

---

	(19) 대한민국특허청(KR)	(11) 공개번호 10-2014-0048276
	(12) 공개특허공보(A)	(43) 공개일자 2014년04월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C07K 16/18</i> (2006.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01) <i>G01N 33/574</i> (2006.01)	(71) 출원인 온코메드 파마슈티칼스, 임크. 미국 94063 캘리포니아주 레드우드 시티 체사피크 드라이브 800	
(21) 출원번호 10-2014-7003901	(72) 발명자 거니, 오스틴, 엘. 미국 94114 캘리포니아주 샌프란시스코 다이아몬 드 스트리트 946	
(22) 출원일자(국제) 2012년07월13일 심사청구일자 없음	액셀로드, 후미코, 타카다 미국 94306 캘리포니아주 팔로 알토 라이트 플레 이스 3780 (뒷면에 계속)	
(85) 번역문제출일자 2014년02월14일	(74) 대리인 양영준, 양영환	
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/046746		
(87) 국제공개번호 WO 2013/012747 국제공개일자 2013년01월24일		
(30) 우선권주장 61/508,403 2011년07월15일 미국(US) (뒷면에 계속)		

---

전체 청구항 수 : 총 173 항

---

(54) 발명의 명칭 RSPO 결합제 및 이의 용도

---

(57) 요약

본 발명은 RSPO-결합제, 및 암과 같은 질환을 치료하기 위해 이러한 작용제를 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 인간 RSPO 단백질에 특이적으로 결합하고  $\beta$ -카테닌 활성을 조절하는 항체를 제공한다. 본 발명은 RSPO 단백질의 활성을 조절하는 작용제, 예컨대 RSP01, RSP02 및/또는 RSP03에 특이적으로 결합하고 종양 성장을 억제하는 항체를 사용하는 방법을 추가로 제공한다. 치료 유효량의 본 발명의 작용제 또는 항체를 종양 또는 암 환자에게 투여하는 것을 포함하는 암 치료 방법이 또한 기술된다.

(72) 발명자

호에이, 티모시, 찰스

미국 94010 캘리포니아주 힐스버러 대밸 로드 200

샤르티에-쿠르토, 세실

미국 94301 캘리포니아주 팔로 알토 쿠퍼 스트리트  
1357

(30) 우선권주장

61/521,547 2011년08월09일 미국(US)

61/570,629 2011년12월14일 미국(US)

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- (a) TGVTMH (서열 12)를 포함하는 중쇄 CDR1, GINPNNGGTTYNQNFKG (서열 13)를 포함하는 중쇄 CDR2, 및 KEFSDGYYFFAY (서열 14)를 포함하는 중쇄 CDR3; 및/또는
  - (b) KASQDVIFAVA (서열 15)를 포함하는 경쇄 CDR1, WASTRHT (서열 16)를 포함하는 경쇄 CDR2, 및 QQHYSTPW (서열 17)를 포함하는 경쇄 CDR3
- 을 포함하는, 인간 R-스폰дин 1 (RSP01)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체.

### 청구항 2

- (a) 서열 10에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는
  - (b) 서열 11에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는, 인간 RSP01에 특이적으로 결합하는 단리된 항체.

### 청구항 3

제2항에 있어서,

- (a) 서열 10에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는
  - (b) 서열 11에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는 항체.

### 청구항 4

제2항에 있어서,

- (a) 서열 10을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는
  - (b) 서열 11을 포함하는 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는 항체.

### 청구항 5

제2항에 있어서,

- (a) 본질적으로 서열 10으로 이루어지는 중쇄 가변 영역; 및
  - (b) 본질적으로 서열 11로 이루어지는 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는 항체.

### 청구항 6

- (a) 서열 55에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는
  - (b) 서열 59에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는, 인간 RSP01에 특이적으로 결합하는 단리된 항체.

### 청구항 7

제6항에 있어서,

- (a) 서열 55에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는
  - (b) 서열 59에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는 항체.

### 청구항 8

제6항에 있어서,

- (a) 서열 55를 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는
- (b) 서열 59를 포함하는 경쇄 가변 영역  
을 포함하는 항체.

### 청구항 9

제6항에 있어서,

- (a) 본질적으로 서열 55로 이루어지는 중쇄 가변 영역; 및
- (b) 본질적으로 서열 59로 이루어지는 경쇄 가변 영역  
을 포함하는 항체.

### 청구항 10

RSP01에 특이적으로 결합하는 것에 대해 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 항체와 경쟁하는 단리된 항체.

### 청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체와 동일한 RSP01 상의 에피토프에 결합하는 단리된 항체.

### 청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 항체가 결합하는 RSP01 상의 에피토프와 중첩되는 RSP01 상의 에피토프에 결합하는 단리된 항체.

### 청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 또는 이중특이적 항체인 항체.

### 청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화 항체인 항체.

### 청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 항체인 항체.

### 청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, IgG1 항체 또는 IgG2 항체인 항체.

### 청구항 17

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 부위를 포함하는 항체 단편인 항체.

### 청구항 18

ATCC 기탁 번호가 PTA-11970인 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 모노클로날 항체.

### 청구항 19

제18항에 있어서, 인간화 형태의 항체.

### 청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의, 류신-풍부 반복부를 함유하고 G 단백질이 커플링된

수용체 (LGR)에 RSP01이 결합하는 것을 억제하는 항체.

### 청구항 21

제20항에 있어서, LGR이 LGR4, LGR5 및 LGR6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체.

### 청구항 22

제21항에 있어서, LGR이 LGR5인 항체.

### 청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, RSP01 신호전달을 억제하는 항체.

### 청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,  $\beta$ -카테닌의 활성화를 억제하는 항체.

### 청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서,  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는 항체.

### 청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 성장을 억제하는 항체.

### 청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 내의 분화 마커의 발현을 유도하는 항체.

### 청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 내의 세포를 분화하도록 유도하는 항체.

### 청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 내의 암 줄기 세포의 번도를 감소시키는 항체.

### 청구항 30

서열 10, 서열 11, 서열 21, 서열 22, 서열 25, 서열 26, 서열 53, 서열 55, 서열 57, 서열 59, 서열 68, 및 서열 69로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 폴리펩티드.

### 청구항 31

제30항에 있어서, 항체인 폴리펩티드.

### 청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 폴리펩티드를 포함하거나 생산하는 세포.

### 청구항 33

ATCC 기탁 번호가 PTA-11970인 하이브리도마 세포주.

### 청구항 34

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자.

### 청구항 35

서열 19, 서열 20, 서열 23, 서열 24, 서열 52, 서열 54, 서열 56, 및 서열 58로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자.

**청구항 36**

제34항 또는 제35항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

**청구항 37**

제34항 또는 제35항의 폴리뉴클레오티드 또는 제36항의 벡터를 포함하는 세포.

**청구항 38**

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

**청구항 39**

종양을 유효량의 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 항체와 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 성장을 억제하는 방법.

**청구항 40**

대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 성장을 억제하는 방법.

**청구항 41**

대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 세포의 분화를 유도하는 방법.

**청구항 42**

대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 내의 암 줄기 세포의 빈도를 감소시키는 방법.

**청구항 43**

세포를 유효량의 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 항체와 접촉시키는 것을 포함하는, 세포에서  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는 방법.

**청구항 44**

제43항에 있어서, 세포가 종양 세포인 방법.

**청구항 45**

제39항 내지 제42항 및 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 종양이 결장직장 종양, 난소 종양, 췌장 종양, 폐 종양, 간 종양, 유방 종양, 신장 종양, 전립선 종양, 위장 종양, 흑색종, 자궁경부 종양, 방광 종양, 교모세포 종, 및 두경부 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 46**

제45항에 있어서, 종양이 췌장 종양인 방법.

**청구항 47**

제45항에 있어서, 종양이 난소 종양인 방법.

**청구항 48**

대상체에게 치료 유효량의 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법.

**청구항 49**

제48항에 있어서, 암이 결장직장암, 난소암, 췌장암, 폐암, 간암, 유방암, 신장암, 전립선암, 위장암, 흑색종, 자궁경부암, 방광암, 교모세포종, 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 암이 결장직장암 또는 췌장암인 방법.

**청구항 51**

제50항에 있어서, 결장직장암이 선종성 결장 폴립증 (APC) 유전자에서의 불활성화 돌연변이를 포함하는 것인 방법.

**청구항 52**

제50항에 있어서, 결장직장암이 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이를 포함하지 않는 것인 방법.

**청구항 53**

제50항에 있어서, 결장직장암이 야생형 APC 유전자를 포함하는 것인 방법.

**청구항 54**

제50항에 있어서, 결장직장암이  $\beta$ -카테닌 유전자에서의 활성화 돌연변이를 포함하지 않는 것인 방법.

**청구항 55**

제49항에 있어서, 암이 난소암인 방법.

**청구항 56**

제39항 내지 제42항 및 제44항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 또는 암이 정상 조직에서의 RSP01 수준과 비교하여 상승된 수준의 RSP01을 발현하는 것인 방법.

**청구항 57**

제40항 내지 제42항 및 제45항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 종양 또는 암이 제거되어 있는 것인 방법.

**청구항 58**

제39항 내지 제42항 및 제44항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 또는 암에서의 RSP01 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 59**

제39항 내지 제42항 및 제44항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 또는 암에 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이가 있는지를 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 60**

제39항 내지 제42항 및 제44항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 또는 암에  $\beta$ -카테닌 유전자에서의 활성화 돌연변이가 있는지를 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 61**

제58항에 있어서, RSP01 발현 수준을 측정하는 단계가 치료 또는 항체와의 접촉 전에 행해지는 것인 방법.

**청구항 62**

제61항에 있어서, 종양 또는 암에서 RSP01 발현 수준이 상승된 경우, 항체를

- (a) 대상체에게 투여하거나; 또는
- (b) 종양 또는 종양 세포와 접촉시키는 것인 방법.

#### **청구항 63**

치료 유효량의 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서  $\beta$ -카테닌의 활성화와 연관된 질환을 치료하는 방법.

#### **청구항 64**

제39항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 추가적인 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

#### **청구항 65**

제64항에 있어서, 추가적인 치료제가 화학요법제인 방법.

#### **청구항 66**

제64항에 있어서, 추가적인 치료제가 혈관신생 억제제인 방법.

#### **청구항 67**

제39항 내지 제42항 및 제45항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

#### **청구항 68**

대상체에 RSP01의 발현 수준이 상승된 종양이 있는지를 결정하고, 이때 종양에서 RSP01의 발현 수준이 상승된 경우, RSP01에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 선택하는 것을 포함하는, RSP01에 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 선택하는 방법.

#### **청구항 69**

제68항에 있어서, 종양이 난소 종양인 방법.

#### **청구항 70**

제58항, 제68항 및 제69항 중 어느 한 항에 있어서, PCR-기반 검정법, 마이크로어레이 분석, 또는 뉴클레오티드 서열분석에 의해 샘플에서 RSP01의 발현 수준을 측정하는 것인 방법.

#### **청구항 71**

대상체에 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이를 포함하는 종양이 있는지를 결정하고, 이때 종양에 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이가 있는 경우, RSP01에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 선택하는 것을 포함하는, RSP01에 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 선택하는 방법.

#### **청구항 72**

제71항에 있어서, 종양이 결장직장 종양인 방법.

#### **청구항 73**

제59항, 제71항 및 제72항 중 어느 한 항에 있어서, PCR-기반 검정법, 혼성화 검정법, 마이크로어레이 분석, 또는 뉴클레오티드 서열분석에 의해 샘플에서 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이를 결정하는 것인 방법.

#### **청구항 74**

제70항 또는 제73항에 있어서, 샘플이 신선한 종양 샘플, 냉동 종양 샘플, 또는 포르말린-고정, 파라핀-포매 샘플인 방법.

#### **청구항 75**

제68항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 항체인 방법.

