



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0079148  
(43) 공개일자 2023년06월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/18 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)  
C07K 16/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/18 (2013.01)  
C07K 16/22 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7014355
- (22) 출원일자(국제) 2021년09월28일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년04월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/052338
- (87) 국제공개번호 WO 2022/067233  
국제공개일자 2022년03월31일
- (30) 우선권주장  
63/084,241 2020년09월28일 미국(US)

- (71) 출원인  
조에티스 서비스즈 엘엘씨  
미국 뉴저지 (우편번호 07054) 파시파니 실반 웨이 10
- (72) 발명자  
버게론 리사 마리  
미국 미시간주 49007 칼라마주 포티지 스트리트 333 조에티스 서비스즈 엘엘씨  
캄포스 헨리 루이스  
미국 미시간주 49007 칼라마주 포티지 스트리트 333 조에티스 서비스즈 엘엘씨
- (74) 대리인  
제일특허법인(유)

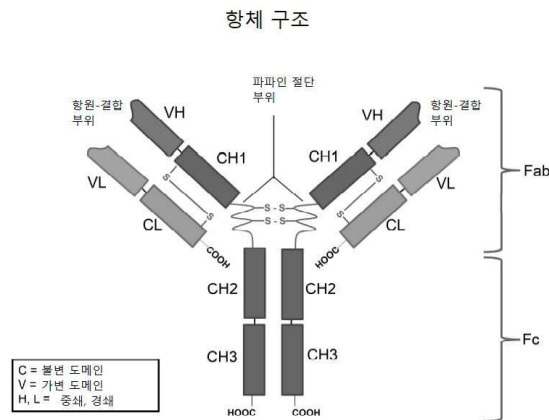
전체 청구항 수 : 총 82 항

(54) 발명의 명칭 개과 항체 변이체

(57) 요약

발명은 일반적으로 개과 항체 변이체 및 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 발명은 그 반감기 및 기타 특성을 개선하기 위한 개과 항체의 불변 영역에서의 돌연변이에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2039/545 (2013.01)

C07K 2317/20 (2013.01)

C07K 2317/52 (2013.01)

C07K 2317/526 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

C07K 2317/94 (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

변형된 IgG로서, 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하되, 상기 치환은 카바트(Kabat)에서와 같이 EU 색인에 따라 넘버링된, 아미노산 잔기 434에서 이루어지는, 변형된 IgG.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 치환은 위치 434의 아스파라긴의 히스티딘으로의 치환(N434H)인, 변형된 IgG.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 변형된 IgG는 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 IgG의 반감기와 비교해 증가된 반감기를 갖는, 변형된 IgG.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 변형된 IgG는 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 IgG보다 FcRn에 대해 더 높은 친화도를 갖는, 변형된 IgG.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 변형된 IgG는 개과 또는 개과화된 IgG인, 변형된 IgG.

#### 청구항 6

제1항에 있어서, IgG는 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub>, 또는 IgG<sub>D</sub>인, 변형된 IgG.

#### 청구항 7

제1항에 있어서, IgG 불변 도메인은 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub>, 또는 IgG<sub>D</sub>의 불변 도메인인, 변형된 IgG.

#### 청구항 8

제1항에 있어서, IgG 불변 도메인은 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 변형된 IgG.

#### 청구항 9

제1항에 있어서, IgG 불변 도메인은 CH2 또는 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 변형된 IgG.

#### 청구항 10

제1항에 있어서, IgG 불변 도메인은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 변형된 IgG.

#### 청구항 11

제1항의 변형된 IgG 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

#### 청구항 12

용기에 제1항의 변형된 IgG 및 사용 설명서를 포함하는 키트.

#### 청구항 13

폴리펩티드로서, 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하되, 상기 치환은 카바트에서와 같이 EU 색인에 따라 넘버링된, 아미노산 잔기 434에서

이루어지는, 폴리펩티드.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 상기 치환은 위치 434의 아스파라긴의 히스티딘으로의 치환(N434H)인, 폴리펩티드.

**청구항 15**

제13항에 있어서, 폴리펩티드는 야생형 개과 IgG 불변 도메인의 폴리펩티드의 반감기와 비교해 증가된 반감기를 갖는, 폴리펩티드.

**청구항 16**

제13항에 있어서, 폴리펩티드는 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 IgG보다 FcRn에 대해 더 높은 친화도를 갖는, 변형된 IgG.

**청구항 17**

제13항에 있어서, 폴리펩티드는 개과 또는 개과화된 IgG의 폴리펩티드인, 폴리펩티드.

**청구항 18**

제17항에 있어서, IgG는 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub>, 또는 IgG<sub>D</sub>인, 폴리펩티드.

**청구항 19**

제13항에 있어서, IgG 불변 도메인은 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub>, 또는 IgG<sub>D</sub>의 불변 도메인인, 폴리펩티드.

**청구항 20**

제13항에 있어서, IgG 불변 도메인은 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 폴리펩티드.

**청구항 21**

제13항에 있어서, IgG 불변 도메인은 CH2 또는CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 폴리펩티드.

**청구항 22**

제13항에 있어서, IgG 불변 도메인은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 폴리펩티드.

**청구항 23**

제13항의 폴리펩티드 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

**청구항 24**

용기에 제13항의 폴리펩티드 및 사용 설명서를 포함하는 키트.

**청구항 25**

항체로서, 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하되, 상기 치환은 카바에서와 같이 EU 색인에 따라 넘버링된, 아미노산 잔기 434에서 이루어지는, 항체.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 상기 치환은 위치 434의 아스파라긴의 히스티딘으로의 치환(N434H)인, 항체.

**청구항 27**

제25항에 있어서, 항체는 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 항체의 반감기와 비교해 증가된 반감기를 갖는, 항체.

**청구항 28**

제25항에 있어서, 항체는 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 항체보다 FcRn에 대해 더 높은 친화도를 갖는, 항체.

**청구항 29**

제25항에 있어서, 항체는 개과 또는 개과화된 항체인, 항체.

**청구항 30**

제25항에 있어서, 항체는 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub>, 또는 IgG<sub>D</sub>인, 항체.

**청구항 31**

제25항에 있어서, IgG 불변 도메인은 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub>, 또는 IgG<sub>D</sub>의 불변 도메인인, 항체.

**청구항 32**

제25항에 있어서, IgG 불변 도메인은 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 항체.

**청구항 33**

제25항에 있어서, IgG 불변 도메인은 CH2 또는 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 항체.

**청구항 34**

제25항에 있어서, IgG 불변 도메인은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 항체.

**청구항 35**

제25항의 항체 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

**청구항 36**

용기에 제25항의 항체 및 사용 설명서를 포함하는 키트.

**청구항 37**

서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 벡터.

**청구항 38**

제37항의 벡터를 포함하는 단리된 세포.

**청구항 39**

항체 또는 분자를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은 제38항의 세포를 제공하는 단계; 및 상기 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 40**

항체를 제조하는 방법으로서, 상기 방법은 제25항 내지 제34항 중 어느 한 항의 항체를 제공하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 41**

개에서 항체 혈청 반감기를 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 항체의 치료학적으로 유효한 양을 상기 개에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하되, 상기 치환은 카바트에서와 같이 EU 색인에 따라 넘버링된, 아미노산 잔기 434에서 이루어지는, 방법.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 상기 치환은 위치 434의 아스파라긴의 히스티딘으로의 치환(N434H)인, 방법.

**청구항 43**

제41항에 있어서, 항체는 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 항체의 반감기와 비교해 증가된 반감기를 갖는, 방법.

**청구항 44**

제41항에 있어서, 항체는 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 항체보다 FcRn에 대해 더 높은 친화도를 갖는, 방법.

**청구항 45**

제41항에 있어서, 항체는 개과 또는 개과화된 항체인, 방법.

**청구항 46**

제41항에 있어서, 항체는 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub>, 또는 IgG<sub>D</sub>인, 방법.

**청구항 47**

제41항에 있어서, IgG 불변 도메인은 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub>, 또는 IgG<sub>D</sub>의 불변 도메인인, 방법.

**청구항 48**

제41항에 있어서, IgG 불변 도메인은 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 방법.

**청구항 49**

제41항에 있어서, IgG 불변 도메인은 CH2 또는 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 방법.

**청구항 50**

제41항에 있어서, IgG 불변 도메인은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

**청구항 51**

융합 분자로서, 제제에 융합된 개과 IgG 불변 도메인을 포함하고, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하되, 상기 치환은 카바트에서와 같이 EU 색인에 따라 넘버링된, 아미노산 잔기 434에서 이루어지는, 융합 분자.

**청구항 52**

제51항에 있어서, 상기 치환은 위치 434의 아스파라긴의 히스티딘으로의 치환(N434H)인, 분자.

**청구항 53**

제51항에 있어서, 분자는 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 분자의 반감기와 비교해 증가된 반감기를 갖는, 분자.

**청구항 54**

제51항에 있어서, 분자는 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 항체보다 FcRn에 대해 더 높은 친화도를 갖는, 분자.

**청구항 55**

제51항에 있어서, 분자는 개과 또는 개과화된 항체를 포함하는, 분자.

**청구항 56**

제51항에 있어서, 분자는 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub>, 또는 IgG<sub>D</sub>를 포함하는, 분자.

**청구항 57**

제51항에 있어서, IgG 불변 도메인은 IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub>, 또는 IgG<sub>D</sub>의 불변 도메인인, 분자.

**청구항 58**

제51항에 있어서, IgG 불변 도메인은 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 분자.

**청구항 59**

제51항에 있어서, IgG 불변 도메인은 CH2 또는 CH3 도메인을 갖는 Fc 불변 영역을 포함하는, 분자.

**청구항 60**

제51항에 있어서, IgG 불변 도메인은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하는, 분자.

**청구항 61**

제51항의 분자 및 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

**청구항 62**

용기에 제51항의 분자 및 사용 설명서를 포함하는 키트.

**청구항 63**

변형된 IgG로서, 서열번호 1, 65, 또는 66에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하되, 변형된 IgG는 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 IgG의 반감기와 비교해 증가된 반감기를 갖는, 변형된 IgG.

**청구항 64**

제63항에 있어서, 증가된 반감기는 약 25일 내지 약 35일의 범위인 기간 동안인, 변형된 IgG.

**청구항 65**

제63항에 있어서, 증가된 반감기는 약 30일 동안인, 변형된 IgG.

**청구항 66**

변형된 IgG로서, 서열번호 1, 65, 또는 66에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하되, 변형된 IgG는 장기간 동안 그의 치료 수준을 유지하는, 변형된 IgG.

**청구항 67**

제66항에 있어서, 변형된 IgG는 약 1개월 내지 약 7개월의 범위인 기간에 걸쳐 그의 치료 수준을 유지하는, 변형된 IgG.

**청구항 68**

제66항에 있어서, 변형된 IgG는 개과 대상체에게 상기 IgG의 피하 전달시 상기 기간에 걸쳐 그의 치료 수준을 유지하는, 변형된 IgG.

**청구항 69**

항체로서, 서열번호 1, 65, 또는 66에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하되, 항체는 야생형 개과 IgG 불변 도메인을 갖는 항체의 반감기와 비교해 증가된 반감기를 갖는, 항체.

**청구항 70**

제69항에 있어서, 증가된 반감기는 약 25일 내지 약 35일의 범위인 기간 동안인, 항체.

**청구항 71**

제69항에 있어서, 증가된 반감기는 약 30일 동안인, 항체.

**청구항 72**

항체로서, 서열번호 1, 65, 또는 66에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하되, 항체는 장기간 동안 그의 치료 수준을 유지하는, 항체.

**청구항 73**

제66항에 있어서, 항체는 약 1개월 내지 약 7개월의 범위인 기간에 걸쳐 그의 치료 수준을 유지하는, 항체.

**청구항 74**

제66항에 있어서, 항체는 개과 대상체에게 상기 항체의 피하 전달시 상기 기간에 걸쳐 그의 치료 수준을 유지하는, 항체.

**청구항 75**

제25항 내지 제34항 및 제69항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 항-IL31, 항-NGF 항체, 또는 항-TGF $\beta$  항체인, 항체.

**청구항 76**

개에서 항체 혈청 반감기를 증가시키는 방법으로서, 상기 방법은 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 항체의 치료학적으로 유효한 양을 상기 개에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하되, 상기 치환은 카바트에서와 같이 EU 색인에 따라 넘버링된, 아미노산 잔기 434에서 이루어지고, 상기 항체는 항-TGF $\beta$  항체인, 방법.

**청구항 77**

제76항에 있어서, 상기 치환은 위치 434의 아스파라긴의 히스티딘으로의 치환(N434H)인, 방법.

**청구항 78**

개에서 항체의 치료 혈청 수준을 유지하는 방법으로서, 상기 방법은 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 항체의 치료학적으로 유효한 양을 상기 개에게 투여하는 단계를 포함하며, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하되, 상기 치환은 카바트에서와 같이 EU 색인에 따라 넘버링된, 아미노산 잔기 434에서 이루어지고, 상기 항체는 항-TGF $\beta$  항체인, 방법.

**청구항 79**

제78항에 있어서, 상기 치환은 위치 434의 아스파라긴의 히스티딘으로의 치환(N434H)인, 방법.

**청구항 80**

개과 대상체에서 TGF $\beta$ -매개된 질환 또는 병태를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 대상체에게 제75항의 항-TGF $\beta$  항체의 치료학적으로 유효한 양을 투여하고, 이에 의해 상기 개과 대상체에서 상기 TGF $\beta$ -매개된 질환 또는 병태를 치료하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 81**

제80항에 있어서, TGF $\beta$ -매개된 질환은 만성 신장 질환인, 방법.

**청구항 82**



제80항에 있어서, 항체는 격월, 3개월에 1회, 4개월에 1회, 5개월에 1회, 6개월에 1회, 또는 7개월에 1회 투여되는, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 출원은 2020년 9월 28일자로 출원된 미국 가특허 출원 제63/084241호에 대한 우선권 및 그 이익을 주장하며, 이는 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0002] **발명의 기술분야**

[0003] 발명은 일반적으로 개과 항체 변이체 및 이의 용도에 관한 것이다. 구체적으로, 발명은 반감기 개선을 위한 개과 항체의 Fc 불변 영역에서의 돌연변이에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0004] 개과 IgG 모노클로날 항체(mAb)는 수의학에서 효과적인 치료제로 개발되고 있다. 수년 전, 4개의 개과 IgG 서브클래스가 식별되어 규정되었다(Bergeron 등의 문헌(2014)[*Vet Immunol Immunopathol.*, vol. 157(1-2), 페이지 31-41]). 그러나, 개과 IgG의 반감기를 연장시키는 것에 대한 연구는 많이 이루어지지 않았다.

[0005] 재순환 메커니즘을 통해, 신생아 Fc 수용체(FcRn)는 그 단편 결정화가능(Fc) 영역과의 pH-의존적 상호작용에서 IgG의 반감기를 연장시킨다. 구체적으로, CH2 및 CH3 도메인의 계면에 걸쳐 있는 Fc 영역은 세포의 표면 상의 FcRn과 상호작용하여 IgG 항상성을 조절한다. 이 상호작용은 IgG 음세포작용 후 산성 상호작용에 의해 선호되며, 따라서 IgG가 분해로부터 보호된다. 그 뒤에, 세포 내 이입된 IgG는 세포 표면으로 다시 재순환되고 알칼리성 pH로 혈류 내로 방출되어 적절한 기능을 위한 충분한 혈청 IgG를 유지한다. 따라서, IgG의 약동학적 프로파일은 그의 Fc 영역의 구조적 및 기능적 특성에 달려있다.

[0006] 3개의 개과 IgG 서브클래스가 개과 FcRn과 결합하고 인간 IgG 유사체와 비교되었다. 개과 IgG의 반감기는 임의의 실험적 뒷받침 없이는 그것이 인간 IgG와 밀접하게 관련이 있을지 여부를 예상하거나 예측할 수 없기 때문에 충분히 연구되어야 한다.

[0007] IgG의 연장된 반감기는 항체 약물의 더 적은 빈도의 투여 및/또는 더 낮은 용량을 허용할 수 있으며, 이는 결과적으로 수의과 방문을 감소시키고, 환자의 순응도를 개선하고, 농도-의존적인 세포독성/부작용을 낮춘다.

[0008] 따라서, 반감기를 개선하기 위해 Fc 불변 영역에서의 돌연변이를 식별할 필요가 존재한다.

**발명의 내용**

[0009] 발명은 야생형 개과 IgG에 비해 더 높은 FcRn 친화도 및 더 높은 반감기를 제공하는 돌연변이체 개과 IgG에 관한 것이다. 구체적으로, 본 출원의 발명자들은 위치 434의 아미노산 잔기 아스파라긴(Asn 또는 N)을 다른 아미노산으로 치환하는 것이 놀랍게도, 그리고 뜻밖에도 FcRn에 대한 친화도를 증진시키고, 이로 인해 IgG의 반감기가 증가됨을 발견하였다.

[0010] 일 양태에서, 발명은 변형된 IgG로서, 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하되, 상기 치환은 카바트(Kabat)에서와 같이 EU 색인에 따라 넘버링된, 아미노산 잔기 434에서 이루어지는 변형된 IgG를 제공한다. 예시적인 실시형태에서, 상기 치환은 위치 434의 아스파라긴의 히스티딘으로의 치환이다.

[0011] 다른 양태에서, 발명은 폴리펩티드로서, 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하되, 상기 치환은 카바트(Kabat)에서와 같이 EU 색인에 따라 넘버링된, 아미노산 잔기 434에서 이루어지는, 폴리펩티드를 제공한다.

[0012] 또 다른 양태에서, 발명은 항체 또는 분자로서, 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하되, 상기 치환은 카바트(Kabat)에서와 같이 EU 색인에 따라 넘버링된, 아미노산 잔기 434에서 이루어지는, 항체 또는 분자를 제공한다.

[0013] 추가 양태에서, 발명은 항체 또는 분자를 생산 또는 제조하는 방법을 제공하며, 본 방법은 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는 항체를 갖는 숙주 세포 또는 벡터를 제공하는 단계를 포함하며, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 야

생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하되, 상기 치환은 카밧(Kabat)에서와 같이 EU 색인에 따라 넘버링된, 아미노산 잔기 434에서 이루어진다.

[0014] 다른 양태에서, 발명은 개에서 항체 혈청 반감기를 증가시키는 방법을 제공하며, 본 방법은 상기 개에게 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는, 치료학적으로 유효한 양의 항체를 투여하는 단계를 포함하며, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하되, 상기 치환은 카밧(Kabat)에서와 같이 EU 색인에 따라 넘버링된, 아미노산 잔기 434에서 이루어진다. 예시적인 실시형태에서, 항체는 약 30일 동안 반감기를 증가시킨다.

[0015] 다른 양태에서, 발명은 개에서 항체의 치료 혈청 수준을 유지하는 방법을 제공하며, 본 방법은 상기 개에게 개과 IgG 불변 도메인을 포함하는, 치료학적으로 유효한 양의 항체를 투여하는 단계를 포함하며, 상기 개과 IgG 불변 도메인은 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하되, 상기 치환은 카밧(Kabat)에서와 같이 EU 색인에 따라 넘버링된, 아미노산 잔기 434에서 이루어진다. 예시적인 실시형태에서, 항체는 상기 개에서 상기 항체의 치료 혈청 수준을 약 1개월 내지 약 7개월의 범위인 기간에 걸쳐 유지한다.

[0016] 본 발명의 다른 특징 및 이점은 다음의 상세한 설명 실시예 및 도면으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 발명의 사상 및 범주 내에서 다양한 변경 및 변형이 이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이기 때문에, 발명의 바람직한 실시형태를 나타내면서 상세한 설명 및 특정 실시예가 단지 예시의 방식으로 제공된 것으로 이해되어야 한다.

### 도면의 간단한 설명

[0017] 본 특허 또는 출원 파일은 컬러로 작성된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)이 있는 본 특허 또는 특허 출원 공보의 사본은 요청 및 필요한 수수료의 지불 시 관청에서 제공할 것이다.

도 1은 IgG의 도메인 구조를 예시한다. Fc 돌연변이 N434H는 pH6에서 FcRn에 대한 친화도를 증진시킴으로써, IgG 반감기를 증가시키기 위해 CH3 도메인에서 만들어졌다.

도 2a는 N434H를 갖는 개과 IgGB 및 야생형(WT) 개과 IgGB의 아미노산 서열을 나타낸다.

도 2b는 야생형(WT) 인간 IgG1, WT 개과 IgGA, WT 개과 IgGB, WT 개과 IgGC 및 WT 개과 IgGD의 아미노산 서열의 정렬을 나타낸다. 아미노산 잔기는 카밧(Kabat)에서와 같이 EU 색인에 따라 넘버링된다. CH1, 힌지, CH2 및 CH3 아미노산 잔기는 각각 적색, 보라색, 파란색 및 녹색이다.

도 2c는 WT IgGB 65의 Fc 뉴클레오티드 서열을 나타낸다.

도 3은 56일 기간에 걸쳐 측정된 2mg/kg의 단일 주사 후, 4마리의 개, 수컷 2마리(01M, 02M) 및 암컷 2마리(03F, 04F)에서 WT mAb1 IgG에 대한 개별 혈청 농도를 나타낸다.

도 4는 56일 기간에 걸쳐 측정된 2mg/kg의 단일 주사 후, 4마리의 개, 수컷 2마리(17M, 18M) 및 암컷 2마리(19F, 20F)에서 N434H mAb1 IgG에 대한 개별 혈청 농도를 나타낸다.

도 5는 98일 기간에 걸쳐 측정된 2mg/kg의 3회 주사(SC/SC/IV) 후, 8마리의 개, 수컷 4마리(H03433, H03434, H03435, H03436) 및 암컷 4마리(H03453, H03454, H03455, H03456)에서 WT mAb2 IgG에 대한 개별 혈청 농도를 나타낸다.

도 6은 98일 기간에 걸쳐 측정된 2mg/kg의 3회 주사(SC/SC/IV) 후, 8마리의 개, 수컷 4마리(H03433, H03434, H03435, H03436) 및 암컷 4마리(H03453, H03454, H03455, 및 H03456)에서 N434H mAb2 IgG에 대한 개별 혈청 농도를 나타낸다.

도 7은 단일 4 mg/kg 이하 투여 후 개에서 ZTS-00008183의 혈청 프로파일을 나타낸다. 색상은 상이한 동물 식별 번호를 나타낸다.

도 8은 단일 4 mg/kg 이하 투여 후 개에서 ZTS-00008183의 평균 혈청 프로파일을 나타낸다.

도 9는 시점별(3 내지 5개월) 처리에 의한 최소 제곱 평균의 플롯을 나타낸다. 알파 수준: 84일차 = 0.07085, 112일차 = 0.04575, 140일차 = 0.04352.

도 10은 시점별(3 내지 5개월) 처리에 의한 최소 제곱 평균 및 백분율 변화의 플롯을 나타낸다. 평균에서 % 변화 = 100 x [평균(T01) - 평균(T02)/평균(T01)].

도 11은 모든 시점에 대한 소양증 지수 박스 플롯을 나타낸다. T01 = 위약 0 mg/kg, T02 = ZTS-00008183 4 mg/kg.

도 12는 모든 시점에 대한 치료에 의한 산술 평균의 소양증 지수 플롯을 나타낸다. 오차 막대는 표준 오차를 나타낸다.

도 13은 모든 시점에 대한 치료에 의한 산술 평균 및 백분율 변화의 소양증 지수 플롯을 나타낸다. X=2,3인 경우, 평균에서 % 변화 =  $100 \times [\text{평균}(T01) - \text{평균}(T0X)] / \text{평균}(T01)$ .

### 서열 목록의 간단한 설명

서열번호1은 N434H 돌연변이를 갖는 돌연변이체 개과 IgGB 불변 도메인의 아미노산 서열이다;

서열번호2는 야생형 개과 IgGB 불변 도메인의 아미노산 서열이다;

서열번호3은 코돈 최적화된 야생형 개과 IgG 불변 도메인(IgGB\_65\_WT)의 핵산 서열이다;

서열번호4는 야생형 개과 IgGB 불변 도메인의 핵산 서열이다;

서열번호5는 IgGB CH1 도메인 위치 118-215의 아미노산 서열이다;

서열번호6은 IgGB 힌지 도메인 위치 217-230의 아미노산 서열이다;

서열번호7은 야생형 IgGB CH2 도메인 위치 231-340의 아미노산 서열이다;

서열번호8은 야생형 IgGB CH3 도메인 위치 341-447의 아미노산 서열이다;

서열번호9는 IgGB CH1 도메인의 핵산 서열이다;

서열번호10은 IgGB 힌지 도메인의 핵산 서열이다;

서열번호11은 야생형 IgGB CH2 도메인의 핵산 서열이다;

서열번호12는 야생형 IgGB CH3 도메인의 핵산 서열이다;

서열번호13은 본 명세서에서 11E12-VH-CDR1로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 CDR1이다;

서열번호14는 본 명세서에서 34D03-VH-CDR1로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 CDR1이다;

서열번호15는 본 명세서에서 11E12-VH-CDR2로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 CDR2이다;

서열번호16은 본 명세서에서 34D03-VH-CDR2로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 CDR2이다;

서열번호17은 본 명세서에서 11E12-VH-CDR3로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 CDR3이다

서열번호18은 본 명세서에서 34D03-VH-CDR3로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 CDR3이다;

서열번호19는 본 명세서에서 11E12-VL-CDR1로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 CDR1이다;

서열번호20은 본 명세서에서 34D03-VL-CDR1로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 CDR1이다;

서열번호21은 본 명세서에서 11E12-VL-CDR2로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 CDR2이다;

서열번호22는 본 명세서에서 34D03-VL-CDR2로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 CDR2이다;

서열번호23은 본 명세서에서 11E12-VL-CDR3으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 CDR3이다;

서열번호24는 본 명세서에서 34D03-VL-CDR3으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 CDR3이다;

서열번호25는 본 명세서에서 MU-11E12-VL로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 서열이다;

서열번호26은 본 명세서에서 CAN-11E12-VL-cUn-FW2로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 서열이다;

서열번호27은 본 명세서에서 CAN-11E12-VL-cUn-13으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 서열이다;

서열번호28은 본 명세서에서 MU-34D03-VL로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 서열이다;

서열번호29는 본 명세서에서 CAN-34D03-VL-998-1로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 서열이다;

- 서열번호30은 본 명세서에서 MU-11E12-VH로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 서열이다;
- 서열번호31은 본 명세서에서 CAN-11E12-VH-415-1로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 서열이다;
- 서열번호32는 본 명세서에서 MU-34D03-VH로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 서열이다;
- 서열번호33은 본 명세서에서 CAN-34D03-VH-568-1로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 서열이다;
- 서열번호34는 GenBank 수탁 번호 C7GOW1에 상응하고 개과 IL-31 전장 단백질에 상응하는 아미노산 서열이다;
- 서열번호35는 GenBank 수탁 번호 C7GOW1에 상응하고 개과 IL-31 전장 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 상응하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호36은 본 명세서에서 MU-11E12-VL로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호37은 본 명세서에서 MU-11E12-VH로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호38은 본 명세서에서 MU-34D03-VL로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호39는 본 명세서에서 MU-34D03-VH로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호40은 본 명세서에서 HC-64(GenBank 수탁 번호 AF354264)로 지칭되는 개과 야생형 중쇄 불변 영역에 대한 아미노산 서열이다;
- 서열번호41은 본 명세서에서 HC-64(GenBank 수탁 번호 AF354264)로 지칭되는 개과 야생형 중쇄 불변 영역을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호42는 본 명세서에서 HC-65(GenBank 수탁 번호 AF354265)로 지칭되는 개과 야생형 중쇄 불변 영역에 대한 아미노산 서열이다;
- 서열번호43은 본 명세서에서 HC-65(GenBank 수탁 번호 AF354265)로 지칭되는 개과 야생형 중쇄 불변 영역을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호44는 본 명세서에서 카파(kappa)(GenBank 수탁 번호 XP\_532962)로 지칭되는 개과 경쇄 불변 영역에 대한 아미노산 서열이다;
- 서열번호45는 카파(GenBank 수탁 번호 XP\_532962)로 지칭되는 개과 경쇄 불변 영역을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호46은 본 명세서에서 CAN-34D03-VL-998-1로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호47은 본 명세서에서 CAN-34D03-VH-568-1로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호48은 본 명세서에서 CAN-11E12-VL-cUn-FW2로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호49는 본 명세서에서 CAN-11E12-VH-415-1로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 중쇄 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호50은 본 명세서에서 CAN-11E12-VL-cUn-13으로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호51은 본 명세서에서 CAN-11E12\_VL\_cUn\_1 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 서열이다;
- 서열번호52는 본 명세서에서 CAN-11E12-VL-cUn-1로 지칭되는 항-IL31 항체의 가변 경쇄 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호53은 대장균 발현을 위한 개과 IL-31 전장 작제물의 아미노산 서열에 상응한다;

