



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0011685
(43) 공개일자 2020년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/72 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01) A61K 47/68 (2017.01)
A61P 5/14 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/721 (2013.01)
A61K 38/1796 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0086437

(22) 출원일자 2018년07월25일
심사청구일자 없음

(71) 출원인

주식회사유한양행

서울특별시 동작구 노량진로 74 (대방동)

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

송무영

경기도 수원시 영통구 권광로260번길 36, 114동 302호 (매탄동, 현대힐스테이트아파트)

윤대진

경기도 구리시 벌말로 226, 502동 102호 (수택동, 토평주공아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이처영, 장제환

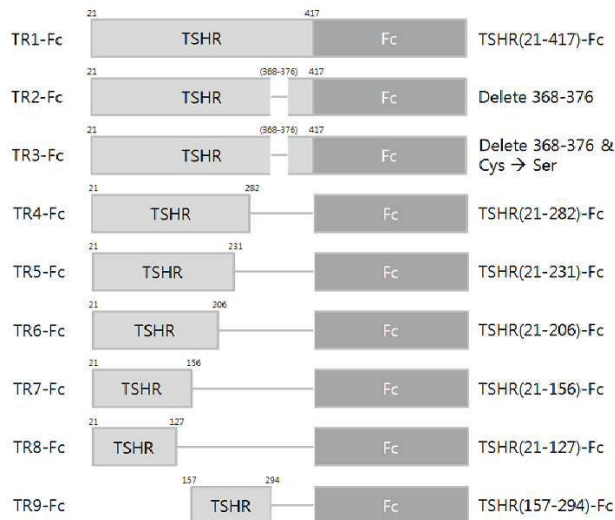
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 갑상선 자극 호르몬 수용기(thyrotropin receptor, TSHR) 단편을 포함하는 융합 단백질 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 TSHR 단편을 포함하는 융합 단백질 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 야생형 TSHR의 세포막 외 도메인을 포함하고, 특정 위치의 아미노산이 치환된 TSHR 단편과 면역글로불린 Fc 영역 또는 카르복시 말단 캡(C-CAP)을 포함하는 융합 단백질 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 융합 단백질은 개선된 약리학적 효능, 체내 지속성 및 단백질의 안정성을 나타내며, 상기 융합단백질을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 그레이브스 질환, 그레이브스 안병증 개선을 위한 치료제 또는 진단시약으로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 47/64 (2017.08)

A61K 47/6811 (2017.08)

A61P 5/14 (2018.01)

C07K 2319/30 (2013.01)

C07K 2319/31 (2013.01)

(72) 발명자

이정선

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 312동 2204호 (신천동, 파크리오)

최병현

경기도 수원시 권선구 입북로 50, 117동 1002호 (입북동, 서수원자이아파트)

임인환

경기도 수원시 권선구 당진로14번길 46, 206동 403호 (당수동, 삼정아파트)

박만식

경기도 안양시 동안구 시민대로327번길 55, 110동 905호 (관양동, 평촌더샵센트럴시티)

이진형

경기도 용인시 기흥구 한보라2로 141, 805동 203호 (공세동, 화성파크드림프라브)

서형식

경기도 군포시 산본로386번길 61, 1121동 1602호 (산본동, 백합아파트)

강현우

경기도 안양시 동안구 호성로 37, 101동 705호 (호계동, 일신건강장미아파트)

김성호

서울특별시 구로구 경인로 390, 203동 1801호 (고척동, 벽산블루밍아파트)

이은직

서울특별시 마포구 창전로 26, 103동 2103호 (신정동, 서강GS아파트)

윤진숙

서울특별시 강남구 압구정로 151, 111동 402호 (압구정동, 현대아파트)

구철룡

서울특별시 용산구 이촌로71길 10, 210동 2005호 (이촌동, 한가람아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

다음의 갑상선 자극 호르몬 수용기(thyrotropin receptor, TSHR) 단편에 면역글로불린 Fc 영역 또는 카르복시 말단 캡(C-Cap)이 결합되어 있는 융합 단백질:

- (i) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 282번째 아미노산까지의 단편; 또는
- (ii) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 266번째 아미노산까지의 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 TSHR의 단편 (i)는 서열번호 5로 표시되며, TSHR의 단편 (ii)는 서열번호 6으로 표시되는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 TSHR 단편은 서열번호 17 내지 21로 구성된 군에서 선택된 어느 하나로 표시되는 링커를 통해 면역글로불린의 Fc 영역에 연결되는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 IgD로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 Fc 영역, 이의 단편 또는 이들의 조합을 포함하는 하이브리드 Fc인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 하이브리드 Fc는 IgG4 또는 이의 단편 및 IgD 또는 이의 단편을 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 22로 표시되는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 C-Cap은 서열번호 23 내지 28로 구성된 군에서 선택된 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 29 또는 30의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 코딩하는 핵산.

청구항 10

제9항의 핵산을 포함하는 재조합 벡터.

청구항 11

제10항의 재조합 벡터가 도입되어 있는 재조합 세포.

청구항 12

다음 단계를 포함하는 갑상선 자극 호르몬 수용기(thyrotropin receptor, TSHR) 단편에 면역글로불린 Fc 영역 또는 카르복시 말단 캡(C-Cap)이 결합되어 있는 융합 단백질의 제조방법:

- (a) 제11항의 재조합 세포를 배양하여 상기 융합 단백질을 발현시키는 단계; 및
- (b) 상기 발현된 융합 단백질을 회수하는 단계.

청구항 13

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 그레이브스 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 그레이브스 질환 진단용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체 내 지속성, 단백질 안정성 및 약리활성이 개선된 갑상선 자극 호르몬 수용기(thyrotropin receptor, TSHR) 단편을 포함하는 융합 단백질 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로는 야생형 TSHR의 세포막 외 도메인을 포함하는 TSHR 단편과 면역글로불린 Fc 영역 또는 카르복시 말단 캡(C-CAP)을 포함하는 융합 단백질 및 이의 그레이브스 질환(Graves disease) 치료 또는 예방 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 정상적인 갑상선 호르몬은 갑상선 자극호르몬에 의해 그 생성이 조절되는데, 이는 시상하부에서 분비된 갑상선 자극 호르몬이 갑상선 조직 세포에서 세포막의 갑상선 자극 호르몬 수용체와 결합하면 갑상선 세포내 G 단백질과 일련의 신호전달과정을 거쳐 갑상선 호르몬을 합성하게 되며, 합성된 호르몬은 온 몸을 순회하며 그 역할을 수행하게 된다. 그런데, 과도한 호르몬이 생성되면, 시상하부에서의 갑상선 자극 호르몬의 발현을 억제하여 결국 갑상선 호르몬의 합성을 억제하게 된다.

[0004] 한편, 그레이브스 질환은 면역체계에 근본적으로 결함이 나타나 발생하는 질환으로, 갑상선 자극 호르몬 수용기

(thyrotropin receptor, TSHR)와 결합하는 자가항체들에 의해서 일어난다. 갑상선 자극 호르몬 수용기에 특이적인 자가항체들은 많은 경우 그 자가항체가 수용기와 결합하여 갑상선 기능 항진증 (hyperthyroidism)을 일으킨다. 또한 적은 경우이지만, 자가항체가 수용기와 결합을 통하여 갑상선 호르몬 (TSH)의 결합에 의한 효과를 저해시키는 갑상선 기능 저하증 (hypothyroidism)을 일으키기도 한다. 그레이브스 질환은 갑상선 호르몬의 과다생산을 유도하는, 즉 갑상선 기능 항진증을 유발하는 자가항체들에 의해서 일어나는 자가면역 질환이다 (Weetman AP, N Engl J Med 2000; 343; 1236-1248, Bartalena L, Nat Rev Endocrinol 2013; 9; 724-734).

[0005] 일반적으로 그레이브스 질환의 치료를 위해서 비선택적인 갑상선 기능 저하제를 사용하거나 방사성 동위원소 또는 외과적인 수술로서 갑상선 조직을 제거하는 등의 방법이 사용되고 있다. 그러나, 갑상선 기능 저하제를 사용할 경우 재발의 우려가 높으며, 갑상선 조직을 제거할 경우에는 지속적으로 갑상선 호르몬을 투여해야 하므로 신체 항상성을 유지하여야 하는 문제점이 있다. 또한, 그레이브스 질환의 50% 환자에서 그레이브스 안병증 (Graves Ophthalmopathy)이 진행되는 것으로 보고되고 있는데, 그레이브스 안병증의 주요원인은 명확히 밝혀지지 않았으나, 그레이브스 안병증을 갖고 있는 환자의 안구섬유모세포에서 갑상선 자극 호르몬 수용체가 발현되는 것으로 보고됨에 따라 안병증도 갑상선 자극 호르몬 수용체에 특이적인 자가항체가 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다.

[0006] 따라서, 그레이브스 병의 근원인 갑상선 자극 호르몬 수용기의 자가 항체들의 수용기와의 결합을 억제하면 그레이브스 병의 증상은 완화될 것으로 보인다. 그럼에도 불구하고 이 자가항체들과 수용기의 결합을 선택적으로 억제할 수 있는 방법이 지금까지 개발되어지지 않고 있다. 갑상선 자극 호르몬 수용기의 자가 항체들의 다양성을 고려하면, 갑상선 자극 호르몬 수용기 자체를 이용한 융합 단백질이 가장 좋은 선택적 결합가능 물질로 판단된다. 갑상선 자극 호르몬 수용체의 가용한 구조의 발현은 1997년 갑상선 자극 호르몬 수용기의 엑토도메인 (ectodomain)의 끝을 차례로 절단하여 비교하였는데 (Chazenbalk GD et al. J Biol Chem (1997) 272(30); 18959-65), 이 TSHR-261, TSHR-289, TSHR-309중 가장 작은 크기의 TSHR-261의 경우 그레이브스 병 환자 혈액의 자가항체들과 결합하여 중화시키는 능력이 가장 좋은 것으로 확인 되었다. 그러나, 같은 저자들의 특허 (WO2000005345A1)를 보면, TSHR-289, TSHR-309등의 큰 크기의 물질들에 비해 상대적으로 TSHR-261의 안정성이 취약한 것으로 파악된다. 이런 이유로 최근의 특허 (WO 2015189543 A2)에서 TSHR-260의 온도 안정성 강화를 목적으로 다양한 point mutation을 도입하여, 온도 안정성을 강화하고 이에 따르는 같은 온도에서의 반감기 상승을 이루었다. 하지만, 치료제의 용도로 사용되기 위해서 필요한 혈중 반감기 상승을 위한 수준에 도달하지는 못하였다.

[0007] 선행연구들은 TSHR물질의 엑토도메인 단편들의 발현 이외의 추가적인 기능 보완을 위한 융합단백질 형태의 연구는 확인되지 않으며, 특히, 치료제 개발과 관련된 자가항체의 선택적 결합억제를 위해서는 혈중 반감기 증가가 필수적이나 이런 목적의 융합단백질 연구는 지금까지 보고되지 않고 있다. 그리고, TSHR-261에서 나타나는 취약한 온도 안정성의 강화를 목적으로 하는 융합단백질 형태의 연구도 보고되지 않았다. 갑상선 자극 호르몬 수용기를 이용한 선행연구들에 대한 특허 (WO2000005345A1)를 살펴보면, 갑상선 자극 호르몬 수용기의 단백질 서열에 다른 단백질 서열의 융합을 이용하여 새로운 기능을 추가한 예 또한 보고되지 않았다.

[0008] 이에 본 발명자들은 TSHR의 체내 반감기 및 온도 안정성을 향상 시키기 위해 예의 노력한 결과, 갑상선 자극 호르몬 수용기 단편에 면역글로불린 IgG의 Fc를 결합하거나, 갑상선 자극 호르몬 수용기 단편의 C-말단에 C-Cap으로 명명된 단백질을 결합할 경우, 각각 혈중 반감기 상승 또는 갑상선 자극 호르몬 수용기의 37도 온도 안정성이 강화되고, 갑상선 자극 호르몬에 의한 갑상선 호르몬의 생성에는 영향을 미치지 않으면서, 갑상선 자극 자가면역항체의 갑상선 자극 호르몬 수용체와의 결합을 억제하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 야생형 TSHR에서 세포의 도메인의 일부를 함유하는 TSHR 단편과 면역글로불린 Fc 영역 또는 카르복시 말단 캡(C-Cap)을 포함하는 융합 단백질을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 목적은 또한, 상기 융합 단백질을 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 재조합 벡터 및 상기 벡터가 도입되어 있는 재조합 세포를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 목적은 또한, 상기 융합 단백질의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 목적은 또한, 상기 융합 단백질을 포함하는 그레이브스 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 다음의 갑상선 자극 호르몬 수용기(thyrotropin receptor, TSHR) 단편에 면역글로불린 Fc 영역 또는 카르복시 말단 캡(C-Cap)이 결합되어 있는 융합 단백질을 제공한다:
- [0016] (i) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 282번째 아미노산까지의 단편; 또는
- [0017] (ii) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 266번째 아미노산까지의 단편.
- [0018] 본 발명은 또한, 상기 융합 단백질을 코딩하는 핵산 및 상기 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0019] 본 발명은 또한, 상기 재조합 벡터가 도입되어 있는 재조합 세포 및 상기 재조합 세포를 이용한 상기 융합 단백질의 제조방법을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또한, 상기 융합 단백질을 포함하는 그레이브스 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명에 따른 TSHR 단편을 포함하는 융합 단백질은 갑상선 자극 호르몬(TSH)과는 결합하지 않고, 갑상선 자극 호르몬 수용기 자가항체들과 결합은 유지하면서, 생산성과 체내 지속성이 증가할 뿐만 아니라, 37도에서 온도 안정성이 증가하는 효과가 있음을 확인하였다. 상기 TSHR 단편을 포함하는 융합 단백질을 포함하는 약학 조성물은 그레이브스 질환의 진단 및 치료제로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1의 (a)는 인간 갑상선 자극 호르몬 수용기의 아미노산 서열의 모식도이며, (b)는 인간 갑상선 자극 호르몬 수용기의 엑토도메인 아미노산 서열을 개시한 것이다.
- 도 2는 인간 갑상선 자극 호르몬 수용기의 엑토도메인 아미노산 서열들을 이용한 면역글로불린 Fc의 융합단백질 모식도이며, TR3-Fc에서 시스테인 아미노산을 세린으로 치환한 위치는 391, 398 및 408번째 위치이다.
- 도 3은 다양한 갑상선 자극 호르몬 수용기의 Fc 융합 단백질들의 HEK293세포에서의 생산량과 발현된 융합단백질의 갑상선 자극 호르몬과의 결합, 갑상선 자극 호르몬 수용기 자가항체 (M22)와의 결합력을 측정된 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 TR4-Fc 융합 단백질을 기반으로 링커를 삽입한 융합단백질들의 모식도와 사용된 링커들의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.
- 도 5는 각 링커별 TR4-Fc 융합 단백질의 생산량, 갑상선 호르몬 결합력, 자가항체 결합력 및 자가항체 중화능력을 평가한 결과이다.
- 도 6의 (a) 및 (b)는 그레이브스 질환 환자 혈액에서 링커가 삽입된 융합 단백질 5 µg/ml의 자가항체 중화효과를 확인한 결과로서, Thyretain TSI assay kit를 사용하여 측정하였고, %SRR 값이 140미만인 경우 음성으로 평가하였다.
- 도 7의 (a) 및 (b)는 그레이브스 질환 환자 혈액에서 링커가 삽입된 융합 단백질 5 µg/ml의 자가항체 중화효과를 확인한 결과로서, Thyretain TSI assay kit를 사용하여 측정하였고, %SRR 값이 140미만인 경우 음성으로 평가하였다.
- 도 8은 10 µg/mL의 융합 단백질들을 이용하여, 5 µg/mL에서 음성으로 떨어지지 못한 6종의 환자혈액에 대한 반응성을 확인한 결과이다.
- 도 9는 환자 혈액 중화약효 평가에 대해 정리한 것으로, TR-GS의 경우 유일하게 10 µg/mL 농도에서 모든 혈액의

중화 약효를 나타내고, 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서는 모든 융합 단백질이 42종 전체 혈액에서 중화 약효를 나타내며, 5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 중화 약효를 확인하지 못한 6종의 혈액 샘플 #3, #4, #7, #16, #18, #65은 다른 혈액과 비교하면 자가항체의 양이 혈액에 많이 존재하는 것을 확인하였다.

도 10은 CHO 세포에서 발현된 TR-GS 융합 단백질의 약물동태평가를 확인한 결과이다.

도 11의 (a)는 C57BL/6 마우스에서 0.3 mg/Kg의 K1-18 (갑상선 자극 호르몬 수용기 자가항체)을 복강투여한 이후, 마커인 T4 (갑상선 호르몬)의 총량의 혈액내 농도를 측정하여, 갑상선 자극 호르몬 수용기 자가항체에 의한 갑상선 호르몬의 변화를 확인한 결과이고, (b)는 C57BL/6 마우스에서 융합 단백질인 TR-GS (7.2 mg/Kg)의 정맥 투여 이후 마커인 T4의 총량에 어떤 영향을 주는지 확인한 결과이며, (c)는 C57BL/6 마우스에서 0.3 mg/Kg의 K1-18(갑상선 자극 호르몬 수용기 자가항체)을 복강투여한 30분 이후, 융합 단백질인 TR-GS (48 μg : 2.4 mg/Kg, 144 μg : 7.2 mg/Kg)를 정맥투여하고 8시간이 지난후 마커인 T4의 총량에 어떤 영향을 주는지 확인한 결과이다. 통계는 one-way ANOVA 방법을 사용하였고, *는 $p<0.01$ 을 의미한다.