### 청구항 76

- (a) SSYAMS (서열 29)를 포함하는 중쇄 CDR1, SISSGGSTYYYPDSVKG (서열 30)를 포함하는 중쇄 CDR2, 및 RGGDPGVYNGDYEDAMDY (서열 31)를 포함하는 중쇄 CDR3; 및/또는
  - (b) KASQDVSSAVA (서열 32)를 포함하는 경쇄 CDR1, WASTRHT (서열 33)를 포함하는 경쇄 CDR2, 및 QQHYSTP (서열 34)를 포함하는 경쇄 CDR3
- 을 포함하는, 인간 R-스폰дин2 (RSP02)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체.

### 청구항 77

- (a) 서열 27에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는
  - (b) 서열 28에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는, 인간 RSP02에 특이적으로 결합하는 단리된 항체.

### 청구항 78

제77항에 있어서,

- (a) 서열 27에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는
  - (b) 서열 28에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는 항체.

### 청구항 79

제77항에 있어서,

- (a) 서열 27을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는
  - (b) 서열 28을 포함하는 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는 항체.

### 청구항 80

제77항에 있어서,

- (a) 본질적으로 서열 27로 이루어지는 중쇄 가변 영역; 및
  - (b) 본질적으로 서열 28로 이루어지는 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는 항체.

### 청구항 81

- (a) 서열 63에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는
  - (b) 서열 67 또는 서열 76에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는, 인간 RSP02에 특이적으로 결합하는 단리된 항체.

### 청구항 82

제81항에 있어서,

- (a) 서열 63에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는
  - (b) 서열 67 또는 서열 76에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 경쇄 가변 영역
- 을 포함하는 항체.

### 청구항 83

제81항에 있어서,

- (a) 서열 63을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및/또는
- (b) 서열 67 또는 서열 76을 포함하는 경쇄 가변 영역  
을 포함하는 항체.

### 청구항 84

제81항에 있어서,

- (a) 본질적으로 서열 63으로 이루어지는 중쇄 가변 영역; 및
- (b) 본질적으로 서열 67로 이루어지는 경쇄 가변 영역  
을 포함하는 항체.

### 청구항 85

제81항에 있어서,

- (a) 본질적으로 서열 63으로 이루어지는 중쇄 가변 영역; 및
- (b) 본질적으로 서열 76으로 이루어지는 경쇄 가변 영역  
을 포함하는 항체.

### 청구항 86

RSP02에 특이적으로 결합하는 것에 대해 제76항 내지 제85항 중 어느 한 항에 따른 항체와 경쟁하는 단리된 항체.

### 청구항 87

제76항 내지 제86항 중 어느 한 항에 따른 항체와 동일한 RSP02 상의 에피토프에 결합하는 단리된 항체.

### 청구항 88

제76항 내지 제86항 중 어느 한 항에 따른 항체가 결합하는 RSP02 상의 에피토프와 중첩되는 RSP02 상의 에피토프에 결합하는 단리된 항체.

### 청구항 89

제76항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 항체, 모노클로날 항체, 키메라 항체, 또는 이중특이적 항체인 항체.

### 청구항 90

제76항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화 항체인 항체.

### 청구항 91

제76항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 항체인 항체.

### 청구항 92

제76항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, IgG1 항체 또는 IgG2 항체인 항체.

### 청구항 93

제76항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 부위를 포함하는 항체 단편인 항체.

**청구항 94**

ATCC 기탁 번호가 PTA-12021인 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 모노클로날 항체.

**청구항 95**

제94항에 있어서, 인간화 형태의 항체.

**청구항 96**

제76항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의, 류신-풍부 반복부를 함유하고 G 단백질이 커플링된 수용체 (LGR)에 RSP02가 결합하는 것을 억제하는 항체.

**청구항 97**

제96항에 있어서, LGR이 LGR4, LGR5 및 LGR6으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체.

**청구항 98**

제97항에 있어서, LGR이 LGR5인 항체.

**청구항 99**

제76항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, RSP02 신호전달을 억제하는 항체.

**청구항 100**

제76항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서,  $\beta$ -카테닌의 활성화를 억제하는 항체.

**청구항 101**

제76항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서,  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는 항체.

**청구항 102**

제76항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 성장을 억제하는 항체.

**청구항 103**

제76항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 내의 분화 마커의 발현을 유도하는 항체.

**청구항 104**

제76항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 내의 세포를 분화하도록 유도하는 항체.

**청구항 105**

제76항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 내의 암 줄기 세포의 빈도를 감소시키는 항체.

**청구항 106**

서열 27, 서열 28, 서열 37, 서열 38, 서열 41, 서열 42, 서열 61, 서열 63, 서열 65, 서열 67, 서열 70, 서열 71, 서열 73, 서열 74, 및 서열 76으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 폴리펩티드.

**청구항 107**

제106항에 있어서, 항체인 폴리펩티드.

**청구항 108**

제76항 내지 제107항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 폴리펩티드를 포함하거나 생산하는 세포.

**청구항 109**

ATCC 기탁 번호가 PTA-12021인 하이브리도마 세포주.

#### **청구항 110**

제76항 내지 제107항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자.

#### **청구항 111**

서열 35, 서열 36, 서열 39, 서열 40, 서열 60, 서열 62, 서열 64, 서열 66, 서열 72, 및 서열 75로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자.

#### **청구항 112**

제110항 또는 제111항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

#### **청구항 113**

제110항 또는 제111항의 폴리뉴클레오티드 또는 제112항의 벡터를 포함하는 세포.

#### **청구항 114**

제76항 내지 제107항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 폴리펩티드 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물.

#### **청구항 115**

종양을 유효량의 제76항 내지 제105항 중 어느 한 항에 따른 항체와 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 성장을 억제하는 방법.

#### **청구항 116**

대상체에게 치료 유효량의 제76항 내지 제105항 중 어느 한 항에 따른 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 성장을 억제하는 방법.

#### **청구항 117**

대상체에게 치료 유효량의 제76항 내지 제105항 중 어느 한 항에 따른 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 세포의 분화를 유도하는 방법.

#### **청구항 118**

대상체에게 치료 유효량의 제76항 내지 제105항 중 어느 한 항에 따른 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 내의 암 줄기 세포의 빈도를 감소시키는 방법.

#### **청구항 119**

세포를 유효량의 제76항 내지 제105항 중 어느 한 항에 따른 항체와 접촉시키는 것을 포함하는, 세포에서  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는 방법.

#### **청구항 120**

제119항에 있어서, 세포가 종양 세포인 방법.

#### **청구항 121**

제115항 내지 제118항 및 제120항 중 어느 한 항에 있어서, 종양이 결장직장 종양, 난소 종양, 췌장 종양, 폐 종양, 간 종양, 유방 종양, 신장 종양, 전립선 종양, 위장 종양, 흑색종, 자궁경부 종양, 방광 종양, 교모세포 종, 및 두경부 종양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### **청구항 122**

제121항에 있어서, 종양이 췌장 종양인 방법.

#### 청구항 123

제121항에 있어서, 종양이 난소 종양인 방법.

#### 청구항 124

대상체에게 치료 유효량의 제76항 내지 제105항 중 어느 한 항에 따른 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법.

#### 청구항 125

제124항에 있어서, 암이 결장직장암, 난소암, 췌장암, 폐암, 간암, 유방암, 신장암, 전립선암, 위장암, 흑색종, 자궁경부암, 방광암, 교모세포종, 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 126

제125항에 있어서, 암이 결장직장암인 방법.

#### 청구항 127

제126항에 있어서, 결장직장암이 선종성 결장 폴립증 (APC) 유전자에서의 불활성화 돌연변이를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 128

제126항에 있어서, 결장직장암이 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이를 포함하지 않는 것인 방법.

#### 청구항 129

제126항에 있어서, 결장직장암이 야생형 APC 유전자를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 130

제126항에 있어서, 결장직장암이  $\beta$ -카테닌 유전자에서의 활성화 돌연변이를 포함하지 않는 것인 방법.

#### 청구항 131

제125항에 있어서, 암이 췌장암인 방법.

#### 청구항 132

제115항 내지 제118항 및 제120항 내지 제131항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 또는 암이 정상 조직에서의 RSP02 수준과 비교하여 상승된 수준의 RSP02를 발현하는 것인 방법.

#### 청구항 133

제116항 내지 제118항 및 제121항 내지 제132항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 종양 또는 암이 제거되어 있는 것인 방법.

#### 청구항 134

제115항 내지 제118항 및 제120항 내지 제133항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 또는 암에서의 RSP02 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 135

제115항 내지 제118항 및 제120항 내지 제134항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 또는 암에 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이가 있는지를 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 136

제115항 내지 제118항 및 제120항 내지 제135항 중 어느 한 항에 있어서, 종양 또는 암에  $\beta$ -카테닌 유전자에서의 활성화 돌연변이가 있는지를 결정하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 137

제134항에 있어서, RSP02 발현 수준을 측정하는 단계가 치료 또는 항체와의 접촉 전에 행해지는 것인 방법.

#### 청구항 138

제137항에 있어서, 종양 또는 암에서 RSP02 발현 수준이 상승된 경우, 항체를

- (a) 대상체에게 투여하거나; 또는
- (b) 종양 또는 종양 세포와 접촉시키는 것인 방법.

#### 청구항 139

치료 유효량의 제76항 내지 제105항 중 어느 한 항에 따른 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서  $\beta$ -카테닌의 활성화와 연관된 질환을 치료하는 방법.

#### 청구항 140

제115항 내지 제139항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 추가적인 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

#### 청구항 141

제140항에 있어서, 추가적인 치료제가 화학요법제인 방법.

#### 청구항 142

제140항에 있어서, 추가적인 치료제가 Wnt 경로 억제제인 방법.

#### 청구항 143

제116항 내지 제118항 및 제121항 내지 제142항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

#### 청구항 144

대상체에 RSP02의 발현 수준이 상승된 종양이 있는지를 결정하고, 이때 종양에서 RSP02의 발현 수준이 상승된 경우, RSP02에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 선택하는 것을 포함하는, RSP02에 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 선택하는 방법.

#### 청구항 145

제144항에 있어서, 종양이 체장 종양인 방법.

#### 청구항 146

제144항에 있어서, 종양이 유방 종양인 방법.

#### 청구항 147

제144항에 있어서, 종양이 폐 종양인 방법.

#### 청구항 148

제144항에 있어서, 종양이 흑색종 종양인 방법.

#### 청구항 149

제144항에 있어서, 종양이 결장직장 종양인 방법.

**청구항 150**

제134항 및 제144항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, PCR-기반 검정법, 마이크로어레이 분석, 또는 뉴클레오티드 서열분석에 의해 샘플에서 RSP02의 발현 수준을 측정하는 것인 방법.

**청구항 151**

대상체에 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이를 포함하는 종양이 있는지를 결정하고, 이때 종양에 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이가 있는 경우, RSP02에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 선택하는 것을 포함하는, RSP02에 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 선택하는 방법.

**청구항 152**

제151항에 있어서, 종양이 결장직장 종양인 방법.

**청구항 153**

제135항, 제151항 및 제152항 중 어느 한 항에 있어서, PCR-기반 검정법, 혼성화 검정법, 마이크로어레이 분석, 또는 뉴클레오티드 서열분석에 의해 샘플에서 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이를 결정하는 것인 방법.

**청구항 154**

제150항 또는 제153항에 있어서, 샘플이 신선한 종양 샘플, 냉동 종양 샘플, 또는 포르말린-고정, 파라핀-포매 샘플인 방법.

**청구항 155**

제144항 내지 제154항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 제76항 내지 제105항 중 어느 한 항에 따른 항체인 방법.

**청구항 156**

서열 25의 중쇄 아미노산 서열 및 서열 26의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체.