- 서열번호54는 대장균 발현을 위한 개과 IL-31 전장 작제물에 상응하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호55는 본 명세서에서 ZTS-841로 지칭되는 항-NGF 항체의 가변 중쇄 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다;
- 서열번호56은 본 명세서에서 ZTS-841로 지칭되는 항-NGF 항체의 가변 중쇄 서열을 인코딩하는 아미노산 서열이다;
- 서열번호57은 본 명세서에서 ZTS-841로 지칭되는 항-NGF 항체의 가변 중쇄 CDR1이다;
- 서열번호58은 본 명세서에서 ZTS-841로 지칭되는 항-NGF 항체의 가변 중쇄 CDR2이다;
- 서열번호59는 본 명세서에서 ZTS-841로 지칭되는 항-NGF 항체의 가변 중쇄 CDR3이다;
- 서열번호60은 본 명세서에서 ZTS-841로 지칭되는 항-NGF 항체의 가변 경쇄 서열을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열이다
- 서열번호61은 본 명세서에서 ZTS-841로 지칭되는 항-NGF 항체의 가변 경쇄 서열을 인코딩하는 아미노산 서열이다;
- 서열번호62는 본 명세서에서 ZTS-841로 지칭되는 항-NGF 항체의 가변 경쇄 CDR1이다;
- 서열번호63은 본 명세서에서 ZTS-841로 지칭되는 항-NGF 항체의 가변 경쇄 CDR2이다;
- 서열번호64는 본 명세서에서 ZTS-841로 지칭되는 항-NGF 항체의 가변 경쇄 CDR3이다;
- 서열번호65는 IgGB 위치 341-447의 돌연변이체 CH3 도메인의 아미노산 서열이다;
- 서열번호66은 IgGB의 CH3 도메인 내의 돌연변이체 영역의 아미노산 서열이다;
- 서열번호67은 본 명세서에서 ZTS-00008183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 경쇄의 핵산 서열이다;
- 서열번호68은 본 명세서에서 ZTS-00008183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 경쇄의 아미노산 서열이다;
- 서열번호69는 본 명세서에서 ZTS-00008183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 중쇄의 핵산 서열이다;
- 서열번호70은 본 명세서에서 ZTS-00008183으로 지칭되는 항-IL31 항체의 중쇄의 아미노산 서열이다;
- 서열번호71은 본 명세서에서 ZTS-426으로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,3 항체의 가변 중쇄 CDR1이다;
- 서열번호72는 본 명세서에서 ZTS-426으로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,3 항체의 가변 중쇄 CDR2이다;
- 서열번호73은 본 명세서에서 ZTS-426으로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,3 항체의 가변 중쇄 CDR3이다;
- 서열번호74는 본 명세서에서 ZTS-426으로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,3 항체의 가변 경쇄 CDR1이다;
- 서열번호75는 본 명세서에서 ZTS-426으로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,3 항체의 가변 경쇄 CDR2이다;
- 서열번호76은 본 명세서에서 ZTS-426으로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,3 항체의 가변 경쇄 CDR3이다;
- 서열번호77은 본 명세서에서 ZTS-426으로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,3 항체의 중쇄의 아미노산 서열이다;
- 서열번호78은 본 명세서에서 ZTS-426으로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,3 항체의 중쇄의 핵산 서열이다;
- 서열번호79는 본 명세서에서 ZTS-426으로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,3 항체의 경쇄의 아미노산 서열이다;
- 서열번호80은 본 명세서에서 ZTS-426으로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,3 항체의 경쇄의 핵산 서열이다;
- 서열번호81은 본 명세서에서 ZTS-501로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1 항체의 가변 중쇄 CDR1이다;
- 서열번호82는 본 명세서에서 ZTS-501로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1 항체의 가변 중쇄 CDR2이다;
- 서열번호83은 본 명세서에서 ZTS-501로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1 항체의 가변 중쇄 CDR3이다;
- 서열번호84는 본 명세서에서 ZTS-501로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1 항체의 가변 경쇄 CDR1이다;
- 서열번호85는 본 명세서에서 ZTS-501로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1 항체의 가변 경쇄 CDR2이다;
- 서열번호86은 본 명세서에서 ZTS-501로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1 항체의 가변 경쇄 CDR3이다;

서열번호87은 본 명세서에서 ZTS-501로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1 항체의 중쇄의 아미노산 서열이다;  
 서열번호88은 본 명세서에서 ZTS-501로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1 항체의 중쇄의 핵산 서열이다;  
 서열번호89는 본 명세서에서 ZTS-501로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1 항체의 경쇄의 아미노산 서열이다;  
 서열번호90은 본 명세서에서 ZTS-501로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1 항체의 경쇄의 핵산 서열이다;  
 서열번호91은 본 명세서에서 ZTS-4155로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 중쇄 CDR1이다;  
 서열번호92는 본 명세서에서 ZTS-4155로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 중쇄 CDR2이다;  
 서열번호93은 본 명세서에서 ZTS-4155로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 중쇄 CDR3이다;  
 서열번호94는 본 명세서에서 ZTS-4155로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 경쇄 CDR1이다;  
 서열번호95는 본 명세서에서 ZTS-4155로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 경쇄 CDR2이다;  
 서열번호96은 본 명세서에서 ZTS-4155로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 경쇄 CDR3이다;  
 서열번호97은 본 명세서에서 ZTS-4155로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 중쇄의 아미노산 서열이다;  
 서열번호98은 본 명세서에서 ZTS-4155로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 중쇄의 핵산 서열이다;  
 서열번호99는 본 명세서에서 ZTS-4155로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 경쇄의 아미노산 서열이다;  
 서열번호100은 본 명세서에서 ZTS-4155로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 경쇄의 핵산 서열이다;  
 서열번호101은 본 명세서에서 ZTS-122로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 중쇄 CDR1이다;  
 서열번호102는 본 명세서에서 ZTS-122로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 중쇄 CDR2이다;  
 서열번호103은 본 명세서에서 ZTS-122로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 중쇄 CDR3이다;  
 서열번호104는 본 명세서에서 ZTS-122로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 경쇄 CDR1이다;  
 서열번호105는 본 명세서에서 ZTS-122로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 경쇄 CDR2이다;  
 서열번호106은 본 명세서에서 ZTS-122로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 경쇄 CDR3이다;  
 서열번호107은 본 명세서에서 ZTS-122로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 중쇄의 아미노산 서열이다;  
 서열번호108은 본 명세서에서 ZTS-122로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 중쇄의 핵산 서열이다;  
 서열번호109는 본 명세서에서 ZTS-122로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 경쇄의 아미노산 서열이다;  
 서열번호110은 본 명세서에서 ZTS-122로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 경쇄의 핵산 서열이다;  
 서열번호111은 본 명세서에서 ZTS-207로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 중쇄 CDR1이다;  
 서열번호112는 본 명세서에서 ZTS-207로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 중쇄 CDR2이다;  
 서열번호113은 본 명세서에서 ZTS-207로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 중쇄 CDR3이다;  
 서열번호114는 본 명세서에서 ZTS-207로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 경쇄 CDR1이다;  
 서열번호115는 본 명세서에서 ZTS-207로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 경쇄 CDR2이다;  
 서열번호116은 본 명세서에서 ZTS-207로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 가변 경쇄 CDR3이다;  
 서열번호117은 본 명세서에서 ZTS-207로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 중쇄의 아미노산 서열이다;  
 서열번호118은 본 명세서에서 ZTS-207로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 중쇄의 핵산 서열이다;  
 서열번호119는 본 명세서에서 ZTS-207로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 경쇄의 아미노산 서열이다;  
 서열번호120은 본 명세서에서 ZTS-207로 지칭되는 항-TGF  $\beta$  1,2,3 항체의 경쇄의 핵산 서열이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0018] 본 주제는 본 개시내용의 일부를 형성하는 다음의 상세한 설명을 참조하여 보다 용이하게 이해될 수 있다. 본 발명은 본 명세서에 기재 및/또는 도시된 특정 생성물, 방법, 조건 또는 파라미터로 제한되지 않고, 본 명세서에 사용된 용어는 단지 예로서 특정 실시형태를 설명하기 위한 목적을 위한 것이고 청구된 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않음을 이해할 것이다.
- [0019] 본 명세서에서 달리 정의되지 않는 한, 본 출원과 관련하여 사용되는 과학 및 기술 용어는 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다. 또한, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단수 용어는 복수를 포함하고 복수 용어는 단수를 포함할 것이다.
- [0020] 위에서 그리고 개시내용 전반에 걸쳐 사용된 것과 같이, 다음 용어 및 약어는 달리 지시되지 않는 한, 다음의 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다.
- [0021] 정의
- [0022] 본 개시내용에서, 단수 형태("a", "an" 및 "the")는 복수 참조를 포함하고, 특정 수치에 대한 언급은 문맥이 명백하게 달리 나타내지 않는 한, 적어도 그 특정 값을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "분자" 또는 "화합물"에 대한 언급은 당업자에게 공지된 이러한 분자 또는 화합물 및 그의 등가물 중 하나 이상에 대한 언급 등이다. 본 명세서에 사용된 것과 같이, 용어 "복수"는 하나 이상을 의미한다. 값의 범위가 표현될 때, 다른 실시형태는 하나의 특정 값으로부터 및/또는 다른 특정 값까지를 포함한다. 유사하게, 값이 근사치로서 표현될 때, 선행사 "약"을 사용함으로써, 특정 값이 다른 실시형태를 형성하는 것으로 이해된다. 모든 범위는 포괄적이고 결합가능하다.
- [0023] 명세서 및 청구범위에서, 번역글로불린 중쇄의 아미노산 잔기의 넘버링은 카바트(Kabat) 등의 문헌[Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에서와 같은 Eu 색인의 것이다. "카바트에서와 같은 Eu 색인"은 IgG 항체의 잔기 넘버링을 지칭하고 본 명세서에서 도 2에 반영된다.
- [0024] 핵산과 관련될 때, 용어 "단리된(isolated)"은 그 천연 공급원에서 통상적으로 연관된 적어도 하나의 오염 핵산으로부터 식별 및 분리된 핵산이다. 단리된 핵산은 자연에서 발견되는 것과 다른 형태 또는 환경에 있다. 따라서 단리된 핵산 분자는 천연 세포에 존재할 때의 핵산 분자와 구별된다. 단리된 핵산 분자는 통상적으로 그 안에 인코딩된 폴리펩티드를 발현하는 세포에 함유된 핵산 분자를 포함하고, 여기서, 예를 들어, 핵산 분자는 천연 세포의 것과 상이한 플라스미드 또는 염색체 위치에 있다. 단리된 핵산은 단일-가닥 또는 이중-가닥 형태로 존재할 수 있다. 단리된 핵산 분자가 단백질 발현시키기 위해 사용될 때, 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 최소한 센스 또는 코딩 가닥을 함유할 것이지만, 센스 및 안티-센스 가닥 모두를 함유할 수 있다(즉, 이중-가닥일 수 있음).
- [0025] 핵산 분자는 다른 핵산 분자와 기능적 관계에 놓일 때, "작동가능하게 연결(operably linked)"되거나 "작동가능하게 부착(operably attached)"된다. 예를 들어, 촉진제(promotor) 또는 증진제(enhancer)는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우, 핵산의 코딩 서열에 작동가능하게 연결되거나; 리보솜 결합 부위가 이것이 번역을 용이하게 하도록 위치되는 경우 핵산의 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 변이체 Fc 영역을 인코딩하는 핵산 분자는 발현된 융합 단백질이 변이체 Fc 영역 폴리펩티드에 상류 또는 하류에 인접한 이중 단백질 또는 이의 기능적 단편을 포함하고; 이중 단백질은 변이체 Fc 영역 폴리펩티드에 바로 인접할 수 있거나 임의의 길이 및 조성의 링커 서열에 의해 이로부터 분리될 수 있도록 위치되는 경우, 이중 단백질(즉, 자연에 존재하는 것처럼, Fc 영역을 포함하지 않는 단백질 또는 이의 기능적 단편)을 인코딩하는 핵산 분자에 작동가능하게 연결된다. 유사하게, 폴리펩티드(본 명세서에서 "단백질"과 동의어로 사용됨) 분자는 다른 폴리펩티드와 기능적 관계에 놓일 때, "작동가능하게 연결"되거나 "작동가능하게 부착"된다.
- [0026] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, "기능적 단편(functional fragment)"은 폴리펩티드 또는 단백질(예를 들어, 변이체 Fc 영역, 또는 모노클로날 항체)과 관련될 때, 전장 폴리펩티드의 적어도 하나의 기능을 보유하는 그 단백질의 단편을 지칭한다. 단편은 크기가 6개 아미노산에서 전장 폴리펩티드의 전체 아미노산 서열에서 1개 아미노산을 뺀 범위일 수 있다. 본 발명의 변이체 Fc 영역 폴리펩티드의 기능적 단편은 본 명세서에 정의된 것과 같은 적어도 하나의 "아미노산 치환"을 보유한다. 변이체 Fc 영역 폴리펩티드의 기능적 단편은 Fc 영역과 연관된 것으로 당업계에 공지된 적어도 하나의 기능을 보유한다(예를 들어, ADCC, CDC, Fc 수용체 결합, C1q 결합, 세포 표면 수용체의 하향 조절 또는, 예를 들어, 작동가능하게 부착된 폴리펩티드의 생체내 또는 시험관내 반감기를 증가시킬 수 있다).

- [0027] 용어 "정제된" 또는 "정제하다"는 샘플에서 적어도 하나의 오염물질의 실질적인 제거를 지칭한다. 예를 들어, 항원-특이 항체는 적어도 하나의 오염 비-면역글로불린 단백질의 완전한 또는 실질적인 제거(적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 또는 보다 바람직하게는 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99%)에 의해 정제될 수 있고; 이는 또한 동일한 항원에 결합하지 않는 면역글로불린 단백질의 제거에 의해 정제될 수 있다. 비-면역글로불린 단백질의 제거 및/또는 특정 항원에 결합하지 않는 면역글로불린의 제거는 샘플에서 항원-특이 면역글로불린의 백분율에서의 증가를 초래한다. 다른 예에서, 박테리아 숙주 세포에서 발견된 폴리펩티드(예를 들어, 면역글로불린)는 숙주 세포 단백질의 완전한 또는 실질적인 제거에 의해 정제되고; 이에 의해 샘플에서 폴리펩티드의 백분율이 증가된다.
- [0028] 폴리펩티드(예를 들어, Fc 영역)를 지칭할 때의 용어 "천연"은 폴리펩티드가 자연에서 일반적으로 발생하는 폴리펩티드 또는 이의 자연적으로 발생하는 다형성의 아미노산 서열로 구성된 아미노산 서열을 갖는 것을 나타내기 위해 본 명세서에서 사용된다. 천연 폴리펩티드(예를 들어, 천연 Fc 영역)는 제조할 수단에 의해 생성될 수 있거나 자연적으로 발생하는 공급원으로부터 단리될 수 있다.
- [0029] 본 명세서에 사용된 용어 "발현 벡터"는 특정 숙주 유기체에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 바람직한 코딩 서열 및 적절한 핵산 서열을 함유하는 제조할 DNA 분자를 지칭한다.
- [0030] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "숙주 세포"는, 시험관내 또는 본 위치, 또는 생체내에 위치 여부와 관계 없이, 임의의 진핵 또는 원핵 세포(예를 들어, 박테리아 세포, 예컨대, 대장균, CHO 세포, 효모 세포, 포유동물 세포, 조류 세포, 양서류 세포, 식물 세포, 어류 세포 및 곤충 세포)를 지칭한다.
- [0031] 본 명세서에 사용된 것과 같이, 용어 "Fc 영역"은 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 지칭한다. "Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 일반적으로 허용되는 경계는 다양할 수 있지만, 개과 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로, 예를 들어, 위치 231의 아미노산 잔기로부터 그의 카르복실-말단까지 연장되어 정의된다. 일부 실시형태에서, 변이체는 Fc 영역의 일부만을 포함하고 카르복시-말단을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 면역글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 2개의 불변 도메인, CH2 및 CH3을 포함한다. 일부 실시형태에서, 불변 도메인 중 하나 이상을 갖는 변이체가 고려된다. 다른 실시형태에서, 이러한 불변 도메인이 없는 (또는 이러한 불변 도메인의 일부만 있는) 변이체가 고려된다.
- [0032] 개과 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인"은 일반적으로, 예를 들어, 약 아미노산 231에서 약 아미노산 340으로 신장된다(도 2b 참조). CH2 도메인은 다른 도메인과 밀접하게 쌍을 이루지 않는다는 점에서 고유하다. 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물 사슬은 온전한 천연 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에 개재된다.
- [0033] 개과 IgG Fc 영역의 "CH3 도메인"은 일반적으로, 예를 들어, 약 아미노산 잔기 341에서 약 아미노산 잔기 447까지 신장하는 Fc 영역에서 CH2 도메인에 대한 잔기 C-말단의 스트레치이다(도 2b 참조).
- [0034] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 보유한다. 본 발명의 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드의 적어도 하나의 이펙터 기능은 천연 Fc 영역 또는 변이체의 모 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드와 관련하여 증진되거나 감소될 수 있다. 이펙터 기능의 예는 다음을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다: C1q 결합; 보체 의존성 세포독성(CDC: complement dependent cytotoxicity); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개된 세포독성(ADCC: antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity); 식균 작용; 세포 표면 수용체(예를 들어, B 세포 수용체, BCR)의 하향 조절 등. 이러한 이펙터 기능은 Fc 영역이 결합 도메인(예를 들어, 항체 가변 도메인)에 작동가능하게 연결되는 것을 요할 수 있고 다양한 검정(예를 들어, Fc 결합 검정, ADCC 검정, CDC 검정, 전체 또는 분획화된 혈액 샘플로부터의 표적 세포 고갈 등)을 사용하여 평가될 수 있다.
- [0035] "천연 서열 Fc 영역" 또는 "야생형 Fc 영역"은 자연에서 일반적으로 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 지칭한다. 예시적인 천연 서열 개과 Fc 영역이 도 2에 도시되어 있고 개과 IgG<sub>B</sub>65 Fc 영역의 천연 서열을 포함한다.
- [0036] "변이체 Fc 영역"은 본 명세서에 정의된 것과 같은 적어도 하나의 "아미노산 치환"으로 인해 천연 서열 Fc 영역 (또는 이의 단편)의 것과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환, 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에서 1, 2, 3, 4 또는 5 아미노산 치환을 갖는다. 대안적 실시형태에서, 변이체 Fc 영역은 본 명세서에 개시된 방법에 따라 생성될 수 있고 이 변이체 Fc 영역은 항체 가변 도메인 또는 비-항체 폴리펩티드, 예를 들어, 수용체 또는 리간드의 결합 도메인과 같은 선택된 이종 폴리펩티드에 융합될 수 있다.



- [0037] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 폴리펩티드의 맥락에서 용어 "유도체"는 아미노산 잔기 치환의 도입에 의해 변경된 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "유도체"는 또한 임의의 유형의 분자의 폴리펩티드에 대한 공유 부착에 의해 변경된 폴리펩티드를 지칭한다. 예를 들어, 그러나 비제한적으로, 항체는 예를 들어 글리코실화, 아세틸화, 폐길화, 인산화, 아마이드화, 공지된 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 세포 리간드 또는 다른 단백질에 대한 연결 등에 의해 변형될 수 있다. 유도체 폴리펩티드는 특정 화학적 절단, 아세틸화, 포르밀화, 투니카마이신의 대사적 합성 등을 포함하나 이에 제한되지 않는, 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 화학적 변형에 의해 생성될 수 있다. 또한, 유도체 폴리펩티드는 그것이 유래된 폴리펩티드와 유사하거나 동일한 기능을 보유한다. 본 발명의 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드는 본 명세서에 정의된 유도체일 수 있으며, 바람직하게는 유도체화가 Fc 영역 내에서 일어나는 것으로 이해된다.
- [0038] 폴리펩티드(예를 들어, Fc 영역 또는 모노클로날 항체)와 관련하여 본 명세서에 사용된 "실질적으로 개과 유래"는 폴리펩티드가 천연 개과 아미노 폴리펩티드의 것과 적어도 80%, 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 또는 보다 더 바람직하게는 적어도 95%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 상동성인 아미노산 서열을 갖는다는 것을 나타낸다.
- [0039] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 Fc 영역(예를 들어, 항체의 Fc 영역)에 결합하는 수용체를 기술하기 위해 사용된다. 바람직한 FcR은 천연 서열 FcR이다. 더욱이, 바람직한 FcR은 IgG 항체(감마 수용체)에 결합하는 것이고, 이들 수용체의 대립형질 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태를 포함하는 Fc 감마 RI, Fc 감마 RII, Fc 감마 RIII 서브클래스의 수용체를 포함한다. 다른 바람직한 FcR은 태아로의 모체 IgG의 전달을 담당하는 신생아 수용체인 FcRn을 포함한다(Guyer 등의 문헌[J. Immunol. 117:587(1976)] 및 Kim 등의 문헌[J. Immunol. 24:249(1994)]). 미래에 확인될 것을 포함하는 다른 FcR이 본 명세서에서 용어 "FcR"에 포괄된다.
- [0040] 문구 "항체-의존적 세포-매개된 세포독성" 및 "ADCC"는 FcR을 발현하는 비특이적 세포독성 세포(예를 들어, 비특이적)(예를 들어, 자연 살해("NK") 세포, 호중구 및 대식세포)가 표적 세포에 결합된 항체를 인식하고 후속적으로 표적 세포의 용리를 야기하는 세포-매개된 반응을 지칭한다. ADCC를 매개하기 위한 일차 세포인 NK 세포는 Fc 감마 RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc 감마 RI, Fc 감마 RII 및 Fc 감마 RIII를 발현한다.
- [0041] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 문구 "이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구(바람직하게는 개과)를 지칭한다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc 감마 RIII를 발현하고 ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 백혈구의 예는 PBMC, NK 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함한다. 이펙터 세포는 천연 공급원으로부터 (예를 들어, 혈액 또는 PBMC로부터) 단리될 수 있다.
- [0042] "변경된" FcRn 결합 친화도를 갖는 변이체 폴리펩티드는 변이체의 모 폴리펩티드 또는 pH 6.0에서 측정시 천연 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드에 비하여 증강되거나(즉, 증가되거나, 더 크거나 더 높은) 또는 약화된(즉, 감소된, 줄은 또는 더 작은) FcRn 결합 친화도를 갖는 것이다. FcRn에 대한 증가된 결합 또는 증가된 결합 친화도를 나타내는 변이체 폴리펩티드는 모 폴리펩티드보다 더 큰 친화도로 FcRn에 결합한다. FcRn에 대한 감소된 결합 또는 감소된 결합 친화도를 나타내는 변이체 폴리펩티드는 그의 모 폴리펩티드보다 낮은 친화도로 FcRn에 결합한다. FcRn에 대한 감소된 결합을 나타내는 이러한 변이체는 FcRn에 대한 적거나 전혀 인식할 수 없는 결합, 예를 들어 모 폴리펩티드와 비교하여 FcRn에 대한 0~20% 결합을 보유할 수 있다. 그의 모 폴리펩티드와 비교하여 "증강된 친화도"로 FcRn에 결합하는 변이체 폴리펩티드는 결합 검정에서 변이체 폴리펩티드와 모 폴리펩티드의 양이 본질적으로 동일하고, 다른 모든 조건이 동일한 경우, 모 폴리펩티드보다 더 높은 결합 친화도로 FcRn에 결합하는 것이다. 예를 들어, 증강된 FcRn 결합 친화도를 갖는 변이체 폴리펩티드는 모 폴리펩티드와 비교하여 FcRn 결합 친화도에서 약 1.10배 내지 약 100배(더 통상적으로는 약 1.2배 내지 약 50배) 증가를 나타낼 수 있고, 여기서 FcRn 결합 친화도는, 예를 들어, ELISA 검정 또는 당업자가 이용할 수 있는 다른 방법에서 결정된다.
- [0043] 본 명세서에 사용된 것과 같이, "아미노산 치환"은 주어진 아미노산 서열에서 적어도 하나의 기존 아미노산 잔기를 다른 상이한 "대체" 아미노산 잔기로의 대체를 지칭한다. 대체 잔기 또는 잔기들은 "자연적으로 발생하는 아미노산 잔기"(즉, 유전자 코드에 의해 인코딩됨)일 수 있고 알라닌(Ala); 아르기닌(Arg); 아스파라긴(Asn); 아스파르트산(Asp); 시스테인(Cys); 글루타민(Gln); 글루탐산(Glu); 글리신(Gly); 히스티딘(His); 이소류신(Ile); 류신(Leu); 라이신(Lys); 메티오닌(Met); 페닐알라닌(Phe); 프롤린(Pro); 세린(Ser); 트레오닌(Thr); 트립토판(Trp); 티로신(Tyr); 및 발린(Val)으로부터 선택된다. 하나 이상의 비-자연적으로 발생하는 아미노산 잔기로의 치환은 또한 본 명세서에서 아미노산 치환의 정의에 의해 포괄된다. "비-자연적으로 발생하는 아미노

산 잔기"는 폴리펩티드 사슬에서 인접한 아미노산 잔기(들)에 공유적으로 결합할 수 있는, 위에서 열거된 이들 자연적으로 발생하는 아미노산 잔기 이외의 잔기를 지칭한다. 비-자연적으로 발생하는 아미노산 잔기의 예는 노르류신, 오르니틴, 노르발린, 호모세린 및 기타 아미노산 잔기 유사체, 예컨대 Ellman 등의 문헌[Meth. Enzym. 202: 301-336(1991)]에 기술된 것들을 포함한다.

[0044] 용어 "검정 신호"는 비색 검정, 형광 강도 또는 분당 붕해(disintegration)로부터의 흡광도 측정을 포함하나 이에 제한되지 않는 단백질-단백질 상호작용을 검출하는 임의의 방법으로부터의 출력을 지칭한다. 검정 형식에는 ELISA, FACS, 또는 기타 방법이 포함될 수 있다. "검정 신호"에서의 변화는 세포 생존율에서의 변화 및/또는 키네틱 오프-속도(kinetic off-rate), 키네틱 온-속도(kinetic on-rate) 또는 둘 모두에서의 변화를 반영할 수 있다. "더 높은 검정 신호"는 측정된 출력 숫자가 다른 숫자보다 큰 것을 지칭한다(예를 들어, 변이체는 모 폴리펩티드와 비교하여 ELISA 검정에서 더 높은(더 큰) 측정된 숫자를 가질 수 있음). "더 낮은" 검정 신호는 측정된 출력 숫자가 다른 숫자보다 작은 것을 지칭한다(예를 들어, 변이체는 모 폴리펩티드와 비교하여 ELISA 검정에서 더 낮은(더 작은) 측정된 숫자를 가질 수 있음).

