 전에 항체의 연속 희석액을 0.25  $\mu$ g/ml의 인간 그렘린-his 변형체로 RT에서 1시간 동안 배양하였다. 이어서 플레이트를 세척하고 항-his HRP(GenScript)를 첨가하였다. 그런 다음 TMB 용액으로 플레이트를 현상하고 중지 용액을 첨가하여 중지시켰다. 플레이트는 450nm에서 플레이트 판독기에서 판독되었다. 도 18b 및 18c에 나타낸 바와 같이, 본원에서 제공되는 항-그렘린 1 항체(예를 들어, 42B9, 36F5, 67G11 및 14E3 HaLa, 키메라 항체 69H5(69H5-chi), 키메라 항체 36F5(36F5-chi), 키메라 항체 22F1(22F1 -chi))는 hGREM1과 FGFR1의 결합을 억제하거나 차단할 수 있는 반면, 벤치마크 항체 6245P는 hGREM1과 FGFR1의 결합을 차단하지 않는다. 36F5-chi는 1.368nM의 IC50으로 hGREM1과 FGFR1의 결합을 차단할 수 있다. 69H5-chi 및 22F1-chi는 부분적 차단 활성을 가졌고, 여기서 69H5-chi는 7.138nM의 IC50으로 hGREM1과 FGFR1의 결합을 차단할 수 있고 22F1-chi는 5.117nM의 IC50으로 hGREM1과 FGFR1의 결합을 차단할 수 있다. 본원에서 제공되는 인간화된 항-GREM1 항체(예를 들어, Hu14E3, Hu22F1)는 FGFR1에 대한 hGREM1의 결합을 차단하는 키메라 대응물과 유사한 기술적 효과를 나타낼 것으로 예상된다.

[0629] **실시예 26: ELISA에 의한 포획된 인간 그렘린 및 DAN 단백질에 대한 정제된 하이브리도마 또는 키메라 항-그렘린 항체의 결합 분석**

[0630] 투명 폴리스티렌 플레이트(BEASER)를 4°C에서 밤새 높은 pH 코팅 완충액에서 0.5 $\mu$ g/ml 인간 그렘린(ACRO) 및 DAN(Sinobiological) 100 $\mu$ l/웰로 코팅하였다. 그런 다음 플레이트를 PBS + 0.1% Tween 20(Sigma)을 사용하여 자동 플레이트 세척기에서 한 번 세척하였다. PBS + 1% BSA + 1% 정상 염소 혈청 + 0.5% Tween 20(Sigma)으로 구성된 차단 용액 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 그런 다음 PBS + 1% BSA + 1% 정상 염소 혈청 + 0.01% Tween 20을 포함하는 항체 희석 완충액 중 항체(하이브리도마 또는 키메라 항체 36F5, 키메라 항체 67G11, 키메라 항체 42B9) 100 $\mu$ l를 2 $\mu$ g/ml(13.33nM)에서 출발하여 이어서 4배 연속 희석액으로 플레이트의 각 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 그 후 플레이트를 200 $\mu$ l의 PBS + 0.1% Tween20으로 3회 세척한 다음 100 $\mu$ l/웰 1:10000 염소 항 마우스 IgG-HRP 또는 마우스 항-인간 IgG-HRP (abcam)를 첨가하고, 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 그런 다음 PBS + 0.1% Tween20으로 3회 세척하였다. 마지막으로, TMB(InnoReagents) 100 $\mu$ l/웰을 각 웰에 첨가하고 2분 후에 중지 용액 50 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트는 450nm에서 Multiscan FC 마이크로플레이트 판독기(Thermo Scientific)에서 판독되었다. EC50 값은 또한 하기도 19a, 19b 및 19c에 나타내었다. 그 결과, 하이브리도마 또는 키메라 항체 36F5, 키메라 항체 67G11 및 키메라 항체 42B9는 그렘린과 DAN 단백질의 결합 활성과 유사하였다.

[0631] **실시예 27: 포획된 BMP2/4에 결합하는 DAN 단백질을 차단하는 항체 활성의 특성화**

[0632] 플레이트를 재조합 인간 BMP2/4(0.5 $\mu$ g/ml)로 밤새 코팅하였다. 그런 다음 플레이트를 PBS + 0.1% Tween 20(Sigma)을 사용하여 자동 플레이트 세척기에서 한 번 세척하였다. PBS + 1% BSA + 1% 정상 염소 혈청 + 0.5% Tween 20(Sigma)으로 구성된 차단 용액 100 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 배양하였다. 그런 다음 플레이트를 3회 세척하였다. 그런 다음 PBS + 1% BSA + 1% 정상 염소 혈청 + 0.01% Tween 20을 포함하는 희석 완충액중 키메라 항체 36F5의 55 $\mu$ l 연속 희석액 및 0.5 $\mu$ g/ml 인간 DAN-his 55 $\mu$ l를 개별적으로 혼합하고 100 $\mu$ l의 상기 복합물을 코팅된 플레이트에 첨가하고 실온에서 추가로 1시간 동안 배양하기 전에 RT에서 1시간 동안 배양하였다. 그런 다음 플레이트를 3회 세척하고 희석 완충액중 항-his HRP(GenScript) 100 $\mu$ l를 첨가하였다. 그런 다음 TMB 용액으로 플레이트를 현상하고 중지 용액을 첨가하여 중지시켰다. 세척 완충액으로 3회 세척한 후, 플레이트를 플레이트 판독기에서 450nm에서 판독하였다. 또한, 이전 결과와 일치하게, 36F5는 그렘린 활성을 차단하는 것 외에도, BMP2/4가 DAN 단백질에 결합하는 것을 차단할 수 있다. (도 20a 및 20b).

[0633] 실시예 28: EMT6/hPD-L1 종양 모델에 대한 하이브리도마 36F5의 효능

[0634] 마우스 유방암 세포주 EMT6을 인간 PD-L1 유전자로 형질감염시켰고, 인간 PD-L1을 발현하는 안정한 선별된 유전자는 EMT6/hPD-L1로 명명되었다. EMT6/hPD-L1 세포는 37°C에서 10% 열 불활성화 태아 소 혈청(ExCell Biology), 100 U/ml 페니실린, 100µg/ml 스트렙토마이신(Hyclone)이 보충된 DMEM 배지(Hyclone)에서 단층 배양으로 시험관 내에, 공기 중 5% CO<sub>2</sub>가 있는 대기에서 유지되었다. 종양 세포는 트립신-EDTA 처리(Hyclone)에 의해 매주 2회 일상적으로 계대배양되었다. 기하급수적 성장기에서 성장하는 세포를 하베스트하고 종양 접종을 위해 계수하였다. 암컷 SPF 등급 BABL/c 마우스에 50% 매트릭스-겔과 혼합된 2\*10<sup>6</sup> EMT6/hPD-L1 세포를 접종하였다. 첫 번째 연구에서는, 종양 크기가 약 80mm<sup>3</sup>일 때, 종양이 있는 마우스를 선택하여 2개 그룹(n=10)으로 무작위 배정하였다. 동물을 24.9mg/kg hIgG1 대조물 및 24.9mg/kg AM4B6으로 4주 동안 주 2회 i.p. 주사로 처리하였다. 두 번째 연구에서는, 종양 크기가 약 70mm<sup>3</sup>일 때 종양이 있는 마우스를 선택하여 2개 그룹(n=8)으로 무작위 배정하였다. 동물을 10mg/kg hIgG1 대조물 및 10mg/kg 36F5로 3주 동안 매주 2회 i.p. 주사로 처리하였다. 종양 크기는 캘리퍼(INSIZE)를 사용하여 일주일에 2회 2차원으로 측정하고 부피는 V=0.5 a\*b<sup>2</sup> 공식을 사용하여 mm<sup>3</sup>으로 표시하였으며, 여기서 a와 b는 각각 종양의 장경과 단경이다. Prism GraphPad를 사용하여 결과를 분석하고 평균±S.E.M.으로 표시하였다. 두 그룹 간의 비교는 T-test로 이루어졌으며, p가 <0.05이고 <0.01이면 차이가 유의적인 것으로 간주된다. 표 7 및 도 21a는 첫 번째 연구의 결과이다. 상기 결과는 항-PD-L1 항체(AM4B6)가 EMT6/hPD-L1 종양 모델에서 항종양 활성을 갖지 않음을 보여준다. EMT6/hPD-L1 종양 모델은 PD-L1 항체에 대해 불량한 반응을 나타낸다. 표 8 및 도 21b는 두 번째 연구의 결과이다. 결과는 항-그렙린1 항체(36F5)가 PD-L1 항체에 대해 불량한 반응을 나타내는 EMT6/hPD-L1 종양 모델에서 유망한 항종양 활성을 가짐을 보여준다.

[0635] [표 7]

[0636] 표 7: 29일차에 EMT6/hPD-L1 종양 모델에 대한 AM4B6의 효능

처리 (n=10)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> , 평균 ±S.E.M.)	TGI (%)	p 값 vs 동종형 대조물
동종형 대조물	1445.07±208.18	/	/
AM4B6	1016.29±214.42	29.67	0.1685

[0637]

[0638] [표 8]

[0639] 표 8: 24일차 EMT6/hPD-L1 종양 모델에 대한 36F6의 효능

처리 (n=8)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> , 평균±S.E.M.)	TGI (%)	p 값 vs 동종형 대조물
동종형 대조물	1060.76±141.45	/	/
36F5	599.72±208.49	43.46	0.0886

[0640]

[0641] 실시예 29: PBMC 인간화된 마우스에서 E7 종양 모델에 대한 하이브리도마 14E3, 하이브리도마 36F5 또는 니블루탐의 효능

[0642] E7은 NOD-SCID 마우스 및 확립된 PDX बैं크에서 베이징 암 병원 계대로부터 얻은 인간 그렙린 고발현을 갖는 식도암 PDX이다. NOG 마우스는 Vital River에서 구입한 중증 면역결핍증이었다. 각각의 마우스에 종양을 포함하는 마우스로부터 통합된 종양 박리로부터 진단한 직경 약 3mm의 작은 종양 조직 블록을 피하 접종하였다. 접종 27일 후, 종양 크기가 약 50mm<sup>3</sup>인 동물을 선택하여 5\*10<sup>6</sup>/마우스 인간 PBMC를 정맥 주사하였다. 일주일 후, 동물을 재작제 프로파일에 대해 선별하고 무작위로 6개의 그룹으로 나누었는데, 각 그룹은 8마리의 마우스로 구성되

었다. 동물을 30mg/kg 동종형 대조물, 30mg/kg 14E3, 30mg/kg 36F5, 10mg/kg 니볼루맵으로 5주 동안 일주일에 2회 i.p. 주사로 처리하였다. 종양 크기는 캘리퍼(INSIZE)를 사용하여 일주일에 2회 2차원으로 측정하고 부피는  $V=0.5 a*b^2$  공식을 사용하여  $mm^3$ 으로 표시하였으며, 여기서 a와 b는 각각 종양의 장경과 단경이다. Prism GraphPad를 사용하여 결과를 분석하고 평균±S.E.M으로 표시하였다. 두 그룹 간의 비교는 T-test로 이루어졌으며, p가  $*<0.05$ 이고  $**<0.01$ 이면 차이가 유의적인 것으로 간주된다. 표 9, 도 22a 및 도 22b는 연구 결과이다. 결과는 항-PD-1 항체(니볼루맵)가 E7 종양 모델에서 항종양 활성을 갖지 않음을 보여준다. 항-그렙린1 항체 36F5 및 14E3은 PD-1 항체에 대해 불량한 반응을 나타내는 E7 종양 모델에서 유망한 항종양 활성을 갖는다.

[0643] [표 9]

[0644] 표 9: 35일째에 PBMC 인간화된 마우스에서 E7 종양 모델에 대한 니볼루맵과 비교한 14E3 또는 36F5의 효능

처리 (n=8)	종양 크기 ( $mm^3$ , 평균±S.E.M.)	TGI (%)	p 값 vs 동종형 대조물
30mg/kg 동종형 대조물	527.84±129.07	/	/
30mg/kg 14E3	279.96±92.85	46.96	0.1606
30mg/kg 36F5	264.61±63.69	49.87	0.0888
10mg/kg 니볼루맵	440.71±84.33	51	0.5809

[0645]

[0646] 실시예 30: MC38/hPD-L1 종양 모델에서 항-PDL1 항체와 56C11 병용 요법의 효능

[0647] 마우스 결장암 세포주 MC38을 인간 PD-L1 유전자로 형질감염시키고 인간 PD-L1을 안정적으로 발현하는 선별된 유전자는 MC38/hPD-L1로 명명하였다. MC38/hPD-L1 세포는 37°C에서 10% 열 불활성화 태아 소 혈청(ExCell Biology), 100 U/ml 페니실린, 100µg/ml 스트렙토마이신(Hyclone)이 보충된 1640 배지(Hyclone)에서 단층 배양으로 시험관 내에, 공기 중 5% CO<sub>2</sub>가 있는 대기에서 유지되었다. 종양 세포는 트립신-EDTA 처리(Hyclone)에 의해 매주 2회 일상적으로 계대배양되었다. 기하급수적 성장기에서 성장하는 세포를 하베스트하고 종양 접종을 위해 계수하였다. 암컷 SPF 등급 C57BL/6 마우스에 50% 매트릭스-젤과 혼합된  $2*10^6$  EMT6/hPD-L1 세포를 접종하였다. 종양 크기가 약 120mm<sup>3</sup>일 때 종양이 있는 마우스를 선택하여 무작위로 4개 그룹(n=8)으로 나누었다. 동물을 3mg/kg hIgG1 대조물, 20mg/kg 56C11, 3mg/kg 23F11(항-PDL1 항체) 및 20mg/kg 56C11과 3mg/kg 23F11의 조합으로 3주 동안 주 2회 i.p. 주사로 처리하였다. 종양 크기는 캘리퍼(INSIZE)를 사용하여 일주일에 2회 2차원으로 측정하고 부피는  $V=0.5 a*b^2$  공식을 사용하여  $mm^3$ 으로 표시하였으며, 여기서 a와 b는 각각 종양의 장경과 단경이다. Prism GraphPad를 사용하여 결과를 분석하고 평균±S.E.M으로 표시하였다. 두 그룹 간의 비교는 T-test로 이루어졌으며, p가  $*<0.05$ 이고  $**<0.01$ 이면 차이가 유의적인 것으로 간주된다. 56C11과 항-PDL1 항체의 조합은 MC38/hPD-L1 종양 모델에서 항종양 활성을 강화한다(표 10 및 도 23)

[0648] [표 10]

[0649] 표 10: 22일째에 MC38/hPD-L1 종양 모델에 대한 56C11 조합의 효능

처리 (n=8)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> , 평균±S.E.M.)	TGI (%)	p 값 vs 동종형 대조물
hlgG1 대조물	849.22±109.77	/	/
56C11	521.52±69.89	38.59	0.0246
항-PDL1 항체	522.04±74.92	38.53	0.0274
56C11+ 항-PDL1 항체	378.94±87.31	55.38	0.0047

[0650]

[0651] [표 10]

[0652] 표 10. 본 출원에서 언급되거나 사용된 서열

서열 번호	서열	주석
1	TYGMA	14E3/Hu 14E3-Ha/ Hu14E3-Hb/ Hu14E3-Hc HCDR 1
2	WINTLSGEPYADDFKG	14E3/Hu 14E3-Ha/ Hu14E3-Hb/ Hu14E3-Hc HCDR 2
3	EPMDY	14E3/Hu 14E3-Ha/ Hu14E3-Hb/ Hu 14E3-Hc HCDR 3
4	KSSQSLLDSDGKTYLS	14E3/Hu14E3-La/ Hu14E3-Lb LCDR 1
5	LVSKLDS	14E3/Hu14E3-La/ Hu 14E3-Lb LCDR 2
6	WQGAHFPLT	14E3/Hu 14E3-La/

[0653]

		Hu14E3-Lb LCDR3
7	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKTSGSTFTTY GMAWMKQAPGKGLTWMGWINTLSGEPTY ADDFKGRFAFSLKTSANTAYLQINNLKNE AATYFCAREPMDYWGQGSVIVSS	14E3 VH
8	DVVMQTPLTSLITIGQPASISCKSSQSLDS DGKTYLSWLLQRPDQSPKRLISLVSKLDSGV PDRITGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGHYYCW QGAHFPLTFGAGTKLELK	14E3 VL
9	CAGATCCAGTTGGTACAGTCTGGACCTGA ACTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGA TCTCCTGCAAGACTTCTGGATCTACGTTCA CAACCTATGGAATGGCCTGGATGAAGCAG GCTCCAGGAAAGGGTTAACGTGGATGGG CTGGATAAACACCCTCTCTGGAGAGCCAA CATATGCTGATGACTTCAAGGGACGGTTT GCCTTCTCTTTGAAAACCTCTGCCAACACT GCCTATTTGAGATCAACAACCTCAAAAA TGAGACGCGGCTACATATTTCTGTGCAC GAGAACCAATGGACTACTGGGGTCAAGGA ACCTCAGTCATCGTCTCTCTCA	14E3 VHnu
10	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACT TTGTCGATTACCATTTGGACAACCAGCCTCC ATCTCTTGCAAATCAAGTCAGAGCCTCTTA GATAGTGATGGAAAGACATATTTGAGTTG GTTGTTACAGAGGCCAGACCAGTCTCCAA AGCGCCTAATCTCTCTGGTGTCCAAACTGG ACTCTGGAGTCCCTGACAGGATCACTGGC AGTGGATCAGGGACAGATTCACACTGAA AATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATTGG GCATCTATTATTGCTGGCAAGGTGCACATT TTCCGCTCACGTTCCGGTCTGGGACCAAGC TGGAGCTGAAA	14E3 VLnu
11	DYYMN	22F1/Hu22F1-Ha/ Hu22F1-Hb/ Hu22F1-Hc/Hu22F1 -Hd HCDR1
12	DINPKDGDSGYSHKFKG	22F1/Hu22F1-Ha/ Hu22F1-Hb/ Hu22F1-Hc/Hu22F1 -Hd HCDR2
13	GFTTVVARGDY	22F1/Hu22F1-Ha/ Hu22F1-Hb/ Hu22F1-Hc/Hu22F1

[0654]

		-Hd HCDR3
14	KSSQSLLDSDGKTYLN	22F1/Hu22F1-La/ Hu22F1-Lb LCDR1
15	LVSKLDS	22F1/Hu22F1-La/ Hu22F1-Lb LCDR2
16	WQGFHPYT	22F1/Hu22F1-La/ Hu22F1-Lb LCDR3
17	EAQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTD YYMNWLKQSHGKSLEWIGDINPKDGDGSGYS HKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSA VYYCASGFTTVVARGDYWGQGTTLTVSS	22F1 VH
18	DVVMVTQPTLTVTIGQPASISCKSSQSLDSD DGKTYLNWLLQRPQSPKRLIYLVSKLDSGF PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCW QGTFHPYTFGGGKLEIK	22F1 VL
19	GAGGCCAGCTGCAACAATCTGGACCTGA ACTGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAGA TATCCTGTAAGGCTTCTGGATACTCGTTCA CTGACTACTACATGAACTGGCTGAAGCAG AGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGG AGATATTAATCCTAAAGATGGTGATAGTG GTTACAGCCATAAGTTCAAGGGCAAGGCC ACATTGACTGTAGACAAGTCTCCAGCAC AGCCTACATGGAGCTCCGAGCCTGACAT CTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAA GCGGATTTACCACGGTAGTAGCTAGGGGG GACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAC AGTCTCTCA	22F1 VHnu
20	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACT TTGTCGGTTACCATTTGGACAACCAGCCTCC ATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTA GATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTG GTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCAA AGCGCCTAATCTATTTGGTGTCTAAACTGG ACTCTGGATTCCCTGACAGGTTCACTGGCA GTGGATCAGGGACAGATTTCACTGAAA ATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGG AGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTT TCCGTACACGTTTCGAGGGGGGACCAAGC TGAAATAAAA	22F1 VLnu
21	DDYMH	69H5 HCDR1
22	WIDPENGDEYASKFQG	69H5 HCDR2
23	WATVPDFDY	69H5 HCDR3
24	KSSQSLLNRSNQKNYLA	69H5 LCDR1

[0655]

25	FTSTRES	69H5 LCDR2
26	QQHYSTPFT	69H5 LCDR3
27	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCTASGFNIKD DYMHWVKRRPEQGLEWIGWIDPENGDEY ASKFQGKATITADTSNTAYLQSSLTSEDY AVYYCTTWTATVPDFDYWGQGTLTVSS	69H5 VH
28	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSL NRSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVHFTSTR ESGVPRDFIGSGGTDFTLTISNLAEDLADY FCQQHYSTPFTFGSGTKLEIK	69H5 VL
29	GAGGTGCAGCTGCAACAGTCCGGCGCTGA ACTGGTGAGGCTGGAGCCTCCGTGAAGC TGTCCTGCACCGCCAGCGGCTCAACATCA AGGACGACTACATGCACTGGGTGAAGAGG AGGCCTGAGCAGGCCTGGAGTGGATCGG CTGGATCGACCCCGAGAACGGCGACACCG AGTACGCCTCCAAGTTCAGGGCAAGGCC ACCATCACCGCCGACACCTCCTCCAACAC CGCCTACCTGCAGCTGAGCTCCCTGACCTC CGAGGACACCGCCGTACTATTGCACCA CCTGGGCCACCGTCCCGACTTCGACTACT GGGGACAGGGCACCACCCTGACCGTGTCC AGC	69H5 VHnu
30	GATATCGTGATGACCCAGTCTCCTTCTCT CTGGCTATGTCAGTGGGACAGAAAGTGAC CATGTCTTGCAAGTCTCTCAGTCTCTGCT GAACAGGTCCAACCAGAAGAACTACCTGG CTTGGTACCAGCAGAAACCAGGACAGTCT CCTAAGCTGCTGGTGCATTTTACCTTACC AGGGAATCCGGAGTGCCAGATAGATTTAT CGGCTCTGGCTCCGGCACAGATTTTACACT GACCATCTCCAATCTGCAGGCAGAAGATC TGGCTGACTACTTTTGGCCAGCAGCACTACT CCACCCCTTTTACCTTTGGCTCCGGCACCA AGCTGGAGATCAAG	69H5 VLnu
31	DFYMN	56C11 HCDR1
32	DINPNNGGTSYNQKFKG	56C11 HCDR2
33	DPIYYDYDEVAY	56C11 HCDR3
34	RSSQSLVHSNGNTYLH	56C11 LCDR1
35	KVSNRFS	56C11/36F5/42B9/6 7G11 LCDR2
36	SQSTHVPLT	56C11 LCDR3
37	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTD FYMNWVKQSHGKSLWIGDINPNNGGTSYN	56C11 VH