**청구항 157**

서열 41의 중쇄 아미노산 서열 및 서열 42의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체.

**청구항 158**

서열 68의 중쇄 아미노산 서열 및 서열 69의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체.

**청구항 159**

서열 70의 중쇄 아미노산 서열 및 서열 71의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체.

**청구항 160**

서열 70의 중쇄 아미노산 서열 및 서열 74의 경쇄 아미노산 서열을 포함하는 항체.

**청구항 161**

대상체에 RSP03의 발현 수준이 상승된 종양이 있는지를 결정하고, 이때 종양에서 RSP03의 발현 수준이 상승된 경우, RSP03에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 선택하는 것을 포함하는, RSP03에 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 선택하는 방법.

**청구항 162**

제161항에 있어서, 종양이 폐 종양인 방법.

**청구항 163**

제161항에 있어서, 종양이 유방 종양인 방법.

#### 청구항 164

제161항에 있어서, 종양이 난소 종양인 방법.

#### 청구항 165

제161항에 있어서, 종양이 결장직장 종양인 방법.

#### 청구항 166

제161항 내지 제165항 중 어느 한 항에 있어서, PCR-기반 검정법, 마이크로어레이 분석, 또는 뉴클레오티드 서열분석에 의해 샘플에서 RSP03의 발현 수준을 측정하는 것인 방법.

#### 청구항 167

제166항에 있어서, 샘플이 신선한 종양 샘플, 냉동 종양 샘플, 또는 포르말린-고정, 파라핀-포매 샘플인 방법.

#### 청구항 168

대상체에 RSP04의 발현 수준이 상승된 종양이 있는지를 결정하고, 이때 종양에서 RSP04의 발현 수준이 상승된 경우, RSP04에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 선택하는 것을 포함하는, RSP04에 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 선택하는 방법.

#### 청구항 169

제168항에 있어서, 종양이 폐 종양인 방법.

#### 청구항 170

제168항에 있어서, 종양이 유방 종양인 방법.

#### 청구항 171

제168항에 있어서, 종양이 난소 종양인 방법.

#### 청구항 172

제168항 내지 제171항 중 어느 한 항에 있어서, PCR-기반 검정법, 마이크로어레이 분석, 또는 뉴클레오티드 서열분석에 의해 샘플에서 RSP03의 발현 수준을 측정하는 것인 방법.

#### 청구항 173

제172항에 있어서, 샘플이 신선한 종양 샘플, 냉동 종양 샘플, 또는 포르말린-고정, 파라핀-포매 샘플인 방법.

### 명세서

#### 기술 분야

[0001] 일반적으로 본 발명의 분야는 RSP01, RSP02 및 RSP03을 포함하는 R-스폰딘(Spondin) 단백질 (RSPO), 특히 인간 R-스폰딘 단백질에 결합하는 항체 및 기타 작용제, 뿐만 아니라 암과 같은 질환의 치료를 위해 이러한 항체 또는 기타 작용제를 사용하는 방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

[0002] R-스폰딘 (RSPO) 패밀리의 단백질은 척추 동물 간에 보존되고, RSP01, RSP02, RSP03 및 RSP04의 4개의 구성원을 포함한다. 이러한 단백질들은 천장판(roof plate)-특이적 스폰딘, hPWTSR (hRSP03), THS2D (RSP03), 크리스틴(Cristin) 1-4, 및 푸트린(Futrin) 1-4가 포함되는 다양한 명칭으로 지칭되었다. RSPO는 전체적으로 약 40-60%의 서열 상동성 및 도메인 구성을 공유하는 소형 분비형 단백질이다. 모든 RSPO 단백질은 N-말단의 2개의 푸린-유사 시스테인-풍부 도메인에 이어지는 트롬보스폰딘 도메인 및 염기성 전하를 띠는 C-말단 꼬리를 함

유한다 (문헌 [Kim et al., 2006, Cell Cycle, 5:23-26]).

[0003] 척추동물 발달 동안 (문헌 [Kamata et al., 2004, Biochim. Biophys Acta, 1676:51-62]), 그리고 제노푸스 (*Xenopus*) 근육발생에서 (문헌 [Kazanskaya et al., 2004, Dev. Cell, 7:525-534]), RSPO 단백질이 역할을 한다는 것이 연구에서 나타났다. RSPO1은 위장 상피 세포에 대한 강력한 유사분열촉진물질로서 기능하는 것으로 또한 나타났다 (문헌 [Kim et al., 2005, Science, 309:1256-1259]). RSPO 단백질은 Wnt 신호전달과 유사한  $\beta$ -카테닌 신호전달을 활성화시키는 것으로 공지되었지만, RSPO 단백질과 Wnt 신호전달 사이의 관계는 여전히 연구 중이다. RSPO 단백질이 Wnt 리간드에 대한 양성 조절 활성을 지닌다는 것이 보고되었다 (문헌 [Nam et al., 2006, JBC 281:13247-57]). 이러한 연구는 RSPO 단백질이 프리즐드(Frizzled)8 및 LRP6 수용체 리간드로서 기능할 수 있고  $\beta$ -카테닌 신호전달을 유도할 수 있다는 것을 또한 보고하였다 (문헌 [Nam et al., 2006, JBC 281:13247-57]). 최근의 연구에서 RSPO 단백질과 LGR (류신-풍부 반복부를 함유하고 G 단백질이 커플링된 수용체) 단백질, 예컨대 LGR5 사이의 상호작용이 확인되었고 (미국 특허 공개 번호 2009/0074782 및 2009/0191205), 이러한 데이터는  $\beta$ -카테닌 신호전달의 활성화를 위한 별법적인 경로를 나타낸다.

[0004] Wnt 신호전달 경로가 암 요법을 위한 잠재적인 표적으로서 확인되었다. Wnt 신호전달 경로는 배아 패턴 형성, 배아-후 조직 유지, 및 줄기 세포 생물학의 여러 결정적인 조절인자 중 하나이다. 더욱 구체적으로, Wnt 신호전달은 세포 극성의 생성 및 세포 운명 상술 (줄기 세포 집단에 의한 자가 재생 포함)에서 중요한 역할을 한다. Wnt 경로의 조절되지 않은 활성화는 수많은 인간 암과 연관되고, 이때 이러한 활성화가 세포의 발달 운명을 변경시킬 수 있는 것으로 여겨진다. Wnt 경로의 활성화는 종양 세포를 미분화 상태에서 유지시킬 수 있고/있거나 제어되지 않은 증식에 이를 수 있다. 따라서, 정상적인 발달 및 조직 복원을 제어하는 항상성 메커니즘을 암도 함으로써 발암이 진행될 수 있다 (문헌 [Reya & Clevers, 2005, Nature, 434:843-50]; [Beachy et al., 2004, Nature, 432:324-31]에서 고찰됨).

[0005] Wnt 신호전달 경로는 날개가 없는 드로소필라(*Drosophila*) 발달 돌연변이체 (*wg*)에서, 그리고 뮤린(murine) 원종양유전자 int-1 (현재 Wnt1)로부터 최초로 해명되었다 (문헌 [Nusse & Varmus, 1982, Cell, 31:99-109]; [Van Ooyen & Nusse, 1984, Cell, 39:233-40]; [Cabrera et al., 1987, Cell, 50:659-63]; [Rijsewijk et al., 1987, Cell, 50:649-57]). Wnt 유전자는 19개가 포유동물에서 확인되어 있는 분비형 지질-변형 당단백질을 코딩한다. 이러한 분비형 리간드는 프리즐드 (FZD) 수용체 패밀리 구성원 및 저밀도 지질단백질 (LDL) 수용체-관련 단백질 5 또는 6 (LRP5/6)으로 이루어진 수용체 복합체를 활성화시킨다. FZD 수용체는 G-단백질이 커플링된 수용체 (GPCR) 수퍼패밀리의 7개의 막횡단 도메인 단백질이고, 시스테인-풍부 도메인 (CRD) 또는 Fri 도메인으로 공지된, 10개의 시스테인이 보존되어 있는 대형 세포외 N-말단 리간드 결합 도메인을 함유한다. FZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, 및 FZD10의 10개의 인간 FZD 수용체가 있다. 상이한 FZD CRD는 특정 Wnt 단백질에 대한 결합 친화력이 상이하고 (문헌 [Wu & Nusse, 2002, J. Biol. Chem., 277:41762-9]), FZD 수용체는 정규  $\beta$ -카테닌 경로를 활성화시키는 것과 비-정규 경로를 활성화시키는 것으로 분류되었다 (문헌 [Miller et al., 1999, Oncogene, 18:7860-72]).

[0006] Wnt1 (원래는 int1)가 뮤린 바이러스의 인근 삽입에 의해 형질전환된 유방 종양에서 종양유전자로서 확인되는 것으로 암에서의 Wnt 신호전달의 역할이 최초로 밝혀졌다 (문헌 [Nusse & Varmus, 1982, Cell, 31:99-109]). 이후에, 유방암에서의 Wnt 신호전달의 역할에 대한 추가적인 증가가 측적되었다. 예를 들어, 유선에서의  $\beta$ -카테닌의 트랜스제닉(transgenic) 과발현은 과형성 및 선암종을 초래하는 반면 (문헌 [Imbert et al., 2001, J. Cell Biol., 153:555-68]; [Michaelson & Leder, 2001, Oncogene, 20:5093-9]), Wnt 신호전달 상실은 정상적인 유선 발달을 과괴한다 (문헌 [Tepera et al., 2003, J. Cell Sci., 116:1137-49]; [Hatsell et al., 2003, J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 8:145-58]). 인간 유방암에서, 50%를 초과하는 암종에서  $\beta$ -카테닌 측적이 활성화된 Wnt 신호전달을 함축하고, 특정 돌연변이가 확인되지는 않았지만, 프리즐드 수용체 발현의 상향조절이 관찰되었다 (문헌 [Brennan & Brown, 2004, J. Mammary Gland Biol. Neoplasia, 9:119-31]; [Malovanovic et al., 2004, Int. J. Oncol., 25:1337-42]).

[0007] Wnt 경로의 활성화는 결장직장암과 또한 연관된다. 모든 결장직장암의 약 5-10%는 유전성이고, 주요 형태 중 하나는 병에 걸린 개체의 약 80%가 선종성 결장 폴립증 (APC) 유전자에서의 생식계열 돌연변이를 함유하는 상염색체 우성 질환인 가족성 선종 폴립증 (FAP)이다. 액신(Axin) 및  $\beta$ -카테닌이 포함되는 기타 Wnt 경로에서 돌연변이가 또한 확인되었다. 개별적인 선종은 제2의 불활성화된 대립유전자를 함유하는 상피 세포의 클론성 증식물이고, 다수의 FAP 선종은 종양유전자 및/또는 종약 억제인자 유전자에서의 추가적인 돌연변이를 통한 선암종의 발달을 필연적으로 초래한다. 또한, APC에서의 기능 상실 돌연변이 및  $\beta$ -카테닌에서의 안정화 돌연변이가 포함되는 Wnt 신호전달 경로의 활성화는 마우스 모델에서 과형성 발달 및 종양 성장을 유도할 수 있다 (문헌

[Oshima et al., 1997, Cancer Res., 57:1644-9]; [Harada et al., 1999, EMBO J., 18:5931-42]).

[0008] 유방암 및 결장암과 유사하게,  $\beta$ -카테닌의 핵 축적에 의해 지시되는 바와 같이, 흑색종에는 종종 Wnt 경로의 구성적인 활성화가 있다. 일부 흑색종 종양 및 세포주에서의 Wnt/ $\beta$ -카테닌 경로의 활성화는 APC, ICAT, LEF1 및  $\beta$ -카테닌과 같은 경로 성분에서의 변형에 기인한다 (예를 들어, 문헌 [Larue et al. 2006, Frontiers Biosci., 11:733-742] 참조). 그러나, 이러한 문헌에는 흑색종에서의 Wnt/ $\beta$ -카테닌 신호전달의 정확한 역할에 관한 상반되는 보고가 있다. 예를 들어, 상승된 수준의 핵  $\beta$ -카테닌이 흑색종으로부터의 생존 개선과 상관된다는 것과 활성화된 Wnt/ $\beta$ -카테닌 신호전달이 감소된 세포 증식과 연관되었다는 것이 한 연구에서 발견되었다 (문헌 [Chien et al., 2009, PNAS, 106:1193-1198]).