도 12는 인간 pp32 서열의 C-Cap에서 가져온 24개의 아미노산 서열 (#1)을 기반으로, C-Cap의 역할을 위해서 필요한 수소결합 (밀줄친 Y: 타이로신, D: 글루탐산)을 만드는 아미노산과 함께, 추가적인 수소결합을 유도할 수 있는 아미노산의 치환을 통한 6종의 C-Cap 후보군 서열을 융합단백질로 발현하여 자가항체들의 중화효과를 Thyretain TSI assay kit를 사용하여 측정한 반응성을 확인한 결과이다.

도 13은 TR-GS와 TR-C-Cap 융합 단백질들의 온도 안정성을 비교한 결과이다. 환자 혈액 #18을 이용한 자가항체들의 중화효과를 Thyretain TSI assay kit를 사용하여 측정하였고, TR-GS와 TR-C-Cap 물질들은 각각 37도에서 0일 (-70도 보관 물질), 1일, 2일 보관 이후 사용하였으며, 5, 20, 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 융합단백질을 사용하여 나온 결과를 막대그래프로 나타낸 것이다.

도 14는 TR-GS와 TR-C-Cap의 정확한 IC50값들을 측정하기 위하여 낮은 농도 (0.39 ~ 12.5 $\mu\text{g/mL}$)의 융합단백질들의 자가항체 중화효과를 환자 혈액 #18과 Thyretain TSI assay kit를 사용하여 측정한 결과이다.

도 15의 (A)는 TR-GS 융합단백질과 TSHR 21-288-Fc 융합 단백질의 자가항체 중화효과를 Thyretain TSI assay kit를 사용하여 측정한 반응성을 확인한 결과이며, (B)는 TR-GS 융합 단백질과, TSHR 1-260-Fc, TSHR 21-262-Fc 및 TSHR 21-260-Fc 융합 단백질의 자가항체 중화효과를 Thyretain TSI assay kit를 사용하여 측정한 반응성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0026] 일반적인 단백질의 반감기 증가를 위한 여러 지속형 기술 중 Fc 융합 기술은 체내 반감기가 증가하면서 독성이 나 면역반응 유발과 같은 부작용 우려가 적다는 점에서 가장 많이 활용되고 있다. Fc 융합 TSHR 단편을 지속형 치료용 약물로 개발하기 위해서는 다음과 같은 여러 조건을 충족해야 한다.
- [0027] 첫째, 융합에 의한 시험관 내 활성 감소가 적어야 한다. 일반적으로 케모카인처럼 작은 단백질의 경우 크기가 상대적으로 큰 Fc와 융합시킬 경우 융합 위치 및 링커에 따라 활성이 크게 달라진다고 알려져 있다. 따라서, TSHR 단편과 Fc 융합 단백질의 활성은 융합 여부 또는 위치에 따라 달라질 수 있다.
- [0028] 둘째, 대부분의 바이오의약품의 경우 환자에서 면역원성이 발생할 수 있다는 점을 감안하면, 융합 링커 또는 돌연변이에 의한 면역원성 위험성이 적어야 한다.
- [0029] 셋째, 융합 위치나 돌연변이 도입에 의한 안정성 문제가 없어야 한다.
- [0030] 넷째, 융합한 면역글로불린의 종류 (isotype)에 따라 원치 않는 면역 반응을 야기할 수 있기 때문에, 이에 대한 대안이 필요하다.
- [0031] 이러한 조건을 고려하여, 본 출원의 발명자들은 TSHR의 생리학적 활성 및 물성을 개선시키기 위해 노력하던 중, TSHR의 엑토 도메인의 일부를 단편 내어 이용하거나, 특정 위치에 돌연변이를 도입하고, 면역글로불린 Fc 영역을 결합시킬 경우, TSHR의 활성을 높이면서 생체 내 노출 정도 및 반감기가 증가하고 약리 효능이 개선되는 것을 확인하였다.

[0032] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 다음과 같은 갑상선 자극 호르몬 수용기 변이체와 면역글로불린 Fc 영역 또는 카르복시 말단 캡(C-Cap)을 포함하는 융합 단백질을 제조하였다:

[0033] (1) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 417번째 아미노산까지의 단편; (2) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 417번째 아미노산까지의 단편에서 368 내지 376번째 아미노산의 결실; (3) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 417번째 아미노산까지의 단편에서 368 내지 376번째 아미노산의 결실 및 391번 시스테인이 세린으로 치환, 398번 시스테인이 세린으로 치환 및 408번의 시스테인이 세린으로 치환으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 변이; (4) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 282번째 아미노산까지의 단편; (5) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 266번째 아미노산까지의 단편; (6) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 231번째 아미노산까지의 단편; (7) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 206번째 아미노산까지의 단편; (8) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 156번째 아미노산까지의 단편; (9) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 127번째 아미노산까지의 단편; (10) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 157번째 아미노산부터 294번째 아미노산까지의 단편; 및 (11) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 282번째 아미노산까지의 단편에서 43번째 아스파르트산이 알라닌으로 치환, 61번째 글루탐산이 알라닌으로 치환 및 250번째 라이신으로 알라닌으로 치환으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 변이.

[0034] 구체적인 융합 단백질의 아미노산 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0035] TSHR 변이체 아미노산 서열

서열번호	이름	아미노산 서열
2	TSHR 21-417	GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCCKDIQRIPSLPPSTQTLKL IETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL ESHSHFYNLKSVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYM TSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQT SVTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYP SHCFAFNQKKIRGILESMLCNESSMQS LRQRKSVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSKFQDTHNNAHYVVFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQA FDSHYDYTICGDSMDVCTPKSDEFNCPEDIMGYKFL
3	TSHR 21-417 Δ 368-376	GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCCKDIQRIPSLPPSTQTLKL IETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL ESHSHFYNLKSVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYM TSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQT SVTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYP SHCFAFNQKKIRGILESMLCNESSMQS LRQRKSVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSKFQDTHNNAHYVVFEEQEDEIIGFGTLQAFDSHYDYTI CGDSEMDVCTPKSDEFNCPEDIMGYKFL
4	TSHR 21-417 Δ 368- 376C391S/C398S/C4 08S	GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCCKDIQRIPSLPPSTQTLKL IETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL ESHSHFYNLKSVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYM TSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQT SVTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYP SHCFAFNQKKIRGILESMLCNESSMQS LRQRKSVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSKFQDTHNNAHYVVFEEQEDEIIGFGTLQAFDSHYDYTI SGDSEMDVSTPKSDEFNPSDEDIMGYKFL
5	TSHR 21-282	GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCCKDIQRIPSLPPSTQTLKL IETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL ESHSHFYNLKSVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYM TSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQTS VTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYP SH
6	TSHR 21-266	GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCCKDIQRIPSLPPSTQTLKL IETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL ESHSHFYNLKSVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYM TSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQT SVTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLS
7	TSHR 21-231	GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCCKDIQRIPSLPPSTQTLKL IETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL ESHSHFYNLKSVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYM TSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLL
8	TSHR 21-206	GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCCKDIQRIPSLPPSTQTLKL IETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL ESHSHFYNLKSVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYM TSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVY
9	TSHR 21-156	GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCCKDIQRIPSLPPSTQTLKL IETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL ESHSHFYNLKSVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMPDLTKVYSTDIFFIL
10	TSHR 21-127	GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCCKDIQRIPSLPPSTQTLKL IETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL ESHSHFYNLKSVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPL

11	TSHR 157-294	EITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGP SLLDVSQTSVTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYP SHCCAFKNQKKIRG
12	TSHR 21-282 D43A	GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCCKAIQRIPSLPPSTQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL ESHSFYNLKSVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMT SIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQTS VTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYP SH
13	TSHR 21-282 E61A	GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCCKDIQRIPSLPPSTQTLKLIATHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL ESHSFYNLKSVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMT SIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQTS VTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYP SH
14	TSHR 21-282D43A/E61A	GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCCKAIQRIPSLPPSTQTLKLIATHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL ESHSFYNLKSVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMT SIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQTS VTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYP SH
15	TSHR 21-282K250A	GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCCKDIQRIPSLPPSTQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL ESHSFYNLKSVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMT SIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQTS VTALPSKGLEHLAELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYP SH
16	TSHR 21-282D43A/E61A/K250A	GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCCKAIQRIPSLPPSTQTLKLIATHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL ESHSFYNLKSVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMT SIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQTS VTALPSKGLEHLAELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYP SH

[0037] TSHR의 엑토 도메인의 단편을 다양한 길이로 제작하여, 이를 면역글로불린의 Fc 영역과 융합하였다(도 1, 2). 이와 같이 제조한 TSHR 단편의 M22 자가항체 중화율을 분석한 결과, TSHR 단편 중, 특정 단편의 중화 활성이 매우 뛰어난 것을 확인하였다(도 3).

[0038] 또한, TSHR의 엑토 도메인의 일부 단편과 카르복시-말단 캡(C-Cap)을 융합할 경우, 37도에서의 온도 안정성이 증가하는 것을 확인하였다(도 12 내지 도 13).

[0039] 따라서, 본 발명은 일관점에서, 다음의 변이를 포함하는 갑상선 자극 호르몬 수용기(thyrotropin receptor, TSHR) 단편에 면역글로불린 Fc 영역 또는 카르복시 말단 캡(C-Cap)이 결합되어 있는 융합 단백질에 관한 것이다: (a) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 282번째 아미노산까지의 단편; 또는 (b) 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 266번째 아미노산까지의 단편.

[0041] 상기 TSHR은 그레이브스 질환의 자가항원으로 밝혀져 있다. TSHR에 대한 항체는 갑상선 자극 호르몬과 유사하게 갑상선 세포막에 발현되어 있는 갑상선 자극 호르몬 수용체를 자극하거나, 억제하여 그레이브스 질환을 유발한다고 알려져 있다. 본 발명에 있어서, 상기 야생형 TSHR은 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0042] 서열번호 1: TSHR full amino acid sequence

[0043] MRPADLLQLVLLDLPRDLGGMGCSSPPCECHQEEDFRVTCCKDIQRIPSLPPSTQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQL
ESHSFYNLKSVTHIEIRNTRNLTYIDPDALKELPLLKFLGIFNTGLKMPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDA
VYLNKNKYLTVIDKDAFGGVYSGPSLLDVSQTSVTALPSKGLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYP SHCCAFKNQKKIRG
ILESMLCNESM
QSLRQKSKVNALNSPLHQEYEENLGDSIVGYKEKSKFQDTHNNAHYVVFEEQEDEIIGFGQELKNPQEETLQAFDSHYDYTCGDS
EDIMGYKFLRIVVWFVSLALLGNVFLILLTSHYKLVNPRFLMCNLAFAFDCMGMYLLIASVDLYTHSEYNNHAIDWQTGP
GCNTAGFFTTFVASELSVY
TLTVITLERWYAITFAMRLDRKIRLRHACAIMVGGWVCCFLALLPLVGISSYAKVSI
CLPMDTETPLALAYIVFVLTNLINIVAFVIVCCCYVKIYITVRNPQ
YNPGDKDTKIAKRAVLIFTDFICMAPI
SFYALSAILNKPLITVNSKILLVLFYPLNSCANPFLYAI
FTKAFQRDVFI
LLSKFGICKRQAQAYRGQRVPPK
NSTDIQVQKVTHDMRQGLHNMEDVYELIENSHLTPKKQGGISEEYMQTVL

[0045] 하나의 실시예에서, 상기 TSHR 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 282번째 아미노산까지의 단편을 포함할 수 있다. 상기 TSHR 변이체는 예를 들어, 서열번호 5로 표시되는 서열을 포함할 수 있다.

- [0046] 또 다른 실시예에서, 상기 TSHR 변이체는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 TSHR의 21번째 아미노산부터 266번째 아미노산까지의 단편을 포함할 수 있다. 상기 TSHR 변이체는 예를 들어, 서열번호 6으로 표시되는 서열을 포함할 수 있다.
- [0048] 본 명세서에서의 "Fc 영역"은 면역글로불린의 중쇄와 경쇄의 가변 영역 및 경쇄 불변 영역 1 (CL1)은 포함하지 않는 단백질을 의미하며, 상기 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 및 IgD로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 Fc 영역, 이의 단편 또는 이들의 조합을 포함하는 하이브리드 Fc일 수 있다.
- [0049] 하나의 실시예에서, 상기 하이브리드 Fc는 예를 들어, IgD 힌지 영역 및 CH2 N-말단 영역 + IG4 CH2 및 CH3 영역을 포함할 수 있으며, 예를 들어 서열번호 22로 표시되는 서열을 포함할 수 있다. 상기 하이브리드 Fc는 예를 들어, 한국등록특허 제0897938호에 개시된 하이브리드 Fc 형태를 동일하게 차용하여 사용할 수 있고, 본 명세서에 참조로서 도입된다.
- [0050] 서열번호 22: IgG4 Fc
- [0051] ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVTLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLYS RLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSLGK
- [0052] 또 다른 실시예에서, 상기 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 Fc 영역, 이의 단편 또는 이들의 조합을 포함하는 하이브리드 Fc일 수 있다.
- [0053] 상기 Fc 영역은 면역글로불린을 구성하는 Fc 영역 전체를 포함할 수 있고, 경우에 따라서 이의 단편, 또는 Fc 영역 변이체를 포함할 수 있다. 일부 아미노산이 치환되거나, 서로 다른 종류의 Fc 영역을 조합한 Fc 영역 변이체도 포함될 수 있다. Fc 영역 변이체는 힌지 부위에서 절단되는 것을 예방하기 위해 변형될 수 있다. 또한, 상기 Fc의 힌지 서열은 항체 의존 세포 매개 세포독성 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity; ADCC) 이나 보체 의존 세포독성 (complement-dependent cytotoxicity; CDC)을 줄이기 위해 아미노산 서열 일부가 치환될 수 있다. 또한, 상기 Fc의 힌지 서열은 Fab 영역의 재배열을 억제하기 위해 아미노산 서열 일부가 치환될 수 있다. 나아가, Fc 영역 C-말단의 라이신 (K)은 제거될 수 있다.
- [0054] 또한, 본 발명의 Fc 단편은 야생형 당쇄, 야생형에 비해 증가된 당쇄, 야생형에 비해 감소한 당쇄, 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 상기 당쇄의 증가, 감소 또는 제거는 화학적 방법, 효소적 방법 및 미생물을 사용한 유전공학적 엔지니어링 방법 등과 같은 당업계에 알려진 통상적인 방법으로 수행될 수 있다.
- [0056] 본 발명에서, "Fc 단편"은 면역글로불린의 카복시 말단에서 규칙적으로 발견되는 단백질 부분 또는 단백질 접합 구조를 설명하기 위해 사용되는 당 분야의 용어이다. Fc 단편은 미완성의 불완전한 공정인 파파인 소화와 같은 효소적 소화를 사용하여, 모노클론 항체의 Fab 단편으로부터 분리될 수 있다(Mihaesco C et al., Journal of Experimental Medicine, 1968, Vol 127, 43 1 - 453) (항원결합 도메인을 함유하는) Fab 단편과 결합하여, Fc 단편은 완전한 항체를 의미하는 홀로-항체를 구성한다. Fc 단편은 항체 중쇄들의 카복시 말단부들로 구성된다. Fc 단편내 사슬들 각각은 길이가 약 220-265개의 아미노산들이며, 사슬들은 디설파이드 결합을 통해 종종 결합된다. Fc 단편은 종종 하나 이상의 독립적 구조적 접합 또는 기능적 서브도메인들을 함유한다.
- [0057] "Fc 부분 단편"은 항체의 전체 미만의 Fc 단편을 포함하는 도메인이며, Fc γ 수용체 결합활성을 포함하는, Fc 단편과 동일한 활성을 갖기에 충분한 구조를 유지한다. 그러므로, Fc 부분 단편은 Fc 부분 도메인이 유도되는 항체의 이소타입에 따라, 힌지 부분의 부분 또는 전체, CH2 도메인의 부분 또는 전체, CH3 도메인의 부분 또는 전체 및/또는 CH4 도메인의 부분 또는 전체가 없을 수 있다. Fc 부분 단편의 예로는 IgG3의 상부, 중심 및 하부 힌지 부분 플러스 CH2 도메인을 포함하는 분자를 포함한다(Tan, LK, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1990 January; 87(1): 162-166).
- [0058] Fc 단편은 또한, 개개의 중쇄 불변 도메인들(예를 들어, CH1, CH2, CH3 및 CH4 도메인) 및 다른 면역글로불린 부류 및 서브부류들의 힌지 부분들을 포함한다. 따라서, 본 발명의 인간 Fc 단편들은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE의 CH1 도메인들, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE의 CH2 도메인들, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE의 CH3 도메인들, IgM 및 IgE의 CH4 도메인들 및, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE의 힌지 도메인들을 포함한다. 다른 종에서 대응하

는 Fc 단편들은 그의 종류내에 존재하는 면역글로불린 및 그의 명명에 따라 다를 것이다. 바람직하게는, 본 발명의 Fc 단편들은 IgG1의 CH1, CH2 및 힌지 도메인들 및 IgG2의 힌지 도메인을 포함한다. 본 발명의 Fc 단편은 이들 도메인들 및 힌지들 중 하나 이상의 조합을 추가로 포함한다.