[0656]

	QKFKGKATLTVDKSSSTAYMELRSLTSEDSA VYYCARDPIYYDYDEVAYWGOGLVTVSA	
38	DVVMVTQTPLSLPLVSLGDQASISCRSSQSLVH SNGNTYLHWYLYQKPGQSPKLLIYKVSNRFS GVPDFRFSGSGSDFTLKISRVEAEDLGVYF CSQSTHVPLTFGAGTKLELK	56C11 VL
	GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCCGGCCCTGA GCTGGTGAAGCCTGGAGCCTCCGTGAAGA TCTCCTGTAAAGCCTCCGGCTACACCTTCA CCGACTTCTACATGAACTGGGTGAAGCAG TCCCACGGCAAGTCCCTGGAGTGGATCGG CGACATCAATCCCAACAACGGCGGCACCT CCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCC ACCCTGACAGTGGACAAGTCTCCAGCAC CGCCTACATGGAGCTGAGGTCCCTGACCT CCGAGGACTCCGCCGTGTACTACTGCGCC AGGGACCCATCTACTACGACTACGACGA GGTGGCCTACTGGGCCAGGGAACCCTGG TGACAGTGTCCGCC	56C11 VHnu
39		
	GATGTGGTGATGACACAGACACCTCTGTC TCTGCCAGTGTCTCTCGGAGATCAGGCTTC TATCTCTTGAGATCCTCTCAGTCTCTGGT GCATTCCAACGGAAACACCTACCTGCATT GGTACTGCAGAAACCAGGACAGTCTCCT AAGCTGTGATCTACAAGGTGTCCAACAG GTTCTCCGGAGTGCCAGATAGATTTTCCGG ATCTGGATCTGGCACCGATTTTACCCTGAA GATCTCTAGAGTGGAAAGCAGAGGATCTGG GAGTGTACTTTGTAGCCAGTCTACCCAG TGCTCTGACATTTGGAGCAGGAACAAAG CTGGAGCTGAAG	56C11 VLnu
40		
41	QVQLVQSGSELKPGASVKVSKASGYTFT TYGMAWMRQAPGQGLEWMGWINTLSGEP TYADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISLKA DTAVYYCAREPMDYWGQGMVTVSS	Hu14E3-Ha VH
	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCTCCGA GCTGAAGAAGCCTGGCGCCTCCGTGAAGG TGTCTGCAAGGCCTCCGGCTACACCTTCA CCACCTACGGCATGGCCTGGATGAGGCAG GCTCCTGGCCAGGACTGGAGTGGATGGG CTGGATCAACACCCTGTCCGGCGAACCA CCTACGCCGACGACTTCAAGGGCAGGTTC GTGTCTCCCTGGACACCAGCGTGTCCACC GCCTACCTGCAGATCTCCTCCCTGAAGGCC	Hu14E3-Ha VHnu
42		

[0657]

	GAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCAG GGAGCCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCA CCATGGTGACCGTGTCTCC	
43	QIQLVQSGSELKPGASVKVSKASGYFTTT YGMAMRQAPGQGLEWGMWINTLSGEPT YADDFKGRFAFLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCAREPMDYWGQGMVTVSS	Hu14E3-Hb VH
44	CAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGA GCTGAAGAAGCCCGCGCTAGCGTGAAGG TGTCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTC ACCACCTACGGCATGGCCTGGATGAGGCA GGCTCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATGG GCTGGATCAACACCTGTCCGGCGAGCCT ACCTACGCCGACGACTTCAAGGGCAGGTT CGCCTTCTCCCTGGACACCTCCGTGAGCAC CGCCTACCTGCAGATCTCCAGCCTGAAGG CCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCC AGGGAGCCTATGGACTACTGGGGCCAGGG CACCATGGTGACCGTGTCCAGC	Hu14E3-Hb VHnu
45	QIQLVQSGSELKPGASVKVSKASGSTFTTT YGMAMMKQAPGQGLTWGMWINTLSGEPT YADDFKGRFAFLDTSVSTAYLQISSLKAED TAVYYCAREPMDYWGQGMVTVSS	Hu14E3-Hc VH
46	CAGATCCAGCTGGTGCAGTCCGGCAGCGA GCTCAAGAAGCCCGAGCCAGCGTGAAGG TGTCTGCAAGGCCAGCGGCTCCACCTTCA CCACATACGGCATGGCCTGGATGAAGCAG GCTCCTGGCCAGGGCCTGACCTGGATGGG ATGGATCAACACCTGTCCGGCGAGCCTA CCTACGCCGATGACTTCAAGGGCAGGTTC GCCTTCTCCCTGGACACCTCCGTGTCCACC GCTTACCTGCAGATCTCTCCCTGAAGGCC GAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCAG GGAGCCCATGGACTACTGGGGCCAGGGCA CCATGGTGACCGTGTCTCC	Hu14E3-Hc VHnu
47	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLDLS DGKTYLSWLQRRPGQSPRRRIYLVSKLDSG VPDRFSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC WQGAHFPLTFGQGTKLEIK	Hu14E3-La VL
48	GATGTGGTGATGACACAGTCTCTCTGTCT CTGCCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTC TATCTTTGCAAGTCTCTCAGTCTCTGCT GGATTCCGACGGAAAGACCTATCTGTCTT GGCTGCAGCAGAGACCAGGACAGTCTCT	Hu14E3-La VLnu

[0658]

	AGAAGACTGATCTACCTGGTGTCCAAGCT GGATTCTGGAGTGCCAGATAGATTTCCG GCTCCGGCTCTGGCACAGATTTACCCTGA AGATCTCTAGAGTGGAGGCAGAAGACGTG GGAGTGTACTATTGTTGGCAGGGAGCTCA CTTCCCTCTGACATTTGGACAGGGAACAA AGCTGGAGATCAAG	
49	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQLLDS DGKTYLSWLQQRPGQSPRRLISLVSKLDSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCW QGAHFPLTFGQGTKLEIK	Hu14E3-Lb VL
50	GATGTGGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCT CTGCCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTC TATCTCTTGAAGTCCCTCTCAGTCTCTGCT GGATTCCGACGGAAGACCTATCTGTCTT GGCTGCAGCAGAGACCAGGACAGTCTCCT AGAAGACTGATCTCCCTGGTGTCTAAGCT GGATTCCGGAGTGCCAGATAGATTTCCG GATCTGGATCTGGCACCGATTTACCCTGA AGATCTCTAGAGTGGAGGCAGAAGACGTG GGAGTGTACTATTGTTGGCAGGGAGCTCA CTTCCCTCTGACATTTGGACAGGGAACAA AGCTGGAGATCAAG	Hu14E3-Lb VLnu
51	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT DYVMNWRQAPGGGLEWMDINPKDGDS GYSHKFKGRVTMTRDTSTVYMESSLRS EDTAVYYCASGFTTVVARGDYWGQTTVT VSS	Hu22F1-Ha VH
52	CAAGTTCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGA GGTGAAGAAGCCCGGCGCTTCCGTGAAGG TGCTTTGTAAGGCCTCCGGCTACTCCTTCA CCGATTACTACATGAACTGGGTGAGGCAA GCTCCCGGTCAAGTCTGGAGTGGATGGG CGACATCAACCCCAAGGACGGCGACTCCG GCTATTCCACAAGTTC AAGGGTCGTGTG ACCATGACCAGGGACACGTCCACCAGCAC CGTGTACATGGAGCTGTCCTTTAAGGTC CGAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCA GCGGATTACCACCGTGGTGGCTAGGGGC GACTATTGGGGCCAAGGTACCACCGTGAC AGTGTCACG	Hu22F1-Ha VHnu
53	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFT DYVMNWRQAPGGGLEWMDINPKDGDS GYSHKFKGRVTMTVDKSTSTVYMESSLRS	Hu22F1-Hb VH

[0659]

	EDTAVYYCASGFTTVVARGDYWGQTTVT VSS	
54	CAAGTTCAGCTGGTGCAGTCCGGAGCCGA GGTGAAGAAGCCCGCGCTCCGTGAAGG TGTCTTGTAAAGGCTCCGGCTACTCCTCA CCGATTACTACATGAACTGGGTGAGGCAA GCTCCCGTCAAGGTCTGGAGTGGATGGG CGACATCAACCCCAAGGACGGCGACTCCG GCTATTCACACAAGTTCAAGGGTCGTGTG ACCATGACCGTGGACAAGTCCACCAGCAC CGTGTACATGGAGCTGTCTCTTTAAGGTC CGAGGACACCGCGTGTACTACTGCGCCA GCGGATTACACCGTGGTGGCTAGGGGGC GACTATTGGGGCCAAGGTACCACCGTGAC AGTGTCAGC	Hu22F1-Hb VHnu
55	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFT DYVMNWVRQAPQGLEWMDINPKDGDS GSHKFKGRVTLTVDKSTSTVYELRSLRS EDTAVYYCASGFTTVVARGDYWGQTTVT VSS	Hu22F1-Hc VH
56	CAAGCTCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCTGA GGTGAAAAGCCCGCGCCAGCGTGAAGG TGTCTTGTAAAGGCTCCGGCTACTCCTCA CCGACTACTACATGAACTGGGTGAGGCAA GCTCCCGTCAAGGTCTGGAGTGGATGGG CGACATCAACCCCAAGGACGGCGACAGCG GCTACTCCACAAGTTCAAGGGTCGTGTG ACTTAAACCGTGGACAAGTCCACCTCCACC GTCTACATGGAGCTGAGGTCTTTAAGGTCC GAGGATACCGCGTGTACTACTGCGTAG CGGCTTACCACCGTGGTGGCTCGTGGCG ATTACTGGGACAAGGTACCACCGTGACC GTGTCCTCC	Hu22F1-Hc VHnu
57	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFT DYVMNWLVRQAPQGLEWIDINPKDGDSG YSHKFKGRATLTVDKSTSTVYELRSLRSE DTAVYYCASGFTTVVARGDYWGQTTVT VSS	Hu22F1-Hd VH
58	CAAGCTCAACTGGTGCAGTCCGGCGCCGA GGTGAAAAGCCCGTGCCTCCGTGAAGG TGAGCTGCAAGGCTCCGGCTACTCCTTTA CCGACTACTACATGAACTGGCTGAGGCAA GCTCCCGTCAAGGTCTGGAGTGGATCGG CGATATCAACCCCAAGGACGGCGACTCCG	Hu22F1-Hd VHnu

[0660]

	GCTACAGCCATAAGTTCAAGGGTGTGCC ACTTTAACCCTGGACAAGTCCACCAGCAC CGTGTACATGGAGCTGAGGTCTTTAAGGT CCGAGGACACCCCGTGTACTACTGCGCC TCCGGCTTACCACAGTGGTGGCTCGTGGC GACTATTGGGGCCAAGGTACCACCGTGAC CGTGAGCTCC	
59	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQLLDS DGKTYLNWLQRRPGQSPRRLIYLVSKLDSG VPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYC WQGTFFPYTFGGGTKVEIK	Hu22F 1-La VL
60	GATGTGGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCT CTGCCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTC TATCTCTTGCAAGTCTCTCAGTCTCTGCT GGATTCCGACGGAAAAGACCTACCTGAATT GGCTGCAGCAGAGACCAGGACAGTCTCCT AGAAGACTGATCTACCTGGTGTCCAAGCT GGATTCTGGAGTGCCAGATAGATTTCCG GCTCCGGCTCTGGCACAGATTTACCCTGA AGATCTCTAGAGTGGAGGCAGAAGACGTG GGAGTGTACTATTGTTGGCAGGGAACCCA CTCCCTTACACATTTGGAGGAGGCACAA AGGTGGAGATCAAG	Hu22F 1-La VLnu
61	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQLLDS DGKTYLNWLQRRPGQSPRRLIYLVSKLDSG FPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYC WQGTFFPYTFGGGTKVEIK	Hu22F 1-Lb VL
62	GATGTGGTGATGACACAGTCTCCTCTGTCT CTGCCAGTGACACTGGGACAGCCAGCTTC TATCTCTTGCAAGTCTCTCAGTCTCTGCT GGATTCCGACGGAAAAGACCTACCTGAATT GGCTGCAGCAGAGACCAGGACAGTCTCCT AGAAGACTGATCTACCTGGTGTCCAAGCT GGATTCTGGATTCCCAGATAGATTTCCGG CTCCGGCTCTGGCACAGATTTACCCTGAA GATCTCTAGAGTGGAGGCAGAAGACGTGG GAGTGTACTATTGTTGGCAGGGAACCCAC TTCCCTTACACATTTGGAGGAGGCACAAA GGTGGAGATCAAG	Hu22F 1-Lb VLnu
63	NSFYIPRHIRKEEGSPQSCSF	BMP-결함루프
64	FSYSVPNTFFQSTESLVHCDS	DAN의63-83아미 노산
65	MGWSCILFLVATGVHS	신호 펩타이드
66	MSRTAYTVGALLLLGLLPAABGKKGKGSQ	인간 그렐린

[0661]

	GAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQGSRNRGRG QGRGTAMPGEEVLESSQEALHYTERKYLKR DWCKTQPLKQTIHEEGNSRTIINRFYGYQC NSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTMMV TLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL	(hGREM1)
67	MNRTAYTVGALLLLGTLPTAEGKKGSQ GAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQGSRNRGRG QGRGTAMPGEEVLESSQEALHYTERKYLKR DWCKTQPLKQTIHEEGNSRTIINRFYGYQC NSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTMMV TLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL	마우스 그렐린I (mGREM1)
68	MSRTAYTVGALLLLGTLPTAEGKKGSQ GAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQGSRNRGRG QGRGTAMPGEEVLESSQEALHYTERKYLKR DWCKTQPLKQTIHEEGNSRTIINRFYGYQC FSYVNPFPQSTESLVHCDSCPKKFTMM VTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL	키메라 hGREM1
69	KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQGS RNRGRGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHYTE RKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGNSRTIINR FCYGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKK FTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRC ISIDL	신호 펩타이드가 없는 인간 그렐 린1 서열
70	KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQGS RTRGRGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHYTE RKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGNSRTIINR FCYGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKK FTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRC ISIDL	신호 펩타이드가 없는 마우스 그렐 린1 서열
71	MSRTAYTVGALLLLGTLPTAEG	인간 그렐린1 신호 펩 타이드
72	MNRTAYTVGALLLLGTLPTAEG	마우스 그렐린1 신호 펩타이드
73	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFT	Hu22F 1-Ha/Hb FR1
74	WVRQAPGGLEWVG	Hu22F 1-Ha/Hb/Hc FR2 Hu56C1 I-HO/Ha FR2
75	RVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDVAVYC AS	Hu22F 1-Ha FR3
76	WGQGTIVTVSS	Hu22F 1-Ha/Hb/Hc1 HdFR4
77	QAQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFT	Hu22F 1-Hc/Hd FR1
78	RVTMTVDKSTSTVYMESSLRSEDVAVYC	Hu22F 1-Hb FR3

[0662]

	AS	
79	RVTLTVDKSTSTVYMELRSLRSEDVAVYYC AS	Hu22F1-Hc FR3
80	WLRQAPGQGLEWIG	Hu22F1-Hd FR2
81	RATLTVDKSTSTVYMELRSLRSEDVAVYYC AS	Hu22F1-Hd FR3
82	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT	Hu14E3-Ha FR1
83	WMRQAPGQGLEWMG	Hu14E3-Ha/Hb FR2
84	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA R	Hu14E3-Ha FR3 Hu14E3-Ha/Hb/Hc FR4
85	WGQGMVTVSS	Hu14E3-Hb/Hc FR3
86	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT	Hu14E3-Hc FR1
87	RFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA R	Hu14E3-Hc FR2
88	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGSTFT	Hu56C11-H0/Ha/Hb /Hc FR1
89	WMKQAPGQGLTWMG	Hu56C11-H0 FR3
90	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFT RVMTMRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYC AR	Hu56C11-H0/Ha/Hb /Hc FR4
91	WGQGLVTVSS	Hu56C11-Ha FR3
92	RVTLTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYC AR	Hu56C11-Hb/Hc FR3
93	RVTLTVDKSISTAYMELSRLSDDTAVYYC AR	Hu56C11-Hb FR2
94	WVRQAPGQGLEWIG	Hu56C11-Hc FR2
95	WVKQAPGKGLEWIG	Hu22F1/Hu14E3/Hu 56C11 HFR1
96	QX <sub>1</sub> QLVQSGX <sub>2</sub> EX <sub>3</sub> KKPGASVKVSKASGX <sub>4</sub> X <sub>5</sub> FT	Hu22F1/Hu14E3/Hu 56C11 HFR2
97	WX <sub>6</sub> X <sub>7</sub> QAPGX <sub>8</sub> GLX <sub>9</sub> WX <sub>10</sub> G	Hu22F1 HFR3
98	RX <sub>11</sub> TX <sub>12</sub> TX <sub>13</sub> DX <sub>14</sub> STSTVYMELX <sub>15</sub> SLRSEDVAVYYCAS	Hu22F1/Hu14E3/Hu 56C11 HFR4
99	WGQGT <sub>X<sub>20</sub></sub> VTVSS	Hu22F1-La/Lb FR1 Hu14E3-La/Lb FR1 Hu56C11-L0/La/Lb FR1
100	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISC	Hu22F1-La/Lb FR2 Hu14E3-La FR2
101	WLQQRPGQSPRRLIY	
102		

[0663]

103	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY C	Hu22F1-La FR3 Hu14E3-La/Lb FR3 Hu56C11-L0/La/Lb FR3
104	FGGGTKVEIK	Hu22F1-La/Lb FR4
105	GFPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY C	Hu22F1- Lb FR3
106	FGQGTKLEIK	Hu14E3-La/Lb FR4 Hu56C11-L0/La/Lb FR4
107	WLQQRPGQSPRRLIS	Hu14E3-Lb FR2
108	WFQQRPGQSPRRLIY	Hu56C11-L0 FR2
109	WFQQRPGQSPRLLIY	Hu56C11-La FR2
110	WYQQRPGQSPRLLIY	Hu56C11-Lb FR2
111	WX <sub>21</sub> QQRPGQSPRX <sub>22</sub> LIX <sub>23</sub>	Hu22F1/Hu14E3/Hu 56C11-LFR2
112	GX <sub>24</sub> PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YC	Hu22F1/Hu14E3/Hu 56C11-LFR3
113	FGX <sub>25</sub> GTKX <sub>26</sub> EIK	Hu22F1/Hu14E3/Hu 56C11-LFR4
114	SSGIG	36F5 HCDR1
115	EIYPRSGNTYNNEKFKG	36F5/42B9/67G11 HCDR2
116	EAYSHHYAMDY	36F5 HCDR3
117	RSSQSLHNSNGNTYLE	36F5 LCDR1
118	FGSHVPFT	36F5/42B9/67G11 LCDR3
119	SYGIG	42B9/67G11 HCDR1
120	EGYSNNYYAMDY	42B9/67G11 HCDR3
121	ISSQSLVHSNGNTYLE	42B9 LCDR1
122	RSSQSLVHSNGNTYLE	67G11 LCDR1
123	SX <sub>32</sub> GIG	36F5/42B9/67G11 HCDR1
124	EX <sub>27</sub> YSX <sub>28</sub> X <sub>29</sub> YYAMDY	36F5/42B9/67G11 HCDR3
125	X <sub>30</sub> SSQSLX <sub>31</sub> HSNGNTYLE	36F5/42B9/67G11 LCDR1
126	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYFTSSGI GWVVKQRSGGLEWIGEIYPRSGNTYNNEKFKGK ATLTADKSSSTVYMELRSLTSEDSAVYFCVREAY SHHYAMDYWGQGTSTVTVFS	36F5 VH

[0664]

