



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년09월12일
 (11) 등록번호 10-1307868
 (24) 등록일자 2013년09월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) **C07K 16/18** (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2006-7015944
 (22) 출원일자(국제) 2005년01월06일
 심사청구일자 2009년12월04일
 (85) 번역문제출일자 2006년08월07일
 (65) 공개번호 10-2007-0034455
 (43) 공개일자 2007년03월28일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2005/000546
 (87) 국제공개번호 WO 2005/068503
 국제공개일자 2005년07월28일
 (30) 우선권주장
 60/535,181 2004년01월07일 미국(US)
 60/576,417 2004년06월02일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 W01996008565 A2

(73) 특허권자
조마 테크놀로지 리미티드
 버뮤다 해밀턴 에이치엠11 처치 스트리트 2 클라
 렌돈 하우스
**노바티스 백신즈 앤드 다이아그노스틱스 인코포레
 이티드**
 미합중국 캘리포니아 94608-2916 엠머리빌 호튼
 스트리트 4560
 (72) 발명자
리우, 쉐
 미국 캘리포니아 94662 엠머리빌 피오 박스 8097
 카이론코포레이션 내
짐머맨, 드보라 리
 미국 캘리포니아 94662 엠머리빌 피오 박스 8097
 카이론코포레이션 내
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
송봉식, 정삼영

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 **M-C S F-특이적 단일클론 항체 및 그것의 사용**

(57) 요약

M-CSF-특이적 RX1-기재 또는 RX-1 유도된 항체가 이러한 항체를 함유하는 약학적 조성물, 약학적 조성물을 함유하는 키트, 및 뼈용해성 질환으로 고통받는 환자에서 뼈 손실을 예방 또는 치료하는 방법과 함께 제공된다.

(72) 발명자

하로웨, 그레고리 마틴

미국 캘리포니아 94662 엠머리빌 피오 박스 8097
카이론코퍼레이션 내

코트스, 커스톤

미국 캘리포니아 94662 엠머리빌 피오 박스 8097
카이론코퍼레이션 내

카바노, 윌리엄 미셸

미국 캘리포니아 94662 엠머리빌 피오 박스 8097
카이론코퍼레이션 내

룽, 리

미국 캘리포니아 94662 엠머리빌 피오 박스 8097
카이론코퍼레이션 내

칼데론-카시아, 마리아

미국 캘리포니아 94662 엠머리빌 피오 박스 8097
카이론코퍼레이션 내

호비츠, 아놀드 에이치.

미국 캘리포니아 94577 샌 리안드로 레이크뷰 드라
이브 2720

특허청구의 범위

청구항 1

인간화 항체로서,

상기 항체는 SEQ ID NO: 18, 21 및 24를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 SEQ ID NO: 29, 32 및 36을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,

상기 항체는 SEQ ID NO: 120 또는 SEQ ID NO: 121의 적어도 4개 연속 잔기를 포함하는 M-CSF의 에피토프와 결합하고,

상기 항체는 SEQ ID NO: 9의 M-CSF에 대한 친화성 K_d (해리 평형 상수)가 적어도 10^{-9} M인 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 2

제 1 항에 있어서, SEQ ID NO: 120 또는 SEQ ID NO: 121을 포함하는 M-CSF의 에피토프와 결합하는 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 단일클론 항체인 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 무손상 전장 항체인 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 5

제 1 항에 있어서, IgG 항체인 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 6

제 1 항에 있어서, $F(ab')_2$ 단편인 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 항체 서열의 불변 영역 및 인간 항체 서열의 하나 이상의 중쇄 및 경쇄 가변 프레임워크 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 인간 항체 서열은 특이적 인간 서열, 인간 컨센서스 서열, 특이적 인간 생식세포 서열, 또는 인간 컨센서스 생식세포 서열인 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 9

제 1 항에 있어서, IgG1 힌지 도메인, 또는 IgG1 힌지 및 CH2 도메인을 포함하는 중쇄를 함유하는 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 10

제 9 항에 있어서, IgG1 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 11

제 1 항에 있어서, IgG4 힌지 도메인, 또는 IgG4 힌지 및 CH2 도메인을 포함하는 중쇄를 함유하는 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 12

제 11 항에 있어서, IgG4 불변 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 13

제 1 항에 있어서, 중쇄 서열은 SEQ ID NO: 114, 116 또는 119 중 어느 하나로 구성된 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 14

제 1 항에 있어서, 중쇄 가변 영역 서열은 SEQ ID NO: 41 또는 43으로 구성된 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 15

제 1 항에 있어서, 경쇄 서열은 SEQ ID NO: 48 또는 136으로 구성된 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 16

제 1 항에 있어서, 제 13 항 또는 제 14 항에 제시된 중쇄 서열 및 제 15 항에 제시된 경쇄 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 인간화 항체.

청구항 17

제 1 항의 항체의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산.

청구항 18

제 17 항의 분리된 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 분리된 핵산이 조절성 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 20

제 17 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항의 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 21

제 1 항의 항체를 생산하는 방법으로서, 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 상기 숙주 세포는 상기 항체의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 분리된 핵산; 또는 상기 분리된 핵산을 포함하는 벡터;를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 숙주 세포 배양물로부터 항체를 회수하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 항체를 분비하는 하이브리도마 세포.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제
청구항 28
삭제
청구항 29
삭제
청구항 30
삭제
청구항 31
삭제
청구항 32
삭제
청구항 33
삭제
청구항 34
삭제
청구항 35
삭제
청구항 36
삭제
청구항 37
삭제
청구항 38
삭제
청구항 39
삭제
청구항 40
삭제
청구항 41
삭제
청구항 42
삭제
청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제
청구항 92
삭제
청구항 93
삭제
청구항 94
삭제
청구항 95
삭제
청구항 96
삭제
청구항 97
삭제
청구항 98
삭제
청구항 99
삭제
청구항 100
삭제
청구항 101
삭제
청구항 102
삭제
청구항 103
삭제
청구항 104
삭제
청구항 105
삭제
청구항 106
삭제
청구항 107

삭제
청구항 108
삭제
청구항 109
삭제
청구항 110
삭제
청구항 111
삭제
청구항 112
삭제
청구항 113
삭제
청구항 114
삭제
청구항 115
삭제
청구항 116
삭제
청구항 117
삭제
청구항 118
삭제
청구항 119
삭제
청구항 120
삭제
청구항 121
삭제
청구항 122
삭제
청구항 123

삭제
청구항 124
삭제
청구항 125
삭제
청구항 126
삭제
청구항 127
삭제
청구항 128
삭제
청구항 129
삭제
청구항 130
삭제
청구항 131
삭제
청구항 132
삭제
청구항 133
삭제
청구항 134
삭제
청구항 135
삭제
청구항 136
삭제
청구항 137
삭제
청구항 138
삭제
청구항 139

삭제
청구항 140
삭제
청구항 141
삭제
청구항 142
삭제
청구항 143
삭제
청구항 144
삭제
청구항 145
삭제
청구항 146
삭제
청구항 147
삭제
청구항 148
삭제
청구항 149
삭제
청구항 150
삭제
청구항 151
삭제
청구항 152
삭제
청구항 153
삭제
청구항 154
삭제
청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

명세서

[0001] 본 출원은 각각 전체가 본원에서 참고로서 인용되는, 2004년 1월 7일자로 출원된 미국 가 출원 제 60/535,181호, 및 2004년 6월 2일자로 출원된 미국 가 출원 제 60/576,417호의 우선권을 주장한다.

기술분야

[0002] 본 발명은 피험체에 M-CSF-특이적 항체를 투여함으로써 뼈용해, 암 전이 및 암 전이와 관련된 뼈 손실을 예방 및 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 암 전이는 암 환자에서 수술 후 또는 치료 후 재발의 주요한 원인이다. 치료를 발전시키기 위한 집중적인 노력에도 불구하고, 암 전이는 치료에 있어서 사실상 여전히 다루기 힘들다. 뼈는 각종 유형의 인간 암(예를 들어, 유방암, 폐암, 전립선암 및 감상선암)의 가장 일반적인 전이의 부위 중 하나이다. 뼈용해성 뼈 전이의 발생은 고치기 어려운 통증으로 인한 심각한 병적 상태(morbidity), 골절상을 매우 입기 쉬움, 신경 압박 및 고칼슘 혈증을 야기한다. 이들 임상적 문제의 중요성에도 불구하고, 암 전이와 관련된 뼈 손실에 대한 이용가능한 치료법이 거의 없다.

[0004] 파골세포는 뼈 재흡착을 조정한다. 파골세포는 혈액형성 세포로부터 분화하는 다핵성 세포이다. 파골세포는 불완전한 세포 분할 보다는, 골수 내 혈액형성 줄기 세포로부터 유도된 단핵 전구체의 융합에 의해 형성된다 (Chambers, Bone and Mineral Research, 6:1- 25,1989 ;Gothling et al., Clin Orthop Relat R. 120: 201-228,1976 ; Kahn et al., Nature 258: 325-327,1975, Suda et al., Endocr Rev 13: 66-80,1992 ; Walker, Science 180: 875,1973 ; Walker, Science 190: 785-787,1975 ; Walker, Science190 : 784-785,1975). 그들은 단핵구-대식세포 계통 세포와 함께 일반적인 줄기 세포를 공유한다(Ash et al., Nature 283: 669-670, 1980, Kerby et al., J. Bone Miner Res 7: 353-62,1992). 성숙한 다핵성 파골세포로의 파골세포 전구체의 분화는 호르몬 및 국소 자극을 포함하는 각종 인자를 필요로 하며(Athanasou et al., Bone Miner 3: 317-333,1988 ; Feldman et al., Endocrinology 107: 1137-1143,1980 ; Walker, Science 190: 784-785,1975 ; Zheng et al., Histochem J 23: 180-188,1991) 살아있는 뼈 및 뼈 세포는 파골세포 발전에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 나타났다(Hagenaars et al., Bone Miner 6: 179-189,1989). 또한, 파골세포 또는 골수 스트로마 세포는 파골세포 분화를 위해 필요하다. 파골세포 형성을 지지하는 이들 세포에 의해 생성된 인자들 중 하나는 대식세포-콜로니 자극 인자, M-CSF이다(Wiktor-Jedrzejczak et al., Proc Natl Acad Sci USA 87: 4828-4832,1990 ; Yoshida et al., Nature 345: 442-444,1990). NF- κ B 리간드에 대한 수용체 활성제(RANKL, 또한 TRANCE, ODF 및 OPGL라

고도 알려짐)는 골아세포/스트로마 세포가 골아세포 및 파골세포 전구체(Lacey et al., Cell 93: 165-176,1998 ; Tsuda et al., Biochem Biophys Res Co 234: 137-142,1997 ; Wong et al., J Exp Med 186: 2075-2080,1997 ; Wong et al., J Biol. Chem 272: 25190-25194,1997 ; Yasuda et al., Endocrinology 139: 1329-1337,1998 ; Yasuda et al., Proc Natl Acad Sci US 95: 3597-3602,1998)에 위치한 수용체, RANK(TRANCER)를 통해 파골세포 형성 및 흡수를 자극하는 것을 통하는 다른 신호이다(Suda et al., Endocr Rev 13: 66-80,1992). 또한, 골아세포는 오스테오프로테게린(OPG, OCIF라고도 알려짐)이라 불리는 파골세포 형성을 강력하게 억제하는 단백질을 분비하며, 이것은 RANKL에 대한 유인 수용체로서 작용하여 RANK 및 RANKL을 통한 파골세포 및 골아세포 간 양의 신호를 억제한다.

[0005] 파골세포는 무기 및 유기 뼈 바탕질 모두의 용해를 야기한다(Blair et al., J Cell Biol 102: 1164-1172, 1986). 파골세포는 특이화된 막 부위 및 예를 들어, 타르타르 저항 산 포스파타제(TRAP) (Anderson et al. 1979), 탄산 탈수 효소II(Vaananen et al., Histochemistry 78: 481-485,1983), 칼시토닌 수용체 (Warshafsky et al., Bone 6: 179-185, 1985) 및 비트로넥틴 수용체(Davies et al., J Cell Biol 109: 1817-1826,1989)와 같은 몇 가지 세포막 및 세포질 마커를 갖는 독특한 극성화 형태를 발현하는 말단 분화 세포를 나타낸다. 다핵화 파골세포는 일반적으로 10개 미만의 핵을 함유하지만, 그들은 직경이 10 내지 100 μm 인 최대 100개의 핵을 함유할 수도 있다(Gothling et al., Clin Orthop Relat R 120: 201-228,1976). 이것은 그들이 광학 현미경에 의해 확인하기에 비교적 용이하게 한다. 그들은 활성 상태일 경우 매우 공포형성되며, 또한 높은 대사율의 지표인 많은 미토콘드리아를 함유한다(Mundy, in Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism, pages 18-22, 1990). 파골세포는 뼈 용해성 뼈 전이에서 중요한 역할을 하기 때문에, 파골세포 자극 및 작용을 막기 위한 새로운 제제 및 방법을 위한 기술이 필요하다.

[0006] 따라서, 뼈용해성 뼈 전이를 포함하는 골용해 또는 암 전이를 예방 또는 치료하기 위한 새로운 제제 및 방법을 확인하기 위한 기술이 여전히 필요하다.

발명의 상세한 설명

[0007] 발명의 개요

[0008] 본 발명의 물질 및 방법은 전술되고 당업계에서 기타 관련한 요구들을 실현한다. 본 발명의 한 구체예에서, 비-뮤린 단일클론 항체가 각각 도 4, 14, 및 15에서 나타낸 아미노산 서열을 갖는 뮤린 단일 클론 항체 RX1, MC1, 또는 MC3 중 임의의 하나와 동일한 M-CSF의 에피토프에 특이적으로 결합하는 작용상의 단편을 포함하여 제공된다. 관련 구체예에서, 전술한 항체는 항체가 제공되며, 항체는 폴리클론 항체; Human Engineered™ 항체를 포함하는 단일클론 항체; 인간화 항체; 인간 항체; 키메라 항체; Fab, F(ab')₂; Sc Fv 또는 SCA 항체 단편; 디어바디(diabody); 선형 항체; 또는 이들 항체 중 임의의 하나의 뮤테인(mutain)으로 이루어진 균으로부터 선택되며, 바람직하게 그것은 적어도 10⁻⁷, 10⁻⁸ 또는 10⁻⁹ 이상의 결합 친화성을 보유한다. 또한, 75% 이상까지 M-CSF에 결합하기 위해 도 4에서 나타낸 아미노산 서열을 갖는 단일 클론 항체 RX1, MC1, 및/또는 MC3와 경쟁하는 작용상의 단편을 포함하는 비-뮤린 단일클론 항체가 고려된다.

[0009] 다른 구체예에서, 본 발명은 작용상의 단편을 포함하는 비-뮤린 단일클론 항체를 제공하며, 상기 비-뮤린 단일클론 항체 또는 그것의 작용상 단편은 도 12의 아미노산 65-73 또는 138-144의 적어도 4, 5, 6, 7 또는 8개의 인접 잔기를 포함하는 M-CSF의 에피토프에 결합한다(5H4 또는 MC3에 의해 인지되는 M-CSF 에피토프에 대응함).

[0010] 또 다른 구체예에서, 도 12의 아미노산 98-105를 포함하는 M-CSF의 에피토프에 결합한다. 관련 구체예에서, 전술한 항체는 도 4A의 CDR3을 포함하여 제공된다. 다른 구체예에서, 항체는 도 4A에서 나타낸 뮤린 항체 RX1의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 CDR을 포함하여 제공된다. 뮤린 항체 RX1의 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5 CDR을 포함하는 이러한 항체는 도 16A-B에서 나타낸 항체 5H4의 6 CDR 중 임의의 것의 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5 CDR을 포함할 수도 있다. 택일적으로, 뮤린 항체 RX1의 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5 CDR을 포함하는 항체는 도 16A-B에서 나타낸 항체 MC1의 6 CDR 중 임의의 것의 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5 CDR을 포함할 수도 있다. 또 다른 대안에서, 전술한 항체는 또한 도 16A-B에서 나타낸 항체 MC3의 6 CDR 중 임의의 것의 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5 CDR을 포함할 수도 있다. 관련 구체예에서, 뮤린 항체 RX1의 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5 CDR을 포함하는 항체는 도 16A-B에서 제공되는 공통 CDR의 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5 CDR을 포함할 수도 있다. 여전히 다른 관련 구체예에서, 전술한 항체에서 공통 CDR의 하나 이상의 잔기는 항체 뮤린 RX1, 5H4, MC1 또는 MC3의 CDR 중 임의의 것의 대응 잔기로 치환된다. 비록 항체의 하나 이상의 아미노산이 예를 들어, CDR 내 보존적 치환, 및/또는 낮

고 중간 정도의 위험 잔기 내 비-보존적 변화에 의해 돌연변이되지만 원하는 결합 친화성은 보유될 수도 있다.

[0011] 본 발명의 다른 구체예에서, 전술한 항체의 변이체들은 도 4A, 13, 14, 또는 15에서 나타낸 아미노산 서열에 적어도 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일한 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하여 제공된다. 관련 구체예에서, 항체는 도 4A, 13, 14, 또는 15에서 나타낸 아미노산 서열에 대하여 적어도 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일한 가변성 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0012] 또 다른 구체예에서, 항체는 인간 항체 서열의 불변 영역 및 하나 이상의 중쇄 및 경쇄 가변 틀구조 부위를 포함한다. 관련 구체예에서, 항체는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 변형 또는 비변형된 불변 영역을 포함한다. 바람직한 구체예에서, 불변 영역은 인간 IgG1 또는 IgG4이며, 이것은 어떤 특성을 증가 또는 감소시키기 위해 선택적으로 변형될 수도 있다. IgG1의 경우에, 불변 영역, 특히 경첩 또는 CH2 부위에서의 변형은 ADCC 및/또는 CDC 활성을 포함하여, 작동자 기능을 증가 또는 감소시킬 수도 있다. 다른 구체예에서, IgG2 불변 영역은 항체-항원 응집 형성을 감소시키도록 변형된다. IgG4의 경우에, 불변 영역, 특히 경첩 부위에 대한 변형은 반-항체의 형성을 감소시킬 수도 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 전술한 항체는 인간 일차 서열, 인간 생식 계열 서열, 인간 공통 생식 계열 서열의 일부, 또는 하기의 인간 항체 서열 중 임의의 것으로부터 유도되거나, 이를 기재로하거나, 이를 함유한다: Kabat, NCBI Ig Blast, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi>, Kabat Database <http://www.bioinf.org.uk/abs/seqtest.html>, FTP site for Kabat Release 5.0 (1992) <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat/Rel5.0/>, ImMunoGeneTics database (Montpellier France) <http://imgt.cunsc.fr:8104/>, V-Base <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/LIST.php?menu=901>, Zurich University <http://www.unizh.ch/~antibody/Sequences/index.html>, The Therapeutic Antibody Human Homology Project (TAHHP) <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html>, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Domains <http://how.to/AnalyseAntibodies/>, Humanization by design <http://people.crvst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>, Antibody Resources <http://www.antibodyresource.com/educational.html>, Antibody Engineering (by TT Wu), Humana Press.

[0014] 본 발명의 바람직한 양태에서, 전술한 항체는 Human Engineered™ 항체이다. 예를 들어, Human Engineered™ 항체 서열은 도 23-24에서 나타낸 서열 중 임의의 것이다. 다른 Human Engineered™ 항체 또는 그것의 변이체가 고려된다.

[0015] 예를 들어, 한 구체예에서, 전술한 RX1-기체 항체가 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열 X₁VX₂LX₃EX₄GX₅AX₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃LX₁₄LX₁₅CX₁₆VX₁₇DYSITSDYAWNWX₁₈QX₁₉X₂₀X₂₁X₂₂X₂₃LX₂₄WMGYISYSGSTX₂₅NX₂₆X₂₇LX₂₈X₂₉X₃₀IX₃₁IX₃₂RX₃₃X₃₄X₃₅X₃₆X₃₇X₃₈FX₃₉LX₄₀LX₄₁X₄₂VX₄₃X₄₄X₄₅DX₄₆AX₄₇YYCASFDYAHAMDYWG₄₈GTX₄₉VX₅₀VX₅₁X₅₂(SEQ ID NO: 124)을 포함하며, X는 임의의 아미노산이다. 관련 구체예에서, 항체가 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열 DVX₁LX₂EX₃GPX₄X₅VX₆PX₇X₈X₉LX₁₀LX₁₁CX₁₂VTDYSITSDYAWNWRQX₁₃PX₁₄X₁₅KLEWMGYISYSGSTSYNPSLX₁₆RIX₁₇IX₁₈RX₁₉TX₂₀X₂₁NX₂₂FX₂₃LX₂₄LX₂₅X₂₆VX₂₇X₂₈X₂₉DX₃₀ATYYCASFDYAHAMDYWG₃₁GTX₃₂VX₃₃VX₃₄X₃₅(SEQ ID NO: 125)을 포함하며, X는 임의의 아미노산이다.

[0016] 본 발명의 여전히 다른 구체예에서, 전술한 항체가 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열 X₁VQLQESGPGLVKPSQX₂LSLTCTVX₃DYSITSDYAWNWRQFPX₄X₅LEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIIX₆IX₇RDTSKNQFX₈LQLNSVTX₉X₁₀DTAX₁₁YCASFDYAHAMDYWGQTX₁₂VTVSS (SEQ ID NO: 126)을 포함하며, X는 아미노산이다. 관련 구체예에서, 항체가 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열 DVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVTDYSITSDYAWNWRQFPX₂KLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIIX₃IX₄RDTSKNQFX₅LQLNSVTX₆X₇DTATYYCASFDYAHAMDYWGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 127)을 포함하며, X는 아미노산이다. 또 다른 구체예에서, 항체가 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열 DVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVTDYSITSDYAWNWRQFPX₂KLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 41)을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 항체가 제공되며, 여기서 중쇄 가변 영역은 아미노산 서열 QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSDYSITSDYAWNWRQFPX₂KLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIITISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMDYWGQTTVTVSS (SEQ ID NO: 43)을 포함한다.

[0017] 본 발명의 다른 구체예에서, 전술한 항체가 제공되며 여기서 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열 X₁IX₂LX₃QX₄X₅X₆X₇X₈X₉VX₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄VX₁₅FX₁₆CX₁₇AX₁₈QSIGTSHWYX₁₉QX₂₀X₂₁X₂₂X₂₃X₂₄PX₂₅LLIKYASEX₂₆X₂₇X₂₈X₂₉IX₃₀X₃₁X₃₂FX₃₃GX₃₄GX₃₅GX₃₆X₃₇FX₃₈LX₃₉IX₄₀X₄₁V₄₂X₄₃X₄₄DX₄₅ADYYCQINSWPTTFGX₄₆GTX₄₇LX₄₈X₄₉X₅₀X₅₁X₅₂ (SEQ ID NO: 128)을 포함하며, X는 임의의 아미노산이다. 관련 구체예에서, 항체가 제공되며, 여기서 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열 X₁IX₂LX₃QX₄PX₅X₆LX₇VX₈PX₉X₁₀X₁₁VX₁₂FX₁₃CX₁₄ASQSIGTSHWYQX₁₅TX₁₆X₁₇SPRLLIKYASEX₁₈ISX₁₉IPX₂₀PFX₂₁GX₂₂GX₂₃GX₂₄X₂₅FX₂₆LX₂₇IX₂₈X₂₉VX₃₀X₃₁X₃₂DX₃₃ADYYCQINSWPTTFGX₃₄GTX₃₅LX₃₆X₃₇X₃₈X₃₉X₄₀ (SEQ ID NO: 129)을 포함하며, X는 임의의 아미노산이다. 또 다른 구체예에서, 항체가 제공되며, 여기서 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열 X₁IX₂LX₃QX₄LSVSPGERVX₅FSCRASQSIGTSHWYQX₆TX₇X₈X₉PRLLIKYASEX₁₀X₁₁X₁₂GIPX₁₃RFSGSGSGTDFTLX₁₄IX₁₅X₁₆VESEDX₁₇ADYYCQINSWPTTFGX₁₈GTKLEIKRX₁₉(SEQ ID NO: 130)을 포함하며, X는 아미노산이다.

[0018] 본 발명의 다른 구체예에서, 전술한 항원이 제공되며, 여기서 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열 X₁IX₂LX₃QX₄LSVSPGERVX₅FSCRASQSIGTSHWYQX₆TX₇X₈SPRLLIKYASEX₉ISGIPX₁₀RFSGSGSGTDFTLX₁₁IX₁₂X₁₃VESEDX₁₄ADYYCQINSWPTTFGX₁₅GTKLEIKRX₁₆ (SEQ ID NO: 131)을 포함하며, X는 임의의 아미노산이다. 관련 구체예에서, 항체가 제공되며, 여기서 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열 X₁IX₂LX₃QX₄LSVSPGERVX₅FSCRASQSIGTSHWYQX₆TX₇X₈X₉PRLLIKYASESISGIPX₁₀RFSGSGSGTDFTLX₁₁IX₁₂X₁₃VESEDX₁₄ADYYCQINSWPTTFGX₁₅GTKLEIKRX₁₆ (SEQ ID NO: 132)을 포함하며, 여기서 X는 임의의 아미노산이다. 관련 구체예에서, 항체가 제공되며 여기서 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열 EIVLTQSPGTLVSPGERVTFSCRASQSIGTSHWYQQTGQAPRLLIKYASESISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQINSWPTTFGQGT KLEIKRT (SEQ ID NO: 45)을 포함한다.

[0019] 본 발명의 여전히 다른 구체예에서, 전술한 항원이 제공되며, 여기서 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열 EIVLTQSPGTLVSPGERVTFSCRASQSIGTSHWYQQTGQAPRLLIKYASERATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQINSWPTTFGQGT KLEIKRT (SEQ ID NO: 47)을 포함한다. 다른 구체예에서, 항체가 제공되며, 여기서 경쇄 가변 영역은 아미노산 서열 EIVLTQSPGTLVSPGERVTFSCRASQSIGTSHWYQQTGQSPRLLIKYASERISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYYCQINSWPTTFGQGT KLEIKRT (SEQ ID NO: 48)을 포함한다.

[0020] 본 발명의 다른 구체예에서, 전술한 항체가 제공되며, 여기서 적어도 하나의 X는 도 4A에서 나타낸 아미노산 서열 내 대응하는 아미노산이다. 관련 구체예에서, 항체가 제공되며, 여기서 적어도 하나의 X는 도 4A에서 나타낸 아미노산 서열 내 대응 아미노산의 보존적 치환(표 1에 따름)이다. 여전히 다른 관련 구체예에서, 항체가 제공되며, 여기서 적어도 하나의 X는 인간 항체 서열 내 대응하는 아미노산이다.

[0021] 전술한 Human EngineeredTM 항체는 인간 항체 일차 서열, 인간 생식 계열 서열, 인간 공통 생식 계열 서열의 일부, 또는 하기의 인간 항체 서열 중 임의의 것으로부터 유도되거나, 이를 기재하거나, 또는 함유한다: Kabat, NCBI Ig Blast, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/showGermline.cgi>, Kabat Database <http://www.bioinf.org.uk/abs/seqtest.html>, FTP site for Kabat Release 5.0 (1992) <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat/Re15.0/>, ImMunoGeneTics database (Montpellier France) <http://imgt.cnusc.fr:8104/>, V-Base <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/LIST.php?menu=901>, Zurich University <http://www.unizh.ch/~antibody/Sequences/index.html>, The Therapeutic Antibody Human Homology Project (TAHHP) <http://www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html>, Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Domains <http://how.to/AnalyseAntibodies/>, Humanization by design <http://people.crvst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>, Antibody Resources <http://www.antibodyresource.com/educational.html>, Antibody Engineering (by TT Wu), Humana Press.

[0022] 본 발명의 다른 구체예에서, 전술한 항원이 제공되며, 여기서 Human EngineeredTM 항체 서열은 도 24 또는 29-30에서 나타낸 서열 중 하나이다. 다른 구체예에서, 항체는 도 19B에서 나타낸 중쇄 아미노산 서열 중 하나와 적어도 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일한 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 항체는 도 20B-22B 중 임의의 것에서 나타낸 경쇄 아미노산 서열 중 하나와 적어도 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일한 가변성 경쇄 아

미노산 서열을 포함한다.

[0023] 또 다른 구체예에서, 도 24C-24E 중 하나에서 나타낸 서열을 갖는 5H4, MC1 또는 MC3 항체와 같은 전술한 항체는 낮고, 중간 정도이고 높은 위험 구간간기를 확인하기 위해 도 24C-24E에서 나타낸 Kabat 넘버링을 사용하여, Studnicka 등의 미국 특허 제 5,766,886호 및 본원의 실시예 4A에서 나타낸 방법에 따라 Human Engineered™ 된다. 관련 구체예에서, 전술한 항원이 제공되며, 여기서 중쇄 또는 경쇄 또는 이들 모두가 변형되어 필요한 경우에, 인간 기준 면역글로불린 서열과 동일한 잔기가 된다. 유사하게, 본 발명의 다른 구체예는 전술한 항체를 제공하며, 여기서 중쇄 또는 경쇄 또는 이들 모두의 낮음 + 중간 위험 잔기 모두가 변형되어, 필요한 경우, 인간 기준 면역글로불린 서열과 동일한 잔기가 된다. 모든 낮은 위험 잔기가 변형된 중쇄는 모든 낮고 중간 위험 잔기가 변형된 경쇄와 합해질 수도 있으며, 그 반대일 수도 있다. 이와 유사하게, 전술한 Human Engineered™ 경쇄 또는 중쇄는 인간 또는 키메라 항체의 경쇄 또는 중쇄와 합해질 수도 있다.

[0024] 여전히 다른 구체예에서, 항체는 Studnicka 방법에 따라서 바로 위에서 설명된 Human Engineered™ 중쇄 아미노산 서열 중 하나와 적어도 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일한 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 항체는 Studnicka 방법에 따라서 바로 위에서 설명된 Human Engineered™ 경쇄 아미노산 서열 중 하나와 적어도 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일한 가변성 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0025] 또 다른 구체예에서, 항체는 상기 제시한 바와 같은 중쇄 및 상기 제시한 바와 같은 경쇄를 포함하여 제공된다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 전술한 항체는 적어도 10[-7]의 친화력 Kd를 갖는다. 관련 구체예에서, 항체는 적어도 10[-9]의 친화력 Kd를 갖는다.

[0027] 본 발명의 다른 구체예에서, 전술한 항체가 제공되며, 이것은 폴리클론 항체; Human Engineered™ 항체를 포함하는 단일클론 항체; 인간화 항체; 인간 항체; 키메라 항체; Fab, F(sb')₂, Fv, ScFv 또는 SCA 항체 단편; 디어바디; 선형 항체; 또는 이들 항체 중 어떤 하나의 무테인이다. 관련 구체예에서, 단일클론 항체는 단리된 항체이다.

[0028] 본 발명의 여전히 다른 구체예에서, 단리된 핵산은 전술한 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 서열을 포함하여 제공된다. 관련 구체예에서, 단리된 핵산은 도 4A, 13, 14, 또는 15에서 나타낸 중쇄 뉴클레오티드 서열과 적어도 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일한 경쇄 핵산 서열을 포함한다. 또 다른 관련 구체예에서, 단리된 핵산은 도 4A, 13, 14, 또는 15에서 나타낸 경쇄 뉴클레오티드 서열과 적어도 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일한 경쇄 핵산 서열을 포함한다.

[0029] 다른 구체예에서, 전술한 단리된 핵산을 포함하는 벡터가 제공된다. 관련 구체예에서, 전술한 벡터가 제공되며, 여기서 단리된 핵산은 조절 대조군 서열에 작동적으로 연결되어 있다. 여전히 다른 구체예에서, 숙주 세포는 전술한 벡터를 포함하여 제공된다.

[0030] 수많은 방법들이 본 발명에서 고려된다. 예를 들어, 전술한 항체를 생산하는 방법은 전술한 숙주 세포를 배양하여 단리된 핵산이 항체를 생산하도록 발현되는 것을 포함하여 제공된다. 관련 구체예에서, 방법은 숙주 세포 배양으로부터 항체를 회수하는 단계를 더 포함한다. 관련 구체예에서, 전술한 방법에 의해 생성된 단리된 항체가 제공된다.

[0031] 전술한 항체를 분비하는 하이브리도마가 본 발명에 의해 제공된다. 추가적으로, 독소에 콘쥬게이트된 전술한 항체가 제공된다.

[0032] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학적 조성물은 전술한 항체 및 약학적으로 적절한 담체, 부형제 또는 희석제 중 어떤 것을 포함하여 제공된다. 관련 구체예에서, 약학적 조성물은 2차 치료제를 더 포함한다. 또 다른 관련 구체예에서, 약학적 조성물이 제공되며, 여기서 2차 치료제는 암 화학치료제이다. 여전히 다른 관련 구체예에서, 약학적 조성물이 제공되며, 여기서 2차 치료제는 비스포스포네이트이다. 다른 구체예에서, 2차 치료제는 다른 항체이다.

[0033] 본 발명의 항체는 질병 및 질환의 치료를 위해 수많은 바람직한 특성을 갖는 것으로 여겨진다. 본 발명의 한 구체예에서, 피험체가 뼈 용해를 야기하거나 이에 기여하는 질병으로 고통받는 것을 예방하기 위해 M-CSF에 결합하는 전술한 항체 중 어떤 것이 제공되며, 여기서 항체는 질병과 관련된 뼈 손실의 심각도를 효과적으로 감소시

GX₃₅GX₃₆X₃₇FX₃₈LX₃₉D₄₀X₄₁VX₄₂X₄₃X₄₄DX₄₅ADYYCQQINSWPTTFGX₄₆GTX₄₇LX₄₈X₄₉X₅₀X₅₁X₅₂ (SEQ ID NO : 134) 내 X1-X5 중 임의의 것을 변경시키고, 도 12의 아미노산 98-105를 포함하는 M-CSF의 에피토프에 결합하기 위한 변경된 아미노산 서열을 포함하는 항체를 테스트하는 것을 포함한다.

[0042] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 도 12의 아미노산 65-73 또는 138-144를 포함하는 M-CSF의 에피토프(5H4 또는 MC3에 의해 인지된 M-CSF 에피토프에 대응함)에 결합하는 항체의 CDR을 변경시키는 방법이 제공되며, 이것은 도 13, 14, 및 15 중 하나에서 나타난 아미노산 서열의 CDR 내 아미노산을 변경시키고, 적어도 10[-7]의 친화성 K_a를 갖는 M-CSF에 결합하는 항체를 선택하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 도 13, 14, 및 15 중 하나에서 나타난 중쇄 아미노산 서열의 최대 60%를 구조적으로 변경시키는 방법이 제공되며, 이것은 Studnicka 등의 미국 특허 제5,766,886호 및 본원의 실시예 4A에서 제시한 방법에 따라서, 그리고 도 24C-24E에서 제시한 Kabat 넘버링에 따라서 전술한 서열을 변경시키고, 도 12의 아미노산 65-73 또는 138-144를 포함하는 M-CSF의 에피토프(5H4 또는 MC3에 의해 인지되는 M-CSF 에피토프에 대응함)에 결합하기 위한 변경된 아미노산 서열을 포함하는 항체를 테스트하는 것을 포함한다. 관련 구체예에서, 모든 낮은 위험 잔기가 변형된다. 이와 유사하게, 본 발명의 다른 구체예에서, 모든 낮은 중간 위험 잔기가 변형된다. 또 다른 구체예에서, 프롤린을 제외하고 모든 낮은 중간 위험 잔기가 변형된다.

[0043] 본 발명의 다른 구체예에서, 전술한 방법에 의해 설계된 CDR을 갖는 항체를 발현시키는 방법이 제공된다. 다른 구체예에서, MCSF에 결합하는 항체를 포함하는 약학적 조성물이 제공되며, 상기 항체는 상술한 방법을 사용하여 만들어진다.

[0044] 본 발명의 여전히 다른 구체예에서, 뼈 손실을 예방 또는 감소시키는 방법이 제공되며, 이것은 뼈용해를 야기하거나 이에 기여하는 질환으로 고통받는 피험체에 전술한 항체 중 어떤 것의 치료적 유효량을 투여하고, 이로써 질환과 관련한 뼈손실을 예방 또는 감소시키는 것을 포함한다. 관련 구체예에서, 뼈용해를 야기하거나 이에 기여하는 질환으로 고통받는 피험체를 치료하는 방법이 제공되며, 이것은 상기 피험체에 전술한 항체 중 임의의 것의 항체의 치료적 유효량을 투여하고, 이로써 질병과 관련한 뼈손실의 심각도를 감소시키는 것을 포함한다.

[0045] 관련 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며, 여기서 상기 질병은 내분비병증(코르티솔혈증, 생식샘저하증, 1차 또는 2차 부갑상샘항진증, 갑상샘과다증), 고칼슘혈증, 결핍 상태(구루병/골연화증, 괴혈병, 영양 실조), 만성 질환(흡수장애 증후군, 만성 신부전(신장 뼈형성장애), 만성 간 질환(간 뼈형성장애)), 약물(글루코코르티코이드(글루코코르티코이드-유도성 골다공증), 헤파린, 알콜), 및 유전 질환(불완전 뼈발생, 호모시스틴뇨증), 암, 골다공증, 골화석증, 관절염 및 류마티스 관절염과 관련된 뼈의 염증, 치주 질환, 섬유 형성 이상, 및/또는 폐 이질병을 포함하는, 비교적 증가된 과골세포 활성화와 관련한 물질대사 뼈 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0046] 여전히 다른 구체예에서, 뼈에 대한 전이성 암을 예방 또는 치료하는 방법이 제공되며, 이것은 전이성 암으로 고통받는 피험체에 전술한 항체 중 임의의 것의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 것을 포함한다. 관련 구체예에서, 방법이 제공되며, 여기서 전이성 암은 유방암, 폐암, 신장암, 다발성 골수종, 갑상선암, 전립선암, 선암, 백혈병 및 림프종을 포함하는 혈액 세포 종양; 두경부암; 식도암, 위암, 결장암, 대장암, 직장결장암, 직장암, 췌장암, 간암, 담즙관 또는 담낭암을 포함하는 위장관암; 난소 암종, 자궁내막 암, 질암, 및 자궁경부 암을 포함하는 여성 생식관의 암; 방광암; 신경모세포종을 포함하는 뇌암; 육종, 골육종; 및 악성 흑색종 또는 편평 세포 암을 포함하는 피부암이다.

[0047] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 뼈 손실 및 종양 성장을 예방하는 방법이 제공되며, 이것은 그것을 필요로 하는 피험체에 전술한 항체 중 임의의 것의 치료적으로 유효한 양을 투여하는 것을 포함한다. 관련 구체예에서, 방법은 2차 치료제를 투여하는 것을 더 포함한다. 여전히 다른 관련 구체예에서, 방법이 제공되며, 여기서 2차 치료제는 암 화학치료제 또는 비포스포네이트이다. 또 다른 관련 구체예에서, 방법이 제공되며, 여기서 비포스포네이트는 젤레드로네이트, 파미드로네이트, 클로드로네이트, 에티드로네이트, 탈렌드로네이트, 알렌드로네이트, 또는 이반드로네이트이다. 또 다른 관련 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며, 여기서 치료제는 세포독성 화학 치료제이다. 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며, 여기서 피험체는 비포스포네이트 처리를 받는 것으로부터 배제된다.

[0048] 여전히 다른 관련 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며, 여기서 항체는 치료적 효과를 달성하기 위해 필요한 2차 치료제의 투여량을 감소시키기에 효과적이다. 다른 구체예에서, 2차 치료제는 비-CSF 콜로니 자극 인자, 예를 들어, G-CSF, 또는 안티-RANKL 항체, 또는 가용성 RANKL 수용체이다.

- [0049] 본 발명의 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며, 여기서 피험체는 포유동물이다. 관련 구체예에서, 포유동물은 인간이다.
- [0050] 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며, 여기서 항체는 M-CSF 및 그것의 수용체(M-CSFR) 간 상호작용을 억제한다. 다른 관련 구체예에서, 항체는 종양 세포에 의해 유도된 파골세포 증식 및/또는 분화를 억제한다. 또 다른 구체예에서, 전술한 방법이 제공되며, 여기서 항체는 약 2 μ g/kg 내지 30 mg/kg, 0.1 mg/kg 내지 30 mg/kg 또는 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg 체중 사이의 투여량으로 투여된다.
- [0051] 본 발명의 다른 구체예에서, 본 발명의 항체의 사용은 뼈용해의 증상을 보이는 환자 내 뼈용해를 예방 또는 감소시키기 위한 약제의 제조에 있어서, 그리고 뼈용해를 야기하거나 이에 기여하는 질환으로 고통받는 환자를 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서 고려된다. 전술한 사용은 더 고려되며, 여기서 질병은 내분비병증(코르티솔혈증, 생식샘저하증, 1차 또는 2차 부갑상샘항진증, 갑상샘과다증), 고칼슘혈증, 결핍 상태(구루병/골연화증, 괴혈병, 영양 실조), 만성 질환(흡수장애 증후군, 만성 신부전(신장 뼈형성장애), 만성 간 질환(간 뼈형성장애)), 약물(글루코코르티코이드(글루코코르티코이드-유도성 골다공증), 헤파린, 알콜), 및 유전 질환(불완전 뼈 발생, 호모시스틴뇨증), 암, 골다공증, 골화석증, 관절염 및 류마티스 관절염과 관련된 뼈의 염증, 치주 질환, 섬유 형성 이상, 및/또는 폐이췌병을 포함하는, 비교적 증가된 파골세포 활성화와 관련한 물질대사 뼈 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0052] 다른 구체예에서, 본 발명의 항체의 사용은 전이성 암으로 고통받는 환자에서 뼈에 대한 전이성 암을 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조에서 고려된다. 관련 구체예에서, 전이성 암은 유방암, 폐암, 신장암, 다발성 골수종, 갑상선암, 전립선암, 선암, 백혈병 및 림프종을 포함하는 혈액 세포 종양; 두경부암; 식도암, 위암, 결장암, 대장암, 직장결장암, 직장암, 췌장암, 간암, 담즙관 또는 담낭암을 포함하는 위장관암; 난소 암종, 자궁 내막 암, 질암, 및 자궁경부 암을 포함하는 여성 생식관의 암; 방광암; 신경모세포종을 포함하는 뇌암; 육종, 골육종; 및 악성 흑색종 또는 편평 세포 암을 포함하는 피부암이다.
- [0053] 여전히 다른 구체예에서, 본 발명의 항체의 사용은 암에 걸린 환자를 치료하기 위한 약제의 제조에 있어서 고려된다.
- [0054] 전술한 사용 중 임의의 것에서, 약제는 2차 치료제를 사용하는 치료법과 조합된다. 관련 구체예에서 2차 치료제는 암 화학치료제이다. 관련 구체예에서, 2차 치료제는 비-M-CSF 콜로니 자극 인자, 또는 항-RANKL 항체, 또는 가용성 RANKL 수용체, 또는 비스포스포네이트이다. 관련 구체예에서, 비스포스포네이트는 젤레드로네이트, 파미드로네이트, 클로드로네이트, 에티드로네이트, 탈린드로네이트, 알렌드로네이트, 또는 이반드로네이트이다.
- [0055] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 전술한 사용 중 임의의 것이 고려되며, 여기서 환자는 비스포스포네이트 치료를 받는 것으로부터 배제되며 및/또는 환자는 2차 치료제로 미리-처리되었다. 관련 구체예에서, 2차 암 화학치료제, 비-M-CSF 콜로니 자극 인자, 또는 항-RANKL 항체, 또는 가용성 RANKL 수용체, 또는 비스포스포네이트이다. 또 다른 관련 구체예에서, 비스포네이트는 젤레드로네이트, 파미드로네이트, 클로드로네이트, 에티드로네이트, 탈린드로네이트, 알렌드로네이트, 또는 이반드로네이트이다. 또 다른 관련 구체예에서, 환자는 비스포스포네이트 치료를 받는 것으로부터 배제된다.
- [0056] 본 발명의 다른 구체예에서, 뼈용해의 증상을 보이는 환자를 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본 발명의 항체의 상승적 조합이 고려되며, 여기서 약제는 2차 치료제를 사용하는 치료법과 조합된다. 관련 구체예에서, 2차 치료제는 암 화학치료제, 비-M-CSF 콜로니 자극 인자, 또는 항-RANKL 항체, 또는 가용성 RANKL 수용체, 또는 비스포스포네이트이다. 관련 구체예에서, 비스포스포네이트는 젤레드로네이트, 파미드로네이트, 클로드로네이트, 에티드로네이트, 탈린드로네이트, 알렌드로네이트, 또는 이반드로네이트이다. 여전히 다른 구체예에서, 환자는 비스포스포네이트 치료를 받는 것으로부터 배제된다.
- [0057] 전술한 사용 중 임의의 구체예가 고려되며, 여기서 약제 내 항체의 양은 치료 효과를 달성하기 위해 필요한 2차 치료제의 투여량을 감소시키기 위해 효과적인 투여량이다. 암과 관련한 뼈 손실에 관한 전술한 구체예 중 임의의 것에서, 약제 내 항체의 양은 바람직하게는 종양 세포에 의해 유도된 파골세포 증식 및/또는 분화를 억제하기에 유효하다.
- [0058] 전술한 약제 중 임의의 것에서 항체의 양은 약 2 μ g/kg 내지 30 mg/kg 체중 사이의 투여량일 수도 있다. 관련 구체예에서, 약제 내 항체의 양은 약 0.1 mg/kg 내지 30 mg/kg 체중의 투여량이다. 여전히 다른 구체예에서, 약제 내 항체의 양은 약 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg 체중의 투여량이다.

- [0059] 또한, 키트가 본 발명에 의해 고려된다. 한 구체예에서, 바이알 또는 보틀과 같은 용기 내에 포장된 본 발명의 항체의 치료적으로 유효한 양을 포함하고, 용기에 부착되거나 또는 용기와 함께 포장된 라벨(상기 라벨은 용기의 내용물을 설명하고 뼈 손실을 예방 또는 감소시키기 위해 용기의 내용물의 사용에 관한 지시사항 및/또는 설명서를 제공함)을 더 포함하는 키트가 제공된다.
- [0060] 다른 구체예에서, 바이알 또는 보틀과 같은 용기 내에 포장된 본 발명의 항체의 치료적으로 유효한 양을 포함하고, 용기에 부착되거나 또는 용기와 함께 포장된 라벨(상기 라벨은 용기의 내용물을 설명하고 뼈용해를 야기하거나 이에 기여하는 질환으로 고통받는 환자에 대한 용기의 내용물의 사용에 관한 지시사항 및/또는 설명서를 제공함)을 더 포함하는 키트가 제공된다.
- [0061] 관련 구체예에서, 키트가 제공되며, 상기 질병은 내분비병증(코르티솔혈증, 생식샘저하증, 1차 또는 2차 부갑상샘항진증, 갑상샘과다증), 고칼슘혈증, 결핍 상태(구루병/골연화증, 괴혈병, 영양실조), 만성 질환(흡수장애 증후군, 만성 신부전(신장 뼈형성 장애), 만성 간 질환(간 뼈형성 장애)), 약물(글루코코르티코이드(글루코코르티코이드-유도성 골다공증), 해파린, 알콜), 및 유전 질환(불완전 뼈발생, 호모시스틴뇨증), 암, 골다공증, 골화석증, 관절염 및 류마티스 관절염과 관련한 뼈의 염증, 치주 질환, 섬유 형성이상, 및/또는 폐이췌병을 포함하여, 상대적으로 증가된 파골세포 활성과 관련한 물질대사 뼈 질환으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0062] 다른 구체예에서, 바이알 또는 보틀과 같은 용기 내에 포장된 본 발명의 항체의 치료적 유효량을 포함하고, 용기에 부착되거나 용기와 함께 포장된 라벨(상기 라벨은 용기의 내용물을 설명하고 뼈에 대한 전이성 암을 예방 또는 치료하기 위한 용기의 내용물의 사용에 관한 지시 및/또는 설명서를 제공함)을 더 포함하는 키트가 제공된다. 관련 구체예에서, 전이성 암은 유방암, 폐암, 신장암, 다발성 골수종, 갑상선암, 전립선암, 선암, 백혈병 및 림프종을 포함하는 혈액 세포 종양; 두경부암; 식도암, 위암, 결장암, 대장암, 직장결장암, 직장암, 췌장암, 간암, 담즙관 또는 담낭암을 포함하는 위장관암; 난소 암종, 자궁내막 암, 질암, 및 자궁경부 암을 포함하는 여성 생식관의 암; 방광암; 신경모세포종을 포함하는 뇌암; 육종, 골육종; 및 악성 흑색종 또는 편평 세포 암을 포함하는 피부암이다.
- [0063] 또 다른 구체예에서, 바이알 또는 보틀과 같은 용기 내에 포장된 본 발명의 항체의 치료적 유효량을 포함하고, 용기에 부착되거나 용기와 함께 포장된 라벨(상기 라벨은 용기의 내용물을 설명하고 암을 치료하기 위해 용기의 내용물의 사용에 관한 지시사항 및/또는 설명서를 제공함)을 더 포함하는 키트가 제공된다.
- [0064] 다른 구체예에서, 키트는 2차 치료제를 더 포함한다. 관련 구체예에서, 2차 치료제는 암 화학치료제, 비-M-CSF 콜로니 자극 인자, 또는 항-RANKL 항체, 또는 가용성 RANKL 수용체, 또는 비스포스포네이트이다. 관련 구체예에서, 비스포스포네이트는 젤레드로네이트, 파미드로네이트, 클로드로네이트, 에티드로네이트, 티라드로네이트, 알레드로네이트, 또는 이반드로네이트이다. 또 다른 구체예에서, 키트는 비스포스포네이트 처리를 받는 것으로부터 배제된 환자를 치료하기 위한 설명서를 포함한다.
- [0065] 다른 구체예에서, 전술한 키트는 치료적 효과를 달성하기 위해 필요한 2차 치료제의 투여량을 감소시키기에 효과적인 항체의 투여량을 포함하여 제공된다. 다른 구체예에서, 키트는 항체의 상승적 투여량을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 키트는 종양 세포에 의해 유도된 파골세포 증식 및/또는 분화를 억제하기에 효과적인 항체의 투여량을 포함한다.
- [0066] 본 발명의 여전히 다른 구체예에서, 전술한 키트는 약 2 μ g/kg 내지 30 mg/kg 체중 사이의 항체의 투여량을 포함한다. 다른 구체예에서, 키트는 약 0.1 μ g/kg 내지 30 mg/kg 체중 사이의 항체의 투여량을 포함한다. 여전히 다른 구체예에서, 키트는 약 0.1 mg/kg 내지 10 mg/kg 체중 사이의 항체의 투여량을 포함한다.
- [0067] 본 발명의 여전히 다른 구체예에서, 포장, 바이알 또는 용기는 하나 이상의 전술한 항체를 포함하는 약제 그리고 약제가 수술 또는 방사능 요법과 함께 사용되어야 하는 설명서를 포함하여 제공된다. 다른 구체예에서, 피험체에 전술한 항체 중 임의의 어떤 것을 투여하는 단계를 포함하는 뼈에 대한 전이성 암을 예방 또는 치료하는 방법 및 수술 또는 방사능 요법으로 피험체를 치료하는 방법이 제공된다. 다른 구체예에서, 그것의 표면 상에서 막-결합 M-CSF를 발현시키는 종양 세포를 표적화하는 방법이 제공되며, 이것은 전술한 항체 중 임의의 것을 투여하는 단계를 포함하며, 이때 항체는 방사성 핵종 또는 기타 독소에 콘주게이트된다. 또 다른 구체예에서, 암으로 고통받는 피험체를 치료하는 방법이 제공되며, 이것은 전술한 항체 중 임의의 것의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함한다.
- [0068] 본 발명의 여전히 다른 구체예에서, 뼈손실을 예방하는 방법이 제공되며, 이것은 골용해를 야기하거나 이에 기여하는 질환으로 고통받는 피험체에 피험체의 세포에 의해 생성된 M-CSF를 중화시키기에 유효한 양으로 전술한

항체 중 임의의 것의 소정량, 암세포에 의해 생성된 M-CSF를 중화시키기에 유효한 양 보다 많은 양을 투여하는 것을 포함한다. 관련 구체예에서, 뼈용해를 야기하거나 이에 기여하는 질병으로 고통받는 피험체를 치료하는 방법이 제공되며, 이것은 상기 피험체에 피험체의 세포에 의해 생성된 M-CSF를 중화시키기에 유효한 양으로 전술한 항체 중 임의의 것의 소정량, 암 세포에 의해 생성된 M-CSF를 중화시키기에 유효한 양 보다 많은 양을 투여하는 것을 포함한다.

[0069] 본 발명의 한 구체예에서, 항체 RX1, SH4, MC1 및/또는 MC3, 또는 비-뮤린 RX1, SH4, MC1 및/또는 MC3 유도된 항체 또는 RX1, 5H4, MC1 및/또는 MC3 경쟁 항체, 및 암 치료제를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 본 발명의 다른 구체예에서, 항체 RX1, 5H4, MC1 및/또는 MC3, 또는 비-뮤린 RX1, 5H4, MC1 및/또는 MC3 유도된 항체 또는 RX1, 5H4, MC1 및/또는 MC3 경쟁 항체를 포함하는 약제, 및 약제가 수술 또는 방사능 요법과 함께 사용되어야 하는 설명서를 포함하는 포장, 바이알 또는 용기가 제공된다.

[0070] 본 발명의 여전히 다른 구체예에서, 암으로 고통받는 피험체를 치료하는 방법이 제공되며, 여기서 암이 M-CSF를 분비하지 않는 세포를 포함하고, 전술한 항체 중 임의의 것을 투여하는 단계를 포함한다.

실시예

[0426] 실시예 1

[0427] 본 실시예는 M-CSF 항체 RX1 및 5A1이 종 특이적이고 항체 RX1, MC1, 및 MC3가 인간 M-CSF 활성을 중화한다는 것을 보여준다. RX1은 본 출원의 출원일보다 1년 이상 앞서 이용가능한 시중에 판매하는 항체이다. 대표적인 시판 공급원은 이것으로 제한되지는 않지만, 마우스 항-인간 M-CSF 단일클론 항체 클론 116,692, 및 21 (Anogen); 항-인간 M-CSF 항체 클론 21113.131, 26730, 및 26786 (R & D 시스템, Inc.); 및 항-인간 M-CSF 항체클론M16 (Antigenix America, Inc.)을 포함한다.

[0428] RX1 및 5A1의 중화 활성을 시험하기 위해, M-NFS-60 세포주의 증식 분석법을 사용하였다(인터류킨 3과 M-CSF 둘다에 반응하고 레트로바이러스의 통합에 의해 유발된 끝절단된 c-myb 원생-종양유전자를 함유하는, Cas-Br-MuLV 야생 마우스 동종숙주역 레트로바이러스로 유도된 골수 백혈병으로부터 유도된 Rockville, MD, USA에서 ATCC로부터 이용가능한, American Type Culture Collection Accession No. CRL-1838). M-NFS-60의 증식은 용량-의존 형태로 활성 M-CSF를 요구한다. 분석법에서, M-NFS-60 세포를 세척하고 10% FBS 및 3000 U/ml의 M-CSF 및 1% Pen/Strep를 갖는 RPMI 1640 배지에 플레이팅하였다. 인간 또는 뮤린-특이적, 제조함 인간 M-CSF (10 ng/ml 최종 농도에서)는 다양한 농도의 항체로 1시간동안 37°C에서 5% CO₂ 에서 배양기에서 배양되었다.

[0429] 배양 후에, 혼합물을 96 웰 마이크로타이터플레이트에서 M-NFS-60 배양에 첨가하였다. 웰당 총 분석법 부피는 10 ng/ml M-CSF와 함께 100 µl였고, 항체 농도는 도 5에 나와있다. 세포 수를 CellTiter Glo 분석법 (Promega)에 의해 정량하기 전에 세포를 37°C에서 5% CO₂ 하에서 72시간동안 배양하였다. 항체 MC3 및 MCI에 대해서 앞서 언급한 분석법을 반복하였다.

[0430] 도 5에서 나타낸 바와 같이, M-CSF 항체 RX1 및 5A1은 종 특이적이다. 세포 증식은 CellTiter Glo 분석법으로부터 형광 판독으로서 표시되고, 이것은 세포 수와 선형이다. RX1 및 5A1의 종 특이성 중화 활성은 그것이 인간 또는 뮤린 M-CSF 중 하나의 존재하에서 M-NFS-60를 저해하는 능력에 의해 나타난다. 최종적으로, 도 5B에 나타낸 바와 같이, 항체 MC3 및 MC1은 또한 M-CSF 활성의 효과적인 저해제이다.