[0060] 상기 면역글로불린 Fc 영역은 TSHR 단편의 C 말단에 Fc 영역의 N 말단이 직접 연결된 형태이거나, 링커를 통해 연결된 형태일 수 있다. 상기 면역글로불린 Fc 영역이 TSHR 단편과 직접 연결된 형태인 경우, 예를 들어 본 발명은 서열번호 5의 TSHR 단편의 C 말단에 서열번호 22의 Fc 영역의 N 말단이 연결된 형태일 수 있다. TSHR과 Fc의 연결 형태는 TSHR의 C 말단에 Fc 영역의 N 말단이 연결된 형태가 바람직하다.

[0061] 링커를 통해 연결되는 경우, 상기 링커는 TSHR 단편의 N 말단, C 말단 또는 유리기 (free radical)에 연결될 수 있고, Fc 단편의 N-말단, C-말단 또는 유리기에 연결될 수 있다. 링커가 펩타이드 링커인 경우, 연결은 임의의 부위에서 일어날 수 있다. 예를 들면, 상기 링커가 상기 TSHR 단편의 C 말단 및 면역글로불린의 Fc 영역의 N 말단에 연결될 수 있다.

[0062] 링커 및 Fc가 별개로 발현된 후에 서로 결합될 때, 링커는 당업계에 알려진 가교제일 수 있다. 상기 가교제는, 예를 들어, 1,1-비스(디아조아세틸)-2-페닐에탄 (1,1-bis(diazoacetyl)-2-phenylethane), 글루타르알데하이드 (glutaraldehyde), 4-아지도살리실릭산 (4-azidosalicylic acid)과 같은 N-하이드록시석신이미드 에스테르 (N-hydroxysuccinimide ester), 3,3'-디사이오비스(석신이미딜프로피오네이트) (3,3'-dithiobis(succinimidylpropionate))와 같은 디석신이미딜에스테르 (disuccinimidyl esters)를 포함하는 이미도에스테르 (imidoesters), 및 비스-N-말레이미도-1,8-옥테인과 같은 이중 기능적 말레이미드 (bifunctional maleimides)일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0063] 또한, 상기 링커는 펩타이드일 수 있다. 구체적으로, 상기 링커는 글리신 및 세린 잔기를 포함하고, 10 내지 35 개의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드일 수 있으며, 보다 바람직하게는 알라닌, 글루탐산, 트레오닌, 라이신 및 아르기닌 잔기를 포함하고, 10 내지 35개의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드 일 수 있으며, 가장 바람직하게는 서열번호 17 내지 21로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 펩타이드 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에서 바람직한 링커 서열은 하기 표 2와 같다.

표 2

[0064] 링커 서열

서열번호	이름	링커 서열
17	L2	A(EAAAK) ₄ A
18	CD	KARAAEAARAAEAAKAAEATKAAEAAAKA
19	MCD	AEAAKAAEATKAAEAAAKA
20	GS	(GGGGS) ₃
21	G8	GGGGGGGG

[0066] 본 발명에 따른 구체적 실시예에서는 (GGGGS)₃ (서열번호 20)의 서열을 포함하는 링커를 통해 면역글로불린 Fc 영역이 TSHR 단편과 연결된 구조를 포함하였다. 실시예에 따르면, 서열번호 20으로 표시되는 서열을 포함하는 링커를 통해 면역글로불린 Fc에 결합된 TSHR 단편 융합 단백질의 활성이 우수함을 확인하였다(도 6 내지 도 10).

[0068] 본 발명에서 상기 카르복시 말단 캡(C-Cap)은 단백질의 구조 안정화를 유도하는 캐핑 모티프 유래이면 제한 없이 이용할 수 있으나, 바람직하게는 류신 반복 단백질 PP32 유래인 것을 특징으로 할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 23 내지 28로 구성된 군에서 선택된 어느 하나로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0069] 본 발명에 있어서, 상기 C-Cap은 상기 서열에서 추가적인 수소결합 생성을 위한 수소 공여체(hydrogen donor)

및 수소 수용체(hydrogen acceptor) 아미노산이 치환된 것을 특징으로 할 수 있다.

[0070] 본 발명에 있어서, 상기 융합 단백질은 C-Cap의 카르복시 말단에 링커 및 정제를 위한 태그를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0071] 본 발명에서 바람직한 C-Cap 서열은 표 3과 같다.

표 3

[0072] C-Cap 서열

서열번호	이름	링커 서열
23	#1	YRENVFKLLPQLTYLDGYDRDDKE
24	#2	DRENVFKLLPQLTYLYGYDRDDKE
25	#3	YRENSFKLLPQLTYLDGYDRDDKE
26	#4	YRESVFKLLPQLTYLDGYDRDDKE
27	#5	YRENSFKLLPQLTYLEGYDRDDKE
28	#6	YRESVFKLLPQLTYLEGYDRDDKE

[0074] 본 발명에 있어서, 상기 융합 단백질은 서열번호 29 또는 30의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0075] 서열번호 29: TSHR(21-282)-GS(Linker)-Fc

[0076] GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIPSLPPSTQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNLSKVTHIEIRNTRNLTYIDPDAL
KELPLLKFLGIFNTGLKMFPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGV
YSGPSLLDVSQTSVTALPSKLEHLKELIARNTWTLKKLPLSLSFLHLTRADLSYPHSHGGGGSGGGSGGGSGSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP
KDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVY
TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK

[0078] 서열번호 30: TSHR(21-266)-C-Cap-Linker-6xHis

[0079] GMGCSSPPCECHQEEDFRVTCKDIQRIPSLPPSTQTLKLIETHLRTIPSHAFSNLPNISRIYVSIDVTLQQLESHSFYNLSKVTHIEIRNTRNLTYIDPDAL
KELPLLKFLGIFNTGLKMFPDLTKVYSTDIFFILEITDNPYMTSIPVNAFQGLCNETLTLKLYNNGFTSVQGYAFNGTKLDAVYLNKNKYLTVIDKDAFGGV
YSGPSLLDVSQTSVTALPSKLEHLKELIARNTWTLKKLPLSYRENSFKLLPQLTYLDGYDRDDKEGGGSGGGSHHHHHHHH

[0081] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 TSHR 단편을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 핵산 및 상기 핵산을 포함하는 제조용 벡터에 관한 것이다.

[0082] 상기 TSHR 단편을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 분리하여 TSHR 단편을 포함하는 융합 단백질을 제조함으로써 생산할 수 있다. 핵산을 분리하고, 이를 복제 가능한 벡터 내로 삽입하여 추가로 클로닝하거나 또는 추가로 발현시킨다. 이를 바탕으로, 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 핵산을 포함하는 벡터에 관한 것이다.

[0083] 본 명세서에서 사용되는 "핵산"은 DNA (gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다. 본 발명의 TSHR 단편을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 핵산의 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.

[0084] 본 발명의 핵산은 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오타이드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 실질적인 동일성은 본 발명의 핵산 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인 된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 보다 바람직하게는 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성을 나타내는 핵산 서열을 의미한다.

[0085] 상기 TSHR 단편을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 DNA는 통상적인 과정을 사용하여 용이하게 분리 또는 합성

한다.

- [0086] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로 플라스미드 벡터; 코즈미드 벡터; 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 허용 가능한 벡터 성분에는 일반적으로 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 증강인자 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열 중 하나 이상이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다.
- [0087] 상기 벡터에서 TSHR 단편 포함 융합 단백질을 코딩하는 핵산은 프로모터와 작동적으로 연결되어 있다.
- [0088] "작동적으로 연결"은 핵산 발현조절서열 (예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [0089] 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 또한, 예를 들어, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터, β -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40프로모터, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스 (MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터엡스타인바 바이러스 (EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스 (RSV)의 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0090] 경우에 따라서, 벡터는 그로부터 발현되는 TSHR 단편 포함 융합 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타틴 S-트랜스퍼라제 (Pharmacia, USA), 말토스 결합 단백질 (NEB, USA), FLAG (IBI, USA) 및 6x His (hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있다.
- [0091] 상기 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.
- [0093] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 언급된 재조합 벡터가 도입되어 있는 재조합 세포 및 상기 재조합 세포를 이용한 상기 융합 단백질의 제조방법에 관한 것이다. 상기 세포는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0094] 본 발명에 있어서, 상기 융합 단백질의 제조방법은 (a) 상기 재조합 세포를 배양하여 상기 융합 단백질을 발현시키는 단계; 및 (b) 상기 발현된 융합 단백질을 회수하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0095] 에스케리치아 콜라이 (Escherichia coli), 바실러스 서브틸리스 및 바실러스 슈린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스 (Streptomyces), 슈도모나스 (Pseudomonas) (예를 들면, 슈도모나스 푸티다 (Pseudomonas putida)), 프로테우스미라빌리스 (Proteus mirabilis) 및 스태필로코쿠스 (Staphylococcus) (예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스 (Staphylococcus carnosus))와 같은 원핵 숙주세포를 이용할 수 있다.
- [0096] 다만, 동물 세포에 대한 관심이 가장 크며, 유용한 숙주 세포주의 예는 COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S, 또는 HT1080일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0097] 본 발명에 사용될 수 있는 가장 바람직한 숙주 세포는 불사의 하이브리도마 세포 (immortal hybridoma cells), NS/O 골수종 세포 (NS/O myeloma cells), 293 세포, 중국 햄스터 난소 세포 (CHO cell), HeLa 세포, CAP 세포 (인간 양수 유래 세포), 및 COS 세포를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0098] 상기 세포는 각종 배지에서 배양할 수 있다. 시판용 배지 중 제한 없이 배양 배지로서 사용할 수 있다. 당업자에게 공지되어 있는 기타 모든 필수 보충물이 적당한 농도로 포함될 수도 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH

등이 발현을 위해 선별된 숙주 세포와 함께 이미 사용되고 있고, 이는 당업자에게 명백할 것이다.

- [0099] 상기 TSHR 단편 포함 융합 단백질의 회수는 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 불순물을 제거하고, 그 결과물을 예를 들어 친화 크로마토그래피 등을 이용하여 정제할 수 있다. 추가의 기타 정제 기술 예를 들어 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피 등이 사용될 수 있다.
- [0101] 한편, 본 발명에서는 융합 단백질이 실제로 그레이브스 질환 환자의 혈액 샘플에서 자가항체를 효과적으로 중화시킬 수 있는 지 확인하고자 하였다.
- [0102] 즉, 본 발명의 다른 실시예에서는 융합 단백질의 농도별 그레이브스 질환 환자의 혈액 샘플에 대한 자가 항체 중화 여부를 확인하였다. 그 결과, 10 µg/ml 농도의 융합 단백질은 모든 그레이브스 질환 환자의 혈액 샘플에 대하여 충분한 자가 항체 중화 효과를 나타내는 것을 확인하였다(도 6 내지 9).
- [0103] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 TSHR 단편 포함 융합 단백질을 포함하는 그레이브스 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0104] 상기 약학 조성물은 치료 유효량의 TSHR 단편 포함 융합 단백질 및 제약상 허용되는 담체를 포함할 수 있다. "제약상 (약학적으로) 허용되는 담체"는 제제를 제제화하거나 또는 안정화시키는 것을 돕기 위해서 활성 성분에 추가될 수 있는 물질이고, 환자에게 유의한 해로운 독성 효과를 야기하지 않는다.
- [0105] 상기 담체는 환자를 자극하지 않고 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0106] 제약상 허용되는 담체는 멸균 주사 가능한 용액제 또는 분산액제를 즉각 투여용 (extemporaneous)으로 제조하기 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 제약 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 조성물은 바람직하게는 비경구 주사용으로 제제화된다. 조성물은 용액제, 마이크로에멀전제, 리포솜제, 또는 높은 약물 농도에 적합한 기타 주문된 구조물로서 제제화될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이것들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 일부 경우에, 조성물 중에 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 에컨대 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 포함시킬 수 있다. 멸균 주사가능한 용액제는 필요한 양의 활성 화합물을 필요에 따라 상기 기재된 성분들 중 1종 또는 이것들의 조합물과 함께 적절한 용매 중에 혼합시킨 후에 멸균 마이크로 여과를 수행하여 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액제는 활성 화합물을 기본적인 분산 매질 및 상기 기재된 것들로부터의 기타 필요한 성분을 함유하는 멸균비히클로 혼합시켜 제조된다. 멸균 주사가능한 용액제를 제조하기 위한 멸균 분말의 경우, 일부 제조 방법은 활성 성분 및 임의의 추가의 원하는 성분의 분말을 이것의 미리 멸균-여과시킨 용액으로부터 생성하는 진공 건조 및 냉동-건조 (동결건조)이다.
- [0107] 구체적으로, 상기 약학적 조성물은, 조성물의 pH, 오스몰 농도, 점도, 투명도, 색상, 등장성, 냄새, 무균성, 안정성, 용해 또는 방출 속도, 흡착, 또는 투과를 변형하거나, 유지하거나 또는 보존하기 위한 제제화 물질을 함유할 수 있다. 적합한 제제화 물질은 아미노산(예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신), 항미생물제, 항산화제(예컨대 아스코르브산, 아황산나트륨 또는 아황산수소나트륨), 완충제(예컨대 보레이트, 비카르보네이트, 트리스-HCl, 시트레이트, 포스페이트 또는 다른 유기산), 별킹제(예컨대 만니톨 또는 글리신), 킬레이트화제(예컨대 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA)), 착화제(예컨대 카페인, 폴리비닐피롤리돈, 베타-시클로덱스트린 또는 히드록시프로필-베타-시클로덱스트린), 충전제, 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물(예컨대 글루코스, 만노스 또는 텍스트린), 단백질(예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 이뮤노글로불린), 착색제, 향미제 및 희석제, 유화제, 친수성 중합체(예컨대 폴리비닐피롤리돈), 저분자량 폴리펩타이드, 염-형성 반대이온(예컨대 나트륨), 보존제(예컨대 벤즈알코늄 클로라이드, 벤조산, 살리실산, 티메로살, 페네틸 알콜, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르브산 또는 과산화수소), 용매(예컨대 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜), 당 알콜(예컨대 만니톨 또는 소르비톨), 현탁화제, 계면활성제 또는 습윤제(예컨대 플루로닉스; PEG; 소르비탄 에스테르; 폴리소르베이트, 예컨대 폴리소르베이트 20 또는 폴리소르베이트 80; 트

리톤; 트로메타민; 레시틴; 콜레스테롤 또는 킬록사팔), 안정성 증진제(예컨대 수크로스 또는 소르비톨), 장성 증진제(예컨대 알칼리 금속 할라이드; 바람직하게는 염화나트륨 또는 염화칼륨; 또는 만니톨 소르비톨), 전달 비히클, 희석제, 부형제 및/또는 제약 아주반트를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

- [0109] 또한, 본 발명은 상기 TSHR 단편 포함 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 갑상선 자극 호르몬 수용기-연관 장애의 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이거나, 치료가 필요한 개체에 TSHR 단편 포함 융합 단백질을 투여하는 것을 포함하는 갑상선 자극 호르몬 수용기-연관 장애를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.
- [0110] 상기 갑상선 자극 호르몬 수용기-연관 장애는 예를 들어, 그레이브스 질환, 그레이브스 안병증을 포함할 수 있다.
- [0111] 상기 TSHR 단편 포함 융합 단백질은 어떠한 경로로도 투여될 수 있다. 예를 들어, 직접적으로 (예, 조직 부위에 주입, 이식 또는 국부적으로 투여함으로써, 국소적으로) 또는 시스템적으로 (예, 비경구 또는 경구로) 임의의 적절한 수단에 의하여 동물에게 제공될 수 있다.
- [0112] 정맥 내, 피하, 눈 (ophthalmic), 복강 내, 근육 내, 구강, 직장, 안와 내 (intraorbital), 뇌 내 (intracerebral), 두개 내 (intracranial), 척추 내 (intraspinial), 뇌실 내 (intraventricular), 수막강 내 (intrathecal), 조내 (intracistenal), 캡슐 내 (intracapsular), 비 내 (intranasal) 또는 에어로졸 투여와 같이 비경구적으로 제공되는 경우, 예를 들어 수성 (aqueous) 이거나 생리학적으로 적용가능한 체액 현탁액 또는 용액의 부분을 포함할 수 있다. 이에 따라, 담체 또는 운반체 (vehicle)가 생리학적으로 허용 가능하므로 융합단백질에 첨가하여 환자에게 전달될 수 있다. 따라서, 제제를 위한 체액과 같은 담체로 일반적으로 생리식염수를 포함할 수 있다.
- [0113] 투여 빈도는 사용되는 제제 내의 TSHR 단편 포함 융합단백질의 약동학적 파라미터에 따라 달라질 것이다. 전형적으로, 임상적 목적 효과를 달성하는 투여량에 도달할 때까지 투여할 수 있다. 따라서, 단일 용량으로서, 시간 간격을 둔 2회 이상의 용량 (동일한 양의 목적 융합 단백질을 함유하거나 함유하지 않을 수 있음)으로서, 또는 이식 장치 또는 카테터를 통한 연속 주입으로서 투여될 수 있다. 적절한 투여량의 추가의 정밀화는 당업자에 의해 일상적으로 이루어지고, 그들에 의해 일상적으로 수행되는 업무 영역 내에 해당한다.
- [0114] 단위 투여량은 인간에 있어서 0.01 $\mu\text{g}/\text{체중kg}$ 내지 100 $\text{mg}/\text{체중kg}$ 이며, 구체적으로, 1 $\mu\text{g}/\text{체중kg}$ 내지 30 $\text{mg}/\text{체중kg}$ 이다. 상기 함량이 최적량인 하나, 치료대상 질환 및 부작용의 유무에 따라 달라질 수 있으며, 최적의 투여량은 통상적인 실험을 이용하여 결정될 수 있다. 융합 단백질의 투여는 주기적인 급속 주입 (periodic bolus injections)에 의하거나, 외측 공급원 (external reservoir) (예, 정맥주사 보유주머니 (intravenous bag)) 또는 내측 (예, 생체부식성 임플란트 (bioerodable implant))으로부터의 지속적인 정맥 내, 피하, 또는 복막 내 투여에 의할 수 있다.
- [0115] 투여 빈도는 상태의 중증도에 따라 달라진다. 빈도는 1주당 3회 내지 매 1주 또는 2주 마다 1회의 범위일 수 있다.
- [0116] 경우에 따라서, 상기 TSHR 단편 포함 융합 단백질은 다른 생물학적 활성 분자와 함께 대상 수용체에 투여될 수 있다. 그러나 융합 단백질 및 다른 분자의 최적의 조합, 투여 형태, 정량은 당업계에서 잘 알려진 통상적인 실험을 통하여 결정될 수 있다.
- [0118] 본 명세서에서 사용된 "치료 유효량"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 본 발명에 따른 TSHR 단편 포함 융합 단백질의 양을 의미한다. 정확한 양은 치료 조성물의 성분 및 물리적 특징, 의도된 환자 집단, 개개의 환자의 고려사항 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 수많은 인자에 따라 달라질 것이고 당업자가 쉽게 결정할 수 있다. 이들 요인들을 완전하게 고려할 때, 부작용 없이 최대의 효과를 얻기에 충분한 최소량을 투여하는 것이 중요하며, 이 복용량은 분야의 전문가에 의하여 용이하게 결정될 수 있다.
- [0119] 본 발명의 약학 조성물의 복용량은 특별하게 한정되지는 않으나, 환자의 건강 상태 및 체중, 질환의 중증도, 약제의 종류, 투여경로 및 투여시간을 포함한 다양한 요인에 따라 변경한다. 조성물은 하루에 1회량 또는 다회용량으로 쥐 (rat), 생쥐 (mouse), 가축, 인간 등을 포함하는 포유류 내로 전형적으로 허용된 경로, 예를 들면, 경구로, 직장으로, 정맥으로 (intravenously), 피하로 (subcutaneously), 자궁내로 (intrauterinely) 또는 뇌

혈관내로 (intracerebrovascularly) 투여될 수 있다.