[0045] 용어 "결합 친화도"는 각각의 Fc 수용체-Fc 결합 상호작용과 연관된 평형 해리 상수(농도의 단위로 표현됨)를 지칭한다. 결합 친화도는 키네틱 온-속도(일반적으로 단위 시간당 농도의 단위로 보고됨, 예를 들어, 몰/초)에 의해 나누어진 키네틱 오프-속도(일반적으로 역 시간의 단위로 보고됨, 예를 들어, 초<sup>-1</sup>)의 비에 직접적으로 관련된다. 일반적으로, 평형 해리 상수에서의 변화가 온-속도, 오프-속도 또는 둘 모두에서의 차이로 인한 것인지 여부는 이들 파라미터 각각이 (예를 들어, BIACORE 또는 SAPIDYNE 측정에 의해) 실험적으로 결정되지 않는 한 명확하게 기술하는 것이 가능하지 않다.

[0046] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "힌지 영역"은, 예를 들어, 개과 IgG의 위치 216으로부터 위치 230까지 스트레칭하는 개과 IgG에서 아미노산의 스트레치를 지칭한다. 다른 IgG 이소타입(isotype)의 힌지 영역은 중쇄-간 이황화(SβS) 결합을 형성하는 시스테인 잔기를 동일한 위치에 배치함으로써 IgG 서열과 정렬될 수 있다.

[0047] "Clq"는 면역글로불린의 Fc 영역에 대한 결합 부위를 포함하는 폴리펩티드다. Clq는 2개의 세린 프로테아제인 Clr 및 Cls와 함께 CDC 경로의 제1 성분인 복합체 C1을 형성한다.

[0048] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "항체"는 "면역글로불린" 또는 "Ig"와 상호교환적으로 사용되고, 가장 넓은 의미로 사용되어 구체적으로 모노클로날 항체(전장 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이중특이적 항체) 및 원하는 생물학적 활성 또는 기능적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함한다. 상이한 종으로부터 유래된 부분을 포함하는 단일 사슬 항체 및 키메라, 개과 또는 개과화된 항체 뿐만 아니라 키메라 또는 CDR-그래프팅된 단일 사슬 항체 등 또한 본 발명 및 용어 "항체"에 포괄된다. 이들 항체의 다양한 부분은 통상적인 기술에 의해 화학적으로, 합성적으로 함께 연결될 수 있거나, 유전 공학 기술을 사용하여 인접 단백질로서 제조될 수 있다. 예를 들어, 키메라 또는 개과화된 사슬을 인코딩하는 핵산은 인접 단백질을 생산하기 위해 발현될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 제4,816,567호; 미국 특허 번호 제4,816,397호; 국제 공개 번호 제86/01533호; 미국 특허 번호 제5,225,539호; 및 미국 특허 번호 제5,585,089호 및 제5,698,762호를 참조한다. 또한, 영장류화된 항체에 관하여, Newman, R 등의 문헌[BioTechnology, 10: 1455-1460, 1993] 및 단일 사슬 항체에 관하여, Ladner 등의 미국 특허 번호 제4,946,778호 및 Bird, R. E. 등의 문헌[Science, 242:423-426, 1988]를 참조한다. Fc 영역(또는 이의 일부)을 포함하는 항체의 모든 형태는 본 명세서에서 "항체"라는 용어 내에 포괄되는 것으로 이해된다. 또한, 항체는 당업계에 공지된 방법에 따라 검출가능한 표지로 표지되고, 고체 상에 고정되고/되거나 이중 화합물(예를 들어, 효소 또는 독소)과 접합될 수 있다.

[0049] 본 명세서에 사용된 것과 같이, 용어 "항체 단편"은 온전한 항체의 일부를 지칭한다. 항체 단편의 예는 선형 항체; 단일-사슬 항체 분자; Fc 또는 Fc' 펩티드, Fab 및 Fab 단편, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 항체 단편은 바람직하게는 힌지의 적어도 일부 및 선택적으로 IgG 중쇄의 CH1 영역을 보유한다. 다른 바람직한 실시형태에서, 항체 단편은 CH2 영역의 적어도 일부 또는 전체 CH2 영역을 포함한다.

[0050] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "기능적 단편"은 모노클로날 항체와 관련된 때, 여전히 기능적 활성을 유지하는 모노클로날 항체의 일부를 지칭하도록 의도된다. 기능적 활성은, 예를 들어, 항원 결합 활성 또는 특이성, 수용체 결합 활성 또는 특이성, 이펙터 기능 활성 등일 수 있다. 모노클로날 항체 기능적 단편은, 예를 들어, VL, VH 및 Fd와 같은 개별 중쇄 또는 경쇄 및 이의 단편; Fv, Fab, 및 Fab'와 같은 1가 단편; F(ab')<sub>2</sub>와 같은 2가 단편; 단일 사슬 Fv(scFv); 및 Fc 단편을 포함한다. 이러한 용어는, 예를 들어, Harlow와 Lane의 문헌[Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York(1989)]; [Molec. Biology

and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers, R. A. (ed.), New York: VCH Publisher, Inc.); Huston 등의 문헌[Cell Biophysics, 22:189-224 (1993); Pluckthun and Skerra, Meth. Enzymol., 178:497-515 (1989)] 및 Day, E. D의 문헌[Advanced Immunochemistry, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, N.Y. (1990)]에 기술되어 있다. 용어 기능적 단편은, 예를 들어, 프로테아제 소화 또는 모노클로날 항체의 환원에 의해 그리고 당업자에게 공지된 재조합 DNA 방법에 의해 생성된 단편을 포함하는 것으로 의도된다.

[0051] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "단편"은 다른 폴리펩티드의 아미노산 서열의 적어도 5, 15, 20, 25, 40, 50, 70, 90, 100 이상의 연속 아미노산 잔기의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 바람직한 실시형태에서, 폴리펩티드의 단편은 전장 폴리펩티드의 적어도 하나의 기능을 보유한다.

[0052] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "키메라 항체"는 1가, 2가 또는 다가 면역글로불린을 포함한다. 1가 키메라 항체는 키메라 경쇄와 이황화 다리를 통해 연관된 키메라 중쇄에 의해 형성된 이량체이다. 2가 키메라 항체는 적어도 하나의 이황화 다리를 통해 연관된 2개 중쇄-경쇄 이량체에 의해 형성된 사량체이다. 개과에서 사용하기 위한 항체의 키메라 중쇄는 CH1 또는 CH2와 같은 개과 중쇄 불변 영역의 적어도 일부에 연결된 비-개과 항체의 중쇄로부터 유래된 항원-결합 영역을 포함한다. 개과에서 사용하기 위한 항체의 키메라 경쇄는 개과 경쇄 불변 영역(CL)의 적어도 일부에 연결된 비-개과 항체의 경쇄로부터 유래된 항원 결합 영역을 포함한다. 동일하거나 상이한 가변 영역 결합 특이성의 키메라 중쇄 및 경쇄를 갖는 항체, 단편 또는 유도체는 또한 공지된 방법 단계에 따라 개별 폴리펩티드 사슬의 적절한 회합에 의해 제조될 수 있다. 이 접근법으로, 키메라 중쇄를 발현하는 숙주를 키메라 경쇄를 발현하는 숙주와 별도로 배양하고, 면역글로불린 사슬을 별도로 회수한 다음 회합시킨다. 대안적으로, 숙주는 공동-배양될 수 있고 사슬이 배양 배지에서 자발적으로 회합되도록 허용된 후, 어셈블링된 면역글로불린 또는 단편 또는 둘 모두의 회수에 의해 중쇄 및 경쇄가 동일한 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 키메라 항체를 생산하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 제6,284,471호; 제5,807,715호; 제4,816,567호; 및 제4,816,397호 참조함).

[0053] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, "개과화된" 형태의 비-개과(예를 들어, 뮤린) 항체(즉, 개과화된 항체)는 비-개과 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하거나 서열이 없는 항체이다. 대부분의 경우, 개과화된 항체는 수용체의 추가 변 영역으로부터의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 생쥐, 쥐, 토끼, 인간 또는 인간 외의 영장류와 같은 비-개과 종의 추가 변 영역(공여자 항체)으로부터의 잔기로 대체된 개과 면역글로불린(수용체 항체)이다. 일부 경우에, 개과 면역글로불린의 프레임워크 영역(FR) 잔기는 상응하는 비-개과 잔기로 대체된다. 또한, 개과화된 항체는 수용체 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 일반적으로 항체 성능을 추가로 개선하기 위해 이루어진다. 일반적으로, 개과화된 항체는 적어도 하나, 및 통상적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가 변 루프(CDR)는 비-개과 면역글로불린의 것에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 잔기는 개과 면역글로불린 서열의 것이다. 개과화된 항체는 또한 면역글로불린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 통상적으로 개과 면역글로불린의 것을 포함할 수 있다.

[0054] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "면역부착소(immunoadhesin)"는 이중 "부착소" 단백질(예를 들어, 수용체, 리간드 또는 효소)의 결합 도메인을 면역글로불린 불변 도메인과 조합시키는 항체-유사 분자를 지칭한다. 구조적으로, 면역부착소는 면역글로불린 불변 도메인 서열을 갖는 항체(즉, "이중"임)의 항원 인식 및 결합 부위(항원 조합 부위) 이외의 원하는 결합 특이성을 갖는 부착소 아미노산 서열의 융합을 포함한다.

[0055] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "리간드 결합 도메인"은 상응하는 천연 수용체의 적어도 정성적 리간드 결합 능력을 보유하는 임의의 천연 수용체 또는 임의의 영역 또는 이의 유도체를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 수용체는 면역글로불린 슈퍼유전자패밀리의 구성원에 상동인 세포의 도메인을 갖는 세포-표면 폴리펩티드로부터의 것이다. 면역글로불린 슈퍼유전자패밀리의 구성원은 아니지만 그럼에도 불구하고 이 정의에 의해 구체적으로 포괄되는 다른 수용체는 사이토카인에 대한 수용체, 그리고 특히 티로신 키나제 활성을 갖는 수용체(수용체 티로신 키나제), 헤마토포이에틴(hematopoietin) 및 신경 성장 인자 수용체 슈퍼패밀리의 구성원, 및 세포 부착 분자(예를 들어, E-, L- 및 P-셀렉틴)이다.

[0056] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "수용체 결합 도메인"은, 예를 들어, 세포 부착 분자, 또는 상응하는 천연 리간드의 적어도 질적 수용체 결합 능력을 보유하는 이러한 천연 리간드의 임의의 영역 또는 유도체를 포함하는 수용체에 대한 임의의 천연 리간드를 지칭한다.

[0057] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, "단리된" 폴리펩티드는 그의 자연 환경의 성분으로부터 식별 및 분리 및/또는 회수된 것이다. 그 자연 환경의 오염 성분은 폴리펩티드에 대한 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효

소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 단리된 폴리펩티드는 (1) Lowry 방법에 의해 결정된 폴리펩티드의 95 중량% 초과, 그리고 바람직하게는 99 중량% 초과로, (2) 스피닝 컵 시퀀네이터의 사용에 의한 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15 잔기를 획득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루(Coomassie blue) 또는 은 염색을 사용한 환원 또는 비환원 조건 하에서 SDS-PAGE에 의한 균질성으로 정제된다. 단리된 폴리펩티드는 폴리펩티드의 자연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내의 제자리에서 폴리펩티드를 포함한다. 그러나, 통상적으로 단리된 폴리펩티드는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0058] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "장애" 및 "질환"은 만성 및 급성 장애 또는 질환(예를 들어, 환자가 특정 장애에 걸리기 쉬운 병리학적 상태)을 포함하는, 변이체 폴리펩티드(발명의 변이체 Fc 영역을 포함하는 폴리펩티드)로 치료함으로써 이익을 얻을 수 있는 임의의 상태를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다.

[0059] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "수용체"는 적어도 하나의 리간드에 결합할 수 있는 폴리펩티드를 지칭한다. 바람직한 수용체는 세포외 리간드-결합 도메인 및 선택적으로 다른 도메인(예를 들어, 막횡단 도메인, 세포내 도메인 및/또는 막 앵커)을 갖는 세포-표면 또는 가용성 수용체이다. 본 명세서에 기재된 검정에서 평가될 수용체는 온전한 수용체 또는 이의 단편 또는 유도체(예를 들어, 하나 이상의 이종 폴리펩티드에 융합된 수용체의 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질)일 수 있다. 또한, 그의 결합 특성에 대해 평가될 수용체는 세포에 존재하거나 단리되고 선택적으로 검정 플레이트 또는 일부 다른 고체 상에 코팅되거나 직접 표지되고 프로브로 사용될 수 있다.

[0060] 개과 야생형 IgG

[0061] 개과 IgG는 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어, Bergeron 등의 문헌(2014)[*Vet Immunol Immunopathol.*, vol. 157 (1-2), 페이지 31-41]에 자세히 기술되어 있다. 일 실시형태에서, 개과 IgG는 IgG<sub>A</sub>이다. 다른 실시형태에서, 개과 IgG는 IgG<sub>B</sub>이다. 또 다른 실시형태에서, 개과 IgG는 IgG<sub>C</sub>이다. 추가 실시형태에서, 개과 IgG는 IgG<sub>D</sub>이다. 특정 실시형태에서, 개과 IgG는 IgG<sub>B-65</sub>이다.

[0062] IgG<sub>A</sub>, IgG<sub>B</sub>, IgG<sub>C</sub>, 및 IgG<sub>D</sub>의 아미노산 및 핵산 서열 또한 당업계에 잘 알려져 있다.

[0063] 일 예에서, 발명의 IgG는 불변 도메인, 예를 들어, CH1, CH2, 또는 CH3 도메인, 또는 이들의 조합을 포함한다. 다른 예에서, 발명의 불변 도메인은, 예를 들어 CH2 또는 CH3 도메인 또는 이들의 조합을 포함하는 Fc 영역을 포함한다.

[0064] 특정 예에서, 야생형 불변 도메인은 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 야생형 IgG 불변 도메인은 서열번호 2의 상동체, 변이체, 이성질체, 또는 기능적 단편이지만, 위치 434에서 돌연변이는 없다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 실시형태를 나타낸다.

[0065] IgG 불변 도메인은 또한 중쇄 및/또는 경쇄의 아미노산 서열과 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 실질적으로 동일한 아미노산 서열은 Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448(1988)에 따른 FASTA 검색 방법에 의해 결정된 것과 같이, 비교된 아미노산 서열에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일성을 갖는 서열로서 본 명세서에서 정의된다.

[0066] 본 발명은 또한 본 명세서에 기재된, IgGs 또는 이의 일부를 인코딩하는 핵산 분자를 포함한다. 일 실시형태에서, 핵산은, 예를 들어, CH1, CH2, CH3 영역, 또는 이들의 조합을 포함하는 항체 중쇄를 인코딩할 수 있다. 다른 실시형태에서, 핵산은, 예를 들어, VH 영역 중 임의의 하나 또는 이의 일부, 또는 이의 임의의 변이체를 포함하는 VH CDR 중 임의의 하나를 포함하는 항체 중쇄를 인코딩할 수 있다. 발명은 또한, 예를 들어, CL 영역 중 임의의 하나 또는 이의 일부, VL 영역 중 임의의 하나 또는 이의 일부 또는 이의 임의의 변이체를 포함하는 VL CDR 중 임의의 하나를 포함하는 항체 경쇄를 인코딩하는 핵산 분자를 포함한다. 특정 실시형태에서, 핵산은 중쇄 및 경쇄 둘 모두, 또는 이의 일부를 인코딩한다.

[0067] 서열번호 2에 제시된 야생형 불변 도메인의 아미노산 서열은 서열번호 4에 제시된 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0068] 변형된 개과 IgG

[0069] 본 출원의 발명자들은 위치 434의 아미노산 잔기 아스파라긴(Asn 또는 N)을 다른 아미노산으로 치환하는 것이 놀랍게도, 그리고 뜻밖에도 FcRn에 대한 친화도를 증진시키고 IgG의 반감기를 증가시킨다는 것을 발견하였다. 본

명세서에 사용된 것과 같이, 용어, 위치 434는 카밧에서와 같은 EU 색인에 따라 넘버링된 위치를 지칭한다 (Kabat 등의 문헌[Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md (1991)]).

[0070] 따라서, 일 실시형태에서, 발명은 변형된 IgG로서, 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하되, 상기 치환은 카밧에서와 같이 EU 색인에 따라 넘버링된, 아미노산 잔기 434에서 이루어지는, 변형된 IgG를 제공한다. 위치 434의 아스파라긴은 임의의 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 예를 들어, 위치 434의 아스파라긴은 히스티딘(즉, N434H), 세린(즉, N434S), 알라닌(즉, N434A), 페닐알라닌(즉, N434F), 글리신(즉, N434G), 이소류신(즉, N434I), 라이신(즉, N434K), 류신(즉, N434L), 메티오닌(즉, N434M), 글루타민(즉, N434Q), 아르기닌(즉, N434R), 트레오닌(즉, N434T), 발린(즉, N434V), 트립토판(즉, N434W), 티로신(즉, N434Y), 시스테인(즉, N434C), 아스파르트산(즉, N434D), 글루탐산(즉, N434E), 또는 프롤린(즉, N434P)으로 치환될 수 있다.) 특정 실시형태에서, 치환은 히스티딘으로의 치환(즉, N434H)이다.

[0071] 특정 예에서, 발명의 돌연변이체 불변 도메인은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이체 IgG 불변 도메인은 서열번호 1의 상동체, 변이체, 이성질체, 또는 기능적 단편이지만, 위치 434에 돌연변이가 있다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 실시형태를 나타낸다.

[0072] 서열번호 1에 제시된 돌연변이체 불변 도메인의 아미노산 서열은 그 상응하는 돌연변이체 핵산 서열, 예를 들어, 서열번호 4에 제시된 핵산 서열의 돌연변이체 형태에 의해 인코딩된다. 일부 실시형태에서, 돌연변이체 형태의 위치 434에 상응하는 핵산 코돈은 CAC 또는 CAT를 포함한다.

[0073] 일부 실시형태에서, 발명의 돌연변이체 불변 도메인은 서열번호 65 또는 66에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이체 IgG 불변 도메인은 서열번호 65 또는 66의 상동체, 변이체, 이성질체, 또는 기능적 단편이지만, 위치 434에 돌연변이가 있다. 각각의 가능성은 본 발명의 별개의 실시형태를 나타낸다.

[0074] 서열번호 65 또는 66에 제시된 돌연변이체 불변 도메인의 아미노산 서열은 그 상응하는 돌연변이체 핵산 서열에 의해 인코딩된다.

[0075] 일 양태에서, 발명의 변형된 IgG는 약 10일 내지 약 35일의 범위인 기간 동안 반감기를 제공한다. 일 실시형태에서, 발명의 변형된 IgG는 약 10, 12, 15, 17, 19, 20, 23, 26, 28, 30, 33, 또는 35일 동안 반감기를 제공한다. 특정 실시형태에서, 발명의 변형된 IgG는 30일 초과 동안 반감기를 제공한다.

[0076] 일 양태에서, 발명의 변형된 IgG는 약 1개월 내지 약 7개월의 범위인 기간 동안 치료 혈청 수준을 유지한다. 일 실시형태에서, 발명의 변형된 IgG는 약 7, 14, 28, 56, 84, 112, 140, 168, 또는 210일 동안 치료 혈청 수준을 유지한다. 특정 실시형태에서, 발명의 변형된 IgG는 3개월 초과 동안 치료 혈청 수준을 유지한다.

[0077] 발명의 항체 분자를 제조하는 방법

[0078] 항체 분자를 제조하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있고 미국 특허 번호 제8,394,925호; 제8,088,376호; 제8,546,543호; 제10,336,818호; 및 제9,803,023호 및 미국 특허 출원 공개 번호 제20060067930에 자세히 기술되어 있으며, 이는 그 전체가 본 명세서에 참고로 포함된다. 당업자에게 공지된 임의의 적합한 방법, 프로세스 또는 기술이 사용될 수 있다. 발명의 변이체 Fc 영역을 갖는 항체 분자는 당업계에 잘 알려진 방법에 따라 생성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 변이체 Fc 영역은 수용체 또는 리간드의 항체 가변 도메인 또는 결합 도메인과 같은 선택된 이중 폴리펩티드에 융합될 수 있다.

[0079] 분자 생물학 및 재조합 기술의 방법의 출현으로, 당업자는 재조합 수단에 의해 항체 및 항체-유사 분자를 생성할 수 있으며, 이에 의해 항체의 폴리펩티드 구조에서 발견되는 특정 아미노산 서열을 코딩하는 유전자 서열을 생성할 수 있다. 이러한 항체는 상기 항체의 폴리펩티드 사슬을 인코딩하는 유전자 서열을 클로닝하거나, 합성된 사슬의 어셈블리로 특정 에피토프 및 항원 결정기에 친화도를 갖는 활성 사랑체(H2L2) 구조를 형성하는 상기 폴리펩티드 사슬의 직접 합성에 의해 생성될 수 있다. 이것은 상이한 종 및 공급원으로부터 항체를 중화시키는 것을 특징으로 하는 서열을 갖는 항체의 용이한 생산을 가능하게 하였다.

[0080] 항체의 공급원, 또는 항체가 재조합적으로 구성되는 방식, 또는 시험관내 또는 생체내에서, 형질전환 동물, 실험실 또는 상업적 크기의 큰 세포 배양물을 사용하거나, 형질전환 식물을 사용하거나 또는 프로세스의 임의의 단계에서 살아있는 유기체를 이용하지 않는 직접적인 화학적 합성에 의해 합성되는 방식에 관계없이, 모든 항체

는 유사한 전체 3차원 구조를 갖는다. 이 구조는 종종 H2L2로 주어지고 항체가 일반적으로 2개의 경쇄(L) 아미노산 사슬과 2개의 중쇄(H) 아미노산 사슬을 포함한다는 사실을 지칭한다. 두 사슬 모두 구조적으로 상보적인 항원 표적과 상호작용할 수 있는 영역을 갖는다. 표적과 상호작용하는 영역은 "가변" 또는 'V' 영역으로 지칭되고 상이한 항원 특이성의 항체와 아미노산 서열에서의 차이를 특징으로 한다. H 또는 L 사슬의 가변 영역은 항원 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 아미노산 서열을 함유한다.

[0081] 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "항원 결합 영역"은 항원과 상호작용하고 항체에 항원에 대한 그 특이성 및 친화성을 부여하는 아미노산 잔기를 함유하는 항체 분자의 그 부분을 지칭한다. 항체 결합 영역은 항원-결합 잔기의 적절한 형태를 유지하는 데 필요한 "프레임워크" 아미노산 잔기를 포함한다. 항원 결합 영역을 제공하는 H 또는 L 사슬의 가변 영역 내에는, 상이한 특이성의 항체 사이에서 이의 극도의 가변성 때문에 "초가변성"이라고 불리는 더 작은 서열이 있다. 이러한 초가변성 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR" 영역으로도 지칭된다. 이들 CDR 영역은 특정 항원 결정기 구조에 대한 항체의 기본적 특이성을 설명한다.

[0082] CDR은 가변 영역 내의 아미노산의 비-연속적인 스트레치를 나타내지만, 종에 관계없이 가변 중쇄 및 경쇄 영역 내의 이들 중요한 아미노산 서열의 위치적 위치는 가변 사슬의 아미노산 서열 내에 유사한 위치를 갖는 것으로 밝혀졌다. 모든 항체의 가변 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR 영역을 가지며, 각각은 다른 영역과 비-인접성이다. 모든 포유동물 중에서, 항체 펩티드는 불변(즉, 고도로 보존된) 영역과 가변 영역을 함유하고, 후자 내에는 CDR 및 CDR 외부가 아닌 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역 내에 아미노산 서열로 구성된 소위 "프레임워크 영역"이 있다.

[0083] 본 발명은 위에서 기재된 핵산 중 적어도 하나를 포함하는 벡터를 추가로 제공한다. 유전자 코드는 퇴화성이기 때문에 특정 아미노산을 인코딩하는 데 하나 초과 코돈이 사용될 수 있다. 유전자 코드를 사용하여 하나 이상의 상이한 뉴클레오타이드 서열이 식별될 수 있으며, 이들 각각은 아미노산을 인코딩할 수 있다. 특정 올리고뉴클레오타이드가 실제로 실제 인코딩 서열을 구성할 확률은 비정상적인 염기 페어링 상관관계 및 특정 코돈이 항체 또는 일부를 발현하는 진핵 또는 원핵 세포에서 (특정 아미노산을 인코딩하기 위해) 실제로 사용되는 빈도를 고려하여 추정될 수 있다. 이러한 "코돈 사용 규칙"은 Lathe 등의 문헌[183 J. Molec. Biol. 1-12(1985)]에 의해 개시되었다. Lathe의 "코돈 사용 규칙"을 사용하여, 개과 IgG 서열을 인코딩할 수 있는 이론적인 "가장 가능성 있는" 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 단일 뉴클레오타이드 서열 또는 뉴클레오타이드 서열의 세트가 식별될 수 있다. 또한 본 발명에 사용하기 위한 항체 코딩 영역은 본 명세서에 기재된 항체 및 펩티드의 변이체를 생성하는 표준 분자 생물학적 기술을 사용하여 기존 항체 유전자를 변경함에 의해 제공될 수 있음이 또한 의도된다. 이러한 변이체는 항체 또는 펩티드의 아미노산 서열에서 결실, 첨가 및 치환을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0084] 예를 들어, 치환의 한 부류는 보존적 아미노산 치환이다. 이러한 치환은 개과 항체 펩티드에서의 주어진 아미노산을 유사한 특성의 다른 아미노산으로 치환하는 것이다. 통상적으로 보존적 치환으로 간주되는 것은 지방족 아미노산 Ala, Val, Leu 및 Ile 중에서 서로에 대한 대체; 하이드록실 잔기 Ser 및 Thr의 상호교환, 산성 잔기 Asp 및 Glu의 교환, 아미드 잔기 Asn 및 Gln 간의 치환, 염기성 잔기 Lys 및 Arg의 교환, 방향족 잔기 Phe, Tyr 등 중에서 대체이다. 어떤 아미노산 변화가 표현형으로 침묵할 가능성이 있는지에 관한 지침은 Bowie 등의 문헌[247 Science 1306-10(1990)]에서 찾을 수 있다.

[0085] 변이체 개과 항체 또는 펩티드는 완전히 기능적일 수 있거나 하나 이상의 활성에서 기능을 결할 수 있다. 완전 기능적 변이체는 통상적으로 보존적 변이 또는 비임계 잔기 또는 비임계 영역에서의 변이만을 함유한다. 또한, 기능적 변이체는 기능에 변화가 없거나 미미한 변화를 초래하는 유사한 아미노산의 치환을 함유할 수 있다. 대안적으로, 이러한 치환은 어느 정도 기능에 긍정적 또는 부정적인 영향을 미칠 수 있다. 비기능적 변이체는 통상적으로 하나 이상의 비-보존적 아미노산 치환, 결실, 삽입, 역위, 또는 절삭 또는 임계 잔기 또는 임계 영역에서 치환, 삽입, 역위 또는 결실을 포함한다.

[0086] 기능에 필수적인 아미노산은 부위-지향된 돌연변이유발 또는 알라닌-스캐닝 돌연변이유발과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 식별될 수 있다. Cunningham 등의 문헌[244 Science 1081-85(1989)]. 후자의 절차는 분자의 모든 잔기에 단일 알라닌 돌연변이를 도입한다. 생성된 돌연변이 분자는 그 다음 에피토프 결합 또는 시험관내 ADCC 활성과 같은 생물학적 활성에 대해 시험된다. 리간드-수용체 결합에 중요한 부위는 결정학, 핵 자기 공명, 또는 광친화성 표지와 같은 구조 분석에 의해 결정될 수도 있다. Smith 등의 문헌[224 J. Mol. Biol. 899-904 (1992)]; de Vos 등의 문헌[255 Science 306-12(1992)].