[0431] 실시예 2

[0432] 본 실시예는 5mg/kg의 용량에서 항체RX1가 인간 이중이식 모델에서 효과적으로 뼈용해를 저해한다는 것을 보여준다. 평균중량 ~20g의 4-7 주령의 나이의, 암컷 누드 마우스를 이 연구에 사용하였다. 10 µl의 식염수에 현탁된 종양 세포(MDA-MB-231, 3x10⁵)를 오른쪽 경골 골수 공간 안으로 주사하였다. 기준선 이미지를 얻고 주사에 의한 골절에 대해 체크하기 위해 뒷다리의 방사선사진을 종양 접종 하루 후에 찍었다. 마우스를 5 mg/kg에서 PBS 및 RX1을 포함하는 군 당 10 마우스로 치료 군으로 무작위화하고, 6 주동안 1주일에 한번 i. p. 주사하였다. 연구 마지막에, 뒷다리의 방사선사진을 다시 찍고 골 손상에 대한 기준선에 대해서 비교하였다. 종양으로 인한 골 손상의 정도는 도 6에 나타낸 바와 같이 정의되었다. RX1 5 mg/kg 치료를 받은 군은 종양-유발된 손상으로부터 통계적으로 유의한 골의 보호를 나타냈다.

[0433] 실시예 3

- [0434] 이 실시예는 항체RX1가 5 mg/kg의 농도에서 인간 유방암 MDA-MB-231 보유 누드 마우스에게 투여될 때 메타스타제의 수가 감소된다는 것을 보여준다.
- [0435] 4-7 주령의 나이, 평균 체중 ~20g 인 암컷 누드 마우스를 이 실험을 위해 사용하였다. 10 μ l의 식염수에 현탁된 종양 세포(MDA-MB-231, 3x10⁵)을 오른쪽 경골 골수 공간안으로 주사하였다. 기준선 이미지를 얻고 주사로 인한 골절을 체크하기 위해서 뒷다리의 방사선사진을 종양 접종 1일 후에 찍었다. 마우스를 5 mg/kg에서 PBS 및 RX1를 포함하는 치료 군으로 무작위로 그룹화하고 6 주동안 1주일에 한번 i. p. 주사하였다. 연구가 끝날 때, 전이 폐 결절 계수를 위해 각각의 치료군의 폐를 수집하고 Bouin's 용액에 고정하였다.
- [0436] 도 7에 나타난 바와 같이, 5mg/kg의 용량으로 항체 RX1를 인간 유방암 MDA-MB-231 보유 누드 마우스로 투여될 때 메타스타제의 수는 감소된다.
- [0437] 실시예 4
- [0438] 이 실시예는 RX1 항체의 인간화를 위한 과정을 설명한다. 5H4, MC1 및 MC3는 유사한 과정을 사용하여 인간화한다.
- [0439] 인간화 RX1 경쇄와 중쇄에 대한 유전자의 설계
- [0440] 뮤린 RX1에 대한 뉴클레오티드 및 아미노산 서열이 도 4B에 나와있다. National Biomedical Foundation Protein Identification Resource 또는 유사한 데이터베이스를 사용하여 확인된 인간 항체의 서열은 인간화 항체의 틀구조를 제공하기 위해 사용된다. 인간화 중쇄의 서열을 선택하기 위해, 뮤린RX1 중쇄 서열은 인간 항체 중쇄의 서열과 정렬된다. 위치가 하기에 정의된 4개의 카테고리 중 어떤 하나에 있지 않다면, 각각의 위치에서, 인간 항체 아미노산이 인간화 서열에 대해 선택되고, 이 경우 뮤린 RX1 아미노산이 선택된다:
- [0441] (1) Kabat, J. Immunol., 125,961-969 (1980)에 의해 정의된 바와 같이, 위치가 상보성 결정 영역 (CDR) 내에 있다;
- [0442] (2) 인간 항체 아미노산이 그 위치에서 인간 중쇄에 대해 드문 반면, 뮤린RX1 아미노산은 그 위치에서 인간 중쇄에 드물다;
- [0443] (3) 위치는 뮤린 RX1 중쇄의 아미노산 서열에서 CDR에 바로 가까이 인접하거나; 또는
- [0444] (4) 뮤린 RX1 항체의 3-차원 모델링은 아미노산이 물리적으로 항원 결합 영역에 가깝다고 암시한다.
- [0445] 인간화 경쇄의 서열을 선택하기 위해서, 뮤린 RX1 경쇄 서열은 인간 항체 경쇄의 서열과 정렬된다. 위치가 상술된 카테고리 중 하나 안으로 다시 떨어지고 아래에서 반복되지 않으면, 인간 항체 아미노산은 인간화 서열에 대해서 각각의 위치에서 선택된다:
- [0446] (1)CDR's ;
- [0447] (2) 뮤린RX1 아미노산은 인간 항체보다 더욱 전형적이고;
- [0448] (3) CDR's에 인접하거나 ; 또는
- [0449] (4) 결합 영역에 가능한 3-차원 근접.
- [0450] 중쇄와 경쇄 유전자의 실제의 뉴클레오티드 서열이 다음과 같이 선택된다:
- [0451] (1) 뉴클레오티드 서열은 위에서 기술된 바와 같이 선택된 아미노산 서열에 대해서 코딩한다;
- [0452] (2) 이들 코딩 서열의 5', 뉴클레오티드 서열은 리더 (신호) 서열에 대해 코딩한다. 이들 리더 서열은 항체의 상징으로서 선택되었고 ;
- [0453] (3) 코딩 서열의 3', 뉴클레오티드 서열은 마우스 경쇄 J5 세그먼트 및 마우스 중쇄 J2 세그먼트를 따르는 서열이고, 이것은 뮤린RX1 서열의 일부이다. 그들이 스플라이스 제공자 신호를 함유하기 때문에 이들 서열이 포함되고;
- [0454] (4) 서열의 각각의 말단에 Xba I 부위에서 절단하고 벡터의 Xba I 부위 안으로 클로닝하는 것을 허용하는 Xba I 부위가 있다.
- [0455] 인간화 경쇄와 중쇄 유전자의 구성

- [0456] 중쇄를 합성하기 위해서, Applied BioSystems 380B DNA 합성장치를 사용하여 4개의 올리고뉴클레오티드를 합성한다. 올리고뉴클레오티드 중 2개는 중쇄의 각각의 가닥의 일부분이고, 각각의 올리고뉴클레오티드는 약 20 뉴클레오티드 만큼 다음의 것과 겹쳐져 어닐링을 허용한다. 함께, 올리고뉴클레오티드는 각각의 말단에서 약간의 여분의 뉴클레오티드를 갖는 전체 인간화 중쇄 가변 영역을 커버하여 Xba I 부위에서 절단을 허용한다. 올리고뉴클레오티드는 폴리아크릴아미드 겔로부터 정제된다.
- [0457] 각각의 올리고뉴클레오티드는 표준 과정에 의해 ATP 및 T4 폴리뉴클레오티드 키나아제를 사용하여 인산화한다 (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989)). 인산화 올리고뉴클레오티드를 어닐링하기 위해, 그들을 함께 40 ul의 TA (33 mM Tris 아세테이트, pH 7.9, 66 mM 칼륨 아세테이트, 10 mM 마그네슘 아세테이트)에 각각 약 3.75 uM의 농도에서 현탁시키고, 4분동안 95°C로 가열하고, 4°C로 천천히 냉각시킨다. 각각의 올리고뉴클레오티드의 반대편 가닥을 합성함으로써, 올리고뉴클레오티드로부터 완전한 유전자를 합성하기 위해 다음의 성분들을 100 ul의 최종 부피로 첨가한다:
- [0458] 10 ul 어닐링된 올리고뉴클레오티드
- [0459] 0.16 mM 각각의 데옥시리보뉴클레오티드
- [0460] 0.5 mM ATP
- [0461] 0.5 mM DTT 100 ug/ml BSA
- [0462] 3.5 ug/ml T4 g43 단백질 (DNA 폴리머라제)
- [0463] 25 ug/ml T4 g44/62 단백질 (폴리머라제 부속 단백질)
- [0464] 25 ug/ml 45 단백질 (폴리머라제 부속 단백질)
- [0465] 혼합물을 37°C에서 30분동안 배양한다. 그후 10 u의 T4 DNA 리가제를 첨가하고 37°C에서 배양을 30분동안 다시 시작한다. 폴리머라제와 리가제는 70°C에서 15분동안 반응을 배양함으로써 비활성화된다. Xba I로 유전자를 소화시키기 위해, 200 ug/ml에서 BSA 및 1 mM에서 DTT를 함유하는 50 ul의 2 X TA, 43 ul의 물, 및 5 ul중의 50u의 Xba I를 반응에 첨가한다. 반응을 3 시간동안 37°C에서 배양하고, 그후 겔에서 정제한다. Xba I 단편을 겔로부터 정제시키고 표준 방법에 의해 플라스미드 pUC19의 Xba I 부위 안으로 클로닝한다. 플라스미드를 표준 기술을 사용하여 정제하고 디테옥시 방법을 사용하여 서열화한다.
- [0466] 인간화 경쇄와 중쇄를 발현하는 플라스미드의 구성은 경쇄와 중쇄 Xba I 단편을, 그것이 삽입된 pUC19 플라스미드로부터 분리하고 그후 그것을, 적절한 숙주 세포 내로 트랜스펙션될 때 높은 수준의 완전한 중쇄를 발현할, 적절한 발현 벡터의 Xba I 부위 안으로 도입함으로써 달성된다.
- [0467] 인간화 항체의 합성 및 친화력
- [0468] 발현 벡터를 마우스 Sp2/0 세포 내로 트랜스펙션하고, 플라스미드를 통합하는 세포는 표준 방법에 의해 발현 벡터에 의해 주어진 선택가능한 마커(들)를 기제로 하여 선택된다. 이들 세포가 M-CSF에 결합하는 항체를 분리했다는 것을 입증하기 위해, 세포로부터의 상청액을 M-CSF을 발현하는 것으로 알려진 세포와 함께 배양한다. 세척 후에, 세포를 플루오레세인-접합된 염소 항-인간 항체로 배양하고, 세척하고, FACSCAN 사이토플루오로미터에서 형광에 대해 분석한다.
- [0469] 다음 실험을 위해, 인간화 항체를 생산하는 세포를 마우스 안에 주사하고, 결과의 복수를 수집한다. 인간화 항체는 염소 항-인간 면역글로불린 항체의 친화력 칼럼 을 통과함으로써 복수로부터 실질적인 동종으로 정제되고, 표준 기술에 따라, Affigel-10 지지체 위에서 제조된다(Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, Calif.). 본래의 뮤린RXI 항체에 대한 인간화 항체의 친화력을 결정하기 위해, 경쟁적 결합 실험을 당업계에 공지된 기술에 따라 수행한다.
- [0470] 실시예 4A
- [0471] 이 실시예는 그러한 항체의 정제와 결합 활성에 대한 테스트는 물론이고, Human Engineered™ RXI 항체의 클로닝 및 발현을 설명한다. Human Engineered™ 5H4, MCI, 및 MC3 항체는 유사한 과정을 사용하여 제조된다.
- [0472] Human Engineered™ 서열의 설계

- [0473] 항체 가변 도메인의 Human Engineered™은 항체 분자의 결합 활성을 유지하면서 면역원성을 줄이기 위한 방법으로서 Studnicka [참조, 예를 들어, Studnicka et al. 미국 특허 No. 5,766, 886; Studnicka et al. Protein Engineering 7: 805-814 (1994)]에 의해 설명되었다. 방법에 따르면, 각각의 가변 영역 아미노산은 치환의 위험이 할당되었다. 아미노산 치환은 3가지 위험 카테고리 중 하나로 분류된다 : (1) 낮은 위험 변화는 항원 결합을 붕괴시키는 가능성이 가장 작은, 감소하는 면역원성에 대해 가장 큰 잠재력을 갖는 것들이다 ; (2) 적당한 위험 변화는 면역원성을 더욱 감소시키지만, 항원 결합 또는 단백질 폴딩에 영향을 줄 가능성이 더 큰 것들이다; (3) 높은 위험 잔기는 항체 구조를 결합 또는 유지하는데 중요하고 항원 결합 또는 단백질 폴딩이 영향을 가장 높은 위험을 수반하는 것들이다. 프롤린의 3-차원 구조 역할로 인해, 만일 위치가 전형적으로 낮은 위험 위치라 할지라도, 프롤린에서의 변형은 일반적으로 적어도 적당한 위험 변화로 간주된다. 치환 변화가 바람직하지만 삽입과 결손도 또한 가능하다. 도 4B와 4C는 높은, 적당한 또는 낮은 위험 변화로 분류된, 각각, 뮤린 RX1 경쇄와 중쇄의 각각의 아미노산 잔기에 대한 위험 할당을 보여준다.
- [0474] 뮤린RX1 항체의 경쇄와 중쇄의 가변 영역은 이 방법을 사용하여 Human Engineered™이었다. 뮤린 가변 영역의 아미노산 서열을 인간 가변 영역 서열과 정렬시킴으로써, 낮은 위험 위치에서 방법에 따라 변형을 위한 후보자인 아미노산 잔기를 확인하였다. 개별적인 VH 또는 VL 서열 또는 인간 합치 VH 또는 VL 서열을 포함하여, 어떠한 인간 가변 영역을 사용할 수 있다. 어떠한 수의 낮은 위험 위치에서 아미노산 잔기, 또는 모든 낮은 위험 위치에서, 변화될 수 있다. 도 19A-B에서 Human Engineered™ "낮은 위험" 중쇄 서열에 대해, 인간 합치 Vh2 (Kabat에 기반함)를 주형으로서 사용하였고, 뮤린 및 인간 아미노산 잔기가 낮은 위험 위치에서 다른 각각의 위치에 대해서, 뮤린 잔기를 인간 잔기로 치환한 아미노산 변형이 도입되었다. 도 20A-B에서 Human Engineered™ "낮은 위험" 경쇄 서열에 대해서, 인간 합치 카파 3 (Kabat에 기반)가 주형으로서 사용되었고, 뮤린과 인간 아미노산 잔기가 낮은 위험 위치에서 다른 각각의 위치에 대해서, 뮤린 잔기를 인간 잔기로 치환한 아미노산 변형을 도입하였다. 경쇄에 대해 총 16 아미노산 낮은 위험 변형을 만들었고 8 낮은 위험 변형을 중쇄에 대해 만들었다.
- [0475] 유사하게는, 뮤린 가변 영역의 아미노산 서열을 인간 가변 영역 서열과 정렬시킴으로써, 낮고 적당한 위험 위치 모두에서 방법에 따르는 변형에 대한 후보자인 아미노산 잔기가 확인되었다. 아미노산 잔기는 어떠한 수의 낮은 또는 적당한 위험 위치에서, 또는 낮고 적당한 위험 위치 모두에서, 변할 수 있다. 도 19A-B에서의 Human Engineered™ 중쇄 서열에 대해서, 인간 합치 Vh2 (Kabat에 기반함)가 주형으로서 사용되었고, 뮤린과 인간 아미노산 잔기가 낮거나 또는 적당한 위험 위치에서 다른 각각의 위치에 대해서, 뮤린 잔기를 인간 잔기로 치환한 아미노산 변형을 도입하였다. 도 20A-B에서 Human Engineered™ 경쇄 서열에 대해서, 인간 합치 카파 3 (Kabat에 기반함)를 주형으로서 사용하였고, 뮤린과 인간 아미노산 잔기가 낮거나 또는 적당한 위험 위치에서 다른 각각의 위치에 대해서, 뮤린 잔기를 인간 잔기로 치환한 아미노산 변형을 도입하였다. 총 19개의 낮고 적당한 위험 아미노산 변형이 경쇄에 만들어졌고 12개의 낮고 적당한 변형이 중쇄에 만들어졌다.
- [0476] 도 21A-B에 나타낸 바와 같이, 위치 54에서 변형이 뮤린로 역전된, "대안의 낮은 위험" 경쇄 서열을 또한 제조하였다. 도 21A-B에서 나타낸 바와 같이, 위치 54-56에서의 변형이 뮤린로 역전된, "대안의 낮은+보통의 위험" 경쇄 서열을 또한 제조하였다.
- [0477] 최종적으로, 도 22A-B에서 나타낸 바와 같이, 주형으로서 인간 생식계열 VK6 하위그룹 2-1-(1) A14를 사용하여, Human Engineered™ "낮은+보통의 위험" 경쇄 V 영역 서열이 또한 제조되었다.
- [0478] 또한 보유하는 글리코실화 부위를 나타내는 도 4A의 아미노산 41-43 (NGS)이 본 발명에 의해 계획된다. 대안으로서, 오직 하나의 또는 두개의 아미노산 41-43 (예를 들어, NG)이 보유될 수 있다.
- [0479] 영구적인 세포주 개발을 위한 발현 벡터의 제조
- [0480] 합성 뉴클레오티드 합성을 사용하여, 항체-유도된 신호 서열과 함께 각각의 상술된 중쇄 및 경쇄 V 영역 서열을 코딩하는 DNA 단편을 구성하였다. 상술한 각각의 경쇄 V 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 DNA를, 인간 카파 경쇄 일정한 영역을 함유하는 벡터 PMXP 10 안으로 삽입하였다. 각각의 상술한 중쇄 V 영역 아미노산 서열을 인코딩하는 DNA를, 인간 감마-2 중쇄 일정한 영역을 함유하는 벡터pMXP6 안으로 삽입하였다. 도 29A, 29b, 및 30에 도시된 서열을 갖는 인간 감마-1 (cDNA) 및 감마-4 (게놈 및 cDNA) 일정한 영역에 융합된 중쇄 V 영역 아미노산 서열을 함유하는 추가의 벡터를 구성하였다. 이들 벡터 모두는 각각 G418-또는 히스티딘-내성 트랜스

펙틴트의 선택을 위해, 네오 또는 히스와 같이 선택가능한 마커 유전자는 물론이고, hCMV 프로모터 및 마우스 카파 경쇄 3' 번역되지 않은 영역을 함유한다. 경쇄와 중쇄 벡터는 표 2 와 3 각각에 기술된다.

표 2

단일 유전자 영구적인 카파 경쇄 벡터

플라스미드	V 영역	선택적인 마커
pMXC5	낮은+보통의 위험 (Kabat)	neo
pMXC6	낮은 위험 (Kabat)	neo
pMXC13	낮은 위험 (Kabat) - R54 to S	neo
pMXC14	낮은+보통의 위험 (Kabat)-RAT54,55,56 to SIS	neo
pMXC22	낮은+보통의 위험 (생식계열)	neo

[0481]

표 3

단일 유전자 영구적인 중쇄 벡터

플라스미드	V 영역	C 영역	선택적인 마커
pMXC7	낮은+보통의 위험 (Kabat)	감마 2	neo
pMXC8	낮은 위험 (Kabat)	감마 2	neo
pMXC40	낮은 위험 (Kabat)	감마 1	neo
pMXC41	낮은+보통의 위험 (Kabat)	감마 1	neo
pMXC45	낮은+보통의 위험 (Kabat)	감마 4 (게놈)	neo
pMXC46	낮은+보통의 위험 (Kabat)	감마 4 (cDNA)	neo

[0482]

[0483]

원하는 Human Engineered™ 경쇄 플러스 중쇄 유전자 (감마-1, 감마-2 및 감마-4)를 포함하는 벡터를 그후 구성 하였다. 이들 "2-유전자" 벡터는 hCMV 프로모터, CMV 스플라이스 제공자, SV40 16S 스플라이스 수용체 및 폴리A 부위를 포함하는 마우스 카파 경쇄 3' 번역되지 않은 DNA의 제어하에서, 각각의 항체 중쇄와 경쇄를 코딩하는 유전자를 함유한다. 그들은 또한 네오 또는 히스와 같은 선택가능한 마커 유전자 및 암피실린 내성 유전자를 함유한다. 중쇄와 경쇄 유전자 둘다를 함유하는 벡터가 표 4에 기술된다. 2 복사의 각각의 경쇄와 중쇄 유전자 (4개의 유전자 벡터)를 포함하는 벡터가 또한 구성될 수 있다.

표 4

2-유전자 영구적인 발현 벡터

플라스미드	카파 경쇄	중쇄		선택적인 마커
		V 영역	C 영역	
pMXC12	낮은 위험 (Kabat)	낮은 위험 (Kabat)	감마 2	neo
pMXC37	낮은 위험 (Kabat)	낮은 위험 (Kabat)	감마 2	his
pMXC9	낮은+보통의 위험 (Kabat)	낮은+보통의 위험 (Kabat)	감마 2	neo
pMXC16	낮은 위험 (Kabat)	낮은+보통의 위험 (Kabat)	감마 2	neo
pMXC17	낮은+보통의 위험 (Kabat)	낮은 위험 (Kabat)	감마 2	neo
pMXC18	낮은 위험 (Kabat) R54 to S	낮은+보통의 위험 (Kabat)	감마 2	neo
pMXC19	낮은+보통의 위험 (Kabat)-RAT54,55,56 to SIS	낮은+보통의 위험 (Kabat)	감마 2	neo
pMXC20	낮은 위험 (Kabat) - R54 to S	낮은 위험 (Kabat)	감마 2	neo
pMXC21	낮은+보통의 위험 (Kabat)-RAT54,55,56 to SIS	낮은 위험 (Kabat)	감마 2	neo
pMXC25	낮은+보통의 위험 (생식계열)	낮은+보통의 위험 (Kabat)	감마 2	neo
pMXC47	낮은+보통의 위험 (생식계열)	낮은+보통의 위험 (Kabat)	감마 2	his
pMXC26	낮은+보통의 위험 (생식계열)	낮은 위험 (Kabat)	감마 2	neo
pMXC42	낮은+보통 위험 (생식계열)	낮은 위험 (Kabat)	감마 1	neo
pMXC43	낮은+보통 위험 (생식계열)	낮은+보통 위험 (Kabat)	감마 1	neo
pMXC50	낮은+보통 위험 (생식계열)	낮은+보통 위험 (Kabat)	감마 1	his
pMXC48	낮은+보통 위험 (생식계열)	낮은+보통 위험 (Kabat)	감마 4 (cDNA)	Neo
pMXC49	낮은+보통 위험 (생식계열)	낮은+보통 위험 (Kabat)	감마 4 (게놈)	neo

[0484]

[0485] 일시적 발현을 위한 발현 벡터의 제조

[0486] 상술한 경쇄 또는 중쇄 유전자 중의 하나를 함유하는 벡터가 또한 일시적 트랜스팩션을 위해 구성되었다. 네오 또는 히스 유전자 대신에, 그들은 Epstein-Barr 바이러스 핵 항원을 발현하는 HEK293 세포에서의 복제를 위해 Epstein-Barr 바이러스 *oriP* 를 함유한다는 것을 제외하고는, 이들 벡터는 영구적인 트랜스팩션에 대해 앞에서 기술한 것과 유사하다. 일시적 트랜스팩션을 위한 벡터는 표 5와 6에 기술된다.

표 5

일시적 카파 경쇄 벡터

플라스미드	V 영역
pMXC1	낮은+중간 위험 (Kabat)
pMXC2	낮은 위험 (Kabat)
pMXC10	낮은+중간 위험 (Kabat)-RAT54,55,56 to SIS
pMXC11	낮은 위험 (Kabat) - R54 to S
pMXC15	낮은+중간 위험 (생식계열)

[0487]

표 6

일시적 중쇄 벡터

플라스미드	V 영역	C 영역
pMXC3	낮은+보통의 위험 (Kabat)	감마 2
pMXC4	낮은 위험 (Kabat)	감마 2
pMXC29	낮은 위험 (Kabat)	감마 1
pMXC38	낮은 위험 (Kabat)	감마 4 (계놈)
pMXC39	낮은+보통의 위험 (Kabat)	감마 1

[0488]

[0489] HEK293E 세포에서 Human-Engineered RX1의 일시적 발현

[0490] 각각 Epstein-Barr 바이러스로부터 *oriP* 및 상술된 경쇄 또는 중쇄 유전자를 함유하는 분리된 벡터들을 일시적으로 HEK293E 세포 내로 트랜스펙션하였다. 일시적으로 트랜스펙션된 세포는 10일 이하동안 배양시켰고 그후에 상청액을 회수하고 단백질 A 크로마토그래피를 사용하여 항체를 정제하였다. 293E 세포의 일시적 트랜스펙션에 의해 제조된 단백질은 하기 표 7에 기술된다.

표 7

Human-engineered RX1 항체 제조법

항체	경쇄		중쇄	
	플라스미드	단백질	플라스미드	단백질
heRX1-1.G2	pMXC2	낮은 위험 (Kabat)	pMXC4	낮은 위험 (Kabat)
heRX1-2.G2	pMXC2	낮은 위험 (Kabat)	pMXC3	낮은+보통의 위험 (Kabat)
heRX1-3.G2	pMXC1	낮은+보통의 위험 (Kabat)	pMXC4	낮은 위험 (Kabat)
heRX1-4.G2	pMXC1	낮은+보통의 위험 (Kabat)	pMXC3	낮은+보통의 위험 (Kabat)
heRX1-5.G2	pMXC11	낮은 위험(Kabat) - R54 to S	pMXC4	낮은 위험 (Kabat)
heRX1-6.G2	pMXC11	낮은 위험(Kabat) - R54 to S	pMXC4	낮은 위험 (Kabat)
heRX1-7.G2	pMXC10	낮은+보통의 위험 (Kabat)- RAT54,55,56 to SIS	pMXC4	낮은 위험 (Kabat)
heRX1-8.G2	pMXC10	낮은+보통의 위험 (Kabat)- RAT 54,55,56 to SIS	pMXC3	낮은+보통의 위험(Kabat)
heRX1-9.G2	pMXC15	낮은+보통의 위험(생식계열)	pMXC4	낮은 위험 (Kabat)
heRX1-10.G2	pMXC15	낮은+보통의 위험(생식계열)	pMXC3	낮은+보통의 위험 (Kabat)
heRX1-1.G1	pMXC2	낮은 위험 (생식계열)	pMXC29	낮은 위험 (Kabat)
heRX1-10.G1	pMXC15	낮은+보통의 위험(생식계열)	pMXC39	낮은+보통의 위험(Kabat)
heRX1-9.G4	pMXC15	낮은+보통의 위험(생식계열)	pMXC38	낮은 위험 (Kabat)

[0491]

[0492] 영구적으로 트랜스펙션된 CHO-K1 세포의 개발

[0493] 함께 한 카피의 각각의 경 및 중 유전자를 함유하는 상술된 벡터 (표 4)는 Ex-Cell 302-적합화된 CHO-K1 세포 내로 트랜스펙션된다. Ex-Cell 302 배지에서 현탁액 성장에 적합화된 CHO-K1 세포는 전형적으로 40 ug의 선형화 벡터로 일렉트로포레이트한다. 대안으로서, 선형화 DNA는 선형 폴리에틸렌이민 (PEI)과 복합체가 형성될 수 있고 트랜스펙션을 위해 사용된다. 세포를 1% FBS 및 G418으로 보충된 Ex-Cell 302 배지를 함유하는 96 웰 플레이트에 플레이팅한다. 클론을 96 웰 플레이트에서 스크리닝하고 각각의 트랜스펙션으로부터 탑 ~10%의 클론

을 Ex-Cell 302 배지를 함유하는 24 웰 플레이트로 이동시킨다.

[0494] 생산성 시험은 배양상청액이 IgG에 대해서 면역글로불린 ELISA 분석법에 의해 분비된 항체의 수준에 대해서 시험되는 시점인, 7일과 14일동안 성장된 배양에 대해서 Ex-Cell 302 배지에서 24 웰 플레이트에서 수행한다.

[0495] 탑 클론을 Ex-Cell 302 배지를 함유하는 셰이크 플라스크로 이동시킨다. 세포가 현탁액 성장에 적합화 되자마자, Ex-Cell 302 배지에서 이들 클론으로 셰이크 플라스크 시험을 수행한다. 세포가 25 ml 배지를 함유하는 125 ml Erlenmeyer 플라스크에서 10일 이하동안 성장한다. 배양 시간의 적어도 격일로 플라스크를 열어 가스 교환이 되도록 하고, 배양 기간이 끝날때 IgG ELISA에 의해서 배양 배지에서 면역글로불린 폴리펩티드의 수준을 결정한다. 2 또는 3 다중-유닛 전사 벡터로 동일한 세포주의 다중 순차적 트랜스펙션은 바람직하게는 300 μ g/ml 이상까지, 면역글로불린 제조의 수준의 더욱 증가를 나타내는, 클론과 세포주를 야기시킨다.

[0496] 정제

[0497] 본 발명에 따라 벡터와 모든 라인으로부터 면역글로불린 폴리펩티드의 정제 방법을 설계할 수 있다. 당업계에 잘 알려진 방법에 따르면, 종료 후에 여과에 의해 세포를 제거한다. 여과액을 단백질 A 칼럼 (만일 필요하다면, 다중 패스로)위에 로딩한다. 칼럼을 세척하고 그후 발현되고 분비된 면역글로불린 폴리펩티드는 칼럼으로부터 용출된다. 항체 생성물의 제조를 위해, 단백질 A 풀은 바이러스 비활성화 단계로서 낮은 pH (pH 3, 최소 30분 최대 1시간동안)에서 유지된다. 흡착 양이온 교환 단계는 생성물을 더욱 정제하기 위하여 다음에 사용된다. 흡착 분리 칼럼으로부터 용출액은 바이러스 보유 필터를 통과하여 잠재 바이러스 입자들을 더욱 제거시킨다. 여과액은 생성물이 결합하지 않는 음이온 교환 칼럼을 통해 통과시킴으로써 더욱 정제된다. 최종적으로, 정제 공정은 투석여과를 통해 생성물을 조제물 완충제 안으로 이동시킴으로써 완결된다. 잔류액은 적어도 1 mg/mL의 단백질 농도로 조절되고 안정제가 첨가된다.

[0498] 결합 활성

[0499] 제조함 Human EngineeredTM 항체의 MCSF 결합 활성을 평가하였다. 단백질 A 칼럼을 통과시키고 이어서, A₂₈₀에서 농도를 측정하는 것에 의해서 진탕 플라스크 배양 상청액으로부터 단백질을 정제하였다. 실시예 1 및 12에 기재된 바와 같이 결합 분석을 수행하였다. PBS 코팅 용액에서 예비 희석된 sM-CSF 항원을 사용하여 Immulon II 플레이트를 예비코팅한 다음 마이크로플레이트에 이를 고정시켰다. 0.25 내지 20 μ g/ml 범위의 다양한 시험 농도의 M-CSF를 웰 당 50 μ l로 첨가하였고 하룻밤동안 4 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 그 다음, 플레이트를 PBS-0.05% 트윈으로 3회 세척하였다. PBS-0.05% 트윈 1% BSA 에 첨가하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분 배양하는 것에 의해서 차단시켰다. PBS-0.05% 트윈 1% BSA 용액에서 면역글로불린 폴리펩티드를 희석시켰다. 2 또는 3배의 일련의 희석액을 준비하고 이중으로 또는 3중으로 (100 μ l/웰) 첨가하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 90분동안 배양 후에, PBS-0.05% 트윈을 사용하여 3회 세척하였다. 신호 발생을 위해서, 페록시다제에 결합된 염소 항-인간 IgG (감마- 또는 Fc-특이적) 2차 항체를 각각의 웰에 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 60분 동안 배양하고 시트레이트 완충액과 0.012% H₂O₂ 중의 0.4mg/ml로 OPD를 첨가하였다. 100 μ l 1M H₂SO₄를 첨가하는 것에 의해서 실온에서 5-10분 후에 분석을 중지하였고, 490nm에서 플레이트를 해독하였다. 염소 항-인간 IgG(감마 특이적) 및 염소 항-인간 IgG(Fc-특이적) 항체 모두를 사용하였다.

[0500] 실시예 5

[0501] 다음 실시예는 변형되거나 또는 비변형된 IgG1 또는 IgG4 항상 영역을 갖는 RX1 Human EngineeredTM 항체를 포함하는, RX1-유래 또는 RX1-경쟁 항체와 같은, M-CSF 특이적 항체를 사용하여 인간을 치료하는 방법을 설명한다. 방법은 또한 MC1 또는 MC3 유래 또는 MC1 또는 MC3 경쟁 항체에 대해서 적용될 수 있다. 기대되는 효과적인 투여량은 2 μ g/kg 내지 10mg/kg 이다. 이 계산 값은 실험 데이터에 의해서 구체화된 다음 설명에 기초한 것이다.

[0502] 인간 혈장(건강한 인간 및 유방암 환자)에 있어서 측정된 M-CSF 수준은 약 1ng/ml 였다. M-CSF 중화 항체 RX1은 1ng/ml 인간 M-CSF에 대하여 2ng/ml의 측정된 EC₅₀을 갖는다. 따라서, 인간 혈장에 있어서 효과적인 항체 농도는 그것의 EC₅₀에 비하여 10 내지 50,000배, 즉 인간 혈장에서 20ng/ml 내지 100 μ g/ml 항체로 존재한다. 인간 환자에 있어서 이 농도를 얻기 위해서, PK 연구에 기초하여, 2 μ g/kg 내지 10mg/kg를 투여하여 혈장에서 20ng/ml 내지 100 μ g/ml의 항체 농도가 되도록 하였다.

[0503] 실시예 6

[0504] 이 실시예는 피하 모델에 있어서 항-M-CSF 단일클론 항체의 항암 활성을 평가하기위한 방법을 설명한다. 실시예

2는 항-M-CSF 단일클론 항체 치료가 골수에 있어서 종양의 성장을 유의하게 억제하였다는 것을 보여준다. 이 연구의 목적은 항체가 연 조직에 있어서 종양 성장을 억제할 수 있는지를 평가하기 위한 것이다.

[0505] 본 연구에 생후 10 주, 평균 중량 ~20g인 암컷 nu/nu 마우스를 사용하였다. 본 연구를 시작하기 적어도 7일 동안 적응기간을 거치도록 하였다. 0일에, 누드 마우스의 오른쪽 옆구리에 SW620 인간 결장암 세포를 마우스마다 100 μ l 당 5 x 10⁶ 세포씩 피하에 주입하였다. 종양 부피가 100-200mm³(일반적으로 종양 접종 후 1 주일)에 도달하였을 때, 마우스를 다음과 같이 그룹당 10 마리의 마우스씩 5개의 그룹으로 무작위 분배하였다.

[0506] 1) PBS

[0507] 2) RX1

[0508] 3) 5A1

[0509] 4) mIgG1 + rIgG1 이소타입 Ab 대조군

[0510] 5) 5A1 + RX1

[0511] 4주 동안 1주일에 한번 씩 표시된 항체 100mpk를 사용하여 마우스 복강내에 처치하였다. 종양 부피가 2000m³에 도달하였을 때, 연구를 종료하였다. 대안으로, 다음 상황 중 어느 하나를 만족한 경우에 동물을 또한 안락사시켰다: 종양 표면 궤양화가 총 종양 표면 면적의 30% 이상으로 커지거나, 유의한 체중 손실(>20%), 탈수 및 사멸해감. 모든 마우스 및 단세포 집단으로부터 수거된 총 혈액을 잠재적인 대리 마커로서 분석하였다. 2-D 분석으로 종양 성장/크기를 측정하였다. 종양 부피를 계산하기 위해서 종양 폭 및 크기를 측정하였다. 이전 실험의 결과로서 연 조직에서 종양 성장은 억제될 것이라는 것이 기대된다.

[0512] 실시예 7

[0513] 이 실시예는 암 전이와 연관된 중증 뼈용해 질병의 치료 및 예방을 위한 조합 치료법의 평가 방법을 설명한다.

[0514] 실험 디자인. 실시예 5에 기재된 연구는 다음 예외 사항을 제외하고는 필수적으로 동일하게 적용되었다. 하기에 치료 그룹에서 제시된 항체 또는 항체 조합에 추가하여, 다음 추가의 치료 중 하나를 동물에 적용하였다.

[0515] 1. 비스포스포네이트 (예를 들어, Aredia; Zometa; Clodronate)

[0516] 2. 외과수술

[0517] 3. 방사선

[0518] 4. 화학요법

[0519] 5. 호르몬 요법(예를 들어, 타목시펜; 항-안드로겐 요법)

[0520] 6. 항체 요법 (예를 들어, RANKL/RANK 중화 항체; PTHrP 중화 항체)

[0521] 7. 치료적 단백질 요법 (예를 들어, 가용성 RANKL 수용체; OPG, 및 PDGF 및 MMP 저해제).

[0522] 8. 작은 분자 약물 요법 (예를 들어, Src-키나제 저해제)

[0523] 9. 올리고뉴클레오티드 요법 (예를 들어, RANKL 또는 RANK 또는 PTHrP 항-센스).

[0524] 10. 유전자 요법 (예를 들어, RANKL 또는 RANK 저해제).

[0525] 11. 펩티드 요법 (예를 들어, RANKL의 뮤테인).

[0526] 치료 그룹은 다음과 같았다. 상기 추가의 치료는 "플러스 요법 X"로서 하기에 기재되어 있다.

[0527] 1. 단지 PBS

[0528] 2. 요법 X 만을 사용하여 치료

[0529] 3. 래트 IgG1 이소타입 대조표준

[0530] 4. 뮤린 IG1 이소타입 대조표준

[0531] 5. 단지 RX1 항-인간 MCSF

- [0532] 6. 단지 5A1 래트 IgG1 항-마우스 MCSF
- [0533] 7. 래트 IgG1 및 뮤린 IgG1 이소타입 대조표준 조합
- [0534] 8. RX1 및 5A1 조합
- [0535] 9. 래트 IgG1 이소타입 대조표준 플러스 요법 X
- [0536] 10. 뮤린 IgG1 이소타입 대조표준 플러스 요법 X
- [0537] 11. RX1 항-인간 MCSF 플러스 요법 X
- [0538] 12. 5A1 래트 IgG1 항-마우스 MCSF 플러스 요법 X
- [0539] 13. 래트 IgG1 및 뮤린 IgG1 이소타입 대조표준 조합 플러스 요법 X
- [0540] 14. RX1 및 5A1 조합 플러스 요법 X
- [0541] 투여량: 0.1 내지 30mg/kg 항체가 각각의 동물에 투여되었다. 바람직한 투여량은 10mg/kg이었다. 투여 루트는 IV, IP, SC 일 수 있다. 바람직한 루트는 IP 이다. 실시예 5에 기재된 바와 같이 종양 세포를 주입한 다음날부터 치료를 시작하였다.
- [0542] 측정: 다양한 치료 그룹 간에 뼈용해의 심각성을 평가하기 위해서, 각 마우스에 종양 세포를 주입한 다음날에 기준선 렉시트론 이미지를 얻었다. 렉시트론 이미지는 또한 연구 종료일에 얻어졌다(8주). 종양 세포가 안정적으로 루시페라제를 발현한 후에 제노젠 시스템을 사용하여 종양 성장을 동시에 측정하였다. 암전이와 연관된 중증 뼈용해 질병을 치료 및 예방을 위한 조합 요법은 항체 요법만을 사용한 경우에 비교하여 개선될 것이라는 것이 기대된다.
- [0543] 실시예 8
- [0544] 다음 실시예는 M-CSF 특이적 항체가 플루오로센스-활성 세포 분류기를 사용하여 예를 들어, 유방암 세포(세포주 MDA231) 또는 다중 골수종 암세포(세포주 ARH77)에 결합하는지를 평가하기 위한 프로토콜을 제공한다.
- [0545] 우선, PBS(Ca²⁺, Mg²⁺ 없음)로 세포를 2회 세척하였다. 각각 10cm 플레이트의 경우에, 3mM EDTA 2ml 를 첨가하고, 세포가 원형을 형성하고 디쉬로부터 분리되기 시작할 때까지, 플레이트를 2-3분동안 37°C에서 배양하였다. 그 다음, 완충액 A(PBS + 5% FBS) 10ml를 첨가하고 혼합하였다. 그 때, 세포를 펠렛화하고 PBS + 5% FBS 에서 약 5 x 10⁶ 세포/ml로 재현탁한 다음, 세포를 100µl/샘플로 튜브에 배치하였다.
- [0546] 이때, 0.1-10 µg/ml의 1차 항체(M-CSF 항체 또는 대조표준 항체의 표시된 농도로 사용됨)를 첨가하였다. 필요한 경우에는, 5% FBS/PBS 중에서 희석하였다. 그 다음, 혼합물을 4°C에서 30분 동안 배양하였다. 배양 기간 후에, 5분동안 400g씩 원심분리에 의해서 3번 세척하였고, 세포를 PBS에서 재현탁하였다.
- [0547] FITC 또는 PE-표지된 항-IgG 항체(0.25ug/샘플)을 1% BSA/PBS 중에서 최적의 희석물로 희석하였고, 세포를 용액 중에서 재현탁하였고 4°C에서 30분동안 배양하였다. 그 다음, 세포를 상기에 기재된 바와 같이 3회 세척하였다. 세포를 세척한 다음, (죽은 세포와 생존 세포를 구별하기 위해 필요한 경우에는) 세포를 0.5ml/샘플 PI-PBS를 사용하여 재현탁하였다. 나중의 분석을 위해서 세포를 고정할 수 있다(세포가 0.1% 포름알데히드로 고정된 경우에, 세포는 약 3일 지속된다). 그 다음, 표준 절차를 사용하여 플루오로센스-활성 FACS 중에서 분석하였다.
- [0548] 도 8A 및 8B에서 도시된 바와 같이, MCSF-특이적 항체 RX1은 표시된 바와 같이 다양한 항체 농도로 유방암 세포 주 MDA231 또는 다발성골수종 세포주 ARH77 에 결합되었다.
- [0549] 실시예 9
- [0550] 다음 실시예는 M-CSF가 다양한 암세포 표면에서 우세하다는 것을 보여준다. 다음과 같이, M-CSF-특이적 항체 RX1을 사용하여 M-CSF의 면역조직화학 염색을 수행하였다.
- [0551] 개시에 있어서, 슬라이드를 55-60°C에서 1시간 동안 오븐에서 가열하였고 2-3분 동안 냉각되도록 하였다. 다음 탈락성 및 재수화 매개변수를 사용하였다.
- [0552] a. 크실렌 3 x 5 분
- [0553] b. 100% 시약 알코올 2 x 5 분

- [0554] c. 95% 시약 알코올 2 x 4 분
- [0555] d. 75% 시약 알코올 2 x 3 분
- [0556] e. 50% 시약 알코올 1 x 3분
- [0557] g. dI H₂O 2-3 빠른 린스
- [0558] 페록시드 차단 단계 전에, 1x 바이오제넥스 시트라 플러스를 사용하여 수복 항원을 제조하였다. 용액을 일단 총 전력 마이크로파로 가열하여 비등하도록 하였다. 일단 용액을 가열한 다음, 파워 레벨 2에서 13분 동안 더 빠르게 마이크로파를 가한 다음, 진행 전에 냉각되도록 하였다. 페록시드 차단 단계를 다음과 같이 수행하였다. 슬라이드를 3% H₂O₂ (25ml 30% 내지 250ml dI H₂O)에 담구었고, 실온에서 10분 동안 방치하였다. 그 다음, 슬라이드를 dI H₂O로 2 x 린스하였고 1x PBS 2 x 2 분 세척하였다.
- [0559] 아비딘/비오틴 차단 과정을 다음과 같이 수행하였다. 슬라이드를 금속 선반에 편평하게 배치하였다. 블루 PAP 펜을 사용하여 조직을 에워쌌다(소수성 슬라이드 마커). 그 다음, 2 방울의 지메드 아비딘(시약 A)-조직을 덮기에는 충분함-을 첨가하고 슬라이드를 10분동안 실온에서 배양하였다. 배양 후에, 슬라이드를 다음과 같이 세척하였다.
- [0560] 1 x PBS 중에서 2 x 3 분 세척
- [0561] 2방울의 지메드 비오틴(시약 B), 10분 동안 실온
- [0562] 1 x PBS 중에서 2 x 3 분 세척
- [0563] 다음과 같이 단백질 차단 절차를 수행하였다. 우선, 2차 항체 종의 (2% 최종 농도에 대하여) 10% 혈청을 첨가하였다. 그 다음, 바이오제넥스 파워 블락을 dI H₂O 를 사용하여 1 x 희석하였다. 슬라이드를 파워 블락에 실온에서 8분 동안 담근 다음, 슬라이드를 1 x PBS에서 2x 린스하였다.
- [0564] 1차 항체를 첨가한 경우에(RX1), 금속 선반에 슬라이드를 편평하게 배치하였다. 각각의 섹션(~350 μ l)을 덮도록 항체를 추가하였고, 조직을 스크랩하지 않고, (필요하다면) 피펫 팁으로 항체가 펼쳐지도록 하였다. 그 다음, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후에, 슬라이드를 각각 3-5분 동안 1 x PBS로 3 x 세척하였다. 이때, 바이오제넥스 멀티링크를 섹션에 적용하였고 실온에서 10-11분 동안 배양하였다. 그 다음, 매회 3분씩 섹션을 세척하였다.
- [0565] 섹션에 바이오제넥스 HRP 라벨을 적용함으로써 표지화를 수행하였고, 그 다음 10-11분 동안 실온에서 배양하였고, 1x PBS 3x3 분 세척하였다. 그 다음, 섹션에 바이오제넥스 H₂O₂ 기질을 첨가하였고(매 2.5ml H₂O₂ 마다 1 방울의 AEC), 실온에서 10분 동안 배양하였다. 그 다음, dI H₂O 로 섹션을 수차례 린스하였다. 다음과 같이 대비 염색 단계를 수행하였다. 섹션을 실온에서 1분동안 헤마토크실린으로 염색하였다. 그 다음, 섹션을 H₂O로 2회 린스하였고, 1분 동안 1 X PBS 에서 배양하였다. 그 다음, 섹션을 H₂O로 린스하여 PBS를 제거하였다. 섹션에 한방울의 바이오제넥스 슈퍼 마운트를 적용함으로써 섹션을 고정한 다음, 실온에서 하룻밤동안 공기 건조시켰다.
- [0566] 도 9에 도시된 바와 같이, M-CSF가 많은 암세포 표면에서 우세하였다. 표시된 암세포 형태에 대한 섹션이 다음과 같이 기록되었다.
- [0567] 0 염색 없음
- [0568] 1 백그라운드에 유사한 염색
- [0569] 2 양성, 그러나 약한 염색
- [0570] 3 양성이면서 유의한 염색
- [0571] 4 양성이면서 강한 염색
- [0572] 실시예 10
- [0573] 다음 실시예는 항체 MC1 및 MC3를 생산하는 방법을 도시한다. MC1 및 MC3는 인간 M-CSF 항체를 중화하고 인간 M-CSF에 결합하는 2개의 단일클론 무린 항체이다. 항체의 아미노산 서열은 각각 도 14 및 15에 기재된 바와 같

다. a) 재조합 M-CSF를 사용하여 Balb C 마우스를 면역화하는 단계; b) ELISA 포맷 중의 인간 M-CSF 에 결합하는 항체를 생산하는 양성 클론을 스크리닝하는 단계; c) 안정한 하이브리도마 클론을 생성하도록 양성 클론을 서브클로닝하는 단계; 및 d) 대량의 항체를 생산하도록 세포 배양물을 스케일링 업하는 단계; e) 앞선 실시예에 기재된 바와 같이 친화성 분석, 세포 결합, 및 중화 활성 분석에서 항체를 정제하고 특성화하는 단계를 포함하는 일련의 단계를 사용하여 아미노산 서열을 확인하였다.

[0574] 도 16A 및 도 16B는 각각 항체 RX1, 5H4, MC1 및 MC3의 중쇄 및 경쇄의 CDR 배열을 보여준다.

[0575] 인간화 및 Human Engineered™ 버전을 상기에 기재된 바와 같이 생성하였다.

[0576] 실시예 11

[0577] 이 실시예는 M-CSF 항체 RX1 및 5H4, 및 그것의 Fab 단편이 서로 다른 중화 활성을 갖는다는 것을 보여준다. 다음 실시예는 또한 항체 RX1, 5H4, 및 MC3가 M-CSF에 대하여 다양한 친화성을 갖는다는 것을 보여준다. 이 실시예는 앞에 언급된 손상되지 않은 항체의 친화성이 앞서 언급된 항체의 Fab 단편에 비하여 매우 높다는 것을 더 입증한다.

[0578] 다양한 농도의 항체 존재하에서 M-CSF 의존성 세포 증식을 측정하는 것에 의해서 손상되지 않은 RX1 및 5H4 대 RX1 및 5H4의 Fab 단편의 중화 활성을 측정하였다. 화학발광 염료로 세포 증식을 결정하였다. 도 17에 도시된 바와 같이, 손상되지 않은 RX1은 가장 높은 효능을 갖는 반면에, RX1의 Fab 단편은 그것의 효능을 상실하였고 5H4 및 5H4 Fab 단편과 같이 거동하였다.

[0579] 비아코아 분석을 사용하여 앞서 언급된 항체의 결합 성질을 분석하였다. M-CSF에 RX1, 5H4, 및 MC3의 상대적인 친화성을 측정하기 위해서, 아민 커플링에 의해서 CM5 바이오센서 칩에 래빗 항-마우스 Fc를 고정시켰다. 그 다음, 앞서 언급된 항체를 2 μ l/분씩 3분 동안 1.5 μ g/ml로 항-마우스 Fc/CM5 바이오센서 칩에서 캡쳐하였다. 다양한 농도로 MCSF를 변형된 바이오센서 표면에 유동시켰다($R_{max} \sim 15$). 시험 항체 및 항원을 0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% 계면활성제 P20(HBS-EP) 중에서 희석하였다. 모든 실험은 25 $^{\circ}$ C에서 수행하였다. 동역학 및 친화성 상수를 1:1 상호작용 모델/글로벌 피트를 갖는 비아이벨류에이션 소프트웨어(Biacore)를 사용하여 결정하였다. 표 8에 기재된 바와 같이, RX1은 5H4 및 MC3에 대하여 가장 높은 친화성으로 M-CSF에 결합한다.

표 8

	Ka (M-1 Sec-1)	Kd (sec-1)	KD (nM)
RX1	1.64e6	2.7e-4	0.16
5H4	5.94e5	1.77e-3	3.0
MC3	7.04e5	1.93e-4	0.27

[0580]

[0581] 손상되지 않은 Mab 및 RX1, 5H4, 및 MC3의 Fab 단편의 결합 친화성에 있어서 상대적인 차이를 결정하기 위해서, 비아코아 분석에 있어서 서로 다른 구성을 사용하였다. 특히적으로, M-CSF를 아민 커플링에 의해서 CM5 바이오센서 칩상에 고정하였다. 5분 동안 분당 1 μ l씩 10mM Na 아세테이트 pH 4.0 중에 0.05 μ g/ml M-CSF를 주입하여 RL=6-12 RU가 되도록 하였다. 다양한 농도의 시험 항체(또는 Fab 단편)를 변형된 바이오센서 표면에 유동시켰다. 시험 항체를 0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% 계면활성제 P20(HBS-EP) 중에서 희석하였고 모든 실험은 25 $^{\circ}$ C에서 수행하였다. 동역학 및 친화성 상수를 1:1 상호작용 모델/글로벌 피트를 갖는 비아이벨류에이션 소프트웨어(Biacore)를 사용하여 결정하였다. 표 9에 기재된 바와 같이, RX1은 RX1 홀로단백질에 대하여 유의하게 낮은 친화성으로 M-CSF에 결합한다.

표 9

	Ka (M-1 Sec-1)	Kd (sec-1)	KD (nM)
rRX1(마우스)	2.34e5	2.35e-4	1.0
rRX1 Fab (마우스)	2.81e5	3.03e-3	10.8
5H4	1.27e5	1.26e-3	9.9
5H4 Fab	2.04e5	2.85e-3	14.0

[0582]

[0583] 결합 친화성 및 중화 데이터는 RX1의 중화 활성이 일차적으로 M-CSF에 대한 그것의 현저하게 높은 친화성에 기인한다는 것과, 높은 친화성은 적어도 부분적으로 항체의 2개의 팔이 M-CSF 이량체에 동시에 결합하는 능력에 기인할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0584] 실시예 12

[0585] 이 실시예는 항체 RX1, 5H4, 및 MC3에 의해서 인식된 M-CSF상의 선형 에피토프(즉, 아미노산 서열)를 나타낸다.

[0586] 우선, 항체 RX1, 5H4, 및 MC3가 M-CSF 내의 선형 에피토프 또는 입체적 에피토프를 인식하는지를 결정하기 위해서 에피토프 맵핑 전략을 설계하였다. 따라서, 감소 및 비감소 조건하에서 0.1 μ g M-CSF 에 대한 항-M-CSF 항체를 시험하였다. 단비 비감소 형태의 M-CSF만이 각각의 항체에 의해서 인식되었고, 이것은 에피토프가 자연에서 비연속적이라는 것을 암시한다.

[0587] 그 다음으로, 각 항체에 대하여 M-CSF의 선형 에피토프를 측정하였다. 특히적으로, 관심의 M-CSF 단편 서열(1개의 아미노산 오프셋으로 합성된 오버랩 10mer 펩티드) 셀룰로스 멤브레인 지지체 상에 로딩되어 있는 SPOT 멤브레인(시그마 제노시스)를 제조하였다. 이들 멤브레인을 앞서 언급된 항체를 사용하여 프로브하였고 반응성 SPOT를 확인하였다. 그 다음, 펩티드 서열을 멤브레인 상의 대응 위치에서 확인하였고, 양성 반응 펩티드 내의 오버랩 아미노산을 에피토프로서 동정하였다. 도 18에 도시된 바와 같이, RX1은 5H4 및 MC3보다는 서로 다른 선형 에피토프에 결합하고, 이것은 M-CSF에서 서로 다른 위치를 차지한다. RX1은 RFRDNTPN(SEQ ID NO:120) 또는 RFRDNTAN(SEQ ID NO:121), 도 12의 M-CSF의 아미노산 98-105로 표시되는 선형 에피토프에 결합한다. 5H4는 (1) ITFEFVDQE(SEQ ID NO:122), 도 12의 M-CSF의 아미노산 65-73, 및 (2) FYETPLQ (SEQ ID NO:123), 도 12의 M-CSF의 아미노산 138-144로 표시되는 선형 에피토프에 결합한다.

[0588] 실시예 13

[0589] 상기 실시예 4A에 기재된 바와 같이 제조된 RX1 항체의 Human Engineered™ 버전의 결합 친화성을 측정하였다. 이 실시예는 서로 다른 IgG 서브클래스 항상 영역을 갖는 Human Engineered™ 항체가 체외에서 서로 다른 친화성을 갖는 M-CSF에 결합한다는 것을 나타낸다. 비아코어 분석에 의한 손상되지 않은 항체의 결합 친화성에 있어서 상대적인 차이점을 측정하기 위해서, 아민 커플링을 통해 CM5 바이오센서 칩상에 M-CSF를 고정하였다. 10mM Na-아세테이트 pH 4.0 중의 0.05 μ g/ml M-CSF를 5분 동안 1 μ l/분으로 5분 동안 주입하여 RL=6-12 RU가 되도록 하였다. Fab 단편의 시험 항체를 2배 희석물 중의 100nM 내지 1.5nM의 다양한 농도 범위로 변형된 바이오센서 표면 상에서 유동시켰다. 시험 항체를 0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% 계면활성제 P20(HBS-EP) 중에서 희석하였고, 모든 실험은 25℃에서 수행하였다. 각각의 농도 포인트 및 완충액 블랭크를 삼중으로 수행하였고, 데이터를 결합 3분 및 해리 8분 동안에 수집하였다. 동역학 및 친화성 상수를 1:1 상호작용 모델/글로벌 피트를 갖는 비아이벨류에이션 소프트웨어(Biacore)를 사용하여 결정하였다. 표 10에 기재된 바와 같이, heRX1-1.G1 및 heRX1-1.G4는 가장 무린 RX1-M-CSF 결합 친화성과 흡사한 친화성으로 M-CSF에 결합한다.

표 10

항 체	ka ($M^{-1} sec^{-1}$)	kd (sec^{-1})	KD (nM)
뮤린 RX1 n=21	$(2.23 \pm 0.35) \times 10^5$	$(1.56 \pm 0.67) \times 10^{-4}$	0.7 ± 0.27
heRX1-1.G2 n=5	$(2.36 \pm 0.18) \times 10^5$	$(1.37 \pm 0.24) \times 10^{-3}$	5.9 ± 1.4
heRX1-10.G2 n=2	$(1.73 \pm 0.29) \times 10^5$	$(1.1 \pm 0.11) \times 10^{-3}$	6.3 ± 1.7
heRX1-1.G1	2.50×10^5	2.38×10^{-4}	0.95
heRX1-1.G4	2.07×10^5	2.93×10^{-4}	1.42

[0590]

[0591] 대조적으로, 표 11에서 알 수 있는 바와 같이, 결합 친화성에 얼마간의 변형이 있었지만, 모든 감마-2 구조체는 부모 뮤린 항체에 비교하여 결합 친화성에 있어서 적어도 7-배의 감소를 나타냈다.