127	DVLMQTPLSLPVSLGGQASISCRSSQSLHNSG NTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFGVDPRLS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLVVYCFQGSHPVFT FGSGTKLEIK	36F5 VL
128	QVQLVQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYG IGWVKQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYNNKFKG KATLTADKSSRTVYMELRSLISEDSAVYFCAREG YSNNYAMDYWGQGSVTVFS	42B9/67G11 VH
129	DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNG TYLEWYLQKPGKLSPKLLIYKVSNRFGVDPRLSG SFGSGTDFTLRISRVEAEDLVVYCFQGSHPVFTF GSGTKLEIK	42B9 VL
130	DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNG NTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFGVDPRLS GSGSGTDFTLKISRVEAEDLVVYCFQGSHPVFT FGSGTKLEIK	67G11 VL
131	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFY MNWVRQAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNQKF KGRVTMTRDTSISTAYMELSRSLRSDDTAVYYCAR DPIYYDYDEVAYWGQGLTVTVSS	Hu56C11-H0 VH
132	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFY MNWVRQAPGQGLEWMGDINPNNGGTSYNQKF KGRVTMTVDKISISTAYMELSRSLRSDDTAVYYCA RDPYYDYDEVAYWGQGLTVTVSS	Hu56C11-Ha VH
133	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFY MNWVRQAPGQGLEWIGDINPNNGGTSYNQKFK GRVTLTVDKSISTAYMELSRSLRSDDTAVYYCARD PIYYDYDEVAYWGQGLTVTVSS	Hu56C11-Hb VH
134	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDFY MNWVKQAPGKGLEWIGDINPNNGGTSYNQKFK GRVTLTVDKSISTAYMELSRSLRSDDTAVYYCARD PIYYDYDEVAYWGQGLTVTVSS	Hu56C11-Hc VH
135	DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNG NTYLHWFQQRPGQSPRLLIYKVSNRFGVDPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCSQSTHVPLT FGQGTKLEIK	Hu56C11-L0 VL
136	DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNG NTYLHWFQQRPGQSPRLLIYKVSNRFGVDPDRFS GSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCSQSTHVPLT FGQGTKLEIK	Hu56C11-La VL
137	DVVMTQSPSLSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSNG NTYLHWYQQRPGQSPRLLIYKVSNRFGVDPDRF SFGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCSQSTHVPL TFGQGTKLEIK	Hu56C11-Lb VL

[0665]

138	ASTRGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSQVHITFPAVLQSSGLYSLSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKITTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLSPGK	인간 IgG1 중쇄 불 변 영역
139	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	인간 카파 경쇄 불변 영 역
140	RF FSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA R	Hu14E3 HFR3
141	RVT T D SISTAYMELSRRLSDDTAVY YCAR	Hu56C11 HFR3
142	CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGA GCTGGCGAGGCCCTGGGGCTTCAGTGAAGC TGTCCTGCAAGGCTTCGGCTACTCCTTCA CAAGCTCTGGTATAGGCTGGGTGAAGCAG AGATCTGGACAGGCCCTTGAGTGGATTGG AGAGATTTATCCTAGAAGTGGTAATACTTAC AACAAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAC ACTGACTGCAGACAAAATCCTCCAGCACAG TGTACATGGAACCTCCGACGCTGACATCTG AGGACTCTGCGGCTATTTTTGTGTAAGAG AGGCCTATAGTCACCATTACTATGCTATGGA CTATTTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGT CTTCTCA	3E5 VHnu
143	GATGTTTTGATGACCCAACTCCTCTCTCC CTGCCTGTCAGTCTTGGAGGTCAAGCCTCC ATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCCTTCTA CATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGT ACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAG CTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTT TCTGGGGTCCCAGACAGGCTCAGTGGCAG TGGATCAGGGACAGATTTTACACTCAAGAT CAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAG TTTATTACTGCTTCAAGGTTACATGTTCC ATTACAGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGG AAATAAAT	3E5 VLnu

[0666]

144	CAGGTTCAAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGA GCTGGCGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGC TGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CAAGCTATGGTATAGGCTGGGTGAAGCAGA GAACTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGA GAGATTTATCCTAGAAAGTGGTAATACTTACA ACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACA CTGACTGCAGACAAATCCTCCAGAACAGT GTACATGGAGCTCCGCAGTCTGATATCTGA GGACTCTGCGGTCTACTTTTGTGCAAGAGA GGGCTATAGTAACAATTACTATGCTATGGAC TACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGT CTTCTCA	42B9 VHnu
145	GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCC CTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCC ATCTCTTGCAATATAGTCAAGGCTTGTAC ATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGT ACCTGCAGAAACCAGGCCTGTCTCCAAA CTCCTGATCTACAAAGTTCCAACCGATT TCTGGGGTCCCAGACAGGCTCAGTGGCAG TGGATCAGGGACAGATTTCACTCAGGAT CAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAG TTTATTACTGTTTCAAGGTTACATGTTC ATTACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGG AAATAAAA	42B9 VLnu
146	CAGGTTCAAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGA GCTGGCGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGC TGTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCA CAAGTTATGGTATAGGCTGGGTGAAGCAGA GAACTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGA GAGATTTATCCTAGAAAGTGGTAATACTTACA ACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACA CTGACTGCGGACAAATCCTCCAGAACAGT GTACATGGAGCTCCGCAGTCTGATATCTGA GGACTCTGCGGTCTACTTTTGTGCAAGAGA GGGCTATAGTAACAATTACTATGCTATGGAC TACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGT CTTCTCA	67G11 VHnu
147	GATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCC CTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCC ATCTCTTGCAATATAGTCAAGGCTTGTAC CATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGT ACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAG CTCCTGATCTACAAAGTTCCAACCGATT	67G11 VLnu

[0667]

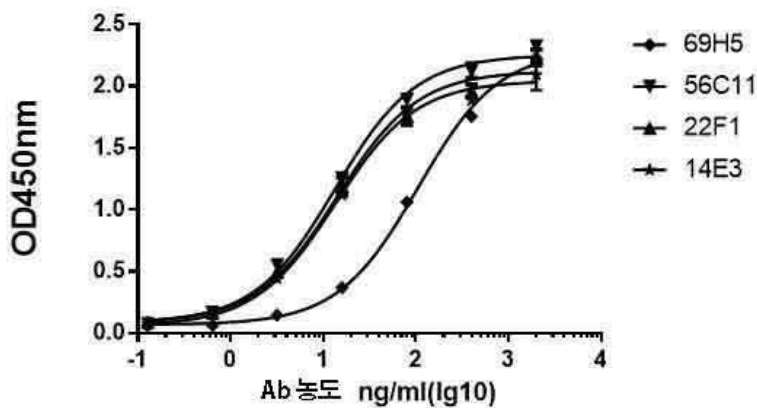
	TCTGGGGTCCCAGACAGGCTCAGTGGCAG TGGATCAGGGACAGATTCACACTCAAGAT CAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAG TTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCC ATTCACGTTCCGGCTCGGGGACAAAGTTGG AAATAAAA	
148	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYVFT DYVMNWVRQAPGQSLEWMGDINPNAETL YNHKFKGRVTITVDKSISTAYMELSRLRSD DTAVYYCVKWDGPPFAYWGQGLVTVSS	AM4B6_VH
149	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNVGA AVAWYQQKPKGKAPKLLIYSVSDRYTGVPSPR FSGSGSDFTLTITSSLQPEDIATYYCQQYSN YPTFGQGTKLEIK	AM4B6_VL
150	QVQLVQSGAEVKKPGASVKLSCKASGYIFT TYWMHWVKRPGQGLEWIGMIQPNSSGGTK YNEKFKKKATLTVDKSISTAYMELSRLLTSD TAVYYCARGAGTVDFDYWGQGLTVSS ASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKEPKKCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNYTQKSLSLSPGK	23F II 중쇄 (HC)
151	DIVLTQSPASLAVSVGQRATITCRASESVDIY GNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLESGIP ARFSGSGSRTDFTLTINPVEAQDTATYYCQQ STEDPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSD EQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC	23F11 경쇄 (LC)

[0668]

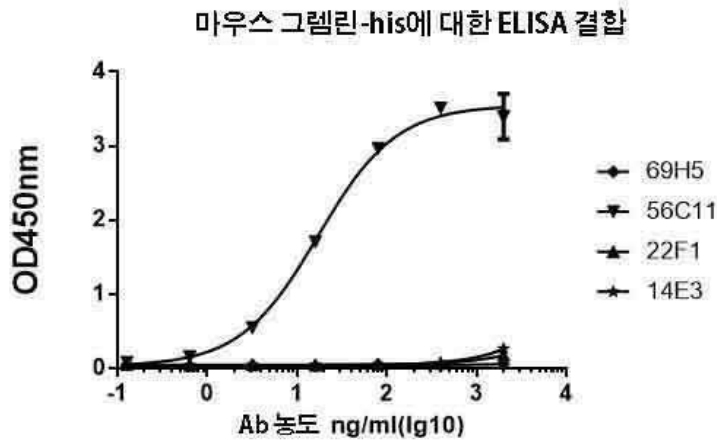
도면

도면1a

인간 그렐린-his에 대한 ELISA 결합



도면1b

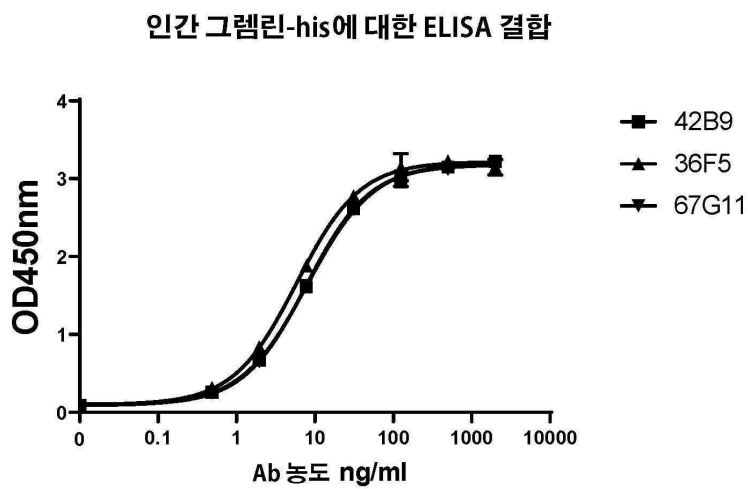


도면1c

인간/마우스 그렘린-1에 대한 결합의 EC50 (ng/ml)

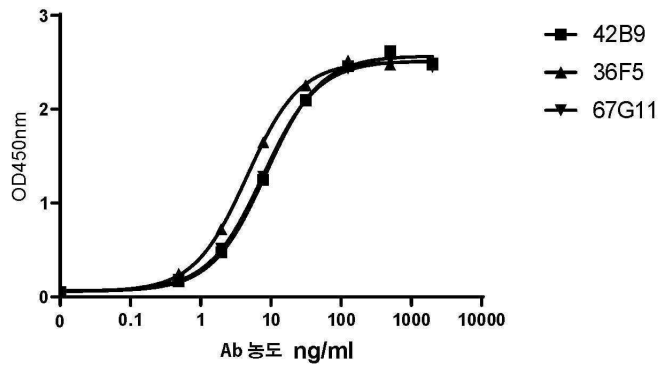
항체	인간	마우스
14E3	13.6	-
69H5	105.9	-
22F1	14.13	-
56C11	13.42	17.2

도면1d



도면1e

마우스 그렘린-his에 대한 ELISA 결합



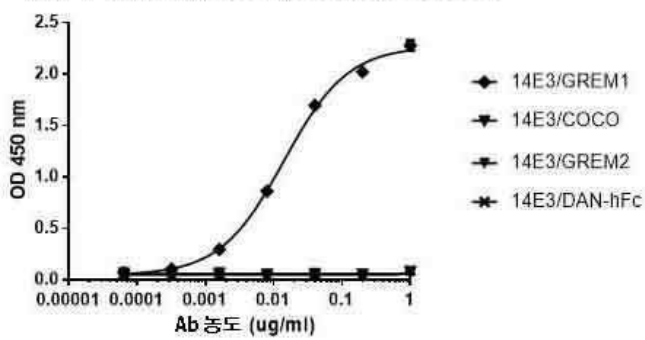
도면1f

인간/마우스 그렘린-1에 대한 결합의 EC50 (ng/ml)

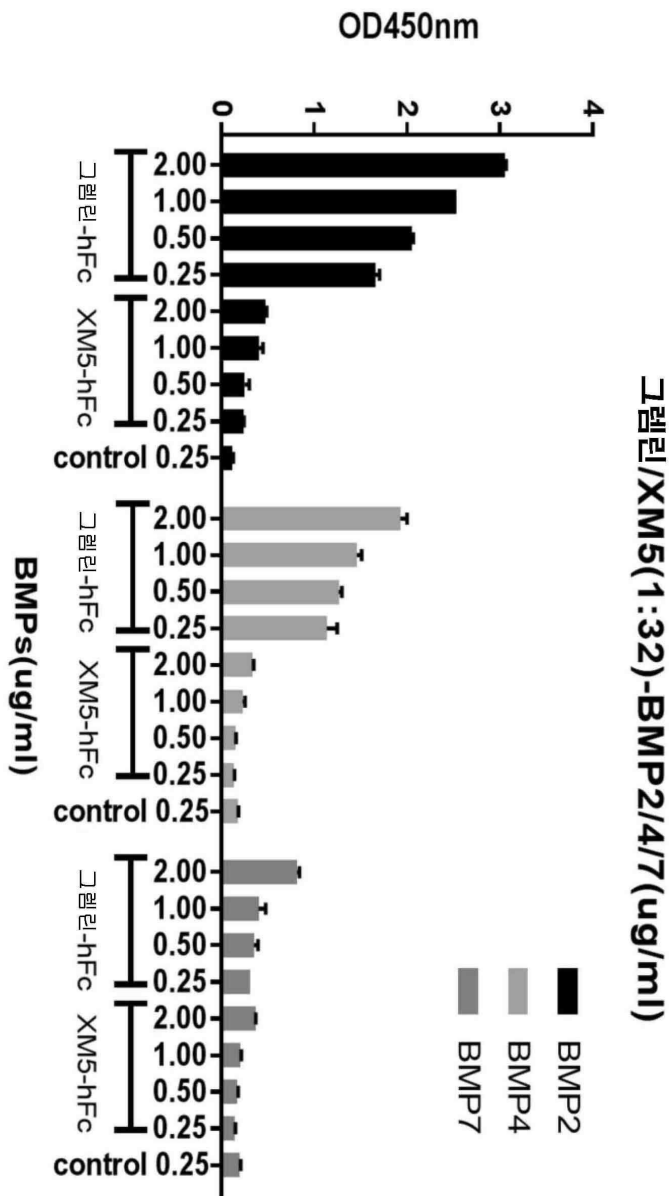
항체	인간	마우스
42B9	8.058	8.512
36F5	5.869	4.564
67G11	7.841	7.713