[0087] 또한, 폴리펩티드는 종종 20개의 "자연적으로 발생하는" 아미노산 이외의 아미노산을 함유한다. 또한, 말단 아

미노산을 포함하는 많은 아미노산은 처리 및 기타 번역 후 변형(post-translational modifications)과 같은 자연적 프로세스에 의해서, 또는 당업계에 잘 알려진 화학적 변형 기술에 의해서 변형될 수 있다. 공지된 변형에는 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유 부착, 헴 모이어티의 공유 부착, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 포스포티딜이노시톨의 공유 부착, 가교, 고리화, 이황화 결합 형성, 탈메틸화, 공유 가교의 형성, 시스템의 형성, 피코글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마 카르복실화, 글리코실화, GPI 앵커 형성, 하이드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백질분해 처리, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황산화, 단백질에 아미노산의 전이-RNA 매개된 첨가 예컨대 아르기닐화, 및 유비퀴틴화가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 변형은 당업자에게 잘 알려져 있으며 과학 문헌에 매우 상세하게 기술되어 있다. 몇 가지 특히 일반적인 변형, 글리코실화, 지질 부착, 황산화, 글루탐산 잔기의 감마-카르복실화, 하이드록실화 및 ADP 리보실화는 예로써 [Proteins-Structure and Molecular Properties (2nd ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman & Co., N.Y., 1993)와 같은 가장 기본적인 텍스트에 기술되어 있다. Wold의 문헌[Posttranslational Covalent Modification of proteins, 1-12 (Johnson, ed., Academic Press, N.Y., 1983)]; Seifter 등의 문헌[182 Meth. Enzymol. 626-46(1990)]; 및 Rattan 등의 문헌[663 Ann. NY Acad. Sci. 48-62(1992)]에 의한 것과 같이, 이 주제에 대한 많은 자세한 리뷰가 이용가능하다.

[0088] 다른 양태에서, 발명은 항체 유도체를 제공한다. 항체의 "유도체"는 일반적으로 단백질의 일부가 아닌 부가적인 화학적 모이어티를 함유한다. 단백질의 공유 변형이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 이러한 변형은 항체의 표적화된 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화 제제와 반응시킴으로써 분자 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 당업계에 잘 알려진, 이작용성 제제를 사용한 유도체화는 항체 또는 단편을 수-불용성 지지체 매트릭스 또는 다른 거대분자 담체에 가교결합하는데 유용하다.

[0089] 또한 유도체는 표지된, 방사성으로 표지된 모노클로날 항체를 포함한다. 예를 들어, 방사성 요오드(251,1311), 탄소(14C), 황(35S), 인듐, 삼중수소( $H^3$ ) 등; 비오틴 또는 아비딘과 모노클로날 항체의 접합체, 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 베타-D-갈락토시다제, 글루코스 옥시다제, 글루코아미라제, 카르복실산 탈수효소, 아세틸콜린 에스테라제, 리소자임, 말산 탈수소효소 또는 글루코스 6-인산 탈수소효소와 같은 효소; 및 또한 생물발광제(예컨대 루시페라제), 화학발광제(예컨대 아크리딘 에스테르) 또는 형광제(예컨대 피코빌리 단백질)와 모노클로날 항체의 접합체.

[0090] 발명의 다른 유도체 이작용성 항체는 2개의 상이한 항원성 기를 인식하는 2개의 별도 항체의 부분을 조합함으로써 생성된 이중특이적 항체이다. 이것은 가교 또는 재조합 기술에 의해 달성될 수 있다. 또한, 모이어티는 항체 또는 이의 일부에 첨가되어 (예를 들어, 혈류로부터 제거되는 시간을 연장함으로써) 생체내 반감기를 증가시킬 수 있다. 이러한 기술은, 예를 들어, PEG 모이어티 추가하는 단계(폐길화라고도 함)를 포함하고, 당업계에 잘 알려져 있다. 미국 특허 출원 공개 번호 제20030031671호를 참조한다.

[0091] 일부 실시형태에서, 대상 항체를 인코딩하는 핵산은 숙주 세포 내로 직접적으로 도입되고, 세포는 인코딩된 항체의 발현을 유도하기에 충분한 조건 하에 인큐베이션된다. 대상 핵산이 세포 내로 도입된 후, 세포는 통상적으로 항체의 발현을 허용하기 위해 약 1~24시간의 기간 동안 일반적으로 37° C에서, 때로는 선택하에 인큐베이션된다. 일 실시형태에서, 항체는 세포가 성장하는 배지의 상등액 안으로 분비된다. 전통적으로, 모노클로날 항체는 무린 하이브리도마 계통에서 천연 분자로 생산되었다. 그 기술에 더하여, 본 발명은 항체의 재조합 DNA 발현을 제공한다. 이것은 선택된 숙주 종에서 항체뿐만 아니라 다양한 항체 유도체 및 융합 단백질의 생산을 허용한다.

[0092] 발명의 적어도 하나의 항체, 일부 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 서열은 결찰을 위한 평활-말단 또는 지그재그-말단 말단, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 분해, 접합성 말단의 것에 적절하게 충전하는 것, 바람직하지 않은 연결을 피하기 위한 알칼리성 포스파타제 처리, 및 적절한 리가제로 결찰을 포함하는 통상적인 기술에 따라 벡터 DNA로 재조합될 수 있다. 이러한 조작을 위한 기술이, 예를 들어, Maniatis 등의 문헌 [MOLECULAR CLONING, LAB. MANUAL, (Cold Spring Harbor Lab. Press, NY, 1982 and 1989)], 및 상술한 Ausubel 등의 문헌(1993)에 의해 개시되었으며, 항체 분자 또는 이의 항원 결합 영역을 인코딩하는 핵산 서열을 구축하는데 사용될 수 있다.

[0093] DNA와 같은 핵산 분자는 전사 및 번역 조절 정보를 함유하는 뉴클레오티드 서열을 함유하고 이러한 서열이 폴리펩티드를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 "작동가능하게 연결"되어 있는 경우, 폴리펩티드를 "발현할 수 있는" 것으로 언급된다. 작동가능한 연결은 조절 DNA 서열 및 발현하고자 하는 DNA 서열이 회복가능한 양의 펩티드 또

는 항체 부분으로서 유전자 발현을 허용하는 방식으로 연결되는 연결이다. 유전자 발현에 필요한 조절 영역의 정확한 특성은 유사한 기술 분야에 잘 알려진 것과 같이 유기체마다 다를 수 있다. 예를 들어, 상술한 Sambrook 등(2001); 상술한 Ausubel 등(1993)을 참조한다.

- [0094] 이에 따라 본 발명은 원핵 또는 진핵 세포에서 항체 또는 펩티드의 발현을 포괄한다. 적합한 숙주는 생체내 또는 체외에서 박테리아, 효모, 곤충, 진균, 조류 및 포유동물 세포를 포함한 박테리아 또는 진핵 숙주, 또는 포유동물, 곤충, 조류 또는 효모 기원의 숙주 세포를 포함한다. 포유동물 세포 또는 조직은 인간, 영장류, 햄스터, 토끼, 설치류, 소, 돼지, 양, 말, 염소, 개 또는 고양이 기원일 수 있다. 또한 당업계에 알려진 임의의 다른 적합한 포유동물 세포가 사용될 수 있다.
- [0095] 일 실시형태에서, 발명의 뉴클레오티드 서열은 수용체 숙주에서 자가 복제가 가능한 플라스미드 또는 바이러스 벡터 안으로 혼입될 것이다. 이 목적을 위해 다양한 벡터 중 임의의 것이 이용될 수 있다. 예를 들어, 상술한 Ausubel 등(1993)을 참조한다. 특정 플라스미드 또는 바이러스 벡터를 선택하는 데 중요한 요소는: 벡터를 함유하는 수용체 세포가 벡터를 함유하지 않는 이들 수용체 세포로부터 인식되고 선택될 수 있는 용이성; 특정 숙주에서 원하는 벡터의 카피의 수; 및 다른 종의 숙주 세포 사이에서 벡터를 "서플링"할 수 있는 것이 바람직하지 여부를 포함한다.
- [0096] 당업계에 공지된 예시적인 원핵생물 벡터는 *대장균*에서 복제할 수 있는 것과 같은 플라스미드(예컨대, 예를 들어, pBR322, CoIE1, pSC101, pACYC 184, .pi.vX)를 포함한다. 이러한 플라스미드는, 예를 들어, 상술한 Maniatis 등(1989); 상술한 Ausubel 등(1993)에 의해 개시되었다. 바실러스 플라스미드는 pC194, pC221, pT127 등을 포함한다. 이러한 플라스미드는 Gryczan에 의해 문헌[THE MOLEC. BIO. OF THE BACILLI 307-329 (Academic Press, NY, 1982)]에서 개시되었다. 적합한 스트렙토마이세스 플라스미드는 pIJ101 (Kendall 등의 문헌[169 J. Bacteriol. 4177-83(1987)]), 및 스트렙토마이세스 박테리오파지, 예컨대 phLC31(Chater 등의 문헌[SIXTH INT'L SYMPOSIUM ON ACTINOMYCETALES BIO. 45-54 (Akademiai Kaido, Budapest, Hungary, 1986)에 나옴])을 포함한다. 슈도모나스 플라스미드는 John 등의 문헌[8 Rev. Infect. Dis. 693-704(1986)]; Izaki의 문헌[33 Jpn. J. Bacteriol. 729-42(1978)]; 및 상술한 Ausubel 등의 문헌(1993)에서 검토되어 있다.
- [0097] 대안적으로, 항체 또는 펩티드를 인코딩하는 cDNA의 발현에 유용한 유전자 발현 요소는 (a) 바이러스 전사 프로모터 및 이의 인핸서 요소, 예컨대 SV40 초기 프로모터(Okayama 등의 문헌[3 Mol. Cell. Biol. 280(1983)]), 라우스 육종 바이러스 LTR(Gorman 등의 문헌[79 Proc. Natl. Acad. Sci., USA 6777(1982)]) 및 몰로니 (Moloney) 뮤린 백혈병 바이러스 LTR(Grosschedl 등의 문헌[41 Cell 885(1985)]); (b) SV40 후기 영역에서 유래된 것과 같은 스플라이스 영역 및 폴리아데닐화 부위(Okayama 등(1983)), 및 (c) SV40에서와 같은 폴리아데닐화 부위(Okayama 등(1983))를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0098] 면역글로불린 cDNA 유전자는, Weidle 등의 문헌[51 Gene 21(1987)]에 의해 기술된 것과 같이 발현 요소로서 SV40 초기 프로모터 및 그의 인핸서, 생쥐 면역글로불린 H 사슬 프로모터 인핸서, SV40 후기 영역 mRNA 스플라이싱, 토끼 S-글로빈 개재 서열, 면역글로불린 및 토끼 S-글로빈 폴리아데닐화 부위, 및 SV40 폴리아데닐화 요소를 사용하여 발현될 수 있다. 부분 cDNA, 부분 게놈 DNA로 구성된 면역글로불린 유전자의 경우(Whittle 등의 문헌[1 Protein Engin. 499(1987)]), 전사 프로모터는 인간 사이토메갈로바이러스일 수 있고, 프로모터 인핸서는 사이토메갈로바이러스 및 생쥐/인간 면역글로불린, 및 mRNA 스플라이싱일 수 있고 폴리아데닐화 영역은 천연 염색체 면역글로불린 서열일 수 있다.
- [0099] 일 실시형태에서, 설치류 세포에서 cDNA 유전자의 발현을 위해, 전사 프로모터는 바이러스 LTR 서열이고, 전사 프로모터 인핸서는 생쥐 면역글로불린 중쇄 인핸서 및 바이러스 LTR 인핸서 중 하나 또는 둘 모두이고, 스플라이스 영역은 31bp 초과인 인트론을 함유하고, 폴리아데닐화 및 전사 종결 영역은 합성되는 면역글로불린 사슬에 상응하는 천연 염색체 서열로부터 유래된다. 다른 실시형태에서, 다른 단백질을 인코딩하는 cDNA 서열은 포유동물 세포에서 단백질의 발현을 달성하기 위해 위에서 인용된 발현 요소와 조합된다.
- [0100] 각각의 융합된 유전자는 발현 벡터에 어셈블링되거나 삽입될 수 있다. 면역글로불린 사슬 유전자 생성물을 발현할 수 있는 수용체 세포는 그 다음 펩티드 또는 H 또는 L 사슬-인코딩 유전자로 단독으로 형질감염되거나 H 및 L 사슬 유전자로 공동-형질감염된다. 형질감염된 수용체 세포는 혼입된 유전자의 발현을 허용하는 조건 하에 배양되고 발현된 면역글로불린 사슬 또는 온전한 항체 또는 단편은 배양물로부터 회수된다.
- [0101] 일 실시형태에서, 펩티드 또는 H 및 L 사슬, 또는 그의 일부를 인코딩하는 융합된 유전자는 그 다음 수용체 세포를 공동형질감염시키기 위해 사용되는 별도의 발현 벡터에서 어셈블링된다. 대안적으로, H 및 L 사슬을 인코



당하는 융합된 유전자는 동일한 발현 벡터 상에서 어셈블링될 수 있다. 발현 벡터의 형질감염 및 항체의 생산을 위해, 수용체 세포주는 골수종 세포일 수 있다. 골수종 세포는 형질감염된 면역글로불린 유전자에 의해 인코딩된 면역글로불린을 합성, 어셈블링 및 분비할 수 있고 면역글로불린의 글리코실화를 위한 메커니즘을 보유한다. 골수종 세포는 배양액 또는 생쥐의 복강에서 성장할 수 있으며, 여기서 분비된 면역글로불린은 복수액에서 수득될 수 있다. 다른 적합한 수용체 세포는 개과 또는 비-개과 기원의 B 림프구, 개과 또는 비-개과 기원의 하이브리도마 세포, 또는 중간 이중하이브리도마 세포와 같은 림프 세포를 포함한다.

[0102] 발명의 항체 구조물 또는 폴리펩티드를 담지하는 발현 벡터는 형질전환, 형질감염, 접합, 원형질체 융합, 인산 칼슘-침전, 및 디에틸아미노에틸(DEAE) 텍스트란과 같은 폴리양이온을 사용한 적용과 같은 생화학적 수단, 및 전기천공, 직접 미세주입 및 미세발사체 충격과 같은 기계적 수단을 포함하는 다양한 적절한 수단 중 임의의 것에 의해 적절한 숙주 세포 안으로 도입될 수 있다. Johnston 등의 문헌[240 *Science* 1538(1988)].

[0103] 효모는 면역글로불린 H 및 L 사슬의 생산에 대해 박테리아에 비해 실질적인 이점을 제공할 수 있다. 효모는 글리코실화를 포함한 번역-후 펩티드 변형을 수행한다. 현재 효모에서 원하는 단백질을 생산하는 데 사용할 수 있는 강력한 프로모터 서열 및 높은 카피 수 플라스미드를 활용하는 다수의 재조합 DNA 전략이 존재한다. 효모는 클로닝된 포유동물 유전자 생성물의 리더 서열을 인식하고 리더 서열을 담지하는 펩티드(즉, 프리(pre)-펩티드)를 분비한다. Hitzman 등의 문헌[11th Int'l Conference on Yeast, Genetics & Molec. Biol. (Montpelier, France, 1982)].

[0104] 효모 유전자 발현 시스템은 펩티드, 항체, 단편 및 이의 영역의 생산, 분비 및 안정성의 수준에 대해 정기적으로 평가될 수 있다. 효모가 글루코스가 풍부한 배지에서 성장할 때 대량으로 생산되는 해당 효소를 코딩하는 활성적으로 발현된 유전자로부터 프로모터 및 종결 요소를 포함하는 일련의 효모 유전자 발현 시스템 중 임의의 것이 이용될 수 있다. 또한 알려진 해당 유전자는 매우 효율적인 전사 제어 신호를 제공할 수 있다. 예를 들어, 포스포글리세레이트 키나제(PGK) 유전자의 프로모터 및 종결자 신호가 이용될 수 있다. 다수의 접근방식이 효모에서 클로닝된 면역글로불린 cDNA의 발현을 위한 최적의 발현 플라스미드를 평가하기 위해 취해질 수 있다. 문헌[Vol. II DNA Cloning, 45-66, (Glover, ed.) IRL Press, Oxford, UK 1985)]을 참조한다.

[0105] 또한 박테리아 균주는 본 발명에 의해 기재된 항체 분자 또는 펩티드의 생산을 위한 숙주로서 이용될 수 있다. 숙주 세포와 호환되는 종에서 유래된 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 플라스미드 벡터는 이들 박테리아 숙주와 관련하여 사용된다. 벡터는 복제 부위뿐만 아니라 형질전환된 세포에서 표현형 선택을 제공할 수 있는 특정 유전자를 담지한다. 다수의 접근방식이 박테리아에서 클로닝된 면역글로불린 cDNA에 의해 인코딩된 항체, 단편 및 영역 또는 항체 사슬의 생산을 위한 발현 플라스미드를 평가하기 위해 취해질 수 있다(상술한 Glover의 문헌(1985); 상술한 Ausubel의 문헌(1993); 상술한 Sambrook의 문헌(2001); Colligan 등이 편집한 문헌 [Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, NY, N.Y. (1994-2001)]; Colligan 등이 편집한 문헌 [Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y. (1997-2001)]를 참조함).

[0106] 숙주 포유동물 세포는 시험관내 또는 생체내에서 성장할 수 있다. 포유동물 세포는 리더 펩티드 제거, Hand L 사슬의 접합 및 어셈블리, 항체 분자의 글리코실화 및 기능적 항체 단백질의 분비를 포함하는 면역글로불린 단백질 분자에 대한 번역 후 변형을 제공한다. 항체 단백질의 생산을 위한 숙주로서 유용할 수 있는 포유동물 세포는, 상술한 림프성 기원의 세포에 더하여, Vero(ATCC CRL 81) 또는 CHO-K1(ATCC CRL 61) 세포와 같은 섬유아 세포 기원의 세포를 포함한다. 포유동물 세포에서 클로닝된 펩티드 Hand L 사슬 유전자의 발현을 위해 많은 벡터 시스템이 이용가능하다(상술한 Glover(1985) 참조함). 완전한 H2L2 항체를 수득하기 위해 상이한 접근방식을 따를 수 있다. 동일한 세포에서 Hand L 사슬을 공동-발현하여 완전한 사량체 H2L2 항체 및/또는 펩티드 안으로 Hand L 사슬의 세포내 연합 및 연결을 달성하는 것이 가능하다. 공동-발현은 동일한 숙주에서 동일하거나 상이한 플라스미드를 사용함으로써 발생할 수 있다. Hand L 사슬 및/또는 펩티드 둘 모두에 대한 유전자를 동일한 플라스미드 안으로 배치할 수 있어, 그 다음 세포 안으로 형질감염되며, 이에 의해 두 사슬 모두를 발현하는 세포에 대해 직접적으로 선택할 수 있다. 대안적으로, 세포는 하나의 사슬, 예를 들어, L 사슬을 인코딩하는 플라스미드로 먼저 형질감염된 후, 생성된 세포주를 제2 선택가능 마커를 함유하는 H 사슬 플라스미드로 형질감염시킬 수 있다. 두 경로 중 하나를 통해 펩티드 및/또는 H2L2 분자를 생산하는 세포주는 어셈블링된 H2L2 항체 분자의 더 높은 생산 또는 형질감염된 세포주의 증강된 안정성과 같은 증강된 특성을 가진 세포주를 생성하기 위해 추가 선택가능한 마커와 연계하여 펩티드, H, L 또는 H 플러스 L 사슬의 추가 카피를 인코딩하는 플라스미드로 형질감염될 수 있다.

[0107] 재조합 항체의 장기간의 고수율 생산을 위해, 안정적인 발현이 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체 분자를 안정적

으로 발현하는 세포주가 조작될 수 있다. 바이러스 복제 기원을 함유하는 발현 벡터를 사용하는 대신, 숙주 세포가 면역글로불린 발현 카세트 및 선택가능한 마커로 형질전환될 수 있다. 외래 DNA의 도입에 이어서, 조작된 세포를 농후화된 배지에서 1~2일 동안 성장시킨 다음 선택 배지로 전환할 수 있다. 재조합 플라스미드에서 선택 가능한 마커는 선택에 대한 내성을 부여하고, 세포가 플라스미드를 염색체 안으로 안정적으로 합체되고, 성장하여 세포주 안으로 차례로 클로닝되고 확장될 수 있는 초점을 형성하도록 한다. 이러한 조작된 세포주는 항체 분자와 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 화합물/성분의 스크리닝 및 평가에 특히 유용할 수 있다.

- [0108] 발명의 항체가 생성되면, 그것은 면역글로불린 분자의 정제를 위해 당업계에 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화도, 특히 단백질 A 후 특정 항원에 대한 친화도, 및 사이징 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차등 용해도에 의해서, 또는 단백질의 정제를 위한 임의의 기타 표준 기술에 의해서 정제될 수 있다. 많은 실시형태에서, 항체는 세포로부터 배양 배지 안으로 분비되고 배양 배지로부터 수확된다.
- [0109] 다른 양태에서, 발명은 항체로서, 야생형 개과 IgG 불변 도메인에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 개과 IgG 불변 도메인을 포함하되, 상기 치환은 아미노산 잔기 434에서 일어나는 항체를 제공한다. 일 실시형태에서, 치환은 위치 434의 아스파라긴의 히스티딘으로의 치환(N434H)이다.
- [0110] 치환을 갖는 항체는 당업자에게 공지된 임의의 적합한 항체일 수 있다. 일 예에서, 항체는 항-IL31 항체이다. 다른 예에서, 항체는 항-NGF 항체이다. 또 다른 예에서, 항체는 항-TGF $\beta$  항체이다.
- [0111] 본 명세서에 기재된 치환이 없는 항-IL31 항체는 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 미국 특허 번호 제 10,526,405호; 제10,421,807호; 제9,206,253호; 및 제8,790,651호에 자세히 기술되어 있다. 또한, 본 명세서에 기재된 치환이 없는 항-NGF 항체도 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 미국 특허 번호 제10,125,192호; 제10,093,725호; 제9,951,128호; 제9,617,334호; 및 제9,505,829호에 자세히 기술되어 있다. 또한, 본 명세서에 기재된 치환이 없는 항-TGF $\beta$  항체도 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 미국 특허 출원 번호 제63/036,092호 및 제63/248,679호 및 PCT 국제 특허 출원 PCT/US2021/036347에도 자세히 기술되어 있다.
- [0112] 일 실시형태에서, 발명의 항-IL31 항체(즉, 치환을 갖는 항체)는 IL-31-매개된 소양증 또는 알레르기 상태를 감소, 억제 또는 중성화시킨다. 다른 실시형태에서, 발명의 항-IL31 항체는 개에서 IL-31 활성을 감소, 억제 또는 중성화시킨다.
- [0113] 일 예에서, 발명의 항-IL31 항체는 서열번호 44의 개과 IL-31 아미노산 서열의 약 아미노산 잔기 95와 125 사이의 영역에서, 바람직하게는 서열번호 44의 개과 IL-31 서열의 약 아미노산 잔기 102와 122 사이의 영역에서 IL-31에 결합한다.
- [0114] 항-IL31 항체의 VL, VH, 및 CDR 서열은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 미국 특허 번호 제10,526,405호; 제10,421,807호; 제9,206,253호; 및 제8,790,651호에 자세히 기술되어 있다. 일 예에서, 발명의 항-IL31 항체는 상보성 결정 영역(CDR) 서열의 다음 조합 중 적어도 하나를 포함할 수 있다: (1) 11E12: 서열번호 13의 가변 중쇄 (VH)-CDR1, 서열번호 15의 VH-CDR2, 서열번호 17의 VH-CDR3, 서열번호 19의 가변 경쇄 (VL)-CDR1, 서열번호 21의 VL-CDR2, 및 서열번호 23의 VL-CDR3; 또는 (2) 34D03: 서열번호 14의 VH-CDR1, 서열번호 16의 VH-CDR2, 서열번호 18의 VH-CDR3, 서열번호 20의 VL-CDR1, 서열번호 22의 VL-CDR2, 및 서열번호 24의 VL-CDR3. 일 부 실시형태에서, 발명의 항-IL31 항체는 본 명세서에 기재된 적어도 하나의 CDR을 포함할 수 있다.
- [0115] 일 실시형태에서, 발명의 항-IL31 항체는 서열번호 25(MU-11E12-VL), 서열번호 26(CAN-11E12-VL-cUn-FW2), 서열번호 27(CAN-11E12-VL-cUn-13), 서열번호 28(MU-34D03-VL) 또는 서열번호 29(CAN-34D03-VL-998-1)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄를 포함할 수 있다.
- [0116] 다른 실시형태에서, 발명의 항-IL31 항체는 서열번호 30(MU-11E12-VH), 서열번호 31(CAN-11E12-VH-415-1), 서열번호 32(MU-34D03-VH) 또는 서열번호 33(CAN-34D03-VH-568-1)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄를 포함할 수 있다.
- [0117] 일 실시형태에서, 발명의 돌연변이체 항-NGF 항체(즉, 치환을 갖는 항체)는 NGF-매개된 통증이나 상태를 치료하기 위해, 동물에서 NGF 활성 및/또는 Trk A 및 p75에 대한 NGF 결합을 억제하는 증강된 능력을 감소, 억제 또는 중성화한다.
- [0118] 또한 항-NGF 항체의 VL, VH, 및 CDR 서열은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 미국 특허 번호 제10,125,192호; 제10,093,725호; 제9,951,128호; 제9,617,334호; 및 제9,505,829호에 자세히 기술되어 있다. 일 예에서, 발명의 항-NGF 항체는 다음 상보적 결정 영역(CDR) 서열 중 적어도 하나를 포함할 수 있다: ZTS-841: 서열번호

57의 가변 중쇄 (VH)-CDR1, 서열번호 58의 VH-CDR2, 서열번호 59의 VH-CDR3, 서열번호 62의 가변 경쇄 (VL)-CDR1, 서열번호 63의 VL-CDR2, 및 서열번호 64의 VL-CDR3. 일부 실시형태에서, VL-CDR2는 서열번호 63의 GNG 잔기를 갖는다.