표 11

항 체	ka ($M^{-1} sec^{-1}$)	kd (sec^{-1})	KD (nM)
뮤린 RX1 n=21	$(2.23 \pm 0.35) \times 10^5$	$(1.56 \pm 0.67) \times 10^{-4}$	0.7 ± 0.27
heRX1-1.G2 n=5	$(2.36 \pm 0.18) \times 10^5$	$(1.37 \pm 0.24) \times 10^{-3}$	5.9 ± 1.4
heRX1-2.G2	2.18×10^5	1.65×10^{-3}	7.6
heRX1-3.G2	2.01×10^5	1.18×10^{-3}	5.9
heRX1-4.G2	2.38×10^5	1.08×10^{-3}	4.6

[0592]

heRX1-5.G2	1.75×10^5	1.29×10^{-3}	7.4
heRX1-6.G2	1.88×10^5	1.49×10^{-3}	7.9
heRX1-7.G2	1.57×10^5	1.49×10^{-3}	9.5
heRX1-8.G2	1.52×10^5	1.48×10^{-3}	9.8
he RX1-9.G2	2×10^5	1.44×10^{-3}	7.2
heRX1-10.G2 n=2	$(1.73 \pm 0.29) \times 10^5$	$(1.1 \pm 0.11) \times 10^{-3}$	6.3 ± 1.7

[0593]

[0594] 실시예 14

[0595] 이 실험은 서로 다른 IgG 서브클래스 항상 영역을 갖는 Human Engineered™ RX1 항체가 체외에서 서로 다른 중화 활성을 포함한다는 것을 나타낸다. M-CSF 항체의 중화 활성을 시험하기 위해서, M-NFS-60 세포의 증식 분석을 사용하였다(아메리칸 타입 컬처 콜렉션, 수탁번호 CRL-1838, 미국, MD, 록빌에서 ATCC로부터 입수가 가능함, Cas-Br.MuLV 야생형 마우스 에코트로픽 레트로바이러스로 유도된 골수성 백혈병으로부터 유래된다).

[0596] 세포주는 인터류킨 3 및 M-CSF 모두에 반응하고 레트로바이러스의 통합에 의해서 생성된 절단된 c-myc 압원성 유전자를 포함한다. M-NFS-60의 증식은 투여량 의존적인 방식으로 활성 M-CSF를 필요로 한다. 분석에서, M-NFS-60 세포를 세척하고 10% FBS 및 1% Pen/Strep을 함유하는 RPIM 1640 배지에 플레이팅하였다. (3000U/ml의 M-CSF 활성과 동량으로, 10ng/ml의 최종 농도)의 재조합 인간 M-CSF를 인큐베이터 중의 5% CO₂에서 37°C에서 1 시간 동안 1ug/ml 내지 0.5ng/ml의 다양한 항체 농도로 배양하였다. 배양 다음에, 혼합물을 96웰 마이크로타이터 플레이트 중의 M-NFS-60 배양물에 첨가하였다. 웰 당 총 분석 부피는 10ng/ml M-CSF를 갖는 100ul였고, 항체 농도가 표시되었다. 세포 수를 CellTiter Glo 분석(Promega)에 의해서 정량화하기 전에 72시간 동안 5% CO₂하에서 37°C에서 배양하였다. 각각의 항체를 삼중으로 시험하였고, 다음날 반복하였다(항체마다 총 6번의 분석). 각각의 항체의 IC₅₀을 커브 피트에 의해서 분석하였다.

[0597] 혈청 중의 인간 MCSF, MDA231 조정 배지(M-CSF 함유), 혈청 중의 시노모로고스 몽키 MCSF, 및 시노모로고스 몽키 재조합 MCSF를 사용하여 분석을 반복하였다. 결과는 CellTiter Glo 분석으로부터 구입한 형광 해독으로서 도 25(재조합 MCSF), 26(혈청 중의 인간 MCSF) 및 27(MDA231 조정 배지)에 제시되어 있으며, 세포 수에 선형이다. 항체의 중화 활성은 M-NFS-60 세포 증식의 억제로서 입증된다.

[0598] 결과는 heRX1-1-IgG1 및 heRX1-1-IgG4의 IC₅₀은 재조합 무린 부모 RX1 항체와는 대체로 동일한 반면에, heRX1-1-IgG2의 IC₅₀은 약 2배 내지 4배 높은 것으로 나타났다.

[0599] 하기 표 12는 실시예 4A의 기재에 따라 제조된 다양한 IgG2 구조체의 상대적인 IC₅₀을 나타낸다(IC₅₀ 몇 배 손실의 측면에서). 이들 구조체 중에서, heRX1-1.G2 및 heRX1-10.G2는 IC₅₀중에서 가장 적은 감소를 나타낸다.

표 12

항체	IC ₅₀ 몇배 손실
heRX1-1.G2	2.8x
heRX1-2.G2	3.1x
heRX1-3.G2	5.3x
heRX1-4.G2	4.6x
heRX1-5.G2	6.5x
heRX1-6.G2	5.9x
heRX1-7.G2	6.1x
heRX1-8.G2	5.9x
heRX1-9.G2	3.6x
heRX1-10.G2	2.2x
heRX1-1.G1	손실 없음
heRX1-1.G4	손실 없음
heRX1-10.G1	손실 없음
heRX1-10.G4	손실 없음

[0600]

[0601] 실시예 15

[0602] 이 실시예는 서로 다른 IgG 서브클래스 항상 영역을 갖는 Human Engineered™ RX1 항체가 체외 파골세포생성 분석에 있어서 서로 다른 TRAP 활성을 보유한다는 것을 나타낸다.

[0603] 본원에 기재된 실험 조건하에서 인간 골수 CD34+ 세포(Biowhittaker 카탈로그 번호 2M-101A, 3 x 10⁵ 세포/바이알)가 파골세포로 분화되도록 유도되었다. 실험 1일에, CD34+ 세포를 1개의 냉동 바이알로부터 10ml의 배지로 해동시켰다(10% FCS를 갖는 MEM, 1 x Pen Strep 및 1 x fungizone). 일단 세포를 세척하고 2ml 배지에서 재현탁하였고, 웰당 100ul로 96웰 플레이트에 놓았다. 2일째에, 처음 배지를 제거하지 않고, 4 x CSF-1 50ul 내지 최종 농도 30ng/ml 및 4 x RANKL 50ul (sRANKL, Chemicon 카탈로그 #GF091, 10ug/패키지) 내지 최종 농도 100ng/ml를 각각의 웰에 첨가하였다. 7일째에, 5 x RANKL 50ul 내지 최종 농도 100ng/ml를 각각의 웰에 첨가하였다. 17일째에, TRAP 활성을 검사하기 위해서 세포를 염색하였고(TRAP 염색 용 류코사이트 에시드 포스파타제 키트, 시그마 카탈로그 번호 387-A), 현미경으로 검사하였다.

[0604] M-CSF-중화 항체를 분석 2일째에 첨가하였다. 항체는 도 28에서 도시된 바와 같이 투여량 의존적 방식으로 파골세포 분화를 억제하였다. 파골세포 분화 분석에 있어서 항체의 억제 활성은 분석 17일에 식별가능한 파골세포로서 관찰된다.

[0605] 실시예 16

[0606] 서로 다른 IgG 서브클래스 항상 영역을 갖는 Human Engineered™ RX1 항체를 더 특성화하였다.

[0607] MCSF로 형성된 다양한 Human Engineered™ RX1 항체 복합체를 동량의 몰 비율로서 완충액 중에서 M-CSF 및 항체를 조합하는 것에 의해서, 그리고 크기 배척 크로마토그래피 또는 광산란을 사용하는 항원-항체 복합체의 크기 분석에 의해서 연구하였다. 결과는 무린 부모 RX1은 약 200kDa의 MCSF와 1:1 복합체를 형성하는 것으로 나타났다.

다. heRX1-9.G2 또는 1-10.G2 항체는 2×10^6 Da보다 큰 MCSF와 약 400kDa의 MCSF와 커다란 격자 응집을 형성하는 것으로 나타났다. IgG1 및 IgG4 구조체는 무린 부모 RX1의 것과 유사한 작은 복합체를 형성하였다.

- [0608] heRX1-1.G4의 감소 및 비-감소 SDS-PAGE의 변성은 예상된 바와 같이, IgG4 버전이 반(half)-항체를 형성하는 것으로 나타났다.
- [0609] 본 명세서 및/또는 출원 데이터 시트에 언급된 상기의 모든 U.S. 특허, U.S.공개특허출원, U.S.특허출원, 외국 특허, 외국 특허출원 및 특허가 아닌 공개문헌은 전체로서 본원에 참고문헌으로 수록되어 있다.
- [0610] 앞선 기재로부터, 본 발명의 특정 구체예는 예시의 목적으로 기재되어 있으며, 본 발명의 취지 및 범위 내에서 다양한 변형이 이루어질 수 있다는 것이 이해 될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0071] 도 1은 절단된 이량체 M-CSF 내 이황화 결합을 나타내는 위상 기하학 도해이다.
- [0072] 도 2는 점선으로 나타낸 모두 10개의 잔기가 표지되고 점선으로 나타낸 비-결정학적 대칭 축을 갖는 M-CSF의 C-알파 백본의 입체도해이다.
- [0073] 도 3은 MDA 231 및 MCF7로부터의 M-CSF 및 조건화 배지(CM) 간 활성을 유도하는 파골세포의 비교이다.
- [0074] 도 4A는 M-CSF-특이적 무린 항체 RX1(SEQ ID NO:2 및 4)의 아미노산 서열(ATCC 기탁 번호 PTA-6113 하에, 미국 버지니아주 마나사스 어메리칸 타입 걸쳐 콜렉슨과 함께 기탁된 플라스미드의 cDNA 삽입에 의해 코딩됨) 및 대응 핵산 서열(SEQ ID NO:1 및 3)을 보여준다. CDR 부위가 썬하여지고 굵게 나타낸다
- [0075] 도 4B 및 4C는 Studnicka 등의 W093/11794호에 따라 확인된 높은 위험(굵은 굵씨), 중간 정도의 위험(밀줄), 및 낮은 위험 잔기를 갖는, 각각 M-CSF 특이적 무린 항체 RX1 경쇄(SEQ ID NO:5) 및 중쇄(SEQ ID NO:6)의 아미노산 서열을 보여준다.
- [0076] 도 5A는 M-CSF 항체 RX1 및 5A1은 종 특이적임을 보여준다. 도 5B는 항체 MC1 및 MC3의 M-CSF 중화 활성을 보여준다.
- [0077] 도 6은 항체 RX1이 농도 5mg/kg에서 인간 이종 이식 모델 내 뼈용해를 억제함을 보여준다.
- [0078] 도 7은 5mg/kg의 농도로 인간 유방암 MDA-MB-231 지니는 누드 마우스에 투여되는 경우 전이의 수가 감소됨을 보여준다.
- [0079] 도 8A 및 8B는 M-CSF-특이적 항체가 유방암 셀라인 MDA-MB-231 또는 다발성 골수종 암셀라인 ARH77에 결합함을 보여준다.
- [0080] 도 9는 M-CSF가 수많은 암세포 표면 상에서 우세함을 보여준다.
- [0081] 도 10은 M-CSF α (SEQ ID NO:7)의 아미노산 서열이다.
- [0082] 도 11은 M-CSF β (SEQ ID NO:8)의 아미노산 서열이다.
- [0083] 도 12는 M-CSF γ (SEQ ID NO:9)의 아미노산 서열이다. DNA 서열 내 수많은 다형현상은 아미노산 차이를 결과로 할 수도 있다. 예를 들어, 공통적인 다형현상은 위치 104에서 Pro보다는 Ala를 제공한다.
- [0084] 도 13, 14, 및 15는 MCSF-특이적 무린 항체 5H4(SEQ ID NO: 10 및 11), MC1(SEQ ID NO:12 및 13)(ATCC 기탁 번호 PTA-6263 하에 기탁된 하이브리도마에 의해 생성됨) 및 MC3(SEQ ID NO:14 및 15)(ATCC 기탁 번호 PTA-6264 하에 기탁된 하이브리도마에 의해 생성됨) 각각의 아미노산 서열을 보여준다.
- [0085] 도 16A 및 B는 인간 M-CSF 특이적 무린 항체 RX1; 5H4; MC1; 및 MC3(SEQ ID NO: 16-38)의 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열의 CDR 부위의 배열이다.
- [0086] 도 17은 5H4에 대비한 RX1에 대하여 Fab 단편에 대비한 손상되지 않은 것의 중화 활성을 보여준다.
- [0087] 도 18은 하이라이트된 RX1, 5H4, 및 MC3 에피토프를 갖는 M-CSF의 구조를 보여준다(SEQ ID NO: 120, 122, 및 123).
- [0088] 도 19A는 다음을 보여준다: (a) 무린 RX1 중쇄(H=높은 위험, M=중간 위험, L=낮은 위험)에 대한 위험 라인, (b) RX1 중쇄 아미노산 서열(SEQ ID NO:6), (c) 가장 근접한 인간 일치 서열, Kabat Vh2 일치의 아미노산 서열로서,

RX1에 정렬됨(SEQ ID NO:39) 및 (d) 2개의 전형적인 Human Engineered™ 서열(SEQ ID NO: 41 및 43)을 생성하도록 만든 변화. 도 19B는 대응 핵산 서열(SEQ ID NO:40 및 42) 뿐만 아니라 "낮은 위험" 및 "낮은+중간 위험"으로 설계된, 2개의 전형적인 중쇄 Human Engineered™ 서열(SEQ ID NO:41 및 43)의 아미노산 서열을 보여준다.

[0089] 도 20A는 다음을 보여준다: (a) 무린 RX1 경쇄에 대한 위험 라인(H=높은 위험, M=중간 위험, L=낮은 위험), (b) RX1 경쇄 아미노산 서열(SEQ ID NO:5), (c) 가장 근접한 인간 일치 서열, Kabat Vk3 일치의 아미노산 서열로서, RX1에 정렬됨(SEQ ID NO:49) 및 (d) 2개의 전형적인 Human Engineered™ 서열(SEQ ID NO: 45 및 47)을 생성하도록 만들어진 변화. 도 20B는 대응 핵산 서열(SEQ ID NO:44 및 46) 뿐만 아니라 "낮은 위험" 및 "낮은+중간 위험"으로 설계된, 2개의 전형적인 중쇄 Human Engineered™ 서열(SEQ ID NO:45 및 47)의 아미노산 서열을 보여준다.

[0090] 도 21A는 다음을 보여준다: (a) 무린 RX1 경쇄에 대한 위험 라인(H=높은 위험, M=중간 위험, L=낮은 위험), (b) RX1 경쇄 아미노산 서열(SEQ ID NO:5), (c) 가장 근접한 인간 일치 서열, Kabat Vk3 일치의 아미노산 서열로서, RX1에 정렬됨(SEQ ID NO:49) 및 (d) 위치 54-56이 변화되지 않은(즉, 무린 서열을 유지함) 대안적인 전형적 아미노산 서열(SEQ ID NO: 48). 도 21B는 대응 핵산 서열(SEQ ID NO: 137 및 135) 뿐만 아니라, 2개의 전형적인 택일적 경쇄 Human Engineered™ 서열(SEQ ID NO: 48, 136)의 아미노산 서열을 보여준다.

[0091] 도 22A는 (a) 무린 RX1 경쇄에 대한 위험 라인(H=높은 위험, M=중간 위험, L=낮은 위험), (b) RX1 경쇄 아미노산 서열(SEQ ID NO:5), (c) 가장 근접한 인간 일치 서열, Vk6 하위군 2-2-(1) A14, RX1에 정렬됨(SEQ ID NO: 50) 및 (d) 2개의 전형적인 Human Engineered™ 서열(SEQ ID NO: 51 및 53)을 생성하도록 만들어진 변화. 도 22B는 대응 핵산 서열(SEQ ID NO: 52) 뿐만 아니라 "낮은 위험" 및 "낮은+중간 위험"으로 설계된, 2개의 전형적인 경쇄 Human Engineered™ 서열(SEQ ID NO: 51 및 53)의 아미노산 서열을 보여준다.

[0092] 도 23A 및 23B는 Kabat 넘버링 시스템을 사용하여("POS"라 칭해진 선에서 나타난 아미노산 넘버링)(SEQ ID NO: 55-82) 각종 인간 일치 및 인간 생식 계열 일치 서열을 갖는 무린 RX1 경쇄 아미노산 서열(SEQ ID NO: 54)의 정렬을 보여준다.

[0093] 도 24A 및 24B는 Kabat 넘버링 시스템("POS"라 칭하여진 선으로 나타난 아미노산 넘버링)(SEQ ID NO: 84-112)을 사용하여 각종 인간 일치 및 인간 생식 계열 일치 서열을 갖는 무린 RX1 중쇄 아미노산 서열(SEQ ID NL: 83)의 정렬을 보여준다. 도 24C-24E는 항체 5H4, MC1 및 MC3의 아미노산 잔기가 Kabat 넘버링 시스템에 얼마나 대응하는지를 보여준다(각각, SEQ ID NO: 10 및 11; SEQ ID NO: 12 및 13; SEQ ID NO: 14 및 15).

[0094] 도 25는 rmRX1으로 표시된 재조합 무린 RX1 항체에 의해 재조합 인간 MCSF의 비교상의 중화, 및 각각 heRX1-1.G1, heRX1-1.G2, 및 heRX1-1.G4로서 표시된 상이한 불변 영역(IgG1, IgG2 또는 IgG4)를 갖는 3개 버전의 Human Engineered™ RX1-1 항체(모두 낮은 위험 변화가 이루어졌음)를 보여준다.

[0095] 도 26은 rmRX1으로 표시된 재조합 무린 RX1 항체에 의한 인간 혈청의 비교상의 중화 및 각각 RX2, RX1-1-IgG2, RX1-1-IgG1, RX1-1-IgG1, RX1-1-IgG4, RX1-a-IgG4와 같이 표시된 상이한 불변 영역(IgG1, IgG2 또는 IgG4)를 갖는 몇가지 상이한 버전의 heRX1-1(모든 낮은 위험 변화가 이루어졌음)을 보여준다.

[0096] 도 27은 재조합 무린 RX1 항체, rmRX1에 의한 MDA231(유방암 셀라인) 배지의 비교상의 중화, 및 각각이 RX2, RX1-1-IgG2, RX1-1-IgG1, RX1-1-IgG1, RX1-1-IgG4, RX1-a-IgG4로서 표시된 상이한 불변 부위(IgG1, IgG2 또는 IgG4)를 갖는 몇가지 상이한 버전의 heRX1-1(모든 낮은 위험 변화가 이루어졌음)을 나타낸다.

[0097] 도 28은 재조합 무린 RX1 항체, rmRX1의 과글세포형성에 관한 영향력, 및 각각 heRX1-1. IgG1 및 heRX1-1.IgG2로 표시된 상이한 불변 영역(Ig1 또는 IgG2)을 갖는 2개의 상이한 버전 heRX1-1을 보여준다.

[0098] 도 29A는 낮은 위험 아미노산 변화를 갖는 RX1-1.IgG1에 대한 아미노산(SEQ ID NO: 114) 및 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO: 113)을 나타낸다. 도 29B는 낮은+중간의 위험 아미노산 변화를 갖는 heRX1-1.IgG1에 대한 아미노산(SEQ ID NO:116) 및 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:115)을 보여준다.

[0099] 도 30은 낮은 위험 아미노산 변화를 갖는 heRX1-1.IgG4에 대한 아미노산(SEQ ID NO: 119) 및 뉴클레오티드 서열(cDNA(SEQ ID NO: 11))을 보여준다.

[0100] 상세한 설명

- [0101] 전이하는 능력은 암의 정의적 특성이다. 전이는 신체의 다른 부분으로의 암세포의 분포 또는 이 분포에 의해 생성된 상태를 나타낸다. 전이는 세포의 유전물질의 변화, 1차 종양을 형성하기 위해 변경된 세포의 비역제성 증식, 1차 종양을 위한 새로운 혈액 공급의 발달, 1차 종양으로부터의 세포에 의한 순환적 시스템의 침입, 신체의 다른 부위로의 1차 종양 세포의 작은 덩어리의 확산, 및 이들 부위 내 2차 종양의 성장을 포함하는 복합적 단단계 과정이다.
- [0102] 뼈는 인간 유방암, 폐암, 전립선암 및 갑상선암, 및 기타 암에서 가장 일반적인 전위의 부위 중 하나이며, 부검에서 60%의 암 환자가 뼈 전이를 갖는 것으로 밝혀졌다. 뼈용해성 뼈전이는 다른 기관에 대한 전이에서 나타나지 않은 파골세포 뼈 재흡수의 독특한 단계를 보여준다. 암 전이와 관련된 뼈 손실은 파골세포(무기물을 함유한 조직을 재흡수하기 위한 수용력을 갖는 다핵성 거대 세포)에 의해 매개되며, 이것은 종양 생성물에 의해 활성화되는 것으로 보인다.
- [0103] 대식세포 콜로니 자극 인자(M-CSF)로서도 알려진 콜로니 자극 인자(CSF-1)는 파골세포 형성에 중요한 것으로 밝혀졌다. 또한, M-CSF는 성숙한 파골세포의 파골세포 기능, 다른 가용성 인자들과 협력하여 그들의 이동 및 그들의 생존 및 골아세포 및 섬유아세포에 의해 생성된 세포 대 세포 상호작용을 조절하는 것으로 보였다(Fixe and Praloran, Cytokine 10: 3-7, 1998; Martin et al., Critical Rev. in Eukaryotic Gene Expression 8: 107-23 (1998)).
- [0104] 총-길이 인간 M-CSF mRNA는 554 아미노산의 전구체 단백질을 코딩한다. 대안적 mRNA 스플라이싱 및 분화된 전사 후 가수분해 과정을 통하여, M-CSF는 글리코프로테인 또는 프로테오글리칸을 함유하는 황산 콘드로이친으로서 순환으로 분비될 수 있거나 또는 M-CSF 생성 세포의 표면 상에서 막간 글리코단백질(membrane spanning glycoprotein)로서 표현될 수 있다. 인간 M-CSF의 박테리아 발현된 아미노 말단 150 아미노산의 3차원 구조, 시험관 내 생물학적 활성에서 완전을 위해 필요한 최소 서열은 4개의 알파 나선 번들 및 역-평행(anti-parallel) 베타 시트로 이루어진 각각의 모노머를 갖는 이황화 연결된 다이머이다(Pandit et al., Science 258: 1358-62(1992)). 3개의 별개의 M-CSF 종은 대안적인 mRNA 스플라이싱을 통해 생성된다. 3개의 폴리펩티드 전구체는 256 아미노산의 M-CSF α , 554 아미노산의 M-CSF β , 및 438 아미노산의 M-CSF γ 이다. M-CSF β 는 막-결합 형태에서 발생하지 않는 분비된 단백질이다. M-CSF α 는 단백질 가수분해 절단에 의해 서서히 방출되는 필수 구성요소의 막 단백질로서 발현된다. M-CSF α 는 도 10에서 제시한 아미노산 191-197의 서열에서 절단된다. M-CSF의 막-결합 형태는 가까운 세포 상의 수용체와 상호작용할 수 있으며 거기서 특이적인 세포 대 세포 접촉을 매개한다. 또한, 용어 "M-CSF"는 도 12의 아미노산 36-438을 포함할 수도 있다.
- [0105] M-CSF의 각종 형태는 표적 세포 상의 그것의 수용체 M-CSFR에 대한 결합에 의해 작용한다. M-CSFR은 5개의 세포외 면역글로불린-유사 도메인, 막투과성 도메인 및 세포내 방해된 Src 관련 티로신 키나제 도메인을 갖는 막간 분자이다. M-CSFR은 c-fms 프로토-발암유전자에 의해 코딩된다. M-CSFR의 세포외 도메인에 대한 M-CSF의 결합은 수용체의 이량체화를 유도하며, 이것은 세포외 키나제 도메인을 활성화하여, 자가인산화 및 다른 세포 단백질의 인산화를 유도한다(Hamilton J. A., J Leukoc Biol., 62 (2): 145-55 (1997); Hamilton J, A., Immuno Today., 18 (7): 313-7 (1997)).
- [0106] 인산화된 세포 단백질은 세포 반응을 유도하는 생화학적 이벤트의 캐스캐이드를 야기한다: 유사분열, 사이토카인의 분비, 막 파동운동, 및 그 자신의 수용체의 전사의 조절(Fixe and Praloran, Cytokine 10: 32-37(1998)).
- [0107] M-CSF는 스트로마 세포, 골아세포, 및 기타 세포에서 발현된다. 또한, 그것은 유방암, 방광암, 및 난소암 세포에서 발현된다. 이들 종양 내 발현의 정도는 높은 등급 및 부실한 예후와 서로 관련이 있다(Kacinski Ann. Med. 27: 79-85 (1995); Smith et al., Clin. Cancer Res.1 : 313-25 (1995)). 유방 암종에서, M-CSF 발현은 관내(예비-침습적) 암에 반대로 침습적 종양 세포에서 우세하다(Scho11 et al., J. Natl. Cancer Inst. 86: 120-6 (1994)). 또한, M-CSF는 포유 동물 종양의 암으로의 진행을 촉진하는 것으로 나타났다(Lin et al., J. Exp. Med. 93: 727-39 (2001)). 유방암 및 난소 암에 대하여, M-CSF의 생성은 대식세포의 종양으로의 모집의 원인이 되는 것으로 보인다.
- [0108] 본원에서 나타낸 바와 같이, RX1, 5H4, MC1 또는 MC3 항체와 같은 M-CSF-특이적 항체는 전이성 암세포에 의한 파골세포 도입을 중화시키고 및/또는 암의 동물 모델 내 뼈에 대한 전이를 감소시킨다. 따라서, 본 발명은 암, 암 전이 및 암 전이와 관련된 뼈 손실을 치료 또는 예방하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다.
- [0109] 바람직한 항-M-CSF 항체 뮤린 RX1은 Studnicka 등의 Human EngineeredTM 방법에 기초한 인간에서 덜 면역성이도록 변형되었다. 바람직한 구체예에서, 중쇄 가변 영역의 8 내지 12 표면 노출된 아미노산 잔기 및 경쇄 부위 내

16 내지 19 표면 노출된 잔기가 항원 결합 또는 단백질 폴딩에 불리하게 작용하지 않는 듯한 것으로 결정된 위치에서 인간 잔기로 변형되었으며, 반면 인간 환경에 관하여 그것의 면역원성을 감소시킨다. 변형된 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 함유하는 합성 유전자는 인간 γ 중쇄 및/또는 κ 경쇄 불변 영역을 구성하고 연결되었다. 인간 중쇄 및 경쇄 유전자가 포유동물 세포에 도입되었으며 결과의 재조합 면역글로불린 생성물이 획득되고 특성화되었다. 5H4, MC1, 또는 MC3와 같은 다른 전형적인 항-M-CSF 항체가 유사하게 Human Engineered™ 된다.

- [0110] 용어 "RX 1-유도된 항체"는 하기 중 어떤 것을 포함한다:
- [0111] 1) 동종 결정을 위해 유사한 아미노산을 고려하여, 도 4에서 제시한 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일한 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하고, 및/또는 도 4에서 제시한 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일한 가변성 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 변이체를 포함하여, 도 4에서 제시한 아미노산 서열을 갖는 무린 항체 RX1의 아미노산 변이체;
- [0112] 2) 도 4에서 제시한 아미노산 서열을 갖는 무린 항체 RX1의 하나 이상의 상보성 결정 부위(CDR)을 포함하고, 바람직하게는 RX1 중쇄의 최소한 CDR3를 포함하고, 바람직하게는 2 이상, 또는 3 이상, 또는 4 이상, 또는 5 이상, 또는 모두 6 CDR을 포함하는 M-CSF-결합 폴리펩티드(무린 항체 RX1을 제외);
- [0113] 3) 도 19B 내지 22B에서 제시한 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖는 Human Engineered™ 항체 또는 도 19B 내지 22B의 원래의 Human Engineered™ 중쇄 또는 경쇄와 적어도 50% 아미노산 서열 동일성을 갖고, 더 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 85%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 및 가장 바람직하게는 적어도 95%로서, 예를 들어 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 및 100% 동일한 중쇄 또는 경쇄를 갖는 중쇄 또는 경쇄를 포함하는 그것의 변이체;
- [0114] 4) 도 19B 내지 22B의 Human Engineered™ 항체의 하나 이상의 CDR의 고도 위험 잔기를 포함하며, 바람직하게는 2 이상, 또는 3 이상, 또는 4 이상, 또는 5 이상, 또는 모두 6 CDR의 고도 위험 잔기를 포함하는 M-CSF-결합 폴리펩티드(무린 항체 RX1을 제외함);
- [0115] 5) 도 4B에서 제시한 고도 위험 아미노산 잔기를 보유하고, 도 4B에서 제시한 낮은 중간 위험 잔기에서 하나 이상의 변화를 포함하는 Human Engineered™ 항체 또는 변이체;
- [0116] 예를 들어, 도 4B에서 제시한 낮은 위험 잔기에서 하나 이상의 변화 및 중간 위험 잔기에서 보존적 치환을 포함하거나, 또는
- [0117] 예를 들어, 도 4B에서 제시한 중간 및 고도 위험 아미노산 잔기를 보유하고, 낮은 위험 잔기에서 하나 이상의 변화를 포함하며,
- [0118] 여기서 변화는 삽입, 결실 또는 치환을 포함하며 보존적 치환일 수도 있으며 또는 유전조작된 상체가 인간 경쇄 또는 중쇄 서열, 인간 생식 계열 경쇄 또는 중쇄 서열, 일치 인간 경쇄 또는 중쇄 서열, 또는 일치 인간 생식 계열 경쇄 또는 중쇄 서열에 더 근접한 서열이 되도록 야기할 수도 있으며;
- [0119] 그것은 M-CSF에 결합하는 능력을 보유한다. 이러한 항체는 바람직하게는 적어도 10^{-7} , 10^{-8} 또는 10^{-9} 이상의 친화성을 갖는 M-CSF에 결합하며 바람직하게는 M-CSF의 활성을 유도하는 파골세포형성을 중화한다.
- [0120] 유사하게, 용어 "MC3-유도된 항체"는 다음을 포함한다:
- [0121] 1) 동종 결정을 위한 유사한 아미노산을 고려하여, 도 15에서 제시한 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일한 가변 중쇄 아미노산 서열을 포함하고, 및/또는 도 15에서 제시한 바와 같은 아미노산 서열에 적어도 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일한 가변성 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 변이체를 포함하여, 도 15에서 제시한 아미노산 서열을 갖는 무린 항체 MC3의 아미노산 변이체;
- [0122] 2) 도 15에서 제시한 아미노산 서열을 갖는 무린 항체 MC3의 하나 이상의 상보성 결정 부위(CDR)을 포함하고, 바람직하게는, MC3 중쇄의 적어도 CDR3를 포함하며, 바람직하게는 2 이상, 또는 3 이상, 또는 4 이상, 또는 5 이상, 또는 모두 6개의 CDR을 포함하는 M-CSF-결합 폴리펩티드(선택적으로 무린 항체 MC3를 포함하거나 제외함);

- [0123] 3) 낮고, 중간 및 높은 위험 잔기를 확인하기 위해 도 24C-24E에서 제시한 Kabat 넘버링을 사용하여, Studnicka 등의 미국 특허 제 5,766,886호 및 본원의 실시예 4A에서 제시한 방법에 따라 무린 서열을 변경시킴으로써 생성된 Human Engineered™ 항체; 이러한 항체는 하기 중쇄 중 적어도 하나 및 하기 경쇄 중 적어도 하나를 포함하며: (a) 중쇄(여기서, 모든 낮은 위험 잔기들은 필요한 경우, 인간 기준 면역글로불린 서열과 동일한 잔기로 변형되었음) 또는 (b) 중쇄(여기서 모든 낮고 중간 위험 잔기들은 필요한 경우, 인간 기준 면역글로불린 서열과 동일한 잔기로 변형되었음), (c) 경쇄(여기서 모든 낮은 위험 잔기들은 필요한 경우, 인간 기준 면역글로불린 서열과 동일한 잔기로 변형되었음) 또는 (d) 경쇄(여기서 모든 낮고 중간 위험 잔기들은 필요한 경우, 인간 기준 면역글로불린 서열과 동일한 잔기로 변형되었음),
- [0124] 4) 원래의 Human Engineered™ 중쇄 또는 경쇄와 적어도 60% 아미노산 서열 동일성, 더 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 85%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 및 가장 바람직하게는 적어도 95%로서, 예를 들어, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 및 100% 를 포함하는 동일성을 갖는 중쇄 또는 경쇄를 포함하는 선행하는 단락(3) 내 전술한 항체의 변이체;
- [0125] 5) 도 15의 무린 MC3 항체의 하나 이상의 CDR의 고도 위험 잔기를 포함하고, 바람직하게는 2 이상, 또는 3 이상, 또는 4 이상, 또는 5 이상, 또는 모든 6개의 CDR의 고도 위험 잔기를 포함하는 M-CSF-결합 폴리펩티드(선택적으로 무린 항체 MC3를 포함하거나 제외함);
- [0126] 6) 무린 MC3 항체의 고도 위험 아미노산 잔기를 보유하고, 낮거나 중간 위험 잔기에서 하나 이상의 변화를 포함하는 Human Engineered™ 항체 또는 변이체;
- [0127] 예를 들어, 낮은 위험 잔기에서 하나 이상의 변화 및 중간 위험 잔기에서 보존적 치환을 포함하거나, 또는
- [0128] 예를 들어, 중간 및 고도 위험 아미노산 잔기를 보유하고 낮은 위험 잔기의 하나 이상의 변화를 포함하며,
- [0129] 여기서 변화는 삽입, 결실 또는 치환을 포함하며 보존적 치환일 수도 있거나 또는 유전 조작된 항체를 인간 경쇄 또는 중쇄 서열, 인간 생식 계열 경쇄 또는 중쇄 서열, 일치 인간 경쇄 또는 중쇄 서열, 또는 일치 인간 생식 계열 경쇄 또는 중쇄 서열에 보다 근접한 서열로 야기할 수도 있으며;
- [0130] 이것은 M-CSF에 대한 결합 능력을 보유한다. 이러한 항체는 바람직하게는 적어도 10^{-7} , 10^{-8} 또는 10^{-9} 이상의 친화성으로 M-CSF에 결합하고 바람직하게는 M-CSF의 활성을 유도하는 파골세포 형성을 증화한다.
- [0131] 용어 "5H4-유도된 항체" 또는 "MC1-유도된 항체"는 상기 설명에 따라서 유사하게 정의된다.
- [0132] 본원에서 상세히 설명되는 바와 같이, Human Engineered™ 항체 또는 변이체를 포함하여, RX1, 5H4, MC1 또는 MC3-유도된 항체는 IgG, IgA, IgM 또는 IgE와 같은 상이한 아이소타이프일 수도 있다. IgG 클래스의 항체는 상이한 불변 영역을 포함할 수도 있는데, 예를 들어, IgG2 항체는 IgG1 또는 IgG4 불변 영역을 디스플레이 하도록 변형될 수도 있다. 바람직한 구체예에서, 본 발명은 변형 또는 비변형된 IgG1 또는 IgG4 불변 영역을 포함하는 Human Engineered™ 항체 또는 변이체를 제공한다. IgG1의 경우에, 불변 영역, 특히 경첩 또는 CH2 영역에 대한 변형은 ADCC 및/또는 CDC 활성을 포함하는 작동자 기능을 증가 또는 감소시킬 수도 있다. 다른 구체예에서, IgG2 불변 영역은 항체-항원 집합체 형성을 감소시키기 위해 변형된다. IgG4의 경우에, 불변 영역, 특히 경첩 부위에 대한 변형은 반-항체의 형성을 감소시킬 수도 있다. 특이적인 전형적 구체예에서, IgG4 경첩 서열 Cys-Pro-Ser-Cys에서 IgG1 경첩 서열 Cys-Pro-Pro-Cys로의 돌연변이가 제공된다.
- [0133] IgG1 또는 IgG4 불변 영역을 함유하는 Human Engineered™ 항체는 IgG2 불변 영역을 함유하는 Human Engineered™ 항체와 비교하여 향상된 특성을 갖는 것으로 본원에서 나타낸다. IgG1 또는 IgG4 Fc 부위의 선택은 결합 친화성, MCSF 중화 활성, 및 항-파골세포 활성을 향상시켰다. 또한, IgG1 또는 IgG4 Fc 부위의 선택은 부모 무린 항체에 의해 형성된 것들과 매우 근접하게 유사한 항원-항체 복합체를 제공하였다.
- [0134] 따라서, 경첩 부위에서의 운동성은 이량체 항원 MCSF에 대한 항체의 결합 및 항체의 중화 활성에 현저하게 영향을 미치는 것으로 보인다. 본 발명은 일반적으로 변형 또는 비변형 IgG1 또는 IgG4 불변 영역을 포함하는 중쇄를 함유하는 항체의 제조를 고려하며, 특히, 경첩 및 CH2 도메인, 또는 바람직하게는 적어도 경첩 도메인은 결합 친화성 및/또는 이량체 항원으로부터의 항체의 느린 분열을 향상시킨다.

- [0135] 용어 "RX1-경쟁 항체"는
- [0136] 1) 비-뮤린 또는 비-설치류 단일 클론 항체는 도 4에서 제시한 완전한 경쇄 및 중쇄 서열을 갖는 뮤린 RX1과 같은 M-CSF의 동일한 에피토프에 결합한다:
- [0137] 2) 비-뮤린 또는 비-설치류 단일클론 항체는 도 12의 M-CSF의 아미노산 98-105의 적어도 4 인접 아미노산에 결합한다; 및
- [0138] 3) 비-뮤린 또는 비-설치류 단일클론 항체는 75% 이상, 80% 이상, 또는 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 또는 95% 이상까지, M-CSF에 대한 결합을 위해 도 4에서 제시한 완전한 서열을 갖는 뮤린 항체 RX1과 경쟁한다. 이러한 항체는 바람직하게는 적어도 10^{-7} , 10^{-8} 또는 10^{-9} 이상의 친환성으로 M-CSF에 결합하며 바람직하게는 M-CSF의 활성을 유도하는 파골세포 형성을 중화한다.
- [0139] 용어 "MC1-경쟁 항체" 또는 "MC3-경쟁 항체" 또는 "5H4-경쟁 항체"는 유사하게 각각 도 13, 14 또는 15에서 제시한 완전한 경쇄 및 중쇄 서열을 갖는 뮤린 5H4, MC1 또는 MC3 항체에 대한 기준, 및 항체에 의해 결합된 M-CSF의 에피토프, 예를 들어, 도 12의 아미노산 65-73 또는 138-144에 대한 기준(5H4 또는 MC3에 의해 인지되는 M-CSF 에피토프에 대응함)과 함께 정의된다.
- [0140] 선택적으로, 그것의 출원일 전에 공공연하게 개시되거나, 또는 그것이 출원일 전에 제출된 명세서에 개시된 임의의 키메라, 인간 또는 인간화 M-CSF 항체는 본 발명의 범주로부터 제외된다.
- [0141] "비-설치류" 단일클론 항체는 본원에서 널리 정의된 바와 같은 어떤 항체이며, 이것은 설치류 하이브리도마에 의해 생성된 완전한 손상되지 않은 설치류 단일클론 항체가 아니다. 따라서, 비-설치류 항체는 구체적으로 이에 한정되지는 않지만, 설치류 항체의 변이체, 설치류 항체 단편, 선형 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, Human Engineered™ 항체 및 인간 항체로서, 트랜스제닉 동물로부터 생산되거나 파지 디스플레이 기술을 통해 생산된 인간 항체를 포함한다. 이와 유사하게, 비-뮤린 항체는 뮤린 항체의 변이체, 뮤린 항체 단편, 선형 항체, 키메라, 인간화, Human Engineered™ 및 인간 항체를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.
- [0142] 본원에서 사용되는 바와 같이 "종양(tumor)"은 모든 종양(neoplastic) 세포 성장 및 증식, 악성 또는 양성, 및 모든 전-암성 및 암 세포 및 조직을 나타낸다.
- [0143] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 조절되지 않은 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물 내 생리학적 상태를 나타내거나 설명한다. 암의 예는 암종; 임파종, 모세포종, 육종, 및 백혈병을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 이러한 암의 더 특정한 예는 유방암, 전립선암, 결장암, 편평암 세포, 소-세포 폐암, 비-소세포 폐암, 위장암, 췌장암, 아교모세포종, 자궁 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암(hepatoma), 결장암, 자궁내막 암종(endometrical carcinoma), 침샘 암종, 신장암, 간암, 외음부 암, 갑상선암, 간장의 암종 및 각종 유형의 두경부암을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [0144] "치료"는 질병의 발달을 예방하거나 질병의 병리를 변경시키기 위한 의도로 수행된 간섭이다. 따라서, "치료"는 치료적 처리 및 예방 또는 방지적 조치를 나타낸다. 치료가 필요한 인간들은 이미 병에 걸린 인간들 및 질병이 예방되어야 하는 인간들을 포함한다. 종양(예를 들어, 암) 치료에서, 치료제는 종양 세포의 병리를 직접 감소시킬 수도 있으며, 또는 종양 세포가 기타 치료제, 예를 들어, 방사능 및/또는 화학요법을 더 받기 쉽도록 할 수도 있다. 뼈용해와 같이, 질병의 임상적, 생화학적, 방사성 물질에 의한 또는 객관적 증상으로 고통받는 환자의 치료는 이러한 증상의 일부 또는 전부를 경감시키거나 질병에 대한 소인을 감소시킬 수도 있다. 암의 "병리"는 환자의 안녕과 타협하는 모든 현상을 포함한다. 이것은 제한없이, 정상 또는 비억제성 세포 성장, 전이, 이웃 세포의 정상적 기능과의 간섭, 사이토카인의 방출 또는 비정상 수준의 기타 분비 생성물, 염증 또는 면역 반응의 억압 또는 악화 등을 포함한다. 따라서, 치료 후 향상은 감소된 종양 크기, 종양 성장율의 감퇴, 존재하는 종양 세포 또는 전이 세포의 파괴, 및/또는 전이의 크기 또는 수적 감소로서 명백해질 수도 있다.
- [0145] 치료의 목적을 위한 "포유동물"은 인간, 가축 및 사육 동물을 포함하는 포유동물, 및 개, 말, 고양이, 소 등과 같은 동물원, 스포츠, 또는 애완용 동물로서 분류된 임의의 동물을 나타낸다. 바람직하게, 포유동물은 인간이다.
- [0146] 본원에서 사용되는 바와 같이, 문구 "전이성 암"은 몸의 기타 부위, 특히 뼈로 확산되는 가능성이 있는 암으로서 정의된다. 각종 암은 뼈에 전이될 수 있지만, 가장 일반적인 전이성 암은 유방암, 폐암, 신장암, 다발성 골수종, 갑상선암 및 전립선암이다. 예로써, 뼈에 전이하는 잠재성을 갖는 다른 암은 선암, 백혈병 및 림프종을 포함하는 혈액 세포 종양; 두경부암; 식도암, 위암, 결장암, 대장암, 직장결장암, 직장암, 췌장암, 간암, 담즙

관 또는 담낭암을 포함하는 위장관암; 난소 암종, 자궁내막 암, 질암, 및 자궁경부 암을 포함하는 여성 생식관의 암; 방광암; 신경모세포종을 포함하는 뇌암; 육종, 골육종; 및 악성 흑색종 또는 편평 세포 암을 포함하는 피부암이다. 본 발명은 특히 뼈에서 중앙-유도성 골용해성 손상의 예방 및 처리를 고려한다.

[0147] 본원에서 사용되는 바와 같이, 구문 "치료적으로 유효한 양"은 본 발명의 구체예를 위해 적절할 수 치료 또는 예방적 M-CSF 항체의 양을 나타내며, 이것은 원하는 치료 계획에 따라서 투여되는 경우 치료 또는 예방적 효과 또는 반응을 유도할 것이다.

[0148] 본원에서 사용되는 바와 같이 인간 "M-CSF"는 이들 각각이 본원에서 참고로서 인용되는 문헌 [Kawasaki et al., Science 230: 291 (1985), Cerretti et al., Molecular Immunology, 25: 761 (1988)], 또는 [Ladner et al., EMBO Journal 6: 2693 (1987)]에서 설명된 성숙한 인간 M-CSF α , M-CSF β , 또는 M-CSF γ 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 인간 폴리펩티드를 나타낸다. 이들 용어는 상기 설명한 바와 같이, 성숙한 M-CSF가 상이한 아미노산 서열을 가지며, M-CSF의 활성 형태가 이황화 결합된 다이머라는 이해를 반영하며; 거기서, 용어 "M-CSF"가 생물학적으로 활성인 형태를 나타내는 경우, 이량체 형태를 의도한다. M-CSF 이량체"는 이량체화된 2개의 M-CSF 폴리펩티드 모노머를 나타내며 호모다이머(2개의 동일한 유형의 M-CSF 모노머로 이루어짐) 및 헤테로다이머(2개의 상이한 모노머로 이루어짐) 모두를 포함한다. M-CSF 모노머는 본원에서 참고로서 인용되는, 미국 특허 제 4,929,700호에서 설명된 바와 같이 시험관 내 M-CSF 다이머로 전환될 수도 있다.

[0149] **항-MCSF 항체**

[0150] 본 발명은 RX1, 5H4, MC1, 및/또는 MC3와 같은 M-CSF-특이적 항체, RX1, 5H4, MC1, 및/또는 MC3와 같은 M-CSF-특이적 항체를 포함하는 약학적 제제, 상기 약학적 제제를 제조하는 방법, 및 상기 약학적 제제 및 화합물로 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 용어 "항체"는 광의로 사용되며 완전히 집합된 항체, 단일클론 항체, 폴리클론 항체, 복합 특이적 항체(예를 들어, 이특이적 항체), 항원에 결합할 수 있는 항체 단편(예를 들어, Fab', F'(ab)2, Fv, 단일 사슬 항체, 디어바디), 및 원하는 생물학적 활성을 보이는 한 앞서 말한 것들을 포함하는 제조법 펩티드를 포함한다.

[0151] 본원에서 사용되는 바와 같이 용어 "단일클론 항체"는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터 획득된 항체를 나타내며, 즉, 집단을 포함하는 개개의 항체는 최소한의 양으로 존재할 수도 있는 가능한 천연발생 돌연변이를 제외하고 동일하다. 단일클론 항체는 매우 특이적이며, 단일 항원 자리에 대하여 향하게 된다. 더욱이, 전형적으로 상이한 결정소(에피토프)에 대하여 향하게 된 상이한 항체를 포함하는 전통적인 (폴리클론) 항체 제조와는 대조적으로, 각각의 단일클론 항체는 항원 상에 하나의 결정소에 대하여 향하게 된다. 그들의 특이성에 더하여, 단일 클론 항체는 그들이 상이한 특이성 및 특성을 갖는 다른 면역글로불린에 의해 오염되지 않은 균질의 배양액에 의해 합성된다는 면에서 이롭다.

[0152] 변형자 "단일클론"은 항체의 실질적으로 균질한 집단으로부터 획득된 바와 같은 항체의 특징을 나타내며, 어떤 특정한 방법에 의한 항체의 생성을 요구하는 것으로 해석되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라서 사용되는 단일 클론 항체는 [Kohler et al., Nature, 256: 495[1975]]에 의해 처음 설명된 하이브리도마 방법에 의해 만들어 질 수도 있으며, 또는 제조법 DNA 방법에 의해 만들어 질 수도 있다(예를 들어, 미국 특허 제 4,816,567호 참조). 또한, "단일클론 항체"는 예를 들어, 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624628 [1991] end Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]에서 설명된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수도 있다.

[0153] 그들의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라서, 면역글로불린은 상이한 클래스로 정하여질 수 있다. 5개의 주요 클래스, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있으며, 이들 중 몇몇은 서브클래스 또는 아이소타입, 예를 들어, IgG, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 더 나뉠 수도 있다. 상이한 클래스의 면역글로불린에 대응하는 중쇄 불변 도메인을 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 라 칭한다. 상이한 부류의 면역글로불린의 서브유닛 구조 및 3-디멘션 배열이 주지되어 있다. 상이한 아이소타입은 상이한 작동자 기능을 가지며; 예를 들어, IgG1 및 IgG3 아이소타입은 ADCC 활성을 갖는다.

[0154] "항체 단편"은 손상되지 않은 총 길이 항체, 바람직하게는 손상되지 않은 항체의 항원 결합 또는 가변 영역의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')2, 및 Fv 단편; 디어바디; 선형 항체(Zapata et al., Protein Eng., 8 (10): 1057-1062 (1995)); 단일-사슬 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다. 항체의 과파인 소화는 각각 단일 항원-결합 자리, 및 잔여 "Fc" 단편을 갖는 "Fab" 단편이라 불리는, 2개의 동일한 항원-결합 단편을 생성하며, 이것의 명칭은 즉시 35개를 결정화하는 그것의 능력을 반영한

다. 펩신 처리는 F(ab')₂ 단편을 수득하며, 2개의 "단일-사슬 Fv" 또는 "sFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는데, 이들 도메인드른 단일 폴리펩티드 사슬 내에 존재한다. 바람직하게, Fv 폴리펩티드는 VH 및 VL 도메인 간 폴리펩티드 링커를 더 포함하며, 이것은 Fv가 항원 결합을 위해 원하는 구조를 형성하도록 한다. sFv의 개관을 위해, [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol.113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조하시오.

[0155] 용어 "고도가변" 부위는 항원-결합에 대한 책임이 있는 항원의 아미노산 잔기를 나타낸다. 고도가변 영역은 상보성 결정 부위 또는 CDR로부터의 아미노산 잔기[즉, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에 의해 설명된 바와 같이 경쇄 가변 도메인 내 잔기 24-34(L1), 5-56(L2) 및 89-97(L3) 및 중쇄 가변 도메인 내 31-35(H1), 50-65(H2) 및 95-103(H3)] 및/또는 고도가변 루프로부터의 잔기[즉, 문헌 [Chothia et al., J. Mol. Biol. 196 : 901-917 (1987)]에 의해 설명된 바와 같이 경쇄 가변 도메인 내 잔기 26-32(L1), 50-52(L2) 및 91-96(L3) 및 중쇄 가변 도메인 내 26-31(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3)]를 포함한다.

[0156] "틀구조" 또는 "FR 잔기는 고도가변 영역 잔기를 제외한 그들 가변 도메인 잔기이다.

[0157] 용어 "디어바디"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 작은 항체 단편을 나타내며, 이 단편은 동일한 폴리펩티드 사슬(VH VL) 내 경쇄 가변 도메인(VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인(VH)을 포함한다. 동일한 사슬 상의 2개 메인 간 짝짓기를 허용하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 다른 사슬의 상보성 도메인과 짝을 이룰 수 밖에 없으며 2개의 항원-결합 부위를 생성한다. 디어바디는 예를 들어, [EP 404,097 ; WO 93/11161; 및 30 Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)]에서 보다 충분히 설명된다.

[0158] 일부 구체예에서, 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대하여 결합 특이성을 갖는 단일클론, 인간, 인간화, Human EngineeredTM 또는 변이체 항-M-CSF 항체를 포함하는 다중특이적(예를 들어, 이특이적) 단일클론 항체를 생성하는 것이 바람직할 수도 있다. 전형적인 이특이적 항체는 M-CSF의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수도 있다. 대안적으로, 항-M-CSF 팔은 M-CSF-발현 세포에 대한 세포 방어 기작에 집중하기 위해 T-세포 분자(예를 들어, CD2 또는 CD3), 또는 Fc γ RI(CD64), Fc γ RII(CD32) 및 Fc γ RIII(CD16)과 같은 IgG(Fc γ R)에 대한 Fc 수용체와 같은 백혈구 상 유발 분자에 결합하는 팔과 조합될 수도 있다. 또한, 이특이적 항체는 M-CSF를 발현시키는 세포에 대한 세포 독성제를 국소화하는데 사용할 수도 있다. 이들 항체는 M-CSF-결합 팔 및 세포 독성 제제(예를 들어, 사포린, 항-인터페론-60, 빈카 알칼로이드, 리친 A 사슬, 메톡트렉세이트 또는 방사성 동위원소 합텐(hapten))에 결합하는 팔을 지닌다. 이특이적 항체는 총길이 항체 또는 항체 단편(예를 들어, F(ab')₂ 이특이적 항체)로서 제조될 수 있다.

[0159] 이특이적 항체를 제조하기 위한 다른 접근법에 따라서, 한 쌍의 항체 분자 간 경계면이 유전 조적되어 재조합 세포 배양으로부터 회수되는 헤테로다имер의 백분율을 최대화할 수 있다. 바람직한 경계면은 항체 불변 도메인의 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이 방법에서, 첫번째 항체 분자의 경계면으로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 사슬은 큰 측쇄(예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 측쇄와 동일하거나 유사한 크기의 보상적 "공동"은 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 것(예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 2차 항체 분자의 표면에 생성된다. 이것은 호모다имер과 같은 기타 원치 않는 최종 생성물의 수율을 증가시키기 위한 메카니즘을 제공한다. 1996년 9월 6일자로 공개된 WO96/27011호를 참조하시오.

[0160] 이특이적 항체는 가교-결합되거나 "이중콘주게이트" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이중콘주게이트에서의 항체 중 하나는 아비딘, 기타 비오틴에 커플링될 수 있다. 이중콘주게이트 항체는 어떤 편리한 가교-결합 방법을 사용하여 만들어 질 수도 있다. 적당한 가교-결합체가 당업계에 주지되어 있으며, 많은 가교-결합 기술에 따라, 미국 특허 제 4,676,980호에서 개시된다.

[0161] 또한, 항체 단편으로부터 이특이적 항체를 생성하기 위한 기술이 분헌에서 설명되었다. 예를 들어, 이특이적 항체는 화학 결합을 사용하여 제조될 수 있다. [Brennan et al., Science 229: 81 (1985)]은 손상되지 않은 항체가 가수분해적으로 절단되어 F(ab')₂ 단편을 생성하는 과정을 설명한다. 이들 단편을 디티올 복원제화 제제 아비산 나트륨의 존재하여 감소시켜서 인접 디티올을 안정화하고 분자내 이호아화물 형성을 막는다. 후속하여, 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트(TNB) 유도체로 전환시킨다. 이어서, Fab'-TNB 유도체 중 하나를 메르캅토에틸아민과 함께 환원시켜서 Fab'-티올로 다시 전환시키고 다른 Fab'-TNB 유도체의 같은 몰량과 혼합하여 이특이적 항체를 형성한다. 생성된 이특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 제제로서 사용될 수 있다. 또 다른 구체예에서, E. Coli로부터 직접 회수된 Fab'-SH 단편은 시험관 내에서 화학적으로 커플링되어 이특이적

항체를 형성할 수 있다. (Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992))

- [0162] [Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992)]은 완전히 인간화된 이특잇거 항체 F(ab')₂ 분자의 생산을 묘사한다. 각각의 Fab' 단편은 e. Coli로부터 각각 분비되며 시험관 내 향하게 된 화학적 커플링을 받아서 이특이적 항체를 형성한다. 거기서 형성된 이특이적 항체는 인간 유방암 표적에 대하여 인간 세포 독성 림프구의 용해 활성을 유발할 수 있을 뿐만 아니라, HER2 수용체를 과잉발현하는 세포 및 정상 인간 T 세포에 결합할 수 있다.
- [0163] 또한, 재조합 세포 배양으로부터 직접 이특이적 항체 단편을 만들거나 단리시키는 각종 기술이 설명되었다. 예를 들어, 이특이적 항체는 류신 지퍼를 사용하여 생성되었다. (Kostelny et al., J. Immunol. 148 (5): 1547-1553 (1992)) Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드는 유전자 융합에 의해 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 결합되었다. 항체 호모다이머가 경첩 부위에서 감소되어 모노머를 형성한 후 다시 산화되어 항체 헤테로다이머를 형성하였다. 또한, 이 방법은 항체 호모다이머의 생산을 위해 이용될 수 있다. [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)]에 의해 설명된 "디어바디" 기술은 이특이적 항체 단편을 만들기 위한 대안적 메커니즘을 제공하였다.
- [0164] 단편은 너무 짧아서 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 간 짝짓기를 허용하지 않는 링커에 의해 경쇄 가변 영역(VL)에 연결된 중쇄 가변 영역(VH)를 포함한다. 따라서, 하나의 단편의 VH 및 VL 도메인은 다른 단편의 상보성 VL 및 VH 도메인에 짝지을 수 밖에 없으며, 이로써 2개의 항원-결합 자리를 형성한다. 또한, 단일-사슬 Fv(sFv)의 사용에 의해 이특이적 항체 단편을 만들기 위한 다른 전략이 보고되었다. 문헌 [Gruber et al., J. Immunol. 152: 5368 (1994)]을 참조하십시오.
- [0165] 대안적으로, 이특이적 항체체는 문헌 [Zapata et al. Protein Eng. 8 (10): 1057-1062 (1995)]에서 설명된 바와 같이 생성된 "선형 항체"일 수도 있다. 간단히 말해서, 이들 항체는 한 쌍의 항원 결합 부위를 형성하는 한 쌍의 직렬 Fd 단편(VH-CH1-VH-CH1)을 포함한다. 선형 항체는 이특이적이거나 단일특이적일 수 있다.
- [0166] 또한, 2가 이상을 갖는 항체들이 고려된다. 예를 들어, 3특이적 항체가 제조될 수 있다. (Tutt et al., J. Immunol. 147: 60 (1991))
- [0167] 특정 구체예에서, 단일클론, 인간, 인간화, Human Engineered™ 또는 변이체 항-M-CSF 항체는 RX1, 5H4, MC1, 또는 MC3 항체 단편과 같은 항원 단편이다. 각종 기술이 항체 단편의 생산을 위해 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편들이 손상되지 않은 항체의 단백질 소화를 통해 유도되었다(예를 들어, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) and Brennan et al., Science 229: 81 (1985) 참조). 그러나, 이들 단편은 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산될 수 있다. [Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988)]은 박테리아로부터의 기능적 항체 단편의 분비를 개시한다(예를 들어, Better et al., Skerra et al. Science 240: 1038-1041 (1988) 참조). 예를 들어, Fab'-SH 단편은 E. Coli로부터 직접 회수될 수 있으며 화학적으로 커플링하여 F(ab')₂ 단편을 형성한다(Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). 다른 구체예에서, F(ab')₂ 는 F(ab')₂ 분자의 집합을 촉진하기 위해 류신 지퍼 GCN4를 사용하여 형성된다. 다른 접근법에 따라서, Fv, Fab 또는 F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양액으로부터 직접 단리될 수 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술들은 숙련된 실행자들에게 명백할 것이다.
- [0168] "단리된" 항체는 그것의 천연 환경의 구성성분으로부터 확인 및 분리 그리고 회수된 항체이다. 그것의 천연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 진단상 또는 치료적 사용과 함께 방해되는 물질이며, 효소, 호르몬, 및 기타 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수도 있다. 바람직한 구체예에서, 항체는 (1) 라우리(Lowry) 법에 의해 결정되는 바와 같이 95 중량% 이상, 및 가장 바람직하게는 99 중량% 이상으로, (2) 급회전 컵 서열분석기의 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 저경도 15 잔기를 획득하기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루, 또는, 바람직하게는, 은 염색을 이용하여 환원 조건 또는 비환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 균질로 정제될 것이다. 단리된 항체는 재조합 세포 내 정위지에서 항체를 포함하며, 이것은 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 구성성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그런, 보통, 단리된 항체는 저경도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0169] 항체의 구조 및 생성의 상세한 설명을 위해, 본원에서 참고로서 인용되는 [Roth, D. B., and Craig, N. L., Cell, 94: 411-414 (1998)], 및 미국 특허 제6,255,458호를 참조하십시오. 간단히 말해서, 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 코딩하는 DNA를 생성하기 위한 과정은 B-세포를 발달시킬 때 주로 발생한다. 각종 면역글로불린 유전자 부분의 재배치 및 결합 전에, V, D, J 및 불변(C) 유전자 부분은 일반적으로 단일 염색체 상에 상대적으로

매우 근접하여 발견된다. B-세포-분화 동안, V, D, J(또는 경쇄 유전자의 경우에 오직 V 및 J)의 각각의 대략의 과 멤버들 중 하나가 재조합되어 기능상으로 재배열된 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자를 형성한다. 이 유전자 부분 재배열 과정은 서열적인 것으로 보인다. 첫째로, 중쇄 D-내지-J 결합이 만들어진 후, 중쇄 V-내지 DJ 결합 및 경쇄 V-내지-J 결합이 만들어진다.