도면2

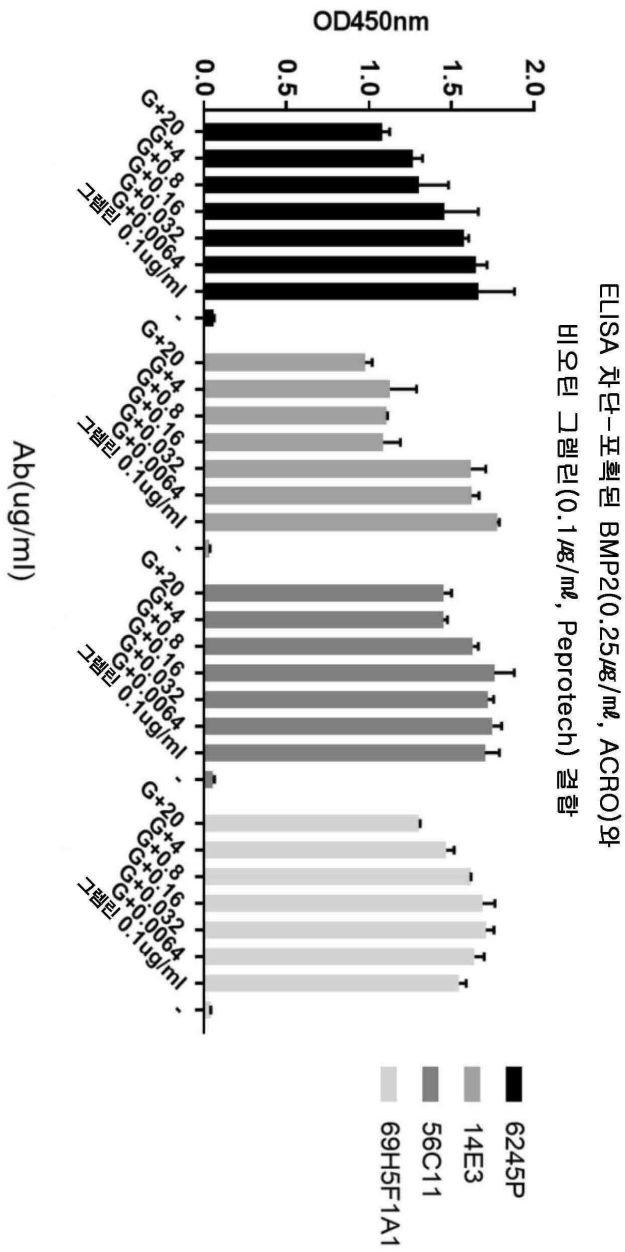
결합 특이성 (DAN 계열, R&D, 0.5ug/ml)-20170227



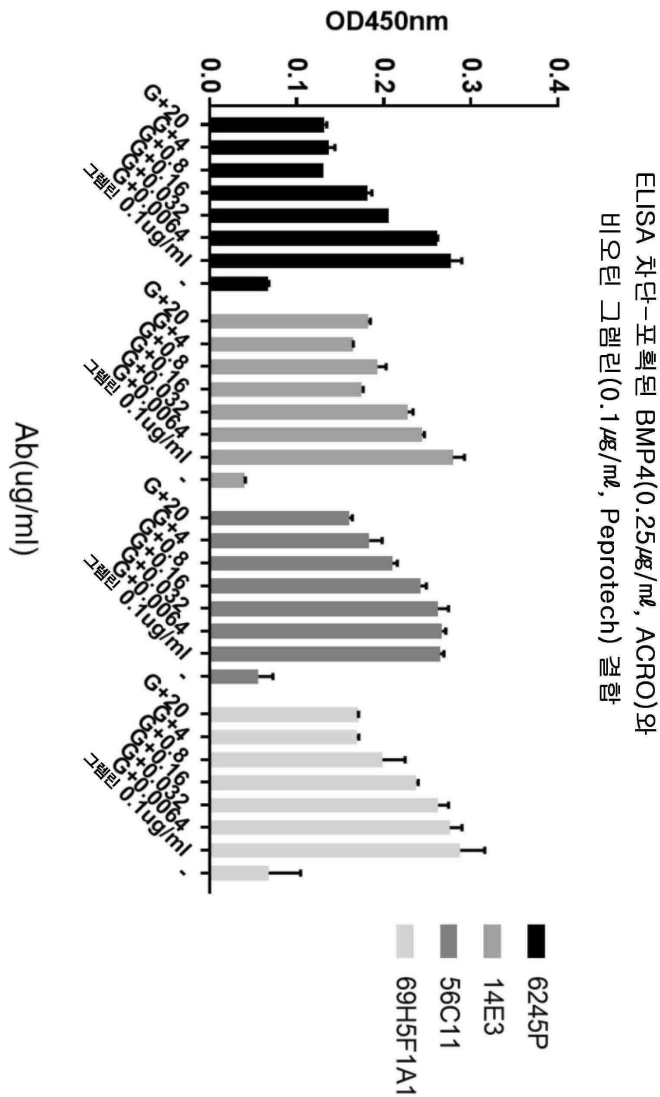
도면3a



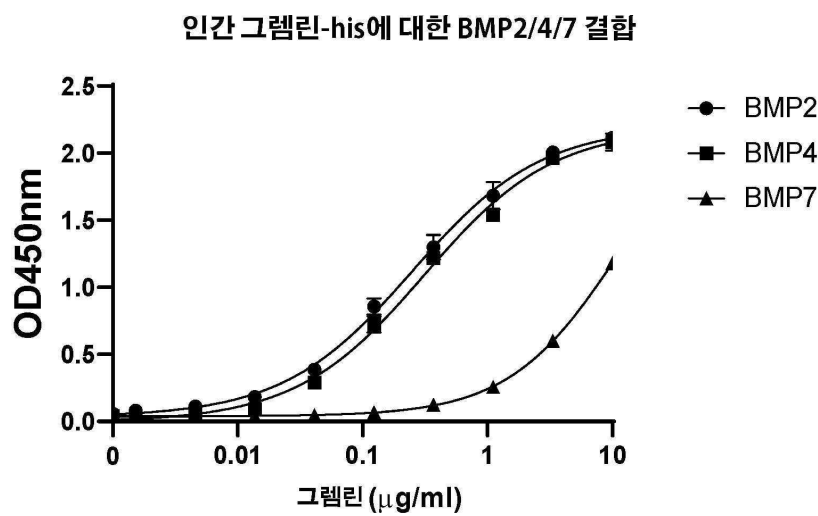
도면3b



도면3c

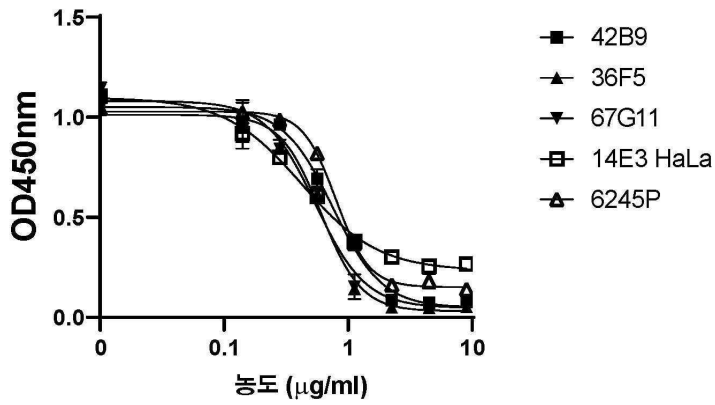


도면3d

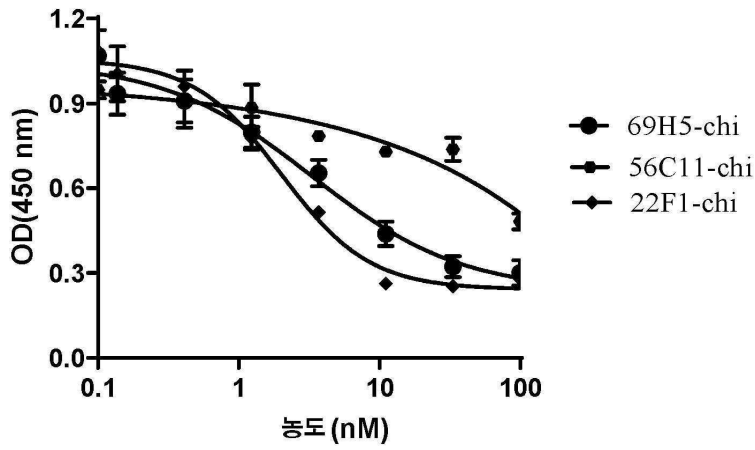


도면3e

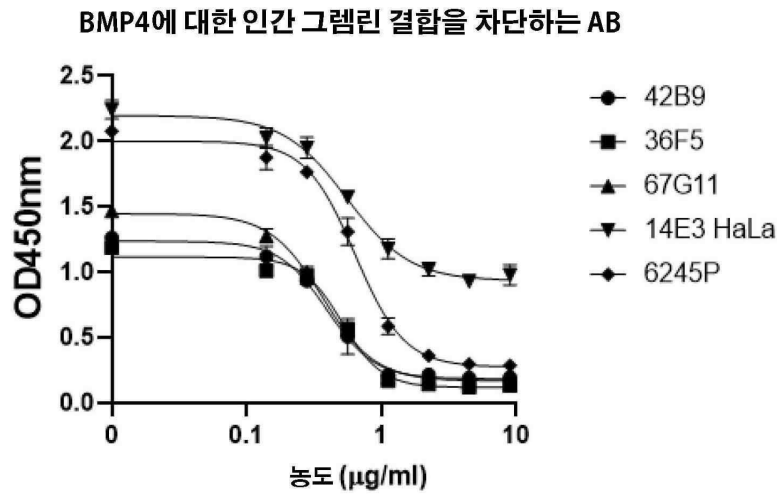
BMP2에 대한 인간 그렐린 결합을 차단하는 Ab



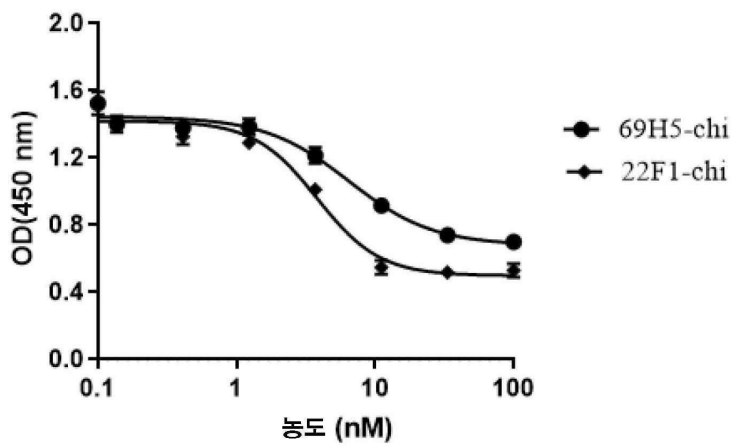
BMP2에 대한 그렐린 결합을 차단하는 ELISA



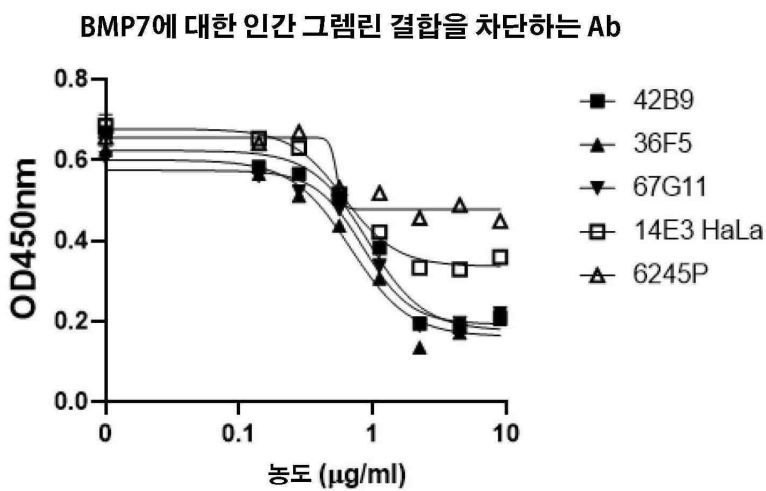
도면3f



**BMP4에 대한 그렘린 결합을 차단하는 ELISA**



도면3g

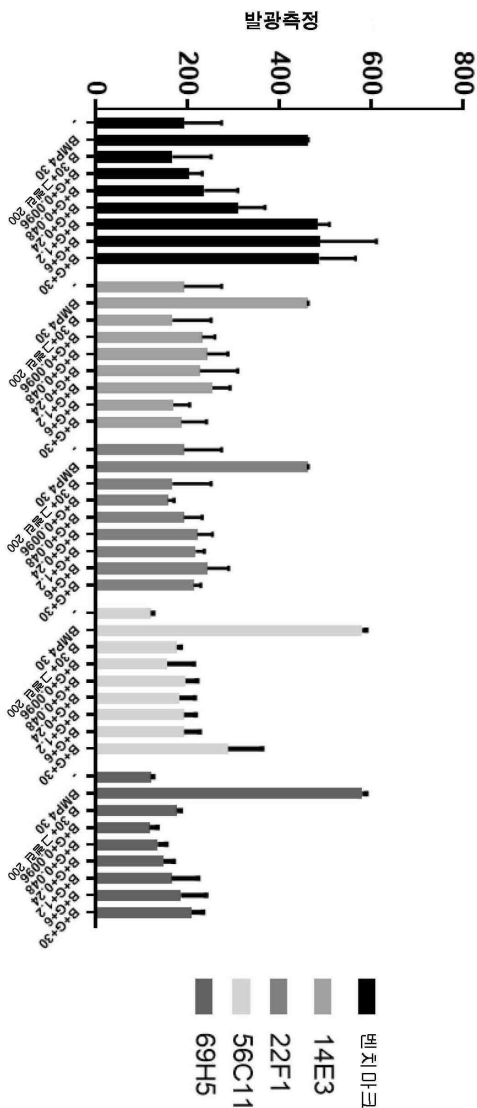


도면3h

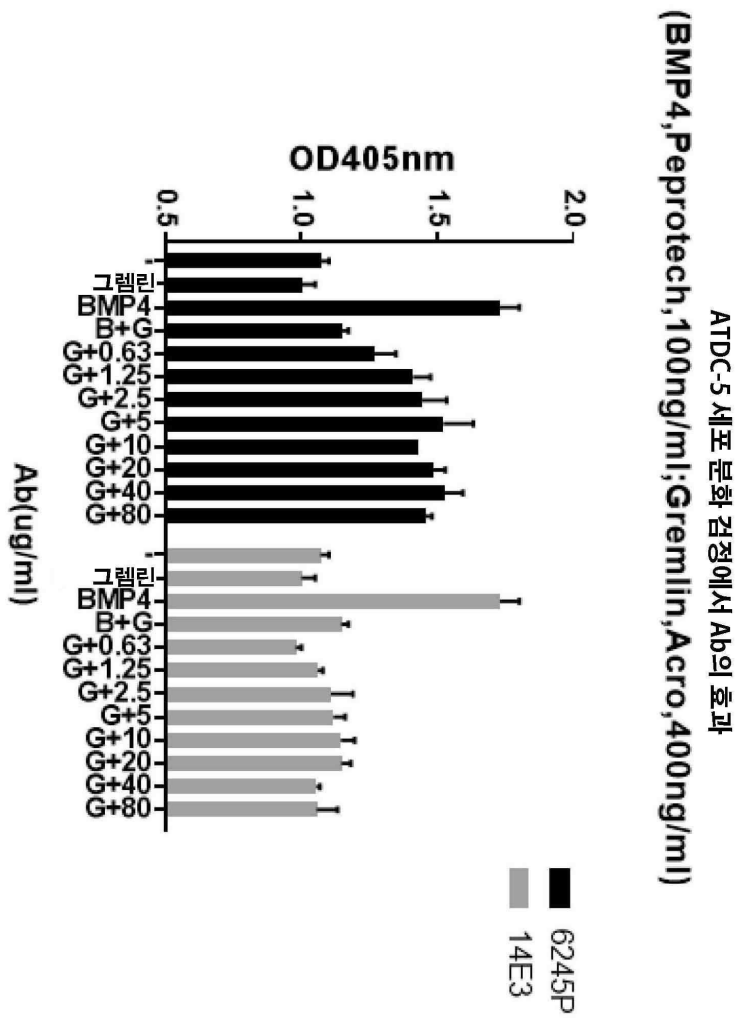
BMP에 대한 인간 그렐린-1 결합을 차단하는 결합 Ab의 IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )

Type	BMP2		BMP4		BMP7	
	IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )		IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )		IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ )	
변수						
그룹	OD450	백분율	OD450	백분율	OD450	백분율
42B9	0.7521	0.7523	0.3965	0.3964	0.9164	0.9281
36F5	0.6042	0.6042	0.5122	0.512	0.6835	0.6835
67G11	0.5471	0.5478	0.3673	0.3673	0.8476	0.8476
14E3 HaLa	0.4232	0.4233	0.5551	0.5548	0.6085	0.6106
6245P	0.7971	0.7971	0.6377	0.6377	0.5363	0.5362

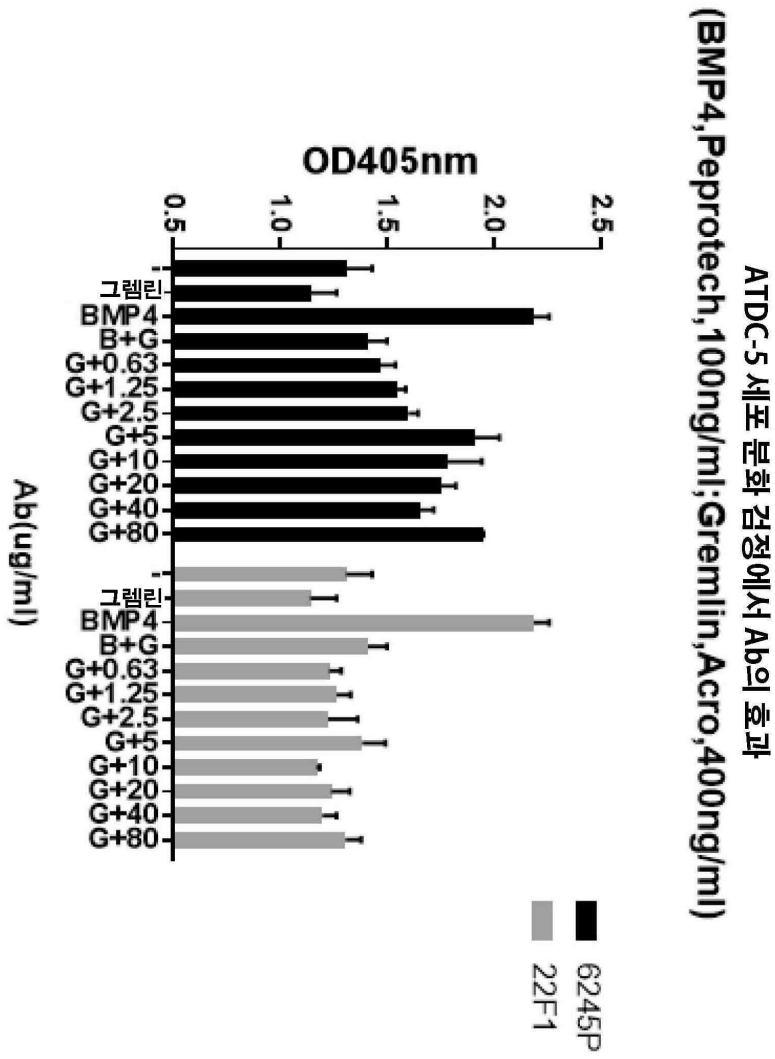
도면4



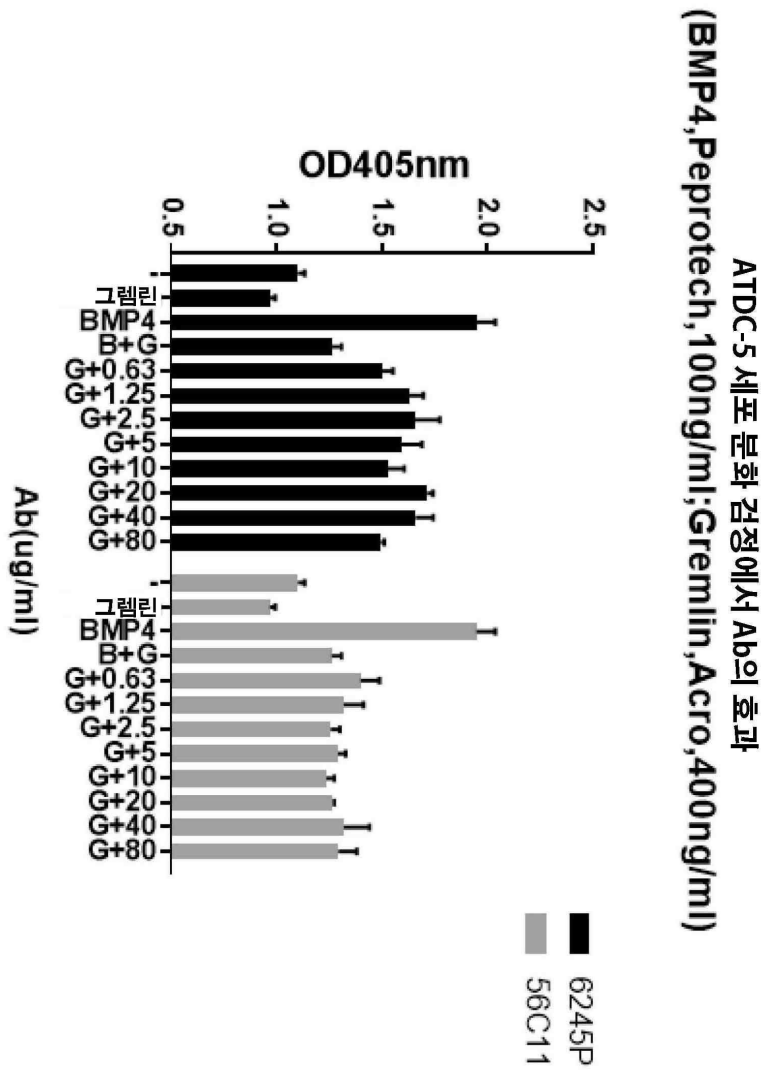
도면5a



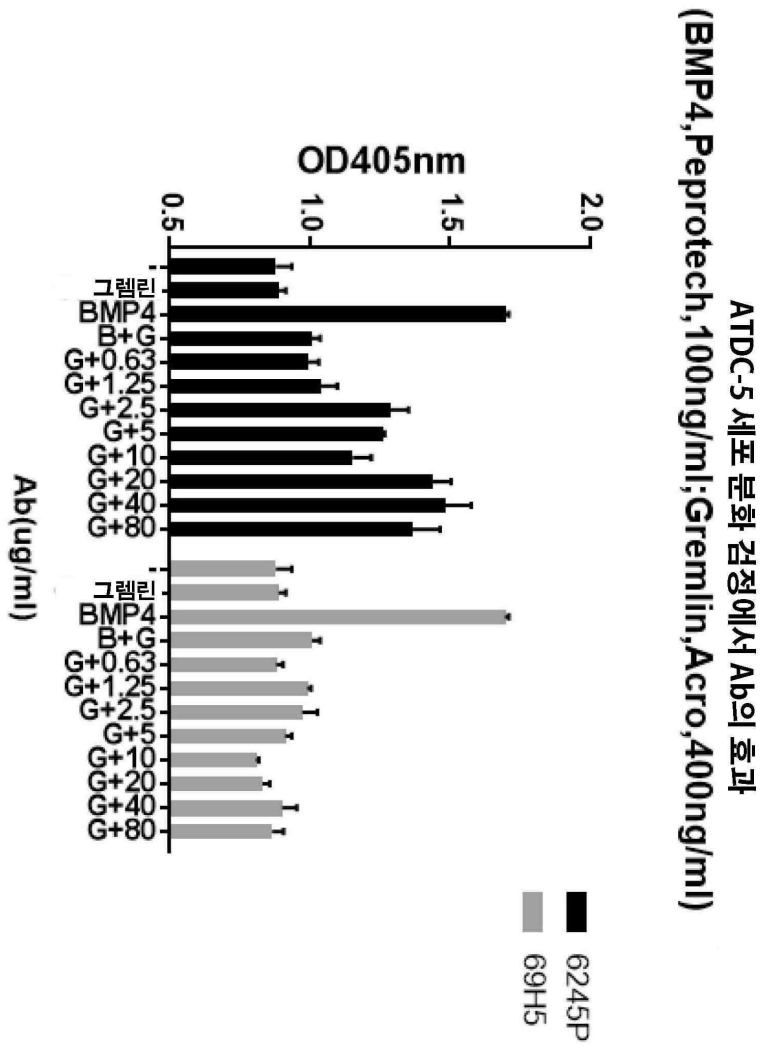
도면5b



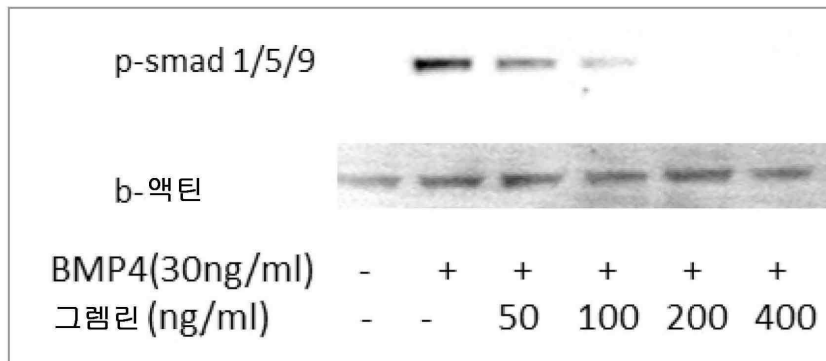
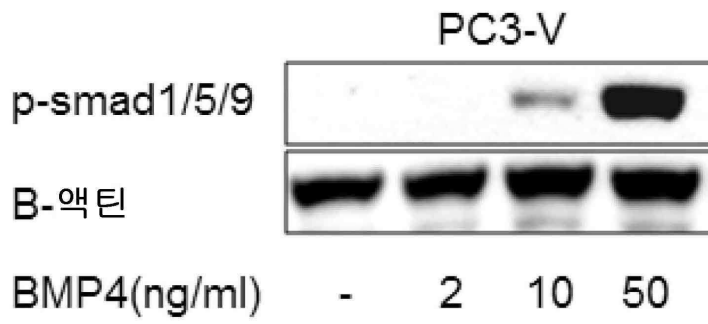
도면5c