- [0119] 일 실시형태에서, 발명의 항-NGF 항체는 서열번호 61(CAN-ZTS-841-VL)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄를 포함할 수 있다.
- [0120] 다른 실시형태에서, 발명의 항-NGF 항체는 서열번호 56(CAN-ZTS-841-VH)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄를 포함할 수 있다.
- [0121] 일 실시형태에서, 발명의 항-TGF $\beta$  항체(즉, 치환을 갖는 항체)는 TGF $\beta$ -매개된 질환 또는 상태, 예를 들어, 만성 신장 질환을 감소, 억제, 또는 중성화한다. 다른 실시형태에서, 발명의 항-TGF $\beta$  항체는 개에서 TGF $\beta$  활성을 감소, 억제 또는 중성화한다. 발명의 항-TGF $\beta$  항체는 TGF $\beta$  1, 2, 3, 또는 이들의 조합에 결합할 수 있다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 발명의 항-TGF $\beta$  항체는 TGF $\beta$  1에 결합한다. 다른 실시형태에서, 발명의 항-TGF $\beta$  항체는 TGF $\beta$  2에 결합한다. 다른 실시형태에서, 발명의 항-TGF $\beta$  항체는 TGF $\beta$  3에 결합한다. 또 다른 실시형태에서, 발명의 항-TGF $\beta$  항체는 TGF $\beta$  1, TGF $\beta$  2, TGF $\beta$  3, 또는 이들의 조합에 결합한다.
- [0122] 항-TGF $\beta$  항체의 VL, VH, 및 CDR 서열은 당업계에 잘 알려져 있고, 예를 들어, 미국 특허 출원 번호 제 63/036,092호 및 제63/248,679호, 및 PCT 국제 특허 출원 PCT/US2021/036347에 자세히 기술되어 있다. 일 예에서, 발명의 항-TGF $\beta$  항체는 상보성 결정 영역(CDR) 서열의 다음 조합 중 적어도 하나를 포함할 수 있다: (1) ZTS-426: 서열번호 71의 가변 중쇄 (VH)-CDR1, 서열번호 72의 VH-CDR2, 서열번호 73의 VH-CDR3, 서열번호 74의 가변 경쇄 (VL)-CDR1, 서열번호 75의 VL-CDR2, 및 서열번호 76의 VL-CDR3; 또는 (2) ZTS-501: 서열번호 81의 VH-CDR1, 서열번호 82의 VH-CDR2, 서열번호 83의 VH-CDR3, 서열번호 84의 VL-CDR1, 서열번호 85의 VL-CDR2, 및 서열번호 86의 VL-CDR3; 또는 (3) ZTS-4155: 서열번호 91의 VH-CDR1, 서열번호 92의 VH-CDR2, 서열번호 93의 VH-CDR3, 서열번호 94의 VL-CDR1, 서열번호 95의 VL-CDR2, 및 서열번호 96의 VL-CDR3; 또는 (4) ZTS-122: 서열번호 101의 VH-CDR1, 서열번호 102의 VH-CDR2, 서열번호 103의 VH-CDR3, 서열번호 104의 VL-CDR1, 서열번호 105의 VL-CDR2, 및 서열번호 106의 VL-CDR3; 또는 (5) ZTS-207: 서열번호 111의 VH-CDR1, 서열번호 112의 VH-CDR2, 서열번호 113의 VH-CDR3, 서열번호 114의 VL-CDR1, 서열번호 115의 VL-CDR2, 및 서열번호 116의 VL-CDR3.
- [0123] 일부 실시형태에서, 발명의 항-TGF $\beta$  항체는 본 명세서에 기재된 적어도 하나의 CDR을 포함할 수 있다.
- [0124] 일 실시형태에서, 발명의 항-TGF $\beta$  항체는 서열번호 77(ZTS-426), 서열번호 87(ZTS-501), 서열번호 97(ZTS-4155), 서열번호 107(ZTS-122) 또는 서열번호 117(ZTS-207)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄를 포함할 수 있다.
- [0125] 다른 실시형태에서, 발명의 항-TGF $\beta$  항체는 서열번호 79(ZTS-426), 서열번호 89(ZTS-501), 서열번호 99(ZTS-4155), 서열번호 109(ZTS-122) 또는 서열번호 119(ZTS-207)에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 가변 경쇄를 포함할 수 있다.
- [0126] 약학적 및 수의학적 적용
- [0127] 또한 발명은 발명의 분자 및 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 보다 구체적으로, 발명은 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제, 및 활성 성분으로서 발명에 따른 항체 또는 펩티드를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0128] "약학적으로 허용가능한 담체"는 이용되는 투여량 및 농도에서, 이에 노출되는 세포 또는 동물에 무독성인 임의의 부형제를 포함한다. 약학적 조성물은 하나 이상의 추가 치료제를 포함할 수 있다.
- [0129] "약학적으로 허용가능한"은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 또는 합리적인 이익/위험 비율에 상응하는 기타 문제 합병증 없이 동물의 조직과의 접촉에 적합한 이들 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 지칭한다.
- [0130] 약학적으로 허용가능한 담체는 용매, 분산 매질, 완충액, 코팅제, 항균제 및 항진균제, 습윤제, 방부제, 버거, 킬레이트제, 항산화제, 등장제 및 흡수 지연제를 포함한다.
- [0131] 의학적으로 허용가능한 담체는 물; 식염수; 인산염 완충 식염수; 텍스트로스; 글리세롤; 에탄올 및 이소프로판올과 같은 알코올; 인산염, 구연산염 및 기타 유기산; 아스코르브 산; 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드

드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노오스 또는 텍스트린을 포함하는 기타 탄수화물; EDTA; 나트륨과 같은 염 형성 반대이온; 및/또는 TWEEN, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 PLURONICS와 같은 비이온성 계면활성제; 당류, 만니톨 및 소르비톨과 같은 다가알코올류, 및 염화나트륨과 같은 등장제; 뿐만 아니라 이들의 조합을 포함한다.

[0132] 발명의 약학적 조성물은, 예를 들어 액체, 반-고체, 또는 고체 투여 형태, 예컨대 액체 용액(예를 들어, 주사가 가능한 및 주입가능한 용액), 분산액 또는 현탁액, 리포솜, 좌약, 정제, 알약 또는 분말을 포함하는 다양한 방식으로 제형화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 주사가 가능한 또는 주입가능한 용액의 형태이다. 조성물은 정맥내, 동맥내, 근육내, 피하, 비경구, 경점막, 경구, 국소 또는 경피 투여에 적합한 형태일 수 있다. 조성물은 즉시, 제어, 연장 또는 지연 방출 조성물로 제형화될 수 있다.

[0133] 발명의 조성물은 개별 치료제로서 또는 다른 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 이들은 단독으로 투여될 수 있지만, 일반적으로 선택된 투여 경로 및 표준 약학적 관행에 기초하여 선택된 약학적 담체와 함께 투여된다. 본 명세서에 개시된 항체의 투여는 비경구 주사(예컨대 복강내, 피하 또는 근육내 주사), 경구로, 또는 기도 표면으로의 항체의 국소 투여(통상적으로는 약학적 제형으로 수행됨)에 의한 것을 포함한 임의의 적합한 수단에 의해 수행될 수 있다. 기도 표면에 대한 국소 투여는 비강내 투여(예를 들어, 점적기, 면봉 또는 흡입기의 사용)에 의해 수행될 수 있다. 또한 기도 표면에 대한 항체의 국소 투여는 에어로졸 현탁액으로서 항체를 함유하는 약학적 제형의 호흡가능한 입자(고체 및 액체 입자 둘 모두 포함)를 생성한 다음 대상체가 호흡가능한 입자를 흡입하게 함에 의한 것과 같이, 흡입 투여에 의해 수행될 수 있다. 약학적 제형의 호흡가능한 입자를 투여하기 위한 방법 및 장치는 잘 알려져 있고, 임의의 통상적인 기술이 이용될 수 있다.

[0134] 일부 원하는 실시형태에서, 항체는 비경구 주사에 의해 투여된다. 비경구 투여를 위해, 항체 또는 분자는 약학적으로 허용가능한 비경구 비히클과 회합하여 용액, 현탁액, 에멀전 또는 동결건조된 분말로서 제형화될 수 있다. 예를 들어, 비히클은 물, 식염수, 링거 용액, 텍스트로스 용액, 트레할로스 또는 수크로스 용액, 또는 5% 혈청 알부민, 0.4% 식염수, 0.3% 글리신 등과 같은 수성 담체와 같은 허용가능한 담체에 용해된 항체 또는 이의 각테일의 용액일 수 있다. 리포솜 및 비수성 비히클 예컨대 고정유가 또한 사용될 수 있다. 이들 용액은 무균이고 일반적으로 미립자 물질이 없다. 이들 조성물은 통상적이고 잘 알려진 멸균 기술에 의해 멸균될 수 있다. 조성물은 pH 조절제 및 완충제, 독성 조절제 등과 같은 생리학적 조건을 근사화하는 데 필요한 약학적으로 허용가능한 보조 물질, 예를 들어 아세트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 젖산나트륨 등을 함유할 수 있다. 이들 제형에서 항체의 농도는, 예를 들어 중량으로 약 0.5% 미만, 일반적으로 약 1%이거나 적어도 1% 내지 15% 또는 20 중량% 정도로 광범위하게 변할 수 있고 주로 선택된 특정 투여 양식에 따른, 유체 부피, 점도 등에 기초하여 선택될 것이다. 비히클 또는 동결건조된 분말은 등장성(isotonicity)(예를 들어, 염화나트륨, 만니톨) 및 화학적 안정성(예를 들어, 완충제 및 방부제)을 유지하는 첨가제를 함유할 수 있다. 제형은 일반적으로 사용되는 기술로 멸균된다. 비경구로 투여가능한 조성물을 제조하는 실제 방법은 당업자에게 알려져 있거나 자명할 것이고, 예를 들어, 문헌[REMGINTON'S PHARMA. SCI. (15th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1980)]에 더 상세히 기재되어 있다.).

[0135] 발명의 항체 또는 분자는 저장을 위해 동결건조될 수 있고 사용 이전에 적합한 담체에서 재구성될 수 있다. 이 기술은 종래의 면역 글로불린에서 효과적인 것으로 나타났다. 임의의 적합한 동결건조 및 재구성 기술이 이용될 수 있다. 동결건조 및 재구성은 다양한 정도의 항체 활성 손실을 초래할 수 있고 사용 수준은 이를 보상하기 위해 조정될 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 본 항체 또는 이의 각테일을 함유하는 조성물은 재발의 예방 및/또는 기존 질환에 대한 치료적 처리를 위해 투여될 수 있다. 적절한 약학적 담체는 이 기술 분야에서 표준 참조 텍스트인 [REMGINTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES]의 최신판에 기술되어 있다. 치료적 적용에서, 조성물은 질환 및 이의 합병증을 치료하거나 적어도 부분적으로 정지 또는 완화시키기에 충분한 양으로 이미 질환을 앓고 있는 대상체에게 투여된다.

[0136] 본 명세서에 기재된 것과 같은 병태 또는 질환의 치료를 위한 본 발명의 조성물의 유효 용량은, 예를 들어, 특정 제제의 약력학적 특성, 및 그의 투여 방식과 경로; 표적 부위; 동물의 생리적 상태; 투여된 다른 약물; 치료가 예방적인지 치료적인지 여부; 수용체의 연령, 건강 및 체중; 동시치료의 증상 종류의 특성과 정도, 치료의 빈도, 및 원하는 효과를 포함하나 이에 제한되지 않는 많은 상이한 인자에 따라 달라진다.

[0137] 조성물의 단일 또는 다중 투여는 치료 의사에 의해 선택되는 용량 수준 및 패턴으로 수행될 수 있다. 여하튼, 약학적 제형은 대상체를 효과적으로 치료하기에 충분한 양의 본 발명의 항체(들)를 제공해야 한다. 예시적인 실

시형태에서, 발명의 조성물은 격월로, 3개월에 1회, 4개월에 1회, 5개월에 1회, 6개월에 1회, 또는 7개월에 1회 투여된다.

[0138] 치료 투여량은 안전성 및 효능을 최적화하기 위해 당업자에게 공지된 일상적인 방법을 사용하여 적정될 수 있다.

[0139] 발명의 약학적 조성물은 "치료학적으로 유효한 양"을 포함할 수 있다. "치료학적으로 유효한 양"은 원하는 치료 결과를 달성하기 위해 필요한 투여량 및 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 분자의 치료학적으로 유효한 양은 질환 상태, 연령, 성별, 및 개체의 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 이끌어내는 분자의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 또한 치료적으로 유효한 양은 분자의 임의의 독성 또는 유해한 효과가 치료학적으로 유의한 효과에 의해 압도당하는 양이다.

[0140] 다른 양태에서, 발명의 조성물은, 예를 들어 개에서 다양한 질환 및 장애의 치료에 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 것과 같이, 용어 "치료하다" 및 "치료"는 예방적 또는 방지적 조치를 포함하는 치료적 치료를 지칭 하되, 목적은 질환 또는 병태와 연관된 바람직하지 않은 생리학적 변화를 예방하거나 늦추는(경감하는) 것이다. 유익하거나 원하는 임상 결과는 증상의 완화, 질환 또는 병태의 정도 감소, 질환 또는 병태의 안정화(즉, 질환 또는 병태가 악화되지 않는 경우), 질환 또는 병태의 진행의 지연 또는 늦춤, 질환 또는 병태의 개선 또는 완화, 검출 가능 여부에 관계없이 질환 또는 병태의 (부분적이든 전체적이든) 완화를 포함하지만, 이에 제한되 지는 않는다. 치료를 필요로 하는 이들은 질환 또는 병태를 이미 갖고 있는 이들 뿐만 아니라 질환 또는 병태에 걸리기 쉬운 이들 또는 질환 또는 병태가 예방되어야 하는 이들을 포함한다.

[0141] 발명의 돌연변이체 분자는 임의의 적합한 질환 또는 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 발명의 돌연변이체 항-IL31 항체는 IL-31-매개된 소양증 또는 알레르기 상태를 치료하는데 사용될 수 있다. IL-31-매개된 소양증 상태의 예는, 예를 들어, 아토피 피부염, 습진, 건선, 경피증 및 소양증을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. IL-31-매개된 알레르기 상태의 예는, 예를 들어, 알레르기성 피부염, 여름 습진, 두드러기, 호흡곤란증, 염증성 기도 질환, 재발성 기도 폐쇄, 기도 과민성, 만성 폐쇄성 폐질환 및 자가면역으로 인한 염증성 진행을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0142] 발명의 돌연변이체 항-NGF 항체는 NGF-매개된 통증 또는 병태를 치료하는데 사용될 수 있다. 통증의 예는, 예를 들어, 만성 통증, 염증성 통증, 수술-후 절개 통증, 신경병증성 통증, 골절 통증, 골다공증성 골절 통증, 대상 포진-후 신경통, 암 통증, 화상으로 인한 통증, 상처와 연관된 통증, 외상과 연관된 통증, 신경병증성 통증, 근 골격계 장애와 연관된 통증, 류마티스성 관절염, 골관절염, 강직성 척추염, 혈청반응음성(비-류마티스성) 관절 병증, 비-관절 류머티즘, 관절주위 장애, 또는 말초 신경병증을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 실시 형태에서, 통증은 골관절염 통증이다.

[0143] 발명의 돌연변이체 항-TGFβ 항체는 TGFβ-매개된 질환 또는 병태를 치료하는데 사용될 수 있다. TGFβ-매개된 질환 또는 병태의 예는, 예를 들어, 만성 신장 질환을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0144] 본 명세서에 인용된 모든 특허 및 문헌 참조는 그 전체가 참고로 본 명세서에 포함된다.

[0145] 다음 실시예는 이전 개시내용을 보완하고 본 명세서에 기술된 주제에 대한 더 나은 이해를 제공하기 위해 제공 된다. 이들 실시예는 기술된 주제를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다. 본 명세서에 기술된 실시예 및 실시 형태는 단지 예시 목적을 위한 것이며, 이에 비추어 다양한 변형 또는 변경이 당업자에게 명백할 것이고 발명의 진정한 범주 내에 포함되어야 하고, 이를 벗어나지 않고 이루어질 수 있음을 이해해야 한다.

[0146] **실시예**

[0147] **실시예 1**

[0148] **개과 IgG Fc 돌연변이체의 구축**

[0149] 모든 개과 IgG의 구축(도 1)은 Bergeron 등에 (Bergeron 등의 문헌(2014)[*Vet Immunol Immunopathol.*, vol. 157(1-2), 페이지 31-41])에 기술된 것과 같이 수행되었으며, 여기서 IgGB(65) 서브-클래스에 대한 개과 불변 영역을 인코딩하는 서열을 함유하는 플라스미드가 활용되었고 본 명세서에서 조사된 각각의 mAb에 대한 VH/VL 서열은 불변 도메인을 인코딩하는 뉴클레오티드와 함께 상류 및 프레임에 삽입되었다. 돌연변이는 Agilent의 QuikChange II 돌연변이유발 및 단일-부위 지향된 돌연변이유발을 위한 연관된 Agilent 프라이머 디자인 도구 (<https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>)를 사용하여 각 플라스미드의 CH3 도메인의 위치

N434(도 2)안으로 합체되었다.

[0150] 항체 구조물은 표준 리포펙타민 형질감염 프로토콜(Invitrogen Life Technologies, 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)을 사용하여 HEK 293 세포에 또는 ExpiCHO 일시적 시스템(ThermoFisher Scientific) 키트 프로토콜을 사용하여 CHO 세포 안으로 일시적으로 발현되었다. ExpiCHO 발현은 IgG 경쇄 및 IgG 중쇄를 인코딩하는 유전자 서열을 함유하는 플라스미드의 공동-형질감염을 위해 ThermoFisher에 의해 요약된 프로토콜을 따랐다. HEK293 발현을 위해, 중쇄 플라스미드 및 경쇄 플라스미드의 동일한 중량이 공동-형질감염되었다. 세포가 7일 동안 성장하도록 한 후 항체 정제를 위해 상등액이 수집되었다. 항체는 Octet QKe 정량화(Pall ForteBio Corp, 미국 캘리포니아주 멘로파크 소재)를 통해 단백질 A 또는 단백질 G 센서에 대한 결합을 위해 스크리닝되었다. 단백질 A에 결합된 구조물은 단백질 품질에 대해 Bergeron 등에 기술된 것과 같이 정제되고 정량화되었다.

[0151] 실시예 2

[0152] 표적 결합 친화도 및 효능 검정

[0153] 각 mAb에 대한 친화도는 Biacore에 의해 평가되었고 IC50은 적절한 세포 기반 효능 검정을 통해 결정되었다. 표면 플라즈몬 공명은 Biacore T200(GE Healthcare, 펜실베이니아주 피츠버그 소재)에서 수행되어 각 항체의 그 표적에 대한 결합 친화도를 측정했으며, 각 표적 단백질 2.5 µg/ml가 각각 CM5 센서 플로우 셀(2~4)에서 최종 밀도 ~250 RU(공명 장치)를 위해 EDC/NHS를 사용하여 아민 커플링에 의해 고정화되었다.

[0154] 플로우 셀(1)은 실행 완충액 효과를 보정하기 위한 내부 기준으로 사용되었다. 항체 결합은 15° C에서 250초의 접촉 시간과 30 µl/분의 유속으로 측정되었다. 해리 시간은 300초였다. 재생은 재생 완충액(10mM 글리신 pH1.5 및 10mM NaOH)과 유속 20 µl/분에서 각각 60초 동안 수행되었다. 실행/회식 완충액(1X HBS-EP, GE Healthcare, BR-1006-69, 100mM HEPES, 150mM NaCl, 30mM EDTA 및 0.5% v/v 계면활성제 P20을 포함한 10X, pH7.4, 여과된 MQ H2O에서 1:10)은 동일한 검정 형식에서 음성 대조군으로 사용되었다.

[0155] 데이터는 이중 참조 방법을 사용하여 Biacore T200 평가 소프트웨어로 분석되었다. 얻어진 곡선은 1:1 결합 모델로 피팅되었다. 야생형과 N434H 돌연변이체 IgG 사이에 결합 친화도 또는 IC50에서의 차이는 관찰되지 않았다(표 1).

[0156] [표 1]

WT 및 N434H 돌연변이체 IgG 의 친화도 및 효능. WT 와 돌연변이체 IgG 사이의 차이가 측정되지 않음:

mAb	야생형		N434H 돌연변이체	
	친화도	IC50	친화도	IC50
mAb1	4.83E-10	1.1 nM	3.73E-10	0.99 nM
mAb2	8.51E-11	23.7 nM	5.55E-11	20.9 nM
mAb3	4.5E-10	0.13 µg/ml	3.8E-10	N/A

[0157] mAb1, mAb2, 및 mAb3는 각각 개과화된 항-IL31, 항-NGF, 및 항-TGFβ 항체를 지칭한다. 항-IL31 항체는 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 제10,526,405호; 제10,421,807호; 제9,206,253호; 제8,790,651호를 참조한다. 항-NGF 항체 또한 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 제10,125,192호; 제10,093,725호; 제9,951,128호; 제9,617,334호; 및 제9,505,829호를 참조한다. 항-TGFβ 항체 또한 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 번호 제63/036,092호 및 제63/248,679호 및 PCT 특허 출원 번호 PCT/US2021/036347를 참조한다. 항-TGFβ 항체 ZTS-4155가 사용되었다.

[0159] 실시예 3

[0160] 시험관내 FcRn 결합 검정

[0161] 개과 FcRn이 단리되고, 제조되고, 돌연변이체 Fc IgG는 위에서 논의된, Bergeron 등에 따라 개과 FcRn에 대해 검정되었다. 시노몰구스 원숭이, 인간, 생쥐 및 쥐로부터의 서열 정렬로부터 설계된 축퇴 프라이머를 사용하여, 표준 PCR을 사용하여 개과 FcRn-α 서브유닛 및 β-마이크로글로불린을 증폭시켰다. 프라이머는 c-말단 6x His + BAP 태그(AGLNDIFEAQKIEWHE)로 조작된, pcDNA3.1(+) 벡터 내로 서브클로닝을 용이하게 하기 위해 3 프라이임에 HindIII 및 5 프라이임 말단에 BamHI를 함유했다. FcRn-α 서브유닛 및 β-마이크로글로불린은 HEK 293 세포 내에

공동-형질감염되었고 FcRn 복합체는 c-말단 His 태그를 통한 IMAC 친화도 정제에 의해 정제되었다. KD는 CM5 센서 칩을 사용하여 Biacore 3000 또는 Biacore T200(GE Healthcare, 미국 펜실베이니아주 피츠버그 소재)에 의해 측정되었다.

[0162] FcRn은 원하는 표면 밀도에 도달하기 위해 표준 아민 고정화 방법을 사용하여 센서의 표면 상에 고정화되었다. HBS-EP는 고정화 실행 완충액으로 사용되었고 10mM MES; 150mM NaCl; 0.005% Tween20; 0.5mg/mL BSA; pH6 및 pH7.2 및 PBS; 0.005% Tween20; 0.5mg/mL BSA; pH7.4는 완충액 및 적정을 실행하는 방법에 사용되었다. Fc 돌연변이체 IgG는 수용체 표면 위로 유동되었고 친화도는 Scrubber2 소프트웨어 분석(BioLogic Software Pty, Ltd., 호주 캠벨 소재) 또는 T200 평가 소프트웨어를 사용하여 결정되었다(표 2). 완충액만 함유하는 블랭크 실행은 모든 실행에서 차감되었다. 유동 세포는 50mM Tris pH8을 사용하여 재생되었다. 실행은 15° C에서 수행되었다.

[0163] mAb 1, 2, 및 3에 대해 위치 434에서 만들어진 돌연변이는 pH 6에서 FcRn에 대한 IgG의 친화도에 현저한 영향을 미친다. 돌연변이 N434H는 pH 6에서 FcRn 친화도에서 유의한 증가를 가진 반면, pH 7.2에서는 3개의 mAb 모두에 대해 약한 친화도를 유지한다. 위치 434에서의 광범위한 돌연변이유발은 몇몇 다른 돌연변이가 pH 6에서 FcRn에 대한 친화도를 증진시킨다는 것을 밝힌다. 이 연구는 IgG에 대한 FcRn 친화도에서의 증가가 VHVL 도메인에 의존적이지 않고 임의의 개과 IgGB(65)에 대해 보편적임을 밝힌다.

[0164] [표 2]

표면 플라즈몬 공명(Biacore)에 의해 측정된 개과 FcRn 에 대한 야생형(WT) 및 N434 돌연변이체 IgG의 결합:

명칭	돌연변이	FcRn pH6	FcRn pH7.2
mAb1	WT	15-24.4 nM	NBO
mAb1	N434H	0.7-1.3 nM	5 μM
mAb2	WT	57.2 nM	NBO
mAb2	N434H	7.3 nM	1.3 μM
mAb3	WT	523 nM	NBO
mAb3	N434H	4.8 nM	38 nM
mAb3	N434S	17.3 nM	66.7 nM
mAb3	N434A	21.4 nM	95.8 nM
mAb3	N434F	1.67 nM	40.1 nM
mAb3	N434G	26.6 nM	0.31 nM
mAb3	N434I	16.7 nM	5.91 nM
mAb3	N434K	15.8 nM	14.3 nM
mAb3	N434L	28 nM	15.5 nM
mAb3	N434M	18.8 nM	11.0 nM
mAb3	N434Q	11.8 nM	50.2 nM
mAb3	N434R	2.7 nM	285 nM
mAb3	N434T	16.6 nM	406 nM
mAb3	N434V	13.6 nM	6.19 nM
mAb3	N434W	2.11 nM	162 nM
mAb3	N434Y	1.56 nM	38.6 nM
mAb3	N434C	NBO	270 nM
mAb3	N434D	NBO	10.3 nM
mAb3	N434E	NBO	5.67 nM
mAb3	N434P	NBO	WB

[0165]

[0166] mAb1, mAb2, 및 mAb3는 위의 표 1에 나타난 것과 같이 각각 개과화된 항-IL31, 항-NGF, 및 항-TGFβ 항체를 지칭한다.

[0167] NBO = 결합이 관찰되지 않음.

[0168] WB = 약한 결합; KD는 정확하게 계산되지 않았음.

[0169] 실시예 4

[0170] 개에서 Fc 돌연변이체 IgG PK 연구

[0171] 연구의 목적은 개에서 2개 IgG 모노클로날 항체(mAb1 및 mAb2)의 약동학을 결정하는 것이었으며, 이는 각각의 IgG 안으로 합체된 Fc 돌연변이체 N434H로 2개의 별개의 상이한 표적에 대해 발생했다.

[0172] mAb1 WT 및 N434H 돌연변이체 IgG의 경우, 4마리 수컷 비글 개의 그룹에 단일 2mg/kg 용량을 정맥내로 투여하였다. mAb2 WT 및 돌연변이체 IgG의 경우, 4마리 수컷 및 4마리 암컷 비글 개의 그룹에 28일 간격으로 IgG 중 하나의 2mg/kg 용량을 3회 투여하였다. 처음 2회 용량은 피하로 투여하였고 마지막 용량은 정맥내로 투여하였다. 개과 혈청에서 '유리(free)' IgG는 각 IgG에 특이적인 검증된 리간드 결합 검정을 사용하여 검증되었고 Gyrolab xP™ 플랫폼에서 자동화되었다(도 3-6). 약동학 계산은 Watson™의 도움으로 비구획 접근법(AUC 계산을 위한 선형 사다리꼴 규칙)을 사용하여 수행되었다(표 3). mAb2 IgG의 경우, 반감기는 투여 후 7 내지 28일의 시점을 사용하여 제1 및 제2 용량에 대해 추정되었다. 마지막 용량에 대한 반감기는 투여 후 7 내지 42일의 시점을 사용하여 추정되었다. 추가 계산은 2차 및 3차 약물의 주입 후 농도-시간 프로파일의 증첩에 대한 AUC의 보정을 포함한, Excel™으로 수행되었다. 간단한 통계(평균, 표준 오차, 변동의 계수)가 있는 농도-시간 데이터 및 약동학 데이터의 요약은 Excel™ 또는 Watson™을 사용하여 계산되었다. 다른 통계 분석은 수행되지 않았다.

[0173] [표 3]

야생형 및 N434H 돌연변이 개과 IgG에 대해 계산된 반감기:

IgG	반감기(일)
mAb1 WT	9.7 +/- 2.6
mAb1 N434H	17.1 +/- 5.1
mAb2 WT	9.2 +/- 1.7
mAb2 N434H	19.3 +/- 3.1

[0174] mAb1 및 mAb2는 각각 개과화된 항-IL31 및 항-NGF 항체를 지칭한다.

[0175] 개과 IgGB(65) 점 돌연변이 N434H는 비글 개에서 2개의 상이한 개과 IgG의 반감기를 증가시키는 것으로 나타났다. mAb1의 경우, 반감기가 9.7+/-2.6일에서 17.1+/- 5.1일로 증가하였고, Ma2b2의 경우 9.2+/- 1.7에서 19.3+/- 3.1일로 증가했다. 작용의 메커니즘은 pH 6에서 개과 FcRn에 대한 친화도를 증가시키는 것을 통해 되고, 그것은 매우 상이하고 뚜렷한 가용성 표적에 결합하는 3개의 개과 IgG로 입증되었다. 따라서, IgGB(65)의 N434 돌연변이의 반감기 연장은 VHVL 도메인과 무관하다는 것이 입증되었다.

[0176] 실시예 5

[0177] FcRn 결합 검정

[0178] 개과 FcRn이 단리되고, 제조되고, 돌연변이체 Fc IgG는 위에서 논의된, Bergeron 등에 따라 개과 FcRn에 대해 검정되었다. 표준 PCR은 개과 FcRn-α 서브유닛 및 β-마이클로글로불린을 증폭하는데 사용되었다. FcRn-α 서브유닛 및 β-마이클로글로불린은 HEK 293 세포 내에 공동-형질감염되었고 FcRn 복합체는 c-말단 His 태그를 통한 IMAC 친화도 정제에 의해 정제되었다. FcRn 복합체는 BirA 효소 비오틴닐화 반응을 통해 비오틴 표지되었다. KD는 SA 센서 칩을 사용하여 Biacore T200(GE Healthcare, 미국 펜실베이니아주 피츠버그 소재) 또는 Biacore 8K(Cytiva, 미국 매사추세츠주 말버러 소재)에 의해 측정되었다.