[0009] 인간 암에서 수반되는 유전자, 단백질 및 경로를 목표로 하는 표적화된 요법을 통해 암 약물 연구의 초점이 이동하고 있다. 암 환자에게 치료 이점을 제공할 수 있는, 신호전달 경로를 표적으로 하는 새로운 작용제 및 다중 경로를 표적으로 하는 작용제들의 새로운 조합물이 요구된다. 따라서,  $\beta$ -카테닌 신호전달을 과괴하는 생체 분자 (예를 들어, 항-RSPO 항체)는 암, 뿐만 아니라 기타  $\beta$ -카테닌-연관 질환에 대한 새로운 치료제의 잠재적인 공급원이다.

### 발명의 내용

#### 발명의 간단한 개요

[0011] 본 발명은 RSPO 단백질에 결합하는 결합체, 예컨대 항체, 뿐만 아니라 이러한 결합체를 포함하는 조성물, 예컨대 제약 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체는 신규 폴리펩티드, 예컨대 항체, 항체 단편, 및 이같은 항체에 관련된 기타 폴리펩티드이다. 특정 실시양태에서, 결합체는 인간 RSP01, RSP02, 및/또는 RSP03에 특이적으로 결합하는 항체이다. 본 발명은 RSPO-결합체를 종양이 있는 대상체에게 투여함으로써 종양 성장을 억제하는 방법을 추가로 제공한다. 본 발명은 RSPO-결합체를 암 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 암을 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 암을 치료하거나 종양 성장을 억제하는 방법은 암 줄기 세포를 RSPO-결합체로 표적화하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 방법은 종양 내의 암 줄기 세포의 빈도를 감소시키는 것, 종양 내의 암 줄기 세포의 개수를 감소시키는 것, 종양의 종양발생성을 감소시키는 것 및/또는 종양 내의 암 줄기 세포의 개수 또는 빈도를 감소시킴으로써 종양의 종양발생성을 감소시키는 것을 포함한다.

[0012] 한 측면에서, 본 발명은 인간 RSP01에 특이적으로 결합하는 결합체, 예컨대 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 인간 RSP01의 아미노산 21-263 내에서 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 인간 RSP01의 아미노산 34-135 내에서 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 인간 RSP01의 아미노산 91-135 내에서 결합한다. 일부 실시양태에서,, RSP01-결합체 (예를 들어, 항체)는 RSP02, RSP03, 및 RSP04로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 기타 인간 RSP0에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체 또는 항체는  $\beta$ -카테닌 활성을 조절하고/하거나,  $\beta$ -카테닌 신호전달의 길항제이고/이거나,  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하고/하거나,  $\beta$ -카테닌의 활성화를 억제한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 RSP01 신호전달을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 RSP01이 하나 이상의 LGR 단백질 (예를 들어, LGR4, LGR5, 및/또는 LGR6)에 결합하는 것을 억제하거나 방해한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 RSP01이 LGR5에 결합하는 것을 억제한다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 RSP02에 특이적으로 결합하는 결합체, 예컨대 항체를 제공한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 인간 RSP02의 아미노산 22-243 내에서 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 인간 RSP02의 아미노산 22-205 내에서 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 인간 RSP02의 아미노산 34-134 내에서 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 인간 RSP02의 아미노산 90-134 내에서 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)는 RSP01, RSP03, 및 RSP04로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 기타 인간 RSP0에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체 또는 항체는  $\beta$ -카테닌 활성을 조절하고/하거나,  $\beta$ -카테닌 신호전달의 길항제이고/이거나,  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하고/하거나,  $\beta$ -카테닌의 활성화를 억제한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 RSP02 신호전달을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 RSP02가 하나 이상의 LGR 단백질 (예를 들어, LGR4, LGR5, 및/또는 LGR6)에 결합하는 것을 억제하거나 방해한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 RSP02가 LGR5에 결합하는 것을 억제한다.

[0014] 각각의 상기 언급된 측면 및 실시양태, 뿐만 아니라 본원에 기술된 기타 측면 및 실시양태의 특정

실시양태에서, RSP01-결합체는 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간화 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간 RSP01에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간 RSP01 및 마우스 RSP01에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 인간 RSP01에 1 nM 미만의  $K_D$ 로 결합하고, 마우스 RSP01에 1 nM 미만의  $K_D$ 로 결합한다.

[0015] 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 TGYTMH (서열 12)를 포함하는 중쇄 CDR1, GINPNNGGTTYNQNFKG (서열 13)를 포함하는 중쇄 CDR2, 및 KEFSDGYYFFAY (서열 14)를 포함하는 중쇄 CDR3을 포함하는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 KASQDVIFAVA (서열 15)를 포함하는 경쇄 CDR1, WASTRHT (서열 16)를 포함하는 경쇄 CDR2, 및 QQHYSTPW (서열 17)를 포함하는 경쇄 CDR3을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 KASQDVIFAVA (서열 15)를 포함하는 경쇄 CDR1, WASTRHT (서열 16)를 포함하는 경쇄 CDR2, 및 QQHYSTPW (서열 17)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 항체이다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 (a) TGYTMH (서열 12)를 포함하는 중쇄 CDR1, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (b) GINPNNGGTTYNQNFKG (서열 13)를 포함하는 중쇄 CDR2, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (c) KEFSDGYYFFAY (서열 14)를 포함하는 중쇄 CDR3, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (d) KASQDVIFAVA (서열 15)를 포함하는 경쇄 CDR1, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (e) WASTRHT (서열 16)를 포함하는 경쇄 CDR2, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및 (f) QQHYSTPW (서열 17)를 포함하는 경쇄 CDR3, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함하는 항체이다. 일부 실시양태에서, 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환이다.

[0016] 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 (a) 서열 10에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 서열 11에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 (a) 서열 10에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 서열 11에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다.

[0017] 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 (a) 서열 55에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 서열 59에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 (a) 서열 55에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 서열 59에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다.

[0018] 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 모노클로날 항체 89M5이고, 기탁 번호가 PTA-11970인, 2011년 6월 30일에 ATCC에 기탁된 하이브리도마 세포주 89M5에 의해 생산된다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 인간화 형태의 항체 89M5이다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 인간화 모노클로날 항체 h89M5-H2L2이다.

[0019] 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 인간 RSP02에 결합하는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 RSP02 및 마우스 RSP02에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 SSYAMS (서열 29)를 포함하는 중쇄 CDR1, SISSGGSTYYPDPSVKG (서열 30)를 포함하는 중쇄 CDR2, 및 RGGDPGVYNGDYEDAMDY (서열 31)를 포함하는 중쇄 CDR3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 KASQDVSSAVA (서열 32)를 포함하는 경쇄 CDR1, WASTRHT (서열 33)를 포함하는 경쇄 CDR2, 및 QQHYSTP (서열 34)를 포함하는 경쇄 CDR3을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 KASQDVSSAVA (서열 32)를 포함하는 경쇄 CDR1, WASTRHT (서열 33)를 포함하는 경쇄 CDR2, 및 QQHYSTP (서열 34)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 항체이다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 (a) SSYAMS (서열 29)를 포함하는 중쇄 CDR1, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (b) SISSGGSTYYPDPSVKG (서열 30)를 포함하는 중쇄 CDR2, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (c) RGGDPGVYNGDYEDAMDY (서열 31)를 포함하는 중쇄 CDR3, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (d) KASQDVSSAVA (서열 32)를 포함하는 경쇄 CDR1, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (e) WASTRHT (서열 33)를 포함하는 경쇄 CDR2, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및 (f) QQHYSTP (서열 34)를 포함하는 경쇄 CDR3, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함하는 항체이다. 일부 실시양태에서, 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환이다.

[0020] 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 (a) 서열 27에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 서열 28에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 (a) 서열 27에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 서열 28에 대한 서

열 동일성이 90% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다.

[0021] 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 (a) 서열 63에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 서열 67에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 (a) 서열 63에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 서열 67에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다.

[0022] 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 (a) 서열 63에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 서열 76에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 (a) 서열 63에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 중쇄 가변 영역; 및/또는 (b) 서열 76에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체이다.

[0023] 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 모노클로날 항체 130M23이고, 기탁 번호가 PTA-12021인 2011년 8월 10일에 ATCC에 기탁된 하이브리도마 세포주 130M23에 의해 생산된다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 인간화 형태의 항체 130M23이다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 인간화 모노클로날 항체 h130M23-H1L2이다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 인간화 모노클로날 항체 h130M23-H1L6이다.

[0024] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 RSP0 단백질에 대한 특이적 결합에 대해 본 발명의 항체와 경쟁하는 결합체 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 일부 실시양태에서, 결합체 (예를 들어, 항체)는 인간 RSP01에 대한 특이적 결합에 대해 서열 10을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 11을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁한다. 일부 실시양태에서, 결합체 (예를 들어, 항체)는 인간 RSP01에 대한 특이적 결합에 대해 서열 55를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 59를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체가 경쟁하는 항체는 89M5 또는 h89M5-H2L2이다. 일부 실시양태에서, 결합체는 RSP01에 대한 특이적 결합에 대해 시험관내 경쟁 결합 검정법에서 본 발명의 항체와 경쟁한다.

[0025] 특정 실시양태에서, 항체는 본 발명의 항체 (예를 들어, 89M5)와 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 RSP01 상의 에피토프에 결합한다.

[0026] 또 다른 측면에서, 결합체는 본 발명의 항체 (예를 들어, 89M5)가 결합하는 RSP01 상의 에피토프와 중첩되는 RSP01 상의 에피토프에 결합한다.

[0027] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간 RSP02에 대한 특이적 결합에 대해 본 발명의 항체와 경쟁하는 결합체 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 일부 실시양태에서, 결합체 (예를 들어, 항체)는 인간 RSP02에 대한 특이적 결합에 대해 서열 27을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 28을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁한다. 일부 실시양태에서, 결합체 (예를 들어, 항체)는 인간 RSP02에 대한 특이적 결합에 대해 서열 63을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 67을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁한다. 일부 실시양태에서, 결합체 (예를 들어, 항체)는 인간 RSP02에 대한 특이적 결합에 대해 서열 63을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 76을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체가 경쟁하는 항체는 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6이다. 일부 실시양태에서, 결합체는 RSP02에 대한 특이적 결합에 대해 시험관내 경쟁 결합 검정법에서 본 발명의 항체와 경쟁한다.

[0028] 특정 실시양태에서, 항체는 본 발명의 항체 (예를 들어, 130M23)와 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 RSP02 상의 에피토프에 결합한다.

[0029] 또 다른 측면에서, 결합체는 본 발명의 항체 (예를 들어, 130M23)가 결합하는 RSP02 상의 에피토프와 중첩되는 RSP02 상의 에피토프에 결합한다.

[0030] 각각의 상기 언급된 측면, 뿐만 아니라 본원의 다른 곳에서 기술된 기타 측면 및/또는 실시양태에서, RSP0-결합체 또는 항체는 단리된 것이다.