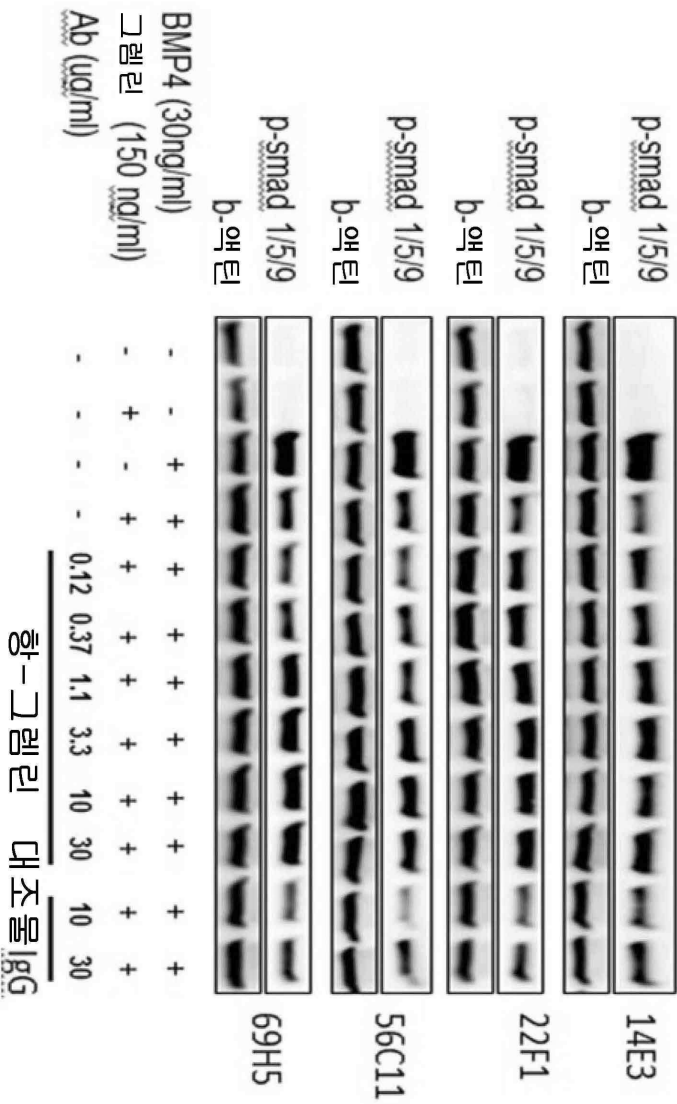
도면5d



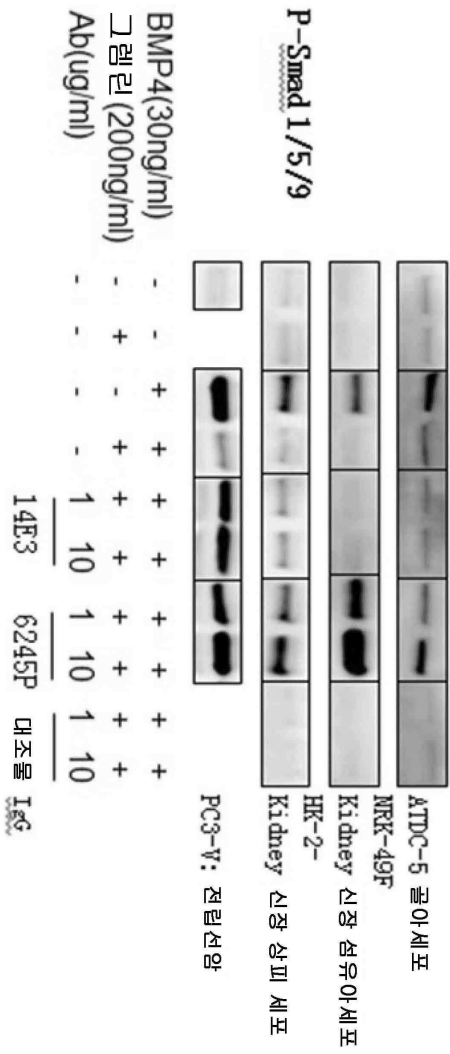
도면6a



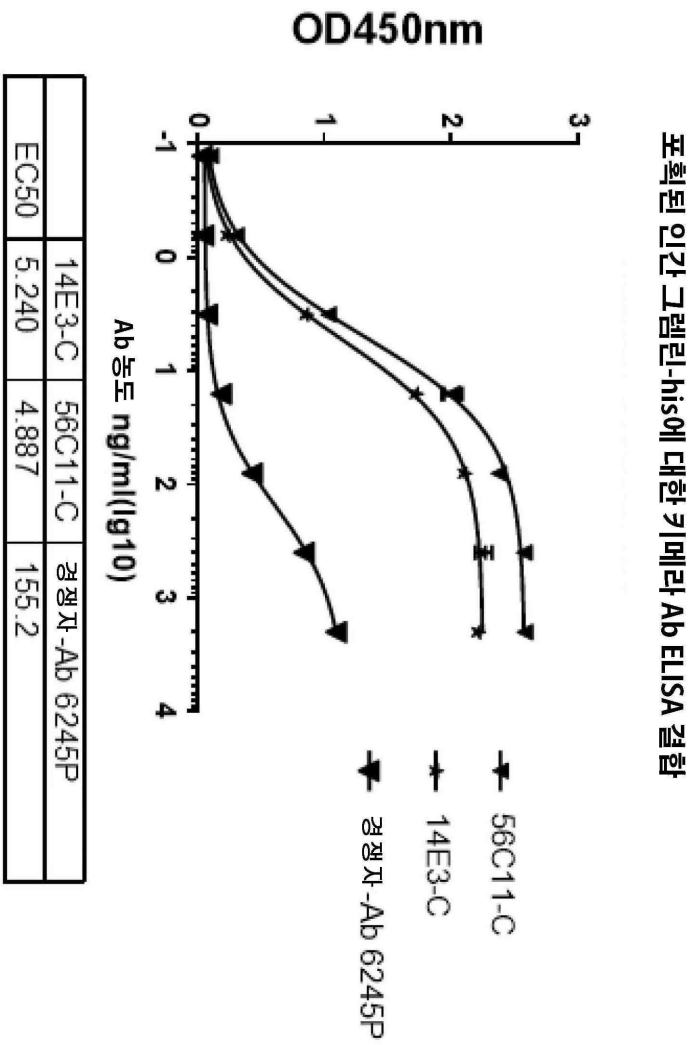
도면6b



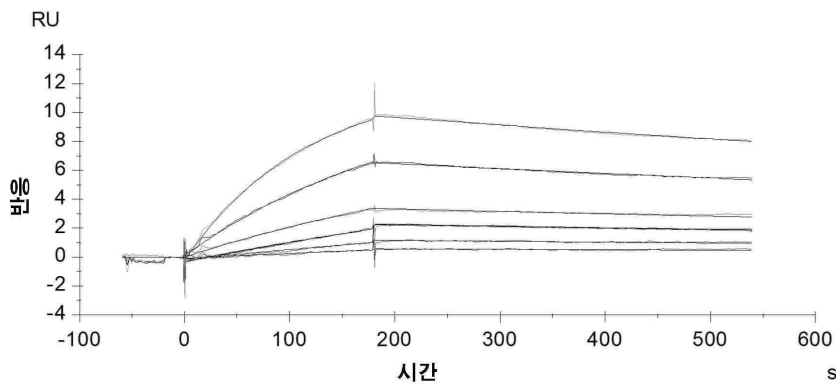
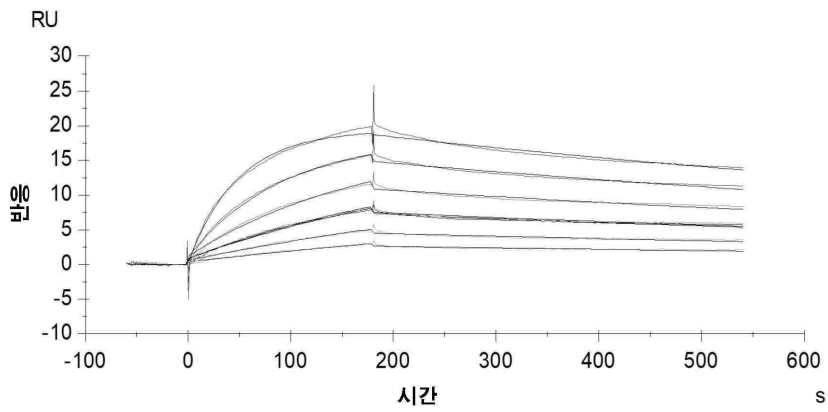
도면7



도면8



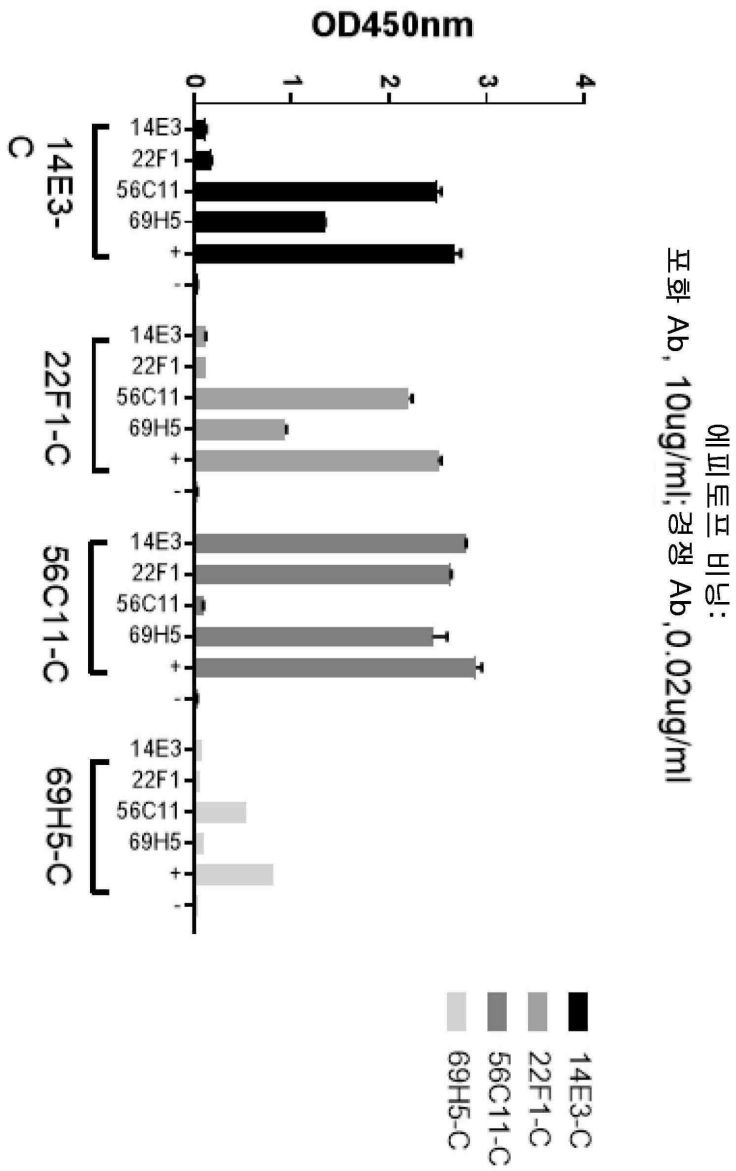
도면9



포획된 인간 그렘린-1에 결합하는 항체에 대한 25°C에서의 Biacore 친화도

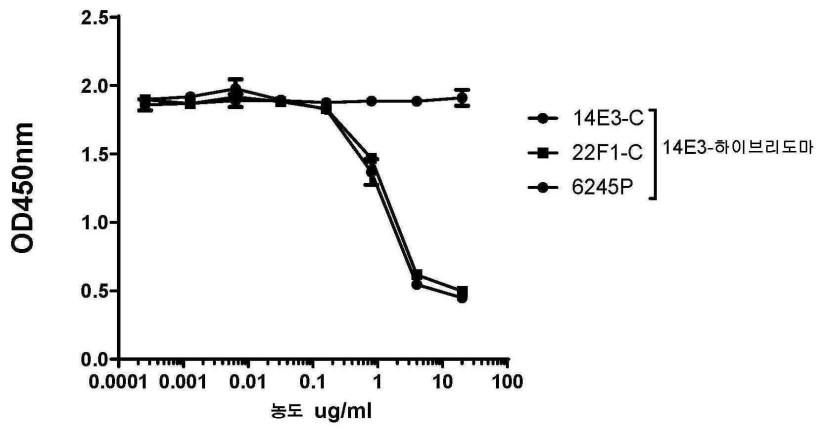
포획된	항체	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
그렘린 (Peprtech)	14E3-C	4.988E+4	8.821E-4	1.768E-8
	22F1-C	2.038E+4	5.561E-4	2.728E-8

도면10a

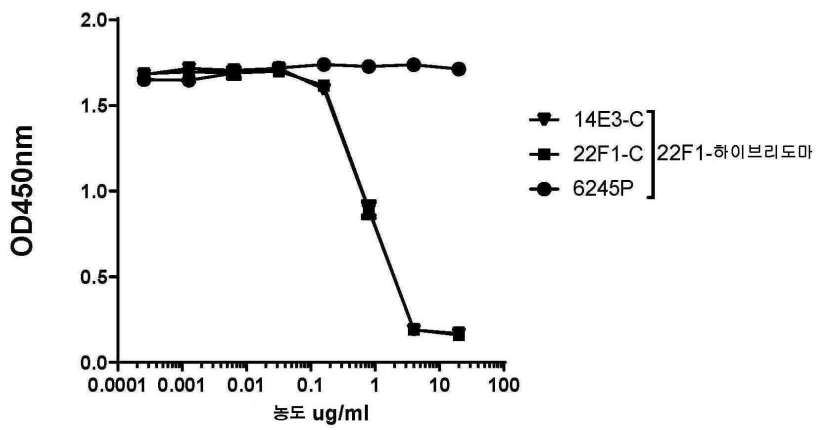


도면10b

포획된 인간 그렐린에 대한 결합 (Acro,0.5ug/ml)

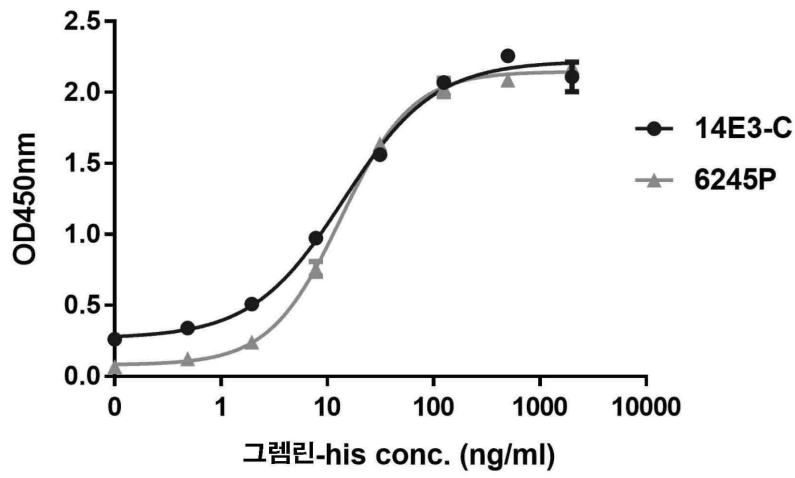


포획된 인간 그렐린에 대한 결합 (Acro,0.5ug/ml)

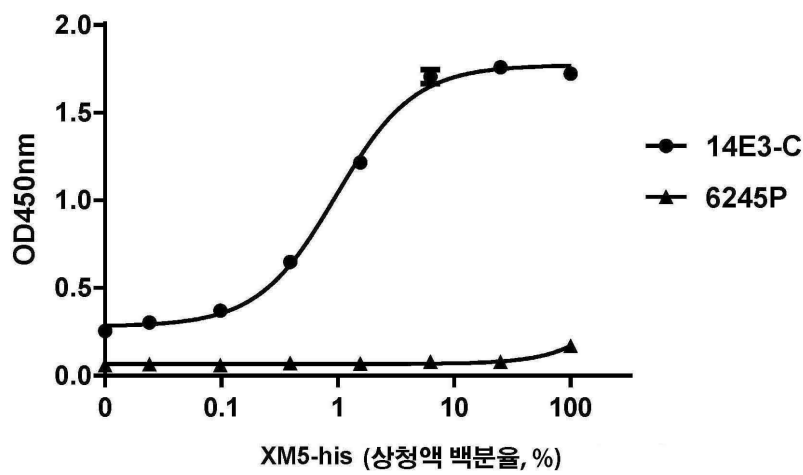


도면10c

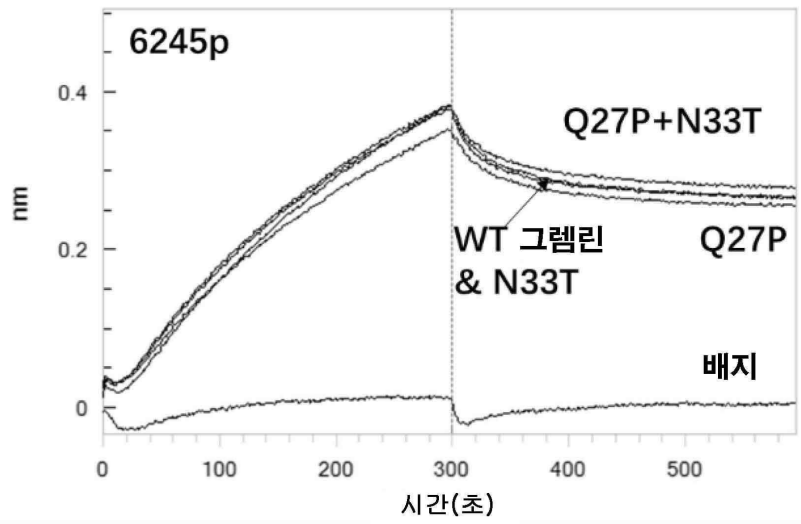
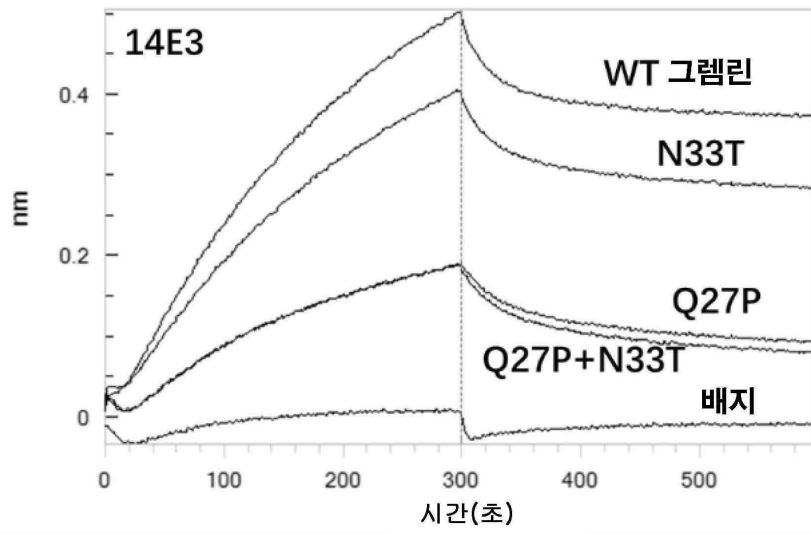
그렘린-his ELISA 결합



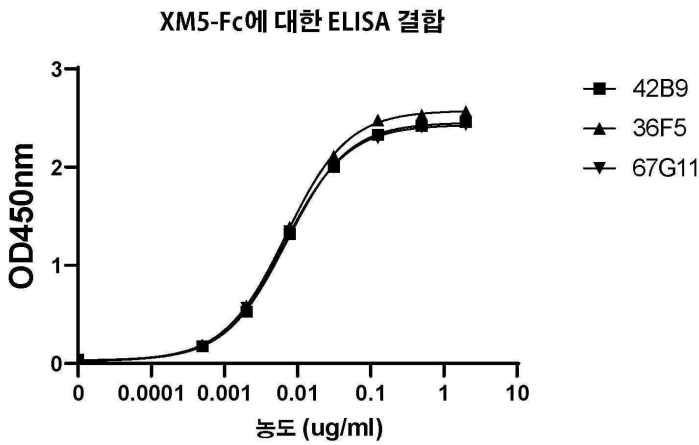
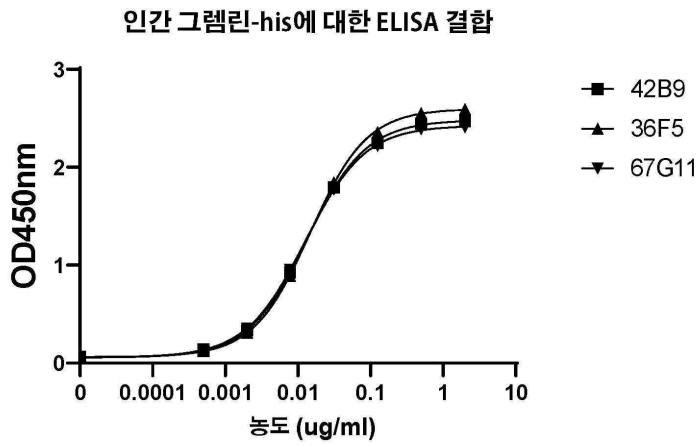
XM5-his ELISA 결합



도면10d



도면10e

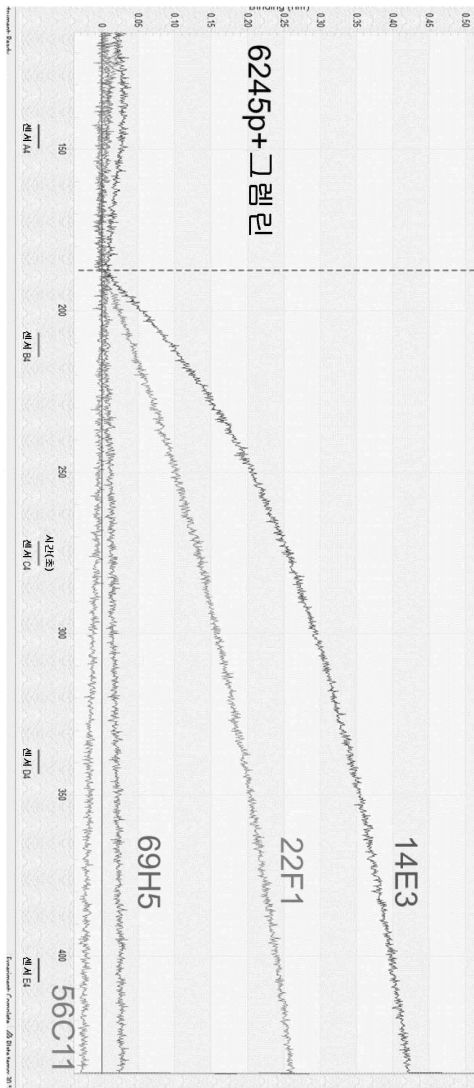


도면10f

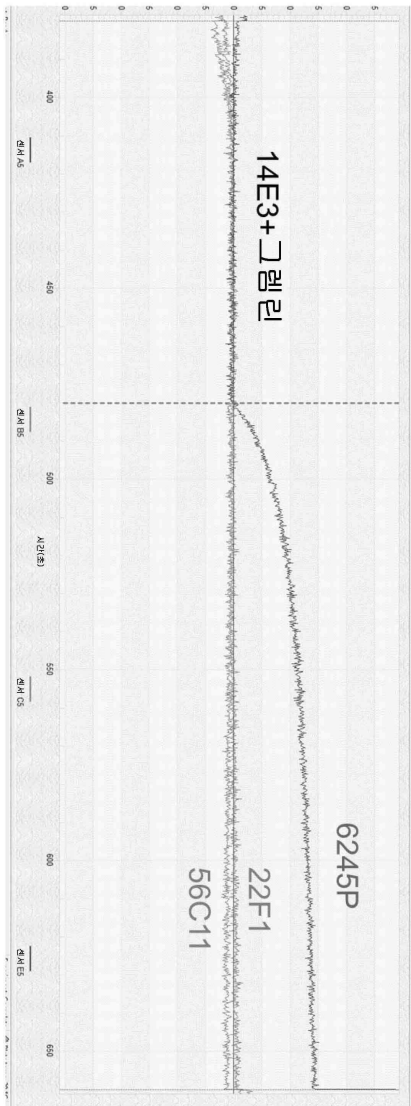
인간 그렐린 1 및 XM5에 대한 결합의 EC50 ( $\mu$ g/ml)