[0170] 기능상 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 형성하기 위한 가변 영역 유전자 부분의 재조합은 재조합적으로 경쟁 V, D 및 J 부분을 플랭킹하는 재조합 신호 서열(RSS's)에 의해 매개된다. 직접 재조합에 필수적이고 충분한 RSS's는 다이애드-대칭 헵타머(heptamer), AT-풍부 노나머(nonamer) 및 12 또는 23 염기 쌍의 간섭 스페이서 부위를 포함한다. 이들 신호는 D-J (또는 V-J) 재조합을 수행하는 상이한 유전자좌 및 종에 사이에서 보존되며 기능적으로 상호교환적이다. 문헌 [Oettinger, et al. (1990), Science, 248,1517-1523] 및 본원에서 인용된 참고문헌을 참조하십시오. 헵타머는 서열 CACAGTG 또는 비보존된 서열의 스페이서에 의한 그것의 유사체 및 후속하여 ACAAAAACC 서열을 갖는 노나머 또는 그것의 유사체를 포함한다. 이들 서열은 J, 또는 V 및 D 유전자 부분의 다운스트림 면에서 발견된다. 생식 계열 D 및 J 부분의 바로 앞서는 것은 다시 2개의 재조합 신호 서열, 첫번째 노나머 및 후속하여 비보존된 서열에 의해 다시 분리된 헵타머이다. V_L , V_H 또는 D 부분 다음의 헵타머 및 노나머 서열은 그들이 다시 합하여지는 J_L , D 또는 J_H 부분에 앞서는 것들과 상보적이다. 헵타머 및 노나머 서열 간 스페이서는 12 염기 TKd 길이 또는 22 및 24 염기 TKd 길이이다.

[0171] V, D 및 J 부분의 재배열에 더하여, 추가적 다양성은 경쇄에서 V 및 J 부분이 결합되고 중쇄의 D 및 J 부분이 결합되는 위치에서 각종 다양한 재조합에 의한 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 제 1의 레퍼토리에서 생성된다. 경쇄 내 변화는 전형적으로 V 유전자 부분의 마지막 코돈 및 J 부분의 첫번째 코돈에서 발생한다. 결합할 때의 유사한 부정확은 D 및 J_H 부분 사이의 중쇄 염색체 상에서 발생하며 10 뉴클레오티드 이상으로 확장될 수도 있다. 더욱이, 몇몇 뉴클레오티드는 게놈DNA에 의해 코딩되지 않는 D 및 J_H 그리고 V_H 및 D 유전자 부분 사이에 삽입될 수도 있다. 이들 뉴클레오티드의 첨가는 N-부위 다양성으로 알려져 있다.

[0172] 가변 영역 유전자 부분 및 이러한 결합 중에 발생할 수도 있는 가변 재조합 내 이러한 재배열의 순수한 효과는 제 1 항체 레퍼토리의 생성물이다.

[0173] "Fv"는 완전한 항원 인지 및 결합 자리를 함유하는 최소 항원 단편이다. 이 부위는 밀착의, 비-공유결합 내 하나의 중쇄- 및 하나의 경쇄 가변 도메인의 다이머로 이루어져 있다. 그것은 각각의 가변 도메인 중 3개의 CDR은 상호작용하여 V_H VI 다이머 상의 항원 결합 자리를 정의하는 이 배열 내에 존재한다. 총괄적으로, 6개의 CDR은 항원에 대한 항원-결합 특이성을 가져온다. 그러나, 하나의 가변 도메인 조차도(또는 항원에 대한 오직 3개의 CDR 특이성을 포함하는 Fv의 절반) 전체 항원 자리 보다 낮은 친화성에도 불구하고, 항원을 인지하고 결합하는 능력을 가진다.

[0174] EH한, Fab 단편은 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 첫번째 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab 단편은 항원 경첩 부위로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에서 소수의 잔기의 첨가에 의해 Fab' 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 티올이 없는 균을 부담하는 Fab'를 지정한다. F(ab')₂ 항체 단편은 최초에 그들 간에 경첩 시스테인을 갖지 않는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성된다.

[0175] 용어 "중화 항체"는 결합되는 표적 항체의 작동자 기능을 제거하거나 현저히 감소시킬 수 있는 항체 분자를 의미한다. 따라서, "중화" 항-표적 항체는 효소 활성화, 리간드 결합, 또는 세포내 신호화와 같은 작동자 기능을 제거하거나 현저히 감소시킬 수 있다.

[0176] 본원에서 제공되는 바와 같이, 암 전이 및/또는 암 전이와 관련된 뼈 손실을 치료하기 위한 조성물 및 방법은 원하는 결과를 달성하기 위해 단독으로 또는 다른 치료제와 조합하여 사용되는 하나 이상의 항체를 이용할 수도 있다. 본 발명에 따른 항체는 주위의 항원과 직접 접촉하거나 항원과 함께 면역화의 결과로서 항체를 생성하는 동물로부터 단리될 수도 있다. 택일적으로, 항체는 당업계 주지된 항체 발현 시스템 중 하나를 사용하여 재조합 DNA 방법에 의해 생성될 수도 있다(예를 들어, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 참조). 이러한 항체들은 재조합 IgG, 면역글로불린 유도된 서열 또는 "Human EngineeringTM" 항체를 갖는 키메라 융합 단백질을 포함할 수도 있으며, 이들 모두는 본 발명에 따른 암 전이 및/또는 암 전이와 관련된 뼈 손실의 치료를 위해 사용될 수도 있다. 손상되지 않은, 총-길이 분자에 추가하여, 용어 "항체"는 또한 그들의 단편(예를 들어, scFv, Fv, Fd, Fab, Fab' 및 F(ab)'₂ 단편) 또는 M-CSF(또는 M-CSFR)에 결합하는 손상되지 않은 분자 및/또는 단편의 다중체 또는 집합체를 나타낸다. 이들 항체 단편은 항체

에 결합하며 유도체화되어 구조적 특징을 보이거나 예를 들어, 갈락토스 잔기의 통합에 의해 제거 및 흡수를 촉진할 수도 있다.

[0177] 본 발명의 한 구체예에서, M-CSF 단일클론 항체는 본원에서 참고로 인용되는 Halenbeck 등의 미국특허 제 5,491,065(1997)에서 설명되는 바와 같이 본질적으로 제조될 수도 있다. 전형적인 M-CSF 단일클론 항체는 생물학적 활성의 중화와 동시에 재조합 또는 본래의 다이머 M-CSF와 결합된 명백한 배열의 에피토프에 결합하는 것들을 포함한다. 이들 항체는 모노머 및 화학적으로 유도체화된 다이머 M-CSF를 포함하는 M-CSF의 생물학적 비활성 형태와 함께 실질적으로 비반응성이다.

[0178] 본 발명의 다른 구체예에서, Human Engineered™ 항-M-CSF 단일클론 항체가 제공된다. 문구 "Human Engineered™ 항체"는 비-인간 항체, 전형적으로는 마우스 단일클론 항체로부터 유도된 항체를 나타낸다. 택일적으로, Human Engineered™ 항체는 부모, 비-인간, 항체의 항원 결합 특성을 보유하거나 또는 실질적으로 보유하지만, 인간에 투여되는 경우 부모 항체와 비교하여 감소된 면역원성을 보이는 키메라 항체로부터 유도될 수도 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 문구 "키메라 항체"는 전형적으로 상이한 종으로부터 유래되는 2개의 상이한 항체로부터 유도된 서열을 함유하는 항체를 나타낸다(예를 들어, 미국 특허 제 4,816,567호 참조). 가장 전형적으로, 키메라 항체는 인간 및 무린 항체 단편, 일반적으로, 인간 불변 및 마우스 가변 영역을 포함한다.

[0179] 문구 "상보성 결정 부위" 또는 용어 "CDR"은 본래의 면역글로불린 결합 자리의 천연 Fc 부위의 결합 친화성 및 특이성을 함께 정의하는 아미노산 서열을 나타낸다(예를 들어, Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services NIH Publication No.91-3242 (1991) 참조). 문구 "불변 영역"은 작동자 기능을 부여하는 항체 분자의 일부를 나타낸다. 본 발명에서, 마우스 불변 영역은 바람직하게는 인간 불변 영역에 의해 치환된다. 피험체 항체의 불변 영역은 인간 면역글로불린으로부터 유도된다. 중쇄 불변 영역은 5개의 아이소타이프 중 하나로부터 선택될 수 있다: α, β, ε, γ 또는 μ.

[0180] 본 발명의 항체는 그들이 약 $10^6 M^{-1}$ 이상, 바람직하게는 $10^7 M^{-1}$ 이상, 더 바람직하게는 약 $10^8 M^{-1}$ 이상, 및 가장 바람직하게는 $10^9 M^{-1}$, $10^{10} M^{-1}$, $10^{11} M^{-1}$ 또는 $10^{12} M^{-1}$ 이상의 Ka로 항원에 결합한다면 면역특이적이거나 특이적으로 결합하는 것이라 말한다. 항-M-CSF 항체는 M-CSF의 상이한 천연 발생 형태에 결합할 수도 있으며, 이것은 종양에 의해 발현된 것들 뿐 아니라, 숙주/피험체의 조직에 의해 발현된 것들을 포함한다. RX1, 5H4, MC1, 또는 MC3 항체와 같은 본원에서 개시된 단일클론 항체는 M-CSF에 대한 친화성을 가지며 적어도 $10^{-4} M$, 바람직하게는 적어도 약 $10^{-7} M$ 내지 약 $10^{-8} M$, 더욱 바람직하게는 적어도 약 $10^{-8} M$, $10^{-10} M$, 또는 $10^{-12} M$ 의 해리 평형 상수(Kd)를 특징으로 한다. 이러한 친화성은 평형 투석에 의해, 제조업자에 의해 개관된 일반적 과정을 사용하는 BIAcore 2000 장치를 사용하여, ^{125}I 표지된 M-CSF를 사용하는 방사능면역분석법에 의함과 같은 전통적 기술을 사용하여, 또는 당업계 숙련자에게 공지된 다른 방법에 의해 용이하게 결정될 수도 있다. 친화성 데이터는 예를 들어, [Scatchard et al., Ann N. Y. Acad. Sci., 51: 660 (1949)]의 방법에 의해 분석될 수도 있다. 따라서, 바람직한 M-CSF 항체는 M-CSF에 대한 고도의 특이성을 나타낼 것이며 다른 분자에 대하여 실질적으로 낮은 친화성으로 결합할 것이다. 바람직한 항체는 도 4의 무린 RX1이 M-CSF에 결합하는 바와 유사한 친화성으로 M-CSF에 결합하며, 이것은 전이성 질환 동물 모델에서 테스트되는 경우 낮은 면역원성을 보이며, 암세포의 전이를 억제한다. 다른 전형적인 항체들은 각각 도 13, 14 또는 15의 무린 5H4, MC1 또는 MC3이 M-CSF에 결합하는 바와 유사한 친화성으로 M-CSF에 결합한다.

[0181] 항체의 생산을 위해 사용될 항원은 예를 들어, 그것의 본래의 배열 내에 에피토프가 디스플레이되도록 허용하는 다른 폴리펩티드에 선택적으로 융합된, 원하는 에피토프를 보유하는 손상되지 않은 M-CSF 또는 M-CSF의 단편일 수도 있다. 택일적으로, M-CSF를 발현시키는 세포는 그들 세포 표면에서 항체를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 세포들은 형질전환되어 M-CSF를 발현시키거나 M-CSF를 발현하는 기타 천연 발생 세포일 수도 있다. 항체를 생성하기 위해 유용한 M-CSF의 다른 형태들은 당업계 숙련자에게 명백할 것이다.

[0182] **폴리클론 항체**

[0183] 폴리클론 항체는 바람직하게는 관련 항원 및 애쥬번트의 복합적 피하(sc) 또는 복막내(ip) 주사에 의해 동물내에서 발생된다. 항상된 항체 반응은 관련 항원을 면역화될 종 내에서 면역원성인 단백질에 콘주게이트 시킴으로써 획득될 수 있으며, 이것은 예를 들어, 키홀 림펫 헤모시아닌(keyhole limpet hemocyanin), 혈청 알부민, 소 타이로글로불린, 또는 예를 들어, 말레이미도벤조일 설포숙신아미드 에스테르(시스테인 잔기를 통한 결합), N-

히드록시숙신이미드(리신 잔기를 포함), 글루타르알데히드, 숙신 무수물, 또는 당업계 공지된 기타 제제들을 사용하는 대두 트립신 억제제이다.

[0184] 동물은 100 μ g 또는 5의 단백질 또는 콘주게이트(각각 래빗 또는 마우스에 대한 것)를 3 부피의 프로이드 완전 애주번트와 합하고 여러 부위에 피부 내로 용액을 주사함으로써 항원, 면역원성 콘주게이트, 또는 유도체에 대하여 면역화시킨다. 한달 후, 동물을 여러 부위에 피하 주사에 의해 프로이드 완전 애주번트 내 최초의 양의 펩티드 또는 콘주게이트를 1/5 내지 {분획 (1/10)}로 부스팅시킨다. 부스터 주사한 7-14일 후에, 동물을 출혈시키고 혈청을 항체 적정 농도에 대하여 분석하였다. 적정 농도가 안정수준에 달할 때까지 동물을 부스팅시켰다. 바람직하게, 동물을 동일한 항원이지만, 상이한 단백질 및/또는 상이한 가교 결합 시약을 통해 콘주게이트 된 콘주게이트와 함께 부스팅시킨다. EH한, 콘주게이트는 단백질 용합과 같은 재조합 세포 배양에서 만들어질 수 있다. 또한, 명반(alum)과 같은 결합제는 면역 반응을 향상시키기 위해 적절히 사용된다.

[0185] **단일클론 항체**

[0186] 단일클론 항체는 [Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975)]에 의해 처음 설명된 하이브리도마 방법을 사용하여 만들어질 수도 있으며, 또는 재조합 DNA 바아법에 의해 만들어 질 수도 있다.

[0187] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 햄스터 또는 짧은꼬리 원숭이와 같은 기타 적절한 숙주 동물은 본원에서 설명한 바와 같이 면역화되어 면역화를 위해 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도한다. 택일적으로, 림프구는 시험관 내에서 면역화될 수도 있다. 후속하여 림프구는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적당한 용합제를 사용하여 골수종 세포와 용합되어 하이브리도마 세포를 형성한다(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

[0188] 거기서 제조된 하이브리도마 세포를 바람직하게는 비융합된, 부모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질들을 함유하는 적당한 배양 배지 내에 시딩(seeding)하고 성장시킨다. 예를 들어, 부모 골수종 세포가 효소 히폭산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(HGPRT 또는 HPRT)를 결핍하는 경우, 하이브리도마로부터의 배양 배지는 전형적으로 히폭산틴, 아미노프테린, 및 티미딘(HAT 배지)을 포함할 것이며, 이 물질들은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 막는다.

[0189] 바람직한 골수종 세포는 효과적으로 용합하고, 선택된 항체-생성 세포에 의한 항체의 안정된 높은 수준의 생성을 뒷받침해주며, 배지에 민감한 것들이다. 또한, 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 셀라인이 인간 단일클론 항체의 생산을 위해 설명되었다(Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). 전형적인 무린 골수종 라인은 미국 캘리포니아 샌디에고의 the Salk Institute Cell Distribution Center로부터 이용가능한 MOP-21 및 M.C.-11 마우스 종양, 및 미국 메릴랜드 록크빌 어메리칸 타입 컬처 콜렉숀으로부터 이용가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포로부터 유도된 것들을 포함한다.

[0190] 하이브리도마 세포가 성장하고 있는 배양 배지를 항원에 대하여 항하게 된 단일클론 항체의 생산에 대하여 분석한다. 바람직하게, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 단일클론 항체의 결합 특이성은 면역침강법에 의하거나 또는 방사면역검정(RIA) 또는 효소-결합된 면역흡착제 분석(ELISA)과 같은 시험관 내 결합 분석법에 의해 결정된다. 단일클론 항체의 결합 친화성은 예를 들어, Scatchard 분석법에 의해 결정된다(Munson et al., Anal. Biochem., 107: 220 (1980)).

[0191] 하이브리도마 세포가 원하는 특이성, 친화성, 및/또는 활성을 생성함을 확인한 후, 클론은 제한적 희석 과정에 의해 하위클로닝되고 표준 방법에 의해 성장될 수도 있다(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). 이러한 목적을 위한 적당한 배양 배지는 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지이다. EH한, 하이브리도마 세포는 동물 내 복수(ascites) 종양으로서 생체 내에서 성장될 수도 있다. 하위클론에 의해 분비된 단일클론 항체는 예를 들어, 단백질 A-Sepharose, 히드록실라파타이트 크로마토그래피, 겔 전기천공법, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 전통적인 면역글로블린 정제 과정에 의해 배양 배지, 복수액, 또는 혈청으로부터 적당히 분리시킨다.

[0192] **항체의 재조합적 생산**

[0193] 단일클론 항체를 코딩하는 DNA는 전통적인 과정(예를 들어, 단일클론 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써)을 사용하여 하이브리도마로부터 단리 및 서열화될 수도 있다. 서열 결정은 일반적으로 관심있는 유전자 또는 cDNA의 적어도 일부의 단리를 필요로 할 것이다. 일반적으로 이것은 DNA 또는, 바람직하게는, 단일클론 항체를 코딩하는 mRNA(즉, cDNA)를 클로닝하는

것을 필요로 한다. 클로닝은 표준 기술을 사용하여 수행된다(예를 들어, 본원에서 참고로서 인용되는 Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press 참조). 예를 들어, cDNA 라이브러리는 polyA + mRNA의 역전사, 바람직하게는 막-결합된 mRNA, 및 인간 면역글로불린 폴리펩티드 유전자 서열에 대하여 특이적인 프로브를 사용하여 스크리닝된 라이브러리에 의해 구성될 수도 있다. 그러나, 바람직한 구체예에서, 증합효소 연쇄 반응(PCR)이 관심있는 면역글로불린 유전자 부분(예를 들어, 경쇄 가변 부분)을 코딩하는 cDNA(또는 총길이 cDNA의 일부)를 증폭하기 위해 사용된다. 증폭된 서열은 어떤 적당한 벡터, 예를 들어, 발현 벡터, 작은유전자(minigene) 벡터, 또는 파지 디스플레이 벡터로 용이하게 클로닝될 수 있다. 관심있는 면역글로불린 폴리펩티드의 일부 서열을 결정하는 것이 가능한 한, 사용되는 클로닝의 특정 방법은 중요하지 않음이 이해될 것이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "단리된" 핵산 분자 또는 "단리된" 핵산 서열은 (1) 핵산의 천연 공급원에 정상적으로 결합되어 있는 적어도 하나의 오염된 핵산 분자로부터 확인되고 분리되거나 또는 (2) 관심있는 핵산이 서열이 결정될 수 있도록 배경 핵산으로부터 클로닝, 증폭, 태그되거나, 그렇지 않으면 구별되며, 단리된 것으로 고려되는 핵산 분자이다. 단리된 핵산 분자는 천연에서 발견되는 형태 및 셋팅을 제외한다. EK로서, 단리된 핵산 분자는 천연 세포에서 존재하는 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 핵산 분자는 예를 들어, 핵산 분자가 천연의 세포의 것과 상이한 염색체 위치에 존재하는 항체를 정상적으로 발현시키는 세포 내에 함유된 핵산 분자를 포함한다.

[0194] 클로닝 및 시퀀싱을 위해 사용된 RNA에 대한 하나의 공급원은 트랜스제닉 마우스로부터 B 세포를 획득하고 B 세포를 불멸 세포에 융합함으로써 생성된 하이브리도마이다. 하이브리도마를 사용하는 이점은 그들이 쉽게 스크리닝될 수 있으며, 하이브리도마가 관심있는 선택된 인간 단일클론 항체를 생산한다는 점이다. 택일적으로, RNA는 면역화된 동물의 B 세포(또는 전체 비장)로부터 단리될 수 있다. 하이브리도마를 제외한 공급원들이 사용되는 경우, 특이적 결합 특성을 갖는 면역글로불린 또는 면역글로불린 폴리펩티드를 코딩하는 서열에 대하여 스크리닝하는 것이 바람직할 수도 있다. 이러한 스크리닝을 위한 한 방법은 파지 디스플레이 기술의 사용이다. 파지 디스플레이는 예를 들어, 각각 본원에서 참고로서 인용되는 Dower 등의 WO 91/17271, McCafferty 등의 WO 92/01047, 및 [Caton and Koprowski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6450-6454 (1990)]에서 설명된다. 파지 디스플레이 기술을 사용하는 한 구체예에서, 면역화된 트랜스제닉 마우스로부터의 cDNA(예를 들어, 전체 비장 cDNA)가 단리되며, 증합효소 연쇄 반응이 면역글로불린 폴리펩티드의 일부, 예를 들어, CDR 부위를 코딩하는 cDNA 서열을 증폭시키는 데 사용되며, 증폭된 서열은 파지 벡터 내로 삽입된다. 관심있는 펩티드를 코딩하는 cDNA, 예를 들어, 바람직한 결합 특성을 갖는 가변 영역 펩티드는 패닝(panning)과 같은 표준 기술에 의해 확인된다.

[0195] 후속하여 증폭되거나 클로닝된 핵산의 서열이 결정된다. 전형적으로 면역글로불린 폴리펩티드의 전체 가변 영역을 코딩하는 서열이 결정되지만, 종종 가변 영역의 단지 일부, 예를 들어, CDR-코딩 부분을 서열화하기에 알맞을 것이다. 전형적으로 서열화 된 부분은 길이가 적어도 30 염기이며, 보다 빈번하게는 가변 영역의 적어도 약 1/3 또는 적어도 약 1/2의 길이에 대하여 코딩하는 염기가 서열화될 것이다.

[0196] cDNA 라이브러리로부터 분리한 클론 상에서 시퀀싱을 수행할 수 있거나 PCR을 사용하는 경우 증폭된 서열을 서브 클로닝 한 후 또는 증폭된 단편의 직접적(direct) PCR 시퀀싱에 의하여 시퀀싱을 수행할 수 있다. 표준 기술을 사용하여 시퀀싱을 수행한다(예를 들면, 본 명세서에서 참고 인용하는 Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Guide*, Vols 1-3, Cold Spring Harbor Press 및 Sanger, F. et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467 참조). 클로닝한 핵산의 서열을 인간 면역글로불린 유전자와 cDNA의 공개된 서열과 비교함으로써, 당업자는 시퀀싱된 부위에 의존하여 (i) (중쇄의 동형을 포함한) 하이브리도마 면역글로불린 폴리펩티드의 생식 계열 단편 사용 및 (ii) N-부위 첨가 및 체세포 돌연변이 과정으로부터 유래한 서열을 포함한 중쇄 및 경쇄 변이 부위의 서열을 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 면역 글로불린 유전자 서열 정보의 공급처는 National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, National Institutes of Health, Bethesda, Md.이다.

[0197] 분리한 경우, DNA를 발현 벡터에 삽입할 수 있고, 그 후 숙주 세포, 예를 들면 대장균 세포, 원숭이 COS 세포, 인간 배아 신장 293 세포(예를 들면, 293E 세포), 중국 햄스터 난소(CHO) 세포 또는 골수종 세포에 트랜스펙션하는데, 그렇지 않으면 재조합 숙주 세포의 모노 클론항체를 합성하기 위한 면역글로불린 단백질 생산하지 못한다. 항체의 재조합 생산을 당업계에 공지되어 있다.

[0198] 발현 대조군 서열은 특정 숙주 개체의 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 가리킨다. 예를 들어 원핵세포에 적합한 대조군 서열은 프로모터, 선택적으로 작동자 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한

다. 프로모터, 폴리A 꼬리의 첨가(polyadenylation) 신호 및 인핸서를 이용하는 진핵세포가 알려져 있다.

- [0199] 핵산은 다른 핵산 서열과의 기능적 관계에 놓여져 있을 때 작동가능하게 연결된다. 예를 들면, 전구서열 또는 분비 리더의 DNA는 그것이 폴리펩티드의 분비에 참여한 전구 단백질로 발현되면 폴리펩티드의 DNA와 작동가능하게 연결되고; 또는 프로모터 또는 인핸서는 그것이 서열의 전사에 영향을 미친다면 코딩 서열과 작동가능하게 연결되거나; 리보솜 결합 부위는 그것이 번역을 촉진하기 위한 위치에 있다면 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 대체로, 작동가능하게 연결된 이라는 말은 연결된 DNA 서열이 인접하고, 분비 리더의 경우 해독단계에서 인접하다. 그러나, 인핸서는 인접할 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서 리게이션으로 이뤄진다. 이 부위가 존재하지 않는다면, 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 연결자를 종래의 실시와 일치하여 사용한다.
- [0200] 세포, 세포주 및 세포 배양은 자주 상호교환가능하게 사용되고 본 명세서에서 이 모든 명칭은 자손을 포함한다. 형질전환체 및 형질전환된 세포는 전달 수와 관계없이 1차 피험체 세포 및 그것으로부터 유래된 배양을 포함한다. 또한, 원래 형질전환된 세포에서는 차단된 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 가지는 돌연변이체 자손을 포함한다. 별개의 명칭이 예상되는 곳에서는, 문맥으로부터 명백해질 것이다.
- [0201] 대안적 구체예에서, 관심사의 번역글로불린의 아미노산 서열은 직접적 단백질 시퀀싱에 의해서 결정할 수 있다. 적합한 코딩 뉴클레오티드 서열을 일반적 코돈표에 따라서 설계할 수 있다.
- [0202] 소정의 항체의 아미노산 서열 변이체는 적당한 뉴클레오티드 변화를 코딩 DNA에 도입하거나 펩티드 합성에 의하여 제조할 수 있다. 예를 들면, 이 변이체는 항체의 아미노산 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 결실, 삽입 및 치환의 임의의 조합은 최종 구성물이 소정의 특성을 보유한다면 최종 구성물에 도달하도록 만들어진다. 또한, 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화와 같은 아미노산 변화는 모노클론, 인간, 인간화, Human Engineered™ 또는 변이체 항체의 번역 후 과정을 변경시킬 수 있다.
- [0203] 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법으로 제조된다. 이 방법은, 한정하는 것은 아니지만, (자연적으로 발생하는 아미노산 서열 변이체의 경우에) 자연적 공급원으로부터의 분리 또는 올리고뉴클레오티드-매개(또는 부위-유도) 돌연변이, PCR 돌연변이 및 항체의 초기 준비된 변이체 또는 변이체 버전의 카세트 돌연변이를 포함한다.
- [0204] 또한, 본 발명은 선택적으로 숙주 세포, 박터 및 핵산을 포함한 숙주 세포에 의하여 인식되는 대조군 서열에 작동가능하게 연결된, 본 발명의 항체를 코딩하는 분리된 핵산과 핵산이 발현되고 선택적으로 숙주 세포 배양 또는 배양 배지로부터 항체를 회복시키도록 숙주 세포를 배양하는 것을 포함할 수 있는 항체의 생산을 위한 재조합 기술을 제공한다.
- [0205] 항체의 재조합 기술을 위해서, 그것을 코딩하는 핵산을 분리하고 다른 클로닝(DNA의 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능한 박터에 삽입한다. 모노클론 항체를 코딩하는 DNA는 용이하게 분리되고 종래의 과정을 사용하여(예를 들면, 항체의 중 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써) 시퀀싱을 한다. 많은 박터를 이용할 수 있다. 대체로 박터 성분은, 한정하는 것은 아니지만, 하나 이상의 하기를 포함한다: 신호 서열, 복제 개시점, 하나 이상의 선택 표지 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열.
- [0206] (1) 신호 서열 성분
- [0207] 본 발명의 항체는 직접적으로뿐만 아니라, 바람직하게는 신호 서열 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 개열을 가지는 다른 폴리펩티드인 이중 폴리펩티드와의 융합 단백질로 재조합 생산될 수 있다. 선택된 신호 서열은 바람직하게는 숙주 세포에 의해서 인식되고 가공된(즉, 신호 펩티다아제에 의하여 개열된) 것이다. 원핵세포 숙주세포가 원래의 항체 신호 서열을 인식하고 가공하지 못하면, 신호 서열은 예를 들면 펩트산 라이에이스(예, pe1B) 알칼린 포스파타아제, 페니실린나아제, lpp 또는 열-안정성 에테로톡신 II 리더의 군 중에서 선택된 신호 서열에 의하여 치환될 수 있다. 효모 분비를 위해서, 원래의 신호 서열은 예를 들면 인버타아제 리더, (Saccharomyces 및 Kluyveromyces a-인자 리더를 포함한) a 인자 리더 또는 산 포스파타아제 리더, C. albicans 당아밀라제 리더 또는 WO 90/13646호에 개시된 신호에 의해서 치환될 수 있다. 포유류 세포 발현의 경우, 포유류 신호 서열뿐만 아니라 바이러스 분비 리더, 예를 들면 단순포진(herpes simplex) gD 신호를 이용할 수 있다.
- [0208] 이 전구체 부위에 대한 DNA를 항체를 코딩하는 DNA의 판독 프레임에 리게이션한다.
- [0209] (2) 복제 개시점 성분

- [0210] 발현 벡터와 클로닝 벡터 모두 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포에서 복제하도록 핵산 서열을 함유한다. 대체로, 클로닝 벡터에서 이 서열은 벡터가 숙주 염색체 DNA와 독립적으로 복제하게 하는 것이고 복제의 기점 또는 자율 복제 서열을 포함한다. 다양한 박테리아, 효소 및 바이러스에 대한 이 서열은 공지되어 있다. 플라스미드 pBR322의 복제 개시점은 대부분의 그람-음성 박테리아에 적합하고, 2 u 플라스미드 기점은 효모에 적합하며, 다양한 바이러스 기점은 포유류 세포에서 벡터를 클로닝하기에 유용하다. 대체로, 복제 개시점 성분은 포유류 발현 벡터에 필요하지 않다(SV 40 기점은 오직 그것이 초기 프로모터를 함유하기 때문에 통상적으로 사용될 수 있다).
- [0211] (3) 선택 표지 성분
- [0212] 발현 벡터 및 클로닝 벡터는 선택가능한 표지라고도 명하는 선택 표지를 함유할 수 있다. 통상적 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들면 앰피실린, 네오마이신, 메토틱사트, 테트라사이클린, G418, 제네티신, 히스티디놀 또는 마이코페놀산에 저항성을 주고 (b) 영양 요구 결핍을 보충하거나 (c) 복합 배지로부터 이용할 수 없는 중요 영양소를 공급하는 단백질을 코딩하는 데, 예를 들면 Bacilli의 D-알라닌 레이스마제를 코딩하는 유전자이다.
- [0213] 선택 구조의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키는 약물을 사용하는 것이다. 이중 유전자로 성공적으로 형질 전환된 세포는 약물 내성을 보이는 단백질을 생산하여 선택 섭생에서 살아남는다. 이 우세 선택의 예는 약물 메토틱사트, 네오마이신, 히스티디놀, 퓨로마이신, 마이코페놀산 및 하이그로마이신을 사용한다.
- [0214] 포유류 세포의 적합한 선택가능한 표지의 다른 예는 세포의 동정이 항체-코딩 핵산을 흡입할 수 있게 하는 것, 예를 들면 DHFR, 티미딘 키나아제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 디아미나제, 오르니틴 디카르복실라제 등이다.
- [0215] 예를 들면, DHFR 선택 유전자로 형질 전환된 세포는 메토틱사트(Mtx), DHFR의 경쟁적 대항제를 함유하는 배양 배지 중의 형질전환체 모두를 배양함으로써 처음으로 확인된다. 야생형 DHFR을 도입할 때 적당한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결핍된 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주이다.
- [0216] 대안적으로, 숙주 세포는 본 발명의 항체, 야생형 DHFR 단백질 및 다른 선택가능한 표지, 예를 들면 아미노글리코시드 3'-인산반효소(APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질전환 또는 상호-형질전환된 숙주 세포(특히 내생 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)는 아미노글리코시드 항생제와 같은 선택가능한 표지, 예를 들면 카나마이신, 네오마이신 또는 G418의 선택 체제를 함유한 배지에서 세포 성장에 의해서 선택될 수 있다. 미국 특허 제4,965,199호를 참조하라.
- [0217] 효모에서 사용하기 위한 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7[Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)]에 있는 *trp1* 유전자이다. *trp1* 유전자는 트립토판에서 성장하는 능력이 결핍된 효모의 돌연변이체 균주의 선택 표지, 예를 들면 [ATCC 제44076호 또는 PEP4-1. Jones, Genetics, 85:12 (1977)]을 제공한다. 그 후, 효모 숙주 세포 유전체의 *trp1* 손상의 존재는 트립토판의 부재시 성장에 의한 형질전환을 탐지하기 위한 효과적인 환경을 제공한다. 유사하게, *Leu2*-결핍 효모 균주(ATCC 20,622 또는 38,626)는 *Leu2* 유전자를 보유하는 공지된 플라스미드에 의하여 보완된다. *Ura3*-결핍 효모 균주는 *ura3* 유전자를 보유하는 플라스미드에 의하여 보완된다.
- [0218] 또한, 1.6 um 원형 플라스미드 pKD1에서 유래된 벡터는 *Kluyveromyces* 효모의 형질전환에 사용될 수 있다. 대안적으로, 재조합 송아지 키모신의 대량 생산을 위한 발현 시스템은 [K. lactis. Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990)]에서 보고되었다. 또한, *Kluyveromyces*의 상업적 균주에 의한 성숙한 재조합 인간 혈청 알부민의 분비를 위한 안정한 다중-사본 발현 벡터는 [Fleer et al, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)]에서 개시되었다.
- [0219] (4) 프로모터 성분
- [0220] 발현 벡터 및 클로닝 벡터는 대개 숙주 개체에 의하여 인식되는 프로모터를 함유하고 항체-코딩 핵산에 작동가능하게 연결된다. 원핵세포 숙주에 사용하기에 적합한 프로모터는 아라비노스(예를 들면, *araB*) 프로모터 *phoA* 프로모터, B-락타메이즈 및 락토즈 프로모터 시스템, 알칼린 포스파타제, 트립토판(*trp*) 프로모터 시스템 및 *tac* 프로모터와 같은 하이브리드 프로모터를 포함한다. 그러나, 다른 알려진 박테리아 프로모터가 적합하다. 또한, 박테리아 시스템에서 사용하기 위한 프로모터는 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 사인-달가노(S.D.) 서열을 함유할 것이다.

- [0221] 진핵세포를 위한 프로모터 서열이 알려져 있다. 실질적으로, 모든 진핵세포 유전자는 전사가 개시되는 부위에서 약 25 내지 30 염기 상류에 위치한 AT-풍부 부위를 가진다. 많은 유전자의 전사 개시로부터 70 내지 80 염기 상류에서 발견되는 다른 서열은 N이 임의의 뉴클레오티드일 수 있는 CNCAAT 부위이다. 대부분의 진핵세포 유전자의 3' 말단에 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 꼬리를 첨가하는 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 있다. 이 모든 서열은 진핵세포 발현 벡터에 적합하게 삽입된다.
- [0222] 효모 숙주에 사용하기 위한 적합한 프로모터 서열의 예는 3-포스포글리세르산 키나아제 또는 다른 해당작용 효소, 예를 들면 에놀라제, 글리세르알데히드-3-인산 탈수소효소, 헥소키나아제, 피루브산 탈탄산효소, 포스포프рук토키나아제, 글루코스-6-인산 이성질화효소, 3-포스포글리세르산 무타제, 피루브산 키나아제, 트리오스인산 이성질화효소 및 글루코키나아제를 포함한다.
- [0223] 성장 조건에 의하여 조절되는 전사의 추가적 이점을 가지는 유도가능한 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알코올 탈수소효소 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타아제, 질소 대사와 연관된 분해효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-인산 탈수소효소 및 말토스 및 갈락토스 이용에 관여하는 효소의 프로모터 부위이다. 효모 발현에서 사용하기 위한 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 73,657호에서 더 개시된다. 또한, 효모 인헨서는 효모 프로모터에서 유리하게 사용된다.
- [0224] 포유류 숙주 세포 중의 벡터의 항체 전사는 예를 들면 아벨슨 백혈병 바이러스, 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스(예를 들면 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 가장 바람직하게는 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, 간염-B 바이러스, 유인원 바이러스 40(SV40)과 같은 바이러스의 유전체, 이중 포유류 프로모터, 예를 들면 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터, 이 프로모터들이 숙주 세포 시스템과 양립가능하다면, 열-충격 프로모터에서 얻은 프로모터에 의하여 조절된다.
- [0225] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 복제의 SV40 바이러스 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 얻어진다. 인간 사이토메갈로 바이러스의 즉시 초기 프로모터는 HindIII E 제한 단편으로서 편리하게 얻어진다. 소 유두종 바이러스를 벡터로 사용한 포유류 숙주의 DNA를 발현하는 시스템은 미국 특허 제4,419,446호에서 개시한다. 이 시스템의 변형은 미국 특허 제4,601,978호에서 개시한다. 또한 단순포진 바이러스의 티미딘 키나아제 프로모터의 조절 하의 마우스 세포에서 인간 β -인터페론 cDNA를 발현하는 것에 관한 [Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)]를 참조하라. 대안적으로, 라우스 육종 바이러스 긴 말단 반복을 프로모터로서 사용할 수 있다.
- [0226] (5) 인헨서 요소 성분
- [0227] 고등 진핵세포에 의하여 본 발명의 항체를 코딩하는 DNA의 전사는 인헨서 서열을 벡터에 삽입함으로써 자주 증가된다. 현재 포유류 유전자(글로빈, 엘라스타제, 알부민, 알파페토프로테인 및 인슐린)의 많은 인헨서가 알려져 있다. 그러나, 전형적으로, 진핵세포 바이러스의 인헨서를 사용할 것이다. 예는 복제 개시점의 후면에 있는 SV40 인헨서(bp 100-270), 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 개시점의 후면에 있는 폴리오마 인헨서 및 아데노바이러스 인헨서를 포함한다. 또한, 진핵세포 프로모터의 활성화를 위한 강화 요소에 관한 [Yaniv, Nature297:17-18 (1982)]을 참조하라. 인헨서는 항체-코딩 서열의 5' 또는 3' 위치에서 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만 바람직하게는 프로모터로부터 5' 부위에 위치한다.
- [0228] (6) 전사 종결 성분
- [0229] 또한, 진핵세포 숙주 세포(효모, 균류, 곤충, 식물, 동물, 인간 또는 다른 다세포 개체의 유핵세포)에서 사용되는 발현 벡터는 전사의 종결과 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 함유할 것이다. 보통 이 서열은 진핵세포 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 가끔 3' 비번역 부위로부터 입수가능하다. 이 부위는 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화된 단편으로서 전사된 뉴클레오티드 조각을 함유한다. 한 유용한 전사 종결 성분은 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 부위이다. 본 명세서에 개시된 WO 94/11026호 및 발현 벡터를 참조하라. 다른 것은 마우스 면역글로불린 경쇄 전사 종결자이다.
- [0230] (7) 숙주세포의 선택과 형질전환
- [0231] 본 명세서의 벡터 내의 DNA를 클로닝 또는 발현하기에 적합한 숙주 세포는 전술한 원핵세포, 효모 또는 고등 진핵세포이다. 이 목적을 위하여 적합한 원핵세포는 진정세균, 예를 들면 그람-음성 또는 그람-양성 개체, 예를 들면 *Enterobacteriaceae*, 예를 들면 *Escherichia*, 예를 들면, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, 예를 들면, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, 예를 들면, *Serratia marcescans* 및

*Shigella*뿐만 아니라 *Bacilli*, 예를 들면 *B. subtilis* 및 *B. licheniformis*(예를 들면, 1989년 4월 12일 공개된 DD 266,710호에 개시된 *B. licheniformis* 41 P), *Pseudomonas*, 예를 들면 *P. aeruginosa* 및 *Streptomyces*를 포함한다. 대장균 B, 대장균 X1776(ATCC 31,537) 및 대장균 W3110(ATCC 27,325)와 같은 다른 균주가 적합하지만, 한 바람직한 대장균 클로닝 숙주는 대장균 294(ATCC 31,446)이다.

[0232] 원핵세포뿐만 아니라, 진핵세포 미생물, 예를 들면 섬질 곰팡이 또는 효모는 항체-코딩 벡터를 위한 적합한 클로닝 또는 발현 벡터이다. *Saccharomyces cerevisiae* 또는 통상의 빵 효모가 하등 진핵세포 숙주 미생물 중에서 가장 통상적으로 사용된다. 그러나, 많은 다른 속, 종 및 균주, 예를 들면 *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces hosts*, 예를 들면 *K. lactis*, *K. fragilis*(ATCC 12,424), *K. bulgaricus*(ATCC 16,045), *K. wickerhamii*(ATCC 24,178), *K. waltii*(ATCC 56,500), *K. drosophilum*(ATCC 36,906), *K. thermotolerans* 및 *K. marxianus*; *yarrowia*(EP 402,226); *Pichia pastors*(EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia*(EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, 예를 들면 *Schwanniomyces occidentalis*; 및 섬질 곰팡이, 예를 들면 *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* 및 *Aspergillus* 숙주, 예를 들면 *A. nidulans* 및 *A. niger*가 통상적으로 이용가능하고 본 명세서에서 유용하다.

[0233] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 생물로부터 유래한다. 무척추 동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 많은 바큇머 바이러스 균주와 변이체 및 *Spodoptera frugiperda*(애벌레), *Aedes aegypti*(모기), *Aedes albopictus*(모기), *Drosophila melanogaster*(초파리) 및 *Bombyx mori*와 같은 숙주의 상응하는 허용 곤충 숙주 세포가 동정되었다. 트랜스팩션의 다양한 바이러스 균주, 예를 들면 *Autographa californica* NPV의 L-1 변이체 및 *Bombyx mori* NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 이용가능한데, 이 바이러스는 특히 *Spodoptera frugiperda* 세포의 트랜스팩션을 위해서 본 발명에 따라서 본 명세서의 바이러스로서 사용될 수 있다.

[0234] 또한, 목화, 옥수수, 감자, 콩, 페튜니아, 토마토, 담배, 개구리밥 및 다른 식물 세포의 식물 세포 배양을 숙주로 사용할 수 있다.

[0235] 그러나, 관심은 척추동물 세포에서 가장 크고 배양(조직 배양)에서의 척추동물 세포의 증식은 일상적 과정이 되었다. 유용한 포유류 숙주 세포주의 예는 CHOK1 세포(ATCC CCL61), DXB-11, DG-44 및 중국 햄스터 난소 세포/-DHFR(CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))를 포함한 중국 햄스터 난소 세포; SV40에 의하여 형질전환된 원숭이 신장 CV1 주(COS-7, ATCC CRL1651); 인간 배아 신장 주(293 세포 또는 현탁액 배양에서 성장하기 위하여 서브클로닝된 293 세포, [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]; 새끼 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 마우스 세르틀리 세포(TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); 원숭이 신장 세포(CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 경부 암 종 세포(HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포(MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포(BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포(W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포(Hep G2, HB 8065); 마우스 유방암(MMT060562, ATCC CCL51); TRI 세포(Mather et al., Annals N. Y Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암 주(Hep G2)이다.

[0236] 숙주 세포를 항체 생산을 위한 전술한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환 또는 트랜스팩션시키고 프로모터를 유도하고, 형질전환체를 선별하거나 소정의 서열을 코딩하는 유전자를 증폭하기에 적합하도록 변형된 통상의 영양소 배지에서 배양한다. 또한, 선택 표지에 의하여 분리된 전사 유닛의 복합 사본을 가진 신규 벡터 및 트랜스팩션된 세포주가 특히 유용하고 M-CSF를 표적화하는 항체의 발현을 위해서 바람직하다.

[0237] (8) 숙주 세포 배양

[0238] 본 발명의 항체를 생산하기 위하여 사용되는 숙주 세포를 다양한 배지에서 배양할 수 있다. 시중에서 구입할 수 있는 배지, 예를 들면 햄 F10(Sigma), 최소 필수 배지((MEM), (Sigma), RPMI-1640(Sigma) 및 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), Sigma)가 숙주 세포를 배양하기에 적합하다. 또한, [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Bames et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980), 미국 특허 제4,767,704호; 제4,657,866호; 제4,927,762호; 제4,560,655호; 또는 제5,122,469호; WO 90103430호; WO 87/00195호; 또는 미국 특허 Re. 제30,985호]에서 개시된 배지 중 임의의 것을 숙주 세포의 배양 배지로 사용할 수 있다. 이 배지의 어떤 것은 필요하다면 호르몬 및/또는 다른 성장 인자(예를 들면, 인슐린, 트랜스페린 또는 상피세포 성장 인자), 염(예를 들면 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산), 완충제(예를 들면, HEPES), 뉴클레오티드(예를 들면, 아데노신 및 티미딘), 항생제(예를 들면 GentamycinTM 약물), (마이크로몰 범위의 최종 농도로 대개 존재하는 무기 화합물로서 정의되는) 미량 원소 및 글루코스 또는 동등한 에너지원으로 보충될 수 있다. 또한, 임의의

다른 필요한 보충제는 당업자에게 알려진 적당한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예를 들면 온도, pH 등은 발현을 위하여 선택된 숙주 세포에서 사전에 사용된 것이고 당업자에게 명백할 것이다.

[0239] (9) 항체의 정제

[0240] 재조합 기술을 사용할 때, 항체는 세포 내에서, 세포질 주변(periplasmic space)에서 생산되거나 미생물 배양을 포함한 배지로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생산된다면, 제1 단계로 미립자 조직과편, 숙주 세포나 용해된 과편을 예를 들면 원심분리 또는 초미세여과기로 제거한다. [Better et al. Science 240:1041-1043 (1988); ICSU Short Reports 10:105 (1990); 및 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:457-461 (1993)]은 대장균의 세포질 주변에 분비된 항체를 분리하기 위한 과정을 설명한다(또한 [Carter et al., BiolTechnology 10:163-167 (1992)]을 참조하라.)

[0241] 미생물 또는 포유동물 세포에서 준비된 항체 조성물을 예를 들면 바람직한 정제 기술인 친화성 크로마토그래피와 함께 수산화인회석 크로마토그래피, 양이온 또는 조류 교환 크로마토그래피 및 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제할 수 있다. 친화성 리간드로서 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 동형에 의존한다. 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 4$ 중쇄에 기초한 항체를 정제하기 위하여 단백질 A를 사용할 수 있다(Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). 모든 마우스 동형 및 인간 $\gamma 3$ 의 경우 단백질 G가 권장된다(Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 대부분 자주 아가로스이지만 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예를 들면 조절된 구멍 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스에서 보다 더 빠른 유동속도 및 더 짧은 가공 시간을 가능케 한다. 항체가 C_H 3 도메인을 포함하는 경우, Bakerbond ABX™ resin(J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.)가 정제에 유용하다. 또한, 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예를 들면 이온-교환 칼럼 상의 분별법, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, SEPHAROSE™ 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 레진 상의 크로마토그래피(예를 들면 폴리아스파르산 칼럼), 크로마토초점매추기, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전을 재생된 항체에 따라서 이용할 수 있다.

[0242] 키메라 및 인간화 항체

[0243] 키메라 또는 인간화 항체는 모체 모노클론 항체보다 인간에서 면역성이 덜하기 때문에, 그것을 아나필락시스의 위험성이 적은 환자의 치료에 사용할 수 있다. 따라서, 이 항체는 인간에게 생체 내 투여하는 것과 연관된 치료적 이용에 바람직할 수 있다.

[0244] 마우스 모노클론 항체의 가변 Ig 도메인이 인간 불변 Ig 도메인에 융합되는 키메라 모노클론 항체를 당업계에 공지된 표준 과정을 사용하여 생성할 수 있다([Morrison, S. L., et al. (1984) Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human Constant Region Domains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81,6841-6855; 및 Boulianne, G. L., et al, Nature 312,643-646.(1984)] 참조). 일부 키메라 모노클론 항체가 인간에서 면역성이 덜한 것으로 증명되었다 하더라도, 마우스 가변 Ig 도메인이 여전히 중요한 인간 항-마우스 반응을 야기할 수 있다.

[0245] 인간화 항체는 예를 들면 (1) 비-인간 상보성 결정 부위를 인간 틀구조 및 불변 영역에 이식하거나, 대안적으로 (2) 전체 비-인간 가변 도메인을 이식하지만 그것을 표면 잔기의 대체에 의하여 인간 유사 표면으로 "덜어 썬"는 것(당업계에서 "베니어링"이라고 불리는 과정)을 포함한 다양한 방법에 의하여 완성될 수 있다. 본 발명에서, 인간화 항체는 "인간화"와 "베니어링" 항체 모두를 포함할 것이다. 이 방법은 예를 들면, 각각이 본 명세서에서 참고 인용하는 [Jones et al., Nature 321:522 525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 81:6851 6855 (1984); Morrison와 Oi, Adv. Immunol., 44:65 92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239:1534 1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489 498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169 217 (1994); 및 Kettleborough, C. A. et al., Protein Eng. 4(7):773 83 (1991)]에 개시된다.

[0246] 특히, 단독으로 또는 콘주게이트로 인간에서 생체 내 투여로 반복되는 설치류 항체는 설치류 항체에 대한 수용체에서의 면역 반응; 소위 HAMA 반응(인간 항-마우스 항체)을 초래할 것이다. HAMA 반응은 반복되는 투약이 필요한 경우 약학의 효과를 제한할 수 있다. 항체의 면역성은 폴리에틸렌 글리콜과 같은 친수성 폴리머를 통한 항체의 화학적 변형 또는 항체 결합 구조를 보다 인간 유사하게 만들기 위한 유전공학 방법을 사용함으로써 감소할 수 있다. 예를 들면, CEA에 결합하는 설치류 항체의 가변 도메인의 유전자 서열은 인간 골수종 단백질의 가변 도메인으로 치환되어, 재조합 키메라 항체를 생산할 수 있다. 이 과정은 EP 194276호, EP 0120694호, EP

0125023호, EP 0171496호, EP 0173494호 및 WO 86/01533호에서 상세히 설명하고 있다. 대안적으로, 설치류 항체의 CDR의 유전자 서열은 분리되거나 합성되고 상동 인간 항체 유전자의 상응하는 서열 부위로 치환되어, 원래의 설치류 항체의 특이성을 가진 인간 항체를 생산할 수 있다. 이 과정은 EP 023940호, WO 90/07861호 및 W091/09967호에서 설명한다. 대안적으로, 설치류 항체의 가변 도메인의 많은 수의 표면 잔기는 보통 상동 인간 항체에서 발견되는 잔기로 변화되어 잔기의 표면 "베니어링"을 가지고 따라서 인체에 의하여 자신으로 인식될 설치류 항체를 생산할 수 있다. 이 접근은 [Padlan et. al. (1991) Mol. Immunol. 28,489]에 의하여 증명되었다.

[0247] CDR 이식은 마우스 중쇄 및 경쇄 가변 Ig 도메인의 6 CDR 중 하나 이상을 또한 CDR 이식이라 불리는 인간 가변 Ig 도메인의 적당한 4 틀구조에 도입하는 것과 연관된다. 이 기술(Riechmann, L., et al., Nature 332,323 (1988))은 항원과의 일차적 접촉인 CDR 루프를 지지하는 스캐폴드로서 보존된 틀구조 부위(FR1-FR4)를 사용한다. 그러나, CDR 이식의 불리한 점은 틀구조 부위의 아미노산이 항원 결합에 기여할 수 있고 CDR 루프의 아미노산이 두 가변 Ig 도메인의 결합에 영향을 줄 수 있기 때문에, 이것이 원래의 마우스 항체보다 실질적으로 더 낮은 결합 친화성을 가진 인간화 항체를 만들 수 있다는 것이다. 인간화 모노클론 항체의 친화성을 유지하기 위해서, CDR 이식 기술은 원래의 마우스 항체의 틀구조 부위와 가장 가깝게 닮아 있는 인간 틀구조 부위를 선택하는 것과 항원 결합 부위의 컴퓨터 모델링의 도움을 받아 틀구조 또는 CDR 내의 단일 아미노산의 부위-유도 돌연변이생성(site-directed mutagenesis)에 의하여 개선될 수 있다[예를 들면, Co, M. S., et al. (1994), J. Immunol. 152,2968-2976].

[0248] 인간화 항체의 한 방법은 비-인간 중쇄 및 경쇄 서열을 인간 중쇄 및 경쇄 서열에 정렬하는 것, 비-인간 틀구조를 이 정렬에 기초한 인간 틀구조로 선택하는 것과 대체하는 것, 인간화 서열의 입체형태를 예측하기 위한 분자 모델링 및 모체 항체의 입체형태와 비교하는 것을 포함한다. 이 과정은 인간화 서열 모델의 예측된 입체형태가 모체 비-인간 항체의 비-인간 CDR의 입체형태에 밀접하게 가까워질 때까지 CDR의 구조를 방해하는 CDR 부위의 잔기의 반복되는 복귀 돌연변이가 수반된다. 이 인간화 항체는 예를 들면 Ashwell 수용체를 통하여 흡수와 제거를 촉진하도록 더 유도체를 생성할 수 있다(예를 들면, 본 명세서에서 참고 인용하는 미국 특허 제5,530,101호 및 제5,585,089호를 참조하라.)

[0249] 합리적 설계에 의한 많은 수의 마우스 모노클론 항체의 인간화가 보고되었다(예를 들면, 2002년 7월 11일 공개된 20020091240, WO 92/11018 및 미국 특허 제5,693,762호, 미국 특허 제5,766,866호를 참조하라.)

[0250] **아미노산 서열 변이체**

[0251] 돌연변이 생성을 위한 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 부위의 동정을 위한 유용한 방법은 [Cunningham and Wells Science, 244:1081-1085 (1989)]에서 설명하는 바와 같이, "알라닌 스캐닝 돌연변이 생성"이라고 불린다. 여기서, 잔기 또는 표적 잔기군이 동정되고(예를 들면, 아르기닌, 아스파라긴, 히스티딘, 리신 및 글루탐산과 같은 하전된 잔기) 아미노산의 항원과의 상호작용에 영향을 미치도록 중성 또는 음성으로 하전된 아미노산(가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)에 의해서 대체된다. 그 후, 치환에 기능적 민감성을 나타내는 아미노산 위치는 치환 부위에 또는 치환의 부위를 위해서 다른 변이체를 도입함으로써 정제된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위가 사전 결정되는 동안, 돌연변이의 성질 자체는 사전 결정될 필요가 없다. 예를 들면, 주어진 부위에서 돌연변이의 실행을 분석하기 위해서, 표적 코돈 또는 부위에서 알라닌 스캐닝 또는 무작위 돌연변이 생성을 수행하고 소정의 활성을 위하여 발현된 항체 변이체를 스크린한다.