[0179] FcRn은 변형된 SA 캡처 방법을 사용하여 센서의 표면 상에서 캡처되었다. 10mM MES; 150mM NaCl; 0.005% Tween20; 0.5mg/mL BSA; pH 6이 캡처, 실행 완충액 및 적정을 실행하는 방법으로 사용되었다. 또한 1x HBS-P, 0.5 mg/mL BSA; pH7.4가 완충액 및 적정을 실행하는 방법에 사용되었다. Fc 돌연변이체 IgG는 수용체 표면 위로 유동되었고 친화도는 T200 평가 소프트웨어 또는 Biacore Insight Evaluation 소프트웨어를 사용하여 결정되었다. 완충액만 함유하는 블랭크 실행은 모든 실행에서 차감되었다. 유동 세포는 50mM Tris pH 8 또는 pH 9를 사용하여 재생되었다. 실행은 15° C에서 수행되었다.

[0180] 각각의 위치에서 만들어진 돌연변이는 pH 6에서 FcRn에 대한 IgG의 친화도에 현저한 영향을 미친다. 개과 FcRn에 대한 야생형(WT) 및 돌연변이체 IgG의 결합은 표면 플라즈몬 공명(Biacore)에 의해 측정되었다.

[0181] 친화도에 대한 현저한 효과는 상이한 표적에 결합하는, 완전하게 상이하고 구조적으로 상이한 항체(즉, 항-IL31 및 항-NGF 항체) 및 동일한 표적에 결합하는 항체의 상이한 버전(즉, 항-IL31 및 항-NGF 항체의 상이한 버전)에서도 관찰되었다(표 1~4). 따라서, IgG에 대한 FcRn 친화도에서의 증가는 VHVL 도메인 또는 CDR 영역에 의존하



지 않는다. 또한, 친화도에 대한 현저한 효과는 약간의 변동이 있지만 다중 IgG 서브클래스에서 관찰되었다. 일반적으로, 결과는 IgG에 대한 FcRn 친화도에서의 증가가 개과 IgG 서브클래스와 무관함을 나타낸다.

[0182] [표 4a]

개과 FcRn에 대한 야생형(WT)과 N434 돌연변이체 IgG의 결합

돌연변이	개과 IgG 서브클래스	표적 1 + mAb1			표적 2 + mAb2		
		ID 번호	KD pH6	KD pH7.4	ID 번호	KD pH6	KD pH7.4
WT	IgGA	1	7.99E-08	NBO	39	9.55E-08	NBO
N434F	IgGA	2	1.27E-08	NBO	40	9.81E-09	NBO
N434H	IgGA	3	1.23E-08	NBO	41	1.04E-08	NBO
N434R	IgGA	4	4.38E-08	NBO	42	1.51E-08	NBO
N434S	IgGA	5	NBO	NBO	43	1.47E-07	NBO
N434W	IgGA	6	1.99E-08	NBO	44	1.06E-08	1.52E-06
N434Y	IgGA	7	2.52E-08	5.73E-07	45	1.43E-08	9.53E-06
WT	IgGB	8	1.99E-08	1.87E-05	46	9.15E-08	NBO
N434A	IgGB	9	1.39E-07	1.75E-07	47	9.81E-09	NBO
N434F	IgGB	10	3.07E-08	3.37E-05	48	1.92E-09	NBO
N434G	IgGB	11	1.18E-07	2.60E-05	49	3.43E-08	NBO
N434I	IgGB	12	7.71E-08	1.96E-05	50	2.76E-09	2.28E-05
N434K	IgGB	13	9.11E-09	7.86E-09	51	1.93E-09	5.94E-07
N434L	IgGB	14	1.43E-08	9.97E-07	52	1.83E-09	NBO
WT	IgGC	35	1.00E-07	NBO	53	5.20E-08	NBO
N434H	IgGC	36	8.79E-08	NBO	54	2.04E-08	NBO
WT	IgGD	37	3.45E-08	NBO	55	7.10E-08	NBO
N434H	IgGD	38	3.21E-09	NBO	56	1.20E-08	NBO

[0183]

[0184]

mAb1 및 mAb2는 각각 개과화된 항-IL31(34D03) 및 항-NGF(ZTS-841) 항체를 지칭함. 이 표 및 상기 표 1~3에서 mAb1은 동일함(즉, 34D03). 그러나, 이 표에서의 mAb2는 표 1~3에 나열된 mAb2 항체에 비해, 상이한 VL, VH 및 CDR 영역을 갖는 ZTS-841 항-NGF 항체임; NBO = 결합이 관찰되지 않음.

[0185]

[표 4b]

개과 FcRn에 대한 야생형(WT)과 N434 돌연변이체 IgG의 결합

돌연변이	개과 IgG 서브클래스	표적 1 + mAb1		
		ID 번호	KD pH6	KD pH7.4
N434M	IgGB	15	1.42E-08	1.46E-04
N434Q	IgGB	16	5.91E-09	2.18E-08
N434R	IgGB	17	9.06E-10	3.11E-09
N434S	IgGB	18	2.02E-08	6.96E-06
N434T	IgGB	19	3.42E-08	5.54E-07
N434V	IgGB	20	6.16E-09	2.75E-06
N434W	IgGB	21	1.98E-09	2.53E-05
N434Y	IgGB	22	2.71E-09	1.90E-06
N434H	IgGB	31	6.45E-09	NBO
WT 2	IgGB	33	4.00E-08	NBO
N434H	IgGB	34	1.00E-09	8.39E-05

[0186]

[0187]

mAb1은 개과화된 항-IL31 항체를 지칭함. ID 번호(15~21 및 31)는 34D03 항-IL31 항체에 상응함. ID 번호(33 및 34)는 11E12 항-IL31 항체에 상응함.

[0188]

실시예 6

[0189]

개에서 Fc 돌연변이체 IgG PK 연구

[0190]

연구의 목적은 0일차에 시험 물품의 투여에 이어서 최대 210일 동안 소양증에서의 감소를 평가함으로써 효능이 측정된 개과 유도된-소양증 모델에서의 효능을 기반으로 4.0mg/kg의 ZTS-00008183의 용량의 효과를 결정하는 것이었다. 본 명세서에 사용된 용어 "ZTS-00008183"은 그 불변 영역에 N434H 돌연변이를 갖는 항-IL31 항체를 지칭한다. ZTS-00008183은 본 명세서에 기재된 34D03의 가변 영역(즉, CDR을 포함하는 VL 및 VH)을 갖는다.

[0191]

ZTS-00008183 또는 위약을 비글 개(~4세 연령)에 단일 SC 주사로 투여하였다. 치료가 아래에 요약되어 있다.

[0192] [표 5]

치료 요약

치료 그룹	경로	용량 (mg/kg)	화합물	제형 농도 (mg/mL)	N
T01	SC	0	위약	0	8
T02	SC	4.0	ZTS-00008183	40	8

[0193]

혈청 샘플은 투여-전(-7일차) 및 약물 투여 후 7, 14, 28, 56, 84, 112, 140, 168 및 210일차에 수집되었다.

[0194]

구체적으로, 비글 개(n=8, 투여하는 날짜에 약 4세 연령)는 IL-31 유도된 소양증 챌린지 연구에서 4mg/kg ZTS-00008183의 단일 피하 투여로 치료되었다. 혈청 샘플은 투여-전(-7일차) 및 약물 투여 후 7, 14, 28, 56, 84, 112, 140, 168 및 210일차에 수집되었다.

[0195]

[0196]

테스트 mAb는 리간드 결합 검정을 사용하여 정량화되었다. 항-약물 항체(ADA)는 적격 ADA 검정 방법으로 평가되었다.

[0197]

생체분석 데이터는 BioAgilytix Labs으로부터 Excel™ 스프레드시트로 수신되었다. 데이터는 Watson™ v.7.4.1로 읽어들였다. 독성 및 약동학 파라미터( $C_{max}$ ,  $t_{max}$ , AUC, AUCextrap 및  $t_{1/2}$ )는 Watson™ v.7.4.1의 도움으로 비-구획 접근법을 사용하여 계산되었다. ZTS-00008183 반감기는 투여 후 56일 내지 210일의 시점을 사용하여 그룹 T02에 대해 추정되었다. 면역원성이 평가되었다.

[0198]

ZTS-00008183의 혈청 농도가 표 6에 나열되어 있다.

[0199]

[표 6]

단일 4mg/kg 피하 투여(T02)에 이어 개에서 ZTS-00008183의 약동학적 매개변수

파라미터	단위	대상제 1	대상제 2	대상제 3	대상제 4	대상제 5	대상제 6	대상제 7	대상제 8	평균	S.D.	CV
AUC	µg*일/mL	1440	2070	1600	2190	2110	1810	2110	2160	1940	285	14.7
AUCextrap	µg*일/mL	1450	2090	1600	2230	2140	1830	2130	2190	1960	295	15.1
$C_{max}$	µg/mL	25.3	34.5	28.6	29.5	29.8	28.7	41.9	35.7	31.8	5.29	16.7
$t_{max}$	일	14.0	7.00	7.00	14.0	28.0	7.00	7.00	7.00	11.4	7.42	65.3
$t_{1/2}$	일	24.9	31.6	26.3	35.2	32.0	31.6	29.2	30.8	30.2	3.31	11.0

[0200]

[0201]

ZTS-00008183의 평균 약동학적 파라미터가 아래 표 7에서 입증된다.

[0202]

[표 7]

ZTS-00008183의 평균 약동학적 파라미터.

파라미터	단위	ZTS-00008183
AUC	µg*일/mL	1940 ± 285
AUC Extrap	µg*일/mL	1960 ± 295
$C_{max}$	µg/mL	31.8 ± 5.3
$t_{max}$	일	11.4 ± 7.4
$t_{1/2}$	일	30.2 ± 3.3

[0203]

[0204]

치료-유도된 면역원성은 검출되지 않았다.

[0205]

ZTS-00008183의 혈청 프로파일이 도 7에 예시되어 있다. ZTS-00008183의 평균 혈청 프로파일이 도 8에 예시되어 있다.

[0206]

요약하면, 결과는 N434H 돌연변이를 갖는 개과 IgG 불변 도메인이 약 30일 동안 반감기를 제공했음을 입증한다. 이는 야생형에 대한 9.2 내지 9.7일의 반감기에 비해, 반감기에서 2-배 초과 증가(즉, 200% 증가)이다(표 2

참조).

[0207] 실시예 7

[0208] Fc 돌연변이체 IgG의 장기간 치료 효과

[0209] 4mg/kg에서 ZTS-00008183의 단일 피하 용량이 IL-31 유도된 소양증의 개과 모델에서 평가되었다.

[0210] 24마리의 건강한 비글 개가 무작위화된 완전 블록 설계를 사용한 치료에 대해 무작위화되었고 병행-설계 효능 연구에서 4mg/kg 체중에서의 ZTS-00008183 또는 위약을 투여받았다. 동물은 과거 소양증 점수에 의해 차단되어 크기 3의 여덟(8)개 완전한 블록을 형성하였다.

[0211] [표 8]

치료 요약

치료 그룹	경로	용량 (mg/kg)	화합물	제형 농도 (mg/mL)	N
T01	SC	0	위약	0	8
T02	SC	4.0	ZTS-00008183	40	8

[0212] SC는 피하를 지칭함; N은 동물의 수를 지칭함.

[0213] 각각의 동물에는 연구 -7일차에 소양증을 유도하기 위해 IL-31 켈린지(2.5 µg/kg)가 투여되어 기준선 소양증 점수를 확립하였다. 추가 IL-31 켈린지는 연구 7, 28, 56, 84, 112, 140, 168 및 210일차에 투여되었다.

[0214] 동물은 각 켈린지 후 120-분 기간 동안 소양증 거동에 대해 관찰되었다. 관찰은 1-분 범위에 걸쳐 이루어졌고 그 범위에서 임의의 소양증 활동은 "예" 응답으로 나타났다. 예 응답의 누적 수가 소양증 점수를 결정했다.

[0215] 이 연구 동안 언급된 유해 사례는 없었고 모든 시험 및 대조군 물품 및 켈린지 물질은 프로토콜에 따라 투여되었다.

[0216] 결과는 4.0mg/kg에서 ZTS-00008183의 단일 SC 용량이 본 발명자들의 IL-31 유도된 소양증의 개과 모델에서 3, 4 및 5개월(P< 0.0001)에서의 대조군과 비교하여 유의하게 더 낮은 최소 제곱 평균 소양증 점수(표 9, 11 및 13)를 나타내었음을 입증한다.

[0217] 도 9~13에 나타난 것과 같이, ZTS-0008183(T02)은 4mg/kg으로 투여되었을 때 연구 84, 112, 140, 168 및 210일차의 대조군과 비교하여 본 발명자들의 IL-31 유도된 소양증의 개과 모델에서 유의하게 더 낮은 총 소양증 점수를 나타냈다.

[0218] 소양증 점수에 기초하여, 결과는 또한 ZTS-00008183이 84, 112, 140, 168 및 210일(즉, 약 7개월) 동안 치료적으로 효과적임을 입증한다.

[0219] 결과는 ZTS-00008183이 장기간 치료 효과를 가지고 3, 4, 5, 6 또는 7개월마다 1회 투여될 수 있음을 추가로 입증한다.

[0220] [표 9]

위약(T01) 또는 ZTS-00008183(T02)으로 치료 후 84 일차에 92.9% 상한 및 하한 신뢰 한계를 갖는 최소 제곱 평균 소양증 점수.

치료 수	동물의 수	최소 제곱 평균 (1sm)	표준 편차	92.9% 하한 신뢰 한계	92.9% 상한 신뢰 한계	범위	평균에서 % 변화 (1)
T01	8	86	6.0	73	98	27 내지 112	
T02	8	9	6.2	-4	21	0 내지 24	90.0

[0221]

[0222] [표 10]

위약(T01) 또는 ZTS-00008183(T02)으로 치료 후 84일차에 92.9% 상한 및 하한 신뢰 한계를 갖는 치료 점수 간의 평균에서의 차이.

대비	평균에서의 차이	표준 오차	92.915% 하한 신뢰 한계	92.915% 상한 신뢰 한계	df	p 값	0.07085 수준에서 유의성
T01 대 T02	77.1	8.77	59.9	94.3	13.6	<.0001	*

[0223]

[0224] [표 11]

위약(T01) 또는 ZTS-00008183(T02)으로 치료 후 112일차에 95.4% 상한 및 하한 신뢰 한계를 갖는 최소 제공 평균 소양증 점수.

치료 번호	동물의 수	최소 제공 평균(lsm)	표준 오차	95.425% 하한 신뢰 한계	95.425% 상한 신뢰 한계	범위	평균에서 % 변화(1)
T01	8	84	6.5	70	98	25 내지 117	
T02	8	11	6.6	-3	26	1 내지 29	86.8

[0225]

[0226] [표 12]

위약(T01) 또는 ZTS-00008183(T02)으로 치료 후 112일차에 95.4% 상한 및 하한 신뢰 한계를 갖는 치료 점수 간의 평균에서의 차이.

대비	평균에서의 차이	표준 오차	95.425% 하한 신뢰 한계	95.425% 상한 신뢰 한계	df	p 값	0.04575 수준에서 유의성
T01 대 T02	72.8	10.63	49.5	96.1	13.8	<.0001	*

[0227]

[0228] [표 13]

위약(T01) 또는 ZTS-00008183(T02)으로 치료 후 140일차에 95.4% 상한 및 하한 신뢰 한계를 갖는 최소 제공 평균 소양증 점수.

치료 번호	동물의 수	최소 제공 평균(lsm)	표준 오차	95.468% 하한 신뢰 한계	95.468% 상한 신뢰 한계	범위	평균에서 % 변화(1)
T01	8	86	5.8	74	99	33 내지 116	
T02	8	21	5.9	8	34	9 내지 45	76.1

[0229]

[0230] [표 14]

위약(T01) 또는 ZTS-00008183(T02)으로 치료 후 140일차에 95.4% 상한 및 하한 신뢰 한계를 갖는 치료 점수 간의 평균에서의 차이.

대비	평균에서의 차이	표준 오차	95.468% 하한 신뢰 한계	95.468% 상한 신뢰 한계	df	p 값	0.04352 수준에서 유의성
T01 대 T02	65.8	9.67	44.3	87.3	13.9	<.0001	*

[0231]

[0232] 요약하면, 결과는 N434H 돌연변이를 갖는 개과 IgG 불변 도메인이 약 210일(즉, 7개월) 동안 치료 혈청 수준을 유지함을 입증한다. 이는 이전 연구에서 보고된 야생형 항-IL31 항체의 치료 수준의 일수에 비해 몇 배 더 높다.

[0233] 실시예 8

[0234] FcRn 결합 검정

[0235] 실시예 3에서 논의된 것처럼, 개과 FcRn이 단리되고, 제조되고, 돌연변이체 Fc IgG는 위에서 논의된 Bergeron 등에 따라 개과 FcRn에 대해 검정되었다. 시노물구스 원숭이, 인간, 생쥐 및 쥐로부터의 서열 정렬로부터 설계된 축퇴 프라이머를 사용하여, 표준 PCR을 사용하여 개과 FcRn-α 서브유닛 및 β 마이크로글로불린을 증폭시켰

다. 프라이머는 c-말단 6x His + BAP 태그(AGLNDIFEAQKIEWHE)로 조작된, pcDNA3.1(+) 벡터 내로 서브클로닝을 용이하게 하기 위해 3 프라이머에 HindIII 및 5 프라이머 말단에 BamHI을 함유했다. FcRn- $\alpha$  서브유닛 및  $\beta$  마이크로글로불린은 HEK 293 세포 내에 공동-형질감염되었고 FcRn 복합체는 c-말단 His 태그를 통한 IMAC 친화도 정제에 의해 정제되었다. KD는 CM5 또는 SA 센서 칩을 사용하여 Biacore T200(GE Healthcare, 미국 펜실베이니아주 피츠버그 소재)에 의해 측정되었다.

[0236] FcRn은 변형된 SA 캡처 방법을 사용하여 센서의 표면 상에서 캡처되었다. 10mM MES; 150mM NaCl; 0.005% Tween20; 0.5mg/mL BSA; pH 6이 캡처, 실행 완충액 및 적정을 실행하는 방법으로 사용되었다. 또한 1x HBS-P, 0.5 mg/mL BSA; pH7.4가 완충액 및 적정을 실행하는 방법에 사용되었다. Fc 돌연변이체 IgG는 수용체 표면 위로 유동되었고 친화도는 T200 평가 소프트웨어 또는 Biacore Insight Evaluation 소프트웨어를 사용하여 결정되었다. 완충액만 함유하는 블랭크 실행은 모든 실행에서 차감되었다. 유동 세포는 50mM Tris pH 8 또는 pH 9를 사용하여 재생되었다. 실행은 15° C에서 수행되었다.

[0237] mAb3 항-TGF $\beta$  항체에 대해 위치 434에서 만들어진 돌연변이는 pH 6에서 FcRn에 대한 IgG의 친화도에 현저한 영향을 미친다. 돌연변이 N434H는 pH 6에서 FcRn 친화도에서 유의한 증가를 가진 반면, pH 7.4에서는 약한 친화도를 유지한다. 이 연구는 IgG에 대한 FcRn 친화도에서의 증가는 VHVL 도메인에 의존적이지 않고 임의의 개과 항-TGF $\beta$  항체에 대해 보편적임을 밝힌다.

[0238] [표 15]

표면 플라즈몬 공명(Biacore)에 의해 측정된 개과 FcRn에 대한 야생형(WT) 및 N434 돌연변이체 IgG의 결합:

IgG	ID 번호	pH6 에서 KD	pH7.4 에서 KD	ID 번호	pH6 에서 KD	pH7.4 에서 KD	ID 번호	pH6 에서 KD	pH7.4 에서 KD	ID 번호	pH6 에서 KD	pH7.4 에서 KD
WT	1	2.44E-08	NBO	3	8.74E-08	NBO	5	3.74E-08	NBO	7	7.53E-08	NBO
N434H	2	7.06E-09	NBO	4	1.79E-09	2.34E-05	6	1.07E-09	2.88E-05	8	1.68E-09	3.67E-06

[0239]

개과 IgG 서브클래스 B가 사용됨.

[0240]

NBO = 결합이 관찰되지 않음.

[0241]

[0242] ID 번호 1, 3, 5, 및 7은 각각 야생형 mAb3 항-TGF $\beta$  항체(ZTS-501, ZTS-426, ZTS-122, 및 ZTS-207)를 나타낸다. ID 번호 (2, 4, 6, 및 8)은 각각 돌연변이체 mAb3 항-TGF $\beta$  항체(ZTS-501, ZTS-426, ZTS-122, 및 ZTS-207)를 나타낸다.

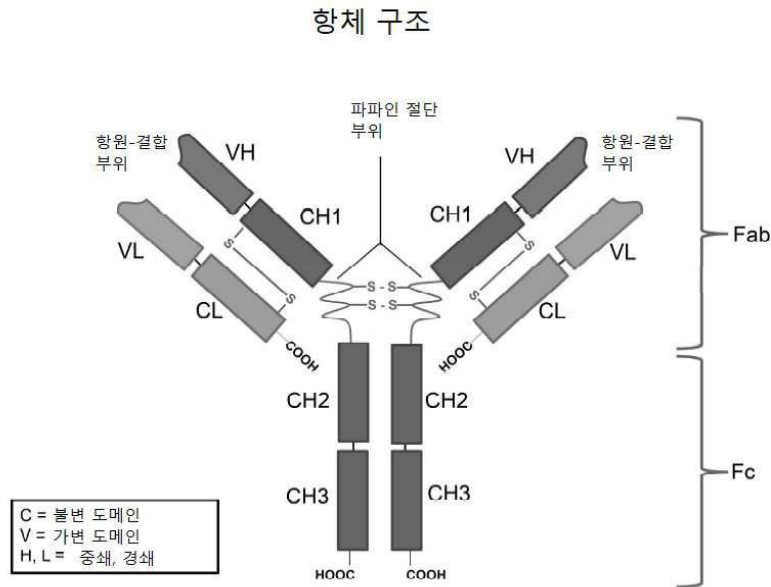
[0243]

발명의 바람직한 실시형태를 설명했지만, 발명은 정확한 실시형태로 제한되지 않고, 다양한 변경 및 변형이 첨부된 청구범위에 정의된 발명의 범주 또는 사상을 벗어나지 않고 당업자에 의해 수행될 수 있음을 이해해야 한다.

[0244]

도면

도면1



도면2a

개과 IgGB\_65\_Fc\_N434H

```

APEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVSVLPIG
HQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQE
PESKYRTTPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK
    
```

개과 IgGB\_65\_Fc\_WT

```

APEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVSVLPIG
HQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQE
PESKYRTTPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK
    
```



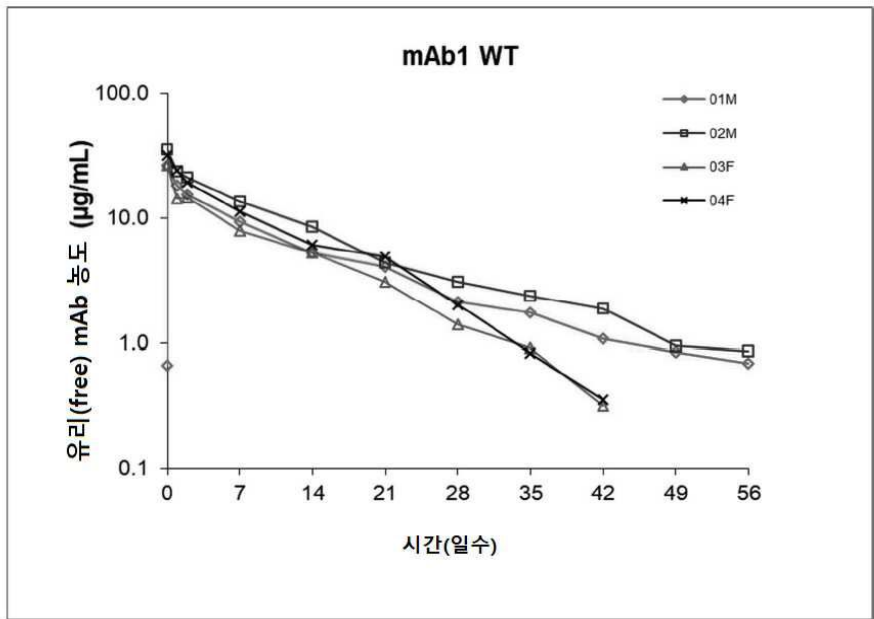
도면2c

개과 IgGB\_65 불변 CH2~CH3 WT

```

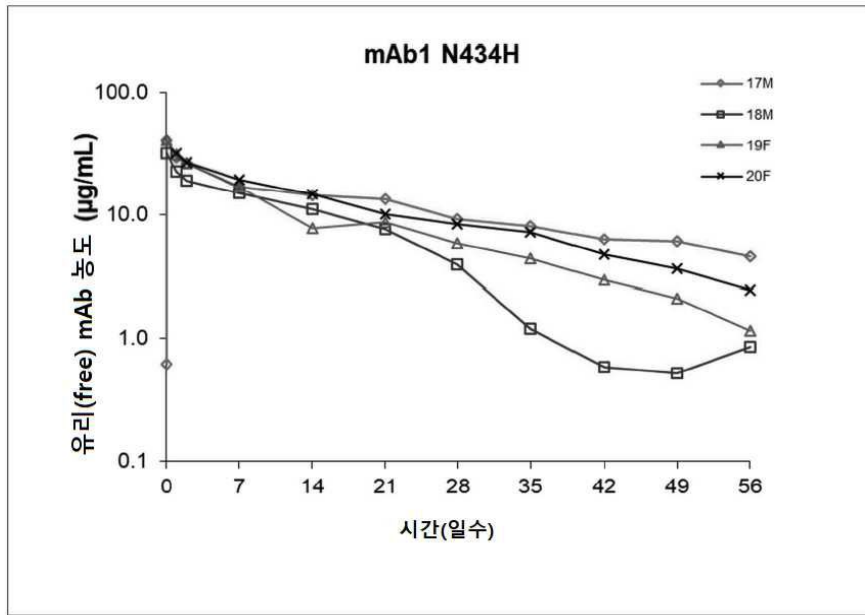
GCTCCAGAAATGCTGGGAGGACCAAGCGTGTTTCATCTTTCCACCC
AAGCCCAAAGACACACTGCTGATTGCTAGAACTCCCGAGGTGACC
TGCCTGGTGGTGGACCTGGATCCAGAGGACCCCGAAGTGCAGATC
TCCTGGTTCGTGGATGGGAAGCAGATGCAGACAGCCAAAACCTCAG
CCTCGGGAGGAACAGTTTAAACGGAACCTATAGAGTGGTGTCTGTG
CTGCCAATTGGACACCAGGACTGGCTGAAGGGCAAACAGTTTACA
TGCAAGGTGAACAACAAGGCCCTGCCTAGTCCAATCGAGAGGACT
ATTTCAAAGCTAGGGGACAGGCTCATCAGCCTTCCGTGTATGTGC
TGCCTCCATCCCGGGAGGAACTGTCTAAGAACACAGTGAGTCTGA
CTTGTCTGATCAAAGATTTCTTTCCCCCTGACATTGATGTGGAGTG
GCAGAGCAATGGGCAGCAGGAGCCAGAATCCAAGTACAGAACCA
CACCACCCAGCTGGACGAAGATGGCTCCTATTTCTGTACAGTAA
GCTGTCAGTGGACAAATCTAGGTGGCAGCGCGGGGATACCTTTAT
CTGCGCCGTGATGCACGAGGCTCTGCACAATCATTACACACAAGA
AAGTCTGTACATAGCCCCGGCAAG
    
```