항체	그렐린	XM5
42B9	0.01339	0.007121
36F5	0.01475	0.006918
67G11	0.01262	0.006646

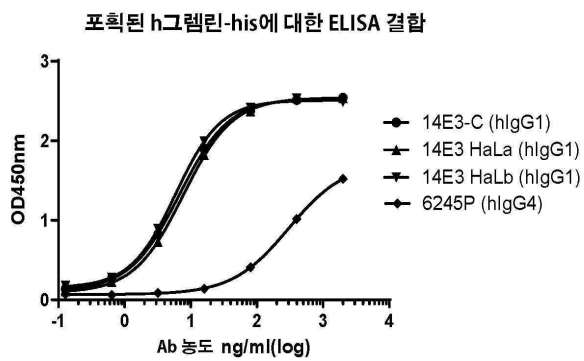
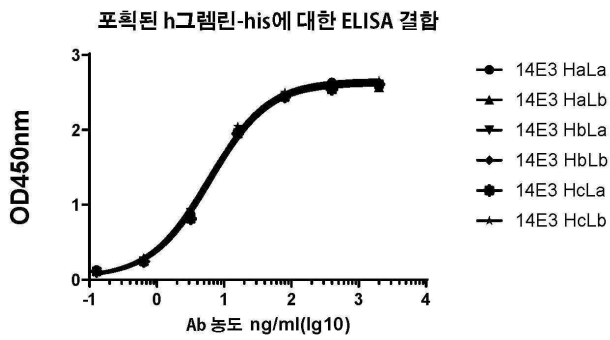
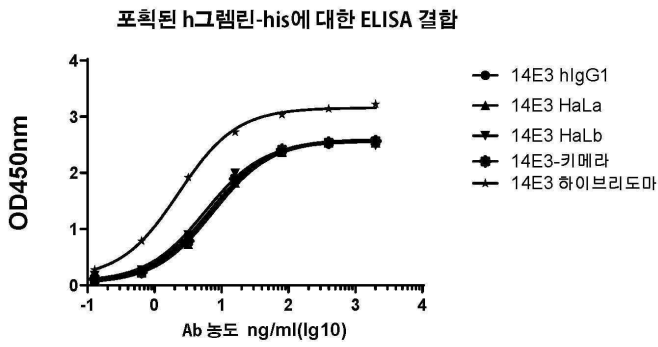
도면11a



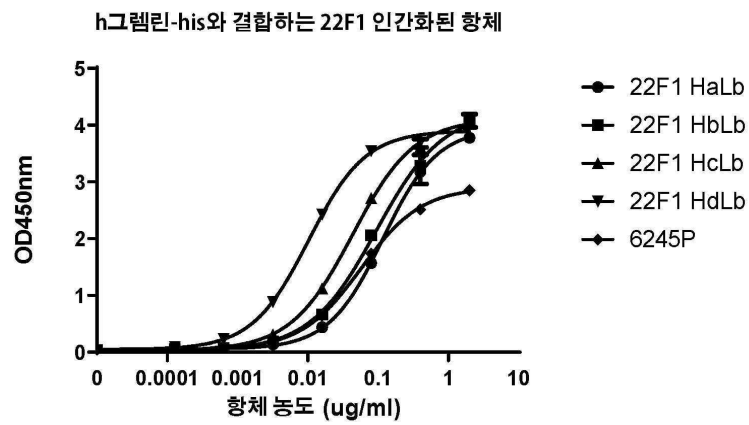
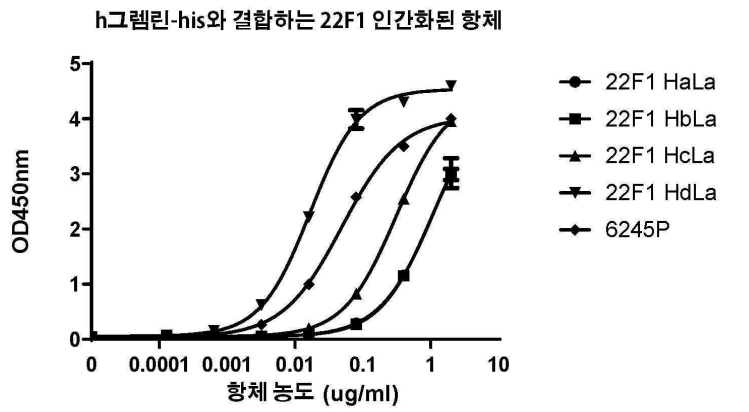
도면11b



도면12a



도면12b

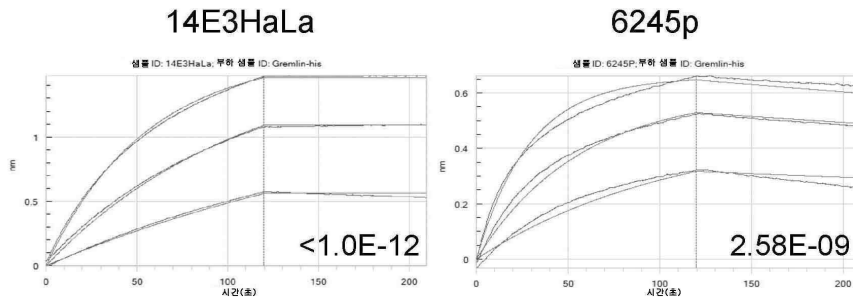


도면12c

h그렘린-his에 대한 결합의 EC50

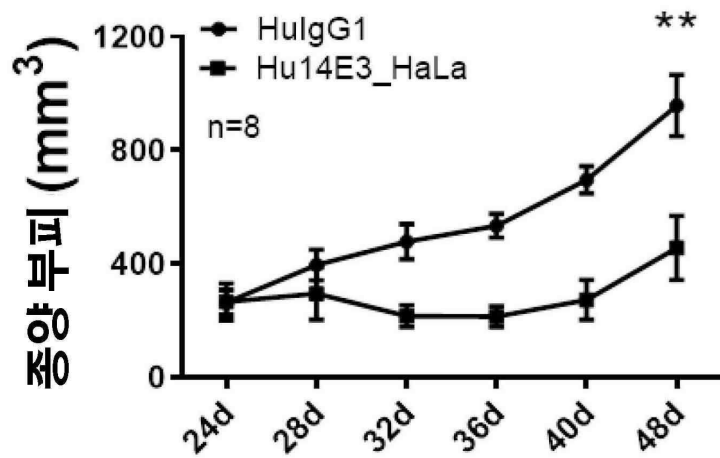
항체		EC50 (ng/ml)
14E3 (hlgG1)	HaLa	6.9
	HaLb	5.6
	HbLa	6.0
	HbLb	6.2
	HcLa	6.6
	HcLb	6.1
	키메라	6.8
22F1 (hlgG1)	HaLa	1167.0
	HaLb	117.4
	HbLa	1038.0
	HbLb	94.0
	HcLa	312.2
	HcLb	43.5
	HdLa	16.7
	HdLb	10.3
6245P (hlgG4)		57.5

도면12d

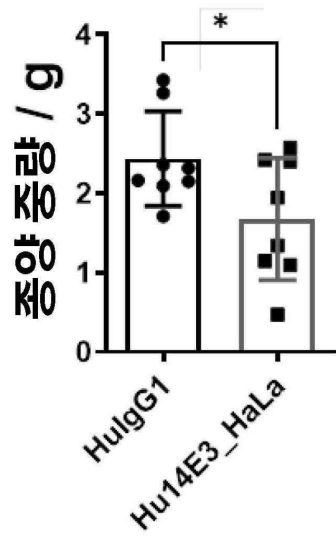


부하 (2ug/ml)	샘플 ID	농도 (nM)	반응	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)
그렐린-his	6245P	100	0.6488	2.58E-09	3.38E+05	8.70E-04
그렐린-his	6245P	50	0.5126			
그렐린-his	6245P	25	0.3132			
그렐린-his	14E3HaLa	100	1.4344	<math><1.0E-12</math>	1.82E+05	<math><1.0E-07</math>
그렐린-his	14E3HaLa	50	1.0436			
그렐린-his	14E3HaLa	25	0.5469			

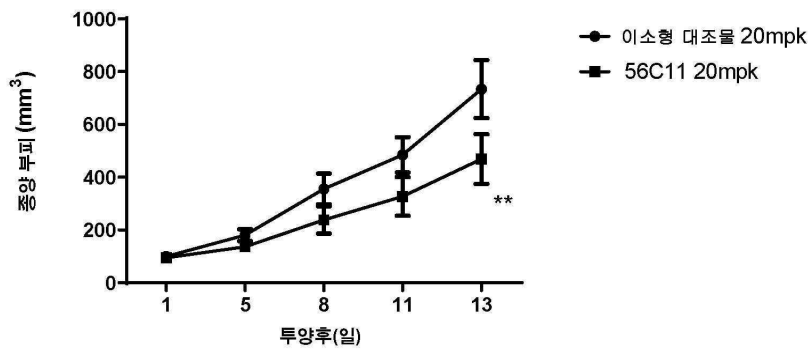
도면13a



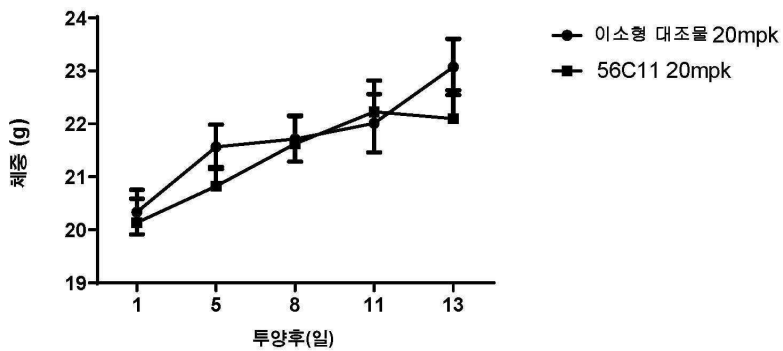
도면13b



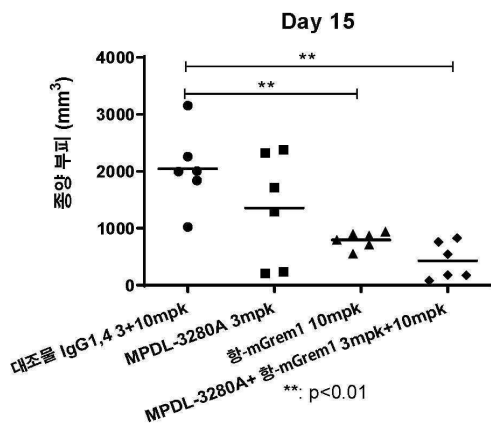
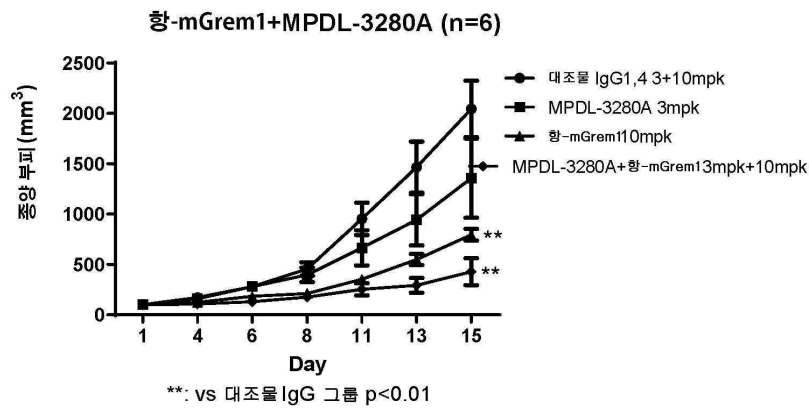
도면14



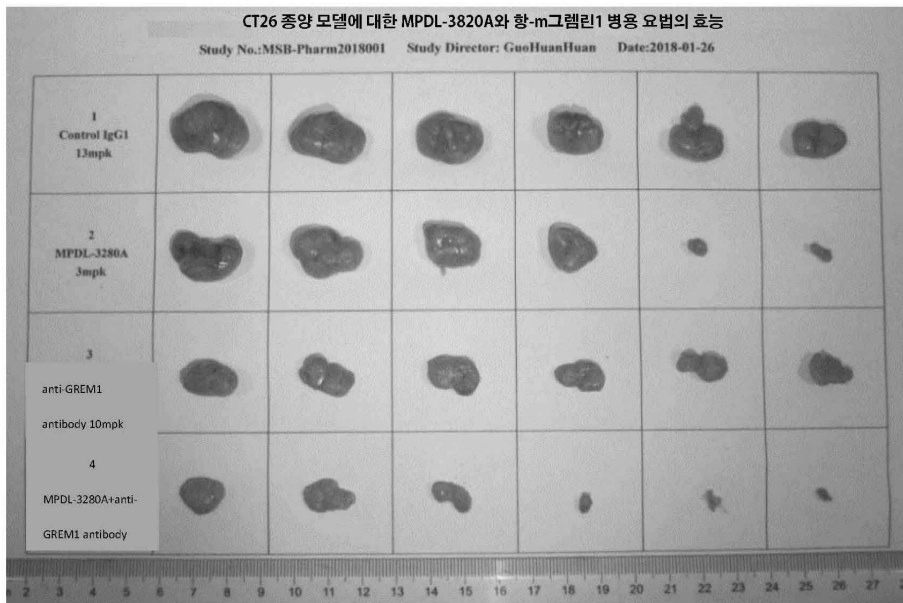
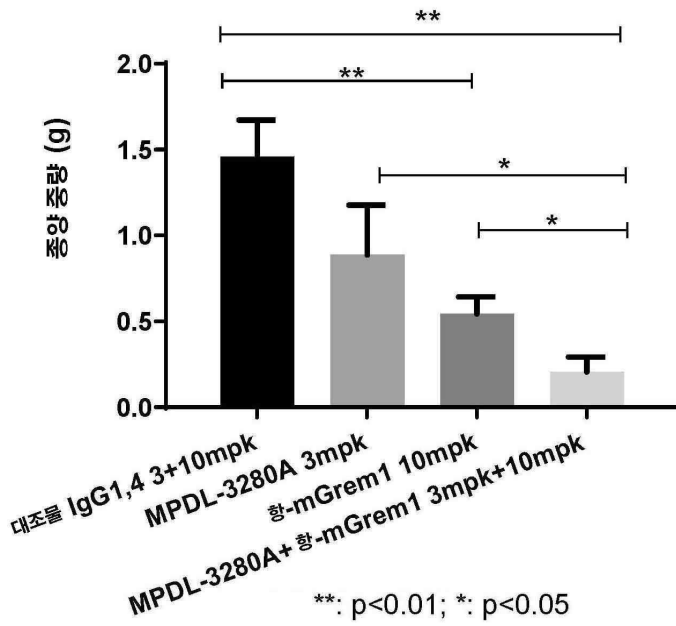
\*\* : vs 이소형 대조물 p<0.01



도면15a

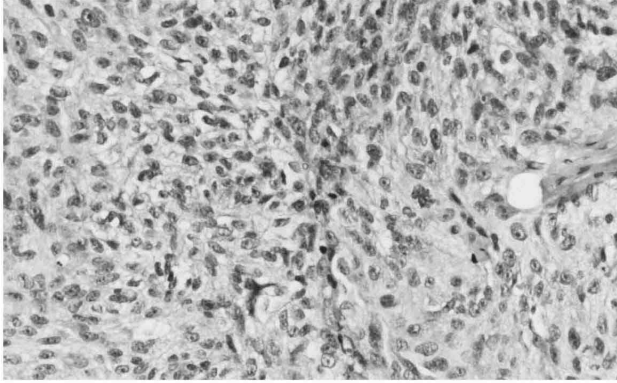


도면15b

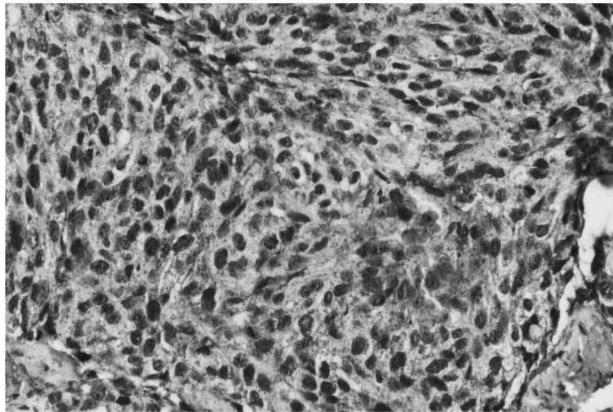


도면16

PD-L1(22C3)



그렘린 (14E3)

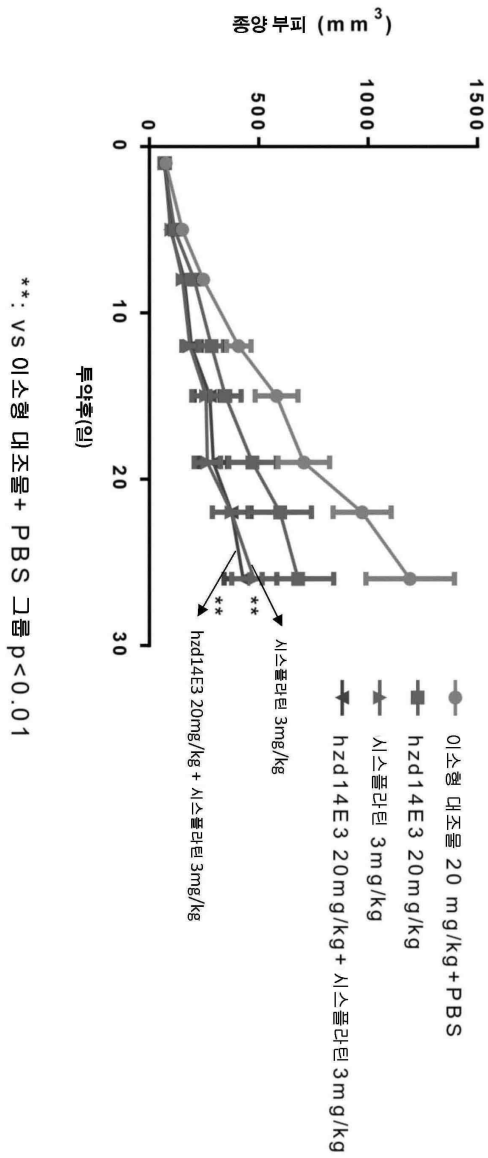


식도암 PDX 모델에서 시스플리틴과 hzd14E3 조합의 26일차 종양 성장 억제

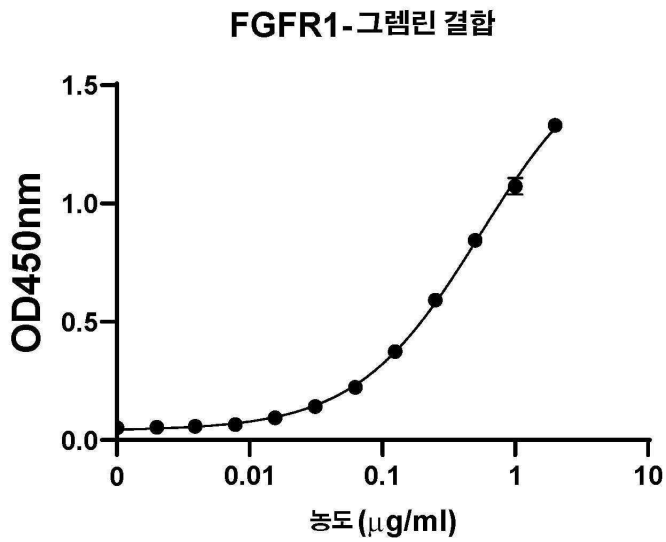
처리 (n=8)	종양 크기 (mm <sup>3</sup> , 평균±S.E.M.)	TGI (%)	p 값 vs. 이소형 대조물
이소형 대조물	1192.40±203.22	/	/
20mg/kg+PBS			
hzd14E3 20mg/kg	680.59±163.73	42.92	0.0701
시스플리틴 3mg/kg	479.41±104.05	59.79	0.0075
hzd14E3 20mg/kg			
+시스플리틴 3mg/kg	429.65±86.99	63.97	0.0039