[0252] 아미노산 서열 삽입은 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 내부 서열 삽입뿐만 아니라 하나의 잔기로부터 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지의 길이의 범위를 가지는 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 가진 에피토프 또는 에피토프 태그 또는 구조 수용체 에피토프에 융합된 (항체 단편을 포함한) 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 예를 들면 N-말단 또는 C-말단에서 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드에 융합을 포함한다.

[0253] 용어 "에피토프에 태그된"은 에피토프 태그에 융합된 항체를 가리킨다. 에피토프 태그 폴리펩티드는 항체가 만 들어질 수 있는 에피토프를 제공하기에 충분한 잔기를 가지지만 충분히 작아서 항체의 활성을 방해하지 않는다. 바람직하게는, 에피토프 태그는 충분히 유일해서 그것에 대한 항체가 다른 에피토프와 실질적으로 교차-반응하지 않는다. 대체로 적합한 태그 폴리펩티드는 적어도 6 아미노산 잔기 및 대개 약 8-50 아미노산 잔기 사이(바람직하게는 약 9-30 잔기 사이)를 가진다. 예는 flu HA 태그 폴리펩티드 및 그것의 항체 12CA5[Field et al., Mol. Cell. Biol. 8: 2159-2165 (1988)]; c-myc 태그 및 그것의 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 및 9E10 항체[Evan et al., Mol. Cell. Biol. 5(12):3610-3616 (1985)]; 및 단순 포진 바이러스 당단백질 D(gD) 태그 및 그것의

항체[Paborsky et al., Protein Engineering 3 (6):547-553 (1990)]를 포함한다. 다른 대표적 예는 니켈 킬레이트화를 사용하여 표지된 화합물의 분리를 허용하는 폴리-히스티딘 서열, 대체로 약 6 히스티딘 잔기이다. 당 업계에 공지되고 일상적으로 사용되는 다른 표지 및 태그, 예를 들면 FLAG[®] 태그(Eastman Kodak, Rochester, NY)는 본 발명에 포함된다.

[0254] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "구조 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체 내 혈청 반감기 증가에 관여하는 IgG 분자(예를 들면, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)의 Fc 분위의 에피토프를 가리킨다.

[0255] 변이체의 다른 유형은 아미노산 치환 변이체이다. 이 변이체는 제거된 항체 분자에 적어도 하나의 아미노산 잔기를 가지고 다른 잔기가 그것 대신에 삽입된다. 임의의 고가변 또는 CDR 부위 또는 틀구조 부위 내에서 치환 돌연변이가 생성이 예상된다. 보존적 치환은 표 1에서 나타낸다. 가장 보존적 치환은 "바람직한 치환"의 제목 아래에서 발견된다. 이 치환이 생물학적 활성에 아무런 변화를 가져오지 않는다면, 표 1에서 "대표적 치환"으로 명명되거나 아미노산 분류를 참고하여 하기에서 더 설명한 더 실질적 변화가 소개될 수 있고 그 산물은 스크리닝된다.

표 1

원래	대표적	바람직한 잔기 치환
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; gln	arg
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	ala	
His (H)	asn; gln; lys; arg	
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe;	leu norleucine
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	
Pro (P)	ala	
Ser (S)	thr	
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

[0256]

[0257]

[0258] 항체의 생물학적 특성의 실질적 변형은 (a) 치환의 부위의 폴리펩티드 골격의 구조, 예를 들면 판 또는 나선 입체형태, (b) 표적 부위의 분자의 전하 또는 소수성 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는 효과를 현저히 다르게 하

는 치환을 선별함으로써 실행된다. 자연적으로 발생하는 잔기는 통상적 측쇄 특성에 기초한 군으로 나누어진다:

[0259] (1) 소수성: 노르루신, met, ala, val, leu, ile;

[0260] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

[0261] (3) 산성: asp, glu;

[0262] (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

[0263] (5) 쇠 방향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

[0264] (6) 방향성: trp, tyr, phe.

[0265] 보존적 치환은 아미노산을 그 분류의 다른 구성원으로 대체하는 것과 연관된다. 비보존적 치환은 이 분류 중 하나의 구성원을 다른 분류의 구성원으로 대체하는 것과 연관된다.

[0266] 또는, 모노클론, 인간, 인간화, Human Engineered™ 또는 변이체 항체의 적합한 입체형태를 유지하는 데 관여하지 않는 임의의 시스템인 잔기는 분자의 산화적 안정성을 향상시키고 비정상적 교차결합을 방지하기 위하여 대체로 세린으로 치환될 수 있다. 반대로, 시스템인 결합은 (특히 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우) 그것의 안정성을 향상시키기 위하여 항체에 첨가될 수 있다.

[0267] 친화력의 성숙은 모체 항체의 CDR 내에 치환이 된 항체 변이체를 준비하고 스크린하는 것과 모체 항체에 상대적인 결합 친화력과 같은 생물학적 특성을 개선한 변이체를 선별하는 것에 관련된다. 이 치환 변이체를 발생시키기 위한 편리한 방법은 파아지 표지를 사용한 친화력의 성숙이다. 간단히 설명하면, 몇 개의 고가변 지역 부위 (예를 들면 6-7 부위)는 각 부위에 가능한 아미노 치환을 발생시키기 위하여 돌연변이가 된다. 따라서, 발생된 항체 변이체는 각 입자 내에 포장된 M13의 유전자 III 산물에 융합과 같이 섬질 파아지 입자로부터 1가 형식으로 나타난다. 그 후, 파아지-표지된 변이체를 그것의 생물학적 활성(예를 들면, 결합 친화력)에 대하여 스크리닝한다.

[0268] 알라닌 스캐닝 돌연변이 생성은 항원 결합에 현저히 기여하는 고가변 영역 잔기를 확인하기 위하여 수행될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 항체와 항원 사이의 접촉점을 확인하기 위하여 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 이 접촉 잔기 및 인접 잔기는 본 명세서에서 고안된 기술에 따른 치환을 위한 후보이다. 이 변이체가 생성되면, 변이체의 패널을 본 명세서에 설명한 스크리닝을 하고 하나 이상의 분석으로 우세한 특성을 가진 항체를 좀더 발전시키기 위하여 선별할 수 있다.

[0269] 또한, 모체 항체에 상대적인 변형된 글리코실화 패턴, 예를 들면 항체에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 부위의 제거 및/또는 항체에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위의 첨가를 가지는 항체 변이체를 생산할 수 있다.

[0270] 통상적으로 항체의 글리코실화는 N-결합이거나 O-결합이다. N-결합은 아스파라긴 잔기의 측쇄의 탄수화물 부분에 부착된 것을 말한다. X가 프롤린을 제외한 임의의 아미노산인 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌은 탄수화물 부분이 아스파라긴 측쇄에 효소에 의하여 부착하기 위한 인식 서열이다. 폴리펩티드 내의 이 트리펩티드 서열 중 임의의 것의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 만든다. 따라서, N-결합 글리코실화 부위는 아미노산 서열을 변경함으로써 항체에 첨가될 수 있어서 이 트리펩티드 서열의 하나 이상을 함유한다. O-결합 글리코실화는 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신도 사용될 수 있지만 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로오스 중 하나를 히드록시아미노산, 가장 일반적으로 세린 또는 트레오닌에 부착하는 것을 말한다. O-결합 글리코실화 부위는 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 원래의 항체의 서열에 삽입 또는 치환함으로써 항체에 첨가될 수 있다. 예로서, 도 4A(NGS)의 41-43 위치에 RX1의 아미노산을 유지할 수 있다. 대안적으로, 아미노산 41 및 42(NG)만을 유지할 수 있다.

[0271] 통상, Human Engineered™ 항체의 아미노산 서열 변이체는 중쇄나 경쇄의 원래의 Human Engineered™ 항체의 아미노산 서열과 적어도 60% 아미노산 서열 동일성(예를 들면, 도 19B에서 22B 중 어느 하나에서와 같이), 예를 들면 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 및 100%를 포함하여 더 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 85%, 더 바람직하게는 적어도 90% 및 가장 바람직하게는 적어도 95%의 아미노산 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 가질 것이다. 이 서열에 대한 동일성 또는 상동성은 필요하다면 최대 퍼센트 서열 동일성을 얻기 위하여 서열을 정렬하고 간격을 끼

위닝고 (상기 표 1에서 정의된) 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 부분으로서 고려하지 않은 후에, Human Engineered™ 잔기와 동일한 후보 서열의 아미노산 잔기의 백분율로서 본 명세서에서 정의한다. N-말단, C-말단 또는 내부 연장, 결실 또는 항체 서열 내로의 삽입 중 어떤 것도 서열 동일성 또는 상동성에 영향을 미치는 것처럼 해석되지 않을 것이다. 따라서, 서열 동일성은 두 폴리펩티드의 아미노산의 위치의 유사성을 비교하기 위하여 통상적으로 사용되는 표준 방법에 의하여 결정될 수 있다. BLAST 또는 FASTA와 같은 컴퓨터 프로그램을 사용하여 그 각각의 아미노산을 (하나 또는 두 서열의 전체 길이를 따르거나 하나 또는 두 서열의 사전 결정된 부분을 따라서) 선택적으로 맞추기 위하여 두 폴리펩티드를 정렬한다. 상기 프로그램은 디폴트 오프닝 별정 및 디폴트 간격 별점을 제공하고 점수 매트릭스, 예를 들면 PAM 250[표준 점수 매트릭스; Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp. 3 (1978) 참조]는 컴퓨터 프로그램에 접목하여 사용될 수 있다. 그 후, 예를 들면, 퍼센트 동일성을 하기와 같이 계산할 수 있다: 일치한 짝의 총수에 100을 곱한 후 짝맞은 거리시간 내의 긴 서열의 길이의 총합으로 나누고 두 서열을 정렬하기 위하여 간격의 수를 긴 서열에 끼워 넣는다.

[0272] 항체의 다른 변형이 고려된다. 예를 들면, 암 치료에서 항체의 효용성을 증대시키기 위해서 효과기 기능에 대하여 본 발명의 항체를 변형하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들면, 시스테인 잔기를 Fc 부위에 도입함으로써 이 부위에 내부 사슬 이황화 결합이 형성되게 할 수 있다. 그렇게 생성된 호모다имер 항체는 내재화 능력을 개선하고/하거나 보체-매개 세포 사멸 및 항체-의존적 세포의 세포독성(ADCC)을 증가시킬 수 있다. [Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) 및 Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)]을 참조하라. 또한, 증가된 항-종양 활성을 가진 호모다имер 항체는 [Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993)]에서 설명한 이 종생기능성 교차결합기를 사용하여 제조할 수 있다. 대안적으로, 두 개의 Fc 부위를 가짐으로써 보체 용해 및 ADCC 능력을 증대시킬 수 있는 항체를 조작할 수 있다. [Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)]을 참조하라. 또한, CDR 내의 서열은 항체를 MHC 클래스 II에 결합하게 하여 불필요한 헬퍼 T 세포 반응을 촉발시킬 수 있다는 것이 알려졌다. 보존적 치환은 항체가 결합 활성을 유지하게 할 수 있지만 불필요한 T 세포 반응을 촉발시키는 능력을 잃게 할 수 있다. 또한, 쥐 가변 영역이 인간 감마1, 감마 2, 감마 3 및 감마 4 불변 영역과 연결된 키메라 항체를 설명하는, 본 명세서에서 그 전체를 참고 인용하는 [Steplewski et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(13):4852-6]을 참조하라.

[0273] 본 발명의 임의의 구체예에서, 예를 들면 종양 침투를 증가시키기 위해서 무결 항체보다는 항체 단편을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이 경우, 예를 들면 반감기를 증가시키기 위하여 PEG 또는 다당류 폴리머를 포함한 다른 수용성 폴리머를 항체 단편에 첨가하여 그것의 혈청 반감기를 증가시키기 위하여 항체 단편을 변형하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 예를 들면 구조 수용체 결합 에피토프를 항체 단편에 혼입함으로써 (예를 들면, 항체 단편의 적당한 부위의 돌연변이에 의하거나 에피토프를 예를 들면 DNA 또는 펩티드 합성에 의하여 이후 말단 또는 중간의 항체 단편에 융합되는 펩티드 태그에 혼입함으로써) 이를 달성할 수 있다. (예를 들면, WO 96/32478호 참조).

[0274] 바람직하게는, 구조 수용체 결합 에피토프는 Fc 도메인의 하나 또는 두 개의 루프의 임의의 하나 이상의 아미노산 잔기가 항체 단편의 유사한 위치에 전달된 부위를 구성한다. 보다 더 바람직하게는, Fc 도메인의 하나 또는 두 개의 루프의 세 개 이상의 잔기가 전달된다. 그보다 더 바람직하게는, 에피토프가 Fc 부위의 CH2 도메인에서 취해져 CH1, CH3 또는 VH 부위 또는 하나 이상의 이 부위에 전달된다. 대안적으로, 에피토프가 Fc 부위의 CH2 도메인에서 취해져 항체 단편의 C.서브.L 부위 또는 V.서브.L 부위 또는 둘 다에 전달된다. 또한, Fc 변이체 및 구조 수용체와의 그것의 상호작용을 설명하는 국제 출원 WO 97/34631호 및 WO 96/32478호를 참조하라.

[0275] 따라서, 본 발명의 항체는 이황화 결합에 관여하는 시스테인이 변형되거나 제거되고/되거나 메티오닌이 N-말단에 첨가되고/되거나 하나 이상의 N-말단 20 아미노산이 제거되고/되거나 C1q 결합 부위와 같은 보체와 상호작용하는 부위가 제거되고/되거나 ADCC 부위가 제거되는 변이체를 포함한, Fc 구조 수용체와 상호작용하는 능력을 보유하는 인간 Fc 부분, 인간 일차 Fc 부분 또는 그것의 변이체를 포함할 수 있다[예를 들면, Molec. Immunol. 29 (5):633-9 (1992) 참조].

[0276] 이전의 연구는 일차적으로 IgG 잔기 233-239로 구성된 낮은 경첩(hinge)부위에 대한 FcR의 인간 및 쥐 IgG 상의 결합 부위의 지도를 작성하였다. 다른 연구는 추가적 폭넓은 단편, 예를 들면 인간 Fc 수용체 I의 GIy316-Lys338, 인간 Fc 수용체 III의 Lys274-Arg301 및 Tyr407-Arg416 또는 낮은 경첩 외부에서 발견된 몇 개의 특정 잔기, 예를 들면 쥐 Fc 수용체 II와 상호작용하는 쥐 IgG2b의 Asn297 및 Glu318을 제안하였다. 인간 Fc 수용체 IIIA를 가지는 인간 IgG1 Fc 단편의 3.2-A 결정 구조의 보고서는 Fc 수용체 IIIA에 결합에 관여하는 IgG1 잔기

Leu234-Ser239, Asp265-Glu269, Asn297-Thr299 및 Ala327-Ile332를 서술한다. 결정 구조에 기초하여, 낮은 경첩(Leu234-Gly237)뿐만 아니라, IgG CH2 도메인 루프 FG(잔기 326-330) 및 BC (잔기 265-271)의 잔기가 Fc 수용체 IIA에 결합하는 역할을 할 수 있다는 것이 제시되었다. 본 명세서에 그 전체를 참고 인용하는 [Shields et al., J. Biol. Chem., 276 (9):6591-6604 (2001)]를 참조하라. Fc 수용체 결합 부위 내의 잔기의 돌연변이는 변경된 효과기 기능, 예를 들면 변경된 ADCC 또는 CDC 활성 또는 변경된 반감기를 초래할 수 있다. 전술한 바와 같이, 잠재적 돌연변이는 알라닌으로 치환, 보존적 치환, 비보존적 치환 또는 다른 IgG 서브클래스의 동일한 위치의 상응하는 아미노산 잔기로 대체하는 것(예를 들면, IgG1 잔기를 그 위치의 상응하는 IgG2 잔기로 대체)을 포함한 하나 이상의 잔기의 삽입, 결실 또는 치환을 포함한다.

[0277] Shields et al.은 모든 인간 Fc 수용체에 결합하는 것에 관여하는 IgG1 잔기는 경첩에 인접한 CH2 도메인에 위치하고, 하기와 같이 두 카테고리로 나뉜다: 1) 모든 FcR과 직접적으로 상호작용할 수 있는 위치는 Leu234-Pro238, Ala327 및 Pro329 (및 가능하게는 Asp265)을 포함하고; 2) 탄수화물 성질 또는 위치에 영향을 미치는 위치는 Asp265 및 Asn297을 포함한다. Fc 수용체 II에 결합하는 것에 영향을 미치는 추가적 IgG1 잔기는 하기와 같다: (가장 큰 영향) Arg255, Thr256, Glu258, Ser267, Asp270, Glu272, Asp280, Arg292, Ser298 및 (낮은 영향) His268, Asn276, His285, Asn286, Lys290, Gln295, Arg301, Thr307, Leu309, Asn315, Lys322, Lys326, Pro331, Ser337, Ala339, Ala378 및 Lys414. A327Q, A327S, P329A, D265A 및 D270A은 결합을 감소시켰다. 모든 FcR의 상기에서 확인된 잔기 뿐만 아니라, Fc 수용체 IIA에 결합을 40% 이상으로 감소시킨 추가적 IgG1 잔기는 하기와 같다: Ser239, Ser267(Gly단), His268, Glu293, Gln295, Tyr296, Arg301, Val303, Lys338 및 Asp376. FcRIIIA에의 결합을 개선시킨 변이체는 T256A, K290A, S298A, E333A, K334A 및 A339T을 포함한다. Lys414는 FcRIIA 및 FcRIIB의 결합에 40% 감소, Arg416은 FcRIIA 및 FcRIIIA에 30% 감소, Gln419은 FcRIIA에 30% 감소 및 FcRIIB에 40% 감소 및 Lys360은 FcRIIIA에 23% 개선을 나타내었다. 또한, [Presta et al., Biochem. Soc. Trans. (2001) 30,487-490]을 참조하라.

[0278] 예를 들면, 본 명세서에서 그 전체를 참고 인용하는 미국 특허 제6,194,551호는 (Kabat 넘버링을 사용한) 아미노산 329, 331 또는 322 위치의 인간 IgG Fc 부위에 돌연변이를 함유하는 변경된 효과기 기능을 가진 변이체를 설명하는데, 그 일부는 감소한 C1q 결합 또는 CDC 활성을 나타낸다. 다른 예로서, 본 명세서에서 그 전체를 참고 인용하는 미국 특허 제6,737,056호는 (Kabat 넘버링을 사용한) 아미노산 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439 위치의 인간 IgG Fc 부위에 돌연변이를 함유한 변경된 효과기 또는 Fc-감마-수용체 결합을 가진 변이체를 설명하는데, 그 일부는 감소한 ADCC 또는 CDC 활성과 연관된 수용체 결합 프로필을 나타낸다. 이 중, 아미노산 238, 265, 269, 270, 327 또는 329 위치의 돌연변이는 FcRI에 결합하는 것을 감소시키는 것으로 나타나고, 아미노산 238, 265, 269, 270, 292, 294, 295, 298, 303, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 373, 376, 414, 416, 419, 435, 438 또는 439 위치의 돌연변이는 FcRII에 결합하는 것을 감소시키는 것으로 나타나며, 아미노산 238, 239, 248, 249, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 272, 278, 289, 293, 294, 295, 296, 301, 303, 322, 327, 329, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 416, 434, 435 또는 437 위치의 돌연변이는 FcRIII에 결합하는 것을 감소시키는 것으로 나타난다.

[0279] 본 명세서에서 그 전체를 참고 인용하는 미국 특허 제5,624,821호는 쥐 항체의 C1q 결합 활성을 증쇄의 아미노산 잔기 318, 320 또는 322를 돌연변이시킴으로써 변경시킬 수 있고 잔기 297(Asn)을 대체하는 것은 용해 활성의 제거를 가져온다고 보고한다.

[0280] 본 명세서에서 그 전체를 참고 인용하는 미국 출원 공개 제20040132101호는 아미노산 (Kabat 넘버링을 사용한) 240, 244, 245, 247, 262, 263, 266, 299, 313, 325, 328 또는 332 위치 또는 (Kabat 넘버링을 사용한) 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 또는 332 위치에 돌연변이를 가지는 변이체를 설명하는데, 이 중 아미노산 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 또는 332 위치의 돌연변이는 ADCC 활성을 감소시키거나 Fc 감마 수용체에 결합하는 것을 감소시킬 수 있다.

[0281] 본 명세서에서 그 전체를 참고 인용하는 [Chappel et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1991;88 (20):9036-40]는 IgG1의 친세포성 활성이 그것의 증쇄 CH2 도메인의 내부 특성이라고 보고한다. IgG1의 임의의 아미노산 잔기 234-237의 단일 점 돌연변이는 그것의 활성을 현저히 저하하거나 제거하였다. 전체 결합 활성을 회복하기

위해서 IgGq 잔기 234-237(LLGG) 모두를 IgG2 및 IgG4로 치환하는 것이 요구되었다. 전체 ELLGGP 서열(잔기 233-238)을 함유한 IgG2 항체는 야생형 IgG1 보다 더 활성이 있는 것으로 관찰되었다.

[0282] 본 명세서에서 그 전체를 참고 인용하는 [Isaacs et al., J Immunol. 1998;161(8):3862-9]는 Fc 감마 R 결합에 중요한 모티프 내의 돌연변이(글루탐산 233을 프롤린으로, 루신/페닐알라닌 234를 발린으로 및 루신 235를 알라닌으로)는 표적 세포의 결실을 완전히 방지하였다. 글루탐산 318을 알라닌으로의 돌연변이는 마우스 IgG2b의 효과기 기능을 제거하였고, 또한 인간 IgG4의 능력을 감소시켰다.

[0283] 본 명세서에서 그 전체를 참고 인용하는 [Armour et al., Mol Immunol. 2003;40(9):585-93]은 야생형 IgG1보다 적어도 10배 덜 효과적으로 활성화 수용체, Fc 감마 RIIa와 반응하지만, 억제 수용체, Fc 감마 RIIb와의 결합은 오직 4배 감소된 IgG1 변이체를 동정하였다. 아미노산 233-236 위치 및/또는 327, 330 및 331 위치의 부위에서 돌연변이를 만들었다. 또한, 본 명세서에서 그 전체를 참고 인용하는 WO 99/58572호를 참조하라.

[0284] 본 명세서에서 그 전체를 참고 인용하는 [Xu et al., J Biol Chem. 1994;269 (5): 3469-74]는 IgG1 Pro331을 Ser으로 돌연변이시킨 것은 C1q 결합을 현저히 감소시키고 용해 활성을 실질적으로 제거하였다고 보고한다. 대조적으로, IgG4의 Ser331을 Pro으로 치환하는 것은 IgG4 Pro331 변이체에 부분적 용해 활성(40%)을 주었다.

[0285] 본 명세서에서 그 전체를 참고 인용하는 [Schoorman et al., Mol Immunol. 2001;38(1):1-8]은 내부-중쇄 결합 형성에 관련된 경첩 시스템 중 하나인 Cys226을 세린으로 돌연변이 시키는 것은 더 안정한 내부-중쇄 결합을 야기하였다고 보고한다. 또한, IgG4 경첩 서열 Cys-Pro-Ser-Cys을 IgG1 경첩 서열 Cys-Pro-Pro-Cys으로 돌연변이 시키는 것은 중쇄 간의 공유 상호작용을 현저히 안정화시킨다.

[0286] 본 명세서에서 그 전체를 참고 인용하는 [Angal et al., Mol Immunol. 1993; 30(1):105-8]은 IgG4의 아미노산 241 위치의 세린을 (IgG1과 IgG2의 그 위치에서 발견되는) 프롤린으로 돌연변이 시키는 것은 동종 항체의 생산 뿐만 아니라 혈청 반감기를 연장하고 원래의 키메라 IgG4에 비하여 조직 분포의 개선을 가져온다고 보고한다.

[0287] 인간 Human Engineered™ 항체

[0288] Human Engineered™

[0289] Studnicka[예를 들면, Studnicka et al. 미국 특허 제5,766,886호; Studnicka et al. Protein Engineering 7:805-814 (1994) 참조]는 항체 분자의 결합 활성을 유지하는 동안 면역성을 감소시키기 위한 방법으로 항체 가변 도메인의 Human Engineering™을 설명하였다. 상기 방법에 따르면, 각 가변 영역 아미노산은 치환의 위험성이 할당되었다. 아미노산 치환은 세 가지 위험성 카테고리 중 하나로 구별된다: (1) 낮은 위험성 변화는 면역성을 항원 결합 붕괴의 최소 가능성으로 감소시키기 위한 가장 큰 잠재력을 가진 것이고; (2) 중간 위험성 변화는 면역성을 더 감소시키지만 항원 결합 또는 단백질 접합에 영향을 미치는 더 큰 가능성을 가지는 것이며; (3) 높은 위험성 변화는 결합 또는 항체 구조를 유지하기 위해 중요하고 항원 결합 또는 단백질 접합에 영향을 받을 가장 높은 위험성을 운반하는 것이다. 프롤린의 3차원 구조적 기능 때문에, 대체로 프롤린의 변형은 그 위치가 통상적으로 낮은 위험성 위치임에도 불구하고 적어도 중간 위험성 변화로 간주된다.

[0290] 설치류 항체의 경쇄 및 중쇄의 가변 영역은 Human Engineering™이어서 항원 결합이나 단백질 접합에 역으로 영향을 중 가능성이 없지만 인간 환경에서 면역성을 감소시킬 가능성이 있도록 결정된 위치에 인간 아미노산을 치환한다. 상기 방법에 따른 변형의 후보자인 "낮은 위험성" 위치에 있는 아미노산 잔기는 설치류 가변 영역의 아미노산 서열을 인간 가변 영역 서열과 정렬함으로써 확인된다. 개체의 VH 또는 VL 서열 또는 인간 공통서열 VH 또는 VL 서열 또는 개체의 또는 공통 인간 생식계열 서열을 포함한 임의의 인간 가변 영역을 사용할 수 있다. 낮은 위험성 위치의 임의의 번호의 아미노산 잔기 또는 낮은 위험성 위치의 모두는 바뀔 수 있다. 예를 들면, 정렬된 쥐와 인간 아미노산 잔기가 다른 각 낮은 위험성 위치에서, 설치류 잔기를 인간 잔기로 대체하는 아미노산 변형이 도입된다. 대안적으로, 낮은 위험성 위치 모두 및 중간 위험성 위치의 임의의 번호에서 아미노산 잔기는 바뀔 수 있다. 이상적으로, 최소의 면역성을 얻기 위해서, 낮은 및 중간 위험성 위치 모두는 설치류에서 인간 서열로 바뀐다.

[0291] 변형된 중쇄 및/또는 경쇄 가변 영역을 함유한 합성 유전자를 구성하여 인간 γ 중쇄 및/또는 카파 경쇄 불변 영역에 결합시킨다. 임의의 인간 중쇄 및 경쇄 불변 영역은 (IgA1 또는 IgA2와 같은 임의의 서브클래스 중의) IgA, IgD, IgE, (IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4와 같은 임의의 서브클래스 중의) IgG 또는 IgM을 포함한 Human Engineered™ 항체 가변 영역과 조합하여 사용될 수 있다. 인간 중쇄 및 경쇄 유전자를 포유동물 세포와 같은 숙

주 세포 내로 도입하고 결과 재조합 면역글로불린 산물을 수득하여 특성화한다.

[0292] 형질전환 동물의 인간 항체

[0293] 또한, M-CSF에 대한 인간 항체는 내생 면역글로불린을 생산하지 않고 인간 면역글로불린 유전자좌를 함유하도록 조작된 형질전환 동물을 사용하여 생산할 수 있다. 예를 들면, WO 98/24893호는 동물이 내생 중쇄 및 경쇄 유전자좌의 비활성화 때문에 기능적 내생 면역글로불린을 생산하지 못하는, 인간 Ig 유전자좌를 가진 형질전환 동물을 개시한다. 또한, WO 91/741호는 면역원에 대한 면역 반응을 장작할 수 있는 형질전환 비영장류 포유류 숙주를 개시하는데, 항체는 영장류 불변 및/또는 가변 영역을 가지고 내생 면역글로불린 코딩 유전자좌는 치환되거나 비활성화된다. WO 96/30498호는 포유동물에서 면역글로불린을 변형시키는, 예를 들면 변형된 항체 분자를 형성하기 위하여 불변 또는 가변 영역의 전체 또는 부분을 대체하는 Cre/Lox 시스템의 용도를 개시한다. WO 94/02602호는 비활성화된 내생 Ig 유전자좌 및 기능적 인간 Ig 유전자좌를 가지는 비인간 포유류 숙주를 개시한다. 미국 특허 제5,939,598호는 내생 중쇄가 결핍되고 하나 이상의 이중 불변 영역로 구성된 외생 면역글로불린 유전자좌를 발현하는 형질전환 마우스를 만드는 방법을 개시한다.

[0294] 전술한 형질전환 동물을 사용하여, 선별된 항원 분자에 대한 면역 반응이 생성될 수 있고, 항체 생성 세포는 동물로부터 제거되어 인간 모노클론 항체를 분비하는 하이브리도마를 생산하는 데 사용될 수 있다. 면역화 프로토콜, 보조제 등은 당업계에 알려져 있고, 예를 들면 WO 96/33735에서 설명한 형질전환 동물의 면역화에 사용된다. 이 공보는 IL 6, IL 8, TNF α , 인간 CD4, L 셀렉틴, gp39 및 과산화물 독소를 포함한 다양한 항원 분자에 대한 모노클론 항체를 개시한다. 상응하는 단백질의 생물학적 활성 또는 생리적 효과를 저해하거나 중화시키는 능력을 위하여 모노클론 항체를 시험할 수 있다. WO 96/33735호는 IL-8, 차단된 IL-8로 면역화된 형질전환 동물의 면역 세포에서 유래된 IL-8에 대한 모노클론 항체가 중성구의 기능을 유도한다고 개시한다. 또한, 형질전환 동물을 면역화하기 위하여 사용되는 항원의 특이성을 가진 인간 모노클론 항체는 WO 96/34096호 및 미국 특허 출원 제20030194404호; 및 미국 특허 출원 제20030031667호에 개시된다.

[0295] 또한, [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); 및 미국 특허 제5,591,669호, 미국 특허 제5,589,369호, 미국 특허 제5,545,807호; 및 미국 특허 출원 제20020199213호를 참조하라. 미국 특허 출원 제20030092125호는 소정의 에피토프에 대한 동물의 면역 반응을 한 쪽으로 치우치게 하기 위한 방법을 설명한다. 또한, 인간 항체는 시험관 내 활성화 B 세포에 의하여 발생될 수 있다(미국 특허 제5,567,610호 및 제 5,229,275호 참조).

[0296] 파아지 표시 기술을 통한 인간 항체

[0297] 재조합 인간 항체 유전자 및 섬질 박테리오파아지의 표면에 코딩된 항체 단편의 표시를 추적하는 기술의 발전은 직접 인간 항체를 만드는 수단을 제공하였다. 파아지 기술로 생산된 항체는 박테리아에서 항원 결합 단편-대개 Fv 또는 Fab 단편-으로서 생산되고 따라서 효과기 기능이 결핍된다. 효과기 기능은 두 전략 중 하나에 의하여 도입될 수 있다: 포유류 세포에서 발현하기 위한 완전한 항체 또는 효과기 기능을 촉발할 수 있는 제2 결합 부위를 가진 이중특이적 항체 내로 단편을 조작할 수 있다.

[0298] 통상적으로, 항체의 Fd 단편(V_H-C_{H1}) 및 경쇄(V_L-C_L)를 PCR에 의하여 개별적으로 클로닝하고 무작위로 조합 파아지 표시 라이브러리에 재조합한 후, 특정 항원에 결합하기 위하여 선별할 수 있다. Fab 단편은 즉 그것을 코딩하는 유전자에 물리적으로 결합된 파아지 표면에서 발현된다. 따라서, 항원 결합에 의한 Fab의 선별은 연속적으로 증폭될 수 있는 Fab 코딩 서열에 대하여 공동 선별한다. 수 회의 항원 결합 및 재증폭, 패닝(panning)이라는 과정에 의하여, 항원에 특이적인 Fab를 풍부하게 하고 최종적으로 분리한다.

[0299] 1994년에, "지정된 선별"이라 불리는, 항체의 인간화를 위한 접근법이 설명되었다. 지정된 선별은 마우스 모노클론 항체의 인간화를 위한 파아지 표시 기술의 힘을 사용한다(Jespers, L. S., et al., Bio/Technology 12,899-903(1994) 참조). 이 때문에, 마우스 모노클론 항체의 Fd 단편을 인간 경쇄 라이브러리와 조합하여 표시할 수 있고 그 후 최종 하이브리드 Fab 라이브러리를 항원으로 선별할 수 있다. 마우스 Fd 단편은 선별을 지정하는 주형을 제공한다. 이어서, 선별된 인간 경쇄는 인간 Fd 단편 라이브러리와 조합된다. 최종 라이브러리의 선별은 완전히 인간 Fab를 수득한다.

[0300] 파아지 표시 라이브러리로부터 인간 항체를 유도하는 다양한 과정이 설명되었다(예를 들면, Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991); 미국 특허 제5,565,332호 및 제5,573,905호; Clackson T., and Wells, J.A., TIBTECH 12, 173-184 (1994) 참조). 특히, 파아지 표시 라이

브러리로부터 유래된 항체의 시험관 내 선별 및 진화는 강력한 도구가 되었다(Burton, D.R., 및 Barbas III, C.F., Adv. Immunol. 57,191-280 (1994); 및 Winter, G., et al., Annu. Rev. Immunol. 12,433-455(1994); 미국 특허 출원 제20020004215호 및 W092/01047호; 2003년 10월 9일 공개된 미국 특허 출원 제20030190317호 및 미국 특허 제6,054,287호; 미국 특허 제5,877,293호 참조).

[0301] [Watkins, "Screening of Phage-Expressed Antibody Libraries by Capture Lift," Methods in Molecular Biology, Antibody Phage Display: Methods and Protocols 178:187-193, 및 2003년 3월 6일 공개된 미국 특허 출원 제200120030044772호]는 포획 리프트(capture lift)에 의하여 파아지 발현 항체 라이브러리 또는 다른 결합 분자를 스크리닝하기 위한 방법, 고체 지지물 상의 후보 결합 분자를 움직이지 못하게 하는 것에 관한 방법을 설명한다.

[0302] 본 명세서의 "스크리닝 방법"이라는 제목의 부분에서 설명한 분석을 사용하거나 당업계에 알려진 임의의 적합한 분석을 사용한 본 발명의 치료 방법의 활성 및 적합성을 위하여 항체 산물을 스크리닝할 수 있다.

[0303] 다른 공유 변형

[0304] 또한, 항체의 공유 변형은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 그것은 적용가능하다면 화학 합성 또는 항체의 효소적 또는 화학적 개열에 의하여 만들어질 수 있다. 항체의 공유 변형의 다른 유형은 항체의 표적 아미노산 잔기를 선별된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체 생성제와 반응시킴으로써 분자 내로 도입된다.

[0305] 가장 통상적으로 시스테인닐 잔기가 α-할로아세트산(및 상응하는 아민), 예를 들면 클로로아세트산 또는 클로로아세트아미드와 반응하여 카르복시메틸 또는 카르복시아미도메틸 유도체를 수득한다. 또한, 시스테인닐 잔기는 브로모트리플루오로아세톤, 알파-브로모-β-(5-이미도졸)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-니트로-2-피리딘 디설파이드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-니트로페놀 또는 클로로-7-니트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸과 반응하여 유도체가 생성된다.

[0306] 히스티딘 잔기는 이 잔기가 히스티딘 측쇄에 상대적으로 특이적이기 때문에 pH 5.5-7.0에서 디에틸피로카보네이트와 반응하여 유도체가 생성된다. 또한, 파라-브로모페나실 브로마이드가 유용하고; 그 반응은 0.1 M pH 6.0의 카코딜레이트에서 수행되는 것이 바람직하다.

[0307] 리시닐 및 아미노-말단 잔기는 숙신 또는 다른 무수카르복실산과 반응한다. 이 제제를 통한 유도체 생성은 리시닐 잔기의 전하를 역으로 바꾸는 효과가 있다. 알파-아미노 함유 잔기의 유도체 생성을 위한 다른 적합한 제제는 이미도에스테르, 예를 들면 메틸 피콜린이미데이트, 피리독살 포스페이트, 피리독살, 수소화클로로보로, 트리니트로벤젠술포산, 0-메틸이소우리아, 2,4-펜타네디온 및 글리옥실레이트와의 트랜스아미나제-촉매 반응을 포함한다.

[0308] 아르기닌 잔기는 하나 또는 수 개의 중래 제제, 그 중 페닐글리옥살, 2,3-부타네디온, 1,2-사이클로헥사네디온 및 닌히드린과 반응하여 변형된다. 아르기닌 잔기의 유도체생성은 구아니딘 작용기의 높은 pKa 때문에 반응이 알칼린 조건에서 수행되는 요구된다. 또한, 이 제제는 리신의 군뿐만 아니라 아르기닌 입실론-아미노 군과 반응할 수 있다.

[0309] 방향족 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄과 반응하여 스펙트럼 표지를 티로실 잔기에 도입하는 것에 특정 관심사가 있는, 티로실 잔기의 특이적 변형을 만들 수 있다. 가장 통상적으로, 0-아세틸 티로실 중 및 3-니트로 유도체를 각각 형성하기 위하여 N-아세틸이미다졸 및 테트라니트로메탄이 사용된다. 방사면역측정법에서 사용하기 위한 표지된 단백질을 준비하기 위해서 티로실 잔기에 ¹²⁵I 또는 ¹³¹I를 사용하여 옥소를 함유시킨다.

[0310] 카르복실 측 군(아스파틸 또는 글루타밀)은 카보다이미드(R-N.dbd.C.dbd.N-R')와 반응하여 선택적으로 변형되는데, R 및 R'는 다른 알킬 군, 예를 들면 1-사이클로헥실-3-(2-모르폴리닐-4-에틸) 카보다이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-디메틸펜틸) 카보다이미드이다. 또한, 아스파틸 및 글루타밀 잔기는 암모늄 이온과 반응하여 아스파라지닐 및 글루타미닐 잔기로 변환된다.

[0311] 글루타미닐 및 아스파라지닐 잔기는 자주 상응하는 글루타밀 및 아스파틸 잔기로 각각 탈아미드화된다. 이 잔기들은 중성 또는 염기 조건 하에 탈아미드화된다. 이 잔기들의 탈아미드화된 형태는 본 발명의 범위 내에 있다.

[0312] 다른 변형은 프롤린 및 리신의 수산화, 세틸 또는 트레오닐 잔기의 히드록실기의 인산화 또는 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 알파-아미노기의 메틸화(T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties,

W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), N-말단 아민의 아세틸화 및 C-말단 카르복실기의 아미드화를 포함한다.

[0313] 다른 유형의 공유 변형은 항체에 화학적으로 또는 효소에 의하여 결합한 글리코시드에 관련된다. 이 과정은 N-또는 O-결합 글리코실화의 글리코실화 능력을 가진 숙주 세포에서 항체의 생산을 필요로 하지 않은 경우에 유리하다. 사용된 결합 방식에 따라서, 당이 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 자유 카르복실기, (c) 자유 황화수소기, 예를 들면 시스테인의 그것, (d) 자유 히드록실기, 예를 들면 세린, 트레오닌 또는 히드록시프로린의 그것 또는 (e) 방향족 잔기, 예를 들면 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판의 그것 또는 (f) 글루타민의 아미드기에 부착될 수 있다. 이 방법은 1987년 9월 11일 공개된 W087/05330호 및 [Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)]에서 설명한다.

[0314] 항체에 존재하는 임의의 탄수화물 부분의 제거는 화학적으로 또는 효소에 의하여 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화는 트리플루오로메탄술폰산 화합물 또는 등가 화합물에 항체를 노출시키는 것이 필요하다. 이 처리는 무결 항체를 보내는 동안, 결합하는 당을 제외한 대부분의 또는 모든 당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민)의 개열을 초래한다. 화학적 탈글리코실화는 [Hakimuddin, et al. Arch. Biochem. Biophys. 259:52 (1987) 및 Edge et al. Anal. Biochem., 118:131 (1981)]에서 설명한다. 항체 상의 탄수화물 부분의 효소에 의한 개열은 [Thotakura et al. Meth. Enzymol. 138:350 (1987)]에서 설명한 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다아제의 사용에 의하여 달성될 수 있다.

[0315] 항체의 다른 유형의 공유 변형은 항체를 다양한 비단백질성감염 폴리머, 예를 들면 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시에틸화 폴리올, 폴리옥시에틸화 소르비톨, 폴리옥시에틸화 글루코스, 폴리옥시에틸화 글리세롤, 폴리옥시알킬렌 또는 텍스트란과 같은 다당류 폴리머 중의 하나에 결합하는 것을 포함한다. 이 방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들면, 미국 특허 제4,640,835호; 제4,496,689호; 제4,301,144호; 제4,670,417호; 제4,791,192호, 제4,179,337호, 제4,766,106호, 제4,179,337호, 제4,495,285호, 제4,609,546호 또는 EP315456호를 참조하라.

[0316] 유전자 치료

[0317] 치료 항체를 적당한 세포에 전달하는 것은 물리적 DNA 전달 방법(예를 들면, 리포솜 또는 화학적 처리)의 사용 또는 바이러스 벡터(예를 들면, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스 또는 레트로바이러스)의 사용을 포함한, 당업계에 공지된 임의의 적합한 접근법을 사용하여 생체 밖, 제자리, 생체 내의 유전자 치료를 통하여 영향받을 수 있다. 예를 들면, 생체 내 치료의 경우, 소정의 항체를 코딩하는 핵산을 단독으로 또는 벡터, 리포솜 또는 침전물과 결합하여 피험자에게 직접 주사할 수 있고, 일부 구체예에서, 항체 화합물의 발현을 원하는 부위에 주사할 수 있다. 생체 밖 치료의 경우, 피험자의 세포가 제거되고, 핵산이 이 세포에 도입되며, 변형된 세포는 피험자에게 직접 되돌려 지거나 또는 예를 들면 환자 내로 주입되는 다공성 막 내에 캡슐로 싸여 진다. 예를 들면, 미국 특허 제4,892,538호 및 제5,283,187호를 참조하라. 살아있는 세포에 핵산을 도입하는 데 이용하는 다양한 기술이 있다. 이 기술은 핵산을 소정의 숙주 세포의 시험관 내 아니면 생체 내 배양 세포에 전달하는지에 따라서 다양하다. 핵산을 시험관 내 포유동물 세포에 전달하기에 적합한 기술은 리포솜, 전기천공법, 미량주사법, 세포 융합, DEAE-텍스트란 및 인산칼슘 침전법의 사용을 포함한다. 핵산의 생체 밖 전달을 위하여 통상적으로 사용되는 벡터는 레트로바이러스이다.

[0318] 다른 생체 내 핵산 전달 기술은 바이러스 벡터(예를 들면 아데노바이러스, 단순 포진 I 바이러스 또는 아데노-연관 바이러스)를 통한 트랜스팩션 및 지질-기초 시스템을 포함한다. 핵산 및 트랜스팩션 제제는 미량입자와 선택적으로 결합된다. 대표적 트랜스팩션 제제는 인산칼슘 또는 염화칼슘 공동-침전법, DEAE-텍스트란-매개 트랜스팩션, 제4 암모늄 양친매성 DOTMA(GIBCO-BRL에 의하여 Lipofectin으로 상품화된 (디올레오일옥시프로필) 트리메틸암모늄 브로마이드)(Felgner et al, (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 7413-7417; Malone et al. (1989) Proc. Natl Acad. Sci. USA 866077-6081); 매달린 트리메틸암모늄 머리를 가진 지방친화성 글루탐산 (Ito et al. (1990) Biochem. Biophys. Acta 1023,124-132); 양이온 지질 디옥타데실아미도 글리실스페르민과 같은 물질대사 가능한 지질(DOGS, Transfectam, Promega) 및 디팔미토일포스파티딜 에탄올아밀스페르민 (DPPES)(J. P. Behr (1986) Tetrahedron Lett. 27,5861-5864; J. P. Behr et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86,6982-6986); 물질대사 가능한 제4 암모늄염(DOTB,N-(1- [2,3-디올레오일옥실 프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 메틸설페이트(DOTAP) (Boehringer Mannheim), 폴리에틸렌이민(PEI), 디올레오일 에스테르, ChoTB, ChoSC, DOSC)(Leventis et al. (1990) Biochim. Inter. 22,235-241); 3베타[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일] 콜레스테롤 (DC-Chol), 1:1 혼합물의 디올레오일포스파티딜 에탄올아민(DOPE)/3베타[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일] 콜레스테롤 (DC-Chol)을 포함한다.

노에탄)-카바모일] 콜레스테롤DC-Chol(Gao et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 1065,8-14), 스페르민, 스페르미딘, 리포폴리아민(Behr et al., Bioconjugate Chem, 1994, 5:382-389), 지방친화성 폴리리신(LPLL)(Zhou et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 939,8-18), 초과 포스포티딜콜린/콜레스테롤을 가진 [(1,1,3,3-테트라메틸부틸)크레-숙시]에톡시]에틸]디메틸 벤질암모늄 하이드록시드(DEBDA 하이드록시드)(Ballas et al., (1988) Biochim. Biophys. Acta 939,8-18), 세틸트리메틸암모늄 브로마이드(CTAB)/DOPE 혼합물(Pinnaduwage et al., (1989) Biochim. Biophys. Acta 985,33-37), DOPE를 가진 글루탐산(TMAG)의 지방친화성 디에스테르, CTAB, DEBDA, 디도데실암모늄 브로마이드(DDAB) 및 포스포티딜에탄올아민과 혼합된 스테아릴아민(Rose et al., (1991) Biotechnique 10,520-525), DDAB/DOPE(TransfectACE, GIBCO BRL), 및 지질을 보유한 올리고락토스를 포함한다. 전달의 효율을 증가시키는 대표적 트랜스팩션 인핸서 제제는 예를 들면 DEAE-텍스트란, 폴리브렌, 리소솜-과피펩티드(Ohmori N I et al, Biochem Biophys Res Commun Jun. 27,1997; 235 (3):726-9), 콘드로이탄-기초 프로테오글리칸, 황산 프로테오글리칸, 폴리에틸렌이민, 폴리리신(Pollard H et al. J Biol Chem, 1998 273(13):7507-11), 인테그린 결합 펩티드 CYGGRGDTP, 선형 텍스트란 비당류, 글리세롤, 올리고뉴클레오티드의 3' 말단 상호뉴클레오티드 결합에 연결된 콜레스테릴기(Letsinger, R. L. 1989 Proc Natl Acad Sci USA 86:(17):6553-6), 리소포스파티드, 리소포스파티딜콜린, 리소포스파티딜에탄올아민 및 1-올레오일 리소포스파티딜콜린을 포함한다.

[0319] 일부 상황에서, 핵산 함유 벡터를 표적 세포로 지정하는 제제를 가진 핵산을 전달하는 것이 바람직할 수 있다. 이 "표적화" 분자는 표적 세포 상의 세포 표면 단백질에 특이적인 항체 또는 표적 세포 상의 수용체의 리간드를 포함한다. 리포솜이 채택된 경우, 엔도시토시스와 연관된 세포 표면 단백질에 결합하는 단백질은 표적화 및/또는 흡수를 촉진하기 위해서 사용될 수 있다. 이 단백질의 예는 특정 세포 유형에 치환적인 캡시드 단백질 및 그것의 단편, 순환에서 내재화를 거친 단백질의 항체 및 세포내 위치선정(localization)을 표적화하고 세포내 반감기를 증가시키는 단백질을 포함한다. 다른 구체예에서, 수용체-매개 엔도시토시스를 사용할 수 있다. 이 방법은 예를 들면, [Wu et al., 1987 또는 Wagner et al., 1990]에서 설명한다. 현재 알려진 유전자 표지 및 유전자 치료 프로토콜의 개관은 Anderson 1992을 참조하라. 또한, WO 93/25673 및 본 명세서에서 인용하는 참고문헌을 참조하라. 유전자 치료의 추가적 개관은 [Friedmann, Science, 244:1275-1281 (1989); Anderson, Nature, supplement to vol. 392, no 6679, pp. 25-30 (1998); Verma, Scientific American: 68-84 (1990); 및 Miller, Nature, 357:455460 (1992)]을 참조하라.

[0320] 스크리닝 방법

[0321] 효과적 치료제는 유효한 독성이 없는 효능있는 제제를 동정하는 것에 달려 있다. 당업계에 알려진 방법에 의하여 결합 친화성 항체를 스크리닝할 수 있다. 예를 들면, 겔-이동 분석, 웨스턴 블롯, 방사성표지 경쟁 분석, 크로마토그래피에 의한 공동-분별법, 공동-침전, 교차 결합, ELISA 등을 사용할 수 있는데, 이들을 예를 들면 본 명세서에서 그 전체를 참고 인용하는 [Current Protocols in Molecular Biology (1999) John Wiley & Sons, NY]에서 설명한다.

[0322] M-CSF 상의 소정의 에피토프에 결합하는 항체를 초기에 스크리닝하기 위해서(예를 들면, RX1, 5H4, MC 1 및/또는 MC3가 M-CSF에 결합하는 것을 차단하는 것), [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에서 설명한 것과 같은 일상적인 교차-차단 분석을 수행할 수 있다. 또한, 일상적인 경쟁적 결합 분석을 사용할 수 있는데, 여기서 미지의 항체는 M-CSF가 본 발명의 M-CSF 특이적 항체에 결합하는 것을 저해하는 능력에 의하여 특성화된다. 무결 M-CSF, 그것의 단편 또는 도 12의 M-CSF의 아미노산 98-105 또는 도 12의 아미노산 65-73 또는 138-144(5H4 또는 MC3에 의하여 인식되는 M-CSF에 상응)으로 대표되는 선형 에피토프를 사용할 수 있다. 에피토프 지도화는 [Champe et al., J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995)]에서 설명한다.

[0323] 그 다음 항체가 파골세포발생에 미치는 효과에 대한 시험을 한 후 동물에 그것을 투여하는 것이 더 예상된다. 암 전이와 연관된 골 손실을 예방하거나 치료하기에 잠재적으로 유용한 화합물을 다양한 분석법을 사용하여 스크리닝할 수 있다. 예를 들면, 후보 대항제는 먼저 파골세포발생을 유도할 때 M-CSF를 중화시키는 그것의 능력을 결정하는 배양 세포 시스템에서 특성화될 수 있다. 이 시스템은 마우스 두개 조골세포와 비장 세포의 공동 배양(Suda et al., Modulation of osteoclast differentiation. Endocr. Rev. 13:66 80,1992; Martin and Udagawa, Trends Endocrinol. Metab. 9:6-12, 1998), 마우스 기질 세포주(예를 들면, MC3T3-G2/PA6 및 ST2)와 마우스 비장 세포(Udagawa et al., Endocrinology 125:1805 13,1989)의 공동 배양, ST2 세포와 골수 세포의 공동 배양, 말초 혈액 단핵 세포 또는 폐포 대식세포(Udagawa et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7260 4,1990; Sasaki et al., Cancer Res. 58:462 7, 1998; Mancino et al., J. Surg. Res. 100:18-24, 2001)를 포

함한다. 임의의 M-CSF 대항제의 부재시, 이 공동 배양에서 형성된 다핵세포는 파골세포의 주요 기준, 예를 들면 타르타르산염 저항성 산 포스파타아제(TRAP, 파골세포의 표지 효소) 활성, 칼시토닌 수용체, p60C-STC, 비트로넥틴 수용체 및 뼈와 상아질 조각의 흡수 구멍을 형성하는 능력을 충족시킨다. 효과적인 M-CSF 대항제의 존재는 이 다핵세포의 형성을 저해한다.

[0324] 상기 공동 배양 시스템뿐만 아니라, 파골세포발생을 저해하는 후보 M-CSF 항체의 능력은 기질 세포가 없거나 파골세포가 없는 시스템에서 분석할 수 있다. 파골세포발생에 필요한 M-CSF는 공동 배양 전이성 암세포(예, MDA 231) 또는 이 암포로부터 조절된 배지(Mancino et al., J. Surg. Res. 0:18-24, 2001) 또는 정제된 M-CSF의 첨가에 의하여 제공될 수 있다.

[0325] 또한, 암 전이와 연관된 골 손실의 예방과 치료에 있어서 공급된 M-CSF의 효능은 당업자에게 잘 알려진 임의의 동물 골 전이 모델 시스템에서 시험할 수 있다. 이 모델 시스템은 종양 세포를 뼈의 모듈 강(Ingall, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 117:819-22, 1964; Falasko, Clin. Orthop. 169:20 7, 1982), 래트 복대동맥(Powles et al., Br. J. Cancer 28:316 21, 1973), 마우스 측면 꼬리 정맥 또는 마우스 좌심실(Aguello et al., Cancer Res. 48:6876 81, 1988)에 직접 주사하는 것에 관련된 것을 포함한다. 효과적 M-CSF 대항제의 부재시, 주사한 종양 세포로부터 형성된 골용해성 골 전이는 방사선사진(골용해성 골 손상 부위) 또는 조직학 및 면역조직화학(뼈 및 연성 조직)에 의하여 결정할 수 있다. [Sasaki et al., Cancer Res. 55:3551 7, 1995; Yoneda et al., J. Clin. Invest. 99:2509 17,1997. Clohisy and Ramnaraine, Orthop Res. 16:660 6, 1998. Yin et al., J. Clin. Invest. 103:197 206, 1999]. 효과적 M-CSF 항체의 존재시, 골용해성 골 전이는 예방 또는 저해되어 더 적고/적거나 더 작은 전이를 야기할 수 있다.

[0326] 또한, 본 발명의 M-CSF 항체는 암 전이를 예방하거나 치료하는 데 유용할 수 있다. 암 전이를 예방하거나 치료하는 데 후보 M-CSF 항체의 효과를 [Filderman et al., Cancer Res 52:36616, 1992]에서 설명한 인간 양막 기저막 침투 모델을 사용하여 스크리닝할 수 있다. 이 모델 시스템은, 한정하는 것은 아니지만, [Wenger et al., Clin. Exp. Metastasis 19:169 73, 2002; Yi et al., Cancer Res. 62:917 23, 2002; Tsutsumi et al., Cancer Lett 169:77-85, 2001; Tsingotjidou et al., AnticancerRes. 21:971 8, 2001; Wakabayashi et al., Oncology 59:75 80, 2000; Culp and Kogerman, FrontBiosci. 3:D672 83, 1998; Runge et al., Invest Radiol. 32:212 7; Shioda et al., J. Surg. Oncol. 64:122 6, 1997; Ma et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 37:2293 301, 1996; Kuruppu et al., J Gastroenterol Hepatol. 11:26 32, 1996]에서 설명한 것을 포함한다. 효과적 M-CSF 항체의 존재시, 암 전이는 예방 또는 저해되어 더 적고/적거나 더 작은 전이를 야기할 수 있다.

[0327] 특정 M-CSF 항체 또는 M-CSF 항체의 조합의 항-종양 활성은 적합한 동물 모델, 예를 들면 인간 림프종 세포가 누드 또는 SCID 마우스와 같이 면역반응이 제대로 발휘되지 못하는 동물에 도입된 이종 림프종 암 모델을 사용하여 생체 내에서 평가할 수 있다. 종양 형성, 종양 퇴화 또는 전이의 저해를 측정하는 분석법을 사용하여 효능을 예측할 수 있다.

[0328] 시험관 내 분석의 한 변형에서, 본 발명은 (a) 부동화된 M-CSF을 후보 항체와 접촉시키는 단계 및 (b) M-CSF에 후보 항체의 결합을 검출하는 단계를 포함한 방법을 제공한다. 대안적 구체예에서, 후보 항체는 부동화되고 M-CSF의 결합은 탐지된다. 부동화는 지지물, 비드 또는 크로마토그래피 레진에 대한 공유결합뿐만 아니라 항체 결합과 같은 비공유, 고 친화성 상호작용 또는 부동화 화합물이 비오틴 부분을 포함하는 스트렙타비딘/비오틴 결합의 사용을 포함한, 당업계에 공지된 임의의 방법을 사용하여 달성된다. 결합의 검출은 (i) 부동화되지 않은 화합물 상의 방사성 표지를 사용하고, (ii) 비부동화 화합물 상의 형광성 표지를 사용하며, (iii) 비부동화 화합물에 면역특이적 항체를 사용하고, (iv) 부동화 화합물이 부착된 형광성 지지물을 흥분시키는 비부동화 화합물 상의 표지를 사용하는 것뿐만 아니라 당업계에 공지되고 일상적으로 실행되는 다른 기술을 사용하여 달성될 수 있다.