[0031] 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 10 및/또는 서열 11을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 55 및/또는 서열 59를 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 27 및/또는 서열 28을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 63 및/또는 서열 67을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 서열 63 및/또는 서열 76을 포함하는 폴리펩티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, RSP01에 결합하는 폴리펩티드는 서열 25 및/또는 서열 26을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP01에 결합하는 폴리펩티드는 서열 68 및/또는 서열 69를 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP02에 결합하는 폴리펩티드는 서열 41 및/또는 서열 42를 포함

하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP02에 결합하는 폴리펩티드는 서열 70 및/또는 서열 71을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP02에 결합하는 폴리펩티드는 서열 70 및/또는 서열 74를 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 단리된 것이다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 실질적으로 순수하다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 항체이다.

[0032] 또 다른 측면에서, 본 발명은 각각의 상기 언급된 측면, 뿐만 아니라 본원에 기술된 기타 측면 및/또는 실시양태의 항체 및/또는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 폴리뉴클레오티드 분자를 제공한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 19, 서열 20, 서열 23, 서열 24, 서열 52, 서열 54, 서열 56, 및 서열 58로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 35, 서열 36, 서열 39, 서열 40, 서열 60, 서열 62, 서열 64, 서열 66, 서열 72, 및 서열 75로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함한다. 본 발명은 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 뿐만 아니라 이러한 발현 벡터 및/또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 세포를 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 하이브리도마 세포주이다. 특정 실시양태에서, 세포는 ATCC 기탁 번호가 PTA-11970인 하이브리도마 세포주이다. 특정 실시양태에서, 세포는 ATCC 기탁 번호가 PTA-12021인 하이브리도마 세포주이다.

[0033] 다른 측면에서, 본 발명은 종양을 유효량의 각각의 본원에 기술된 것들이 포함되는 RSPO-결합체 또는 항체와 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 성장을 억제하는 방법을 제공한다.

[0034] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에게 치료 유효량의 각각의 본원에 기술된 것들이 포함되는 RSPO-결합체 또는 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 성장을 억제하는 방법을 제공한다.

[0035] 또 다른 측면에서, 본 발명은 세포를 유효량의 각각의 본원에 기술된 것들이 포함되는 RSPO-결합체 또는 항체와 접촉시키는 것을 포함하는, 세포에서  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 종양 세포이다. 일부 실시양태에서, 종양은 결장직장 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 난소 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 췌장 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 폐 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 상승된 수준의 하나 이상의 RSPO 단백질을 발현한다. 일부 실시양태에서, 종양은 상승된 수준의 RSP01을 발현한다. 일부 실시양태에서, 종양은 상승된 수준의 RSP02를 발현한다. 일부 실시양태에서, 종양은 상승된 수준의 RSP03을 발현한다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체는, 예를 들어, 종양 내의 암 줄기 세포의 개수 및/또는 빈도를 감소시키는 것에 의해, 종양 성장을 억제한다.

[0036] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 대상체에게 치료 유효량의 상기 기술된 RSPO-결합체 또는 항체, 뿐만 아니라 본원의 다른 곳에서 기술된 것들 중 임의의 것을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 췌장암이다. 일부 실시양태에서, 암은 결장직장암이다. 일부 실시양태에서, 결장직장암은 선종성 결장 폴립증 (APC) 유전자에서의 불활성화 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 결장직장암은 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 결장직장암은 야생형 APC 유전자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 암은 난소암이다. 일부 실시양태에서, 암은 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 폐암이다. 일부 실시양태에서, 암은 상승된 수준의 하나 이상의 RSPO 단백질을 발현한다. 일부 실시양태에서, 암은 상승된 수준의 RSP01을 발현하는 난소암이다. 일부 실시양태에서, 암은 상승된 수준의 RSP02를 발현하는 췌장암이다. 일부 실시양태에서, 암은 상승된 수준의 RSP02를 발현하는 유방암이다. 일부 실시양태에서, 암은 상승된 수준의 RSP02를 발현하는 폐암이다.

[0037] 또 다른 측면에서, 본 발명은 치료 유효량의 각각의 본원에 기술된 것들이 포함되는 RSPO-결합체 또는 항체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서  $\beta$ -카테닌의 활성화 및/또는 비정상적인  $\beta$ -카테닌 신호전달과 연관된 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0038] 각각의 상기 언급된 측면, 뿐만 아니라 본원의 다른 곳에서 기술된 기타 측면 및/또는 실시양태의 특정 실시양태에서, 치료 방법은 RSPO-결합체를 하나 이상의 추가적인 치료제와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료 방법은 RSP01-결합체를 제2 RSPO-결합체 예컨대 RSP02-결합체, RSP03-결합체, 및/또는 RSP04-결합체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료 방법은 RSP02-결합체를 제2 RSPO-결합체 예컨대 RSP01-결합체, RSP03-결합체, 및/또는 RSP04-결합체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료 방법은 RSP01-결합체를 RSP02-결합체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료 방법은 RSP01-결합체, RSP02-결합체 및 화학요법제의 조합물을 투여하는 것을 포함한다.

[0039] 각각의 상기 언급된 측면, 뿐만 아니라 본원의 다른 곳에서 기술된 기타 측면 및/또는 실시양태의 특정 실시양

태에서, 치료 방법은 종양 또는 암에서의 하나 이상의 RSPO 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0040] 또 다른 측면에서, 본 발명은 각각의 본원에 기술된 것들이 포함되지만 이에 한정되지 않는 RSPO-결합체 또는 항체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 확인하거나 또는 인간 대상체를 선택하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 대상체에 정상 조직에서의 동일한 RSPO 단백질의 발현과 비교하여 특정 RSPO (예를 들어, RSP01 또는 RSP02)의 발현 수준이 상승된 종양이 있는지를 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 종양에서 RSPO 발현 수준이 상승된 경우에 치료를 위해 대상체가 확인되거나 또는 치료를 위해 대상체가 선택되는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 대상체에 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이를 포함하는 종양이 있는지를 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 종양이 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이를 포함하는 경우에 치료를 위해 대상체가 확인되거나 또는 치료를 위해 대상체가 선택되는 것을 포함한다.

[0041] 본원에 기술된 RSPO-결합체 또는 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물이 추가로 제공되고, RSPO-결합체를 생산하는 세포주도 추가로 제공된다. 대상체에게 RSPO-결합체를 포함하는 조성물을 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 대상체 (예를 들어, 인간)에서 암을 치료하고/하거나 종양 성장을 억제하는 방법이 또한 제공된다.

[0042] 본 발명의 측면 또는 실시양태가 마쿠쉬 그룹 또는 기타 별법적인 그룹화의 관점에서 기술되는 경우, 본 발명은 총괄적으로 열거된 전체 그룹을 포함할 뿐만 아니라, 개별적인 각각의 구성원, 및 주요 그룹의 모든 가능한 하위 그룹, 그리고 또한 하나 이상의 그룹 구성원이 부재하는 주요 그룹을 또한 포함한다. 본 발명은 청구된 발명에서 하나 이상의 임의의 그룹 구성원이 명확하게 배제되는 것도 또한 구상한다.

### 도면의 간단한 설명

[0043] 도 1. 종양 및 정상 조직에서의 RSPO 발현. 인간의 정상, 양성 및 악성 조직 샘플로부터의 마이크로어레이 데이터의 요약이 제시된다. 개별적인 틱(tick) 마크는 RSPO mRNA의 발현 수준을 가리킨다. a) RSP01 b) RSP02 c) RSP03

도 2. RSPO 단백질 및 LGR5의 결합 연구. LGR5를 발현하는 HEK-293 세포의 FACS 분석. HEK-293 세포를 FLAG-LGR5-CD4TM-GFP를 코딩하는 cDNA 발현 벡터로 일시적으로 형질감염시킨 후, 이어서 가용성 RSP01-Fc, RSP02-Fc, RSP03-Fc, 또는 RSP04-Fc 융합 단백질과 혼합하였다. 항-FLAG 항체가 양성 대조군으로 사용되었고, 가용성 FZD8-Fc가 음성 대조군으로 사용되었다. 각각의 FACS 플롯 상의 진한 선 상자 오버레이 내의 신호의 존재에 의해 특이적 결합이 지시된다.

도 3. 폐 종양 세포-컨디셔닝 배지에서의 억제 활성의 확인. 6xTCF-루시페라제(luciferase) 리포터 검정법을 사용하여 HEK-293 세포에서의  $\beta$ -카테닌 신호전달을 측정하였다. 가용성 LGR5-Fc의 존재 하에 HEK-293 세포를 Wnt3a L 세포-컨디셔닝 배지를 함유하는 대조군 배지 (DMEM 배지) 또는 폐 종양 세포-컨디셔닝 배지 및 Wnt3a L 세포-컨디셔닝 배지를 함유하는 배지에 노출시켰다. 가용성 Jag-Fc 및 항체 LZ1이 음성 대조군으로서 사용되었다. 가용성 FZD8-Fc, 및 Wnt3a를 차단하는 항-FZD 항체가 양성 대조군으로서 사용되었다. 가용성 LGR5-Fc, Jag-Fc 및 FZD8-Fc 융합 단백질은 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 사용되었다. 항-FZD 항체 및 LZ1 항체는 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 사용되었다.

도 4.  $\beta$ -카테닌 신호전달 유도의 억제. 6xTCF-루시페라제 리포터 검정법을 사용하여 HEK-293 세포에서의  $\beta$ -카테닌 신호전달을 측정하였다. 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 0.02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로의 4배 희석의 가용성 LGR5-Fc의 존재 하에 HEK-293 세포를 10 ng/mL RSP02 및 25% Wnt3a L 세포-컨디셔닝 배지를 함유하는 배지 ("RSP02") 또는 25% 폐 종양 세포-컨디셔닝 배지 및 25% Wnt3a L 세포-컨디셔닝 배지를 함유하는 배지 ("LT")에 노출시켰다; RSP02 + LGR5-Fc (-□-) 및 LT + LGR5-Fc (-■-). 가용성 Jag-Fc가 RSP02 (-△-) 또는 LT (-▲-)와 함께 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 음성 대조군으로서 사용되었다. Wnt3a를 차단하는 가용성 FZD8-Fc가 RSP02 (-○-) 또는 LT (-●-)와 함께 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 양성 대조군으로 사용되었다.

도 5. RSP01에 결합하는 항체의 확인. a) 융합 단백질 FLAG-RSP01푸린-CD4TM-GFP의 다이어그램. b) 인간 RSP01에 대해 생성된 항체의 FACS 분석. 상대적인 항체 결합이 y축에 제시되고, FLAG-RSP01푸린-CD4TM-GFP 융합 단백질의 발현이 x축에 제시된다. 각각의 FACS 플롯 상의 진한 선 상자 오버레이 내의 신호의 존재에 의해 양성 결합이 지시된다. 항-FLAG 항체가 양성 대조군으로서 사용되었다. 항-PE 항체가 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 6. RSP01에 의해 유도되는  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는 항-RSP01 항체의 확인. 탑플래시(TOPflash) 루시퍼라제 리포터 검정법을 사용하여, 증가되는 농도의 항-RSP01 항체 (89M2, 89M4, 89M5, 89M7, 89M19 또는 89M25) 또는 관련되지 않은 대조군 항체 (254M14 또는 254M26)의 존재 하에 Wnt3a (5 ng/ml) 및 RSP01 (10 ng/ml)의 조합물에 노출시킨 후의 HEK-293 세포에서의  $\beta$ -카테닌 신호전달을 측정하였다. 10  $\mu$ g/ml에서 0.625  $\mu$ g/ml로의 2배 희석률로서 항체가 사용되었다. 대조군은 대조군 배지 (Wnt3a 없음 및 RSP01 없음), Wnt3a 단독, 또는 항체 부재 하의 Wnt3a 및 RSP01의 조합물에 대한 노출을 포함하였다.