- [0121] 본 발명의 다른 실시예에서는 ELISA를 이용하여 샘플 내 자가항체의 양을 본 발명에서 개발한 TSHR 융합 단백질을 이용하여 측정하였다(도 15). 즉, 본 발명의 융합단백질은 자가항체 중화 용도뿐만 아니라, 샘플 내 자가항체의 양을 측정하여, 그레이브스 질환을 진단하는 용도로 이용될 수 있다.
- [0122] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 TSHR 단편 포함 융합 단백질을 포함하는 그레이브스 질환 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0123] 본 발명은 또한, 상기 그레이브스 질환 진단용 조성물을 포함하는 그레이브스 질환 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0124] 본 발명에 있어서, 상기 키트는 필요에 따라 다양한 완충액, 세척액 및 표지물질들을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0126] 본 발명에서 사용되는 기술용어 및 과학용어에 있어 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 의미를 지닌다. 또한, 종래와 동일한 기술적 구성 및 작용에 대한 반복되는 설명은 생략하기로 한다.
- [0128] 실시예
- [0129] 이하, 본 발명을 구체적인 실시예에 의해 보다 상세히 설명하고자 한다. 하지만, 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 아이디어와 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정될 수 있음은 통상의 기술자에게는 자명한 것이다.
- [0131] **제조예 1. TSHR 변이체를 포함한 융합 단백질의 제조 및 정제**
- [0132] **제조예 1-1. 단백질 발현벡터 제작**
- [0133] 갑상선 자극 호르몬 수용기 변이체의 생물학적 활성을 증가시키기 위하여 다양한 조합의 변이체 및 Fc 또는 C-Cap과 결합된 융합 단백질을 표 4와 같이 설계하였다.

표 4

- [0134] TSHR 변이체 융합 단백질 구조

서열번호	이름	링커	결합 단백질
2	TSHR 21-417 (TR1-Fc)	없음	IgG4-Fc(서열번호 22)
3	TSHR 21-417 Δ368-376 (TR2-Fc)	없음	IgG4-Fc (서열번호 22)
4	TSHR 21-417 Δ368-376 C391S/C398S/C408S (TR3-Fc)	없음	IgG4-Fc(서열번호 22)
5	TSHR 21-282 (TR4-Fc)	없음	IgG4-Fc(서열번호 22)
7	TSHR 21-231 (TR5-Fc)	없음	IgG4-Fc(서열번호 22)
8	TSHR 21-206(TR6-Fc)	없음	IgG4-Fc(서열번호 22)
9	TSHR 21-156(TR7-Fc)	없음	IgG4-Fc(서열번호 22)
10	TSHR 21-127(TR8-Fc)	없음	IgG4-Fc(서열번호 22)
11	TSHR 157-294(TR-9-Fc)	없음	IgG4-Fc(서열번호 22)
12	TSHR 21-282 D43A(N01)	없음	IgG4-Fc (서열번호 22)
13	TSHR 21-282 E61A (N02)	없음	IgG4-Fc (서열번호 22)
14	TSHR 21-282 D43A/E61A (N03)	없음	IgG4-Fc (서열번호 22)

15	TSHR 21-282 K250A(N04)	없음	IgG4-Fc (서열번호 22)
16	TSHR 21-282 D43A/E61A/K250A(N05)	없음	IgG4-Fc (서열번호 22)
29	TSHR 21-282-GS-Fc (TR-GS)	(GGGGS) ₃ (서열번호 20)	IgG4-Fc (서열번호 22)
30	TSHR 21-266-C-Cap (TR-C-Cap)	없음	C-Cap #5 (서열번호 27)
31	TSHR 21-282-L2-Fc (TR-L2)	A(EAAAk) ₄ A(서열번호 17)	IgG4-Fc (서열번호 22)
32	TSHR 21-282-CD-Fc (TR-CD)	KARAAEAAARAEEAAKAAEATKAAEAAKAAK A (서열번호 18)	IgG4-Fc (서열번호 22)
33	TSHR 21-282-MCD-Fc (TR-MCD)	AEAAKAAEATKAAEAAKAAKA (서열번호 19)	IgG4-Fc (서열번호 22)
34	TSHR 21-282-G8-Fc (TR-G8)	GGGGGGGG(서열번호 21)	IgG4-Fc (서열번호 22)
35	TSHR 21-266-C-Cap #1	없음	C-Cap #1 (서열번호 23)
36	TSHR 21-266-C-Cap #2	없음	C-Cap #2(서열번호 24)
37	TSHR 21-266-C-Cap #3	없음	C-Cap #3(서열번호 25)
38	TSHR 21-266-C-Cap #4	없음	C-Cap #4(서열번호 26)
39	TSHR 21-266-C-Cap #6	없음	C-Cap #6(서열번호 28)

[0136] 각 갑상선 자극 호르몬 수용기 변이체 단백질의 아미노산 서열을 기초로 이를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 (주)바이오니아사에 의뢰하여 합성하였다. 각 갑상선 자극 호르몬 수용기 변이체 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 5' 말단과 3' 말단에 각각 NheI과 NotI 제한효소 서열을 첨가하였고, 5' 말단의 제한효소 서열 뒤에 단백질 번역을 위한 시작 코돈과 발현된 단백질을 세포 밖으로 분비하게 하는 유도서열을 삽입하였다. 각 갑상선 자극 호르몬 수용기 단백질 변이체 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 뒤에는 종결코돈을 삽입하였다. NheI과 NotI 두 제한효소 서열을 이용하여 각 갑상선 자극 호르몬 수용기 변이체 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 pcDNA3.1-empty 발현벡터에 클로닝하였다. pcDNA3.1-empty 발현벡터는 미국의 Invitrogen사에서 입수하였으며, CMV 프로모터, pUC 유래 복제기원, SV40 유래 복제기원, 암피실린 내성 유전자등을 가지는 간단한 구조의 발현벡터이다.

[0138] 제조예 1-2. 단백질 발현을 위한 플라스미드 DNA의 제작

[0139] 각 발현벡터를 대장균(*E. coli* Top 10 competent cell, Thermo Fisher Scientific)에 형질전환하여 발현에 쓰일 다량의 플라스미드 DNA를 얻었다. 각 발현벡터는 세포벽이 약화된 대장균내에 열 쇼크를 통해 형질도입하였으며, LB 플레이트에 도말하여 콜로니를 확보하였다. 확보된 콜로니를 LB배지에 접종한 후 16시간 배양하여 각 발현벡터를 세포 내에 가지는 대장균을 각 100 ml씩 확보하였다. 확보된 대장균은 원심분리를 통해 배양배지를 제거한 후 P1, P3, P3 용액(QIAGEN사, cat. no.:12963)을 첨가하여 세포벽을 깨고 단백질과 DNA를 분리한 DNA 혼탁액을 확보하였다. Qiagen DNA 정제 칼럼을 이용해 확보한 용액으로부터 플라스미드 DNA를 정제하였다. 용출된 DNA는 아가로스 젤 전기영동을 통해 확인하였으며, 나노드롭 기기(Thermo scientific사, Nanodrop Lite)를 이용하여 농도와 순도를 측정한 후 발현에 사용하였다.

[0141] 제조예 1-3. HEK293 세포에서 변이체 단백질 발현

[0142] 각 플라스미드 DNA로 인간세포주를 형질전환하였다. FreeStyle 293 배지 (Life technologies)에서 배양중인 293F세포(FreeStyle 293-F, Thermo Fisher Scientific)에 PEI 용액(Polyplus사, cat. no.:101-10N)을 이용하여 각 플라스미드 DNA를 형질도입하였다. DNA와 PEI 용액의 혼합액을 인비트로젠사의 Freestyle293 발현 배지를 이용하여 현탁한 세포에 섞고 24시간 배양 후 10% select soytone stock을 0.5%(v/v)으로 첨가하였다. 5일간 배

양 후 원심분리를 통해 세포를 제거하여 갑상선 자극 호르몬 수용기(TSHR) 변이체 단백질이 포함된 상등액을 확보하였다.

[0144] **제조예 1-4. CHO 세포에서 변이체 단백질 발현**

[0145] 각 플라스미드 DNA로 인간세포주를 형질전환하였다. TransFxC 배지 (HyClone)에서 배양중인 CHO-S세포 (FreeStyle CHO-S, Thermo Fisher Scientific)에 FectoPro DNA transfection reagent 용액(Polyplus사, cat. no.:116-010)을 이용하여 각 플라스미드 DNA를 형질도입하였다. DNA와 FectoPro의 혼합액을 하이클론사의 TransFxC 발현 배지를 이용하여 현탁한 세포에 섞고 4시간 배양 후 10% select soytone stock을 0.5%(v/v)으로 첨가하였다. 5일간 배양 후 원심분리를 통해 세포를 제거하여 갑상선 자극 호르몬 수용기(TSHR) 변이체 단백질이 포함된 상등액을 확보하였다.

[0147] **제조예 1-5. 갑상선 자극 호르몬 수용기 (TSHR) 변이체 단백질과 Fc 영역이 융합된 융합 단백질의 정제**

[0148] Protein A 친화크로마토그래피(GE Healthcare) 칼럼을 20mM 인산나트륨(pH 7.2) 완충액으로 평형화하였다. TSHR-Fc 단백질을 포함하는 배양 상등액을 0.2 μ m 필터로 여과한 후, Protein A 친화크로마토그래피 칼럼에 로딩하였다. 20mM 인산나트륨 완충액으로 칼럼을 세척하고, 100mM 글리신(pH 3.3) 완충액으로 용출한 후, 1M 트리스 완충액으로 용출된 단백질을 중화하였다. Protein A 친화크로마토그래피를 통해 얻은 단백질은 다시 Poros HQ(Life technologies) 음이온크로마토그래피 칼럼을 이용해 정제하였다. Poros HQ 음이온크로마토그래피 칼럼을 50mM 트리스(pH 8.0) 완충액으로 평형화한 후, Protein A 친화크로마토그래피에서 용출된 단백질을 로딩하였다. 50mM 트리스(pH 8.0) 완충액으로 칼럼을 세척한 후, 1M 염화나트륨이 포함되어 있는 50mM 트리스(pH 8.0) 완충액을 농도 구배로 흘려준 후, 용출된 분획을 분석하였다. SDS-PAGE 환원 조건에서 각 분획을 분석하여 고순도의 TSHR-Fc 단백질이 존재하는 부분을 모은 다음, 최종 완충액 1X PBS, pH 7.4로 4℃에서 밤새 투석하였다. 투석이 끝난 후 30,000 MW 컷오프 원심분리 필터를 사용하여, 2,500 rpm, 4℃ 조건으로 농축하였으며, 농축이 완료된 TSHR-Fc 단백질의 농도는 Nano-Drop(Thermo)으로 측정하였다.

[0150] **제조예 1-6. 갑상선 자극 호르몬 수용기 (TSHR) C-Cap 변이체 융합 단백질의 정제**

[0151] Ni-Sepharose(GE-17-3712-02, GE Healthcare) 칼럼을 20mM 인산나트륨(pH 7.2), 0.5 M 염화나트륨 완충액으로 평형화하였다. TR-C-Cap 단백질을 포함하는 배양 상등액을 0.2 μ m 필터로 여과한 후, Ni-Sepharose 칼럼에 로딩하였다. 20mM 인산나트륨 (pH 7.2), 0.5 M 염화나트륨, 10 - 50 mM 이미다졸 완충액으로 칼럼을 순차적으로 세척하고, 20mM 인산나트륨 (pH 7.2), 0.5 M 염화나트륨, 0.5 M 이미다졸 완충액으로 용출하였다. SDS-PAGE 환원 조건에서 각 분획을 분석하여 고순도의 TR-C-Cap 단백질이 존재하는 부분을 모은 다음, 최종 완충액 1X PBS, pH 7.4로 4℃에서 밤새 투석하였다. 투석이 끝난 후 10,000 MW 컷오프 원심분리 필터를 사용하여, 2,500 rpm, 4℃ 조건으로 농축하였으며, 농축이 완료된 TR-Fc 단백질의 농도는 Nano-Drop(Thermo)으로 측정하였다.

[0153] **실험예 1. 융합 단백질의 활성 측정 결과**

[0154] **실험예 1-1. 측정 방법**

[0155] **1) M22 항체 blocking 반응성 확인**

[0156] 상기 방법으로 제조한 융합 단백질의 M22 항체에 대한 blocking 반응성 평가를 KRONUS ELISA Kit(KRONUS, USA)로 실시하였다.

[0157] 융합 단백질을 20 μ g/mL 농도에서 2배씩 희석하여 0.039 μ g/mL까지 총 10종의 순차적 희석시료를 준비하였다. 그리고 45 μ L의 순차적 희석시료 10종 및 표준물질과 60 μ L의 peroxide-M22 항체를 반응시키고, 상온에서 90분 정치 후, 96-well plate에 시작용액 75 μ L와 blocking 반응이 완료된 시료 75 μ L를 첨가하였다. 상온에서 90분 정치 후, 96-well plate에 들어있는 용액을 완전히 제거 및 3회 세척하고, TMB 발색액 100 μ L를 첨가하였다. 상온에서 25분 동안 정치 후, 종료 용액 50 μ L를 첨가하고 A450nm에서 분석하였다.

[0159] **2) TSH blocking 반응성 확인**

[0160] 상기 방법으로 제조한 융합 단백질의 TSH에 대한 blocking 반응성 평가를 EAGLE ELISA Kit(EAGLE, USA)로 실시하였다. 융합 단백질을 100 µg/mL 농도에서 2배씩 희석하여 0.195 µg/mL까지 총 10종의 순차적 희석시료를 준비하였다. 그리고 60 µL의 순차적 희석시료 10종 및 표준물질과 60 µL의 TSH complex를 반응시키고, 상온에서 90분 정치 후, 96-well plate에 시작용액 50 µL와 blocking 반응이 완료된 시료 100 µL를 첨가하였다. 상온에서 120분 정치 후, 각 96-well에 들어있는 용액을 완전히 제거 및 3회 세척하고, SA-POD conjugate 100 µL를 첨가하였다. 상온에서 60분 정치 후, 96-well plate에 들어있는 용액을 완전히 제거 및 3회 세척하고, TMB 발색액 100 µL를 첨가하였다. 상온에서 20분 동안 정치 후, 종료용액 50 µL를 첨가하고 A450nm에서 분석하였다.

[0162] **실험예 1-2. TSHR 변이체 종류에 따른 활성 측정 결과**

[0163] 위 제조예에서 제조한 TSHR 변이체 융합 단백질 TR1-Fc, TR2-Fc, TR3-Fc, TR4-Fc, TR5-Fc, TR6-Fc, TR7-Fc, TR8-Fc, TR9-Fc, N01, N02, N03, N04 및 N05의 M22 항체에 대한 IC50 값 및 TSH blocking 반응성을 실험예 1의 방법으로 측정하였다.

[0164] 그 결과, 발현되지 못한 융합 단백질을 제외하면, TR1-Fc, TR3-Fc, TR4-Fc, TR8-Fc, TR9-Fc가 발현되었으며, TR4-Fc가 가장 활성이 뛰어난 것을 확인하였다(도 3).