도면17a

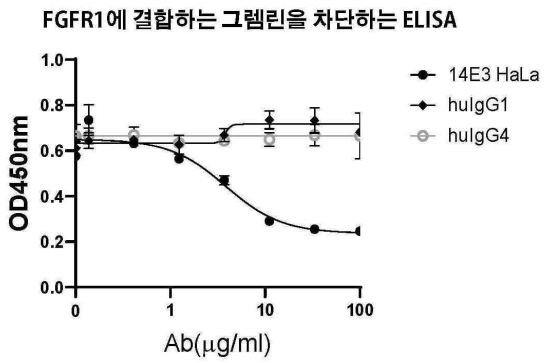
도면17b



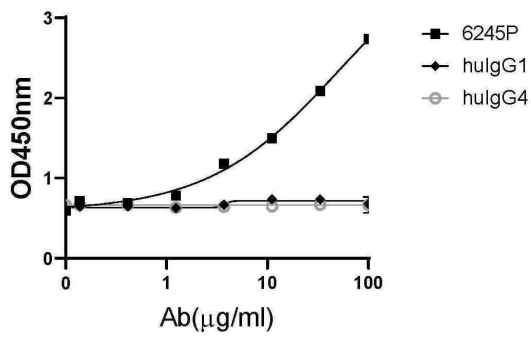
도면18a



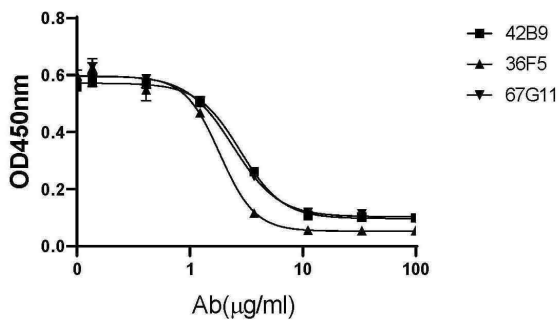
도면18ba



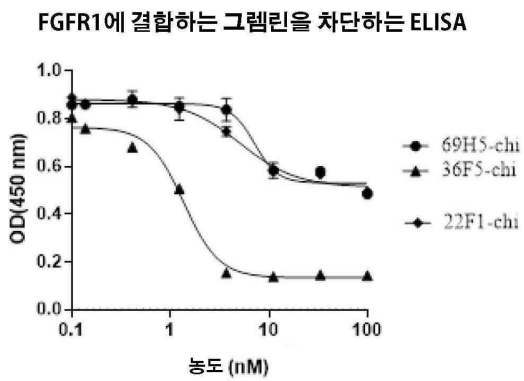
FGFR1에 결합하는 그렐린을 차단하는 ELISA



FGFR1에 결합하는 그렐린을 차단하는 ELISA



도면18bb



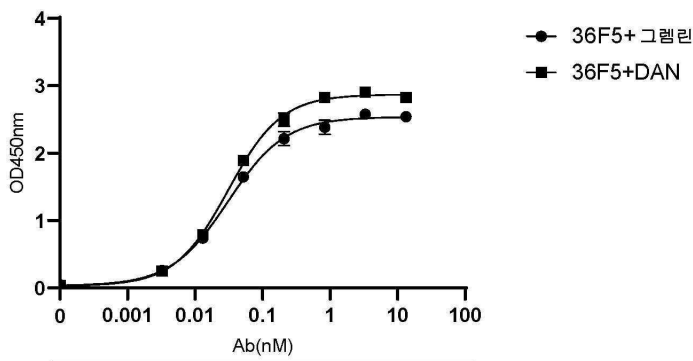
도면18c

FGFR1에 결합하는 인간 그렐린 1을 차단하는 결합 Ab의 IC50 (μg/ml)

클론 #	IC50( μ g/ml)
<b>42B9</b>	2.795
<b>36F5</b>	1.844
<b>67G11</b>	2.411
<b>14E3 HaLa</b>	3.853

도면19a

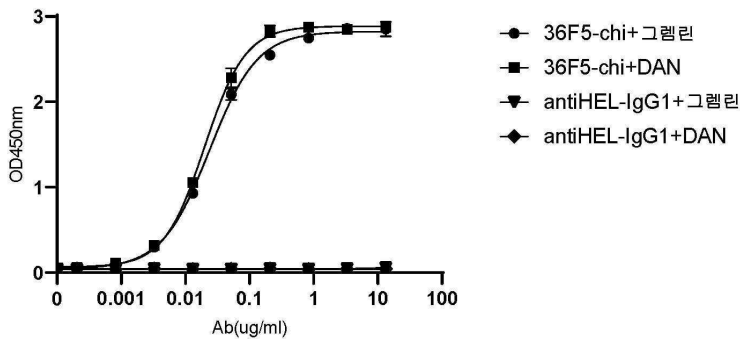
그렐린-his와 DAN-his에 대한 하이브리도마 36F5의 ELISA 결합 활성



	36F5+그렐린	36F5+DAN
EC50	0.03089	0.03094

도면19b

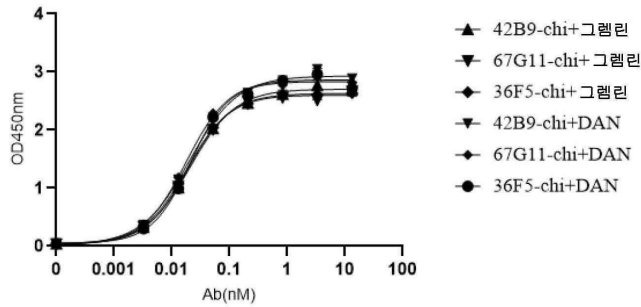
그렐린-his와 DAN-his에 대한 키메라 36F5의 ELISA 결합 활성



	36F5-chi+그렐린	36F5-chi+DAN
EC50	0.02380	0.01997

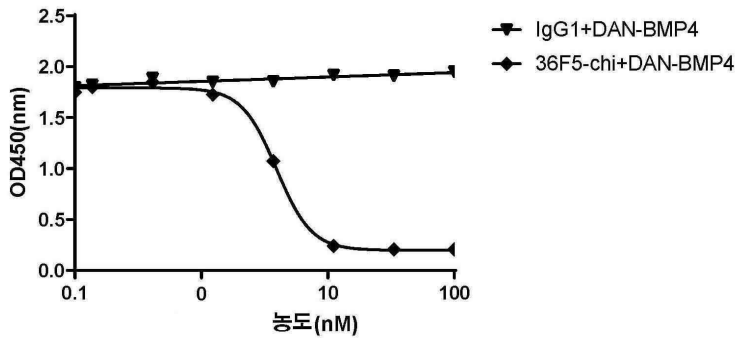
도면20a

그렙린-his와 DAN-his에 대한 키메라 Ab의 ELISA 결합 활성



	42B9-chi+그렙린	67G11-chi+그렙린	36F5-chi+그렙린
EC50	0.02094	0.01895	0.01827
	42B9-chi+DAN	67G11-chi+DAN	36F5-chi+DAN
	0.02034	0.01776	0.02109

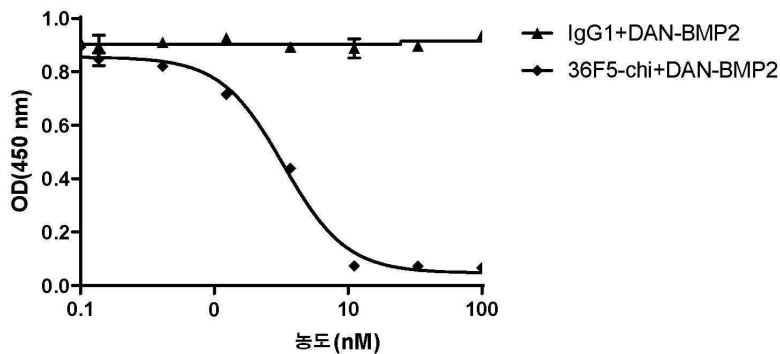
DAN 단백질에 결합하는 BMP4를 차단하는 항-그렙린



	IgG1+DAN-BMP4	36F5-chi+DAN-BMP4
IC50	~ 105770387262	3.932

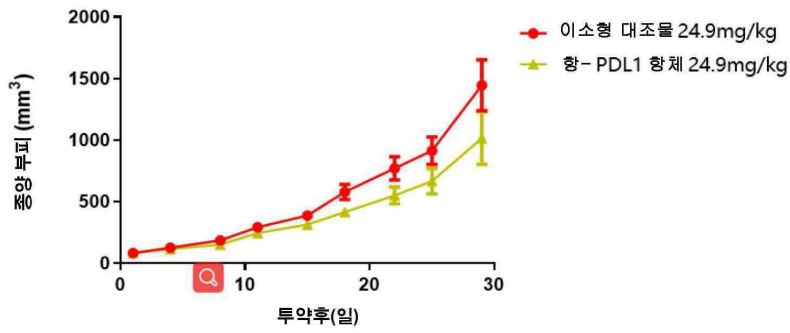
도면20b

DAN 단백질에 결합하는 BMP2를 차단하는 항-그렙린

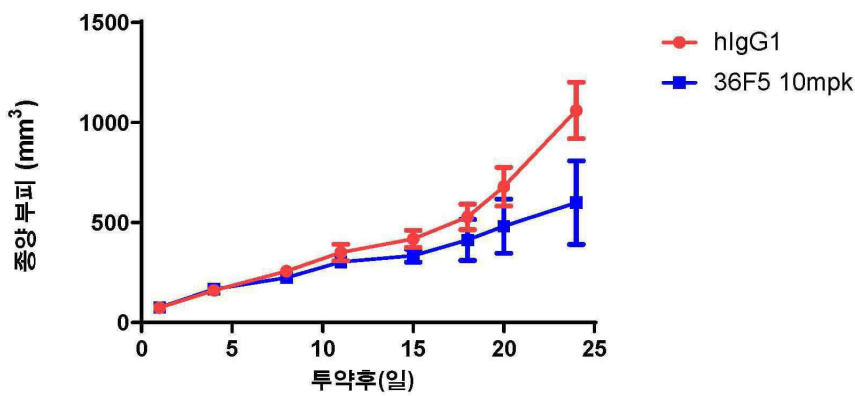


	IgG1+DAN-BMP2	36F5-chi+DAN-BMP2
IC50	~ 24.73	3.291

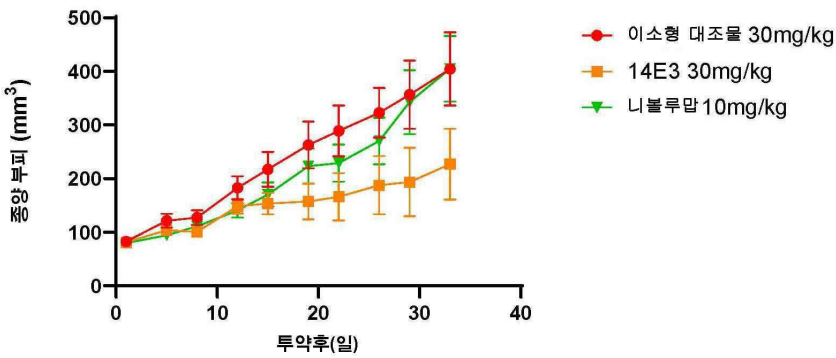
도면21a



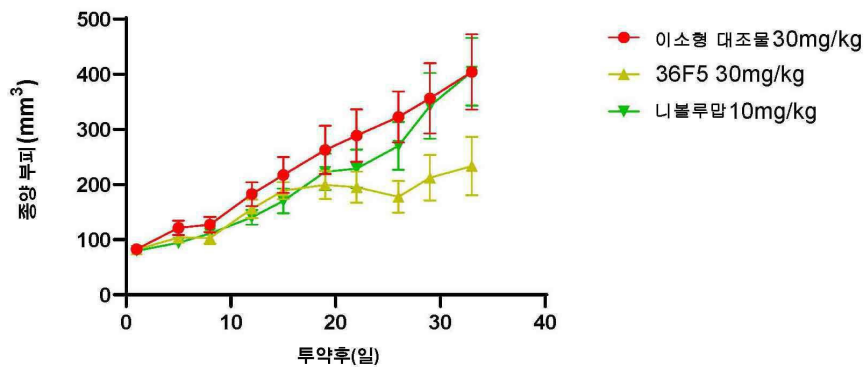
도면21b



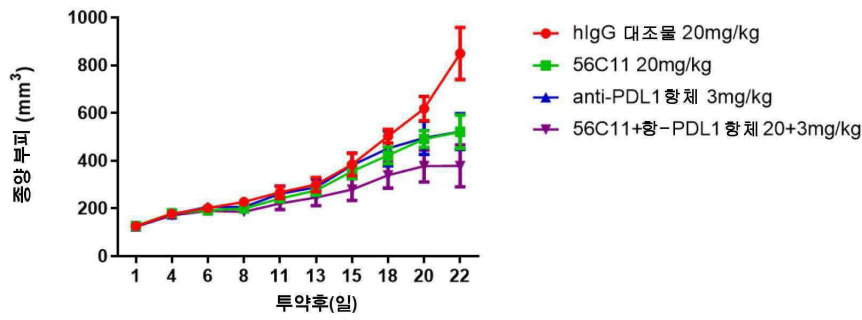
도면22a



도면22b



도면23



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SUZHOU TRANSCENTA THERAPEUTICS CO., LTD.

<120> NOVEL ANTI-GREMLIN1 ANTIBODIES

<130> 063694-8006W003

<150> PCT/CN2021/072397

<151> 2021-01-18

<150> PCT/CN2021/142043

<151> 2021-12-28

<160> 151

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Thr Tyr Gly Met Ala

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<

400> 2

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

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

Glu Pro Met Asp Tyr

1                    5

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

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

1                    5                    10                    15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1                    5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

Trp Gln Gly Ala His Phe Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ala Trp Met Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Thr Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Ile Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

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

1 5 10 15

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly  
 85 90 95  
 Ala His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

<210> 9

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

cagatccagt tggtagcagtc tggacctgaa ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60

tcttgcgaaga ctctctggatc tacgttcaca acctatggaa tggcctggat gaagcaggct 120

ccaggaaagg gtttaacgtg gatgggctgg ataacacccc tctctggaga gccaacatat 180

gctgatgact tcaagggagc gtttgccctc tctttgaaaa cctctgcca cactgcctat 240

ttgcagatca acaacctcaa aatgaggac gcggtacat atttctgtgc acgagaacca 300

atggactact ggggtcaagg aacctcagtc atcgtctcct ca 342

<210> 10

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 10

gatgttgtga tgacceagac tccaactcaet ttgtcgatta ccattggaca accagcctec 60

atctcttga aatcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgagttgg 120

ttgttacaga ggccagacca gtctccaaag cgctaatct ctctgggtgc caaactggac 180  
 tctggagtcc ctgacaggat cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240  
 agcagagtgg aggctgaaga tttgggcatac tattattgct ggcaaggtgc acattttccg 300  
 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

Asp Tyr Tyr Met Asn

1 5

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 12

Asp Ile Asn Pro Lys Asp Gly Asp Ser Gly Tyr Ser His Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 13

Gly Phe Thr Thr Val Val Ala Arg Gly Asp Tyr

1 5 10

<210> 14

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

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

1                    5                    10                    15

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1                    5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 16

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr

1                    5

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 17

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

Tyr Met Asn Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile

35                    40                    45

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asp Gly Asp Ser Gly Tyr Ser His Lys Phe

50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

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

85 90 95  
 Ala Ser Gly Phe Thr Thr Val Val Ala Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110  
 Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120  
 <210> 18

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 18

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

1 5 10 15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30  
 Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45  
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Phe Pro

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

65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95  
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110  
 <210> 19

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 19

gaggcccagc tgcaacaatc tggacctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcttgaagg ctcttgata ctcgttcact gactactaca tgaactggct gaagcagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gattggagat attaatccta aagatggtga tagtggttac 180

agccataagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagcggattt 300

accacggtag tagctagggg ggactactgg ggccaaggca ccaactctcac agtctctca 360

<210> 20

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 20

gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtcgttga ccattggaca accagcctcc 60

atctcttga agtcaagtca gagectctta gatagtgatg gaaagacata ttggaattgg 120

ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgctaatct atttgggtgc taaactggac 180

tctggattcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcagga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtag acattttccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 21

Asp Asp Tyr Met His

1 5

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 22

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

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

Trp Ala Thr Val Pro Asp Phe Asp Tyr

1                    5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 24

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1                    5                    10                    15

Ala

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 25

Phe Thr Ser Thr Arg Glu Ser

1                    5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 26

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 27

<211

> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 27

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Asp

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Arg Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Thr Trp Ala Thr Val Pro Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 28

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 28

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

1                    5                    10                    15

Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Arg

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Ile Ser Asn Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln

85                    90                    95

His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100                    105                    110

Lys

<210> 29

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 29

gaggtgcagc tgcaacagtc cggcgctgaa ctggtgaggc ctggagcctc cgtgaagctg 60

tcctgcaccg ccagcggctt caacatcaag gacgactaca tgcactgggt gaagaggagg 120

cctgagcagg gcttgagtg gatcggctgg atcgaccccg agaacggcga caccgagtac 180

gcctccaagt tccagggcaa ggccaccatc accgccgaca cctcctcaa caccgctac 240

ctgcagctga gtcctctgac ctccgaggac accgccgtgt actattgcaac cacctgggcc 300

accgtgcccg acttcgacta ctggggacag ggcaccaccc tgaccgtgtc cagc 354

<210> 30

<211> 339

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 30

```

gatatcgtga tgaccagtc tccttctct ctggctatgt cagtgggaca gaaagtgacc      60
atgtcttgca agtcctctca gtctctgctg aacaggtcca accagaagaa ctacctggct      120
tggtagaccaga agaaccagg acagtctcct aagctgctgg tgcattttac ctctaccagg      180
gaatccggag tgccagatag atttatcggc tctggctccg gcacagattt tacactgacc      240
atctccaatc tgcaggcaga agatctggct gactactttt gccagcagca ctactccacc      300
ccttttacct ttggctcgg caccaagctg gagatcaag                               339
    
```

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

Asp Phe Tyr Met Asn

1                    5

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 33

Asp Pro Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Glu Val Ala Tyr

1                    5                    10

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 34

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

1                    5                    10                    15

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 35

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1                    5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 36

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Leu Thr

1                    5

<210> 37

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 37

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Phe  
                   20                    25                    30  
 Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
                   35                    40                    45  
 Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe  
                   50                    55                    60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80  
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
 Ala Arg Asp Pro Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Glu Val Ala Tyr Trp Gly  
                   100                    105                    110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
                   115                    120  
 <210> 38  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 38  
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser  
                   20                    25                    30  
  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
                   35                    40                    45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

85

90

95

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100

105

110

<210> 39

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 39

gaggtgcagc tgcagcagtc cggccctgag ctggtgaagc ctggagcctc cgtgaagatc 60  
 tcctgtaagg cctccggcta caccttcacc gacttctaca tgaactgggt gaagcagtcc 120  
 cacggcaagt cctggagtg gatcggcgac atcaatccca acaacggcgg cacctcctac 180  
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccaccctg acagtggaca agtctccag caccgcctac 240

atggagctga ggtccctgac ctccaggac tccgccgtgt actactgcbc cagggacccc 300  
 atctactacg actacgacga ggtggcctac tggggccagg gaaccctggt gacagtgtcc 360  
 gcc 363

<210> 40

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 40

gatgtggtga tgacacagac acctctgtct ctgccagtgt ctctcggaga tcaggcttct 60  
 atctcttgca gatcctctca gtctctggtg cattccaacg gaaacaccta cctgcattgg 120  
 tacctgcaga aaccaggaca gtctcctaag ctgctgatct acaaggtgtc caacaggttc 180

tccggagtgc cagatagatt ttccggatct ggatctggca ccgattttac cctgaagatc 240  
 tctagagtgg aagcagagga tctgggagtg tacttttgta gccagtctac ccacgtgcct 300  
 ctgacatttg gagcaggaac aaagctggag ctgaag 336

<210> 41

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 41

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

Gly Met Ala Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35                    40                    45

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Ala Arg Glu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val

100                    105                    110

Ser Ser

<210> 42

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 42

caggtgcagc tgggtcagtc cggctccgag ctgaagaagc ctggcgcctc cgtgaaggtg 60

tcctgcaagg cctccggcta caccttcacc acctacggca tggcctggat gaggcaggct 120

cctggccagg gactggagtg gatgggctgg atcaacaccc tgtccggcga acccacctac 180

gccgacgact tcaagggcag gttcgtgttc tcctggaca ccagcgtgtc caccgcctac 240

ctgcagatct cctccctgaa ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggagccc 300

atggactact ggggccaggg caccatggtg accgtgtcct cc 342

<210> 43

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 43

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

Gly Met Ala Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35                    40                    45

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Ala Arg Glu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val

100                    105                    110

Ser Ser

<210> 44

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 44

cagatccagc tggatgcagag cggcagcgag ctgaagaagc cggcgctag cgtgaaggtg 60

tcttgcaagg ccagcggcta caccttcacc acctacggca tggcctggat gaggcaggct 120

cctggacagg gcctggagtg gatgggctgg atcaacaccc tgtccggcga gcctacctac 180

gccgacgact tcaagggcag gttcgccttc tcctggaca cctccgtgag caccgcctac 240

ctgcagatct ccagcctgaa ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggagcct 300

atggactact ggggccaggg caccatggtg accgtgtcca gc 342

<210> 45

<211> 114

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 45

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Met Ala Trp Met Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Thr Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val