도 7. RSP01/LGR5 결합을 차단하는 항-RSP01 항체의 확인. LGR5를 발현하는 HEK-293 세포의 FACS 분석. HEK-293 세포를 FLAG-LGR5-CD4TM-GFP를 코딩하는 cDNA 발현 벡터로 일시적으로 형질감염시킨 후, 이어서 개별적인 항-RSP01 항체와 조합된 가용성 RSP01-Fc 융합 단백질과 혼합하였다. PE-접합 항-인간 Fc 2차 항체로 결합을 검출하였다. 상대적인 RSP01-Fc 결합이 y축에 제시되고, FLAG-LGR5-CD4TM-GFP 융합 단백질의 발현이 x축에서 지시된다. 각각의 FACS 플롯 상의 진한 선 상자 오버레이 내의 신호의 존재에 의해 양성 결합이 지시된다. 항-PE 항체가 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 8. 항-RSP01 항체로의 종양 성장의 억제. OV19 난소 종양 세포를 NOD/SCID 마우스 내로 피하 주사하였다. 마우스를 89M5 (-●-), 89M25 (-▼-), 탁솔 (-◆-), 항체 89M5 및 탁솔의 조합물 (-○-), 항체 89M25 및 탁솔의 조합물 (-□-), 또는 대조군 항체 1B7.11 (-■-)로 처리하였다. 데이터는 처리 후의 일수에 걸친 종양 부피 ( $\text{mm}^3$ )로서 제시된다.

도 9. 항-RSP01 항체의 에피토프 지도작성. a) 일련의 RSP01 도메인 결실을 함유하는 구축된 융합 단백질의 다이어그램. 이러한 구축물들은 모두 단백질의 세포 표면 발현을 허용하는 CD4TM 도메인을 포함한다. b) 융합 단백질로 형질감염된 세포에 대한 항-RSP01 항체 결합의 FACS 분석. 상대적인 항체 결합이 y축에서 제시되고, 융합 단백질의 발현이 x축에서 지시된다. 항-FLAG 항체가 양성 대조군으로서 사용되었다. 항-PE 항체가 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 10. RSP02에 결합하는 항체의 확인. 인간 RSP02에 대해 생성된 항체의 FACS 분석. 상대적인 항체 결합이 y축에 제시되고, FLAG-RSP02프린-CD4TM-GFP 융합 단백질의 발현이 x축에 제시된다. 항-FLAG 항체가 양성 대조군으로서 사용되었다. 항-PE 항체가 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 11. RSP02에 의한  $\beta$ -카테닌 신호전달의 유도를 억제하는 항-RSP02 항체의 확인. 탑플래시 루시퍼라제 리포터 검정법을 사용하여, RSP02에 대한 항체 (mAb 130M23, 130M24, 130M25, 130M26, 130M27, 및 130M28)의 존재 하에 Wnt3a (5 ng/ml) 및 인간 RSP02 (10 ng/ml) 또는 Wnt3a (5 ng/ml) 및 인간 RSP03 (10 ng/ml)의 조합물에 노출시킨 후의 HEK-293 세포에서의  $\beta$ -카테닌 신호전달을 측정하였다. 대조군은 대조군 배지 (Wnt3a가 첨가되지 않았고 RSP0가 없음 - "세포"로 표지됨), Wnt3a 단독 ("W3A"로 표지됨), 또는 항체 부재 하의 Wnt3a 및 RSP0의 조합물에 대한 노출을 포함하였다.

도 12. RSP02/LGR5 결합을 차단하는 항-RSP02 항체의 확인. LGR5를 발현하는 HEK-293 세포의 FACS 분석. HEK-293 세포를 FLAG-LGR5-CD4TM-GFP를 코딩하는 cDNA 발현 벡터로 일시적으로 형질감염시킨 후, 이어서 개별적인 항-RSP02 항체와 조합된 가용성 RSP02-Fc 융합 단백질과 혼합하였다. PE-접합 항-인간 Fc 2차 항체로 결합을 검출하였다. 상대적인 RSP02-Fc 결합이 y축에 제시되고, FLAG-LGR5-CD4TM-GFP 융합 단백질의 발현이 x축에서 지시된다. 각각의 FACS 플롯 상의 진한 선 상자 오버레이 내의 신호의 존재에 의해 양성 결합이 지시된다. 항-FLAG 항체가 양성 대조군으로 사용되었고, 항-PE 항체가 음성 대조군으로 사용되었다.

도 13. 종양 세포-컨디셔닝 배지에서의 억제 활성의 확인. 가용성 LGR5-Fc, FZD8-Fc, 또는 대조군 융합 Fc 단백질의 존재 하에 STF-293 세포를 대조군 배지 (DMEM 배지), Wnt3a L 세포-컨디셔닝 배지를 함유하는 배지, 종양 세포-컨디셔닝 배지를 함유하는 배지, 또는 종양 세포-컨디셔닝 배지 및 Wnt3a L 세포-컨디셔닝 배지를 함유하는 배지에 노출시켰다. 가용성 LGR5-Fc, FZD8-Fc, 및 대조군-Fc 융합 단백질은 10  $\mu$ g/ml로 사용되었다. 폐 종양 LU2 (도 13a), 폐 종양 LU25 (도 13b), 및 난소 종양 OV38 (도 13c)로부터 종양 세포-컨디셔닝 배지가 제조되었다.

도 14.  $\beta$ -카테닌 신호전달 유도의 억제. STF-293 세포를 LU2 세포 + 25% 폐 종양 세포-컨디셔닝 배지 + 25% Wnt3a-L 세포-컨디셔닝 배지와 함께 인큐베이션하였다. 항체 130M23 (-■-) 및 가용성 LGR5-Fc (-●-)를 50  $\mu$ g/ml에서 0.0006  $\mu$ g/ml로의 5배 단계 희석으로 세포에 첨가하였다. 유사하게 희석된 관련되지 않은 모노클로날 항체 (-□-), 및 대조군 Fc 융합 단백질 (-△-, 50  $\mu$ g/ml)이 음성 대조군으로 사용되었다.

도 15. 항-RSP0 항체로의 종양 성장의 억제. PN31 췌장 종양 세포를 NOD/SCID 마우스 내로 피하 주사하였다.

마우스를 항-RSP01 항체 89M5 (-□-), 항-RSP02 항체 130M23 (-▲-), 쟈시타빈 (-■-), 항체 89M5 및 쟈시타빈의 조합물 (-▼-), 항체 130M23 및 쟈시타빈의 조합물 (-◇-), 또는 대조군 항체 1B7.11 (-○-)로 처리하였다. 데이터는 이식 후의 일수에 걸친 종양 부피 ( $\text{mm}^3$ )로서 제시된다.

도 16. 항-RSP0 항체로의 종양 성장의 억제. PN7 췌장 종양 세포를 NOD/SCID 마우스 내로 피하 주사하였다. 마우스를 항-RSP02 항체 130M23 (-▼-), 항-FZD 항체 18R5 (-▲-), 쟈시타빈 (-●-), 130M23 및 18R5의 조합물 (-○-), 130M23 및 쟈시타빈의 조합물 (-□-), 18R5 및 쟈시타빈의 조합물 (-△-), 130M23, 18R5, 및 쟈시타빈의 조합물 (-◇-), 또는 대조군 항체 1B7.11 (-■-)로 처리하였다. 데이터는 처리 후의 일수에 걸친 종양 부피 ( $\text{mm}^3$ )로서 제시된다 (도 16a). 마우스를 Wnt 경로 억제제 FZD8-Fc 및 쟈시타빈의 조합물 (-△-), 130M23 및 쟈시타빈의 조합물 (-▼-), 130M23, FZD8-Fc, 및 쟈시타빈의 조합물 (-◇-), 쟈시타빈 (-●-), 또는 대조군 항체 1B7.11 (-■-)로 처리하였다. 데이터는 처리 후의 일수에 걸친 종양 부피 ( $\text{mm}^3$ )로서 제시된다 (도 16b). 생성된 종양을 단일 세포 혼탁액으로 프로세싱하고, 연속적으로 마우스 내로 이식하였다. 각각의 처리 군으로부터 수득된 종양으로부터의 90개의 세포를 NOD/SCID 마우스 내로 피하 주사하였다. 처리 없이 종양이 성장되게 하였다. 데이터는 제40일의 종양 부피 ( $\text{mm}^3$ )로서 제시된다 (도 16c).

도 17. 인간화 RSPO 항체의 FACS 분석. a) 인간화 89M5 항체 (h89M5-H2L2) 및 모 89M5 항체의 FACS 분석. 각각의 항체의 5배 단계 희석물을 테스트하였다. 상대적인 항체 결합이 y축에 제시되고, FLAG-RSP01푸린-CD4TM-GFP 융합 단백질의 발현이 x축에서 지시된다. b) 인간화 130M23 항체 (h130M23-H1L2) 및 모 130M23 항체의 FACS 분석. 각각의 항체의 5배 단계 희석물을 테스트하였다. 상대적인 항체 결합이 y축에 제시되고, FLAG-RSP02푸린-CD4TM-GFP 융합 단백질의 발현이 x축에서 지시된다.

도 18. 항-RSP01 및 항-RSP02 항체로의 종양 성장의 억제. B39 삼중 음성 유방암 종양 세포를 NOD/SCID 마우스 내로 피하 주사하였다. 마우스를 항-RSP01 항체 89M5 및 항-RSP02 항체 130M23의 조합물 (-○-), 시스플라틴 (-▼-), 89M5, 130M23 및 시스플라틴의 조합물 (-●-), 또는 대조군 항체 1B7.11 (-■-)로 처리하였다. 데이터는 처리 후의 일수에 걸친 종양 부피 ( $\text{mm}^3$ )로서 제시된다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044]

### 발명의 상세한 설명

[0045]

본 발명은 RSPO 단백질 (예를 들어, 인간 RSP01, RSP02, 및/또는 RSP03)에 결합하는 폴리펩티드 예컨대 항체를 포함하지만 이에 한정되지 않는 신규 작용제를 제공한다. RSPO-결합제에는  $\beta$ -카테닌 신호전달의 길항제가 포함된다. 관련된 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드, RSPO-결합제를 포함하는 조성물, 및 RSPO-결합제를 제조하는 방법이 또한 제공된다. 신규 RSPO-결합제를 사용하는 방법, 예컨대 종양 성장을 억제하는 방법, 암을 치료하는 방법, 종양 내의 암 줄기 세포의 빈도를 감소시키는 방법,  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는 방법, 및/또는 치료를 위해 대상체를 확인 및/또는 선택하는 방법이 추가로 제공된다.

[0046]

인간 RSP01에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체가 확인되었다 - 모노클로날 항체 89M2, 89M4, 89M5, 89M7, 89M19 및 89M25 (실시예 5, 도 5). 항-RSP01 항체 89M2, 89M4, 89M5, 및 89M25는  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제한다 (실시예 6, 도 6). 항-RSP01 항체 89M2, 89M4, 89M5, 및 89M25는 가용성 RSP01이 LGR5에 결합하는 것을 차단한다 (실시예 7, 도 7). 이어서 서열 데이터는 항체 89M2, 89M4, 89M5, 및 89M25가 동일한 중쇄 및 경쇄가변 영역을 함유한다는 것을 입증하였고, 이러한 항체들이 동일한 항원-결합 부위를 포함할 것으로 결론지어졌다. 항-RSP01 항체 89M4, 89M5, 89M7 및 89M25는 인간 및 마우스 RSP01 양쪽 모두에 대한 결합 친화력이 0.1 nM 미만이다 (실시예 8). 89M5의 인간화 버전인 h89M5-H2L2가 생산되었고 (실시예 19), 이는 인간 RSP01에 대한 결합 친화력이 0.1 nM 미만이다 (실시예 20). 항-RSP01 항체 89M5 및 89M25는 단일 작용제로서, 그리고 화학요법제와 조합되어 난소 종양 이종이식 모델에서 생체 내에서 종양 세포 성장을 억제하는 것으로 확인되었다 (실시예 9, 도 8). 항-RSP01 항체 89M5는 화학요법제와 조합되어 췌장 종양 이종이식 모델에서 생체 내에서 종양 세포 성장을 억제하는 것으로 나타났다 (실시예 17, 도 15). 예비 예피토프 지도작성 연구는 RSP01의 푸린2 도메인 내의 아미노산이 항-RSP01 항체 89M5에 대한 결합 부위에서 수반된다는 것을 시사한다 (실시예 10, 도 9).