도면3

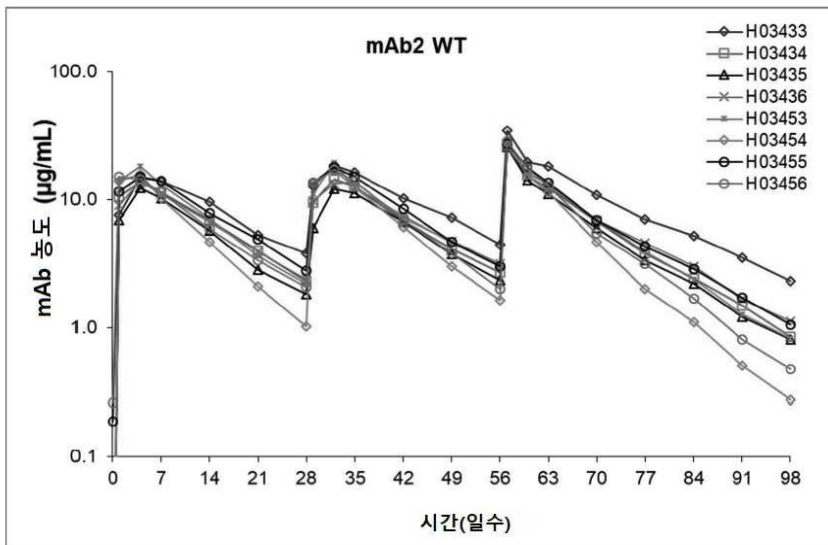




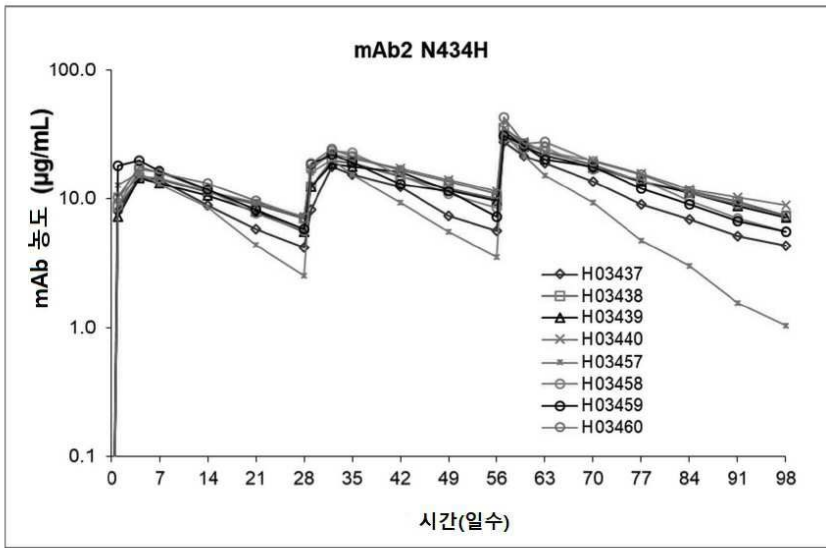
도면4



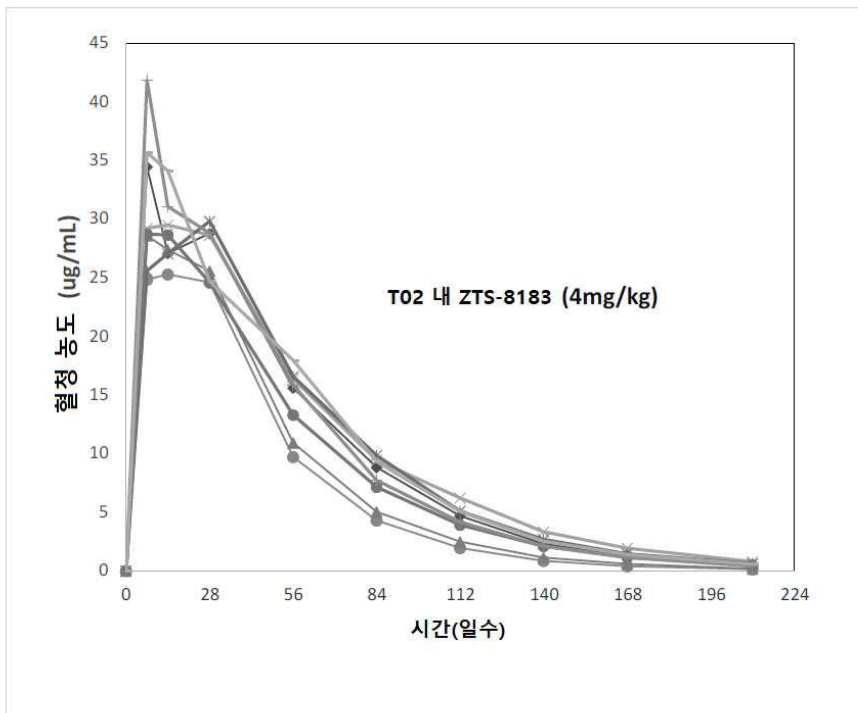
도면5



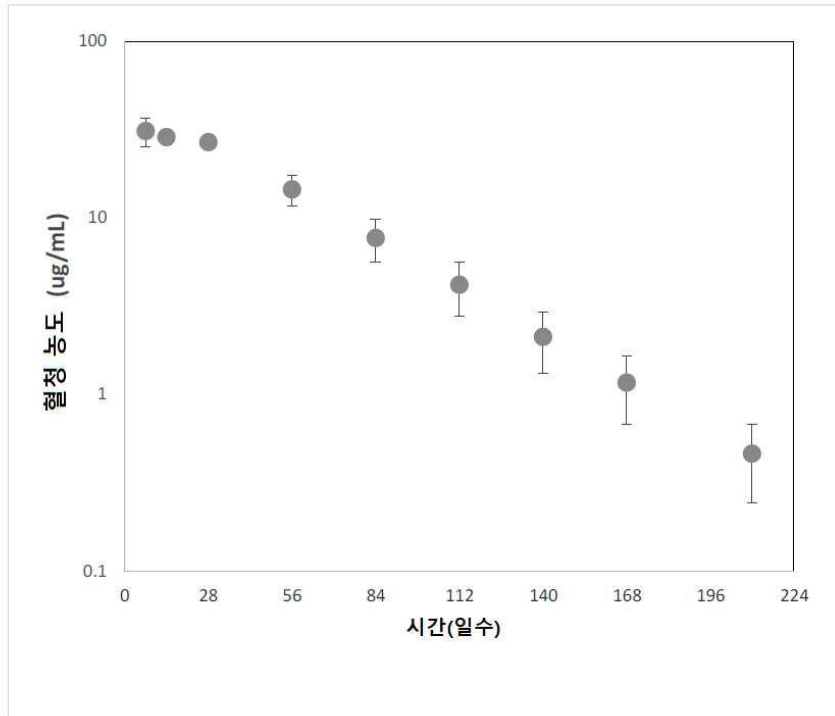
도면6



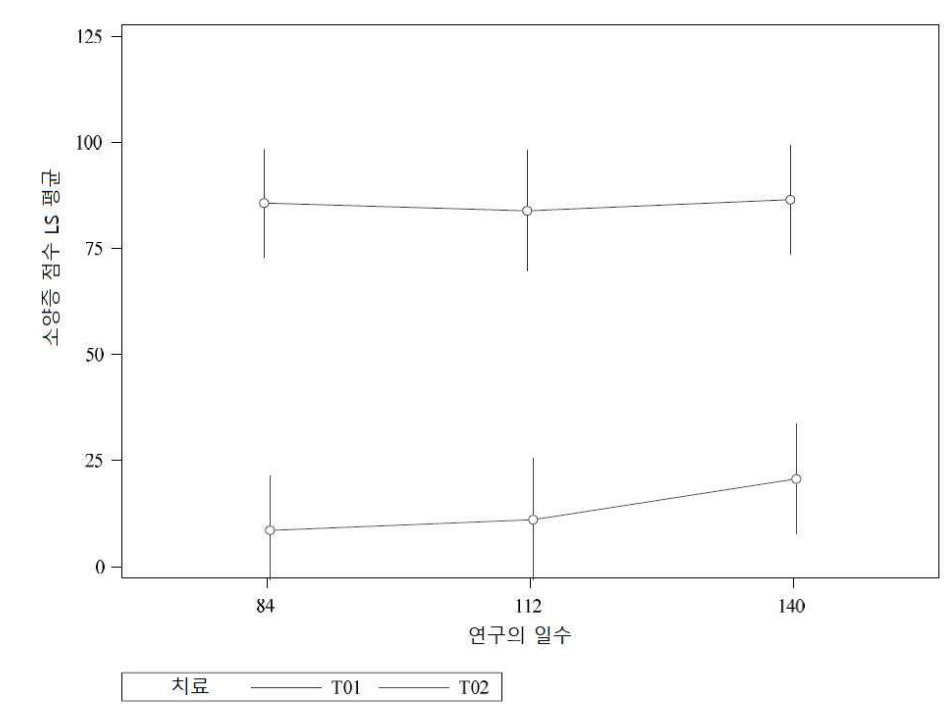
도면7



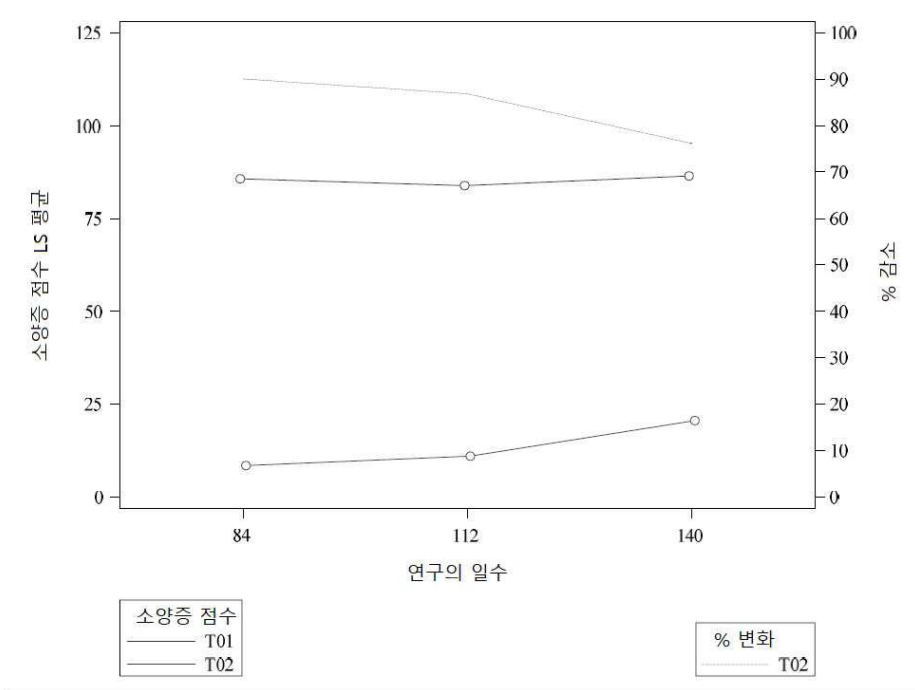
도면8



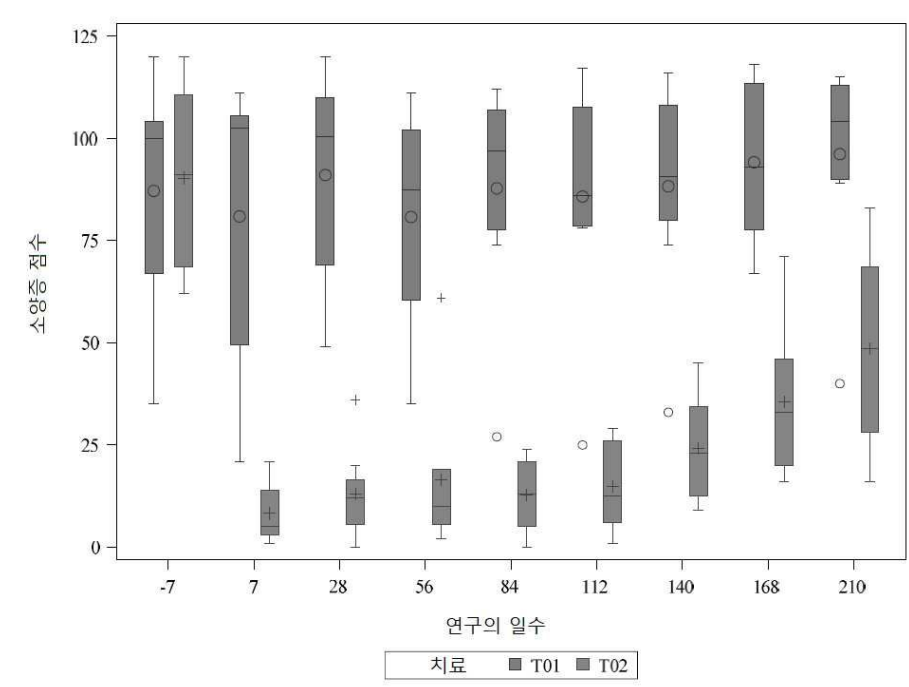
도면9



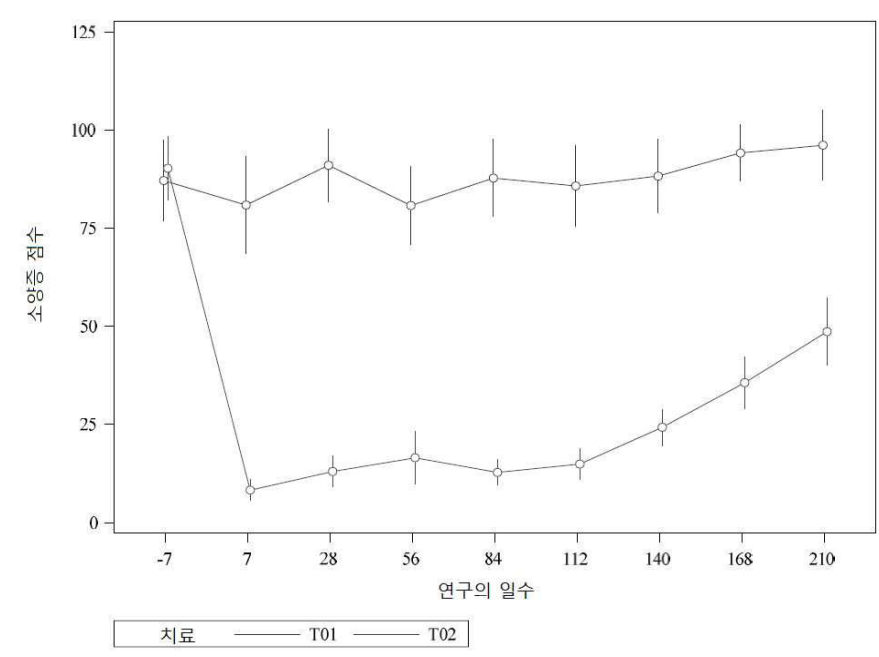
도면10



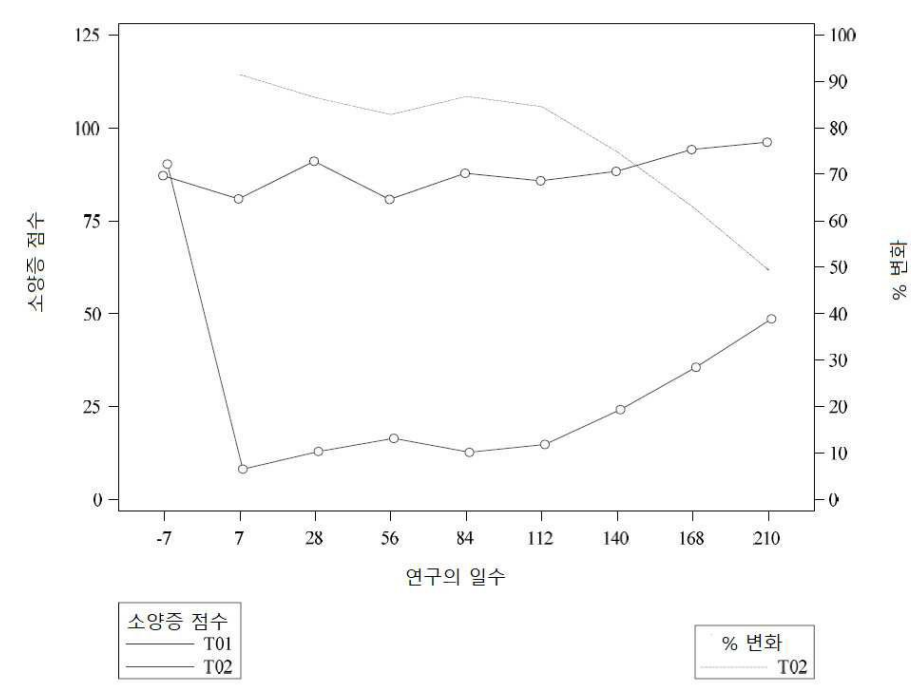
도면11



도면12



도면13



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Zoetis Services LLC

<120> CANINE ANTIBODY VARIANTS

<130> ZP000358A-PCT  
 <140> PCT/US2021/052338  
 <151> 2021-09-28  
 <150> US 63/084,241  
 <151> 2020-09-28  
 <160> 120  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 335  
 <212> PRT  
 <213> *Canis familiaris*  
 <400> 1  
 Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr  
                   20                    25                    30  
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ser Leu Thr Ser  
                   35                    40                    45  
 Gly Val His Thr Phe Pro Ser Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
                   50                    55                    60  
 Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr  
 65                    70                    75                    80  
 Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys  
                   85                    90                    95  
 Pro Val Pro Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys  
                   100                    105                    110  
 Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile  
                   115                    120                    125  
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu  
                   130                    135                    140  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln  
                   145                    150                    155                    160

Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln  
 165 170 175

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

Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys  
 195 200 205

Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys  
 210 215 220

Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser  
 225 230 235 240

Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys  
 245 250 255

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

Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu  
 275 280 285

Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg  
 290 295 300

Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu  
 305 310 315 320

His His His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 325 330 335

<210> 2

<211> 335

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 2

Ala Ser Thr Thr Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Cys Gly  
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Ser Thr Val Ala Leu Ala Cys Leu Val Ser Gly Tyr  
 20 25 30

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





Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg  
 290                      295                      300  
 Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu  
 305                      310                      315                      320

His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 325                      330                      335

<210> 3

<211> 1005

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 3

gccagcacca cagctccctc cgtgttcccc ctggctccta gctgctggctc tacctccggc 60  
 agcacagtgg ccctggcttg tctgggtgcc ggctacttcc ctgagccagt gaccgtgagc 120  
 tggaaactccg gctccctgac ctccggagtg cacacatttc caagcgtgct gcagtcttcc 180  
 ggccctgtatt ctctgagctc tatggtgacc gtgccttcca gcaggtggcc atctgagaca 240  
 ttcacctgca acgtggccca tcccgttcc aagacaaagg tggacaagcc cgtgcctaag 300  
  
 agggagaatg gaagggtgcc ccggcccccct gattgccecta agtgtccagc tccagagatg 360  
 ctgggaggac catccgtgtt catctttcca cccaagccca aggataccct gctgatcgct 420  
 agaaccctg aggtgacatg cgtgggtggg gacctggatc cagaggacc cagagtgacg 480  
 atctcttggg tcgtggatgg caagcagatg cagaccgcca agacacagcc tagggaggag 540  
 cagttaaac gcacctacag ggtggtgtcc gtgctgcca tcgccacca ggactggctg 600  
 aagggaagc agtttacctg caaggtgaac aataaggctc tgccttctcc aatcgagaga 660  
 acaatctcca aggccagggg ccaggctcat cagcctagcg tgtacgtgct gcctccatcc 720  
  
 agagaggagc tgagcaagaa caccgtgtct ctgacatgct tgatcaagga tttctttccc 780  
 cctgacatcg atgtggagtg gcagagcaat ggccagcagg agccagagtc taagtatcgc 840  
 accacaccac ccagctgga cgaggatggc agctacttcc tgtatagcaa gctgtctgtg 900  
 gacaagtcta gatggcagcg gggcgatacc tttatctgtg ccgtgatgca cgaggcactg 960  
 cacaatcact acaccagga gagtctgagc cacagcccag gaaaa 1005

<210> 4

<211> 1005

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 4

```

gcctcaaca ctgctcctag cgtgtttccc ctggcccta gctgcggaag tacctcaggc      60

agcacagtgg ccttggcttg tctggtgtct ggatatttcc ctgagccagt gaccgtgagt      120
tggaacacgc gctctctgac ctccggggtg cacacatttc catctgtgct gcagtctagt      180
ggcctgtact cctgtcaag catggtgact gtgccttctt ctaggaggcc atcagaaact      240
ttcacctgca acgtggccca tcccgccagc aagaccaaag tggacaagcc cgtgcctaaa      300
agggagaatg gaagggtgcc aagaccacct gattgcccta agtgtccagc tccagaaatg      360
ctgggaggac caagcgtgtt catctttcca cccaagccca aagacacact gctgattgct      420
agaactcccc aggtgacctg cgtggtggtg gacctggatc cagaggacc cgaagtgcag      480

atctcctggt tcgtggatgg gaagcagatg cagacagcca aaactcagcc tcgggaggaa      540
cagtttaacg gaacctatag agtgggtgct gtgctgccaa ttggacacca ggactggctg      600
aagggaacac agtttacctg caaggtgaac aacaaggccc tgcctagtcc aatcgagagg      660
actatttcaa aagctagggg acaggtcatc cagccttccg tgtatgtgct gcctccatcc      720
cgggaggaac tgtctaagaa cacagtgagt ctgacttgtc tgatcaaaga tttctttccc      780
cctgacattg atgtggagtg gcagagcaat gggcagcagg agccagaatc caagtacaga      840
accacaccac cccagctgga cgaagatggc tcctatttcc tgtacagtaa gctgtcagtg      900

gacaaatcta ggiggcagcg cggggatacc tttatctgcg ccgigtatgca cgaggctctg      960
cacaatcatt acacacaaga aagtctgtca catagccccg gcaag      1005

```

<210> 5

<211> 96

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 5

```

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

```

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr  
 65                      70                      75                      80

Phe Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Lys Thr Lys Val Asp Lys  
                                  85                      90                      95

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 6

Pro Val Pro Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys  
 1                      5                      10                      15

Pro Lys Cys Pro  
                                  20

<210> 7

<211> 110

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 7

Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys  
 1                      5                      10                      15

Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
                                  20                      25                      30

Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe  
                                  35                      40                      45

Val Asp Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu  
                                  50                      55                      60

Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gly His  
 65                      70                      75                      80

Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys  
                                  85                      90                      95

Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg  
                                  100                      105                      110

<210> 8

<211> 109

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 8

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

100

105

<210> 9

<211> 291

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 9

gcctcaaca ctgctcctag cgtgtttccc ctggccccta gctgcggaag tacctcaggc        60  
 agcacagtgg ccctggcttg tctggtgtct ggatatttcc ctgagccagt gaccgtgagt        120  
 tggaacacgc gctctctgac ctccggggtg cacacatttc catctgtgct gcagtctagt        180  
 ggctgtact cctgtcaag catggtgact gtgccttct ctaggtggcc atcagaaact        240  
 ttcacctgca acgtggccca tcccgccagc aagaccaaag tggacaagcc c                291

<210> 10

<211> 57

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*  
 <400> 10  
 gtgcctaaaa gggagaatgg aagggtgcc aagaccactg attgcctaa gtgtcca 57  
 <210> 11  
 <211> 330  
 <212> DNA  
 <213> *Canis familiaris*  
 <400> 11  
 gctccagaaa tgetgggagg accaagcgtg ttcattttc cacccaagcc caaagacaca 60  
 ctgctgattg ctagaactcc cgaggtgacc tgcgtggtgg tggacctgga tccagaggac 120  
 cccgaagtgc agatctcctg gttcgtgat gggaagcaga tgcagacagc caaaactcag 180  
 cctcgggagg aacagtttaa cggaacctat agagtgtgt ctgtgctgcc aattggacac 240  
  
 caggactggc tgaaggcaa acagtttaca tgcaagtgga acaacaaggc cctgcctagt 300  
 ccaatcgaga ggactatttc aaaagctagg 330  
 <210> 12  
 <211> 327  
 <212> DNA  
 <213> *Canis familiaris*  
 <400> 12  
 ggacaggctc atcagcttc cgtgtatgtg ctgcctecat cccgggagga actgtctaag 60  
 aacacagtga gtctgacttg tctgatcaa gatttcttc cccctgacat tgatgtggag 120  
 tggcagagca atgggcagca ggagccagaa tccaagtaca gaaccacacc accccagctg 180  
 gacgaagatg gctcctattt cctgtacagt aagctgtcag tggacaaatc taggtggcag 240  
  
 cgcggggata cttttatctg cgccgtgatg cacgagctc tgcacaatca ttacacaaa 300  
 gaaagtctgt cacatagccc cggcaag 327  
 <210> 13  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 13  
 Tyr Tyr Asp Ile Asn  
 1 5  
 <210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Asn Tyr Gly Met Ser

1                    5

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

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

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

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

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

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

1                    5                    10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Val Arg Gly Tyr Gly Tyr Asp Thr Met Asp Tyr

1                    5                    10

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met His

1                    5                    10                    15

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala Gly Thr Gly Leu Met His

1                    5                    10                    15

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1                    5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Gln Gln Ser Asn Lys Asp Pro Leu Thr

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Gln Gln Ser Arg Glu Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 25

<211> 111

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

85 90 95



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

100 105 110

<210> 26

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> caninized variable light chain mAb sequence, from Mus musculus  
and Canis

<400> 26

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr

20 25 30

Gly Ile 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 Val Pro Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

<210> 27

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> caninized variable light chain mAb sequence, from Mus musculus  
and Canis

<400> 27

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr  
 20 25 30  
 Gly Ile Ser Phe Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro  
 35 40 45  
 Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Arg Val Glu Ala Asp Asp Ala Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn  
 85 90 95  
 Lys Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 28  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 28  
 Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Ala Ile Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala  
 20 25 30  
 Gly Thr Gly Leu Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro  
 35 40 45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ala Gly Val Pro Thr  
 50 55 60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 65 70 75 80  
 Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg  
 85 90 95  
 Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 29

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> caninized variable light chain mAb sequence, from Mus musculus

and Canis

<400> 29

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

1                    5                    10                    15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

<210> 30

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 30

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile

                  35                    40                    45

Gly Trp Ile Phe Pro Gly Asp Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Thr Phe  
 50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 31

<211> 121

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> caninized variable heavy chain mAb sequence, from *Mus musculus*

and *Canis*

<400> 31

Glu 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 Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Lys Tyr Tyr

20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Ala Gly Leu Asp Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 32

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 32

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

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

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 33

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220

><223> caninized variable heavy chain mAb sequence, from Mus musculus  
 and Canis

<400> 33

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30  
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Thr Ile Ser Tyr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Asn Ile  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Val Arg Gly Tyr Gly Tyr Asp Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110  
 Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 34