[0165] 또한, N01, N02, N03, N04, N05의 IC50값을 측정한 결과, N01 내지 N05 모두 TSH 블로킹 활성은 나타나지 않았고, N01은 M22 항체에 대하여 3.0 µg/mL의 IC50 값을 나타내었으나, N02-N05는 반응성이 전혀 나타나지 않는 것을 확인하였다.

[0166] 또한 TR-C-Cap #1, TR-C-Cap #2, TR-C-Cap #3, TR-C-Cap #4, TR-C-Cap #5, TR-C-Cap #6의 반응성을 확인한 결과, TR-C-Cap #3 및 #5의 반응성이 뛰어난 것을 확인하였다(도 12)

[0168] **실험예 1-3. 링커의 종류에 따른 활성 측정 결과**

[0169] 위 제조예에서 제조한 TR4-Fc, TR-L2, TR-CD, TR-MCD, TR-GS 및 TR-G8의 M22 항체에 대한 IC50 값 및 TSH blocking 반응성을 실험예 1의 방법으로 측정하였다.

[0170] 그 결과, 모든 융합단백질에서 TSH blocking 반응성은 나타나지 않았으며, 링커가 결합되지 않은 TR4-Fc에 비하여 링커가 결합된 융합 단백질들이 M22 항체에 대한 IC50값이 뛰어난 것을 확인할 수 있었다(도 5).

[0172] **실험예 2. GD/GO 환자 혈액 중화 반응성 확인**

[0173] **실험예 2-1. 측정 방법**

[0174] 상기 제조예에 따라 제조한 변이체 융합 단백질의 그레이브스 질환 (GD), 그레이브스 안병증 (GO) 환자 혈액에 존재하는 자가항체의 중화 반응성 평가를 Thyretain TSI Reporter Bioassay kit(Quidel, USA)로 실시하였다. 96-well (black, clear bottom, poly-lysine treated)에 100 µL 세포부착용액을 첨가하고 10분간 클린벤치에서 정치시킨 후, kit에 제공된 CHO-MC4 cell을 세포성장용액에 준비하여 96-well (black, clear bottom, poly-lysine treated)에 100 µL씩 균일하게 첨가한 후, CO₂ incubator에서 15-18시간 동안 배양하였다.

[0175] 다음날 준비된 융합 단백질을 2.5, 5, 10, 20 µg/mL 등의 농도로 준비하여, 선택된 환자 혈액과 37도에서 1시간 동안 반응 시켰다. 이후 전날 준비된, CHO-MC4 cell이 준비된 96-well을 kit에서 제공하는 반응버퍼로 2회 세척 후, 준비된 환자혈액, 변이체 TSHR-Fc 혼합물 100 µL를 첨가하였다. 혼합물이 첨가된 96-well은 CO₂ incubator에서 3시간 배양하고, luciferase substrate 용액을 75 µL 첨가한 후 10분간 25도에서 정치 후 luminometer로 값을 측정하였다. 최종적으로 %SRR (샘플과 레퍼런스의 % 비율) 값이 140 미만인 경우 음성으로 판단하였다.

[0177] **실험예 2-2. TSHR 변이체-Fc 융합 단백질의 중화 반응성 확인**

[0178] 전체 혈액 42종을 TR4-Fc, TR-L2, TR-GS, TR-CD와 반응시켰으며, 2.5 µg/mL의 융합단백질을 사용한 경우 각각

19, 19, 25, 18종의 혈액을 중화시킬 수 있음을 확인하였다(도 6 및 7).

[0179] 전체 42종의 혈액중 6종은 자가항체의 농도가 높아서 모든 후보물질들의 농도 5 $\mu\text{g/mL}$ 에서 중화시켜지지 않았다. 위에서 언급한 6종의 혈액을 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 반응시켰을 때, TR-GS는 6종 모두 중화시켰지만, TR4-Fc는 5종만을 중화시켰고, TR-L2, TR-CD는 각각 1종씩만 중화시키는 것을 확인하였다(도면 8 및 9). 이로써 위에서 언급한 융합단백질들 가운데 TR-GS가 가장 좋은 중화 효과를 보였음을 확인할 수 있었다.

[0181] 실험예 2-3. TSHR 변이체-C-cap 융합 단백질의 중화 반응성 확인

[0182] 변이체 TR-C-Cap의 혈액 중화반응을 확인하기 위하여, 자가항체의 양이 많은 #18 혈액을 선택하여 수행하였다. TR-GS와 TR-C-Cap과 반응시켰으며, 각각의 융합단백질들을 37도에서 1일, 2일 보관후 비교 사용하였다. 5, 20, 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 융합단백질을 사용한 경우 TR-C-Cap의 경우 37도 보관 2일 후에도 중화효과를 확인할 수 있었지만, TR-GS의 경우 37도 1일후에도 중화효과는 현저히 감소되는 것을 확인하였다(도 13). 또한, 정확한 IC50값 측정을 위해 0.39 ~ 12.5 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서의 중화약효를 측정하였고, TR-GS (37도 0일) 2.015 $\mu\text{g/mL}$, TR-C-Cap 37도 보관 0일, 1일, 2일은 각각 0.4439, 1.782, 4.469 $\mu\text{g/mL}$ 의 IC50값이 나타나는 것을 확인하였다(도 14). 따라서, C-Cap의 도입에 의한 37도 온도 안정성 강화를 확인할 수 있었다.

[0183]

[0184] 실험예 3. 융합 단백질의 약동역학 측정

[0185] 실험예 3-1. 약동역학 측정 실험 방법

[0186] (주)오리엔트 바이오(Orient BIO, Korea)에서 구입한 8주령의 암컷 C57BL/6 마우스를 약물 처리일 체중 측정하여 군 분리(채혈 시간당 n=3)한 후, 샘플 (TR-GS)을 2 mg/mL/kg 용량으로 1회 정맥 투여하였으며, 혈액 샘플은 약물투여 후 5분, 30분, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 시간차에 수집하였다. 온전한(intact) TR-GS의 혈중 농도를 측정하기 위해, 본 시험에서는 TSHR 및 IgG4 Fc에 대해 면역 반응성을 갖는 in-house ELISA 방법을 사용하였다. 마우스에 피하 주사 후 72시간 까지의 샘플의 혈중 농도를 측정하였다.

[0188] 실험예 3-2. 약동역학 활성 측정 결과

[0189] TR-GS 융합 단백질의 약동 역학을 평가하기 위하여, 마우스에 정맥 주사 후 72시간 까지의 TR-GS의 혈중 농도를 측정하였다.

[0190] 그 결과, 도 10에 개시된 바와 같이, 기존의 HEK 세포에서 발현된 TR-GS의 경우 5.6 시간의 반감기가 나타나는 반면, CHO 세포에서 발현한 TR-GS의 경우, 31.2시간의 반감기가 나타나는 것을 확인하였다(도 10).

[0192] 실험예 4. 마우스에서 융합 단백질의 중화약효 평가

[0193] 실험예 4-1. 마우스에서 중화약효 평가 실험 방법

[0194] 암컷, 8~10주령의 C57BL/6 마우스 (Orient BIO, Korea), 20~22g을 사용하였다. 자가항체인 K1-18은 6 $\mu\text{g/head}$ (0.3 mg/kg)를 복강투여 하였다. 그리고 30분 후 48 $\mu\text{g/head}$ (2.4 mg/kg) 또는 144 $\mu\text{g/head}$ (7.2 mg/kg)의 TR-GS를 정맥투여하였다. 이 때 비히클 처리는 식염수(PBS, Gibco, USA)를 투여하였으며, 혈액 내 total T4 양은 total T4 ELISA kit (Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 측정 하였다.

[0196] 실험예 4-2. K1-18 및 TR-GS의 중화약효 평가 확인

[0197] K1-18의 투여이후 혈액 내에서의 total T4 농도측정을 비히클과 비교해보면 2배이상 상승된 total T4 농도를 확인할 수 있었고, 그 농도는 8시간에서 최고점을 찍고 서서히 감소하는 것을 확인하였다(도 11a).

[0198] 한편, TR-GS (144 $\mu\text{g/head}$ (7.2 mg/kg))투여 후 8시간과 24시간에 측정한 total T4 농도를 보면 비히클 대비 변화가 없는 것을 확인하였다(도면 11b). 따라서, 마우스 혈액에서의 total T4 농도의 증가는 K1-18 (갑상선 자극 호르몬 수용기 자가항체)에 의한 것으로 확인되었으며, 융합단백질인 TR-GS에 의한 직접적인 영향이 없었다.

[0199] 또한, K1-18 투여후 8시간 시점에서 TR-GS에 의한 자가항체 중화약효를 total T4 측정으로 확인한 결과, 비히클 대비 K1-18 투여군은 2.5배 이상의 total T4를 증가시킨 반면(one-way ANOVA, $p < 0.01$), TR-GS는 2가지 농도에 서 total T4 양을 감소시켰는데, TR-GS, 144 $\mu\text{g}/\text{head}$ (7.2 mg/kg) 투여시 비히클과 유사한 수준으로 total T4 양을 감소시키는 것(one-way ANOVA, $p < 0.01$)을 확인하였다(도면 11c). 이로써 갑상선 자극 호르몬 수용기 자가 항체로 인한 갑상선 자극 영향을 융합단백질에 의해 제거 혹은 감소시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0201] 실험예 5. 융합 단백질을 이용한 갑상선 자극 호르몬 수용기 자가항체의 측정

[0202] 실험예 5-1. ELISA 측정 실험 방법

[0203] 갑상선 자극 호르몬 수용기 자가항체인 K1-18을 1 $\text{v g}/\text{mL}$ 로 1xPBS에서 희석(또는 M22 항체를 0.1 1 $\text{v g}/\text{mL}$ 로 희 석)하여, ELISA plate에 overnight으로 4°C에서 코팅시켰다. 1x PBST (wash buffer, 0.05% Tween20 in PBS buffer)로 4번 wash한 이후 Blocking buffer (3% BSA in 1xPBST buffer)로 2시간동안 25°C에서 블로킹한 다음, Wash buffer로 Elisa plate의 각 well을 다시 3번씩 세척하였다. 융합단백질을 8 $\text{v g}/\text{mL}$ 으로부터 2배로 serial 희석을 하여 최소 1 $\text{v g}/\text{mL}$ 이하까지 각각 준비하였으며, 이때 사용한 희석 버퍼는 1% BSA in PBS buffer를 사용 하였다. 준비한 각 샘플들을 각각의 ELISA well에 100 v L 씩 담고 2시간동안 K1-18(또는 M22)와 결합하도록 25°C에서 배양하였다. 이후 모든 well들은 wash buffer로 다시 3번씩 세척한 다음, 측정을 위하여 human IgG4-Fc-HRP (1/2000 희석버퍼)를 준비하여 각 well에 100 v L 씩 담고 1시간동안 25°C에서 배양하였다. Wash buffer 로 3번 세척한 다음, TMB용액(TMB detection reagent (Bio-Rad, 172-1066))을 준비하여 100 v L 씩 담고 8분동 안 25°C에서 배양하였다. 발색을 끝내기 위하여 STOP 용액 (1M H_2SO_4)를 100 v L 씩 넣어 모든 발색반응을 종료한 다음, ELISA plate를 측정기기 (Perkin Elmer Wallac Victor3 1420 multilabel counter)로 옮겨 450nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0204] 그 결과, 샘플 내 자가항체의 농도를 정량적으로 측정하여 자가항체의 농도 판별을 통해 질병진단 등에 이용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0206] 실험예 5-2. 환자 혈액과 융합단백질을 이용한 ELISA 측정 실험 방법

[0207] 환자 혈액을 K1-18(또는 M22)을 대신하여 ELISA에 코팅을 하고 융합단백질을 이용하여 환자혈액에 존재하는 갑 상선 자극 호르몬 수용기 자가항체의 총량을 측정할 수 있다. 또한 융합단백질에 직접 형광 소분자(예. Alexa fluor 450 등)를 결합하여, 두번째 사용된 측정용 항체 (human IgG4-Fc-HRP) 처리 없이 그 형광 소분자의 형광 을 측정하는 방법을 사용하여, 환자 혈액 내 자가항체의 총량을 측정하여 질병진단에 이용할 수 있음을 확인하 였다.

[0209] 실험예 5-3. Protein G/A bead를 이용한 측정 실험 방법

[0210] 융합단백질 TR-C-Cap의 경우 단백질의 C-말단에 원하는 tag (e.g. His-tag, flag tag)의 서열을 추가할 수 있 다. 이 tag이 결합할 수 있는 bead (e.g His-tag bead)를 이용하여 TR-C-Cap 융합 단백질을 결합시키고, 혈액 속의 갑상선 자극 호르몬 수용기 자가항체를 직접 결합하고 그 총량을 측정할 수 있다. Bead에 결합한 TR-C-Cap 이 자가항체의 Fab부분과 결합하게 되고 외부로 노출된 Fc부분을 인식할 수 있는 항체 (e.g. human IgG-Fc-HRP, human IgG-Fc-Alexa450)와 결합을 통하여 측정이 가능하다.

[0212] 실험예 6. 융합 단백질 단편 별 성능 비교

[0213] 공지된 TSHR 단편의 Fc 융합 단백질과 본 발명에서 개발한 TSHR 단편의 Fc 융합 단백질의 자가항체 중화효과를 Thyretain TSI assay kit를 사용하여 측정하였다.

[0214] 그 결과, 도 15의 (A)에 개시된 바와 같이 공지된 TSHR21-289 단백질과 유사한 TSHR21-288 단백질에 Fc를 융합 한 T20의 경우, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 자가항체 중화효과를 나타내지 못하는 반면, 본 발명에서 개발한 TSHR21-

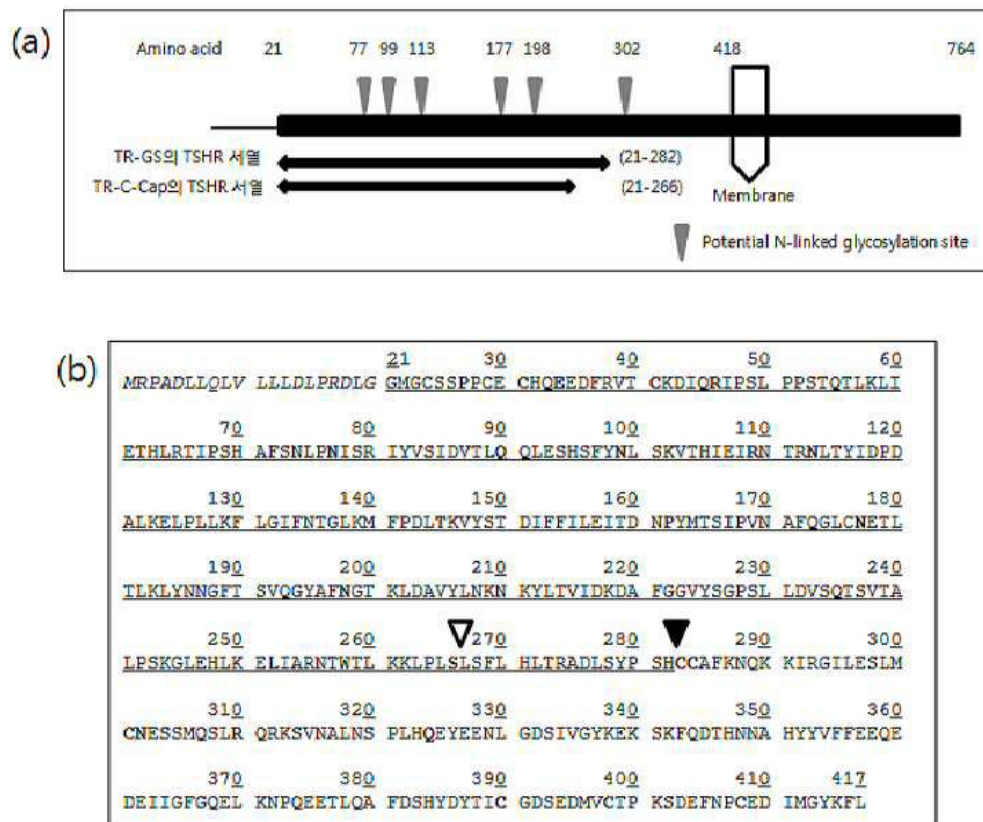
282 단편에 Fc를 융합한 TR-GS의 경우, 5 µg/ml에서도 획기적인 중화효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0215] 또한, 공지된 TSHR21-261과 유사한 TSHR1-260(T27), TSRH21-262(T51) 및 TSHR21-260(T60) 단백질 단편에 Fc를 연결한 융합 단백질의 경우에도, 자가항체 중화효과가 나타나지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 15 B)