100 105 110

Ser Ser

<210> 46

<211> 342

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 46

cagatccagc tgggtcagtc cggcagcgag ctcaagaagc cgggagccag cgtgaaggtg 60

tcttgaagg ccagcgctc caccttcacc acatacggca tggcctggat gaagcagget 120

cctggccagg gcctgacctg gatgggatgg atcaacacc tgtccggcga gcttacctac 180

gccgatgact tcaagggcag gttcgccttc tcctggaca cctccgtgtc caccgcttac 240  
 ctgcagatct cctccctgaa ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagggagccc 300  
 atggactact ggggccaggg caccatggtg accgtgtcct cc 342

<210> 47

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 47

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

Ala His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 48

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 48

gatgtggtga tgacacagtc tcctctgtct ctgccagtga cactgggaca gccagcttct 60

atctcttgca agtcctetca gtctctgtct gattccgacg gaaagaccta tetgtcttgg 120

ctgcagcaga gaccaggaca gtctctctaga agactgatct acctggtgtc caagctggat 180

tctggagtgc cagatagatt ttccggctcc ggctctggca cagatttcac cctgaagatc 240  
 tctagagtgg aggcagaaga cgtgggagtg tactattggtt ggcagggagc tacttcctcct 300  
 ctgacatttg gacaggaac aaagctggag atcaag 336

<210> 49

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 49

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

1                    5                    10                    15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20                    25                    30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35                    40                    45

Pro Arg Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85                    90                    95

Ala His Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100                    105                    110

<210> 50

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 50

gatgtggtga tgacacagtc tcctctgtct ctgccagtga cactgggaca gccagettct 60

atctcttgca agtcctetca gtctctgctg gattccgacg gaaagaccta tetgtcttgg 120

ctgcagcaga gaccaggaca gtctctctaga agactgatct ccctggtgtc taagctggat 180

tccggagtgc cagatagatt ttccggatct ggatctggca ccgattttac cctgaagatc 240  
 tctagagtgg aggcagaaga cgtgggagtg tactattggtt ggcagggagc tcacttcctt 300  
 ctgacatttg gacaggaac aaagctggag atcaag 336

<210> 51

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asp Gly Asp Ser Gly Tyr Ser His Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Gly Phe Thr Thr Val Val Ala Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 52

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 52

caagttcagc tggatgcagtc cggagccgag gtgaagaagc cggcgcttc cgtgaaggtg 60

tcttgaagg cctccggcta ctccttcacc gattactaca tgaactgggt gaggcaagct 120  
 cccggtaag gtctggagt gatggcgac atcaaccca aggacggcga ctccggetat 180  
 tcccacaagt tcaagggtcg tgtgacatg accagggaca cgtccaccag caccgtgtac 240  
 atggagctgt cctctttaag gtccgaggac accgccgtgt actactgcmc cagcggattc 300  
 accaccgtgg tggctagggg cgactattgg ggccaaggta ccaccgtgac agtgtccagc 360

<210> 53

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 53

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asp Gly Asp Ser Gly Tyr Ser His Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val 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 Gly Phe Thr Thr Val Val Ala Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 54

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 54

caagttcagc tggatgcagtc cggagccgag gtgaagaagc ccggcgcttc cgtgaaggtg 60

tcttgaagg cctccggeta ctccttcacc gattactaca tgaactgggt gaggcaagct 120

cccggtaag gtctggagtg gatgggcgac atcaaccca aggacggcga ctccggctat 180

tcccacaagt tcaagggtcg tgtgaccatg accgtggaca agtccaccag caccgtgtac 240

atggagctgt cctctttaag gtccgaggac accgccgtgt actactgcgc cagcggattc 300

accaccgtgg tggctagggg cgactattgg ggccaaggta ccaccgtgac agtgtccagc 360

<210> 55

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 55

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asp Gly Asp Ser Gly Tyr Ser His Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Ser Gly Phe Thr Thr Val Val Ala Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 56

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 56

caagctcagc tggatgcagtc cggcgctgag gtgaaaaagc cggcgccag cgtgaagtg 60

tcttgtaagg cctccggcta ctcttcacc gactactaca tgaactgggt gaggcaagct 120

cccggtaag gtctggagtg gatggcgac atcaacccca aggacggcga cagcggctac 180

tcccacaagt tcaagggctg tgtgacttta accgtggaca agtccacctc caccgtctac 240

atggagctga ggtctttaag gtccgaggat accgccgtgt actactgcgc tagcggcttc 300

accaccgtgg tggctcgtgg cgattactgg ggacaaggta ccaccgtgac cgtgtcctcc 360

<210> 57

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 57

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

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

                  20                    25                    30  
Tyr Met Asn Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

                  35                    40                    45  
Gly Asp Ile Asn Pro Lys Asp Gly Asp Ser Gly Tyr Ser His Lys Phe

                  50                    55                    60  
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr

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

                  85                    90                    95  
Ala Ser Gly Phe Thr Thr Val Val Ala Arg Gly Asp Tyr Trp Gly Gln

                  100                    105                    110  
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

                  115                    120  
<210> 58

<211> 360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 58

caagctcaac tggatgcagtc cggcgccgag gtgaaaaagc ccggtgcctc cgtgaaggtg 60

agctgcaagg cctccggcta ctccittacc gactactaca tgaactggct gaggcaagct 120

cccggtaac gtctggagtg gatcggcgat atcaacccca aggacggcga ctccggctac 180

agccataagt tcaagggtcg tgccacttta accgtggaca agtccaccag caccgtgtac 240

atggagctga ggtctttaag gtccgaggac accgccgtgt actactgcgc ctccggcttc 300

accacagtgg tggctcgtgg cgactattgg ggccaaggta ccaccgtgac cgtgagctcc 360

<210> 59

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 59

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

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

100 105 110

<210> 60

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 60

gatgtggtga tgacacagtc tcctctgtct ctgccagtga cactgggaca gccagcttct 60

atctcttgca agtcctctca gtctctgctg gattccgacg gaaagaccta cctgaattgg 120

ctgcagcaga gaccaggaca gtctcctaga agactgatct acctggtgtc caagctggat 180

tctggagtgc cagatagatt ttccggctcc ggctctggca cagatttcac cctgaagatc 240

tctagagtgg aggcagaaga cgtgggagtg tactattggt ggcagggaac ccacttcct 300

tacacatttg gaggaggcac aaaggtggag atcaag 336

<210> 61

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 61

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

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

100 105 110

<210> 62

<211> 336  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 62  
 gatgtggtga tgacacagtc tcctctgtct ctgccagtga cactgggaca gccagcttct 60  
  
 atctcttgca agtcctctca gtctctgctg gattccgacg gaaagaccta cctgaattgg 120  
 ctgcagcaga gaccaggaca gtctcctaga agactgatct acctggtgtc caagctggat 180  
 tctggattcc cagatagatt ttccggctcc ggctctggca cagatttcac cctgaagatc 240  
 tctagagtgg aggcagaaga cgtgggagtg tactattggt ggcagggaac ccacttcct 300  
 tacacatttg gaggaggcac aaagtgaggag atcaag 336

<210> 63  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 63  
 Asn Ser Phe Tyr Ile Pro Arg His Ile Arg Lys Glu Glu Gly Ser Phe

1 5 10 15  
 Gln Ser Cys Ser Phe  
 20

<210> 64  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Pan troglodytes  
 <400> 64  
 Phe Ser Tyr Ser Val Pro Asn Thr Phe Pro Gln Ser Thr Glu Ser Leu

1 5 10 15  
 Val His Cys Asp Ser  
 20

<210> 65  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 65

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Gly Val His

1                    5                    10                    15

Ser

<210> 66

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Met Ser Arg Thr Ala Tyr Thr Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Gly

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

Ile Pro Pro Pro Asp Lys Ala Gln His Asn Asp Ser Glu Gln Thr Gln

35                    40                    45

Ser Pro Gln Gln Pro Gly Ser Arg Asn Arg Gly Arg Gly Gln Gly Arg

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Leu His Val Thr Glu Arg Lys Tyr Leu Lys Arg Asp Trp Cys Lys Thr

85                    90                    95

Gln Pro Leu Lys Gln Thr Ile His Glu Glu Gly Cys Asn Ser Arg Thr

100                    105                    110

Ile Ile Asn Arg Phe Cys Tyr Gly Gln Cys Asn Ser Phe Tyr Ile Pro

115                    120                    125

Arg His Ile Arg Lys Glu Glu Gly Ser Phe Gln Ser Cys Ser Phe Cys

130                    135                    140

Lys Pro Lys Lys Phe Thr Thr Met Met Val Thr Leu Asn Cys Pro Glu

145                    150                    155                    160

Leu Gln Pro Pro Thr Lys Lys Lys Arg Val Thr Arg Val Lys Gln Cys

165 170 175

Arg Cys Ile Ser Ile Asp Leu Asp

180

<210> 67

<211> 184

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 67

Met Asn Arg Thr Ala Tyr Thr Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Pro Pro Pro Asp Lys Ala Gln His Asn Asp Ser Glu Gln Thr Gln

35 40 45

Ser Pro Pro Gln Pro Gly Ser Arg Thr Arg Gly Arg Gly Gln Gly Arg

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu His Val Thr Glu Arg Lys Tyr Leu Lys Arg Asp Trp Cys Lys Thr

85 90 95

Gln Pro Leu Lys Gln Thr Ile His Glu Glu Gly Cys Asn Ser Arg Thr

100 105 110

Ile Ile Asn Arg Phe Cys Tyr Gly Gln Cys Asn Ser Phe Tyr Ile Pro

115 120 125

Arg His Ile Arg Lys Glu Glu Gly Ser Phe Gln Ser Cys Ser Phe Cys

130 135 140

Lys Pro Lys Lys Phe Thr Thr Met Met Val Thr Leu Asn Cys Pro Glu

145 150 155 160

Leu Gln Pro Pro Thr Lys Lys Lys Arg Val Thr Arg Val Lys Gln Cys

165 170 175

Arg Cys Ile Ser Ile Asp Leu Asp

180

<210> 68

<211> 184

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 68

Met Ser Arg Thr Ala Tyr Thr Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Gly

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

Ile Pro Pro Pro Asp Lys Ala Gln His Asn Asp Ser Glu Gln Thr Gln

35                    40                    45

Ser Pro Gln Gln Pro Gly Ser Arg Asn Arg Gly Arg Gly Gln Gly Arg

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Leu His Val Thr Glu Arg Lys Tyr Leu Lys Arg Asp Trp Cys Lys Thr

85                    90                    95

Gln Pro Leu Lys Gln Thr Ile His Glu Glu Gly Cys Asn Ser Arg Thr

100                    105                    110

Ile Ile Asn Arg Phe Cys Tyr Gly Gln Cys Phe Ser Tyr Ser Val Pro

115                    120                    125

Asn Thr Phe Pro Gln Ser Thr Glu Ser Leu Val His Cys Asp Ser Cys

130                    135                    140

Lys Pro Lys Lys Phe Thr Thr Met Met Val Thr Leu Asn Cys Pro Glu

145                    150                    155                    160

Leu Gln Pro Pro Thr Lys Lys Lys Arg Val Thr Arg Val Lys Gln Cys

165                    170                    175

Arg Cys Ile Ser Ile Asp Leu Asp

180

<210> 69

<211> 160

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Lys Lys Lys Gly Ser Gln Gly Ala Ile Pro Pro Pro Asp Lys Ala Gln  
 1                    5                    10                    15  
 His Asn Asp Ser Glu Gln Thr Gln Ser Pro Gln Gln Pro Gly Ser Arg  
                   20                    25                    30  
 Asn Arg Gly Arg Gly Gln Gly Arg Gly Thr Ala Met Pro Gly Glu Glu  
                   35                    40                    45

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

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

<210> 70

<211> 160

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 70

Lys Lys Lys Gly Ser Gln Gly Ala Ile Pro Pro Pro Asp Lys Ala Gln  
 1                    5                    10                    15  
 His Asn Asp Ser Glu Gln Thr Gln Ser Pro Pro Gln Pro Gly Ser Arg



1                    5                    10                    15  
 Thr Leu Leu Pro Thr Ala Glu Gly

20

<210> 73

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 73

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

<210> 74

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 74

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

1                    5                    10

<210> 75

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 75

Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

<210> 76

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 76

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1                    5                    10

<210> 77

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 77

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

<210> 78

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 78

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

<210> 79

<211> 32

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 79

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

1                    5                    10                    15  
 Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser  
                   20                    25                    30

<210> 80  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 80

Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1                    5                    10

<210> 81  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 81

Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu  
 1                    5                    10                    15  
 Leu Arg Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser  
                   20                    25                    30

<210> 82  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 82

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

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

<210> 83  
 <211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 83

Trp Met Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly

1                    5                    10

<210> 84

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 84

Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 85

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1                    5                    10

<210> 86

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 86

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

1                    5                    10                    15

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

20 25 30

<210> 87

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 87

Arg Phe Ala Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 88

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 88

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 89

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 89

Trp Met Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Thr Trp Met Gly

1 5 10

<210> 90

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 90

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

<210> 91

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 91

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

<210> 92

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 92

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1                    5                    10

<210> 93

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 93

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

1                    5                    10                    15

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

20 25 30

<210> 94

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 94

Arg Val Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 95

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 95

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

1 5 10

<210> 96

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 96

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

1 5 10

<210> 97

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Synthetic

<220><221> misc\_feature

<222> (2)..(2)  
 <223> Xaa is Val, Ile or Ala.  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Xaa is Ala or Ser.  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa is Val or Leu.  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (27)..(28)  
 <223> Xaa at position 27 is Tyr or Ser, and Xaa at position 28 is Thr  
 or Ser.  
 <400> 97  
 Gln Xaa Gln Leu Val Gln Ser Gly Xaa Glu Xaa Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                    5                    10                    15  
  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Xaa Xaa Phe Thr  
                   20                    25                    30  
 <210> 98  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (2)..(3)  
 <223> Xaa at position 2 is Val, Leu or Met, and Xaa at position 3 is  
 Arg or Lys.  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Xaa is Gln or Lys.  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa is Glu or Thr.  
 <220><221> misc\_feature

<222> (13)..(13)

<223> Xaa is Met or Ile.

<400> 98

Trp Xaa Xaa Gln Ala Pro Gly Xaa Gly Leu Xaa Trp Xaa Gly

1                    5                    10

<210> 99

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc\_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Val or Ala.

<220><221> misc\_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa is Met or Leu.

<220><221> misc\_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Arg or Val.

<220><221> misc\_feature

<222> (8)..(8)

<223> Xaa is Thr or Lys.

<220><221> misc\_feature

<222> (18)..(18)

<223> Xaa is Ser or Arg.

<400> 99

Arg Xaa Thr Xaa Thr Xaa Asp Xaa Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

<210> 100

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc\_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa is Thr, Met or Leu.

<400> 100

Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val Ser Ser

1                    5                    10

<210> 101

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 101

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

1                    5                    10                    15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys

20

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 102

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

1                    5                    10                    15

<210> 103

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 103

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1                    5                    10                    15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 104  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 104

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 1 5 10

<210> 105  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 105

Gly Phe Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 106  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 106

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 1 5 10

<210> 107  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic

<400> 107  
 Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Ser  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 108  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400>  
 > 108  
 Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile Tyr  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 109  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 109  
 Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 110  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 110  
 Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr  
 1                    5                    10                    15  
 <210> 111  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <220><221> misc\_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Leu, Phe or Tyr.

<220><221> misc\_feature

<222> (12)..(12)

<223> Xaa is Arg or Leu.

<220><221> misc\_feature

<222> (15)..(15)

<223> Xaa is Tyr or Ser.

<400> 111

Trp Xaa Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Arg Xaa Leu Ile Xaa

1                    5                    10                    15

<210> 112

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc\_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Val or Phe.

<400> 112

Gly Xaa Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1                    5                    10                    15

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

                  20                    25                    30

<210> 113

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Synthetic

<220><221> misc\_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Gly or Gln.

<220><221> misc\_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is Val or Leu.

<400> 113

Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Xaa Glu Ile Lys

1                    5                    10

<210> 114

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 114

Ser Ser Gly Ile Gly

1                    5

<210> 115

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 115

Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Asn Asn Glu Lys Phe Lys

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 116

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 116

Glu Ala Tyr Ser His His Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1                    5                    10

<210> 117

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 117

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1                    5                    10                    15

<210> 118

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 118

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr

1                    5

<210> 119

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 119

Ser Tyr Gly Ile Gly

1                    5

<210> 120

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 120

Glu Gly Tyr Ser Asn Asn Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1                    5                    10

<210> 121

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 121

Ile Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1                    5                    10                    15

<210> 122

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 122

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1                    5                    10                    15

<210> 123

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc\_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Ser or Tyr.

<400> 123

Ser Xaa Gly Ile Gly

1                    5

<210> 124

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc\_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa is Ala or Gly.

<220><221> misc\_feature

<222> (5)..(6)

<223> Xaa at position 5 is His or Asn, and Xaa at position 6 is His or

Asn.

<400> 124

Glu Xaa Tyr Ser Xaa Xaa Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr

1                    5                    10

<210> 125

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc\_feature

<222> (1)..(1)

<223> Xaa is Arg or Ile.

<220><221> misc\_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa is Leu or Val.

<400> 125

Xaa Ser Ser Gln Ser Leu Xaa His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1                    5                    10                    15

<210> 126

<211

> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 126

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

Gly Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35                    40                    45

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Asn Asn Glu Lys Phe

50

55

60



<220><223> Synthetic

<400> 128

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

Gly Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

                  35                    40                    45

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Asn Asn Glu Lys Phe

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Ile Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

                  85                    90                    95

Ala Arg Glu Gly Tyr Ser Asn Asn Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

                  100                    105                    110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Phe Ser

                  115                    120

<210> 129

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 129

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

1                    5                    10                    15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Ile Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

                  50                    55                    60

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

<210> 130

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 130

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

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

<210> 131

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 131

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Ala Arg Asp Pro Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Glu Val Ala Tyr Trp Gly

                  100                    105                    110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

                  115                    120

<210> 132

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 132

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80  
 Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                                  85                    90                    95  
 Ala Arg Asp Pro Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Glu Val Ala Tyr Trp Gly  
                                  100                    105                    110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                                  115                    120  
 <210> 133  
 <211> 121  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 133

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

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

<210> 134

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 134

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

                  35                    40                    45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Ala Arg Asp Pro Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Glu Val Ala Tyr Trp Gly

                  100                    105                    110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

                  115                    120

<210> 135

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 135

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

1                    5                    10                    15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

                  20                    25                    30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

                  35                    40                    45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro



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

1                    5                    10                    15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

                  20                    25                    30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

                  35                    40                    45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser

                  85                    90                    95

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

                  100                    105                    110

<210> 138

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 138

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 139

<211> 107

<212>

PRT

<213> Homo sapiens

<400> 139

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

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

<210> 140

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<220><221> misc\_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa is Val or Ala.

<400> 140

Arg Phe Xaa Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr Leu Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
                   20                    25                    30

<210> 141

<211> 32



<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 143

```

gatgttttga tgacccaac tectctctcc ctgcctgtca gtcttggagg tcaagcctcc      60
atctcttgcga gatctagtca gaccccttcta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg    120
tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt      180
tctgggggcc cagacaggct cagtggcagt ggatcagggga cagattttac actcaagatc    240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcca    300
ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaat                                336
    
```

<210> 144

<

211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 144

```

caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ctggggcttc agtgaagctg      60
tctctcaagg ctctcgcta caccttcaca agctatggta taggctgggt gaagcagaga    120
actggacagg gccttgagtg gattggagag atttatccta gaagtggtaa tacttacaac     180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag aacagtgtac     240
atggagctcc gcagtctgat atctgaggac tctgcggtct acttttgtgc aagagagggc    300
tatagtaaca attactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtcttc     360
    
```

tca 363

<210> 145

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 145

```

gatgttttga tgacccaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc      60
atctcttgcga tatctagtca gaccccttcta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg    120
tacctgcaga aaccaggcct gtctccaaaa ctctgatct acaaagtttc caaccgattt      180
tctgggggcc cagacaggct cagtggcagt ggatcagggga cagatttcac actcaggatc    240
    
```

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcca 300

ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa 336

<210> 146

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 146

caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ctggggcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg ctcttgcta caccttcaca agttatggta taggctgggt gaagcagaga 120

actggacagg gccttgagtg gattggagag atttatccta gaagtggtaa tacttacaac 180

aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcggaca aatcctccag aacagtgtac 240

atggagctcc gcagtctgat atctgaggac tctgcggtct acttttgtgc aagagagggc 300

tatagtaaca attactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtcttc 360

tca 363

<210> 147

<211> 336

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 147

gatgttttga tgaccxaaac tccactctcc ctgctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagta gagccttgta catagtaatg gaaacaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctggggtcc cagacaggct cagtggcagt ggatcagggc cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttcca 300

ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa 336

<210> 148

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 148

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                    5                    10                    15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Val Phe Thr Asp Tyr  
                   20                    25                    30

Tyr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Ser Leu Glu Trp Met  
                   35                    40                    45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Ala Glu Thr Leu Tyr Asn His Lys Phe  
                   50                    55                    60

Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Val Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95

Val Lys Trp Gly Asp Gly Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
                   100                    105                    110

Val Thr Val Ser Ser  
                   115

<210> 149

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 149

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

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

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

Tyr Ser Val Ser Asp Arg Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                    55                    60

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



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

405 410 415  
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

420 425 430  
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435 440 445  
 Lys

<210> 151

<211> 218

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 151

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ile Tyr

20 25 30  
 Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

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

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

65 70 75 80  
 Pro Val Glu Ala Gln Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Thr

85 90 95  
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110  
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

115 120 125  
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

130 135 140

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

145                      150                      155                      160

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

165                      170                      175

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

180                      185                      190

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

195                      200                      205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210                      215