[0047]

또한, 인간 RSP02에 특이적으로 결합하는 모노클로날 항체가 확인되었다 - 모노클로날 항체 130M23, 130M24, 130M25, 130M26, 130M27, 및 130M28 (실시예 11, 도 10). 항-RSP02 항체 130M23, 130M24, 130M25, 130M26, 130M27, 및 130M28은  $\beta$ -카테닌 신호전달을 감소시키거나 완전히 차단하는 것으로 나타났다 (실시예 12, 도 11). 항-RSP02 항체 130M23 및 130M24는 가용성 RSP02가 LGR5에 결합하는 것을 차단한다 (실시예 13, 도 12).

항-RSP02 항체 130M23는 인간 RSP02에 대한 결합 친화력이 0.14 nM이고, 마우스 RSP02에 대한 결합 친화력이 0.35 nM이다 (실시예 15). 130M23의 인간화 버전인 h130M23-H1L2 및 h130M23-H1L6이 생산되었다 (실시예 19). 항-RSP02 항체 h130M23-H1L2는 인간 RSP02에 대한 결합 친화력이 0.13 nM이고, h130M23-H1L6은 인간 RSP02에 대한 결합 친화력이 0.15 nM이다 (실시예 20). 항-RSP02 항체 130M23은 단일 작용제로서, 그리고 추가적인 치료제와 조합되어 췌장 종양 이종이식 모델에서 생체 내에서 종양 세포 성장을 억제하는 것으로 나타났다 (실시예 17 및 18, 도 15 및 16).

#### [0048] I. 정의

본 발명의 이해를 용이하게 하기 위해, 다수의 용어 및 구절이 하기에서 정의된다.

본원에서 사용되는 경우의 "길항체" 및 "길항성"이라는 용어는 표적 및/또는 신호전달 경로 (예를 들어,  $\beta$ -カテ닌 신호전달)의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나, 감소시키거나 또는 중화하는 임의의 분자를 지칭한다. "길항체"라는 용어는 단백질 (예를 들어, RSP0 단백질)의 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나, 감소시키거나 또는 중화하는 임의의 분자를 포함하도록 본원에서 사용된다. 적절한 길항체 분자에는 특히 길항체 항체 또는 항체 단편이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

본원에서 사용되는 경우의 "조절" 및 "조절하다"라는 용어는 생물학적 활성의 변화 또는 변경을 지칭한다. 조절에는 활성을 자극하거나 억제하는 것이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 조절은 활성의 증가 또는 감소 (예를 들어, RSP0 신호전달의 감소;  $\beta$ -cateenin 신호전달의 감소), 결합 특성의 변화, 또는 단백질, 경로 또는 기타 생물학적 관심 지점의 활성과 연관된 생물학적, 기능적 또는 면역학적 성질의 임의의 기타 변화일 수 있다.

본원에서 사용되는 경우의 "항체"라는 용어는 면역글로불린 분자의 가변 영역 내의 하나 이상의 항원 인식 부위를 통해 표적, 예컨대 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 탄수화물, 폴리뉴클레오티드, 지질, 또는 이들의 조합물을 인식하고 이에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 본원에서 사용되는 경우, 이러한 용어는 무손상 폴리클로날 항체, 무손상 모노클로날 항체, 항체 단편 (예컨대 Fab, Fab', F(ab')2, 및 Fv 단편), 단일쇄 Fv (scFv) 항체, 2개 이상의 무손상 항체로부터 생성된 이중특이적 항체와 같은 다중특이적 항체, 단일특이적 항체, 1가 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 항체의 항원 결정 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 항체가 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항원 인식 부위를 포함하는 임의의 기타 변형된 면역글로불린 분자를 포함한다. 항체는 각각 알파, 델타, 앱실론, 감마 및 뮤로 지칭되는 이의 중쇄 불변 도메인의 신원을 기초로 5가지 주요 면역글로불린 클래스 중 임의의 것일 수 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 또는 이의 서브클래스 (이소형(isotype)) (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2). 상이한 면역글로불린 클래스는 상이하고 주지된 서브유닛 구조 및 3차원 형상을 지닌다. 항체는 네이키드(naked)일 수 있거나 또는 독소 및 방사성 동위원소가 포함되지만 이에 한정되지 않는 다른 분자에 접합될 수 있다.

"항체 단편"이라는 용어는 무손상 항체의 일부분을 지칭하고, 무손상 항체의 항원 결정 가변 영역을 지칭한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')2, 및 Fv 단편, 선형 항체, 단일쇄 항체, 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 본원에서 사용되는 경우의 "항체 단편"은 항원-결합 부위 또는 에피토프 결합 부위를 포함한다.

항체의 "가변 영역"이라는 용어는 단독이거나 조합된 항체 경쇄의 가변 영역 또는 항체 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 영역은 "초가변 영역"으로 또한 공지된 3개의 상보성 결정 영역 (CDR)에 의해 연결된 4개의 프레임워크 영역 (FR)으로 이루어진다. 각각의 사슬 내의 CDR은 프레임워크 영역에 의해 근접하게 유지되고, 다른 사슬로부터의 CDR과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다. CDR을 결정하기 위한 2가지 이상의 기술이 있다: (1) 종-교차 서열 가변성을 기초로 하는 접근법 (즉, 문헌 [Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, National Institutes of Health, Bethesda MD.]), 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정학적 연구를 기초로 하는 접근법 (문헌 [Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol., 273:927-948]). 또한, 이러한 2가지 접근법의 조합이 CDR을 결정하기 위해 때때로 업계에서 사용된다.

본원에서 사용되는 경우의 "모노클로날 항체"라는 용어는 단일 항원 결정인자 또는 에피토프의 고도로 특이적인 인식 및 결합에서 수반되는 균질한 항체 집단을 지칭한다. 이는 상이한 항원 결정인자들에 대해 지시된 상이한 항체들의 혼합물을 전형적으로 포함하는 폴리클로날 항체와 대조적이다. "모노클로날 항체"라는 용어는 무손상 및 전장 모노클로날 항체 양쪽 모두, 뿐만 아니라 항체 단편 (예를 들어, Fab, Fab', F(ab')2, Fv), 단일쇄

(scFv) 항체, 항체 부분을 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인식 부위 (항원-결합 부위)를 포함하는 임의의 기타 변형된 면역글로불린 분자를 포함한다. 또한, "모노클로날 항체"는 하이브리도마 생산, 파지 선별, 재조합 발현 및 트랜스제닉 동물을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 기술에 의해 제조된 이같은 항체를 지칭한다.

[0056] 본원에서 사용되는 경우의 "인간화 항체"라는 용어는 최소량의 비-인간 서열을 함유하는 특이적 면역글로불린 사슬, 키메라 면역글로불린 또는 이의 단편인 비-인간 (예를 들어, 뮤란) 항체의 형태를 지칭한다. 전형적으로, 인간화 항체는 CDR 잔기가 원하는 특이성, 친화력 및/또는 결합 능력을 지니는 비-인간 종 (예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 또는 햄스터)의 CDR로부터의 잔기로 교체된 인간 면역글로불린이다 (문헌 [Jones et al., 1986, Nature, 321:522-525]; [Riechmann et al., 1988, Nature, 332:323-327]; [Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536]). 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역 잔기가 원하는 특이성, 친화력 및/또는 결합 능력을 지니는 비-인간 종으로부터의 항체 내의 상응하는 잔기로 교체된다. 항체 특이성, 친화력 및/또는 결합 능력을 정련하고 최적화하기 위해 Fv 프레임워크 영역 내 및/또는 교체된 비-인간 잔기 내의 추가적인 잔기의 치환에 의해 인간화 항체가 추가로 변형될 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간 면역글로불린에 상응하는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR을 함유하는 하나 이상, 전형적으로는 2개 또는 3개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것인 한편, 모든 또는 실질적으로 모든 프레임워크 영역은 인간 면역글로불린 컨센서스(consensus) 서열의 것이다. 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인 (Fc)의 적어도 일부분, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 것을 또한 포함할 수 있다. 인간화 항체를 생성시키는데 사용되는 방법의 예가, 예를 들어, 미국 특허 5,225,539에 기술되어 있다.

[0057] 본원에서 사용되는 경우의 "인간 항체"라는 용어는 인간에 의해 생산된 항체, 또는 업계에 공지된 기술 중 임의의 것을 사용하여 제조된, 인간에 의해 생산된 항체에 상응하는 아미노산 서열의 항체를 지칭한다. 인간 항체의 이러한 정의는 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 명확하게 제외한다.

[0058] 본원에서 사용되는 경우의 "키메라 항체"라는 용어는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열이 2가지 이상의 종으로부터 유래되는 항체를 지칭한다. 전형적으로, 경쇄 및 중쇄 양쪽 모두의 가변 영역은 원하는 특이성, 친화력 및/또는 결합 능력이 있는 한가지 종의 포유동물 (예를 들어, 마우스, 래트, 토끼 등)로부터 유래된 항체의 가변 영역에 상응하는 한편, 불변 영역은 또 다른 종 (일반적으로 인간)으로부터 유래된 항체의 서열과 상동성이어서 이러한 종에서 면역 반응을 유발하는 것을 방지한다.

[0059] 본원에서 사용되는 경우의 "친화력 성숙 항체"라는 구절은 변경(들)을 보유하지 않는 모 항체와 비교하여 항원에 대한 항체의 친화력에서의 개선을 초래하는 하나 이상의 변경이 하나 이상의 CDR 내에 있는 항체를 지칭한다. 바람직한 친화력 성숙 항체는 표적 항원에 대한 친화력이 나노몰 또는 심지어 피코몰일 것이다. 업계에 공지된 절차에 의해 친화력 성숙 항체가 생산된다. 예를 들어, VH 및 VL 도메인 셔플링(shuffling)에 의한 친화력 성숙이 문헌 [Marks et al., 1992, Bio/Technology 10:779-783]에 기술되어 있다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이유발이 문헌 [Barbas et al., 1994, PNAS, 91:3809-3813]; [Schier et al., 1995, Gene, 169:147-155]; [Yelton et al., 1995, J. Immunol. 155:1994-2004]; [Jackson et al., 1995, J. Immunol., 154:3310-9]; 및 [Hawkins et al., 1992, J. Mol. Biol., 226:889-896]에 기술되어 있다.

[0060] "에피토프" 및 "항원 결정인자"라는 용어는 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 특정 항체가 인식하고 특이적으로 결합할 수 있는 항원의 부분을 지칭한다. 항원이 폴리펩티드인 경우, 에피토프는 인접한 아미노산들 및 단백질의 3차 폴딩(folding)에 의해 병치된 인접하지 않은 아미노산들 양쪽 모두로부터 형성될 수 있다. 인접한 아미노산들로부터 형성된 에피토프 (선형 에피토프로도 지칭됨)는 전형적으로 단백질 변성 시에 유지되는 반면, 3차 폴딩에 의해 형성된 에피토프 (형상 에피토프로도 지칭됨)은 전형적으로 단백질 변성 시 상실된다. 전형적으로 에피토프는 독특한 공간 형상의 적어도 3개, 더욱 일반적으로는 적어도 5개 또는 8-10개의 아미노산을 포함한다.