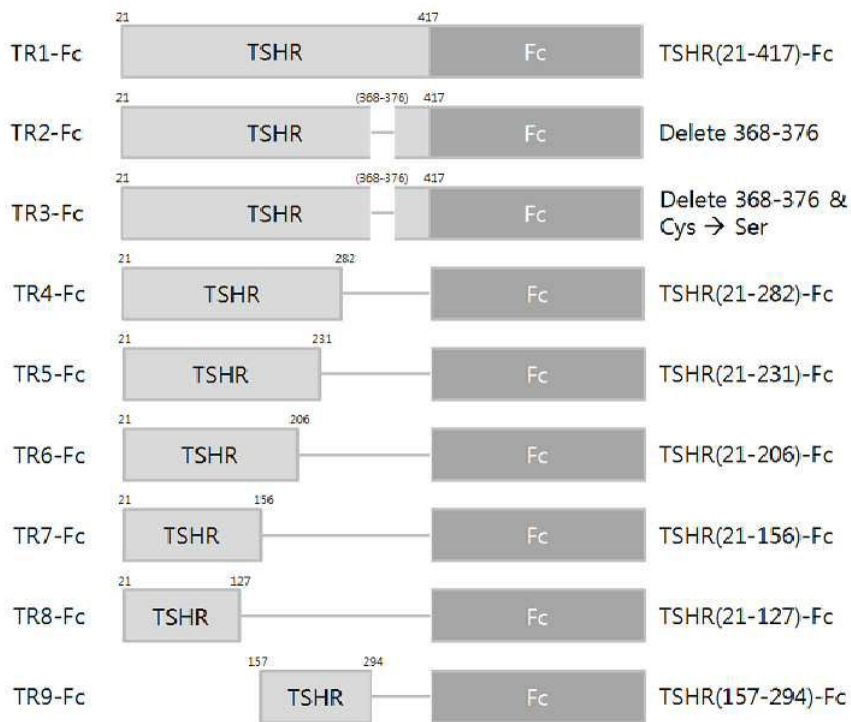
[0217] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



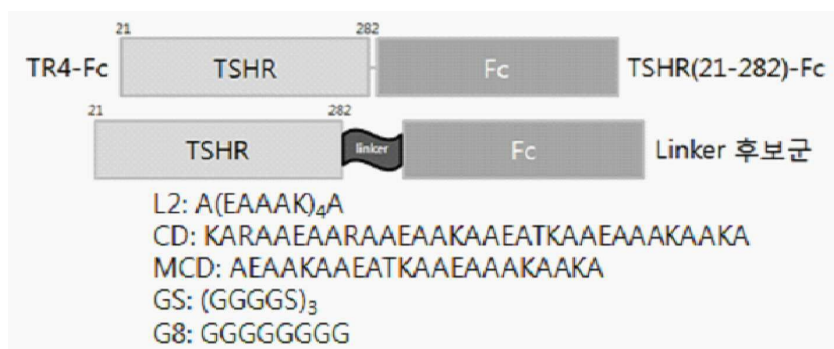
도면2



도면3

후보군	생산량 (mg/L)	TSH binding	M22 결합력 (IC50: $\mu\text{g/ml}$)	M22 중화 Cell assay (IC50: $\mu\text{g/ml}$)
TR1-Fc	1.6	++	>500	>100
TR3-Fc	1	-	423	56
TR4-Fc	5.1	-	5.6	20
TR8-Fc	17	-	NB	NT
TR9-Fc	11	-	NB	NT

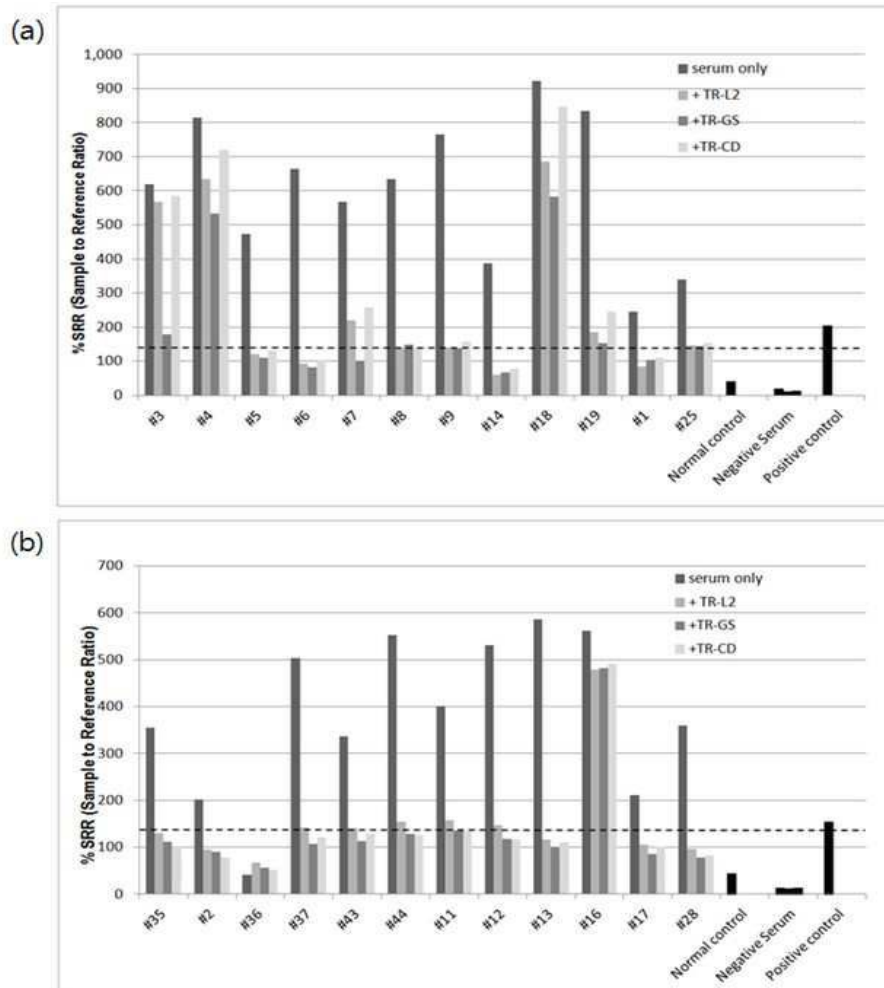
도면4



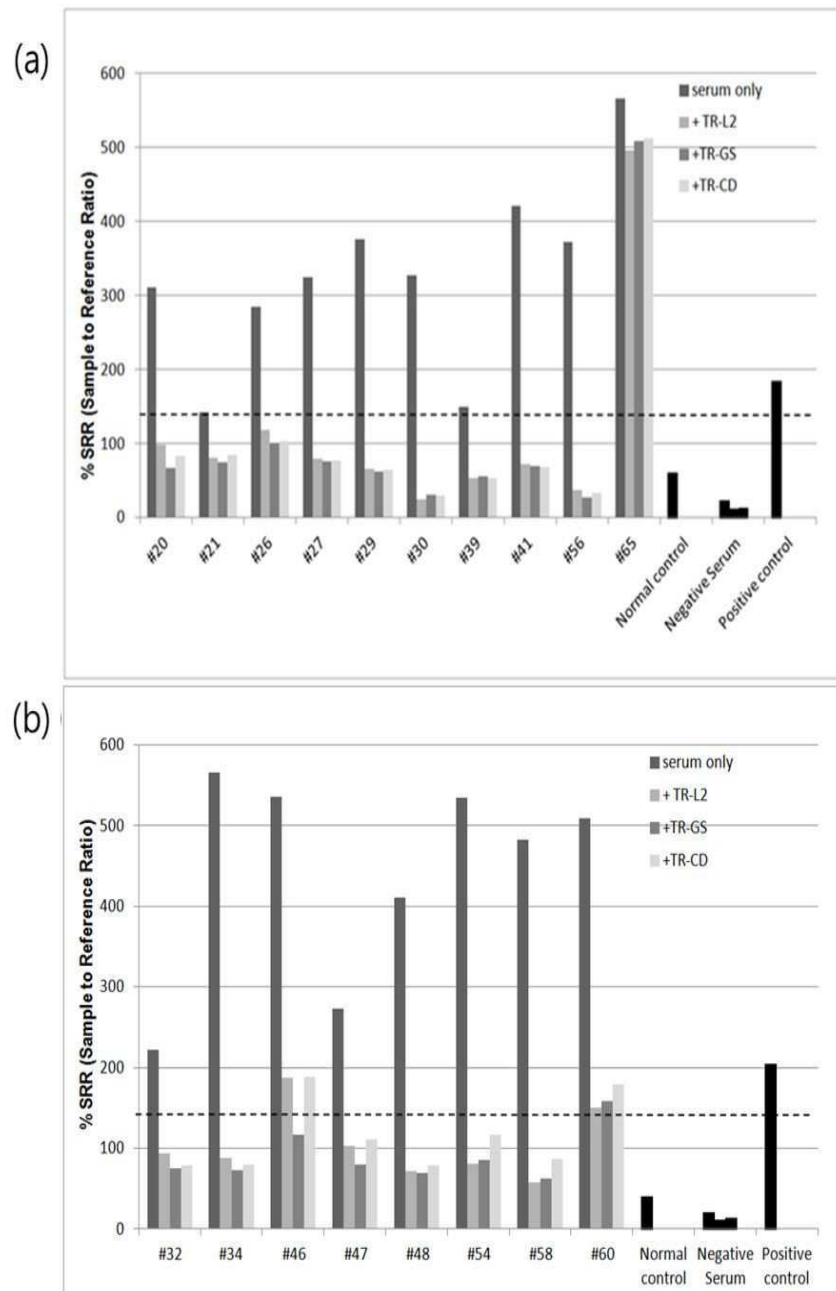
도면5

후보군	생산량 (mg/L)	TSH binding	M22결합력 (IC50: $\mu\text{g/ml}$)	M22 중화 Cell assay (IC50: $\mu\text{g/ml}$)
TR4-Fc	5.1	-	5.6	20
TR-L2	16	-	1.3	4.9
TR-CD	32	-	0.6	5~11
TR-MCD	17	-	1.3	6~10
TR-GS	28	-	0.6	3~6
TR-G8	16	-	12	38

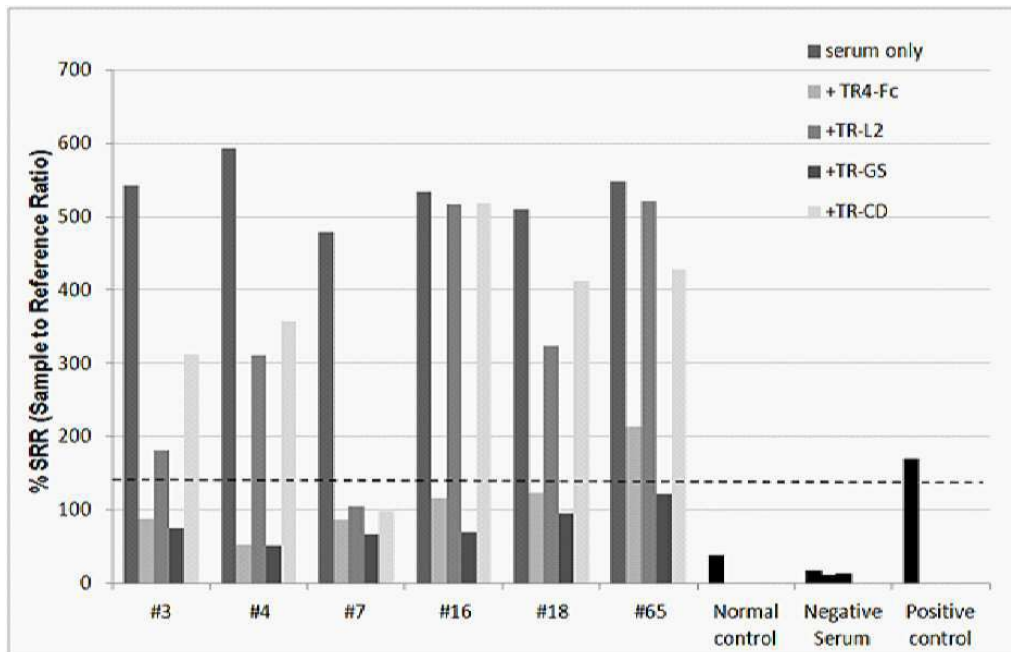
도면6



도면7



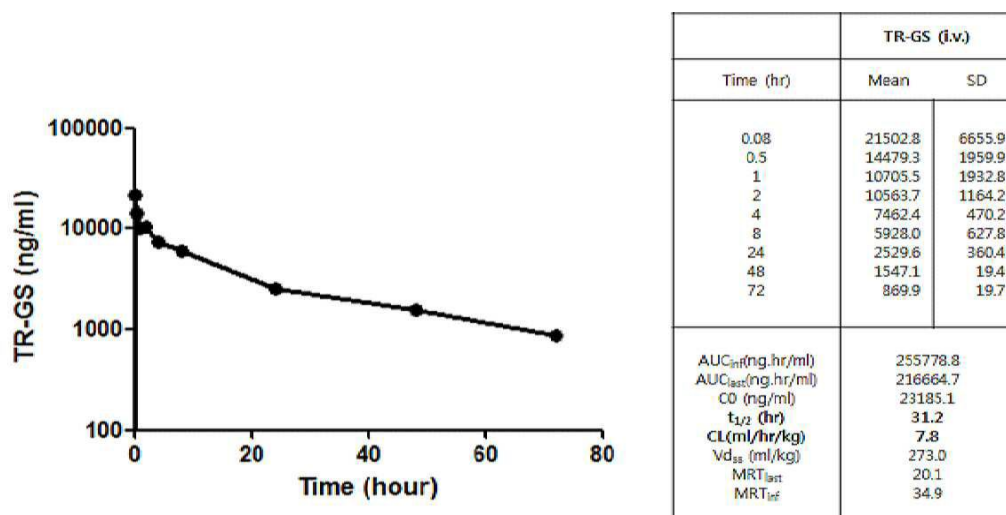
도면8



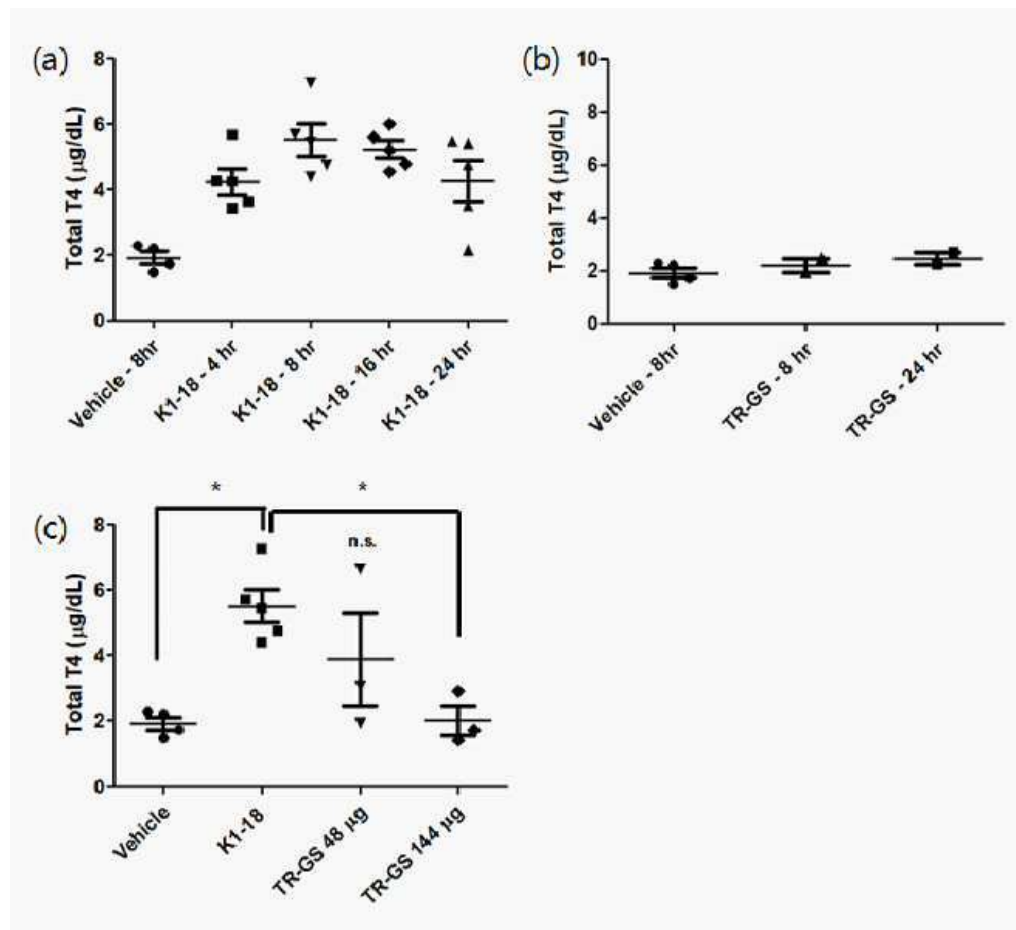
도면9

후보군	전체 혈액 (42종)		5 µg/mL 미 반응 혈액 (6종)	
	2.5 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL
TR4-Fc	19/34 (56%)	-	5/6 (83%)	6/6 (100%)
TR-L2	19/34 (56%)	28/42 (67%)	1/6 (17%)	6/6 (100%)
TR-GS	25/34 (74%)	34/42 (81%)	6/6 (100%)	6/6 (100%)
TR-CD	18/34 (53%)	31/42 (74%)	1/6 (17%)	6/6 (100%)

도면10



도면11



도면12

(a)