<211> 159

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 34

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

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

115 120 125

Thr Phe Glu Cys Lys Ser Phe Ile Leu Thr Ile Leu Gln Gln Phe Ser

130 135 140

Ala Cys Leu Glu Ser Val Phe Lys Ser Leu Asn Ser Gly Pro Gln

145 150 155

<210> 35

<211> 477

<212> DNA

<213> *Canis familiaris*

<400> 35

atgctctccc acacaggacc atccaggttt gcctgttcc tgctctgctc tatggaaacc 60

ttgctgtcct cccatatggc acccacccat cagctaccac caagtgatgt acgaaaaatc 120

atcttggaat tacagccctt gtcgagggga cttttggaag actatcagaa gaaagagaca 180

ggggtgccag aatccaaccg taccttgctg ctgtgtctca cctctgattc ccaaccacca 240

cgctcaaca gctcagccat cttgccttat ttcagggcaa tcagaccatt atcagataag 300

aacattattg ataaatcat agaacagctt gacaaactca aatttcaaca tgaaccagaa 360

acagaaattt ctgtgcctgc agatactttt gaatgtaaaa gttcatctt gacgatttta 420

cagcagttct cggcgtgcct ggaaagtgtg ttaagtcac taaactctgg acctcag 477

<210> 36

<211> 333

<212> DNA

<213> *Mus musculus*

<400> 36

gacattgtgc tgacceaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60

atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattatggca ttagttttat gactggtac 120

cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatcaa cctagaatct 180

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggtg tctaggacag acttcaccct caccattaat 240

cctgtggaga ctgatgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagtaataa ggatccgctc 300

acgttcggtg ctgggaccaa gctggagctg aaa 333

<210> 37

<211> 363

<212> DNA

<

213> Mus musculus

<400> 37

```

caggttcagc tgcagcagtc tggagctgaa ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagttg      60
tcttgcgaagg ctcttggtca caccttcaaa tactatgata taaactgggt gaggcagagg      120
cctgaacagg gacttgagtg gattggatgg atttttcctg gagatggtgg tactaagtac      180
aatgagacgt tcaagggcaa ggccacactg actacagaca aatcctccag cacagcctac      240
atgcagctca gcaggctgac atctgaggac tctgctgtct atttctgtgc aagagggggg      300
acttcggtga taagggatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc      360
tca                                                                              363
    
```

<210> 38

<211> 333

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 38

```

gacattttgc tgaccaaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gagggccatc      60
atctctgca aggccagcca aagtgtcagt ttgctggta ctggtttaat gcaactgtac      120
caacagaaac caggacagca acccaaactc ctcatctatc gtgcatcaa cctagaagct      180
ggggttecta ccaggtttag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caatatccat      240
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tctgtcagc aaagcaggga atatccgtgg      300
acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaa                                      333
    
```

<210> 39

<211> 353

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 39

```

gaggtgcagt tggctggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc      60
tctctgicag ccctcggatt ctctttcagt aactatggca tgtcttgggt tcgccagact      120
ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagttatg gtggtagtta cacctactat      180
ccagacaata taaagggcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac      240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgt aaggggtat      300
    
```



ggttacgata ctatggacta ctggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc gag

353

<210> 40

<211> 331

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 40

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

Leu Ser Ser Met Val Thr Val Pro Ser Ser Arg Trp Pro Ser Glu Thr

65                    70                    75                    80

Phe Thr Cys Asn Val Val His Pro Ala Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

                  85                    90                    95

Pro Val Phe Asn Glu Cys Arg Cys Thr Asp Thr Pro Pro Cys Pro Val

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

Leu Asp Leu Gly Arg Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val

145                    150                    155                    160

Asp Gly Lys Glu Val His Thr Ala Lys Thr Gln Ser Arg Glu Gln Gln

                  165                    170                    175

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

                  180                    185                    190

Asp Trp Leu Thr Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn His Ile Asp



aagtgcagag tcaaccacat agacctcccg tctcccatcg agaggacat ctctaaggcc 660  
 agagggaggg ccataagcc cagtgtgtat gtctgccc catcccaaa ggagtgtca 720  
 tccagtgaca cagtcagcat cacctgcctg ataaaagact tctaccacc tgacattgat 780  
 gtggagtggc agagcaatgg acagcaggag cccgagagga agcaccgcat gaccccgccc 840  
 cagctggacg aggacgggtc ctacttctg tacagcaagc tctctgtgga caagagccgc 900  
 tggcagcagg gagaccctt cacatgtgcg gtgatgcatg aaactctaca gaaccactac 960  
 acagatctat ccctctccca ttctccgggt aaa 993

<210> 42

<211> 335

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 42

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

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

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu  
 130                    135                    140  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln

145                    150                    155                    160  
 Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln

                         165                    170                    175  
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu  
                          180                    185                    190

Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys  
                          195                    200                    205

Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys  
                          210                    215                    220

Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser  
 225                    230                    235                    240

Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys  
                          245                    250                    255

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

Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu  
                          275                    280                    285

Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg  
                          290                    295                    300

Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu  
 305                    310                    315                    320

His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
                          325                    330                    335

<210> 43

<211> 1005

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 43

gcctcaacaa ctgctcctag cgtgtttccc ctggccccta gctgcggaag tacctcaggc            60  
 agcacagtgg ccttggcttg tctggtgtct ggatatttcc ctgagccagt gaccgtgagt            120  
 tggaacagcg gcctctgac ctccgggggtg cacacatttc catctgtgct gcagtctagt            180  
 ggctgtact cctgtcaag catggtgact gtgccttct ctaggtggcc atcagaact            240

ttcacctgca acgtggccca tcccgccagc aagaccaaag tggacaagcc cgtgcctaaa 300

agggagaatg gaagggtgcc aagaccacct gattgcccta agtgtccagc tccagaaatg 360

ctgggaggac caagcgtgtt catctttcca cccaagecca aagacacact getgattgct 420

agaactcccg aggtgacctg cgtgggtgtg gacctggatc cagaggaccc cgaagtgcag 480

atctcctggt tcgtggatgg gaagcagatg cagacagcca aaactcagcc tcgggaggaa 540

cagtttaacg gaacctatag agtgggtgtct gtgctgcca ttggacacca ggactggctg 600

aagggcaaac agtttacatg caaggtgaac aacaaggccc tgcctagtcc aatcgagagg 660

actatttcaa aagctagggg acaggtcat cagccttccg tgtatgtgct gcctccatcc 720

cgggaggaac tgictaagaa cacagtgagt ctgacttgtc tgatcaaaga tttctttccc 780

cctgacattg atgtggagtg gcagagcaat gggcagcagg agccagaatc caagtacaga 840

accacaccac cccagctgga cgaagatggc tcctatttcc tgtacagtaa getgtcagtg 900

gacaaatcta ggiggcagcg cggggatacc tttatctgcg ccgtgatgca cgaggctctg 960

cacaatcatt acacacaaga aagtctgtca catagccccg gcaag 1005

<210> 44

<211> 106

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 44

Arg Asn Asp Ala Gln Pro Ala Val Tyr Leu Phe Gln Pro Ser Pro Asp

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

100 105

<210> 45

<211> 318

<212> DNA

<213> Canis familiaris

<400> 45

aggaacgacg cccagcctgc tgtgtatctg tttcagcct cccctgatca gctgcacact 60

ggctctgcta gtgtggtgtg tctgctgaac agcttctacc caaaggatat caatgtgaag 120

tgaaaagtgg acggcgtgat ccaggatact gggattcagg agtccgtgac cgaacaggac 180

aaagattcaa catatagcct gagctccact ctgacatgt ctagtaccga gtacctgagc 240

cacgaactgt attcctgcga gatcactcat aagtcctgc cctctaccct gatcaagagc 300

ttccagagat cagagtgt 318

<210> 46

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence encoding a caninized variable light chain mAb  
sequence, from Mus musculus and Canis

<400> 46

gagatcgtga tgaccagag ccccgccagc ctgagcctga gccaggaaga gaaagtcacc 60

atcacatgca aggccagcca gagcgtgtcc ttcgccgca caggcctgat gcaactggtat 120

cagcagaagc cggccaggc cccaagctg ctgatctacc gggccagcaa cctggaagcc 180

ggcgtgccaa gcagattcag cggcagcggc tccggcaccg acttcagctt caccatcagc 240

agcctcgaac ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccagc agagcagaga gtaccctgg 300

accttcggcc aggtaccaa gctggagatc aag 333

<210> 47

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence encoding a caninized variable heavy chain mAb  
sequence, from Mus musculus and Canis

<400> 47

gaggtgcagc tgggtggaatc tggcggcgac ctggtcaagc ctggcggcag cctgagactg 60  
 agctgtgtgg ccagcggctt caccttcagc aactacggca tgagctgggt ccgacaggcc 120  
 cctggcaagg gactgcagtg ggtggccacc atcagctacg gcggcagcta cacctactac 180  
 cccgacaaca tcaagggccg gttcaccatc agccgggaca acgccaagaa caccctgtac 240  
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgccatgt actactgctg gcggggctac 300  
 ggctacgaca caatggacta ctggggccag ggcaccctcg tgaccgtctc gagg 354

<210> 48

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence encoding a caninized variable light chain mAb  
 sequence, from Mus musculus and Canis

<400> 48

gatatagtga tgacacaaac tcctctcagt ctttccgtat caccgggaga accggttcc 60  
 atttctgtc gggcctcaga gtctgtggac aactacggga tacccttcat gcaactgtat 120  
 cagcagaaac ccggccagcc ccctaaactc cttatttaca gggccagtaa tctggaaagc 180  
 ggtgtgcccc atcgatttag cggttccggg agcggcacag atttaccctc gcgaatctct 240  
 agagttgaag cggatgatgc aggagtatat tactgccagc aatccaataa ggatccctt 300

acattcggcg cgggtaccaa gctggagatc aag 333

<210> 49

<211> 363

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence encoding a caninized variable heavy chain mAb  
 sequence, from Mus musculus and Canis

<400> 49

gaggtgcagc tgggtgcagtc tggcggcga gtaagaaac ctggcggcag cgtgaagtg 60  
 tcctgcaaga ccagcggcta caccttcaag tactacgaca tcaactgggt ccgacaggcc 120  
 cctggcgccg gactggattg gatgggctgg atcttccccg gcgacggcgg caccaagtac 180  
 aacgagacat tcaagggcag agtgaccctg accgccgaca ccagcaccag caccgcctac 240  
  
 atggaactga gcagcctgag agccggcgat atcgctgtgt actactgctc cagaggcggc 300  
 accagcgtga tccgggacgc tatggactac tggggccagg gcaccctctg gaccgtctcg 360

agc 363

<210> 50

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence encoding a caninized variable light chain mAb sequence, from Mus musculus and Canis

<400> 50

gacattgtta tgaactcagac gcccctgagc ctgagcgtct cccccggcga gcccgctagt 60

attagttgcc gggcatccga gtcagtggac aattatggca tcagctttat gcattggttt 120

cagcagaaac caggtcagtc cctcaactc ctgatttaca gagcttccaa tctggaatca 180

ggcgttcctg acagatttag cggatcaggc tccgggacag atttcaccct gcgcatcagt 240

cgcgtggaag ccgatgacgc aggcgtctat tattgtcaac agtccaacaa ggatcccctt 300

acattcggag ccggtaccaa gctggagatc aag 333

<210> 51

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> caninized variable light chain mAb sequence, from Mus musculus and Canis

<400> 51

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr

20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro

35 40 45

Gln Arg Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

50 55 60

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

65 70 75 80

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



85 90 95  
 Lys Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

<210> 52

<211> 333

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> nucleotide sequence encoding a caninized variable light chain mAb  
 sequence, from Mus musculus and Canis

<400

> 52

gacatcgtga tgaccagac cccctgagc ctgagcgtgt ccctggcga gcctgccagc 60  
 atcagctgca gagccagcga gagcgtggac aactacggca tcagcttcat gcaactggttc 120  
 cagcagaagc ccggccagag cccccagcgg ctgatctaca gagccagcaa cctggaaagc 180  
 ggcgtgcccc atcggtttag cggtctggc agcggcaccg acttcaccct gcgatctct 240  
 cgggtggaag ccgatgacgc cggagtgtac tactgccagc agagcaacaa ggaccccctg 300  
 acctttggcg ccggtaccaa gctggagatc aag 333

<210> 53

<211> 148

<212> PRT

<213>

Artificial

<220><223> canine IL-31 full length protein encoded by codon-optimized  
 nucleotide sequence

<400> 53

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



gaggtgcagc tggtagagtc tgggggagat ttggtgaagc ctggggggtc cttgagactg 60  
 tcctgtgtgg cctctggatt caccttcagt agccacggca tgcactgggt cgtcagctct 120  
 ccagggaagg gactgcagtg ggtcgcagtt attaacagcg gtggaagtag cacatactac 180  
 acagacgctg tgaagggccg attcacatc tccagagaca acgccaagaa cacagtgtat 240  
 ctacagatga acagcctgag agccgaggac acggccatgt attactgtgc aaaggagtcc 300

gtcgggggggt gggagcaact ggtcggacct cattttgact actggggcca gggaaccttg 360  
 gtcacgtct cgagc 375

<210> 56

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZTS-841 Heavy Chain Variable Region

<400> 56

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His  
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val  
 35 40 45

Ala Val Ile Asn Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Thr Asp Ala Val  
 50 55 60

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

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

Ala Lys Glu Ser Val Gly Gly Trp Glu Gln Leu Val Gly Pro His Phe  
 100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 57

<211> 8

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 57

Gly Phe Thr Phe Ser Ser His Gly

1 5

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 58

Ile Asn Ser Gly Gly Ser Ser Thr

1 5

<210> 59

<211> 18

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 59

Ala Lys Glu Ser Val Gly Gly Trp Glu Gln Leu Val Gly Pro His Phe

1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 60

<211> 330

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZTS-841 Light Chain Variable Region

<400> 60

cagtctgtgc tgactcagcc gacctcagtg tcagggtccc ttggccagag ggtcaccatc 60

tcctgctctg gaagcacgaa caacatcggg atctcttggtg cgagctggta ccaactgttc 120

ccaggaaagg ccctaaact cctcgtgtac ggtaatggga atcgaccgtc aggggtccct 180

gaccggtttt cgggcgccga ctctggcgac tcagtcaccc tgaccatcac tgggcttcag 240

gctgaggacg aggctgatta ttactgccag tcctttgata ccacgcttgg tgctcatgtg 300

ttcggcggag gcaccacct gaccgtcctt 330

<210> 61

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZTS-841 Light Chain Variable Region

<400> 61

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

1                    5                    10                    15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Asn Asn Ile Gly Ile Leu

20                    25                    30

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

35                    40                    45

Val Tyr Gly Asn Gly Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

Gly Ala His Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Leu

100                    105                    110

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 62

Thr Asn Asn Ile Gly Ile Leu Gly

1                    5

<210> 63

<211> 4

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 63

Gly Asn Gly Asn

1

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 64

Gln Ser Phe Asp Thr Thr Leu Gly Ala His Val

1                    5                    10

<210> 65

<211> 109

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 65

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

1                    5                    10                    15

Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

65                    70                    75                    80

Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His His

                  85                    90                    95

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

                  100                    105

<210>

66

<211> 11

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 66

His Glu Ala Leu His His His Tyr Thr Gln Glu

1                    5                    10

<210> 67

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZTS-00008183 Light Chain

<400> 67

gagatcgtga tgaccagag ccccgccagc ctgagcctga gccaggaaga gaaagtcacc        60

atcacatgca aggccagcca gagcgtgtcc ttcgccggca caggcctgat gcaactggtat        120

cagcagaagc ccggccaggc cccaagctg ctgatctacc gggccagcaa cctggaagcc        180

ggcgtgccaa gcagattcag cggcagcggc tccggcaccg acttcagctt caccatcagc        240

agcctcgaac ccgaggacgt ggccgtgtac tactgccagc agagcagaga gtaccctctgg        300

accttcggcc aggttaccaa gctggaatc aagcggaaac acgccagcc cgccgtgtac        360

ctgttcagc ccagccccga tcagctgcac accggcagcg cttcagtcgt ctgcctgctg        420

aacagcttct accccaagga catcaacgtg aagtggagg tggacggcgt gatccaggac        480

accggcatcc aggaaagcgt caccgagcag gacaaggaca gcacctacag cctgagcagc        540

accctgacca tgtccagcac cgagtacctg agccacgagc tgtatagctg cgagatcacc        600

cacaagagcc tgcttagcac cctgatcaag agcttcagc ggagcgagtg ctagtag            657

<210> 68

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ZTS-00008183 Light Chain

<400> 68

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

1                    5                    10                    15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Phe Ala

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60





acaactgctc ctacgtggtt tcccctggcc cctagctgcg gaagtacctc aggcagcaca 420  
 gtggcctgg ctgtctggt gtctggatat ticcctgagc cagtgaccgt gaggttggaac 480

agcggetctc tgacctccgg ggtgcacaca ttccatctg tgctgcagtc tagtggcctg 540  
 tactcctgt caagcatggt gactgtgcct tcctctaggt ggccatcaga aactttcacc 600  
 tgcaactgg cccatcccgc cagcaagacc aaagtggaca agcccgtgcc taaaaggagg 660  
 aatggaaggg tgccaagacc acctgattgc cctaagtgtc cagctccaga aatgctggga 720  
 ggaccaagcg tgttcatctt tccaccaag cccaaagaca cactgctgat tgctagaact 780  
 cccgagtgta cctgcgtggt ggtggacctg gatccagagg accccgaagt gcagatctcc 840  
 tggttcgtgg atgggaagca gatgcagaca gccaaaactc agcctcggga ggaacagttt 900

aacggaacct atagagtgtt gtctgtgctg ccaattggac accaggactg gctgaagggc 960  
 aaacagttta catgcaaggt gaacaacaag gcctgccta gtecaatcga gaggactatt 1020  
 tcaaaagcta ggggacagcg tcatcagcct tccgtgtatg tgctgcctcc atcccgggag 1080  
 gaactgtcta agaacacagt gactctgact gtctgatca aagatttctt tcccctgac 1140  
 attgatgtgg agtggcagag caatgggcag caggagccag aatccaagta cagaaccaca 1200  
 ccacccagc tggacgaaga tggctcctat ttctgtaca gtaagctgtc agtggacaaa 1260  
 tctagtggc agcgcgggga tacctttatc tgcgccgtga tgcacgagc tctgcacat 1320

cattacacac aagaaagtct gtcacatagc cccggcaagt agtag 1365

<210> 70  
 <211> 453  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> ZTS-00008183 Heavy Chain  
 <400> 70

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



305                    310                    315                    320  
 Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile  
    325                    330                    335  
 Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val  
    340                    345                    350  
 Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser  
  
    355                    360                    365  
 Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Phe Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu  
    370                    375                    380  
 Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr  
 385                    390                    395                    400  
 Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu  
    405                    410                    415  
 Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala  
  
    420                    425                    430  
 Val Met His Glu Ala Leu His His His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser  
    435                    440                    445  
 His Ser Pro Gly Lys  
    450  
 <210> 71  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 71  
 Ser Ser Trp Met Asn  
 1                    5  
 <210> 72  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 72  
 Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 73

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 73

Ala Arg His Tyr Asp Gly Ser Thr Asp Tyr

1                    5                    10

<210> 74

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 74

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1                    5                    10

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 75

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1                    5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 76

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr Thr

1                    5

<210> 77

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caninized Sequence - Variable Heavy Region Engineered to Have Sequences from Mus musculus and Canis

<400> 77

Glu 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 Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Ser Ser

                  20                    25                    30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Ala Gly Leu Asp Trp Met

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Ala Arg His Tyr Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu

                  100                    105                    110

Val Thr Val Ser Ser

                  115

<210> 78

<211> 351

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caninized Sequence - Variable Heavy Region Engineered to Have Sequences from Mus musculus and Canis

<400> 78

gaggtgcagc tgggtgcagtc cggagctgag gtgaagaagc caggagcttc cgtgaaggtg            60

agctgcaaga catctggcta caccttcac tccagctgga tgaactgggt gagacaggct            120

ccaggagctg gcctggactg gatggccag atctaccctg gcgacggcga taaaactat            180

aatggcaagt ttaaggaag ggtgacctg acagctgaca ccagcacatc taccgcttac            240

atggagctgt cttccctgag ggccggcgat atcgccgtgt actattgtgc cggcactat 300  
gacggctcca cggattactg gggccagggc acaactggtga ccgtctcgag c 351  
<210> 79  
<211> 103  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Caninized Sequence - Variable Light Region Engineered to Have  
Sequences from Mus musculus and Canis  
<400> 79  
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Leu Ser Gln Gly  
  
1 5 10 15  
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn  
20 25 30  
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro  
  
65 70 75 80  
Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr  
85 90 95  
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys  
100  
<210> 80  
<211> 306  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> Caninized Sequence - Variable Light Region Engineered to Have  
Sequences from Mus musculus and Canis  
<400> 80  
gagatcgtga tgacceagtc ccctgcttct ctgtccctga gccagggcga gaaggtgacc 60  
atcacatgca gggcctctga gaacatctac tccaatctgg cttggtatca gcagcggccc 120

ggacaggctc ctaagctgct gatctacgcc gctacaaacc tggctgacgg cgtgccaagc 180  
 aggttctctg gatccggaag cggcaccgac ttttctctga caatctccag cctggagcca 240  
 gaggatgtgg ccgtgtacta ttgtcagcac ttctggggca cccctatac atttgccag 300  
 ggtacc 306

<210> 81

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Phe Ser Ser Tyr Gly Met His

1 5

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Ile Lys Tyr Tyr

1 5 10

<210> 83

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

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

1 5 10

<210> 84

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp Leu Gly

1 5 10

<210> 85

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser

1                    5

<210> 86

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Leu Gln Asp Ser Asn Tyr Pro Leu Thr

1                    5

<210> 87

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caninized Sequence - Variable Heavy Region Engineered to Have  
Sequences from Homo sapiens and Canis

<400> 87

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

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



100 105 110  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120  
 <210> 88  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Caninized Sequence - Variable Heavy Region Engineered to Have

Sequences from Homo sapiens and Canis

<400> 88  
 gaagtgcagc tgggtggaatc tggcggcgac ctctgaagc ctggcggctc tctgagactg 60  
 tctctgtggt cctccggett caccttctcc agctacggca tgactgggt gcgacaggcc 120  
 cctggaaaag gcctgcagtg ggtggccgtg atctctacg acggctccat caagtactac 180  
 gccgacgcc tgaagggccg gttcaccatc agcagagaca acgccaagaa caccctgtac 240  
 ctgcagatga actccctcgc ggccgaggac accgccgtgt actactgtgc tagaaccggc 300  
 gagtactccg gctacgatac cgacccccag tactcttggg gccagggcac cacagtgacc 360

gtctcgagc 369

<210> 89  
 <211> 103  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Caninized Sequence - Variable Light Region Engineered to Have

Sequences from Homo sapiens and Canis

<400> 89  
 Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Leu Ser Gln Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Asp Asp  
 20 25 30  
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Gly Thr Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60



<210> 93

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 93

Gly Asp Gly Asn Tyr Ala Leu Asp Ala Met Asp Tyr

1                    5                    10

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 94

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His

1                    5                    10                    15

<210> 95

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 95

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1                    5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 96

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Leu Thr

1                    5

<210> 97

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caninized Sequence - Variable Heavy Region Engineered to Have

Sequences from Mus musculus and Canis

<400> 97

Glu 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 Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Ile Thr Tyr

                  20                    25                    30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Ala Gly Leu Asp Trp Met

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

Gln Gly Thr Leu Val Thr

                  115

<210> 98

<211> 354

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caninized Sequence - Variable Heavy Region Engineered to Have

Sequences from Mus musculus and Canis

<400> 98

gaggtgcagt tggttcagtc cggcgccgag gtgaagaagc cggggcctc tgtaaagtc            60

agctgcaaga ctacgggata tacatttacc acatactgga tgaactgggt cgcacaagcc            120

cctggtgccg gcttgattg gatgggccag atcttcccag caagcggatc taccaattac            180

aatgagatgt tcgagggtag ggtgacccctc acagctgata ccagtacttc aactgcatac            240

atggaactga gttccctgag agcagggcac atcgagttt actattgtgc cggaggcgac            300

ggcaattatg cactggatgc tatggactac tggggtcagg gaacctggt gaca            354

<210> 99

<211> 104

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caninized Sequence - Variable Light Region Engineered to Have Sequences from Mus musculus and Canis

<400> 99

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln

                  100

<210> 100

<211> 312

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caninized Sequence - Variable Light Region Engineered to Have Sequences from Mus musculus and Canis

<400> 100

gatattgtga tgacacagac tccaccctcc ctttctgtca gccctcggga gaccgcctcc            60

attagctgtc ggcaccagta gtccgtcgat tcctacggaa atagcttcat gcactggtat            120

ctgcagaaac caggtcagtc tctcaattg ctgatctacc tggcttctaa cctggaagc            180

ggtgtgtcag ataggttttc cggaagtggg agcggaaactg actttaccct gcgtatttcc            240

cgagtggaag ccaatgacac tgggtgtttac tactgtcagc agaataacga agaccctctg            300

acctttggcc ag

312

<210> 101

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

Ser Asn Val Ile Ser

1                    5

<210> 102

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

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

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 103

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

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

1                    5                    10

<210> 104

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

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

1                    5                    10

<210> 105

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro

1                    5

<210> 106

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 106

Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro Ile Thr

1                    5

<210> 107

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caninized Sequence - Variable Heavy Region Engineered to Have

Sequences from Homo sapiens and Canis

<400> 107

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

1                    5                    10                    15

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

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85                    90                    95

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

100                    105                    110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 108

<211> 359

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caninized Sequence - Variable Heavy Region Engineered to Have Sequences from Homo sapiens and Canis

<400> 108

gaggtgcagc tggatgcagag cgccgctgag gtgaagaagc caggcgcctc cgtgaagggt 60  
 agctgcaaga catctggcta catcttcac tccaacgtga tcagctgggt gcagcaggct 120  
 ccaggagctg gactggagtg gatggcgccg gtgatcccta tcgtggacat cgccaattac 180  
 gctcagaggt ttaagggccg ggtgaccctg acagccgata cctctacaaa caccgtgtat 240  
 atggagctgt ccaatctgag gacagaggac accgccgtgt actattgtgc ttctaccctg 300  
 ggccctggtgc tggacgctat ggattattgg ggccagggca cactggtgac cgtctcgag 359

<210> 109

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caninized Sequence - Variable Light Region Engineered to Have Sequences from Homo sapiens and Canis

<400> 109

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

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

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



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

85

90

95

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

100

105

<210> 110

<211> 309

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caninized Sequence - Variable Light Region Engineered to Have Sequences from Homo sapiens and Canis

<400> 110

gagaccgtgc tgacacagag ccctggcacc ctgtccctga gcccaggaga gagggccaca 60  
 ctgtcttgcc gggcttctca gtcctgggc tccagctacc tggcctgta tcagcagaag 120  
 ccaggccagg ctcccaggt gctgatctac ggagcctctt ccagagctcc aggcgtgcct 180  
 gctcgttca gcggatctgg ctccggcacc gactttacc tgacaatcag ctctctggag 240  
 cccgaggact tcgccgtgta ctattgtcag cagtatgctg attcccctat cacatttggc 300

cagggtacc 309

<210> 111

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Asn Val

1 5

<210> 112

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Val Ile Pro Ile Val Asp Ile Ala

1 5

<210> 113

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 113

Leu Gly Leu Val Leu Asp Ala Met Asp Tyr

1                    5                    10

<210> 114

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

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

1                    5                    10

<210> 115

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 115

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Pro

1                    5

<210> 116

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 116

Gln Gln Tyr Ala Asp Ser Pro Ile Thr

1                    5

<210> 117

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caninized Sequence - Variable Heavy Region Engineered to Have  
Sequences from Homo sapiens and Canis

<400> 117

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115                    120

<210> 118

<211> 359

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Caninized Sequence - Variable Heavy Region Engineered to Have  
 Sequences from Homo sapiens and Canis

<400> 118

gaggtgcagc tggaggagag cggaggcgac ctggtgaagc cagctggctc tctgaggctg            60  
 tctctcgtgg ctacgggcta caccttctcc agcaactga tgtcttgggt gagacaggct            120  
 ccaggcaagg gactgcagtg ggtgggctac gtgatcccta tcgtggacat cgccaactat            180  
 gccgatgctg tgaagggcag gtttaccatc tctcgggaca acgctaagaa tacactgtac            240

ctgcagatga actccctgag agtggaggat acagccgtgt actattgtac cgcacactg            300  
 ggcttgggtc tggacgctat ggattattgg ggccagggca ccctggtgac agtctcgag            359

<210> 119

<211> 108

<212> PRT