[0329] 활성 또는 M-CSF의 발현을 조절(즉, 증가, 감소 또는 차단)하는 항체는 추정 조절자를 M-CSF를 발현하는 세포와 배양하고 추정 조절자가 활성 또는 M-CSF의 발현에 미치는 효과를 결정함으로써 확인될 수 있다. M-CSF 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 활성을 조절하는 항체의 선택성은 M-CSF 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드에 대한 그것의 효과를 다른 관련 화합물에 미치는 그것의 효과와 비교함으로써 평가할 수 있다. 예를 들면, 선택적 조절자는 항체 및 다른 단백질, 펩티드 또는 특이적으로 M-CSF 폴리펩티드 또는 M-CSF 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에 결합하는 유기 분자를 포함한다. M-CSF 활성의 조절자는 M-CSF 폴리펩티드의 정상 또는 비정상 활성이 관여하는 질병 및 생리적 조건의 치료에 치료적으로 유용할 것이다.

[0330] 또한, 본 발명은 상호작용하는 항체를 확인하거나 M-CSF 폴리펩티드의 생물학적 활성을 저해하는(즉, 효소

활성, 결합 활성 등을 저해하는) 고 처리량 스크리닝(HTS) 분석을 포함한다. HTS 분석은 많은 수의 화합물을 효율적 방식으로 스크리닝할 수 있게 한다. 세포 기초 HTS 시스템은 M-CSF 폴리펩티드와 그것의 결합 파트너 사이의 상호작용을 조사하도록 고려될 수 있다. HTS는 소정의 특성을 가진 "히트"나 "선두 화합물"을 확인하도록 설계되는데, 이로부터 변형은 소정의 특성을 개선하도록 설계될 수 있다. "히트"나 "선두 화합물"의 화학적 변형은 자주 "히트"와 M-CSF 폴리펩티드 간의 확인가능한 구조/활성 관계에 기초한다.

[0331] 본 발명의 다른 양태는 M-CSF를 항체와 접촉시키는 것을 포함한, M-CSF의 활성을 조절하는(즉, 감소시키는) 항체를 확인하고 항체가 M-CSF의 활성을 변형하는지 여부를 결정하는 방법에 관한 것이다. 시험 항체의 존재시 활성을 시험 항체의 부재시 활성과 비교한다. 시험 항체를 함유하는 샘플의 활성이 시험 항체가 결핍된 샘플의 활성보다 낮은 경우, 항체는 활성을 저해했을 것이다.

[0332] 당업계에 공지된 재조합 폴리펩티드의 기능적 발현을 위하여 다양한 이종 시스템이 이용가능하다. 이 시스템은 박테리아(Strosberg, et al., Trends in Pharmacological Sciences (1992) 13:95-98), 효모(Pausch, Trends in Biotechnology (1997) 15:487-494), 여러 종류의 곤충 세포(Vanden Broeck, Int. Rev. Cytology (1996) 164:189-268), 양서류 세포(Jayawickreme et al., Current Opinion in Biotechnology (1997) 8:629-634) 및 여러 포유류 세포주(CHO, HEK293, COS 등; Gerhardt, et al., Eur. J. Pharmacology (1997) 334:1-23 참조)을 포함한다. 이 예는 선충류에서 얻은 세포주를 포함한, 다른 가능한 발현 시스템의 사용을 배제하지 않는다(PCT 출원 WO 98/37177호).

[0333] 본 발명의 한 구체예에서, M-CSF의 활성을 조절하는 항체를 스크리닝하는 방법은 시험 항체를 M-CSF와 접촉시키고 항체와 M-CSF 간에 복합체의 존재를 분석하는 것을 포함한다. 이 분석에서, 통상적으로 리간드는 표지된다. 적합한 배양 후, 자유 리간드는 결합된 형태로 존재하는 것으로부터 분리되고, 자유 또는 비복합체 표지의 양은 M-CSF 또는 M-CSFR 폴리펩티드에 결합하는 특정 항체의 능력의 측정이다.

[0334] 본 발명의 다른 구체예에서, M-CSF 폴리펩티드에 적합한 결합 친화성을 가지는 항체 단편 또는 CDR에 대한 고 처리량 스크리닝을 채택한다. 간단히 설명하면, 많은 수의 다른 작은 펩티드 시험 화합물이 고체 기질에서 합성된다. 펩티드 시험 항체를 M-CSF 폴리펩티드와 접촉시키고 세척한다. 그 후, 결합된 M-CSF 폴리펩티드를 당업계에 공지된 방법에 의하여 검출한다. 또한, 본 발명의 정제된 폴리펩티드를 전술한 약물 스크리닝 기술에서 사용한 판 위에 직접 코팅할 수 있다. 또한, 단백질을 포획하고 그것을 고체 지지물에 부동화하기 위하여 비중성화 항체를 사용할 수 있다.

[0335] **조합 치료**

[0336] 동물 모델에 효과적인 하나 이상의 M-CSF 항체를 확인한 후, 암 전이와 연관된 암 전이 및/또는 골 손실에 대한 더 개선된 효능을 제공하기 위하여 두 가지 이상의 M-CSF 항체를 혼합하는 것이 더 유리할 수 있다. 하나 이상의 M-CSF 항체를 포함한 조성물을 암 전이 및/또는 암 전이와 연관된 골 손실이 있거나 있을 가능성이 많은 인간 또는 포유동물에 투여할 수 있다. 제제가 치료 효과를 나타내는 동안 시간이 겹치는 한, 2가지 치료제 병행 치료는 제제를 동시에 또는 동일한 경로로 투여할 필요가 없다. 다른 날 또는 주에 투여하는 것과 같은 동시적 또는 연속적 투여가 고려된다.

[0337] M-CSF 항체 치료가 암의 모든 단계에 유용할 수 있지만, 항체 치료는 진행되거나 전이된 암에 특히 적합할 수 있다. 항체 치료 방법과 화학치료 또는 방사선 요법의 조합은 화학치료적 치료를 수용하지 않은 환자에게 바람직할 수 있는 반면, 항체 치료는 하나 이상의 화학치료를 받은 환자에게 지정될 수 있다. 추가적으로, 항체 치료는 특히 화학치료제의 독성을 매우 잘 참아내지 못하는 환자에서 조합 화학치료의 감소된 투여량의 사용을 가능케 할 수 있다.

[0338] 본 발명의 방법은 단일 항-M-CSF 항체뿐만 아니라 다른 항체의 조합 또는 "칵테일"의 투여를 고려한다. 이 항체 칵테일은 그것이 다른 효과기 메커니즘을 이용하거나 직접 세포독성 항체를 면역 효과기 기능에 의존하는 항체와 조합하는 항체를 함유하는 것과 같은 특정 이점을 가질 수 있다. 이 조합 항체는 상승작용적 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[0339] RX1 또는 RX1 항체의 Human Engineered™ 유도체의 다른 치료제와의 조합은 파골세포 질병 및/또는 중앙 성장 또는 전이를 경험하는 환자에게 영향을 미칠 수 있다. 예를 들면, 골용해성 질병을 가지는 환자를 치료하기 위한 의약 제조에 RX1 항체를 사용할 수 있는데, 상기 의약은 항-RANKL 항체, 가용성 RANKL 수용체, 다른 RANKL 저해제, 또는 비스포스포네이트(예, 아레디아; 조메타; 클로드로네이트)를 사용한 치료와 조화롭게 기능 한다. 대안적으로, 골용해성 질병을 가지는 환자를 치료하기 위한 의약의 제조에 항-RANKL 항체 또는 비스포스포네이트

트를 사용할 수 있는데, 상기 의약은 RX1 항체 또는 RX1 항체의 인간 유전자 조작 유도체와 조화롭게 기능한다. 또한, 조합은 치료받은 환자에게 상승작용적 효과를 나타낼 수 있다. RX1 항체 및 다른 치료제를 동시에 투여할 필요는 없다. RX1 또는 인간 유전자 조작 변이체 및 다른 치료제를 각각의 1일, 1주, 2주, 4주, 2달, 3달, 6달, 1년 또는 2년 내에 투여할 수 있다.

[0340] 또한, 본 발명은 골용해성 질병이 있는 환자를 치료하기 위한 의약의 제조에 RX1 항체 또는 RX1 항체의 Human Engineered™ 항체 유도체의 사용을 고려하는데, 상기 의약은 항-RANKL 항체 또는 비스포스포네이트로 사전 치료 받은 환자에게 사용된다. "사전 치료"는 환자가 RX1 항체 또는 RX1 항체의 Human Engineered™ 유도체로 치료하기 전 2년, 1년, 6월, 3월, 2월, 1월, 2주, 1주 또는 적어도 1일 내에 치료받았다는 것을 의미한다.

[0341] RX1 항체 또는 Human Engineered™ 유도체를 다른 암 치료제와 조합하여 사용할 수 있다. 예를 들면, 암 질병이 있는 환자를 치료하기 위한 의약의 제조에 RX1 항체 또는 인간 유전자 조작 유도체를 사용할 수 있는데, 상기 의약은, 한정하는 것은 아니지만, 다양한 화학치료제, 안드로젠 차단제 및 면역 조절제(예, IL-2, GM-CSF, SLC), 비스포스포네이트(예, 아레디아; 조메타; 클로드르네이트), 수술, 방사선, 세포독성 화학치료, 호르몬 치료(예, 타목시펜; 항-안드로젠 치료), 항체 치료(예, RANKL/RANK 중성화에 대한 항체; PTHrP 중성화, 항-Her2, 항-CD20, 항-CD40, CD22, VEGF, IGFR-1, EphA2, HAAH, TMEFF2, CAIX 항체), 치료 단백질 치료(예, 가용성 RANKL 수용체; OPG 및 PDGF 및 MMP 저해제), 소분자 약물 치료(예, Src-키나아제 저해제), 성장 인자 수용체의 키나아제 저해제 또는 RANKL 저해제, 올리고뉴클레오타이드 치료(예, RANKL 또는 RANK 또는 PTHrP 안티-센스), 유전자 치료(예, RANKL 또는 RANK 저해제), 펩티드 치료(예, RANKL의 뮤테인)뿐만 아니라 본 명세서에서 기술한 단백질, 펩티드, 화합물 및 소분자를 포함하는 다른 치료제 및/또는 과정을 사용하는 치료와 조화롭게 기능한다.

[0342] 전술한 치료제로 사전 치료받은 환자를 치료하기 위한 의약의 제조에 RX1 항체 또는 Human Engineered™ 유도체를 사용할 수 있다.

[0343] 세포독성 제제는 세포의 기능을 저해 또는 억제하고/하거나 세포의 파괴를 야기시키는 물질을 가리킨다. 상기는 방사성 동위원소(예, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰ 및 Re¹⁸⁶), 화학치료제 및 독소, 예를 들면 박테리아, 균류, 식물 또는 동물 기원의 효소적 활성 독소 또는 합성 독소 또는 그것의 단편을 포함하는 것을 의미한다. 비-세포독성 제제는 세포의 기능을 저해하거나 억제하지 않고/않거나 세포의 파괴를 야기시키지 않는 물질을 가리킨다. 비-세포독성 제제는 비드, 리포솜, 매트릭스 또는 입자를 포함할 수 있다(예를 들면, 본 명세서에서 참고 인용하는 미국 특허 공보 제2003/0028071호 및 제2003/0032995호를 참조하라). 이 제제는 본 발명에 따른 항체와 콘쥬게이션, 결합, 연결 또는 연관될 수 있다.

[0344] 암 화학치료제는, 한정하는 것은 아니지만, 알킬화제, 예를 들면 카보플라틴 및 시스플라틴; 질소 겨자 알킬화제; 니트로소우리아 알킬화제, 예를 들면 카무스틴(BCNU); 대사길항물질, 예를 들면 메토트렉사트; 폴린산; 퓨린 유사 대사길항물질, 머캅토피린; 피리미딘 유사 대사길항물질, 예를 들면 플루오로우라실(5-FU) 및 겐시타빈(Gemzar®); 호르몬 항종양제, 예를 들면 고세레린, 류프로리드 및 타목시펜; 천연 항종양제, 예를 들면 알데스류킨, 인터류킨-2, 도세탁셀, 에토포시드(VP-16), 인터페론 알파, 파클리탁셀(Taxol®) 및 트레티노인(ATRA); 항생 천연 항종양제, 예를 들면 블레오마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 다우노마이신 및 미토마이신 C를 포함한 미토마이신; 및 빈카 알칼로이드 천연 항종양제, 예를 들면 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신; 히드록시우리아; 아세글라톤, 아드리아마이신, 이포스파미드, 에노시타빈, 에피티오스타놀, 아클라루비신, 안시타빈, 니무스틴, 프로카바진 히드로클로리드, 카르보퀸온, 카보플라틴, 카르모푸르, 크로모마이신 A3, 항종양 다당류, 항종양 혈소판 인자, 사이클로포스파미드(Cytosin®), 스킴조필란, 시타라빈(시토신 아라비노시드), 다카르바진, 티오이노신, 티오테파, 테가푸르, 돌라스타틴, 돌라스타틴 유사체, 예를 들면 오리스타틴, CPT-11(이리노테칸), 미토잔트론, 비노렐빈, 테니포시드, 아미노프테린, 카르미노마이신, 에스페라미신(예를 들면, 미국 특허 제4,675,187호 참조), 네오카르지노스타틴, OK-432, 블레오마이신, 푸르투론, 브록수리딘, 부설판, 혼반, 펩로마이신, 베스타틴(Ubenimex®), 인터페론-β, 메피티오스탄, 미토브로니톨, 펠팔란, 라미닌 펩티드, 렌티난, Coriolus 다색 추출물, 테가파/우라실, 에스트라무스틴(에스트로젠/메클로레타민)을 포함한다.

[0345] 더 나아가, 암 환자를 위한 치료법에 사용된 추가의 작용제는 EPO, G-CSF, 간시클로비르; 항생제, 류프롤라이드; 메페리딘; 지도부딘(AZT); 돌연변이 및 유사체를 포함하여 인터류킨 1부터 18; 항체형성 호르

몬 방출 호르몬 (LHRH) 및 유사체 및, 생식샘자극호르몬 방출 호르몬(GnRH)과 같은, 인터페론 α , β 및 γ 호르몬과 같은 인터페론 또는 시토카인; 전환 성장 인자- β (TGF- β), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 신경 성장 인자 (NGF), 성장 호르몬 방출 인자 (GHRF), 표피 성장 인자 (EGF), 섬유모세포 성장 인자 동종 인자 (FGFHF), 간세포 성장 인자 (HGF), 및 인슐린 성장 인자 (IGF)와 같은 성장 인자 ; 종양 괴사 인자- α & β (TNF- α & β) ; 침입 저해 인자-2 (IIF-2); 골 형태 형성 단백질 1-7 (BMP 1-7); 소마토스타틴; 티모신- α -1; γ -글로불린 ; 과산화 디스무타아제(SOD); 보체 인자; 항-혈관형성 인자; 항원 물질; 및 프로드러그를 포함한다.

[0346] 프로드러그는 모 약물에 비교할때 종양 세포에 대해 세포독성이 덜하거나 비-세포독성이고, 효소에 의해 활성화되거나 활성화 또는 더욱 활성화 모 형태로 변환될 수 있는 약학적으로 활성 물질의 전구물질 또는 유도체 형태를 말한다. 참조, 예를 들어, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) and Stella et al., "Prodrugs : A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, "Directed Drug Delivery, Borhardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). 프로드러그는 이것으로 제한되지는 않지만, 포스페이트-함유 프로드러그, 티오포스페이트-함유 프로드러그, 술페이트-함유 프로드러그, 펩티드-함유 프로드러그, D-아미노산-변형된 프로드러그, 글리코실화 프로드러그, β -락탐-함유 프로드러그, 선택적으로 치환된 페녹시아세트아미드-함유 프로드러그 또는 선택적으로 치환된 페닐아세트아미드-함유 프로드러그, 5-플루오로사이토신 및 보다더 활성인 세포독성 자유 약물로 전환될 수 있는 다른 5-플루오로우리딘 프로드러그를 포함한다.

[0347] 본원에서 사용하기 위한 프로드러그 형태로 유도될 수 있는 세포독성 약물의 예는 이것으로 제한되지는 않지만, 상술한 화학요법제를 포함한다.

[0348] **투여 및 제조**

[0349] 본 발명의 실행에 사용된 항-M-CSF 항체가 원하는 송달 방법에 적합한 운반체를 포함하는 약학적 조성물로 조제될 수 있다. 적합한 운반체는 항-M-CSF 항체와 조합될때, 항체의 항-종양 기능을 보유하고 대상의 면역 시스템과 활성화 반응하지 않는 어떤 물질을 포함한다. 예는 이것으로 제한되지는 않지만, 무균 포스페이트 완충화 식염수 용액, 정균수, 등과 같이 많은 표준 약학 운반체 중 어떤것을 포함한다. 예를 들어, 물, 완충수, 0.4% 식염수, 0.3% 글리신 등의 다양한 수성 운반체가 사용될 수 있고, 가벼운 화학적 변형 등을 받는 알부민, 지질 단백질, 글로불린, 등과 같이 강화된 안정성을 위한 다른 단백질을 포함할 수 있다.

[0350] 항체의 치료 조제물은 원하는 정도의 순도를 갖는 항체를 임의의 생리학적으로 허용가능한 운반체, 부형제 또는 안정제와 혼합함으로써 동결건조된 조제물 또는 수용액의 형태로, 저장을 위해 제조된다(Remington's Pharmaceutical Sciences 제 16판, Osol, A. Ed. (1980)). 허용가능한 운반체, 부형제, 또는 안정제는 채택된 용량과 농도에서 받는 인간에게 무독성이고, 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제 (이들테면 옥타데실디메틸벤질염화암모늄; 염화헥사메토늄; 염화벤잘코늄, 염화벤제토늄; 페놀, 부틸 또는 벤질알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 낮은 분자량 (약 10미만 잔기) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 폴리머 ; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신과 같은 아미노산 ; 단당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물 ; EDTA 과 같은 킬레이팅제 ; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당 ; 나트륨과 같은 염-형성 반대이온; 금속 착제 (예를 들어, Zn-단백질 착제); 및/또는 TWEENTM, PLURONICSTM 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제를 포함한다.

[0351] 본원에서 조제물은 또한 치료될 특별한 지시가 필요할때 하나 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 부정적인 영향을 주지 않는 상보적 활성을 갖는 것들을 함유할 수 있다. 예를 들어, 면역억제제를 더욱 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 그러한 분자는 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합하여 적절하게 존재한다.

[0352] 활성 성분들은 또한 예를 들어, 액적형성 기술 또는 계면 중합에 의해, 마이크로캡슐, 예를 들어, 콜로이드 약물 송달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미세구, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐) 또는 매크로에멀전에서 각각 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에 쌓일 수 있다. 그러한 기술은 Remington's Pharmaceutical Sciences 제16판, Osol, A. Ed. (1980)에 개시된다.

[0353] 생체내 투여를 위해 사용될 조제물은 무균이어야 한다. 이것은 무균 여과 막을 통한 여과에 의해 손쉽게 수행된다.

- [0354] 항체는 만일 국부 처리, 병소내 투여를 원한다면, 비경구, 피하, 복막내, 허파속, 및 코안을 포함하여 어떠한 적합한 수단에 의해 투여된다. 비경구 주입은 정맥내, 동맥내, 복막내, 근육내, 피부내 또는 피하 투여를 포함한다. 게다가, 항체는 특히 항체의 감소하는 용량으로, 펄스 주입에 의해 적절하게 투여된다. 바람직하게는 투약은 투여가 단시간의 또는 만성인지에 따라 부분적으로 의존하여, 주사, 가장 바람직하게는 정맥내 또는 피하 주사에 의해 주어진다.
- [0355] 국소, 특히 경피, 점막을 통해, 직장, 경구 또는 국부 투여를 포함하는 예를 들어 원하는 부위에 가깝게 위치한 카테터를 통하는 다른 투여 방법이 계획된다.
- [0356] 본 발명의 조성물은 예를 들어, 과립, 분말, 정제, 캡슐, 시럽, 좌약, 주사, 에멀전, 엘릭서, 현탁액 또는 용액의 형태가 될 수 있다. 본 발명의 조성물은 예를 들어, 경구 투여, 코 투여, 직장 투여, 피하 주사, 정맥내 주사, 근육내 주사, 또는 복막내 주사에 의한 다양한 경로의 투여를 위해 조제될 수 있다. 다음의 투약 형태는 예로서 주어지고 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0357] 경구, 불안, 및 설하 투여, 분말, 현탁액, 과립, 정제, 알약, 캡슐, 겔캡, 및 캐플릿은 고체 투약 형태로서 허용 가능하다. 이들은 예를 들어, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 화합물, 또는 그것의 약학적으로 허용가능한 염 또는 호변이성체를, 전분 또는 다른 첨가제와 같은 적어도 하나의 첨가제와 혼합시킴으로써 제조될 수 있다. 적합한 첨가제는 수크로스, 락토오스, 셀룰로오스 당, 만니톨, 말티톨, 텍스트란, 전분, 우무, 알기네이트, 키틴, 키토산, 펙틴, 트라가칸트 고무, 아라비아 고무, 젤라틴, 콜라겐, 카세인, 알부민, 합성 또는 반-합성 폴리머 또는 글리세리드이다. 선택적으로, 경구 투약 형태는 비활성 희석제, 또는 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제, 또는 파라벤 또는 소르브산과 같은 보존제, 또는 아스코르브산, 토코페롤 또는 시스테인과 같은 항-산화제, 붕괴제, 결합제, 농축제, 완충제, 감미제, 향료제 또는 방향제와 같은 투여를 돕기 위한 다른 성분들을 함유할 수 있다. 정제와 알약은 당업계에 공지된 적합한 코팅 물질로 더욱 처리될 수 있다.
- [0358] 경구 투여를 위한 액체 투약 형태는 물과 같은 비활성 희석제를 함유할 수 있는, 약학적으로 허용가능한 에멀전, 시럽, 엘릭서, 현탁액, 및 용액의 형태가 될 수 있다. 약학 조제물 및 약제는 이것으로 제한되지는 않지만, 오일, 물, 알코올, 및 이들의 조합과 같은 무균 액체를 사용하여, 액체 현탁액 또는 용액으로서 제조될 수 있다. 약학적으로 적합한 계면활성제, 현탁제, 유화제는 경구 또는 비경구 투여를 위해 첨가될 수 있다.
- [0359] 위에서 주목된 바와 같이, 현탁액은 오일을 포함할 수 있다. 그러한 오일은 이것으로 제한되지는 않지만, 땅콩유, 참기름, 면실유, 옥수수유 및 올리브유를 포함할 수 있다. 현탁액 제제는 또한 에틸 올레에이트, 아이소프로필 미리스테이트, 지방산 글리세리드 및 아세틸화 지방산 글리세리드와 같은 지방산의 에스테르를 함유할 수 있다. 현탁액 조제물은 이것으로 제한되지는 않지만, 에탄올, 아이소프로필 알코올, 헥사데실 알코올, 글리세롤 및 프로필렌 글리콜과 같은 알코올을 포함할 수 있다. 이것으로 제한되지는 않지만, 폴리(에틸렌글리콜), 미네랄유 및 바셀린과 같은 석유 탄화수소와 같은 에테르와; 물이 또한 현탁액 조제물에 사용될 수 있다.
- [0360] 코 투여를 위해, 약학 조제물 및 약제는 적절한 용매(들) 및 이것으로 제한되지는 않지만, 안정제, 향균제, 항산화제, pH 조절제, 계면활성제, 생물학적 이용가능성 조절제 및 이들의 조합과 같은 선택적으로 다른 화합물을 함유하는 스프레이 또는 에어로졸이 될 수 있다. 에어로졸 조제물을 위한 분사제는 압축공기, 질소, 이산화탄소, 또는 탄화수소 기반 낮은 끓는점 용매를 포함할 수 있다.
- [0361] 주사가 가능한 투약 형태는 일반적으로 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 제조될 수 있는 수성 현탁액 또는 오일 현탁액을 포함한다. 주사가 가능한 형태는 용매 또는 희석제와 함께 제조되는, 용액 상 또는 현탁액의 형태가 될 수 있다. 허용가능한 용매 또는 매개체는 무균수, 링거용액, 또는 등장 수성 식염수 용액을 포함한다. 대안으로서, 무균 오일은 용매 또는 현탁제로서 채택될 수 있다. 바람직하게는, 오일 또는 지방산은 천연 또는 합성 오일, 지방산, 모노-, 디- 또는 트리-글리세리드를 포함하여 비-휘발성이다.
- [0362] 주사를 위해서, 약학 조제물 및/또는 약제는 상술한 바와 같이 적절한 용액과 재구성하기에 적합한 분말이 될 수 있다. 이들의 예는 이것으로 제한되지는 않지만, 냉동 건조된, 회전 건조 또는 분무 건조된 분말, 비결정질 분말, 과립, 침전물s, 또는 미립자를 포함한다. 주사를 위해서, 조제물은 선택적으로 안정제, pH 조절제, 계면활성제, 생물학적 이용가능성 조절제 및 이들의 조합을 함유할 수 있다.
- [0363] 직장 투여를 위해서, 약학 조제물 및 약제는 창자, 구불창자굽이 및/또는 직장에서 화합물의 방출을 위한 좌약, 연고, 관장제, 정제 또는 크림의 형태가 될 수 있다. 본 발명의 하나 이상의 화합물을, 또는 화합물의 약학적으로 허용가능한 염 또는 호변이성체를, 허용가능한 매개체, 예를 들어, 정상 저장 온도에서 고체상으로 존재하고 직장과 같은 체내로 방출하기에 적합한 온도에서는 약상으로 존재하는 코코아 버터 또는 폴리에틸렌 글리콜

과 혼합함으로써 직장 좌약이 제조된다. 오일은 또한 연 젤라틴 타입의 조제물 및 좌약의 제조에 채택될 수 있다. 완충제 및 보존제는 물론이고, 펙틴, 카보머, 메틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필 셀룰로오스 또는 카르복시메틸 셀룰로오스와 같은 현탁제를 또한 함유할 수 있는 현탁액 조제물의 제조에 있어서, 물, 식염수, 수성 텍스트로스 및 관련 당 용액, 및 글리세롤이 채택될 수 있다.

[0364] 지속-방출 제제를 제조할 수 있다. 지속-방출 제제의 적합한 예는 매트릭스가 형상화 입자, 예를 들어, 막, 또는 마이크로캡슐의 형태인 항체를 함유하는 고체 소수성 폴리머의 반투성 매트릭스를 포함한다. 지속-방출 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 하이드로겔 (예를 들어, 폴리 (2-하이드록시에틸-메타크릴레이트), 또는 폴리 (비닐알코올)), 폴리락타이드 (미국 특허 No. 3,773, 919), L-글루탐산과 y 에틸-L- 글루타메이트의 코폴리머, 비-분해가능한 에틸렌-비닐 아세테이트, Lupron Depot™ (락트산- 글리콜산 코폴리머 및 류프롤라이드 아세테이트로 구성되는 주사가능한 미세구)와 같은 분해가능한 락트산-글리콜산 코폴리머, 및 폴리-D- (-)-3-하이드록시부티르산을 포함한다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 폴리머가 분자의 방출을 가능하게 하는 한편, 10일에 걸쳐서, 특정 하이드로겔은 짧은 시간동안 단백질을 방출한다. 캡슐화 항체가 긴 시간동안 체내에 남아있을 때, 그들은 37°C에서 수분에 노출되는 결과로서 변성 또는 응집될 수 있고, 그 결과 생물학적 활성의 손실 및 면역원성의 가능한 변화를 초래한다. 이성적인 전략이 수반된 메카니즘에 의존하여 안정화를 위해 고안될 수 있다. 예를 들어, 만일 응집 메카니즘이 티오-디설피드 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성으로 발견된다면, 안정화는 설피드틸 잔기를 변경하고, 산성 용액으로부터 동결건조하고, 수분 함량을 조절하고, 적절한 첨가제를 사용하고, 특이적 폴리머 매트릭스 조성물을 개발함으로써 달성될 수 있다.

[0365] 본 발명의 조제물은 본원에서 기술된 바와 같이 짧은 작용, 신속한 방출, 긴-작용 또는 지속-방출이 되도록 설계될 수 있다. 따라서, 약학 조제물은 또한 제어 방출 또는 느린 방출을 위해 조제될 수 있다.

[0366] 본 발명의 조성물은 또한 예를 들어, 미셀 또는 리포솜s, 또는 이일부 다른 캡슐화 형태를 포함하거나, 또는 연장된 방출 형태로 투여되어 연장된 저장 및/또는 송달 효과를 제공할 수 있다. 따라서, 약학 조제물과 약제는 펠릿 또는 실린더안으로 압축되고 근육내 또는 피하로 저장소 주사 또는스텐트와 같은 임플란트로 이식될 수 있다. 그러한 임플란트는 실리콘 및 생물분해가능한 폴리머와 같은 공지된 비활성 재료를 채택할 수 있다.

[0367] 위에서 상술된 그러한 대표적인 투약 형태 이외에, 약학적으로 허용가능한 부형제 및 운반체는 일반적으로 당업계에 잘 알려져있고 따라서 본 발명 내에 포함된다. 그러한 부형제 및 운반체는 예를 들어, 본원에서 참조에 의해 포함되는 "Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey(1991)에서 기술된다.

[0368] 특이적 용량은 질병의 상태, 나이, 체중, 일반적인 건강 상태, 성별, 및 대상의 식이, 투약 간격, 투여 경로, 배설율, 및 약물의 조합에 따라 조절될 수 있다. 효과적인 양을 함유하는 상기 투약 형태중 어떠한 것은 일상적인 실험의 경계내에 적절하게 있고 따라서, 본 발명의 범위내에 적절히 있다.

[0369] 암 전이와 관련된 암 전이 또는 골 손실을 위한 치료로서 유용한 M-CSF 항체가 다른 천연에서 발생하는 면역글로불린 또는 다른 생물학적 분자가 실질적으로 없이 종종 제조될 것이다. 암 전이와 관련된 암 전이 및/또는 골 손실에 시달리거나 그것들에 걸리기 쉬운 포유동물에 투여될 때, 바람직한 M-CSF 항체는 또한 최소 독성을 나타낼 수 있다.

[0370] 본 발명의 조성물은 종래의, 잘 알려진 멸균 기술에 의해 살균될 수 있다. 결과의 용액은 사용하기 위해 포장되고 또는 무균 상태하에서 여과되고 동결건조될 수 있고, 동결건조된 제제는 투여하기 전에 무균 용액과 조합된다. 조성물은 pH 조절 및 완충제, 긴장성 조절제 등, 예를 들어, 나트륨 아세테이트, 나트륨 락테이트, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 및 안정제 (예를 들어, 1 20% 말토스, 등)과 같은 대략의 생리적 조건에 요구될 때 약학적으로 허용가능한 보조 물질을 함유할 수 있다.

[0371] 본 발명의 M-CSF 항체는 또한 약물의 송달에 유용한 다양한 타입의 지질 및/또는 인지질 및/또는 계면활성제 (본원에서 개시된 항체, 및 선택적으로, 화학요법제와 같이)로 이루어지는 작은 소낭인, 리포솜을 통해 투여될 수 있다. 리포솜은 에멀전, 발포체, 미셀, 불용성 단일층, 인지질 분산, 층판 층 등을 포함하고, 조성물의 반감기를 증가시키는 것은 물론이고, M-CSF 항체를 특정한 조직으로 표적화시키기 위해 매개체로서 역할을 할 수 있다. 예를 들어, 본원에서 참조에 의해 포함되는 미국 특허 Nos. 4,837, 028 및 5,019, 369에서 기술된 바와 같이, 리포솜을 제조하기 위해 다양한 방법이 이용가능하다.

[0372] Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); 및 미국 특허 Nos. 4,485, 045 및 4,544, 545에서 기술된 바와 같이, 항체를 함유하는 리포솜은 공지된 방법에 의해 제조된다. 증대된 순환 시간을 갖는 리포솜이 미국 특허 No. 5,013, 556에 개시된다.

특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도된 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물과 함께 역상 증발 방법에 의해 발생될 수 있다. 리포솜은 한정된 기공 크기의 필터를 통해서 압출 성형되어 원하는 직경을 갖는 리포솜을 수득한다. 발명의 항체의 Fab' 단편은 디술퍼드 교환 반응을 통해 Martin et al., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)에서 기술된 바와 같이, 리포솜에 접합될 수 있다. 화학 요법제 (Doxorubicin와 같은)는 선택적으로 리포솜 내에 함유된다 [참조, 예를 들어, Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81 (19): 1484 (1989)].

[0373] 이들 조성물에서 M-CSF 항체의 농도는 폭넓게 즉, 약 10%미만, 보통 적어도 약 25% 내지 75중량% 또는 90중량% 만큼 변할 수 있고 선택된 투여의 특정한 모드에 따라, 주로 유체 부피, 점도, 등에 의해 선택될 것이다. 경구로, 국소적으로 그리고 비경구로 투여가능한 조성물을 제조하기 위한 실제적인 방법은 당업자들에게 공지되거나 또는 명백할 것이고 본원에서 참조에 의해 포함되는 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Science, 19th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995)에서 상세히 설명된다.

[0374] 암 전이와 연관된 암 전이 및/또는 골 손실을 치료하기 위한 본 발명의 효과적인 양의 조성물의 결정은 당업계에서 잘 공지된 표준 실험 방법을 통해 수행될 수 있다. Cenci et al., J Clin. Invest. 105: 1279-87, 2000에서 기술된 바와 같이, 예를 들어, 시험관내에서 혈청이 M-CSF 유발된 증식과 뮤린 단핵세포의 생존을 차단하는 능력을 결정하는 검정법을 사용하여 (CD11b+ 세포, CD11 세포의 서브셋, 이것이 M-CSF에 대한 높은 수준의 수용체를 발현한다), 주어진 용량의 M-CSF 항체로 치료된 대상으로부터 생체내에서 혈청의 중화 활성은 평가될 수 있다.

[0375] 본 발명의 조성물은 암 전이 및/또는 암 전이와 관련된 골 손실로 이미 고통받거나 병에 걸리기 쉬운 포유동물에게 암 전이와 관련된 암 전이 및/또는 골 손실의 발전을 방지하거나 또는 적어도 부분적으로 억지하기에 충분한 양으로 투여된다. 이것을 수행하는데 적절한 양은 "치료에 효과적인 용량"이라고 정의된다. 효과적인 양의 M-CSF 항체는 변할 것이고 질병의 심각도 및 치료받는 환자의 체중 및 일반적인 상태에 의존하지만, 더욱 통상적으로 사용되는 응용 당 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg 또는 약 1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 용량으로, 일반적으로 약 1.0 µg/kg 내지 약 100 mg/kg 체중, 또는 약 10 µg/kg 내지 약 30 mg/kg의 범위이다. 예를 들어, 하나 이상의 분리된 투여에 의해, 또는 연속적인 주입에 의해, 예를 들어, 항체의 약 10 µg/kg 내지 5 mg/kg 또는 약 30 µg/kg 내지 1 mg/kg은 환자에 대한 투여를 위한 초기 후보자 용량이다. 투여는 질병에 대한 반응 및 치료법의 환자의 내성에 따라 필요할때, 매일, 이틀에 한번, 주마다 또는 덜 자주이다. 질병 증상의 원하는 억제에 일어날 때까지, 4, 5, 6, 7, 8, 10 또는 12 주 또는 그 이상과 같은 더 오랜 기간에 걸쳐서 지속 용량은 필요할 수 있고, 용량은 필요할때 조절될 수 있다. 이 치료법의 진행은 종래의 기술 및 분석법에 의해 쉽게 모니터링된다.

[0376] 치료하는 의사에 의해 선택될 용량 수준과 패턴으로 조성물의 단일 또는 다중 투여를 수행할 수 있다. 질병의 예방 또는 치료를 위해서, 항체의 적절한 용량은 위에서 정의된 바와 같이 질병의 타입, 질병의 심각도와 과정, 항체가 예방 또는 치료 목적, 이전의 치료법, 환자의 임상적인 히스토리 및 항체에 대한 반응, 및 주치의의 결정권을 위해 투여되는지 여부에 의존할 것이다. 항체는 항체가 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐서 적절하게 환자에게 투여된다.

[0377] 어떠한 경우에, 조제물은 암 전이와 관련된 암 전이 및/또는 골 손실의 심각도를 효과적으로 막거나 최소화하는데 충분한 시간에 걸쳐서 M-CSF 항체의 양을 제공해야 한다. 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 암 전이와 관련된 암 전이 및/또는 골 손실의 치료를 위해 당업계에서 공지된 다른 치료와 결합하여 보조약 치료법으로서 투여될 수 있다.

[0378] 항체 조성물은 양호한 의학 실행과 일치하는 형태로 조제되고, 투약되고, 투여될 것이다. 본 문맥에서 고려를 위한 인자들은 치료될 특정한 장애, 치료되는 특정한 포유동물, 개별적인 환자의 임상적인 상태, 장애의 원인, 작용제의 송달의 부위, 투여의 방법, 투여의 스케줄, 및 의학 의료인에게 공지된 다른 인자들을 포함한다. 투여될 치료에 효과적인 양의 항체는 그러한 고려에 의해 지배될 것이고, M-CSF 매개 질병, 상태 또는 장애를 예방하고, 개선하고 또는 치료하기 위해 특히 암 세포를 치료하고, 가장 특히 종양 세포 메타스타제를 치료하기 위해 필요한 최소 량이다. 그러한 양은 바람직하게는 숙주에 독성이거나 숙주를 감염되기 상당히 더욱 쉽게 만드는 양 미만이다.

[0379] 항체는 반드시 그럴 필요는 없지만 문제의 장애를 예방하거나 치료하기 위해 현재 사용된 하나 이상의 작용제와 함께 선택적으로 조제된다. 예를 들어, 암에서, 상술한 바와 같이 화학치료제와 결합하여 또는 ADEPT에서 항체가 주어질 수 있다. 효과적인 양의 그러한 다른 작용제는 조제물에 존재하는 항체의 양, 질병의 타입, 조건 또

는 장애 또는 치료, 위에서 논의된 다른 인자에 의존한다. 이들은 일반적으로 동일한 용량으로 지금까지 사용된 바와 같은 투여 경로 또는 지금까지 채택된 용량의 약 1 내지 99%로 사용된다.

[0380] 본 발명의 또다른 구체예에서, 암의 치료를 포함하여, 상술된 질병, 장애 또는 상태의 치료를 위해 유용한 재료를 함유하는 제조 물질이 제공된다. 제조물질은 용기와 라벨을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어, 병, 유리병, 주사기, 및 테스트 튜브를 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로부터 형성될 수 있다. 용기는 상태를 치료하기에 효과적인 조성을 보유하고 무균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어 용기는 정맥내 용액 백 또는 피하조직 주사 바늘로 뚫을 수 있는 스토퍼를 갖는 유리병). 활성제는 조성물은 본 발명의 항체이다. 그위에 라벨 또는 연관된, 용기는 선택의 상태를 치료하기 위한 조성이 사용된다는 것을 나타낸다. 제조 물질은 포스페이트-완충화 식염수, Ringer-용액 및 텍스트로스 용액과 같은 약학적으로-허용가능한 완충제를 포함하는 제 2 용기를 더욱 포함할 수 있다. 그것은 사용 설명서와 함께 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기, 및 패키지 삽입체를 포함하여, 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 재료를 더욱 포함할 수 있다.

[0381] **면역요법**

[0382] 암에 걸린 환자를 치료하는데 유용한 항-M-CSF 항체는 종양과 직접적인 세포독성이 가능한 것들에 대해 효력있는 면역 반응을 개시할 수 있는 것들을 포함한다. 이런 관점에서, 항-M-CSF 항체가 보체-매개 또는 항체-의존 세포 세포독성 (ADCC) 메카니즘 중의 하나에 의해 종양 세포 용해를 도출할 수 있고, 이것 둘다 작동 세포 Fc 수용체 부위 또는 보충 단백질과의 상호작용을 위해 면역글로불린 분자의 손상되지 않은 Fc 부분을 필요로한다. 게다가, 종양 성장에 대해 직접적인 생물학적 효과를 발휘하는 항-M-CSF 항체는 본 발명의 실행에서 유용하다.

[0383] 그것에 의해 그러한 직접적으로 세포독성인 항체가 작용할 수 있는 효력있는 메카니즘은 세포 성장의 저해, 세포 분화의 조정, 종양 혈관형성 인자 프로파일의 조정, 및 세포자멸사의 유도를 포함한다. 그것에 의해 특정한 항-M-CSF 항체가 항-종양 효과를 발휘하는 메카니즘은 일반적으로 당업계에 알려진 바와 같이, ADCC, ADMMC, 보체-매개 세포 용해, 등을 결정하도록 설계된 어떠한 수의 시험관내 검정법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0384] 한 구체예에서, 분비된 형태의 M-CSF에 대해서보다 막-결합된 형태의 M-CSF (M-CSF α)에 대해서 더 높은 친화력을 가지는 항체를 사용하여 면역요법을 수행한다. 예를 들어, M-CSFα의 분할 부위에서 또는 그 주변에서 또는 막에 인접한 M-CSF α의 부분에 특이적으로 결합하는 항체가 제조될 수 있다. 그러한 항체는 또한 M-CSF α의 가용성 활성 부분의 분할과 방출을 유리하게 저해할 수 있다.

[0385] 항-M-CSF 항체는 그들의 "맨" 또는 접합되지 않은 형태로 투여되거나, 또는 그들에 접합된 치료제를 가질 수 있다. 한 구체예에서, 항-M-CSF 항체는 방사선민감제로서 사용된다. 그러한 구체예에서, 항-M-CSF 항체는 방사선민감제에 접합된다. 본원에 사용된 용어 "방사선민감제"는 전자기 방사선에 방사선민감화 될 세포의 민감도를 증가시키고/또는 전자기 방사선으로 치료가능한 질병의 치료를 촉진하기 위해 치료에 효과적인 양으로 동물에 투여된 분자, 바람직하게는 낮은 분자량 분자로서 정의된다. 전자기 방사선으로 치료가능한 질병은 네오플라ستيك 질병, 양성 및 악성 종양, 및 암 세포를 포함한다.

[0386] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "전자기 방사선" 및 "방사선"은 이것으로 제한되지는 않지만, 10^{-20} 내지 100 미터의 파장을 갖는 방사선. 본 발명의 바람직한 구체예는 전자기 방사선: 감마- 방사선(10^{-20} 내지 10^{-13} m), X-선 방사선(10^{-12} 내지 10^{-9} m), 자외선 광 (10 nm 내지 400 nm), 가시광선 (400 nm 내지 700nm), 적외선 방사선 (700 nm 내지 1.0 mm), 및 마이크로파 방사선(1 mm 내지 30 cm)을 채택할 수 있다.

[0387] 방사선민감제는 전자기 방사선의 독성 효과에 대한 암 세포의 민감도를 증가시키는 것으로 알려져있다. 많은 암 치료 프로토콜은 현재 X-선의 전자기 방사선에 의해 활성화된 방사선민감제를 채택한다. X-선 활성화 방사선민감제의 예는 이것으로 제한되지는 않지만, 다음의: 메트로니다졸, 미소니다졸, 테스메틸미소니다졸, 피모니다졸, 에타니다졸, 니모라졸, 미토마이신 C, RSU 1069, SR 4233,E09, RB 6145, 니코틴아미드, 5-브로모데옥시우리딘 (BUdR), 5-요오도데옥시우리딘(IUdR), 브로모데옥시시스티딘, 플루오로데옥시우리딘 (FUdR), 하이드록시유리아, 시스플라틴, 및 동일한 것의 치료에 효과적인 유사체 및유도체를 포함한다.

[0388] 암의 광선역학요법 (PDT)은 민감제의 방사선 활성화제로서 가시광선을 채택한다. 광선역학 방사선민감제의 예는 다음의, 이것으로 제한되지는 않지만: 헤마토포르피린 유도체, Photofin (r), 벤조포르피린 유도체, NPe6, 티에티오포르피린(SnET2), 페오보르바이드-a, 박테리오클로로필-a, 나프탈로시아닌, 프탈로시아닌, 징크 프탈로시아닌, 및 동일한 것의 치료에 효과적인 유사체 및 유도체를 포함한다.

- [0389] 또다른 구체예에서, 항체는 항체-수용체 접합체가 환자에게 투여되는 종양 미리표지화에서 이용하기 위한 수용체 (그러한 스트렙타비딘)에 접합되고 이어서 청소제를 사용하여 순환으로부터 미결합 접합체를 제거하고 그후 세포독성제 (예를 들어, 방사선택종)에 접합되는 리간드의 투여 (예를 들어, 아비딘)될 수 있다.
- [0390] 본 발명은 검출가능하게 표지화된 형태로 상술된 항체를 더욱 제공한다. 항체는 방사성동위원소, 친화력 라벨 (비오틴, 아비딘, 등과 같은), 효소 라벨 (양고추냉이피록시다아제, 알칼리성 포스파타아제, 등과 같은) 형광 또는 발광성 또는 생물발광성 라벨 (FITC 또는 로다민, 등과 같은), 상자성 원자, 등의 사용을 통해 검출가능하게 표지될 수 있다. 그러한 라벨링을 수행하기 위한 과정은 당업계에 잘 알려져있다; 예를 들어, 참조 (Sternberger, L. A. et al., J. Histochem. Cytochem. 18: 315 (1970); Bayer, E. A. et al., Meth. Enzym. 62: 308 (1979); Engval, E. et al., Immunol. 109: 129 (1972); Goding, J. W. J. Immunol. Meth. 13:215 (1976)).
- [0391] "라벨"은 항체에 직접 또는 간접적으로 접합되는 검출가능한 화합물 또는 조성물을 말한다. 라벨은 그 자체로 검출가능할 수 있거나(예를 들어, 방사성동위원소 라벨 또는 형광 라벨), 또는 효소 라벨의 경우에, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변경을 촉진할 수 있다. 대안으로서, 라벨은 그 스스로 검출가능하지 않을 수 있지만 검출가능한 (예를 들어 에피토프 태그 또는 비오틴-아비딘, 등과 같은 결합 파트너 쌍 중 하나) 또다른 작용제에 의해 결합되는 원소가 될 수 있다. 따라서, 항체는 그것의 분리를 촉진하는, 라벨 또는 태그를 포함할 수 있고 항체를 확인하기 위한 본 발명의 방법은 라벨 또는 태그와의 상호작용을 통해 M-CSF/항체를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0392] 대표적인 치료 면역접합체는 화학요법제, 독소 (예를 들어, 세균, 곰팡이, 식물 또는 동물 기원, 또는 그것의 단편 효소에 의한 활성 독소), 또는 방사능 동위원소 (즉, 방사능접합체)와 같은 세포독성제에 접합된 분원에서 기술된 항체를 포함한다. 용합 단백질이 아래에서 더욱 기술된다.
- [0393] 면역접합체의 제조는 미국 특허 No. 6,306, 393에서 기술된다. 면역접합체는 치료제를 항체 성분에 간접적으로 접합시킴으로써 제조될 수 있다. 일반적인 기술은 Shih et al., Int. J. Cancer 41: 832- 839 (1988); Shih et al., Int. J. 암 46: 1101-1106 (1990); 및 Shih et al., U. S. Pat. No. 5,057, 313에 기술된다. 일반적인 방법은 산화된 탄수화물 부분을 갖는 항체 성분을, 적어도 하나의 자유 아민 작용을 갖고 다수의 약물, 독소, 킬레이터, 붕소 가수, 또는 다른 치료제가 로딩된 운반체 폴리머와 반응시키는 것을 수반한다. 이 반응은 2차 아민로 환원에 의해 안정화되어 최종 접합체를 형성할 수 있는 초기 Schiff 염기 (이민) 연결을 초래한다.
- [0394] 다른 실질적으로 등가의 폴리머 운반체가 또한 사용될 수 있지만, 운반체 폴리머는 바람직하게는 적어도 50 아미노산 잔기의 아미노텍스트란 또는 폴리펩티드이다. 바람직하게는, 최종 면역접합체는 투여의 용이함과 치료법에서 사용하기 위한 효과적인 표적화를 위해, 포유동물 혈청과 같은 수용액에서 가용성이다. 따라서, 운반체 폴리머에 대한 가용화 작용은 최종 면역접합체의 혈청 용해도를 증대시킬 것이다. 특히, 아미노텍스트란이 바람직할 것이다.
- [0395] 아미노텍스트란 운반체와의 면역접합체를 제조하는 방법은 전형적으로 텍스트란 폴리머, 유리하게는 약 10,000-100,000의 평균 분자량의 텍스트란으로 시작된다. 텍스트란은 산화제와 반응하여 그것의 탄수화물 고리의 일부분의 제어된 산화에 영향을 미쳐 알데히드 기를 발생시킨다. 산화는 종래의 과정에 따라 NaIO₄와 같은 글리콜 화학적 시약으로 편리하게 야기된다.
- [0396] 산화된 텍스트란은 그후 폴리아민, 바람직하게는 디아민, 더욱 바람직하게는, 모노-또는 폴리하이드록시 디아민과 반응한다. 적합한 아민은 에틸렌 디아민, 프로필렌 디아민, 또는 다른 유사 폴리메틸렌 디아민, 디에틸렌 트리아민 또는 유사 폴리아민, 1, 3-디아미노-2-하이드록시프로페인, 또는 다른 유사 하이드록실화 디아민 또는 폴리아민, 등을 포함한다. 텍스트란의 알데히드 기에 대해 초과량의 아민을 사용하여 알데히드 작용의 Schiff 염기 기로의 실질적으로 완전한 전환을 확보한다.
- [0397] NaBH₄, NaBH₃ CN 또는 유사물과 같은 환원제를 사용하여 결과의 Schiff 염기 중간체의 환원 안정화를 야기시킨다. 결과의 부가생성물은 종래의 사이징 칼럼을 통한 통과에 의해 정제되어 교차-결합된 텍스트란을 제거할 수 있다.
- [0398] 텍스트란이 아민 작용을 도입하도록 유도하는 다른 종래의 방법, 예를 들어, 시아노젠 브롬화물과의 반응, 이어서 디아민과의 반응이 사용될 수 있다.
- [0399] 아미노텍스트란은 그후 활성화 형태, 바람직하게는, 종래의 수단에 의해 예를 들어, 디사이클로헥실카보디이미

드 (DCC) 또는 그것의 수용성 변체를 사용하여 제조된, 카르복실-활성화 유도체로, 로딩될 특정한 약물, 독소, 킬레이터, 면역조정자, 붕소 가수, 또는 다른 치료제의 유도체와 반응하여, 중간체 부가생성물을 형성한다.

[0400] 대안으로서, 역새플 항바이러스 단백질 또는 리신 A-사슬, 등과 같은 폴리펩티드 독소는 글루타르알데히드 축합에 의해 또는 단백질에서의 활성화 카르복실기와 아미노엑스트란에서의 아민과의 반응에 의해 아미노엑스트란에 결합될 수 있다.

[0401] 방사선금속 또는 자기 공명 인센서를 위한 킬레이터가 당업계에 잘 알려져있다. 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA) 및 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA)의 유도체가 전형적이다. 이들 킬레이터는 전형적으로 킬레이터가 운반체에 부착될 수 있는, 측쇄위에 기를 갖는다. 그러한 기는 DTPA 또는 EDTA이 그것에 의해 운반체의 아민기에 결합될 수 있는, 예를 들어, 벤질이소티오시아네이트를 포함한다. 대안으로서, 킬레이터에 있는 카르복실기 또는 아민기는 모두 잘 알려진 수단에 의해, 활성화 또는 앞선 유도화 및 그후 결합에 의해, 운반체에 결합될 수 있다.

[0402] 카르보레인과 같은 붕소 가수는 종래의 방법에 의해 항체 성분에 부착될 수 있다. 예를 들어, 당업계에 잘 알려져 있듯이, 카르보레인은 펜던트 측쇄에서 카르복실 작용으로 제조될 수 있다. 그러한 카르보레인의 운반체, 예를 들어, 아미노엑스트란에 대한 부착은 카르보레인의 카르복실기의 활성화 및 운반체에서 아민과의 축합에 의해 달성되어 중간체 접합체를 제조할 수 있다. 그러한 중간체 접합체는 그후 항체 성분에 부착되어 아래에서 기술한 바와같이, 치료에 유용한 면역접합체를 제조한다.

[0403] 폴리펩티드 운반체는 아미노엑스트란 대신에 사용될 수 있지만, 폴리펩티드 운반체는 사슬에서 적어도 50 아미노산 잔기, 바람직하게는 100-5000 아미노산 잔기를 가져야한다. 적어도 일부의 아미노산은 리신 잔기 또는 글루탐레이트 또는 아스파르테이트 잔기가 되어야한다. 리신 잔기의 펜던트 아민 및 글루탐인과 아스파르테이트의 펜던트 카르복실레이트는 약물, 독소, 면역조정자, 킬레이터, 붕소 가수 또는 다른 치료제를 부착하기 위해 편리하다. 적합한 폴리펩티드 운반체의 예는 결과의 로딩된 운반체 및 면역접합체에 원하는 용해도 성질을 부여하기 위해, 폴리리신, 폴리글루탐산, 폴리아스파르트산, 그들의 코폴리머, 및 이들 아미노산 및 다른 것들, 예를 들어, 세린의 혼합된 폴리머를 포함한다.

[0404] 중간체 접합체와 항체 성분의 접합은 항체 성분의 탄수화물 부분을 산화하고, 약물, 독소, 킬레이터, 면역조정자, 붕소 가수, 또는 다른 치료제로 로딩한 후에 결과의 알데히드 (및 케톤) 카르보닐을 운반체에 남아있는 아민기와 반응함으로써 달성된다. 대안으로서, 중간체 접합체는 치료제로 로딩한 후에 중간체 접합체에 도입된 아민기를 통하여 산화된 항체 성분에 부착될 수 있다. 산화는 화학적으로, 예를 들어, NaIO₄ 또는 다른 글리콜리틱 시약으로, 또는 효소에 의해, 예를 들어, 뉴라미니다아제 및 갈락토오스 옥시다아제로 편리하게 수행된다. 아미노엑스트란 운반체의 경우는, 아미노엑스트란의 아민의 모두는 아니지만 전형적으로 치료제를 로딩하기 위해 사용된다. 아미노엑스트란의 남아있는 아민은 산화된 항체 성분과 축합하여 Schiff 염기 부가생성물을 형성하고, 이것은 그후 통상적으로 보로하이드라이드 환원제로 환원으로 안정화된다.

[0405] 본 발명에 따라 다른 면역접합체를 제조하기 위해서 유사한 과정이 사용된다. 로딩된 폴리펩티드 운반체는 바람직하게는 항체 성분의 산화된 탄수화물 부분과의 축합을 위해 남아있는 자유 리신 잔기를 갖는다. 폴리펩티드 운반체에서의 카르복실은 만일 필요하다면, 예를 들어, DCC로 활성화하고 초과량의 다이아민의 반응에 의해, 아민으로 변환될 수 있다.

[0406] 최종 면역접합체는 하나 이상의 CD84Hy 에피토프를 사용하여 Sephacryl S-300 또는 친화력 크로마토그래피에서 사이징 크로마토그래피와 같은 종래의 기술을 사용하여 정제된다.

[0407] 대안으로서, 면역접합체는 항체 성분을 치료제와 직접적으로 접합함으로써 제조될 수 있다. 일반적인 과정은 치료제가 산화된 항체 성분에 직접 부착되는 것을 제외하고는 접합의 간접적인 방법과 유사하다.

[0408] 다른 치료제가 본원에서 기술된 킬레이터에 대해 치환될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 당업자들은 부적당한 실험 없이 접합 계획을 고안할 수 있을 것이다.

[0409] 더 나아가 예시로서, 치료제는 디설피드 결합 형성을 통해 환원된 항체 성분의 힌지 영역에서 부착될 수 있다. 예를 들어, 과산화물 특소이드 펩티드는 펩티드를 항체 성분에 부착하는데 사용되는 단일 시스테인 잔기로 구성될 수 있다. 대안으로서, 그러한 펩티드는 N-숙시닐 3-(2-피리리딘디티오) 프로프리오네이트 (SPDP)와 같은 헤테로2 작용 크로스-링커를 사용하여 항체 성분에 부착될 수 있다. Yu et al., Int. J. Cancer 56: 244 (1994). 그러한 접합을 위한 일반적인 기술이 당업계에 잘 알려져있다. 참조, 예를 들어, Wong, Chemistry Of Protein

Conjugation and Cross-Linking (CRC Press 1991); Upešlacis et al., "Modification of Antibodies by Chemical Method," in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch et al. (eds.), 187-230쪽 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter et al. (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995).

[0410] 항체와 세포독성제의 접합체는 N-숙시니미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티오레인 (IT), 이미도에스테르의 2작용 유도체(디메틸 아디피미데이트 HCL와 같음), 활성 에스테르 (디숙시니미딜 수버레이트와 같음), 알데히드(글루타렐데히드와 같음), 비스-아지도 화합물(비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민과 같음), 비스-디아조늄 유도체(비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민과 같음), 디소시아네이트(톨리엔 2,6-디소시아네이트와 같음), 및 비스-활성 플루오르 화합물(1,5-디플루오르-2,4-디니트로벤젠과 같음)와 같은 다양한 2작용 단백질 결합체를 사용하여 만들어진다. 예를 들어, 리신 면역독소는 Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987)에서 기술된 바와 같이 제조될 수 있다. Carbon-14-표지화된 1-이소티오시아나토벤질-3-메틸디에틸렌트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 대한 방사선택중의 접합을 위한 대표적인 킬레이팅제이다(참조, 예를 들어, W094/11026).