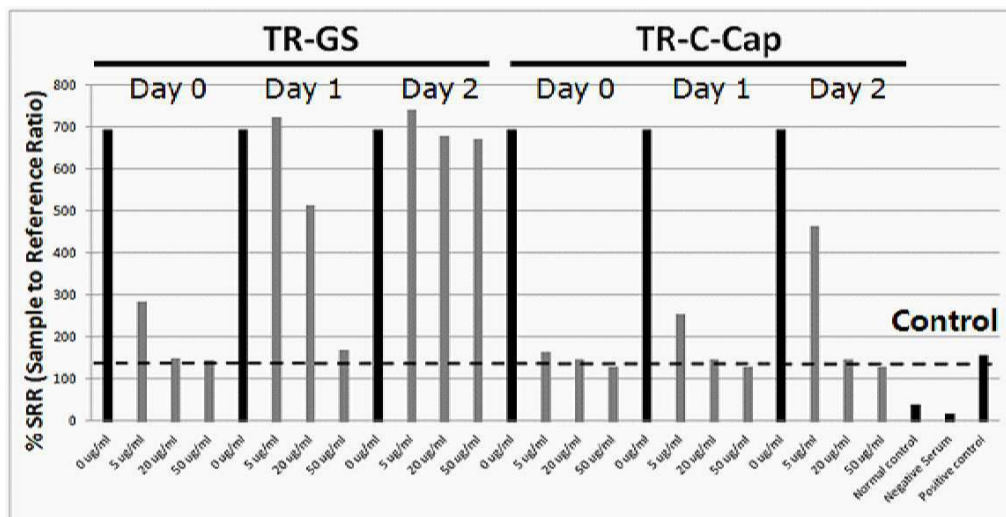
후보군	C-Cap Sequences	반응성
#1	<u>Y</u> RENVFKLLPQLTYL <u>D</u> GYDRDDKE	+
#2	<u>D</u> RENVFKLLPQLTYL <u>Y</u> GYDRDDKE	+
#3	YRENS <u>F</u> KLLPQLTYLDGYDRDDKE	+++
#4	YRE <u>S</u> VFKLLPQLTYLDGYDRDDKE	+
#5	YRENS <u>F</u> KLLPQLTYL <u>E</u> GYDRDDKE	+++
#6	YRE <u>S</u> VFKLLPQLTYL <u>E</u> GYDRDDKE	+

(b)

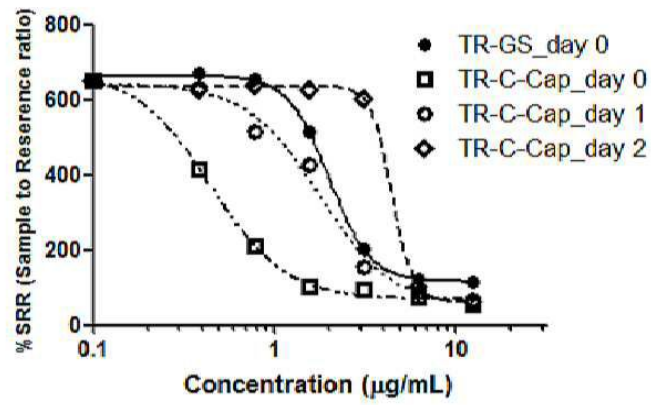
```

MRPADLLQLV LLLDLPRDLG  21      30      40      50      60
                        GMGCSSPFCE  CHQEEDFRVT  CKDIQRIFSL  PPSTQTLKLI
70      80      90      100     110     120
ETHLRTIPSH AFSNLPNISR  IYVSIDVTIQ  QLESHSFYNL  SKVTIEIRN  TRNLTYIDPD
130     140     150     160     170     180
ALKELPLLKF LGIFNTGLKM  FPDLTQVYST  DIFFILEITD  NPYMTSIFVN  AFQGLCNETL
190     200     210     220     230     240
TLKLYNNGFT SVQGYAFNGT  KLDAYVLNKN  KYLTVIDKDA  FGGVYSGESL  LDVSQTSVTA
250     260     270     280     290     300
LPSKGLEHLK ELIARNTWTL  KKLPLSYREN  SFKLLPQLTY  LDGYDRDDKE  GGGSGGGSHH
HHHHHH
  
```

도면13

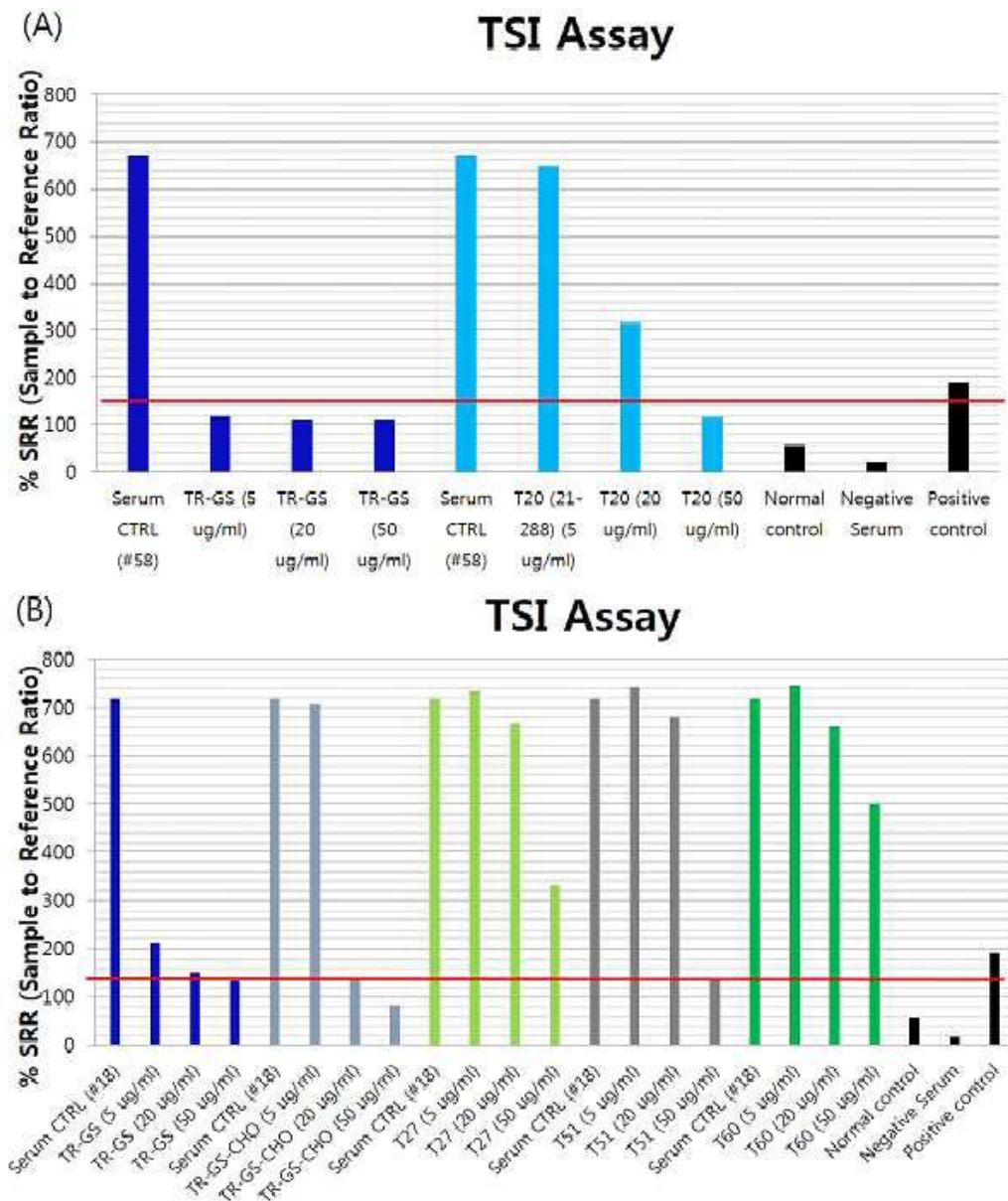


도면14



	TR-GS_day 0	TR-C-Cap_day 0	TR-C-Cap_day 1	TR-C-Cap_day2
IC50 (μg/mL)	2.015	0.4439	1.782	4.469
R ²	0.9993	0.9986	0.9877	0.9991

도면15



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> YUHAN CORPORATION

Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University

<120> Fusion Protein Comprising Thyrotropin Receptor Variants And Use Thereof

<130> P18-B086

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 764

<212> PRT

<213> TSHR full aa seq

<400> 1

Met Arg Pro Ala Asp Leu Leu Gln Leu Val Leu Leu Leu Asp Leu Pro

1 5 10 15

Arg Asp Leu Gly Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His

20 25 30

Gln Glu Glu Asp Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro

35 40 45

Ser Leu Pro Pro Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu

50 55 60

Arg Thr Ile Pro Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Phe Tyr Asn Leu Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg

100 105 110

Asn Leu Thr Tyr Ile Asp Pro Asp Ala Leu Lys Glu Leu Pro Leu Leu

115 120 125

Lys Phe Leu Gly Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu

130 135 140

Thr Lys Val Tyr Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp

145 150 155 160

Asn Pro Tyr Met Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys

165 170 175

Asn Glu Thr Leu Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val

180 185 190

Gln Gly Tyr Ala Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn

195 200 205

Lys Asn Lys Tyr Leu Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val

210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Pro Ser Lys Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn

245 250 255

Thr Trp Thr Leu Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu

260 265 270

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

275 280 285

Gln Lys Lys Ile Arg Gly Ile Leu Glu Ser Leu Met Cys Asn Glu Ser

290 295 300

Ser Met Gln Ser Leu Arg Gln Arg Lys Ser Val Asn Ala Leu Asn Ser

305 310 315 320

Pro Leu His Gln Glu Tyr Glu Glu Asn Leu Gly Asp Ser Ile Val Gly

325 330 335

Tyr Lys Glu Lys Ser Lys Phe Gln Asp Thr His Asn Asn Ala His Tyr

340 345 350

Tyr Val Phe Phe Glu Glu Gln Glu Asp Glu Ile Ile Gly Phe Gly Gln

355 360 365

Glu Leu Lys Asn Pro Gln Glu Glu Thr Leu Gln Ala Phe Asp Ser His

370 375 380

Tyr Asp Tyr Thr Ile Cys Gly Asp Ser Glu Asp Met Val Cys Thr Pro

385 390 395 400

Lys Ser Asp Glu Phe Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Lys Phe

405 410 415

Leu Arg Ile Val Val Trp Phe Val Ser Leu Leu Ala Leu Leu Gly Asn

420 425 430

Val Phe Val Leu Leu Ile Leu Leu Thr Ser His Tyr Lys Leu Asn Val

435 440 445

Pro Arg Phe Leu Met Cys Asn Leu Ala Phe Ala Asp Phe Cys Met Gly

450 455 460
 Met Tyr Leu Leu Leu Ile Ala Ser Val Asp Leu Tyr Thr His Ser Glu

 465 470 475 480
 Tyr Tyr Asn His Ala Ile Asp Trp Gln Thr Gly Pro Gly Cys Asn Thr

 485 490 495
 Ala Gly Phe Phe Thr Val Phe Ala Ser Glu Leu Ser Val Tyr Thr Leu

 500 505 510
 Thr Val Ile Thr Leu Glu Arg Trp Tyr Ala Ile Thr Phe Ala Met Arg

 515 520 525
 Leu Asp Arg Lys Ile Arg Leu Arg His Ala Cys Ala Ile Met Val Gly

 530 535 540
 Gly Trp Val Cys Cys Phe Leu Leu Ala Leu Leu Pro Leu Val Gly Ile
 545 550 555 560
 Ser Ser Tyr Ala Lys Val Ser Ile Cys Leu Pro Met Asp Thr Glu Thr

 565 570 575
 Pro Leu Ala Leu Ala Tyr Ile Val Phe Val Leu Thr Leu Asn Ile Val

 580 585 590
 Ala Phe Val Ile Val Cys Cys Cys Tyr Val Lys Ile Tyr Ile Thr Val

 595 600 605
 Arg Asn Pro Gln Tyr Asn Pro Gly Asp Lys Asp Thr Lys Ile Ala Lys
 610 615 620
 Arg Met Ala Val Leu Ile Phe Thr Asp Phe Ile Cys Met Ala Pro Ile
 625 630 635 640
 Ser Phe Tyr Ala Leu Ser Ala Ile Leu Asn Lys Pro Leu Ile Thr Val

 645 650 655
 Ser Asn Ser Lys Ile Leu Leu Val Leu Phe Tyr Pro Leu Asn Ser Cys

 660 665 670
 Ala Asn Pro Phe Leu Tyr Ala Ile Phe Thr Lys Ala Phe Gln Arg Asp

 675 680 685
 Val Phe Ile Leu Leu Ser Lys Phe Gly Ile Cys Lys Arg Gln Ala Gln

 690 695 700

Ala Tyr Arg Gly Gln Arg Val Pro Pro Lys Asn Ser Thr Asp Ile Gln
705 710 715 720
Val Gln Lys Val Thr His Asp Met Arg Gln Gly Leu His Asn Met Glu
725 730 735
Asp Val Tyr Glu Leu Ile Glu Asn Ser His Leu Thr Pro Lys Lys Gln
740 745 750
Gly Gln Ile Ser Glu Glu Tyr Met Gln Thr Val Leu
755 760
<210> 2
<211> 397
<212> PRT
<213> TSHR 21-417
<400> 2
Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp
1 5 10 15
Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro
20 25 30
Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro
35 40 45
Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser
50 55 60
Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu
65 70 75 80
Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr
85 90 95
Ile Asp Pro Asp Ala Leu Lys Glu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Gly
100 105 110
Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr
115 120 125
Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met
130 135 140

Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys

210 215 220

Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu

225 230 235 240

Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp

245 250 255

Leu Ser Tyr Pro Ser His Cys Cys Ala Phe Lys Asn Gln Lys Lys Ile

260 265 270

Arg Gly Ile Leu Glu Ser Leu Met Cys Asn Glu Ser Ser Met Gln Ser

275 280 285

Leu Arg Gln Arg Lys Ser Val Asn Ala Leu Asn Ser Pro Leu His Gln

290 295 300

Glu Tyr Glu Glu Asn Leu Gly Asp Ser Ile Val Gly Tyr Lys Glu Lys

305 310 315 320

Ser Lys Phe Gln Asp Thr His Asn Asn Ala His Tyr Tyr Val Phe Phe

325 330 335

Glu Glu Gln Glu Asp Glu Ile Ile Gly Phe Gly Gln Glu Leu Lys Asn

340 345 350

Pro Gln Glu Glu Thr Leu Gln Ala Phe Asp Ser His Tyr Asp Tyr Thr

355 360 365

Ile Cys Gly Asp Ser Glu Asp Met Val Cys Thr Pro Lys Ser Asp Glu

370 375 380

Phe Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly Tyr Lys Phe Leu

385 390 395

<210> 3

<211> 388

<212> PRT

<213> TSHR 21-417 Δ368-376

<400

> 3

Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp

1 5 10 15

Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro

20 25 30

Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro

35 40 45

Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser

50 55 60

Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu

65 70 75 80

Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr

115 120 125

Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met

130 135 140

Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr

180 185 190

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

195 200 205
 Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys
 210 215 220
 Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu
 225 230 235 240
 Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp
 245 250 255

 Leu Ser Tyr Pro Ser His Cys Cys Ala Phe Lys Asn Gln Lys Lys Ile
 260 265 270
 Arg Gly Ile Leu Glu Ser Leu Met Cys Asn Glu Ser Ser Met Gln Ser
 275 280 285
 Leu Arg Gln Arg Lys Ser Val Asn Ala Leu Asn Ser Pro Leu His Gln
 290 295 300
 Glu Tyr Glu Glu Asn Leu Gly Asp Ser Ile Val Gly Tyr Lys Glu Lys
 305 310 315 320

 Ser Lys Phe Gln Asp Thr His Asn Asn Ala His Tyr Tyr Val Phe Phe
 325 330 335
 Glu Glu Gln Glu Asp Glu Ile Ile Gly Phe Gly Thr Leu Gln Ala Phe
 340 345 350
 Asp Ser His Tyr Asp Tyr Thr Ile Cys Gly Asp Ser Glu Asp Met Val
 355 360 365
 Cys Thr Pro Lys Ser Asp Glu Phe Asn Pro Cys Glu Asp Ile Met Gly
 370 375 380

 Tyr Lys Phe Leu
 385
 <210> 4
 <211> 388
 <212> PRT
 <213> TSHR 21-417 Δ368-376 C391S/C398S/C408S
 <400> 4
 Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp
 1 5 10 15

Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro
 20 25 30
 Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro
 35 40 45

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

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

 Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr
 180 185 190
 Leu Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro
 195 200 205
 Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys
 210 215 220
 Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu
 225 230 235 240

 Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp
 245 250 255
 Leu Ser Tyr Pro Ser His Cys Cys Ala Phe Lys Asn Gln Lys Lys Ile

260 265 270
 Arg Gly Ile Leu Glu Ser Leu Met Cys Asn Glu Ser Ser Met Gln Ser
 275 280 285
 Leu Arg Gln Arg Lys Ser Val Asn Ala Leu Asn Ser Pro Leu His Gln
 290 295 300

 Glu Tyr Glu Glu Asn Leu Gly Asp Ser Ile Val Gly Tyr Lys Glu Lys
 305 310 315 320
 Ser Lys Phe Gln Asp Thr His Asn Asn Ala His Tyr Tyr Val Phe Phe
 325 330 335
 Glu Glu Gln Glu Asp Glu Ile Ile Gly Phe Gly Thr Leu Gln Ala Phe
 340 345 350
 Asp Ser His Tyr Asp Tyr Thr Ile Ser Gly Asp Ser Glu Asp Met Val
 355 360 365

 Ser Thr Pro Lys Ser Asp Glu Phe Asn Pro Ser Glu Asp Ile Met Gly
 370 375 380
 Tyr Lys Phe Leu
 385
 <210> 5
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> TSHR 21-282
 <400> 5
 Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp
 1 5 10 15
 Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro
 20 25 30
 Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro

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

Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr
85 90 95
Ile Asp Pro Asp Ala Leu Lys Glu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Gly
100 105 110
Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr Ser
115 120 125
Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met Thr
130 135 140
Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu Thr
145 150 155 160
Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala Phe
165 170 175
Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr Leu
180 185 190
Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro Ser
195 200 205
Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys Gly
210 215 220
Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu Lys
225 230 235 240
Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp Leu
245 250 255
Ser Tyr Pro Ser His
260
<210> 6
<211> 246
<212> PRT
<213> TSHR 21-266
<400> 6
Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp
1 5 10 15
Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro

[illegible]

<212> PRT

<213> TSHR 21-231

<400> 7

Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp

1 5 10 15

Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro

20 25 30

Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro

35 40 45

Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser

50 55 60

Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu

65 70 75 80

Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr

115 120 125

Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met

130 135 140

Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Ser Leu Leu

210

<210> 8

<211> 186

<212> PRT

<213> TSHR 21-206

<400> 8

Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp

1 5 10 15
Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro

20 25 30
Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro

35 40 45
Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser

50 55 60
Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu

65 70 75 80
Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr

85 90 95
Ile Asp Pro Asp Ala Leu Lys Glu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Gly

100 105 110
Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr

115 120 125
Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met

130 135 140
Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu

145 150 155 160
Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala

165 170 175
Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr

180 185

<210> 9

<211> 136

<212> PRT

<213> TSHR 21-156

<400> 9

Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp

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

65	70	75	80
Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr			
85	90	95	
Ile Asp Pro Asp Ala Leu Lys Glu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Gly			
100	105	110	
Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr			
115	120	125	
Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu			
130	135		

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> TSHR 21-127

<400> 10

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

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

<210> 11

<211> 138

<212> PRT

<213> TSHR 157-294

<400> 11

Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe

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

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

<210> 12

<211> 261

<212> PRT

<213> TSHR 21-282 D43A

<400> 12

Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp

1 5 10 15

Phe Arg Val Thr Cys Lys Ala Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro

20 25 30

Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro

35 40 45

Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser

50 55 60

Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu

65 70 75 80

Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr Ser

115 120 125

Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met Thr

130 135 140

Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu Lys

225 230 235 240
 Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp Leu

 245 250 255
 Ser Tyr Pro Ser His
 260
 <210> 13
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> TSHR 21-282 E61A
 <400> 13
 Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp
 1 5 10 15
 Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro
 20 25 30
 Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Ala Thr His Leu Arg Thr Ile Pro

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

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

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

 225 230 235 240
 Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp Leu
 245 250 255
 Ser Tyr Pro Ser His
 260
 <210> 14
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> TSHR 21-282 D43A/E61A
 <400> 14
 Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp
 1 5 10 15
 Phe Arg Val Thr Cys Lys Ala Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro

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

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

Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr Ser
115 120 125
Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met Thr
130 135 140
Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu Thr
145 150 155 160
Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala Phe
165 170 175
Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr Leu
180 185 190
Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro Ser
195 200 205
Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys Gly
210 215 220
Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu Lys
225 230 235 240
Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp Leu
245 250 255
Ser Tyr Pro Ser His
260
<210> 15
<211> 261
<212> PRT
<213> TSHR 21-282 K250A
<400> 15
Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp
1 5 10 15
Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro
20 25 30
Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro
35 40 45
Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser

50 55 60
 Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu

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

 130 135 140
 Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu Thr
 145 150 155 160
 Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala Phe
 165 170 175
 Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr Leu
 180 185 190
 Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro Ser

 195 200 205
 Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys Gly
 210 215 220
 Leu Glu His Leu Ala Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu Lys
 225 230 235 240
 Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp Leu
 245 250 255
 Ser Tyr Pro Ser His
 260

 <210
 > 16
 <211> 261
 <212> PRT
 <213> TSHR 21-282 D43A/E61A/K250A

<400> 16

Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp

1 5 10 15

Phe Arg Val Thr Cys Lys Ala Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro

20 25 30

Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Ala Thr His Leu Arg Thr Ile Pro

35 40 45

Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser

50 55 60

Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu

65 70 75 80

Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr Ser

115 120 125

Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met Thr

130 135 140

Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu Thr

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Leu Glu His Leu Ala Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu Lys

225 230 235 240

Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp Leu

245

250

255

Ser Tyr Pro Ser His

260

<210> 17

<211> 22

<212> PRT

<213> L2

<400> 17

Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys

1

5

10

15

Glu Ala Ala Ala Lys Ala

20

<210> 18

<211> 32

<212> PRT

<213> CD

<400> 18

Lys Ala Arg Ala Ala Glu Ala Ala Arg Ala Ala Glu Ala Ala Lys Ala

1

5

10

15

Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Ala

20

25

30

<210> 19

<211> 22

<212> PRT

<213> MCD

<400> 19

Ala Glu Ala Ala Lys Ala Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ala Glu Ala Ala

1

5

10

15

Ala Lys Ala Ala Lys Ala

20

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

<213> GS

<400> 20

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

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> G8

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 22

<211> 229

<212> PRT

<213> IgG4 Fc

<400> 22

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
1 5 10 15

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
20 25 30

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

35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
85 90 95

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

100 105 110

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

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

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

225

<210

> 23

<211> 24

<212> PRT

<213> #1

<400> 23

Tyr Arg Glu Asn Val Phe Lys Leu Leu Pro Gln Leu Thr Tyr Leu Asp
 1 5 10 15
 Gly Tyr Asp Arg Asp Asp Lys Glu
 20

<210> 24

<211> 24

<212> PRT

<213> #2

<400> 24

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

20

<210> 25

<211> 24

<212> PRT

<213> #3

<400> 25

Tyr Arg Glu Asn Ser Phe Lys Leu Leu Pro Gln Leu Thr Tyr Leu Asp

1 5 10 15

Gly Tyr Asp Arg Asp Asp Lys Glu

20

<210> 26

<211> 24

<212> PRT

<213> #4

<400> 26

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

1 5 10 15

Gly Tyr Asp Arg Asp Asp Lys Glu

20

<210> 27

<211> 24

<212> PRT

<213> #5

<400> 27

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

1 5 10 15

Gly Tyr Asp Arg Asp Asp Lys Glu

20

<210> 28

<211> 24

<212> PRT

<213> #6

<400> 28

Tyr Arg Glu Ser Val Phe Lys Leu Leu Pro Gln Leu Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15
 Gly Tyr Asp Arg Asp Asp Lys Glu
 20

 <210> 29
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> TSHR(21-282)-GS(Linker)-Fc
 <400> 29
 Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp
 1 5 10 15
 Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro
 20 25 30
 Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro
 35 40 45
 Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser

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

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

Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys

210 215 220

Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu

225 230 235 240

Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp

245 250 255

Leu Ser Tyr Pro Ser His Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

260 265 270

Gly Gly Gly Gly Ser Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

420 425 430
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

435 440 445
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

450 455 460
Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn

465 470 475 480
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

485 490 495
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

500 505

<210> 30

<211> 286

<212> PRT

<213> TSHR(21-266)-C-Cap-Linker-6xHis

<400> 30

Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp

1 5 10 15

Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro

20 25 30

Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro

35 40 45

Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser

50 55 60

Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu

65 70 75 80

Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr

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

180 185 190
 Leu Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro
 195 200 205
 Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys
 210 215 220
 Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu
 225 230 235 240
 Lys Lys Leu Pro Leu Ser Tyr Arg Glu Asn Ser Phe Lys Leu Leu Pro

245 250 255
 Gln Leu Thr Tyr Leu Asp Gly Tyr Asp Arg Asp Asp Lys Glu Gly Gly
 260 265 270
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser His His His His His His His His
 275 280 285

<210> 31

<211> 513

<212> PRT

<213> TSHR 21-282-L2-Fc (TR-L2)

<400> 31

Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp
 1 5 10 15

Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro
 20 25 30
 Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro
 35 40 45

Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser
50 55 60
Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu
65 70 75 80
Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr
85 90 95
Ile Asp Pro Asp Ala Leu Lys Glu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Gly
100 105 110
Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr
115 120 125
Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met
130 135 140
Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu
145 150 155 160
Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala
165 170 175
Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr
180 185 190
Leu Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro
195 200 205
Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys
210 215 220
Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu
225 230 235 240
Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp
245 250 255
Leu Ser Tyr Pro Ser His Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala
260 265 270
Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala Glu Ser Lys Tyr
275 280 285
Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro

290 295 300
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 305 310 315 320
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 325 330 335

 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 340 345 350
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 355 360 365
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 370 375 380
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 385 390 395 400

 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 405 410 415
 Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 420 425 430
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 435 440 445
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 450 455 460

 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys
 465 470 475 480
 Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 485 490 495
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 500 505 510
 Lys

<210> 32

<211> 523

<212> PRT

<213> TSHR 21-282-CD-Fc (TR-CD)

<400> 32

Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp

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

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

130 135 140
Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu
145 150 155 160
Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala
165 170 175
Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr
180 185 190
Leu Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro

195 200 205
Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys
210 215 220
Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu

225 230 235 240
 Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp
 245 250 255
 Leu Ser Tyr Pro Ser His Lys Ala Arg Ala Ala Glu Ala Ala Arg Ala

 260 265 270
 Ala Glu Ala Ala Lys Ala Ala Glu Ala Thr Lys Ala Ala Glu Ala Ala
 275 280 285
 Ala Lys Ala Ala Lys Ala Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
 290 295 300
 Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 305 310 315 320
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr

 325 330 335
 Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 340 345 350
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 355 360 365
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 370 375 380
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser

 385 390 395 400
 Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 405 410 415
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
 420 425 430
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 435 440 445
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

 450 455 460
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 465 470 475 480

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
 485 490 495
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 500 505 510
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 515 520

 <210> 33
 <211> 513
 <212> PRT
 <213> TSHR 21-282-MCD-Fc
 <400> 33

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

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

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

165 170 175
 Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr

 180 185 190
 Leu Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro
 195 200 205
 Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys
 210 215 220
 Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu
 225 230 235 240
 Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp

 245 250 255
 Leu Ser Tyr Pro Ser His Ala Glu Ala Ala Lys Ala Ala Glu Ala Thr
 260 265 270
 Lys Ala Ala Glu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Lys Ala Glu Ser Lys Tyr
 275 280 285
 Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro
 290 295 300
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser

 305 310 315 320
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp
 325 330 335
 Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 340 345 350
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 355 360 365
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

 370 375 380
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 385 390 395 400
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 405 410 415

Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

Lys

<210> 34

<211> 499

<212> PRT

<213> TSHR 21-282-G8-Fc (TR-G8)

<400> 34

Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp

1 5 10 15

Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro

20 25 30

Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro

35 40 45

Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser

50 55 60

Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu

65 70 75 80

Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr

85 90 95

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

100	105	110	
Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr			
115	120	125	
Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met			
130	135	140	
Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu			
145	150	155	160
Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala			
165	170	175	
Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr			
180	185	190	
Leu Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro			
195	200	205	
Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys			
210	215	220	
Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu			
225	230	235	240
Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp			
245	250	255	
Leu Ser Tyr Pro Ser His Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ser			
260	265	270	
Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly			
275	280	285	
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
290	295	300	
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln			
305	310	315	320
Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val			
325	330	335	
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr			
340	345	350	

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
355 360 365

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Leu Gly Lys

<210> 35

<211> 523

<212> PRT

<213> TSHR 21-266-C-Cap #1

<400> 35

Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp
1 5 10 15

Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro
20 25 30

Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro
35 40 45

Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser

50 55 60

Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu

65 70 75 80

Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr

115 120 125

Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met

130 135 140

Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys

210 215 220

Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu

225 230 235 240

Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp

245 250 255

Leu Ser Tyr Pro Ser His Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ser

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln

305 310 315 320
Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

325 330 335
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr

340 345 350
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

355 360 365
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile

370 375 380
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

385 390 395 400
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

405 410 415
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

420 425 430
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

435 440 445
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val

450 455 460
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

465 470 475 480
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

485 490 495
Leu Gly Lys Tyr Arg Glu Asn Val Phe Lys Leu Leu Pro Gln Leu Thr

500 505 510
Tyr Leu Asp Gly Tyr Asp Arg Asp Asp Lys Glu

515 520

<210> 36

<211> 523

<212> PRT

<213> TSHR 21-266-C-Cap #2

<400> 36

Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp

1 5 10 15

Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro

20 25 30

Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro

35 40 45

Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser

50 55 60

Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu

65 70 75 80

Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr

85 90 95

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

100 105 110

Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr

115 120 125

Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met

130 135 140

Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr

180 185 190

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

195 200 205

Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys

210 215 220

Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu

225 230 235 240

Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp

245 250 255

Leu Ser Tyr Pro Ser His Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ser

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

465 470 475 480
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

 485 490 495
 Leu Gly Lys Asp Arg Glu Asn Val Phe Lys Leu Leu Pro Gln Leu Thr
 500 505 510
 Tyr Leu Tyr Gly Tyr Asp Arg Asp Asp Lys Glu
 515 520
 <210> 37
 <211> 523
 <212> PRT
 <213> TSHR 21-266-C-Cap #3
 <400> 37
 Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp
 1 5 10 15
 Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro

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

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

145 150 155 160
 Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala
 165 170 175
 Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr
 180 185 190
 Leu Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro
 195 200 205
 Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys

 210 215 220
 Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu
 225 230 235 240
 Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp
 245 250 255
 Leu Ser Tyr Pro Ser His Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ser
 260 265 270
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly

 275 280 285
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 290 295 300
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
 305 310 315 320
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 325 330 335
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr

 340 345 350
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 370 375 380
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

485 490 495

Leu Gly Lys Tyr Arg Glu Asn Ser Phe Lys Leu Leu Pro Gln Leu Thr

500 505 510

Tyr Leu Asp Gly Tyr Asp Arg Asp Asp Lys Glu

515 520

<210> 38

<211> 523

<212> PRT

<213> TSHR 21-266-C-Cap #4

<400> 38

Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp

1 5 10 15

Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro

20 25 30

Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro

35 40 45

Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser

50 55 60

Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu

65 70 75 80

Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr
85 90 95
Ile Asp Pro Asp Ala Leu Lys Glu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Gly
100 105 110
Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr
115 120 125
Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met
130 135 140
Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu
145 150 155 160
Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala
165 170 175
Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr
180 185 190
Leu Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro
195 200 205
Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys
210 215 220
Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu
225 230 235 240
Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp
245 250 255
Leu Ser Tyr Pro Ser His Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ser
260 265 270
Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
275 280 285
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
290 295 300
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
305 310 315 320
Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

325 330 335
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 340 345 350
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
 370 375 380
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

 385 390 395 400
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 405 410 415
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 420 425 430
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 435 440 445
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val

 450 455 460
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 465 470 475 480
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495
 Leu Gly Lys Tyr Arg Glu Ser Val Phe Lys Leu Leu Pro Gln Leu Thr
 500 505 510
 Tyr Leu Asp Gly Tyr Asp Arg Asp Asp Lys Glu
 515 520

 <210> 39
 <211> 523
 <212> PRT
 <213> TSHR 21-266-C-Cap #6
 <400> 39
 Gly Met Gly Cys Ser Ser Pro Pro Cys Glu Cys His Gln Glu Glu Asp
 1 5 10 15

Phe Arg Val Thr Cys Lys Asp Ile Gln Arg Ile Pro Ser Leu Pro Pro
 20 25 30
 Ser Thr Gln Thr Leu Lys Leu Ile Glu Thr His Leu Arg Thr Ile Pro
 35 40 45
 Ser His Ala Phe Ser Asn Leu Pro Asn Ile Ser Arg Ile Tyr Val Ser
 50 55 60
 Ile Asp Val Thr Leu Gln Gln Leu Glu Ser His Ser Phe Tyr Asn Leu
 65 70 75 80
 Ser Lys Val Thr His Ile Glu Ile Arg Asn Thr Arg Asn Leu Thr Tyr
 85 90 95
 Ile Asp Pro Asp Ala Leu Lys Glu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Gly
 100 105 110
 Ile Phe Asn Thr Gly Leu Lys Met Phe Pro Asp Leu Thr Lys Val Tyr
 115 120 125
 Ser Thr Asp Ile Phe Phe Ile Leu Glu Ile Thr Asp Asn Pro Tyr Met
 130 135 140
 Thr Ser Ile Pro Val Asn Ala Phe Gln Gly Leu Cys Asn Glu Thr Leu
 145 150 155 160
 Thr Leu Lys Leu Tyr Asn Asn Gly Phe Thr Ser Val Gln Gly Tyr Ala
 165 170 175
 Phe Asn Gly Thr Lys Leu Asp Ala Val Tyr Leu Asn Lys Asn Lys Tyr
 180 185 190
 Leu Thr Val Ile Asp Lys Asp Ala Phe Gly Gly Val Tyr Ser Gly Pro
 195 200 205
 Ser Leu Leu Asp Val Ser Gln Thr Ser Val Thr Ala Leu Pro Ser Lys
 210 215 220
 Gly Leu Glu His Leu Lys Glu Leu Ile Ala Arg Asn Thr Trp Thr Leu
 225 230 235 240
 Lys Lys Leu Pro Leu Ser Leu Ser Phe Leu His Leu Thr Arg Ala Asp
 245 250 255
 Leu Ser Tyr Pro Ser His Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ser

260 265 270
 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
 275 280 285
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 290 295 300
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln

 305 310 315 320
 Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 325 330 335
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
 340 345 350
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile

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

 435 440 445
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
 450 455 460
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 465 470 475 480
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 485 490 495
 Leu Gly Lys Tyr Arg Glu Ser Val Phe Lys Leu Leu Pro Gln Leu Thr

 500 505 510

Tyr Leu Glu Gly Tyr Asp Arg Asp Asp Lys Glu
515 520