[0411] 상술한 바와 같이, 항체의 Fc 영역에서 탄수화물 부분이 치료제를 접합하는데 사용될 수 있다. 그러나, 단일 항체 단편이 면역접합체의 항체 성분으로서 사용된다면, Fc 영역은 존재할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 항체 또는 항체 단편의 경쇄 가변 영역 안으로 탄수화물 부분을 도입하는 것이 가능하다. 참조, 예를 들어, Leung et al., *J. Immunol.* 154: 5919 (1995); Hansen et al., U. S. Pat. No. 5,443, 953. 조각된 탄수화물 부분은 그후 치료제를 부착하는데 사용된다.

[0412] 게다가, 당업자들은 접합 방법의 수많은 가능한 변이를 인식할 것이다. 예를 들어, 탄수화물 부분은 혈액, 림프, 또는 다른 세포의 유체에서, 손상되지 않은 항체, 또는 그것의 항원-결합 단편의 반감기를 연장하기 위해, 폴리에틸렌글리콜을 부착하는데 사용될 수 있다. 더욱이, 탄수화물 부분과 자유 술폰기기에 치료제를 부착함으로써 "2가 면역접합체"를 구성하는 것이 가능하다. 그러한 자유 술폰기기는 항체 성분의 힌지 영역에 위치할 수 있다.

[0413] 항-M-CSF 항체 융합 단백질

[0414] 본 발명은 하나 이상의 항-M-CSF 항체 부분 및 면역조절자 또는 독소 부분을 포함하는 융합 단백질의 사용을 계획한다. 항체 융합 단백질을 만드는 방법은 당업계에 잘 알려져있다. 참조, 예를 들어, 미국 특허 No. 6,306,393. 인터류킨-2 부분을 포함하는 항체 융합 단백질이 Boleti et al., *Ann.Oncol.* 6: 945 (1995), Nicolet et al., *Cancer Gene Ther.* 2: 161 (1995), Becker et al., *Proc.Nat'l Acad. Sci. USA* 93: 7826 (1996), Hank et al., *Clin. Cancer Res.* 2: 1951 (1996), and Hu et al., *Cancer Res.* 56: 4998 (1996)에 의해 기술된다. 게다가, Yang et al., *Hum. 항체 Hybridomas* 6: 129 (1995)은, F(ab')₂ 단편 및 종양 괴사 인자 알파 부분을 포함하는 융합 단백질을 기술한다.

[0415] 재조합 분자가 하나 이상의 항체 성분을 포함하는 항체-독소 융합 단백질을 만드는 방법과, 독소 또는 화학요법제가 또한 당업자들에게 알려져있다. 예를 들어, 항체-*Pseudomonas* 외독소 A 융합 단백질은 Chaudhary et al., *Nature* 339: 394 (1989), Brinkmann et al., *Proc.Nat'l Acad. Sci. USA* 88: 8616 (1991), Batra et al., *Proc.Nat'l Acad. Sci. USA* 89: 5867 (1992), Friedman et al., *J. Immunol.* 150: 3054 (1993), Wels et al., *Int. J. Can.* 60: 137 (1995), Fominaya et al., *J. Biol. Chem.* 271: 10560 (1996), Kuan et al., *Biochemistry* 35: 2872 (1996), and Schmidt et al., *Int. J. Can.* 65: 538 (1996)에 의해 기술되었다. 디프테리아 독소 부분을 함유하는 항체-독소 융합 단백질은 Kreitman et al., *백혈병* 7: 553 (1993), Nicholls et al., *J. Biol. Chem.* 268: 5302 (1993), Thompson et al., *J. Biol. Chem.* 270: 28037 (1995), 및 Vallera et al., *Blood* 88: 2342 (1996)에 의해 기술되었다. Deonarain et al., *Tumor Targeting* 1: 177 (1995)은 RNase 부분을 갖는 항체-독소 융합 단백질을 기술한 반면, Linardou et al., *Cell Biophys.* 24-25: 243 (1994)은, DNase I 성분을 포함하는 항체-독소 융합 단백질을 제조하였다. Wang et al., *Abstracts of the 209th ACS National Meeting, Anaheim, Calif., Apr. 2-6, 1995, Part 1, BIOT005*의 항체-독소 융합 단백질에서 겔로닌을 독소 부분으로서 사용하였다. 더 나아가 예로서, Dohlsten et al., *Proc.Nat'l Acad. Sci. USA* 91: 8945 (1994)는 *Staphylococcal* 장독소-A를 포함하는 항체-독소 융합 단백질을 보고하였다.

[0416] 그러한 접합체의 제조에 적합하게 채택되는 독소의 예는 리신, 아브린, 리보뉴클레아제, DNaseI, *Staphylococcal* 장독소-A, 역세폴 항바이러스 단백질, 겔로닌, 디프테린 독소, *Pseudomonas* 외독소, 및

Pseudomonas 내독소이다. 예를 들어, Pastan et al., Cell 47: 641 (1986), 및 Goldenberg, CA--A Cancer Journal for Clinicians 44: 43 (1994) 참조. 다른 적합한 독소는 당업자들에게 잘 알려져있다.

[0417] 본 발명의 항체는 또한 항체를, 프로드러그 (예를 들어, 펩티딜 화학요법제, SeeW081/01145)를 활성 항-암 약물로 변환하는 프로드러그-활성화 효소에 접합함으로써 ADEPT에 사용될 수 있다. 참조, 예를 들어, W088/07378 및 미국 특허 No. 4,975, 278.

[0418] ADEPT에 유용한 면역접합체의 효소 성분은 그것을 그것의 더욱 활성, 세포독성 형태로 변환하기 위한 방식으로 프로드러그에서 작용할 수 있는 어떠한 효소를 포함한다.

[0419] 본 발명의 방법에서 유용한 효소는 이것으로 제한되지는 않지만, 포스페이트-함유 프로드러그를 자유 약물로 변환하기에 유용한 알칼리성 포스파타아제; 술페이트-함유 프로드러그를 자유 약물로 변환하는데 유용한 아릴솔파타제; 비-독성 5-플루오로사이토신을 항-암 약물, 5-플루오로우라실로 변환하는데 유용한 시토신 디아미나아제; 펩티드-함유 프로드러그를 자유 약물로 변환하기에 유용한, 세라티아 프로테아제, 테르몰리신, 셉틸리신, 카르복시펩티다아제 및 카텡신(카텡신 B 및 L과 같은)과 같은 프로테아제; D-아미노산 치환기를 함유하는 프로드러그를 변환하는데 유용한 D-알라닐카르복시펩티다아제; β-갈락토시다아제와 같은 탄수화물-분할 효소 및 글리코실화 프로드러그를 자유 약물로 변환하는데 유용한 뉴라미니다아제; β-락탐으로 유도된 약물을 자유 약물로 변환하기에 유용한 β-락타마제; 및 그들의 아민 질소에서 각각 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸 기로 유도된 약물을 자유 약물로 변환하기에 유용한, 페니실린 V 아미다아제 또는 페니실린 G 아미다아제와 같은 페니실린 아미다아제를 포함한다. 대안으로서, 또한 당업계에 항체효소로서 알려져있는 효소 활성을 갖는 항체는 본 발명의 프로드러그를 자유 활성 약물로 변환하기 위해 사용될 수 있다 (참조, 예를 들어, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). 항체-항체효소 접합체는 항체효소의 종양 세포 집단으로의 송달을 위해 본원에서 기술된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0420] 본 발명의 효소는 위에서 논의된 헤테로2작용 가교결합 시약의 사용과 같이, 당업계에 잘 알려진 기술에 의해 항체에 공유 결합될 수 있다. 대안으로서, 본 발명의 효소의 적어도 작용적으로 활성 부분에 연결된 발명의 항체의 적어도 항원 결합 영역을 포함하는 융합 단백질은 당업계에 잘 알려진 재조합 DNA 기술을 사용하여 구성될 수 있다(참조, 예를 들어, Neuberger et al., Nature 312: 604-608 (1984))

[0421] 비-치료 용도

[0422] 본 발명의 항체는 M-CSF을 위한 친화력 정제제로서 또는 M-CSF 단백질에 대한 진단 분석법에서 예를 들어, 특이 세포, 조직, 또는 혈청에서 그것의 발현을 검출하는데 사용될 수 있다. 항체는 또한 생체내 진단 분석법을 위해 사용될 수 있다. 일반적으로, 이런 목적을 위해, 종양이 면역신티그램 조영법을 사용하여 집중화될 수 있도록 항체는 방사선택중으로 표지화된다(¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹⁴C, ¹³¹I, ¹²⁵I, ³H, ³²P 또는 ³⁵S와 같은).

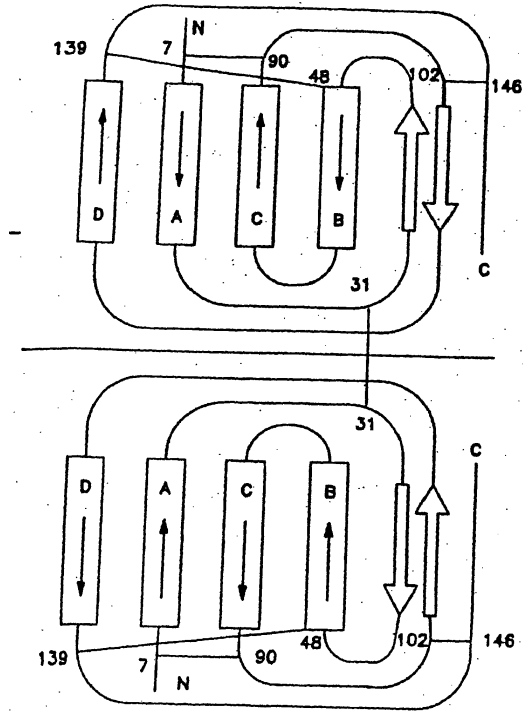
[0423] 본 발명의 항체는 경쟁적 결합 분석법, ELISA와 같은 직접적 및 간접적인 샌드위치 분석법, 및 면역침전 분석법과 같은 어떠한 공지된 분석법 방법에서 채택될 수 있다. Zola, 단일클론 항체: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc. 1987). 항체가 또한 당업계에 공지된 방법을 사용하여 라벨 종양 샘플에 대한 면역조직화학을 위해 사용될 수 있다.

[0424] 편의상, 본 발명의 항체는 키트에, 즉, 진단 분석법을 수행하기 위한 지시사항과 함께 미리 결정된 양으로 포장된 시약의 조합으로 제공될 수 있다. 항체가 효소로 표지화되는 경우, 키트는 효소에 의해 요구되는 기질 및 공동인자를 포함할 것이다(예를 들어, 검출가능한 발색단 또는 플루오로포어를 제공하는 기질 전구물질). 게다가, 안정제, 완충제 (예를 들어, 불록 완충제 또는 용해 완충제) 등과 같은 다른 첨가제가 포함될 수 있다. 상대적으로 양의 다양한 시약이, 분석법의 민감도를 실질적으로 최적화하는 시약 용액중의 농도를 제공하기 위해 폭넓게 변화될 수 있다. 특히, 시약은 용해가 적절한 농도를 갖는 시약 용액을 제공할 부형제를 포함하는, 보통 동결건조된, 건조 분말로서 제공될 수 있다.

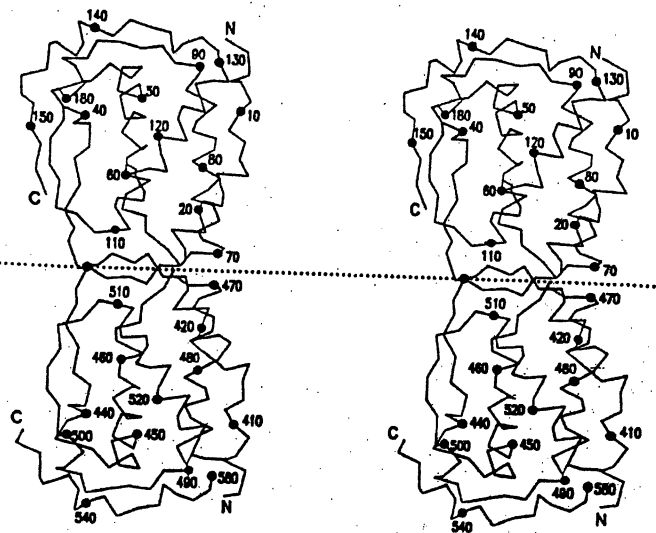
[0425] 본 발명은 다음의 실시예에 의해 예증되며, 이것은 어떠한 식으로도 발명을 제한하려는 의도는 아니다.

도면

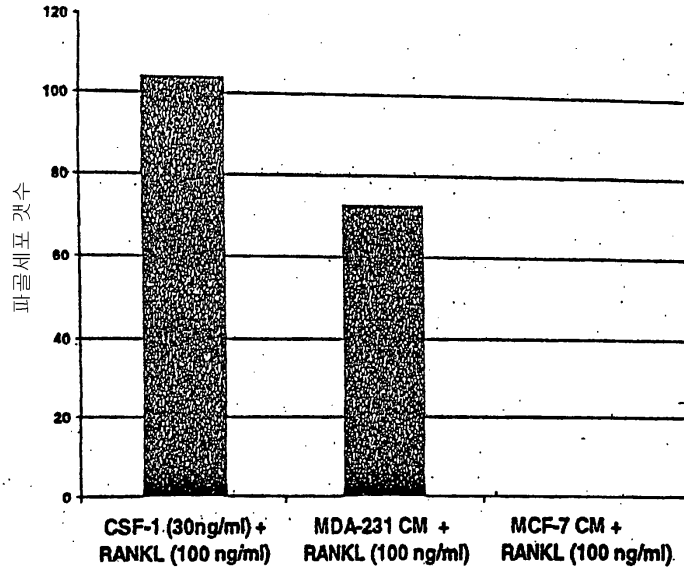
도면1



도면2



도면3



도면4A

RX1 경쇄 아미노산 서열:

DILLTQSPAILLSVSPGERVFSFRASQSI¹IGTSHWYQRTNGSPRLLI²KYASESISGIPSRFSGSGSDFTLSINSVESEDIADYYCQQINSWPTTFGGGKLEIKRADAAPT³VSI⁴FPFSSQLTSSGGASVVCFLNMFYKIDINVKWKIDGSEKQVNLNSWTDQSDKSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSVTCEATHKTSPIVVKSPNRNEC

RX1 중쇄 아미노산 서열:

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAMN⁴WIRQFPGNKLEWNGYISYSGTSTYNS⁵SLKRSISITRDTSKNQFFLQ⁶LNSVTTEDTAYYCASF⁷DYAHAMDYWGOGT⁸SVTVSSAKT⁹PSVYPLAPVCCD¹⁰TSSVTLCLVKGYPFEPVLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVSTWPSQITCNVAHPASSTKV¹¹DKKIEPRGPTIKPCPC¹²KCPAPNLLGGPSV¹³PIPRKIDVLMISLSPVTCVVDVSDDDPDVQISWFMVNV¹⁴EVHTAQ¹⁵TQTHREDYNSL¹⁶RVVSALPIQHODWMSGKFKCKV¹⁷NNKDLPAPIERTISKPKGSV¹⁸RAPQVVVLP¹⁹PpEERMT²⁰KKQVLLT²¹QVTD²²FMPED²³IYEVW²⁴TNGKTELNYK²⁵TEPVLDSGSYFMYSKL²⁶RVEKKNVERNYSYSCSVVHEGLN²⁷Hht²⁸K²⁹FSR³⁰TG

RX1 중쇄 뉴클레오티드 서열:

atgggttggtcctgtatcatcctattcctggtggccactgccacaggtgtgcaactccgacgtgcagcttcaggagt¹caggacctggcctcgtgaaacctctcagagctcgtccctcaactgtactgtcactgactcctcaccacagtgat²tcgacctggaactggatccgcaat³tcccagggaataaacttggatggatggggtacataagctacagtggtgcaacttccatacaatccatctctcaaaaagtcggatctccatcactcgagacacatccaagaaccagtctctcctgcagctgcaactctgtgactactgaggacacagccacataattactgtgcaactcctcgactatgccacgcccctggatctctgggccaaggactctggatcactgtctctccgcca⁴aaacacagcccccactcgggtctatccactggcccctgtgtggagatcaaac⁵tggtcctcctcggtgactctaggatgcactgtcaaacctcgagaccctggccagcagctccactcactgcaatgtggcccaccggcaagcagccacaaaggtggacagaaaat⁶tgagcccagagggcccacaatcaagccctgtcctccatgcaaatgccagcaactaaactcttgggtggaccatccgtctctcatctccctccaaagatcaaggatgactcatgatctccctggaccoccatagtcaatgtgtgggtggatgtgagcggatga⁷cccagatgtccagatcagctgggtt⁸gtgaaacaactgggaagtacacacagctcagacacaaacccatagagaggtatcaacagctactctccgggtggtcagtcacctcccatacagcaccagactggatgagtggaaggagt⁹tcaaatgcaaggtcaacaacaagaactcccagcgccatcgagagaaccatctcaaaacc¹⁰aaagggtcagtaagagctccacaggtatattacaagacactgaaccagctcctggactctgaggtctcttactctatgtacagcaagctcagatgtacagcaagctgagagt¹¹gaaagaagaactgggtggaaga¹²aatagctactcctgtctcagtggtccacgaggtctgcacaatcaccacacgactaaagactctccggactccgggtaaa

RX1 경쇄 뉴클레오티드 서열:

atgggtatccacacctcagttcctgtattttgtctttctggattccagcctccagaggtgacatcttctgctgactcagctccagccatcctgtctgtgagtcocaggaga¹aaagctcagttctcctcagggccagtcagagcatggcacaagcatcacactggtatcagcaagaaca²aatggtctccaggctctctataaagtatgctcttgagctctatctctgggatcccttccaggtttagtggcagtggtcagggacagatttactcttagcatcaacagctg³ggagctcgaagatattgcagattat⁴tactgtcaacaaataatagctggccaaaccygtcggcgggggacaaaagt⁵tgaaataaaaaggctgagctgcaccacactg⁶atccatctcccacatccagtagcagctaaacatctggaggtgctcagtcgtgctcttgaacaactctacc⁷ccaaagacatcaatgtcaagtggaaagattgagcagtgaa⁸cgcaaaaatggcgtcctgaaactggactgatcaggacgaaagacagcactacagcatgagcagaccctcagctg⁹caacaagacagtatgaacacataacagctatccctgtgagggcactcacaagacatcaactt¹⁰cccactgtc¹¹caagactc¹²caacaggaatgagtg¹³t

도면4B

CHIR-RX1 경쇄 위험 정렬

V- 부위	아미노산 1-52
위험	LHLHLHMLLMLHMLLLHLHLHLMHHHHHHHHHHHHHMLMLLMHHHHHHHH
마우스	DILLTQSPAILSVSPGERVVSFSCRASQSIGTSIH---WYQQR _T NGSP _R LLIKYAS

V- 부위	아미노산 53-109
위험	HLMMLHMLMHLHLHLHLLHLHLHLLHLLHLLHLLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHLLHLL
마우스	ESISGIP _S RFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQINSWPT-----TFGGGT _K LEI-KRA

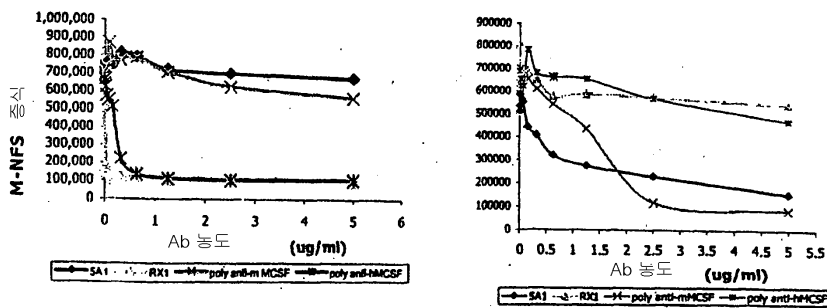
도면4C

CHIR-RX1 중쇄 위험 정렬

V- 부위	아미노산 1-57
위험	MHLHLHLHMLLMLLMLLLHLHLHLMHHHHHHHHHHHHHMLMLLMHHHHHHHHHHHHHH
마우스	DVQLQESGPG _L VK _P SQSLSLTCTVT _D YSITS _D YAWN-WIR _Q F _P G _N K _L E _W M _G YIS---YSGST

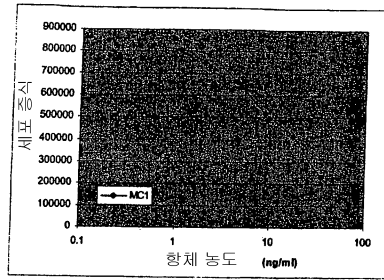
V- 부위	아미노산 58-113
위험	HMMHMLMHLHLHMLLMLLHLHLHLLHLLHLLHLMHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHLLHLL
마우스	SYNPSL _K S _R I _S IT _R DT _S KN _Q FL _Q L _N SV _T TED _T A _T Y _C A _S F _D Y _A HAM-----DYW _Q G _T S _V IV _S S

도면5A

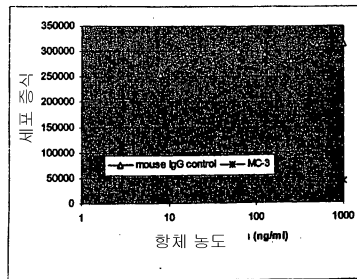


도면5B

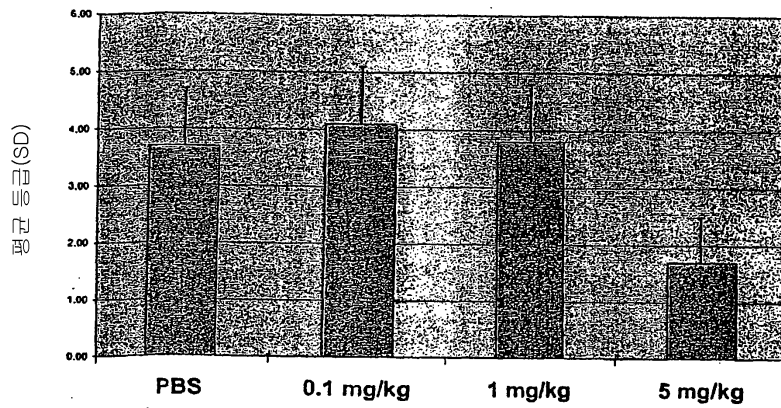
MC1은 인간 MCSF 활성을 중화한다



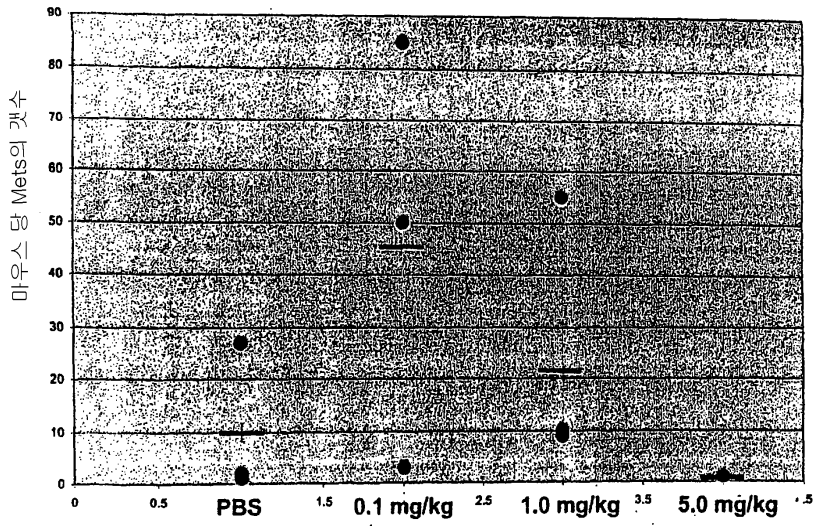
MC3은 인간 MCSF 활성을 중화한다



도면6



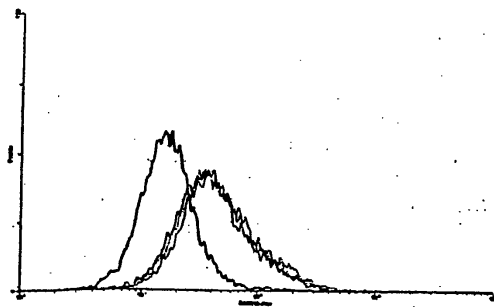
도면7



도면8A

유방암 셀라인 MDA231에 대한 MCSF-특이적 항체의 결합

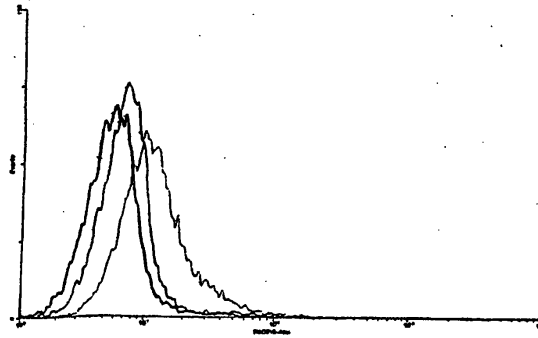
붉은색: 항원 없는 대조군
 검은색: M-CSF 항체 1 ug/ml
 녹색: M-CSF 항체 10ug/ml
 파란색: M-CSF 항체 50ug/ml



도면8B

다발성 골수종 셀라인 ARH77에 대한 MCSF-특이적 항체의 결합

붉은색: 항원 없는 대조군
 파란색: M-CSF 항체 50ug/ml
 eo대조군 IgG2a



도면9

암 유형	암 상태	점수 0	점수 1	점수 2	점수 3	점수 4	3점 이상을 갖는 %
adrenal (부신)	정상	10	5	5	0	0	0
basal cell (기저 세포)	양	5	0	0	0	0	0
bladder (방광)	정상	6	1	2	1	0	10
brain (뇌)	정상	17	1	2	0	0	0
breast (유방)	양	6	5	13	62	0	72
breast (유방)	정상	7	5	7	6	0	24
carcinoids (장양종)	양	9	2	2	0	0	0
carcinoids (muscle) (근육)	양	1	0	1	0	0	0
choriocarcinoma (황모양양종)	양	1	0	0	0	0	0
colon (결장)	정상	4	0	2	0	0	0
colon (결장)	양	9	0	1	4	0	27
fibrosarcoma (섬유양종)	양	3	1	0	0	0	0
gallbladder (담낭)	정상	2	1	0	1	0	26
germ cell (생식 세포)	양	1	0	0	0	0	0
heart (심장)	정상	7	3	2	4	0	25
kidney (신장)	정상	5	10	1	4	0	20
kidney (신장)	양	8	1	0	3	0	25
leiomyosarcoma (평활근양종)	양	5	0	0	0	0	0
liver (간)	정상	11	3	4	1	0	6
liver (간)	양	5	3	0	3	0	27
lung (폐)	정상	18	0	1	0	0	0
lung (폐)	양	3	1	0	3	0	43
lymphoma (림프종)	정상	13	0	3	2	0	12
melanoma (흑색종)	양	7	0	2	5	0	36
melanoma (흑색종)	양	0	0	0	1	0	100
mesothelioma (중피종)	양	6	0	0	0	0	0
neuroblastoma (신경모세포종)	정상	1	0	0	0	0	0
ovary (난소)	양	6	0	2	0	0	0
ovary (난소)	양	8	2	0	4	0	28
pancreas (췌장)	정상	9	2	5	4	0	20
pancreas (췌장)	양	8	1	0	3	0	25
prostate (전립선)	정상	0	3	8	3	0	21
prostate (전립선)	양	9	1	1	4	0	27
sarcoma ell (육종 모두)	양	6	0	2	2	0	20
sarcoma (육종)	양	3	0	2	1	0	17
sarcoma (kidney) (육종(신장))	양	3	0	2	1	0	17
sarcoma mfh (육종 mfh)	양	2	0	0	0	0	0
seminoma (고환종)	양	3	0	0	0	0	0
small intestine (소장)	정상	2	1	0	1	0	25
spleen (비장)	정상	14	2	3	0	0	0
squamous cell (평면 세포)	양	3	0	0	0	0	0
stomach (위)	정상	3	2	2	1	0	13
stomach (위)	양	7	1	1	1	0	10
teratoma (기형종)	양	1	0	0	0	0	0
testis (고환)	정상	5	1	3	3	0	25
thyroid (갑상선)	정상	15	0	0	0	0	0
thyroid (갑상선)	양	6	2	1	2	0	18
미확인되도 모든것	양	6	0	2	1	0	11
미확인되것	양	5	0	2	0	0	0

도면10

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
 20 25 30
 Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
 35 40 45
 Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
 50 55 60
 Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
 65 70 75 80
 Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
 85 90 95
 Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
 100 105 110
 Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
 115 120 125
 Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
 130 135 140
 Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
 145 150 155 160
 Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
 165 170 175
 Glu Cys Ser Ser Gln Gly His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser
 180 185 190
 Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile
 195 200 205
 Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg
 210 215 220
 Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro
 225 230 235 240
 Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
 245 250 255

도면11

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
 20 25 30
 Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
 35 40 45
 Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
 50 55 60
 Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
 65 70 75 80
 Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
 85 90 95
 Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
 100 105 110
 Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
 115 120 125
 Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
 130 135 140
 Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
 145 150 155 160
 Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Ser Phe Ala
 165 170 175
 Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
 180 185 190
 Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
 195 200 205
 Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
 210 215 220
 Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
 225 230 235 240
 Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
 245 250 255
 Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
 260 265 270
 Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
 275 280 285
 Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
 290 295 300
 Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
 305 310 315 320
 Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
 325 330 335
 Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
 340 345 350
 Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro
 355 360 365
 Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro
 370 375 380
 Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro
 385 390 395 400
 Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro
 405 410 415
 Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly
 420 425 430
 Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp
 435 440 445
 Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala
 450 455 460
 Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly
 465 470 475 480
 His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser
 485 490 495
 Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val
 500 505 510
 Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro
 515 520 525
 Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr
 530 535 540
 Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val

도면12

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
 20 25 30
 Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
 35 40 45
 Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
 50 55 60
 Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
 65 70 75 80
 Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
 85 90 95
 Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
 100 105 110
 Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
 115 120 125
 Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
 130 135 140
 Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
 145 150 155 160
 Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
 165 170 175
 Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
 180 185 190
 Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
 195 200 205
 Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
 210 215 220
 Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
 225 230 235 240
 Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
 245 250 255
 Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
 260 265 270
 Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
 275 280 285
 Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
 290 295 300
 Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
 305 310 315 320
 Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
 325 330 335
 Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
 340 345 350
 Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly His Glu Arg Gln
 355 360 365
 Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu
 370 375 380
 Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu
 385 390 395 400
 Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp
 405 410 415
 Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg
 420 425 430
 Gln Val Glu Leu Pro Val

도면13

5H4 중쇄 단백질 서열:

1 EIQLQQSGPE LVKTGTSVKI SCKASGYSFT GYFMHWVKQS HGKSLEWIGY
 51 ISCYNGDTNY NQNFKGKATF TVDTSSSTAY MQFNLSLTS ED SAVYYCAREG
 101 GNYPAYWGQG TLVTVSAAKT TPPSVYPLAP GSAAQTNMVM TLGCLVKGYF
 151 PEPVTVTWNS GSLSSGVHTF PAVLQSDLYT LGSSVTVPPSS TWPSETVTCN
 201 VAHPASSTKV DKKIVPRDCG CKPCICTVPE VSSVFIFPPK PKDVLITITLT
 251 PKVTCVVVDI SKDDPEVQFS WFVDDVEVHT AQTQPREBQF NSTFRSVSEL
 301 PIMHQDWLNG KEFKCRVNSA AFPAPIEKTI SKTKGRPKAP QVYTIPPPKE
 351 QMAKDKVSLT CMITDFFPED ITVEWQWNGQ PAENYKNTQP IMDTDGSYFV
 401 YSKLNVQKSN WEAGNTFTCS VLHEGLHNHH TEKSLSHSPG K

5H4 경쇄 단백질 서열:

1 DIVMTQSHKF MSTSVGDRVT ITCKASQNVG TAVTWYQQKP GQSPKLLIYV
 51 TSTRHAGVPD RFTGSGSGTD FTLTISDVQS EDLADYFCQQ YSSYPLTFGA
 101 GTKLELKRAD AAPTIVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNMFY PKDINVKWKI
 151 DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKI
 201 STSPIVKSPN RNEC

도면14

MC-1 중쇄 단백질 서열:

```

1   EVKLVESGGG LVQPGGSLKL SCATSGFTFS DYMYWVRQT PEKRLEWVAY
51  ISNGGGSTYY PDTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMSRLKSED TAMYYCARQG
101 SYGYPFAYWG QGTLVTVSAA KTTAPSVYPL APVCGDTTGS SVTLGCLVKG
151 YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT
201 CNVAHPASST KVDKKIEPRG PTIKPCPPCK CPAPNLLGGP SVFIFPPKIK
251 DVLMISSLPI VTCVVVDVSE DDPDVQISWF VNNVEVHTAQ TQTHREDYNS
301 TLRVVSALPI QHQDWMGKE FKCKVNNKDL PAPIERTISK PKGSVRAPOV
351 YVLPPPEEEM TTKQVTLTCM VTFMPEDIY VEWTTNNGKTE LNYKNTEPVL
401 DSDGSYFMYS KLRVEKKNWV ERNSYSCSVV HEGLHNHHTT KFSRRTPGK
    
```

MC-1 경쇄 단백질 서열:

```

1   AIQMTQTSS LSASLGDRVT ISCSASQGIS NYLNWYQQKP DGTVKLLIYY
51  TSSLHSGVPS RFGSGSGSTD YSLTISNLEP EDIATYYCQQ YSKLPWTFGG
101 GTKLEIKRAD AAPTVISFPP SSEQLTSGGA SVVCFLLNMFY PKDINVKWKI
151 DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
201 STSPIVKSFN RNEC
    
```

도면15

MC-3 중쇄 단백질 서열:

```

1   DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT SDYAWNWIRO FPGNKLEWVG
51  YISYSGSTSY NPSLKRISI TRDTSKNQFF LQLNSVTTED TATYYCARLE
101 TWLFDYWGQG TTLTVSSAKT TPPSVYPLAP GCGDTTGSSV TLGCLVKGYF
151 PESVTVTWNS GSLSSSVHTF PALLQSGLYT MSSSVTVPSS TWPSQVTCS
201 VAHPASSTTV DKKLEPSGPI STINPCPPCK ECHKCPAPNL EGGPSVFIFP
251 PNIKDVLMIS LTPKVTCVVV DVSEDDPDVQ ISWVNNVEV HTAQTQTHRE
301 DYNSTIRVVS TLPQHQDWM SGKEFKCKVN NKDLPSPIER TISKIKGLVR
351 APQVYILPPP AEQLSRKDVV LTCLVVGFPN GDISVEWTSN GHTEENYKDT
401 APVLDSDGSY FIYSKLNMTK SKWEKTSFVS CNVRHEGLKN YYLKKTISRS
451 PGLDLDICA EAKDGELDGL WTTITIFISL FLLSVCYSAS VTLFKVKWIF
501 SSVVELKQKI SPDYRNMIQ GA
    
```

MC-3 경쇄 단백질 서열:

```

1   DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSCRASQSIG TSIHWYQRT NGSPRLLIKY
51  ASESISGIPS RFGSGSGSTD FTLSINSVES EDIADYYCQQ SNSWPTTFGG
101 GTKLEIKWAD AAPTVISFPP SSEQLTSGGA SVVCFLLNMFY PKDINVKWKI
151 DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
201 STSPIVKSFN RNEC
    
```

도면16A

중쇄 CDR1에 대하여:

		1	
H_CDR1_5H4	(1)	-G	YFMH
H_CDR1_MC-1	(1)	-Y	YMY
H_CDR1_CHIR-RX1	(1)	Y	Y
H_CDR1_MC-3	(1)	Y	Y
일치	(1)	SDYAWN	

중쇄 CDR2에 대하여:

		1		17
H_CDR2_5H4	(1)	YIS	NGD	TNYIQNF
H_CDR2_MC-1	(1)	YIS	NGGG	TYMPD
H_CDR2_CHIR-RX1	(1)	YIS	GG	TSYNPS
H_CDR2_MC-3	(1)	YIS	GG	TSYNPS
일치	(1)	YIS	YSG	STSYNPSLKS

중쇄 CDR3에 대하여:

		1	
H_CDR3_5H4	(1)	--G	NYPAY
H_CDR3_MC-1	(1)	QGS	PPAY
H_CDR3_CHIR-RX1	(1)	-F	YHAM
H_CDR3_MC-3	(1)	--L	ETLE
일치	(1)	DYGW	FDY

도면16B

경쇄 CDR1에 대하여:

		1		11
L_CDR1_5H4	(1)	ASQ	NS	Y
L_CDR1_MC-1	(1)	SAS	Q	ISNY
L_CDR1_CHIR-RX1	(1)	ASQ	NS	Y
L_CDR1_MC-3	(1)	ASQ	NS	Y
일치	(1)	RASQ	SIG	TSIH

경쇄 CDR2에 대하여:

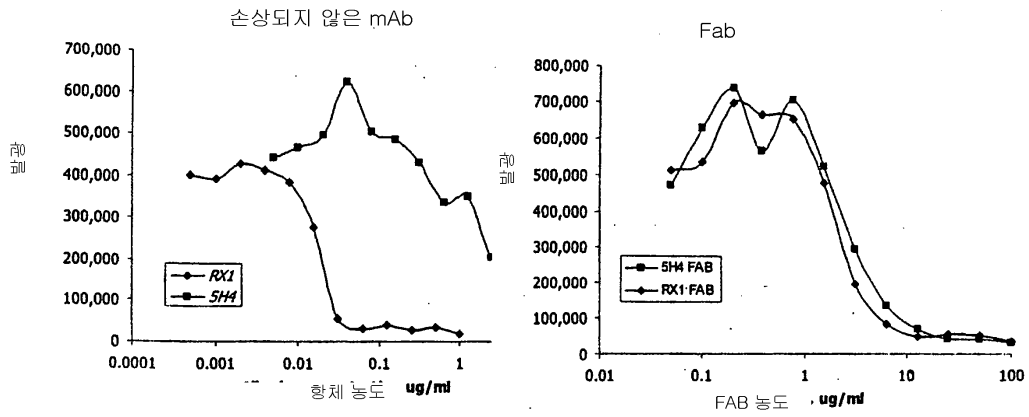
		1	
L_CDR2_5H4	(1)	STR	H
L_CDR2_MC-1	(1)	SSL	H
L_CDR2_CHIR-RX1	(1)	AS	NS
L_CDR2_MC-3	(1)	AS	NS
일치	(1)	YTSE	SIS

경쇄 CDR3에 대하여:

		1	
L_CDR3_5H4	(1)	QQ	KL
L_CDR3_MC-1	(1)	QQ	KL
L_CDR3_CHIR-RX1	(1)	QQ	IN
L_CDR3_MC-3	(1)	QQ	SN
일치	(1)	QQY	SSW

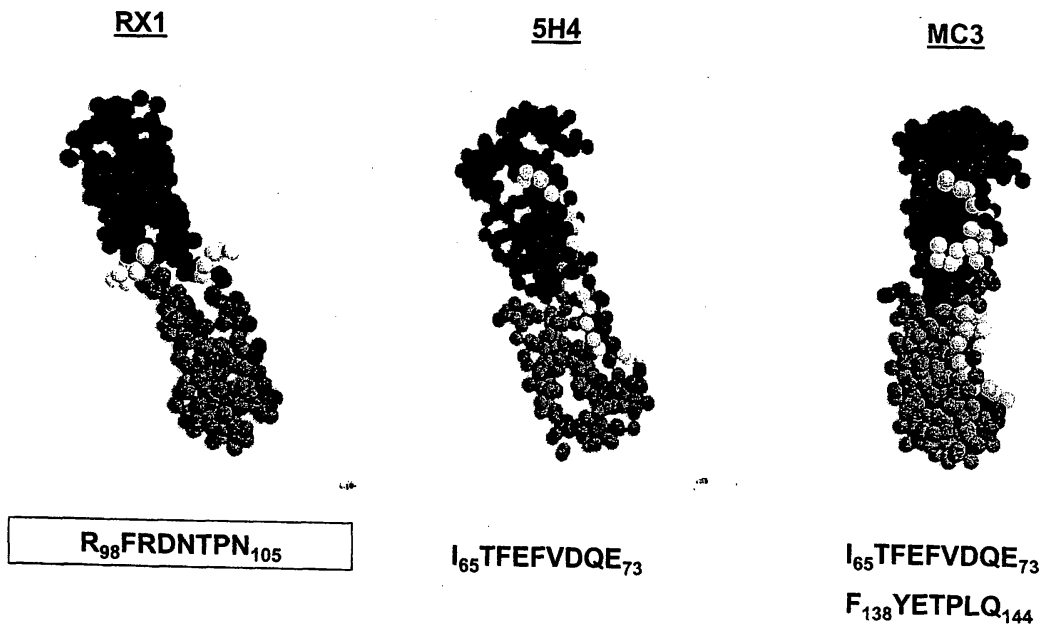
도면17

손대지 않은 mAbs 대 Fabs의 중화 활성



도면18

하이라이트된 RX1 에피토프를 갖는 MCSF 구조



도면19A

중쇄

V- 부위	변화의 번호	아미노산 1-57
위험		MHLHLHLMLLMLLMLLHLHLHLMHHHHHHHHHHHHHMLLMLLMMHHHHHHHHHHHH
마우스		DVQLQESGPGLVKPSQSLTCTVTDYSITSDYAWN-WIRQFPGNKLEWMGYIS---YSGST
인간		qvqLqesGpgLVkPsqTlsLTCxvsGxsxSsxxxxxxWiRQpPgkgLEWigxiyyraxxgxt
낮은 위험	2	DVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVTDYSITSDYAWN-WIRQFPGKLEWMGYIS---YSGST
낮음 + 중간	5	QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSDYSITSDYAWN-WIRQFPGKLEWMGYIS---YSGST

V- 부위	변화의 번호	아미노산 58-113
위험		HMHHMMLMHLHLMLLMLLHLHLHLLHLLHLMHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLLHLHL
마우스		SYNPSLKSRIISRDTSKNQFSLQNSVTEDTATYYCASFDYAHAM-----DYWGQGTSTVTVSS
인간		xynpSlksRvTisvDTSKNQfSLxLxsvtaadTAvYyCArxxxxxxxxxxxxxxxxxxfdxWGqGtXVTVSS
낮은 위험	6	SYNPSLKSRIISRDTSKNQFSLQNSVTAADTATYYCASFDYAHAM-----DYWGQGTSTVTVSS
낮음 + 중간	7	SYNPSLKSRIISRDTSKNQFSLQNSVTAADTAVYYCASFDYAHAM-----DYWGQGTSTVTVSS

도면19B

낮은 위험 중쇄 대 Kabat Vh2 일치:

단백질 서열:

DVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVTDYSITSDYAWN-WIRQFPGKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIISRDTSKNQFSLQNSVTAADTATYYCASFDYAHAMD
YWGQGTSTVTVSS

DNA 서열:

GACGTACAACCTCAAGAATCTGGCCAGGCTCTCGTCAAACCTTCTCAAACCTCTCACTCACTGACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTACGCTT
GGAACTGGATCCGACAATTTCTGGTAAAAAATCGAATGGATGGGTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCTCTACAATCTCTCTGAAATCAGCATCAC
AATTTCCCGGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCAACTCAATTTCTGTTACCGCCGCGGATACCTGCCACTACTACTGTGCCTCTTTTACTACGCTCAG
CCATGGATTATGGGGACAGGCTACTACCGTTACCGTAAGCTCA

낮음 + 중간 위험 중쇄 대 Kabat Vh2 일치:

단백질 서열:

QVQLQESGPGLVKPSQTLTCTVSDYSITSDYAWN-WIRQFPGKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRIISRDTSKNQFSLQNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMD
YWGQGTSTVTVSS

DNA 서열:

CAAGTTCACCTCAAGAATCAGGCCCGGACTCGTTAAACCCTCTCAAACCTCTCTCTACTTGCAGTATCCGATTACTCTATTACTTCAGACTACGCTTG
GAACTGGATCAGACAATTTCCCGGAAAAGGACTCGAATGGATGGGATATATCTCTACTCTGGCTCAACCTCTTACAACCCCTCTCTCAAATCTCGAATAAC
AATCTCAGCGGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCAACTTAACCTCGGTTACTGCGCCGACACTGCCGTTTACTACTGTGCTCTCTCGATTACGCCAG
CTATGGATTATGGGGACAAGGAACCTACCTGCTACGCTCA

도면20A

경쇄

V. 부위	변화의 번호	아미노산 : 1-52
위험		LHLHLMLLMLLMLLMLLHLHLHLHMHMMMMMMMMMMMMMMMMLMLLMHMMMMMMMM
마우스		DILLTQSPAILSVSPGERVVFSCRASQSIGTSIH---WYQRTNGSPRLLIKYAS
인간		EIVLTQSPgTlS1SPGERaTLSCRASQSVsssyL---AWYQqkPGQAPRLLIYgAS
낮은 위험	8	EIVLTQSPGTLSPSPGERVTFSCRASQSIGTSIH---WYQKtGQSPRLLIKYAS
낮음+중간	9	EIVLTQSPGTLSPSPGERVTFSCRASQSIGTSIH---WYQKtGQAPRLLIKYAS

V. 부위	변화의 번호	아미노산 53-109
위험		HLMLHMLMHLHLHLHLHLHLHLHLHLHLHLHMMMMMMMMMMMMMMMMMMMMLHHLHLLLLL
마우스		ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYCCQINSWPT-----TFGGTKLEI-KRA
인간		sRATGIPdRFSGSGSGTDFTLTISrLepEDFAVYYCQYgsspp-----xTFGqGtKvEI-KRT
낮은 위험	8	ERISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYCCQINSWPT-----TFGGTKLEI-KRT
낮음+중간	10	ERATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYCCQINSWPT-----TFGGTKLEI-KRT

도면20B

낮은 위험 경쇄 대 Kabat Vk3 일치:

단백질 서열:

EIVLTQSPGTLSPSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQKtGQSPRLLIKYASERISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYCCQINSWPTTFGGTKLEIKRT

뉴클레오티드 서열:

GAAATAGTCTTACCCAATCTCCCGGAACCTCTCAGTATCTCCCGGCGAACGAGTAACCTTTTCATGTAGAGCATCCCAAATCCATCGGCACCTTCAATTCACCTGGTATCAGCAGAAAACAGGTCAATCCCCACGGCTTCTTATAAAATATGCATCAGAAAGAATATCAGGCATTCAGACAGATTCTCAGGTTTCAGGTCAGGCACAGACTTCACACTTACAATTTCCCGCTCGAATCCGAAGACTTCGCTGACTATTACTGCCAACAAATCAACTCATGGCCTACTACTTTCGGTCAAGGCACC AAACTCGAAATTAACGTACG

낮은 위험 + 중간 위험 경쇄 대 Kabat Vk3 일치:

단백질 서열:

EIVLTQSPGTLSPSPGERVTFSCRASQSIGTSIHWYQKtGQAPRLLIKYASERATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYCCQINSWPTTFGGTKLEIKRT

뉴클레오티드 서열:

GAAATAGTCTTACTCAATCCCGGTACACTCTCAGTITCCCGAGGCGAACGCGTCACTTTTCTTGAGAGCATCACAATCAATCGGCACCTTCAATTCATTGGTATCAACAAAAACAGGACAGGCCACGACTTCTTATAAAATATGCATCAGAACGAGCCACAGGCATCCAGACAGATTTCAGGTTTCAGGTCAGGCACCGATTCACACTTACAATATCCAGAGTCGAATCAGAAGATTTTCAGATTACTATTGTCAACAAATAACAGCTGGCCCACTACATTCGGACAAGGCACA AAACTCGAAATTAACGTACG

도면21A

경쇄- 유린으로 되돌아간 변화

V- 부위	변형의 번호	아미노산 1-52
위험		LHLHLMLLMLHLMLLLHLHLHLMHHHHHHHHHHHHHMLMLLMHMHMMMMHH
마우스		DILLTQSPAILSVSPGERVFSFCRASQSIGTSH---WYQRTNGSPRLLIKYAS
인간		EIVLTQSPgTSLSPGERaTlSCRASQSVssyL---AWYQkPGQAPRLLIYgAS
낮은 위험	8	EIVLTQSPGTLSPGERVTFSCRASQSIGTSH---WYQKTGQSPRLLIKYAS
낮음+중간	9	EIVLTQSPGTLSPGERVTFSCRASQSIGTSH---WYQKTGQAPRLLIKYAS

V- 부위	변형의 번호	아미노산 53-109
위험		HLMLHMLHLHLHLHLHLHLHLHLHLHLHHHHHHHHHHHHHHHHHHHLHLHLHLHL
마우스		ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYQCQINSWPT-----TFGGGTKLEI-KRA
인간		sRATGIPdRFSGSGSGTDFTLTISrLepEDFAVYQCQYgsspp-----xTFGgGTKvEI-KRT
낮은 위험	8	ERISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYQCQINSWPT-----TFGQGTKLEI-KRT
낮음+중간	10	ERATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYQCQINSWPT-----TFGQGTKLEI-KRT
낮음+중간 백일적임	7	ESISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYQCQINSWPT-----TFGQGTKLEI-KRT

도면21B

낮은 위험 경쇄 대 Kabat Vk3 일치: 유린으로 되돌아가 변화된 AA54:

단백질 서열:

EIVLTQSPGTLSPGERVTFSCRASQSIGTSHWYQKTGQSPRLLIKYASESISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYQCQINSWPTTFGQGTKLEIKRT

뉴클레오티드 서열:

GAAATAGTCCCTACCAATCTCCCGGAACCCCTCTCAGTATCTCCGGCGAACAGTAACCTTTTCATGTAGAGCATCCCAATCCATCGGCACTTCAATTCAT
GGTATCAGCAGAAAACAGTCAATCCACGGCTTCTTATAAATATGCATCAGAATCAATTTCTGGCATCCAGACAGATTTTCAGGTTTCAGGATCAGGCA
CCGATTTACACTTACAATCCAGAGTCGAATCAGAAGATTTTGAGATTACTATTGTCAACAATAAACAGCTGGCCCACTACATTCGGACAAGGCACAA
AACTCGAAATTAACGTACG

낮은 위험 + 중간 위험 경쇄 대 Kabat Vk3 일치: 유린으로 되돌아가 변화된 AA54, 55, 56:

단백질 서열:

EIVLTQSPGTLSPGERVTFSCRASQSIGTSHWYQKTGQAPRLLIKYASESISGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRVESEDFADYQCQINSWPTTFGQGTKLEIKRT

뉴클레오티드 서열:

GAAATAGTCTTACTCAATCCCGGTACTCTCAGTTTCCCGAGCGAACGCGTCACTTTTCTTGAGAGCATCACAATCAATCGGCACTTCAATTCATT
GGTATCAACAAAAACAGGACAGGCCACGACTTCTTATAAATATGCATCAGAATCAATTTCTGGCATCCAGACAGATTTTCAGGTTTCAGGATCAGGCA
CCGATTTACACTTACAATCCAGAGTCGAATCAGAAGATTTTGAGATTACTATTGTCAACAATAAACAGCTGGCCCACTACATTCGGACAAGGCACAA
AACTCGAAATTAACGTACG

도면23A

유린 RX-1 경쇄:

```
DILLTQSPAILSVSPGERVSVFSCRASQSIGTSHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQINSWPTTFGGGKLEIKRA
Rxi kv (1) DILLTQSPAILSVSPGERVSVFSCRASQSIGTSHWYQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQINSWPTTFG
Consensus Germline LC
hVK I Consensus (1) DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQSISS-Y-----LNHYQKPKGKAPKLLIYVAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYVSTP----
hVK II Consensus (1) DIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLDSDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTLVYRASGVDRFSGSGSGTDFTLISRVEAEDVGVYYCMQRIEFP----
hVK III Consensus (1) EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQVSSSY-----LAWYQKPGQAPKLLIYGASRRATLDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFVAVYCCQYVSTP----
hVK IV Consensus (1) DIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSLYSSNKNYLAWYQKPGQSPKLLIYVAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFVAVYCCQYVSTP----
hVK V Consensus (1) EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQIDDD-----LHWYQKPGQAPKLLIYVAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFVAVYCCQYVSTP----
hVK VI Consensus (1) EIVLTQSPDFQSVTPKKEKVTITTCRASQSIG-----LHWYQKPGQSPKLLIYVAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYCHQSSSLP----
```

경쇄 아미노 절반

RX-1 DILLTQSPAILSVSPGERVSVFSCRASQSI--GTSIH---WYQRTNGSPRLLIKYAS

pos... 10 20 abcdef 30 40 50

Kabat:

```
HK1...DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQSLVXX-XISXXLXWYQKPKGKAPKLLIYXAS
HK2...DIVMTQSPPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLHSDGXLYLNWYLQKPGQSPQLLIYXXS
HK3...EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSI-----VSSSYLAWYQKPGQAPRLLIYXAS
HK4...DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLAWYQKPGQPPKLLIYXAS
```

생식 계열 일치(JK4 포함):

```
hVK1 DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQSI-----ISSYLNWYQKPKGKAPKLLIYXAS
hVK2 DIVMTQSPPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLDSDGNTYLDWYLQKPGQSPQLLIYTLV
hVK3 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSI-----VSSSYLAWYQKPGQAPRLLIYXAS
hVK4 DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNKNYLAWYQKPGQPPKLLIYXAS
hVK5 EIVLTQSPAFMSATPGDKVNISCKASQIDDD-----DMNHWYQKPGQEAIFIQEAT
hVK6 EIVLTQSPDFQSVTPKKEKVTITTCRASQSIG-----SSLHWYQKPGQSPKLLIYXAS
```

도면23B

경쇄 카복시 절반

RX-1 ESISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQINSWPT-----TFGGGKLEI-KRA

pos... 60 70 80 90 abcdef 100 a

Kabat:

```
HK1...XLXSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQXXXXXPE-----XTFGQGTKVEI-KRT
HK2...NRXSGVPSRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQAXQXPR-----XTFGQGTKVEI-KRT
HK3...SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFVAVYCCQYVSTP-----XTFGQGTKVEI-KRT
HK4...TRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYCCQYVSTP-----XTFGQGTKVEI-KRT
```

생식 계열 일치(JK4 포함):

```
hVK1 SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQSYSTP-----LTFGGGKTKVEI-KRT
hVK2 YRASGVPSRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQRIEFP-----LTFGGGKTKVEI-KRT
hVK3 SRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFVAVYCCQYVSTP-----LTFGGGKTKVEI-KRT
hVK4 TRESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQAEADVAVYCCQYVSTP-----LTFGGGKTKVEI-KRT
hVK5 TLVPGIIPRFSGSGYGTDFTLTINNI ESEDAAYFCLQHDNFP-----LTFGGGKTKVEI-KRT
hVK6 QSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYCHQSSSLP-----LTFGGGKTKVEI-KRT
```

도면24A

유린 RX-1 중쇄:

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWNWI RQFPGNKLEWMMGYISYSGSTS YNPSLKRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASF DYAHAMADYWGQTSVTVSS

RX1 VH (1) DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWNWI RQFPGNKLEWMMGYISYSGSTS ---YNPSLKRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASF DY
Consensus Germline
hVH I Consensus (1) QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGVTFTG--YMHVRQAPGQGLEWGWGWINP--NSGGTYAQKPGQVITRDTSISAYMELSSLRSDDTAVYYCAR---
hVH II Consensus (1) QITLKEGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGWI RQPPGKALEWLALYWNDDK---YSPSLKSRITITKDTSKNQVLLTMTNMDPVDATYYCAHR---
hVH III Consensus (1) E VQLVDSGGGLVQGGSLRLSLSAASGTFSS--YMSWVRQAPGKLEWVANI KQ--DGRKYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR---
hVH IV Consensus (1) QVQLVDSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIG--WVRQMPGKLEWMMGI IYP--GDSDT
hVH V Consensus (1) E VQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTS--YMSWVRQMPGKLEWVANI KQ--DGRKYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR---
hVH VI Consensus (1) QVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTS--YMSWVRQMPGKLEWVANI KQ--DGRKYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR---
hVH VII Consensus (1) QVQLVQSGELKPKGASVKVSCKASGVTFTS--YAMNVRQAPGQGLEWGWGWINP--NTGNPTAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCAR---

중쇄 아미노 절반

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITSDYAWN-WIRQFPGNKLEWMMGYIS---YSGST
pos ... 10 20 30 ab 40 50 abc

Kabat:

HH1 ...XVQLVQSGAEVKKPGXSVKVSCKASGYTFXSYXIX--WVRQAPGQGLEWMMGXIXPY-XXGXT
HH2 ...QVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCAVSGXSSSSXXXKXWIRQPPGKLEWIGXIYYRAXXGXT
HH3 ...EVQLVDSGGGLVQGGSLRLSLSAASGTFXSYXMX--WVRQAPGKLEWVXXIXXKXGXXT

생식 계열 일치(JH4를 포함):

hVHI QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFGTYYMH--WVRQAPGQGLEWMMGWINP--NSGGT
hVHII QITLKEGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGWI RQPPGKALEWLALIY--WNDDK
hVHIII EVQLVDSGGGLVQGGSLRLSLSAASGTFSSYWMS--WVRQAPGKLEWVANIK--QDGSEK
hVHIV QVQLQESGPGLVKPSGTLTCAVSGGSISSSNW--SWVRQPPGKLEWIGEIY--HSGST
hVHV EVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIG--WVRQMPGKLEWMMGI IYP--GDSDT
hVHVI QVQLVQSGAEVKKPGESLKI SCKGSGYSFTSYWIG--WVRQMPGKLEWMMGI IYP--GDSDT
hVHVII QVQLVQSGELKPKGASVKVSCKASGYTFSTYAMN--WVRQAPGQGLEWMMGWINP--NTGNP

도면24B

중쇄 카르복시 절반

SYNPSLKRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASF DYAHAM-----DYWGQTSVTVSS
pos ... 60 70 80 abc 90 100 abcdefghijk 110

Kabat:

HH1 ...NYAQKFQGRVTITDXDSTSTAYMELSSLRSXDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXDXFDXWGQGLVTVSS
HH2 ...XYNPSLKRVTISVDTSKNQFSLXLSVTAADTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXXFDXWGQGLVTVSS
HH3 ...YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAXXXXXXXXXXXXXXXXXYFDXWGQGLVTVSS

생식 계열 일치(JH4를 포함):

hVHI NYAQKFQGRVTITRDTSISAYMELSSLRSDDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGLVTVSS
hVHII RYSPSLKSRITITKDTSKNQVLLTMTNMDPVDATYYCAHRXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGLVTVSS
hVHIII YYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGLVTVSS
hVHIV NYNPSLKRVTISVDKSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGLVTVSS
hVHV RYSPSFQGVITISADKISITAYLQWSSLKASDTAMYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGLVTVSS
hVHVI DYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGLVTVSS
hVHVII TYAQGFTGRFVFLDTSVSTAYLQICSLKAEDTAVYYCARXXXXXXXXXXXXXXXXYFDYWGQGLVTVSS

도면24C

5H4의 Kabat 넘버링

5H4 중쇄 단백질 서열:

1-30: EIQLQQSGPE LVKTGTSVKI SCKASGYSFT
 31-35: GYFMH
 36-49: WVKQSHGKSLEWIG
 50-65: YIS C (52A) YNGDTNY NQNFKG
 66-94: KATF TVDTSSTAY MQF N (82A) S (82B) L (82C) TSED SAVYYCAR
 95-102: EGGNYPAY
 103-437: WGQG TLVTVSAAKT TPPSVYPLAP GSAAQTNSMV
 TLGCLVKGYFPEPVTVTWNS GSLSSGVHTF PAVLQSDLYT LSSSVTVVPS TWPSETVTCN
 VAHPASSTKV DKKIVPRDCG CKPCICTVPE VSSVFIFPPK PKDVLITLTL PKVTCVVVDI
 SKDDPEVQFS WFDVDDVEVHT AQTQPREEQF NSTFRSVSEL PIMHQDWLNG KEFKCRVNSA
 AFPAPIEKTI SKTKGRPKAP QVYTIPPPKE QMAKDKVSLT CMITDFFPED ITVEWQWNGQ
 PAENYKNTQP IMDTDGSYFV YSKLNVQKSN WEAGNTFTCS VLHEGLHNHHH TEKSLSHSPG K

5H4 경쇄 단백질 서열:

1-23: DIVMTQSHKF MSTSVGDRVT ITC
 24-34: KASQNVG TAVT
 35-49: WYQOKPGQSPKLLIY
 50-56: WTSTRHA
 57-88: GVPD RFTGSGSGTD FTLTISDVQS EDLADYFC
 89-97: QQYSSYPLT
 98-214: FGAGTKLELKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI
 DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
 STSPIVKSPN RNEC

도면24D

MC1의 Kabat 넘버링

MC-1 중단백질 서열:

1-30: EVKLVESGGG LVQPGGSLKL SCATSGFTFS
 31-35: DYYMY
 36-49: WVRQTPEKRLEWVA
 50-65: YIS N (52A) GGGSTYY PDTVKG
 66-94: RFTI SRDNAKNTLY LQM S (82A) R (82B) L (82C) KSED TAMYYCAR
 95-102: QGSYGYPFAY
 103-449: WG QGTLVTVSAA KTTAPSVYPL APVCGDITGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTV
 NSGSLSSGVH TFPVAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQIT CNVAHPASST KVDKIEPRG
 PTIKPCPPCK CPAPNLLGGP SVFIFPPKIK DVLMLISLPI VTCVVVDVSE DDPDVQISWF
 VNNVEVHTAQ TQTHREDYNS TLRVVSALPI QHQDWMGKE FKCKVNNKDL PAPIERTISK
 PKGSVRAPQV YVLPPEEEM TTKQVTLTCM VTDMPEDIY VEWTNNGKTE LNYKNTPEVL
 DSDGSYFMYS KLRVEKKNWV ERNSYSCSVV HEGLHNHHTT KSFSRTPGK

MC-1 경쇄 단백질 서열:

1-23: AIQMTQTSS LSASLGDRVT ISC
 24-34: SASQGIS NYLN
 35-49: WYQOKP DGTVKLLIY
 50-56: YTSSLHS
 57-88: GVPS RFSGSGSGTD YSLTISNLEP EDIATYYC
 89-97: QQ YSKLPWT
 98-214: FGGGTKLEIKRAD AAPTVSIFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKWKI
 DGSERQNGVL NSWTDQDSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT STSPIVKSPN
 RNEC

도면24E

MC3의 Kabat 넘버링

MC-3 중쇄 단백질 서열:

```

1-30:   DVQLQESGPG LVKPSQSLSL TCTVTGYSIT
31-35:  SDYAW N (35A)
36-49:  WIRQ FPGNKLEWVG
50-65:  YISYSGSTSY NPSLKS
66-94:  RISIT RDTSKNQFFL QL N (82A) S (82B) V (82C) TTEDT ATYYCAR
95-102: LETWLFDY

103-522: WGQG TLLTVSSAKT TPSPVYPLAP GCGDTTGSSV TLGCLVKGYF PESVTVTWNS
          GSLSSSVHTF PALLQSGLYT MSSSVTVPSS TWPSQVTTCV VAHPASSTTV
          DKKLEPSGPI STINPCPPCK ECHKCPAPNL EGGPSVFIFP PNIKDVLMIS
          LTPKVTCVVV DVSEDDPDVQ ISWVFNVEV HTAQTQTHRE DYNSTIRVVS
          TLPQHQDWM SGKEFKCKVN NKDLPSPIER TISKIKQLVR APQVYILPPP
          AEQLSRKDVV LTCLVVGFPN GDISVEWTSN GHTEENYKDT APVLDSGGSY
          FIYSKLNMTK SKWEKTDSPS CNVRHEGLKN YYLKKTISRS PGLDLDICA
          EAKGELDGL WTTITIFISL FLLSVCYSAS VTLFKVKWIF SSVVELKQKI
          SPDYRNMIGQ GA
    
```

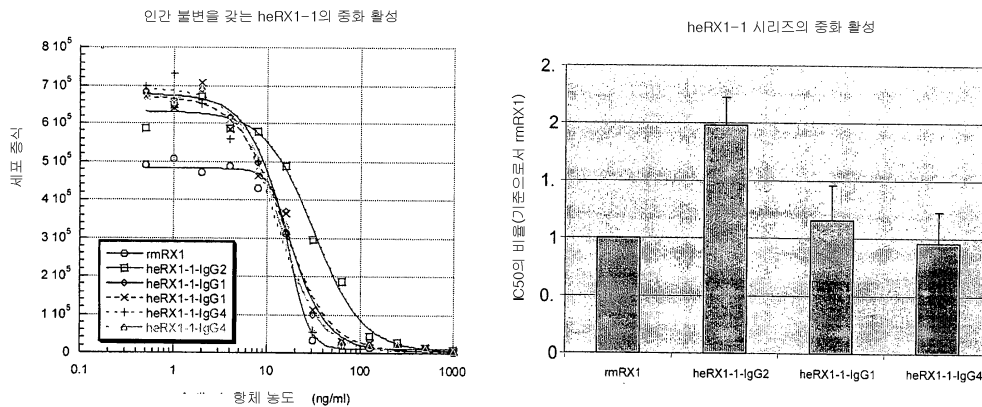
MC-3 경쇄 단백질 서열:

```

1-23:   DILLTQSPAI LSVSPGERVS FSC
24-34:  RASQSIG TSIH
35-49:  WYQRT NGSPLLK
50-56:  YASESIS
57-88:  GIPS RFGSGSGTD FTLSINSVES EDIADYYC
89-97:  QQ SNSWPTT
98-214: FGG GTKLEIKWAD AAPTVISFPP SSEQLTSGGA SVVCFLNNFY PKDINVKKI
          DGSERQNGVL NSWTDQSKD STYSMSSTLT LTKDEYERHN SYTCEATHKT
          STSPIVKSFN RNEC
    
```

도면25

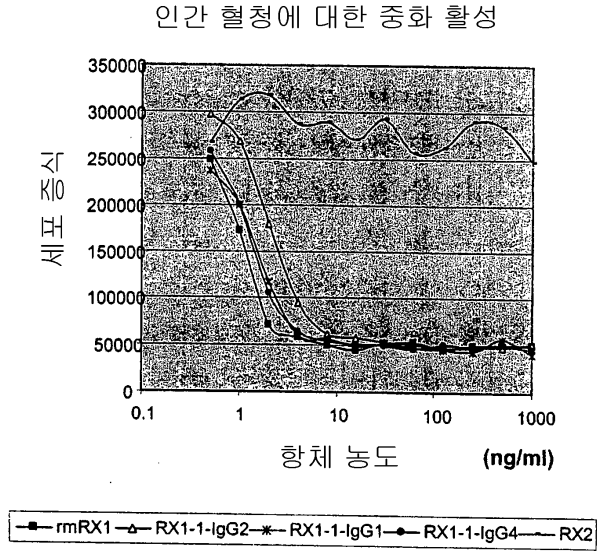
상이한 IgG 서브클래스 불변 부위를 갖는 heRX1의 중화 활성의 측정치



재조합 인간 MCSF 대한 것

도면26

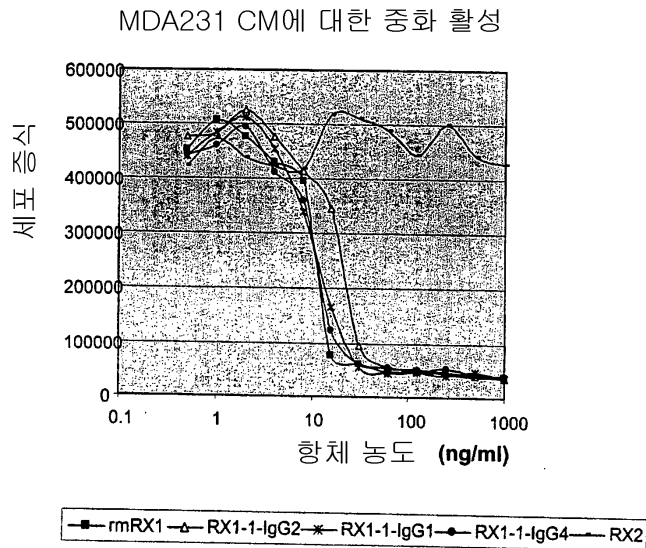
MCSF의 다른 형태에 대하여 상이한 IgG 서브클래스를 갖는 heRX1-1의 활성



혈청 및 재조합 Cyno MCSF 내 Cyno MCSF에 대하여 관찰된 유사한 결과

도면27

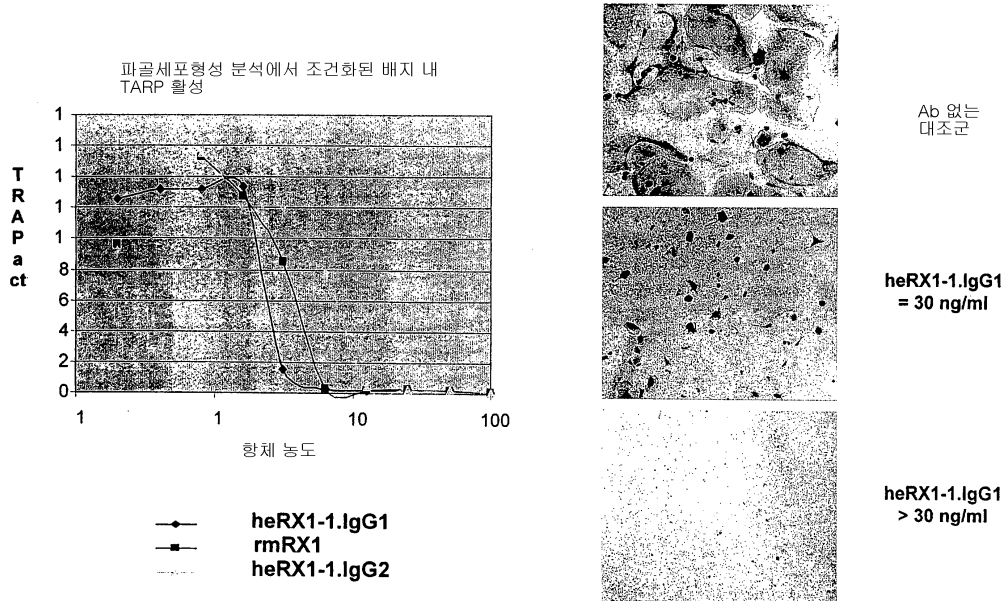
MCSF의 다른 형태에 대한 상이한 IgG 서브클래스를 갖는 heRX1-1의 활성



혈청 및 재조합 Cyno MCSF 내 Cyno MCSF에 대하여 관찰된 유사한 결과

도면28

상이한 IgG 서브클래스와 함께 heRX1-1의 파골세포 형성 분석



도면29A

아미노산

MGWSCILFLVATATGVHS

DVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVTDYSITSDYA WNWIRQFPQKLEWGMGYISYSGSTSYPNPSLKS RITISRDTSKNQFSL QLSNVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQTTVTVSS

ASTKGPVVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTY ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK•

뉴클레오티드

ATGGGATGGAGITGCATTATACTTTTCCTCGTTGCCACCGCCACTGGAGITCACTCTGACGTACAACCTCAAGAATC TGGCCCAAGTCTCGTCAAACTTCTCAAACCTCTCACTACCTGCACTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTA CGCTTGGAACTGGATCCGACAATTTCTGGTAAAAAAGTCAATGGATGGGTTATATTTCTTACTCTGGCTCCACT CCTACAATCCTTCTGAAATCACGCATCAAAATTTCCGCGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCCAACCTCAATT CTGTTACCGCCGCGGATACTGCCACTACTGTGCCTCTTTGACTACGCTCACGCCATGGATTATTGGGGACAG GGTACTACCGTTACCGTAAGCTCAGCCAGCACAAAGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTC AGGCGCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG TGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCAAGGCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAGAGTTGAGCCAAAATCTTGTGACAAAACCTACACATGTCCACCGTGCACAGCCTGAACTCCTGGGG GGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT CAAGCAAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCAGGTCACCTCAGGTCACATGCGT CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAGGGCAGCCCGGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCCTGGAC AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCCCGGGTAAATGA

도면29B

아미노산

MGWSCILFLVATATGVHS

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVSDYSITSDYAWNWIQFPFGKLEWMGYISYSGSTSYNPSLKSRLTISRDTSKNQFSL
QLNSVTAADTAVYYCASFDYAHAMDYWGQGTFTVSS

ASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTY
ICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNH
YTQKLSLSLSPGK•

뉴클레오티드

ATGGGTTGGTCTTGCAATCTCTTTCTCGTCGCTACCGCAACTGGTGTACTCCCAAGTCAACTCAAGAATCA
GGCCCCGACTCGTTAAACCCCTCAAACCTCTCTCTTACTTGCACTGTATCCGATTACTCTATTACTTCAGACTAC
GCTTGGAACTGGATCAGACAATTTCCCGAAAAGGACTCGAATGGATGGGATATATCTCTTACTCTGGCTCAACCT
CTTACAACCCCTCTCTCAAATCTCGAATAACAATCTCACGCGATACTTCTAAAAATCAATTTCTCACTTCAACTAAC
TCCGTTACTGCGCCGACACTGCCGTTTACTACTGTGCTTCTTCGATTACGCCACGCTATGGATTATTGGGGACA
AGGAACTACCGTCACTGTCAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGC
ACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAT
CAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAGAGTTGAGCCAAAATCTTGTGACAAAATCACACATGTCCACCGTGCAGCAGCACTGAACTCCTGGG
GGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCG
TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATG
CCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTACAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGG
ACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTC
CAAAGCCAAAGGGCAGCCCGGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA
GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG
GAGAACAATAACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGTAAATGA

도면30

HeRX1-낮은 위험 종채 감마-4
아미노산

MGWSCILFEVATAFGVHSDVQLQESGPGLVKPSQLSLTCTVTDYSITSDYAWNWRQFPKGKLEWMGYISYSGSTSYN
PSLKSRLTISRDTSKNQFSLQLNSVTAADTATYYCASFDYAHAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFLAPCSRSTSESTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY
GPPCPSCPAPFELFGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTSKAKGQPREPQVYLLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEV
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSMHEALHNHYTQKLSLSLGLK

뉴클레오타이드

eDNA

ATGGGATGGAGTTGCATTATACTTTTCTCGTTGCCACCGCCACTGGAGTTCACCTCTGACGTACAACCTCAAGAATC
TGGCCAGGTCCTCGTCAAACCTTCTCAAACCTCTCACTCACCTGCACCTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTA
CGCTTGGAACTGGATCCGACAATTTCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCT
CCTACAATCCTTCTCTGAAATCAGGCATCACAAATTTCCCGCGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCCAACCTAAT
CTGTTACCGCCGCGGATACTGCCACCTACTACTGTGCCTCTTTTACTACGCTCACGCCATGGATTATTGGGGACAG
GGTACTACCGTTACCGTAAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCATCCGCTCTCCCTTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA
CCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAACTC
AGGCGCCCTGACCAAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAGCTACACCTGCAACGTAGTACAAAGCCAGCAACCAAGCTAAGT
GGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCATCATGCCAGCACCTGAGTCTCTGGGGGACCACTCA
GTCTTCTGTTCCTCCCAAACCAAGGACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGGA
CGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAGTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA
GCCGCGGAGGAGGACAGTTCAACAGCAGCTACCGTGTGGTCAAGGCTCACCCTGTCACCCAGGACTGGCTGAA
GGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCCAACAAAGGCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCACTCCCAAAGCCAAA
GGCAGCCCGGAGGACAGGTTACACCTGCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCCAGGTGAGCCTG
ACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAC
TACAAGACCGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAGGCTAACCCGTTGACAAGAGCA
GGTGGCAGGAGGGAATGTCTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCT
CTCCCTGTCTGGGTAATGA

게놈

ATGGGATGGAGTTGCATTATACTTTTCTCGTTGCCACCGCCACTGGAGTTCACCTCTGACGTACAACCTCAAGAATC
TGGCCAGGTCCTCGTCAAACCTTCTCAAACCTCTCACTCACCTGCACCTGTTACTGACTACTCTATTACATCCGACTA
CGCTTGGAACTGGATCCGACAATTTCTGGTAAAAAACTCGAATGGATGGGTTATATTTCTTACTCTGGCTCCACCT
CCTACAATCCTTCTCTGAAATCAGGCATCACAAATTTCCCGCGATACCTCTAAAAATCAATTTTCACTCCAACCTAAT
CTGTTACCGCCGCGGATACTGCCACCTACTACTGTGCCTCTTTTACTACGCTCACGCCATGGATTATTGGGGACAG
GGTACTACCGTTACCGTAAGCTCAGCCAGCACAAAGGGCCATCCGCTCTCCCTTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCA
CCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAACTC
AGGCGCCCTGACCAAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG
TGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAAGCTACACCTGCAACGTAGTACAAAGCCAGCAACCAAGGT
GGACAAGAGAGTTGGTGAAGGCGCACAGGAGGGAGGGTGTCTGCTGGAAGCCAGGCTCAGCCCTCTGTGCT
GGACGACCCCGGCTGTGACGCCCCAGCCAGGGCAGCAAGGCATGCCCATCTGTCTCTCACCAGGAGCCCTCT
GACCAACCCACTCATGTCTCAGGGAGAGGGTCTCTGGATTTTCCACCAGGCTCCGGGACCCAGGCTGGATGC
CCCTACCCAGGCCCTGGCATAAGGGGACGGTGTCTGCTCAGACCTGCCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCT
GCCCCGACTAAGCCACCCCAAAGGCCAAACTTCCACTCCCTCAGCTCAGACCTTCTCTCTCCAGATCTG
AGTAACTCCCAATCTTCTCTCTGACAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCATATGCCAGGTAAGCCAAACCCAGG
CCTCGCCCTCAGCTCAAGGGCGGACAGGTGCCCTAGAGTACCTGATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGTGTG
ACGCATCCACCTCCATCTTCTCTCAGCACCTGAGTCTGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTCCCAAACCC
AAGGACACTCTATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCAAGTGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGG
TCCAGTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACA
GCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCTCACCCTCTGCCACAGGACTGGCTGAAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGT
CTCCAACAAAGGCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCACTTCCAAGCCAAAGGTGGGACCCAGGGTGGGAGG
GCCACATGGACAGAGGTGAGCTCGGCCACCTCTGCTGGGAGTGAACCGTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAGG
GCAGCCCGGAGAGCCAGGTTACACCTGCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCCAGGTGACGCTGAC
CTGCTGGTCAAAGGCTTACCCAGGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTA
CAAGACCAAGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTCAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGG
TGGCAGGAGGGGAATGTCTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCT
CCCTGTCTCTGGGTAATGA

서열목록

- <110> LIU et al.
- <120> M-CSF-SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODY AND USES THEREOF
- <130> 21601.003
- <140> To be assigned
- <141> 2005-01-06
- <150> US 60/535,181

<151> 2004-01-07

<150> US 60/576,417
 <151> 2004-06-02

<160> 137

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 1401
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 1
 atgggttggc cctgtatcat cctattcctg gtggccactg ccacaggtgt gcactccgac 60
 gtgcagcttc aggagtcagg acctggcctc gtgaaacctt ctgagagtct gtcctcacc 120
 tgtactgtca ctgactactc catcaccagt gattacgcct ggaactggat acggcaattc 180
 ccaggggaata aacttgagtg gatggggctac ataagctaca gtggtagcac ttcctacaat 240
 ccatctctca aaagtcggat ctccatcact cgagacacat ccaagaacca gttcttctg 300
 cagctgaact ctgtgactac tgaggacaca gccacatatt actgtgcatc cttcgactat 360
 gccacgcca tggattactg gggccaaggg acttcggtca ctgtctcttc cgccaaaaca 420
 acagcccat cggctctatcc actggccctt gtgtgtggag atacaactgg ctccctcggtg 480
 actctaggat gcttggtcaa gggttatttc cctgagccag tgaccttgac ctggaactct 540
 ggatccctgt ccagtgggtg gcacacctc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacacc 600
 ctgagcagct cagtgactgt aacctgagc acctggccca gccagtccat cacctgcaat 660
 gtggcccacc cggcaagcag caccaagtg gacaagaaaa ttgagcccag agggcccaca 720
 atcaagcctt gtcctccatg caaatgccc gacactaacc tcttgggtgg accatccgtc 780

ttcatcttcc ctccaaagat caaggatgta ctcatgatct ccctgagccc catagtcaca 840
 tgtgtggtgg tggatgtgag cgaggatgac ccagatgtcc agatcagctg gtttgtgaac 900
 aacgtggaag tacacacagc tcagacacaa acccatagag aggattacaa cagtactctc 960
 cgggtggtca gtgcctccc catccagcac caggactgga tgagtggcaa ggagttcaaa 1020
 tgcaaggta acaacaaaga cctcccagcg cccatcgaga gaacctctc aaaacccaaa 1080
 gggtcagtaa gagctccaca ggtatatgtc ttgcctccac cagaagaaga gatgactaag 1140
 aaacaggta ctctgacctg catggtcaca gacttcatgc ctgaagacat ttacgtggag 1200
 tggaccaaca acgggaaaac agagctaac tacaagaaca ctgaaccagt cctggactct 1260
 gatggttctt acttcatgta cagcaagctg agagtggaaa agaagaactg ggtggaaaga 1320
 aatagctact cctgttcagt ggtccacgag ggtctgcaca atcaccacac gactaagagc 1380
 ttctcccga ctccggtaa a 1401

<210> 2
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

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

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro
 115 120 125

Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn
 145 150 155 160

Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr
 180 185 190

Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
 245 250 255

Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
 260 265 270

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
 275 280 285

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

290

295

300

Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu
340 345 350

Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
355 360 365

Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
370 375 380

Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys
405 410 415

Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
420 425 430

Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
435 440 445

<210> 3
<211> 702
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 3
atggtatcca cacctcagtt ccttgatatt ttgcttttct ggattccagc ctccagaggt 60

gacatcttgc tgactcagtc tccagccatc ctgtctgtga gtccaggaga aagagtcagt 120

ttctcctgca gggccagtca gagcattggc acaagcatac actggtatca gcaaagaaca 180

aatggttctc caaggcttct cataaagtat gcttctgagt ctatctctgg gatcccttcc 240
 aggttttagtg gcagtggatc aggacagat tttactctta gcatcaacag tgtggagtct 300
 gaagatattg cagattatta ctgtcaacaa attaatagct ggccaaccac gttcggcggg 360
 gggacaaaagt tggaaataaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420
 tccagtgagc agttaacatc tggagggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 480
 cccaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540
 aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcag 600
 ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 660
 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt 702

<210> 4
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4
 Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 5
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5
 Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
85 90 95

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

<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
65 70 75 80

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

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 256
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7
Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1 5 10 15
Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
20 25 30
Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
35 40 45
Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
50 55 60
Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65 70 75 80
Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
85 90 95
Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
100 105 110
Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
115 120 125
Glu His Asp Lys Ala Cys Val Arg Thr Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
130 135 140
Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145 150 155 160
Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
165 170 175
Glu Cys Ser Ser Gln Gly His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser
180 185 190
Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile
195 200 205
Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg
210 215 220

Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro
 225 230 235 240

Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
 245 250 255

<210> 8
 <211> 554
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8
 Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
 20 25 30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
 35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
 50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
 65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
 85 90 95

Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
 100 105 110

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
 115 120 125

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

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu

Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro
 385 390 395 400

Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro
 405 410 415

Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly
 420 425 430

Ser Val Leu Pro Leu Gly Glu Leu Glu Gly Arg Arg Ser Thr Arg Asp
 435 440 445

Arg Arg Ser Pro Ala Glu Pro Glu Gly Gly Pro Ala Ser Glu Gly Ala
 450 455 460

Ala Arg Pro Leu Pro Arg Phe Asn Ser Val Pro Leu Thr Asp Thr Gly
 465 470 475 480

His Glu Arg Gln Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser
 485 490 495

Val Phe His Leu Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val
 500 505 510

Gly Gly Leu Leu Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro
 515 520 525

Gln Arg Ala Asp Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr
 530 535 540

Gln Asp Asp Arg Gln Val Glu Leu Pro Val
 545 550

<210> 9

<211> 438

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
 1 5 10 15

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

20

25

30

Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
35 40 45

Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln
50 55 60

Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
85 90 95

Met Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn Ala Ile Ala Ile Val Gln Leu
100 105 110

Gln Glu Leu Ser Leu Arg Leu Lys Ser Cys Phe Thr Lys Asp Tyr Glu
115 120 125

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

Leu Leu Glu Lys Val Lys Asn Val Phe Asn Glu Thr Lys Asn Leu Leu
145 150 155 160

Asp Lys Asp Trp Asn Ile Phe Ser Lys Asn Cys Asn Asn Ser Phe Ala
165 170 175

Glu Cys Ser Ser Gln Asp Val Val Thr Lys Pro Asp Cys Asn Cys Leu
180 185 190

Tyr Pro Lys Ala Ile Pro Ser Ser Asp Pro Ala Ser Val Ser Pro His
195 200 205

Gln Pro Leu Ala Pro Ser Met Ala Pro Val Ala Gly Leu Thr Trp Glu
210 215 220

Asp Ser Glu Gly Thr Glu Gly Ser Ser Leu Leu Pro Gly Glu Gln Pro
225 230 235 240

Leu His Thr Val Asp Pro Gly Ser Ala Lys Gln Arg Pro Pro Arg Ser
245 250 255

Thr Cys Gln Ser Phe Glu Pro Pro Glu Thr Pro Val Val Lys Asp Ser
 260 265 270

Thr Ile Gly Gly Ser Pro Gln Pro Arg Pro Ser Val Gly Ala Phe Asn
 275 280 285

Pro Gly Met Glu Asp Ile Leu Asp Ser Ala Met Gly Thr Asn Trp Val
 290 295 300

Pro Glu Glu Ala Ser Gly Glu Ala Ser Glu Ile Pro Val Pro Gln Gly
 305 310 315 320

Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
 325 330 335

Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala
 340 345 350

Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly His Glu Arg Gln
 355 360 365

Ser Glu Gly Ser Ser Ser Pro Gln Leu Gln Glu Ser Val Phe His Leu
 370 375 380

Leu Val Pro Ser Val Ile Leu Val Leu Leu Ala Val Gly Gly Leu Leu
 385 390 395 400

Phe Tyr Arg Trp Arg Arg Arg Ser His Gln Glu Pro Gln Arg Ala Asp
 405 410 415

Ser Pro Leu Glu Gln Pro Glu Gly Ser Pro Leu Thr Gln Asp Asp Arg
 420 425 430

Gln Val Glu Leu Pro Val
 435

<210> 10
 <211> 441
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 10
 Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Thr

Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
 245 250 255

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

Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu
 275 280 285

Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His
 290 295 300

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala
 305 310 315 320

Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg
 325 330 335

Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met
 340 345 350

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

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

Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val
 385 390 395 400

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

Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu
 420 425 430

Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 435 440

- <210> 11
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

<400> 11
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
 20 25 30
 Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110
 Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125
 Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140
 Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160
 Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190
 Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 12
 <211> 449
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 12
 Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Tyr Met Tyr Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
 180 185 190

Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
 195 200 205

Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys
 210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp
 260 265 270

Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr
 275 280 285

Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val
 290 295 300

Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu
 305 310 315 320

Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val
 340 345 350

Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr
 355 360 365

Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr
 370 375 380

Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys
 405 410 415

Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu
 420 425 430

Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
 435 440 445

Lys

<210> 13
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 13
 Ala Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 14
 <211> 522
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 14
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Glu Thr Trp Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
 115 120 125

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

130

135

140

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser
145 150 155 160

Gly Ser Leu Ser Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Thr Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp
180 185 190

Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
195 200 205

Thr Val Asp Lys Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu
225 230 235 240

Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val
245 250 255

Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val
275 280 285

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met
305 310 315 320

Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser
325 330 335

Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser
 370 375 380

Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr
 385 390 395 400

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

Asn Met Lys Thr Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn
 420 425 430

Val Arg His Glu Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser
 435 440 445

Arg Ser Pro Gly Leu Asp Leu Asp Asp Ile Cys Ala Glu Ala Lys Asp
 450 455 460

Gly Glu Leu Asp Gly Leu Trp Thr Thr Ile Thr Ile Phe Ile Ser Leu
 465 470 475 480

Phe Leu Leu Ser Val Cys Tyr Ser Ala Ser Val Thr Leu Phe Lys Val
 485 490 495

Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val Val Glu Leu Lys Gln Lys Ile Ser Pro
 500 505 510

Asp Tyr Arg Asn Met Ile Gly Gln Gly Ala
 515 520

<210> 15
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 15
 Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

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

35

40

45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Trp Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly
 115 120 125

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile
 130 135 140

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu
 145 150 155 160

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr
 180 185 190

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210

<210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Gly Tyr Phe Met His
 1 5

<210> 17
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Asp Tyr Tyr Met Tyr
 1 5

<210> 18
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Ser Asp Tyr Ala Trp Asn
 1 5

<210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Tyr Ile Ser Cys Tyr Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 20
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 21
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

<210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 Glu Gly Gly Asn Tyr Pro Ala Tyr
 1 5

<210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Pro Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr
 1 5

<210> 25
 <211> 8

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Leu Glu Thr Trp Leu Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 26
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Asp Tyr Gly Trp Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Thr
 1 5 10

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 29
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser Ile His
 1 5 10

<210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 Trp Thr Ser Thr Arg His Ala
 1 5

<210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser
 1 5

<210> 32
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5

<210> 33
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Tyr Thr Ser Glu Ser Ile Ser
 1 5

<210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35
 Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Trp Thr
 1 5

<210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36
 Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr Thr
 1 5

<210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37
 Gln Gln Ser Asn Ser Trp Pro Thr Thr
 1 5

<210> 38
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 Gln Gln Tyr Ser Ser Trp Pro Thr Thr
 1 5

<210> 39
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (23)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (27)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (29)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (31)..(36)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (51)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (56)..(57)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (59)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE

<222> (61)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (84)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (86)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (101)..(116)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (119)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (125)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 39
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Xaa Val Ser Gly Xaa Ser Xaa Ser Xaa Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Xaa Tyr Tyr Arg Ala Xaa Xaa Gly Xaa Thr Xaa Tyr Asn Pro
 50 55 60

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 65 70 75 80

Phe Ser Leu Xaa Leu Xaa Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Xaa Val Thr Val
 115 120 125

Ser Ser
 130

<210> 40
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 gacgtacaac ttcaagaatc tggcccaggt ctcgtaaac ctctcaaac tctctcactc 60
 acctgcactg ttactgacta ctctattaca tccgactacg cttggaactg gatccgacaa 120
 tttcttgta aaaaactcga atggatgggt tatatttctt actctggctc cacctctac 180
 aatccttctc tgaatcacg catcacaatt tcccgcgata cctctaaaaa tcaattttca 240
 ctccaactca attctgttac cggcggcat actgccacct actactgtgc ctcttttgac 300
 tacgctcag ccatggatta ttggggacag ggtactaccg ttaccgtaag ctca 354

<210> 41
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

- <210> 42
- <211> 354
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

<400> 42
 caagttcaac ttcaagaatc agggccccgga ctcgttaaac cctctcaaac tctctctctt 60
 acttgactg tatccgatta ctctattact tcagactacg cttggaactg gatcagacaa 120
 tttcccggaa aaggactcga atggatggga tataatctctt actctggctc aacctcttac 180
 aaccctctc tcaaactcg aataacaatc tcacgcgata cttctaaaaa tcaattctca 240
 cttaactta actccgttac tgccgccgac actgccgttt actactgtgc ttccttcgat 300
 tacgcccacg ctatggatta ttggggacaa ggaactaccg tcaactgtcag ctca 354

<210> 43

<211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 44
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 44
 gaaatagttc ttactcaatc ccccggtaca ctctcagttt ccccaggcga acgcgtcact 60

ttttcttgca gagcatcaca atcaatcggc acttcaattc attggtatca acaaaaaaca 120

ggacaggccc cagcattct tattaatat gcatcagaac gagccacagg catcccagac 180

agattttcag gttcaggatc aggaccgat ttcacactta caatatccag agtcgaatca 240

gaagattttg cagattacta ttgtcaacaa ataacagct ggcccactac attcggacaa 300

ggcacaaaac tcgaaattaa acgtacg 327

<210> 45
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Arg Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 46
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 gaaatagttc ttactcaatc ccccggtaca ctctcagttt ccccaggcga acgcgtcact 60

ttttcttgca gagcatcaca atcaatcggc acttcaattc attggtatca acaaaaaaca 120

ggacaggccc cagcacttct tattaaatat gcatacagaac gagccacagg catcccagac 180
 agattttcag gttcaggatc aggcaccgat ttcacactta caatatccag agtcgaatca 240
 gaagattttg cagattacta ttgtcaacaa ataaacagct ggcccactac attcggacaa 300
 ggcacaaaac tcgaaattaa acgtacg 327

<210> 47
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 48
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48

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

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 49
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (98)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 49
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

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

50

55

60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Pro Xaa Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
100 105 110

<210> 50
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

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

Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ala Lys Leu Leu Ile Lys
35 40 45

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

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Lys His Pro Leu Thr
85 90 95

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

<210> 51
<211> 109
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Low Risk Light Chain vs. VK6 Subgroup 2-1-(1) A14:

<400> 51

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

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Asp Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 52

<211> 327

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 52

gacatagttc tcacacaatc accagcattc ctctcagtta caccggcgca aaaagtaacc 60

tttacctgtc aggcttctca atctatcggc acttctattc actggtatca acaaaaaacc 120

gatcaagctc ctaaactcct cataaaatac gcatccgaat ccatctccgg tatccctcc 180

agattttcag gctccggctc cggcacagat ttcacctta ccattagctc agttgaagcc 240

gaagacgcag ctgattacta ctgcaacaa ataaactcat ggccactac tttcggcggc 300

ggcactaaac tcgaaataaa acgtacg 327

<210> 53
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 53
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Phe Thr Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Asp Gln Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ala Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 54
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 54
 Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly

<210> 55
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro
 85 90 95

<210> 56
 <211> 101
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

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

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

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95

Arg Ile Glu Phe Pro
 100

<210> 57

<211> 96

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

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

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

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

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

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

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Ala Ala Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro
 85 90 95

<210> 60
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 60
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

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

<210> 61
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 61
 Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser
 50

<210> 62
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (31)..(33)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (36)..(37)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (39)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (55)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 62
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Xaa Ala Ser
 50 55

<210> 63
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (33)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (36)..(37)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (56)..(57)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 63
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30

Xaa Asp Gly Xaa Xaa Tyr Leu Asn Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Xaa Xaa Ser

50

55

<210> 64
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 64
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

Ile Tyr Gly Ala Ser
 50

<210> 65
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 65
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser
 50 55

<210> 66
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 66
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

Tyr Ala Ala Ser
 50

<210> 67
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 67
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30

Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser
 50 55

<210> 68
 <211> 53
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 68
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

20

25

30

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

Ile Tyr Gly Ala Ser
 50

<210> 69
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 69
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser
 50 55

<210> 70
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 70
 Glu Thr Thr Leu Thr Gln Ser Pro Ala Phe Met Ser Ala Thr Pro Gly
 1 5 10 15

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

Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Ala Ile Phe Ile Ile
 35 40 45

Gln Glu Ala Thr

50

<210> 71
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val Thr Pro Lys
 1 5 10 15

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

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser
 50

<210> 72
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 72
 Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala
 20 25 30

Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr Thr Phe Gly Gly
 35 40 45

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
 50 55

<210> 73
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (1)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (3)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (39)..(42)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (45)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 73
 Xaa Leu Xaa Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Glu Xaa Thr Phe Gly
 35 40 45

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 50 55

<210> 74
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (3)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (40)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (42)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (45)

<223> Xaa= any amino acid

<400> 74

Asn Arg Xaa Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Xaa Gln Xaa Pro Arg Xaa Thr Phe Gly
 35 40 45

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 50 55

<210> 75

<211> 58

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> (45)

<223> Xaa= any amino acid

<400> 75

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

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Pro Xaa Thr Phe Gly
 35 40 45

Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 50 55

<210> 76
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (44)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 76
 Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Xaa Thr Phe Gly Gln
 35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 50 55

<210> 77
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 77
 Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly
 35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 50 55

<210> 78
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 78
 Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Met Gln Arg Ile Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly
 35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 50 55

<210> 79
 <211> 57
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 79
 Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30

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

35

40

45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 80
<211> 57
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80
Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala
20 25 30

Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro Leu Thr Phe Gly Gly
35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 81
<211> 57
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81
Thr Leu Val Pro Gly Ile Pro Pro Arg Phe Ser Gly Ser Gly Tyr Gly
1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Ile Glu Ser Glu Asp Ala Ala
20 25 30

Tyr Tyr Phe Cys Leu Gln His Asp Asn Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly
35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
50 55

<210> 82

<211> 57
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 82
 Gln Ser Phe Ser Gln Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala
 20 25 30

Thr Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly
 35 40 45

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 50 55

<210> 83
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 83
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80

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

Ala Ser Phe Asp Tyr
 100

<210> 84
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 84
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 85
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 85
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys Arg Tyr Ser Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala His Arg
 100

<210> 86
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 86
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 87
 <211> 98
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

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

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

Asn Trp Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg

<210> 88

<211> 98

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
 50 55 60

Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg

- <210> 91
- <211> 58
- <212> PRT
- <213> Mus musculus

<400> 91
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

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

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr
 50 55

- <210> 92
- <211> 59
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (1)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (16)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (30)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (33)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (35)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (50)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (52)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (55)..(56)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (58)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 92
 Xaa Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Xaa
 1 5 10 15

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

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

Gly Xaa Ile Xaa Pro Tyr Xaa Xaa Gly Xaa Thr
 50 55

<210> 93
 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (23)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (27)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (29)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE

<222> (32)..(37)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (52)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (58)..(59)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (61)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 93
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Xaa Val Ser Gly Xaa Ser Xaa Ser Ser Xaa
 20 25 30
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Ile Gly Xaa Ile Tyr Tyr Arg Ala Xaa Xaa Gly Xaa Thr
 50 55 60

<210> 94
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (31)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (33)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (35)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (49)..(50)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (52)..(53)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (55)..(56)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (58)..(59)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 94
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Tyr
 20 25 30

Xaa Met Xaa Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Thr
 50 55 60

<210> 95
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 95
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr
 50 55

<210> 96
 <211> 59
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 96
 Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Thr Leu Val Lys Pro Thr Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30

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

Trp Leu Ala Leu Ile Tyr Trp Asn Asp Asp Lys
 50 55

<210> 97
 <211> 58

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 97
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys
 50 55

<210> 98
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 98
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gly
 1 5 10 15

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

Asn Trp Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr
 50 55

<210> 99
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 99
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
 50 55

<210> 100
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 100
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

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

Ser Ala Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu
 35 40 45

Trp Leu Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn
 50 55 60

<210> 101
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 101
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Asn Pro
 50 55

<210> 102
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 102
 Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr
 1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp
 20 25 30

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp
 35 40 45

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 50 55 60

<210> 103
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (14)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (16)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (31)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (41)..(53)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (55)..(56)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (59)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 103
 Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Xaa Asp Xaa
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Xaa Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa Phe Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr
 50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70

<210> 104
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (1)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (24)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (26)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (41)..(56)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (59)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (65)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 104
 Xaa Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr
 1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Xaa Leu Xaa Ser Val Thr Ala Ala Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr
 50 55 60

Xaa Val Thr Val Ser Ser
 65 70

<210> 105
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (40)..(52)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (55)..(56)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (59)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 105
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 1 5 10 15

Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Tyr Xaa Xaa Phe Asp Xaa Trp Gly Gln Gly Thr
 50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70

<210> 106
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (41)..(55)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 106
 Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
 1 5 10 15

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70

<210> 107
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (42)..(55)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 107
 Arg Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Thr Lys Asp Thr
 1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp
 20 25 30

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala His Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70

<210> 108
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (41)..(55)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 108
 Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 1 5 10 15

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70

<210> 109
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (41)..(55)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 109
 Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Lys
 1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70

<210> 110
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (41)..(55)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 110
 Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys
 1 5 10 15

Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp
 20 25 30

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70

<210> 111
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (41)..(55)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 111
 Asp Tyr Ala Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr
 1 5 10 15

Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70

<210> 112
 <211> 70
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (41)..(55)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 112
 Thr Tyr Ala Gln Gly Phe Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr
 1 5 10 15

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 50 55 60

Leu Val Thr Val Ser Ser
 65 70

- <210> 113
- <211> 1404
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

<400> 113
 atgggatgga gttgcattat acttttcctc gttgccaccg ccaactggagt tcactctgac 60

 gtacaacttc aagaatctgg ccaggtctc gtcaaacctt ctcaaactct ctcaactcacc 120

 tgcaactgta ctgactactc tattacatcc gactacgctt ggaactggat cgcacaattt 180

 cctggtaaaa aactcgaatg gatgggttat atttcttact ctggctccac ctctacaat 240

 ccttctctga aatcacgcat cacaatttcc cgcgatacct ctaaaaatca attttcactc 300

 caactcaatt ctgttaccgc cgccgatact gccacctact actgtgcctc ttttgactac 360

 gctcacgcca tggattattg gggacagggt actaccgtta ccgtaagctc agccagcaca 420

 aagggcccat cggtcttccc cctggcaccg tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480

 gccctgggct gectggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540

 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggetgtcc tacagtctc aggactctac 600

 tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660

 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt 720

 gacaaaactc acacatgtcc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780

ttctcttcc ccccaaac caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgagtcaca 840
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
 cgtgtggtca gcgtctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1080
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 1140
 aaccagggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1260
 gacggctcct tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 1320
 aacgtttctt catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 ctctccctgt ccccggtaa atga 1404

<210> 114
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 114
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile
 35 40 45
 Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Lys
 50 55 60

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
65 70 75 80

Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
85 90 95

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

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

290

295

300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

- <210> 115
- <211> 1404
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens

<400> 115
atgggttggt ctgcatcat tctctttctc gtcgctaccg caactggtgt acactcccaa

60

gttcaacttc aagaatcagg ccccgactc gttaaaccct ctcaaactct ctctcttact 120

tgcactgtat ccgattactc tattacttca gactacgctt ggaactggat cagacaattt 180

cccggaaaag gactcgaatg gatgggatat atctcttact ctggctcaac ctcttacaac 240

ccctctctca aatctcgaat aacaatctca cgcgatactt ctaaaaatca attctcactt 300

caacttaact ccgttactgc cgccgacact gccgtttact actgtgcttc cttcgattac 360

gcccacgcta tggattattg gggacaagga actaccgtca ctgtcagctc agccagcaca 420

aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480

gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgtcc tacagtctc aggactctac 600

tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt 720

gacaaaactc acacatgtcc accgtgcccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780

ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840

tgctgtgtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960

cggtgtgtca gcgtctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020

tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caagccaaa 1080

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggagga gatgaccaag 1140

aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1260

gacggctcct tcttcctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320

aacgttttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380

ctctccctgt ccccgggtaa atga 1404

<210> 116
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 116
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Asp Tyr Ser Ile
 35 40 45

Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Gly
 50 55 60

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
 85 90 95

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

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

ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac 600

tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 660

aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gatttggatga gaggccagca 720

cagggaggga ggggtgtctgc tggaaagccag gctcagccct cctgcctgga cgcaccccgg 780

ctgtgcagcc ccagcccagg gcagcaaggc atgcccctc tgtctctca cccggaggcc 840

tctgaccacc ccaactcatgc tcagggagag ggtcttctgg atttttccac caggctccgg 900

gcagccacag gctggatgcc cctaccccag gccctgcgca tacaggggca ggtgctgcgc 960

tcagacctgc caagagccat atccgggagg accctgcccc tgacctaacg ccaccccaaa 1020

ggccaaactc tcaactccct cagctcagac accttctctc ctcccagatc tgagtaactc 1080

ccaatcttct ctctgcagag tccaaatag gtcccccatg cccatcatgc ccagtaage 1140

caaccaggc ctgcacctcc agctcaaggc gggacagggtg ccctagagta gcctgcatcc 1200

agggacaggc cccagccggg tgctgacgca tccacctcca tctcttctc agcacctgag 1260

ttcttggggg gaccatcagt ctctctgttc cccccaaaac ccaaggacac tctcatgatc 1320

tcccggacc ctgaggtcac gtgcgtggtg gtggacgtga gccaggaaga ccccagggtc 1380

cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 1440

gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg 1500

ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag 1560

aaaaccatct ccaaagccaa aggtgggacc cacggggtgc gaggccaca tggacagagg 1620

tcagctcgcc ccacctctg ccttgggagt gaccgtgtg ccaacctctg tccctacagg 1680

gcagccccga gagccacagg tgtacacct gccccatcc caggaggaga tgaccaagaa 1740

ccaggtcagc ctgacctgcc tggfcaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg 1800
 ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga 1860
 cggtccttc ttcctctaca gcaggctaac cgtggacaag agcaggtggc aggaggggaa 1920
 tgttttca tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacac agaagagcct 1980
 ctcctgtct ctgggtaaat ga 2002

<210> 118
 <211> 1395
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 118
 atgggatgga gtgacattat acttttctc gttgccaccg ccaactggagt tcaactctgac 60
 gtacaacttc aagaatctgg cccaggtctc gtcaaacctt ctcaactct ctaactcacc 120
 tgcaactgta ctgactactc tattacatcc gactacgctt ggaactggat cgcacaattt 180
 cctggtaaaa aactcgaatg gatgggttat atttcttact ctggctccac ctctacaat 240
 cttctctga aatcacgcat cacaatttcc cgcgatacct ctaaaaatca attttcactc 300
 caactcaatt ctgttaccgc cgccgatact gccacactact actgtgcctc ttttgactac 360
 gctcagcca tggattattg gggacagggt actaccgta ccgtaagctc agccagcaca 420
 aagggcccat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 480
 gccctgggct gctgtgcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac 600
 tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 660

aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gaggtagtc caaatatggt 720

cccccatgcc catcatgccc agcacctgag ttcttggggg gaccatcagt cttctgttc 780

cccccaaac ccaaggacac tctcatgac tcccggacce ctgaggtcac gtgcgtggtg 840

gtggactga gccaggaaga ccccagggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 900

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 960

agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020

tccaacaaag gcctcccgtc ctccatcgag aaaaccatct ccaagccaa agggcagccc 1080

cgagagccac aggtgtacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1140

agcctgacct gctgtgtaa aggttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1260

ttttctct acagcaggct aaccgtggac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtctc 1320

tcatgtccg tgatgatga ggctctgcac aacctaca cacagaagag cctctccctg 1380

tctctgggta aatga 1395

<210> 119
 <211> 464
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 119
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile
 35 40 45

Thr Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Lys Lys
 50 55 60

Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn
 65 70 75 80

Pro Ser Leu Lys Ser Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn
 85 90 95

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
 225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270

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

275

280

285

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
 340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 450 455 460

<210> 120

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 120

Arg Phe Arg Asp Asn Thr Pro Asn

1 5

<210> 121
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 121
 Arg Phe Arg Asp Asn Thr Ala Asn
 1 5

<210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 122
 Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu
 1 5

<210> 123
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 123
 Phe Tyr Glu Thr Pro Leu Gln
 1 5

<210> 124
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (1)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (3)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (5)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (7)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (9)..(17)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (19)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (21)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (23)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (25)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (39)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (41)..(45)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (47)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (60)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (62)..(63)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (65)..(67)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (69)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (71)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (73)..(78)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (80)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (82)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (84)..(85)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (87)..(89)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (91)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (93)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (110)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (113)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (115)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (117)..(118)

<223> Xaa= any amino acid

<400> 124

Xaa Val Xaa Leu Xaa Glu Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Leu Xaa Leu Xaa Cys Xaa Val Xaa Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Xaa Asn Xaa Xaa Leu
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Ile Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa
 65 70 75 80

Leu Xaa Leu Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ala Xaa Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Xaa Gly Thr
 100 105 110

Xaa Val Xaa Val Xaa Xaa
 115

<210> 125

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (3)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (5)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (7)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (10)..(11)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (13)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (15)..(17)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (19)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (21)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (23)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (41)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (43)..(44)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (66)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (69)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (71)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (73)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (75)..(76)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (78)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (80)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (82)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (84)..(85)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (87)..(89)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (91)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (110)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (113)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (115)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (117)..(118)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 125
 Asp Val Xaa Leu Xaa Glu Xaa Gly Pro Xaa Xaa Val Xaa Pro Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Leu Xaa Leu Xaa Cys Xaa Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Xaa Pro Xaa Xaa Lys Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Xaa Arg Ile Xaa Ile Xaa Arg Xaa Thr Xaa Xaa Asn Xaa Phe Xaa
 65 70 75 80

Leu Xaa Leu Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Xaa Gly Thr
 100 105 110

Xaa Val Xaa Val Xaa Xaa
 115

<210> 126
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (1)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (17)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (25)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (44)..(45)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (69)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (71)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (80)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (88)..(89)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE
 <222> (93)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (113)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 126
 Xaa Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Xaa Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Xaa Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Xaa Xaa Leu Glu Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Xaa Ile Xaa Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Xaa
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Xaa Xaa Asp Thr Ala Xaa Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Xaa Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 127
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (17)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (44)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (69)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (71)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (80)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (88)..(89)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (113)

<223> Xaa= any amino acid

<400> 127

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

Xaa Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Xaa Lys Leu Glu Trp

35

40

45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Ile Xaa Ile Xaa Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Xaa
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Xaa Xaa Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Phe Asp Tyr Ala His Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Xaa Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 128
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (1)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (3)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (5)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (7)..(12)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (14)..(18)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (20)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (22)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (24)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (26)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (37)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (39)..(43)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (45)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (54)..(57)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (59)..(61)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (63)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (65)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (67)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (69)..(70)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (72)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (74)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (76)..(77)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (79)..(81)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (83)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (100)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (103)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (105)..(109)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 128
 Xaa Ile Xaa Leu Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Val Xaa Phe Xaa Cys Xaa Ala Xaa Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Gly
 50 55 60

Xaa Gly Xaa Gly Xaa Xaa Phe Xaa Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105

<210> 129
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (1)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (3)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (5)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (7)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (9)..(10)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (12)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (14)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (16)..(18)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (20)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (22)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (24)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (39)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (41)..(42)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (54)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (57)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (60)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (63)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (65)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (67)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (69)..(70)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (72)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (74)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (76)..(77)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (79)..(81)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (83)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (100)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (103)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (105)..(109)

<223> Xaa= any amino acid

<400> 129

Xaa Ile Xaa Leu Xaa Gln Xaa Pro Xaa Xaa Leu Xaa Val Xaa Pro Xaa

1

5

10

15

Xaa Xaa Val Xaa Phe Xaa Cys Xaa Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Ile Ser Xaa Ile Pro Xaa Arg Phe Xaa Gly
 50 55 60

Xaa Gly Xaa Gly Xaa Xaa Phe Xaa Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105

<210> 130
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (1)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (3)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (9)..(10)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (20)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (39)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (41)..(43)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (54)..(56)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (60)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (74)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (76)..(77)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (83)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (100)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (109)

<223> Xaa= any amino acid

<400> 130

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

Glu Arg Val Xaa Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Xaa Xaa Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 131

<211> 109

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> UNSURE

<222> (1)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (3)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (9)..(10)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (20)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (39)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (41)..(42)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (54)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (60)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (74)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (76)..(77)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (83)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (100)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (109)

<223> Xaa= any amino acid

<400> 131

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

Glu Arg Val Xaa Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Ile Ser Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 132

<211> 109

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (1)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (3)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (9)..(10)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (20)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (39)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (41)..(43)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (60)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (74)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (76)..(77)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (83)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (100)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (109)

<223> Xaa= any amino acid

<400> 132

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

Glu Arg Val Xaa Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Xaa Thr Xaa Xaa Xaa Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

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

<210> 133
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (1)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (3)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (5)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (7)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (9)..(17)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (19)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (21)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (23)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (25)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (39)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (41)..(45)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (47)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (60)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (62)..(63)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (65)..(67)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (69)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (71)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (73)..(78)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (80)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (82)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (84)..(85)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (87)..(89)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (91)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (93)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (110)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (113)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (115)

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE

<222> (117)..(118)

<223> Xaa= any amino acid

<400> 133

Xaa Val Xaa Leu Xaa Glu Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Leu Xaa Leu Xaa Cys Xaa Val Xaa Asp Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Trp
 35 40 45

Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Ser Xaa Asn Xaa Xaa Leu
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Ile Xaa Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Xaa

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (20)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (22)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (24)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (26)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (37)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (39)..(43)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (45)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (54)..(57)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> UNSURE
 <222> (59)..(61)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (63)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (65)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (67)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (69)..(70)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (72)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (74)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (76)..(77)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE

<222> (79)..(81)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (83)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (100)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (103)
 <223> Xaa= any amino acid

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (105)..(109)
 <223> Xaa= any amino acid

<400> 134
 Xaa Ile Xaa Leu Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Xaa Xaa Val Xaa Phe Xaa Cys Xaa Ala Xaa Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Gly
 50 55 60

Xaa Gly Xaa Gly Xaa Xaa Phe Xaa Leu Xaa Ile Xaa Xaa Val Xaa Xaa
 65 70 75 80

Xaa Asp Xaa Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn Ser Trp Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 100 105

<210> 135
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 135
 gaaatagtcc ttaccaatc tcccgaacc ctctcagtat ctcccggcga acgagtaacc 60
 ttttcatgta gagcatccca atccatcggc acttcaattc actggatca gcagaaaaca 120
 ggtcaatccc cacggettct tataaaatat gcatcagaat caatttctgg catcccagac 180
 agattttcag gttcaggatc aggcacgat ttcacactta caatatccag agtcgaatca 240
 gaagattttg cagattacta ttgtcaacaa ataaacagct ggcccactac attcggacaa 300
 ggcacaaaac tcgaaattaa acgtacg 327

<210> 136
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 136
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Thr Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Ser
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Thr Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ser