[0061] "선택적으로 결합한다" 또는 "특이적으로 결합한다"는 결합체 또는 항체가 관련되지 않은 단백질이 포함되는 별법적인 물질보다 더욱 빈번하게, 더욱 신속하게, 더 긴 기간 동안, 더 큰 친화력으로, 또는 상기의 것들의 일부 조합으로 에피토프, 단백질 또는 표적 분자와 반응하거나 회합된다는 것을 의미한다. 특정 실시양태에서, "특이적으로 결합한다"는, 예를 들어, 항체가 약 0.1 mM 이하, 더욱 일반적으로는 약 1 μM 미만의 K<sub>D</sub>로 단백질과 결합한다는 것을 의미한다. 특정 실시양태에서, "특이적으로 결합한다"는 항체가 때로는 적어도 약 0.1 μM 이하, 때로는 적어도 약 0.01 μM 이하, 때로는 적어도 약 1 nM 이하의 K<sub>D</sub>로 표적과 결합한다는 것을 의미한다. 상이한 종에서의 상동성 단백질 간의 서열 동일성으로 인해, 특이적 결합은 1가지를 초과하는 종에서의 단백질 (예를 들어, 인간 RSP01 및 마우스 RSP01)을 인식하는 항체를 포함할 수 있다. 마찬가지로, 상이한 단백질들의

폴리펩티드 서열의 특정 영역에서의 상동성으로 인해, 특이적 결합은 1가지를 초과하는 단백질 (예를 들어, 인간 RSP01 및 인간 RSP02)을 인식하는 항체 (또는 기타 폴리펩티드 또는 결합체)를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 제1 표적을 특이적으로 인식하는 항체 또는 결합 모이어티(moiety)가 제2 표적에 특이적으로 결합할 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있는 것으로 이해된다. 그러므로, "특이적 결합"은 배타적인 결합, 즉 단일 표적에 대한 결합을 (포함할 수는 있지만) 필수적으로 요구하지 않는다. 따라서, 특정 실시양태에서, 항체는 1가지를 초과하는 표적에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 다중 표적에 항체 상의 동일한 항원-결합 부위가 결합할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 항체가 2개의 동일한 항원-결합 부위를 포함할 수 있고, 이들 각각은 2개 이상의 단백질 (예를 들어, RSP01 및 RSP02) 상의 동일한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 특정한 별법적인 실시양태에서, 항체는 이중특이적 또는 다중특이적일 수 있고, 특이성이 상이한 2개 이상의 항원-결합 부위를 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 이중특이적 항체는 1개의 단백질 (예를 들어, 인간 RSP01) 상의 에피토프를 인식하는 1개의 항원-결합 부위를 포함할 수 있고, 제2 단백질 상의 상이한 에피토프를 인식하는 제2의 상이한 항원-결합 부위를 추가로 포함한다. 일반적으로, 필수적이지는 않지만, 결합에 대한 언급은 특이적 결합을 의미한다.

[0062]

"폴리펩티드" 및 "펩티드" 및 "단백질"이라는 용어들은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 임의 길이의 아미노산 중합체를 지칭한다. 이러한 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있으며, 비-아미노산에 의해 중단될 수 있다. 이러한 용어는 천연적으로 또는 개입, 예를 들어, 디슬퍼드 결합 형성, 당화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 임의의 기타 조작 또는 변형, 예컨대 표지 성분의 접합에 의해 변형된 아미노산 중합체를 또한 포함한다. 이러한 정의에는, 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 유사체 (예를 들어, 비천연 아미노산이 포함됨), 뿐만 아니라 업계에 공지된 기타 변형을 함유하는 폴리펩티드가 또한 포함된다. 본 발명의 폴리펩티드는 항체를 기초로 하기 때문에, 특정 실시양태에서 폴리펩티드가 단일쇄 또는 회합된 사슬로서 발생할 수 있는 것으로 이해된다.

[0063]

"폴리뉴클레오티드" 및 "핵산"이라는 용어들은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 임의 길이의 뉴클레오티드 중합체를 지칭하며, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해 중합체 내로 혼입될 수 있는 임의의 기질일 수 있다.

[0064]

"고 염격성 조건"은 (1) 세척용으로 낮은 이온 강도 및 높은 온도, 예를 들어 15 mM 염화나트륨/1.5 mM 시트르산나트륨/0.1% 소듐 도데실 술페이트, 50°C를 사용하는 것; (2) 혼성화 동안 변성제, 예컨대 포름아미드, 예를 들어, 50% (v/v) 포름아미드 + 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% 피콜(Ficoll)/0.1% 폴리비닐피롤리돈/50 mM 인산나트륨 완충제, pH 6.5 + 750 mM 염화나트륨, 75 mM 시트르산나트륨, 42°C를 사용하는 것; 또는 (3) 50% 포름아미드, 5× SSC (0.75 M NaCl, 75 mM 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5× 덴하르트 용액, 초음파처리된 연어 정자 DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, 및 10% 텍스트란 술페이트, 42°C를 사용하고, 42°C, 0.2× SSC 및 50% 포름아미드, 55°C에서 세정한 후, EDTA를 함유하는 0.1× SSC, 55°C로 이루어지는 고-염격성 세정이 이어지는 것에 의해 확인될 수 있다.

[0065]

2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드의 문맥에서의 "동일한" 또는 "동일성" 백분율이라는 용어는 최대 상응성을 위해 비교 및 정렬되었을 때 (필요하다면 캡(gap)이 도입됨), 동일하거나 또는 상술된 백분율의 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기를 지니는 2개 이상의 서열 또는 하위 서열을 지칭하고, 이때 임의의 보존적 아미노산 치환은 서열 동일성의 일부로 간주되지 않는다. 서열 비교 소프트웨어 또는 알고리즘을 이용하여 또는 육안 검사로 동일성 백분율을 측정할 수 있다. 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열의 정렬을 수득하는데 사용될 수 있는 다양한 알고리즘 및 소프트웨어가 업계에 공지되어 있다. 여기에는 BLAST, ALIGN, 메갈라인(Megalign), 베스트핏(BestFit), GCG 위스콘신 패키지(Wisconsin Package), 및 이의 변형이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 2개의 본 발명의 핵산 또는 폴리펩티드가 실질적으로 동일하다는 것은 서열 비교 알고리즘을 사용하여 또는 육안 검사로 측정된 바와 같이 최대 상응성을 위해 비교 및 정렬되었을 때 이들이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 일부 실시양태에서는 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기 동일성이 있다는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 길이가 적어도 약 10개, 적어도 약 20개, 적어도 약 40-60개의 잔기, 적어도 약 60-80개의 잔기 또는 이들 사이의 임의의 정수 값인 서열의 영역에 걸쳐 동일성이 존재한다. 일부 실시양태에서, 60-80개의 잔기보다 긴 영역, 예컨대 적어도 약 80-100개의 잔기에 걸쳐 동일성이 존재하고, 일부 실시양태에서, 비교되는 서열들의 전장, 예컨대 뉴클레오티드 서열의 코딩 영역에 걸쳐 서열들이 실질적으로 동일하다.

[0066]

"보존적 아미노산 치환"은 1개의 아미노산 잔기가 유사한 측쇄가 있는 또 다른 아미노산 잔기로 교체되는 것이

다. 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 전하를 띠지 않는 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 타이로신, 시스테인), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 타이로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)가 포함되는 유사한 측쇄가 있는 아미노산 잔기들의 패밀리가 업계에 규정되어 있다. 예를 들어, 페닐알라닌이 타이로신을 치환하는 것은 보존적 치환이다. 바람직하게는, 본 발명의 폴리펩티드 및 항체의 서열 내에서의 보존적 치환은 이러한 아미노산 서열을 함유하는 폴리펩티드 또는 항체가 항원(들), 즉 폴리펩티드 또는 항체가 결합하는 하나 이상의 RSPO 단백질(들)에 결합하는 것을 폐지하지 않는다. 항원 결합을 제거하지 않는 뉴클레오티드 및 아미노산 보존적 치환을 확인하는 방법이 업계에 주지되어 있다.

[0067] 본원에서 사용되는 경우의 "벡터"라는 용어는 하나 이상의 관심 유전자(들) 또는 서열(들)을 숙주 세포 내에 전달할 수 있고, 일반적으로는 이를 발현할 수 있는 구축물을 의미한다. 벡터의 예로는 바이러스 벡터, 네이키드 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드, 또는 파지 벡터, 양이온성 축합제와 결합된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 및 리포솜 내에 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0068] "단리된" 폴리펩티드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포, 또는 조성물은 천연에서 발견되지 않는 형태의 폴리펩티드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포, 또는 조성물이다. 단리된 폴리펩티드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포 또는 조성물에는 더 이상 천연에서 발견되는 형태가 아닌 정도로 정제된 것들이 포함된다. 일부 실시양태에서, 단리된 폴리펩티드, 항체, 폴리뉴클레오티드, 벡터, 세포, 또는 조성물은 실질적으로 순수하다.

[0069] 본원에서 사용되는 경우의 "실질적으로 순수한"이라는 용어는 적어도 50% 순수하거나 (즉, 오염물질이 없음), 적어도 90% 순수하거나, 적어도 95% 순수하거나, 적어도 98% 순수하거나, 또는 적어도 99% 순수한 물질을 지칭한다.

[0070] 본원에서 사용되는 경우의 "암" 및 "암성"이라는 용어는 세포 집단이 조절되지 않은 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 지칭하거나 기술한다. 암의 예로는 암종, 모세포종, 육종, 및 혈액암 예컨대 림프종 및 백혈병이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0071] 본원에서 사용되는 경우의 "종양" 및 "신생물"이라는 용어는 과도한 세포 성장 또는 증식으로부터 초래되는, 전 암성 병변이 포함되는 악성 (암성) 또는 양성 (비-암성)의 임의의 조직 덩어리를 지칭한다.

[0072] 본원에서 사용되는 경우의 "전이"라는 용어는 새로운 위치에서 유사한 암성 병변이 발달되면서 암이 원래 부위에서 신체의 다른 영역으로 확산되거나 이전되는 프로세스를 지칭한다. "전이성" 또는 "전이" 세포는 이웃 세포와의 점착성 접촉을 상실하고 혈류 또는 림프를 통해 1차 질환 부위로부터 이동하여 이웃 신체 구조를 침습하는 것이다.

[0073] "암 줄기 세포" 및 "CSC" 및 "종양 줄기 세포" 및 "종양 개시 세포"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, (1) 광범위한 증식 능력이 있고; 2) 하나 이상의 유형의 분화된 세포 자손이 생성되도록 비대칭 세포 분열을 할 수 있고, 이때 분화된 세포는 증식 또는 발달 잠재력이 감소되며; (3) 자가-재생 또는 자가-유지를 위해 대칭적 세포 분열을 할 수 있는 암 또는 종양으로부터의 세포를 지칭한다. 이러한 성질들은 종양을 형성하는데 실패하는 대다수의 종양 세포와 비교하여 면역손상 숙주 (예를 들어, 마우스) 내로의 연속 이식 시 종양 또는 암을 형성하거나 확립하는 능력을 암 줄기 세포에 부여한다. 암 줄기 세포에서 무질서한 방식으로 자가-재생 대 분화가 진행되어, 돌연변이가 발생함에 따라 경시적으로 변화할 수 있는 비정상적인 세포 유형의 종양이 형성된다.

[0074] "암 세포" 및 "종양 세포"라는 용어는 대부분의 암 세포 집단을 포함하는 비-종양발생성인 세포, 및 종양발생성인 줄기 세포 (암 줄기 세포) 양쪽 모두를 포함하여, 암 또는 종양 또는 전암성 병변으로부터 유래된 전체 세포 집단을 지칭한다. 본원에서 사용되는 경우, 재생 및 분화 능력이 없는 세포만 지칭하여 이러한 종양 세포를 암 줄기 세포와 구별할 때 "비-종양발생성인"이라는 용어가 "암 세포" 또는 "종양 세포"라는 용어를 수식할 것이다.

[0075] 본원에서 사용되는 경우의 "종양발생성인"이라는 용어는 자가-재생 (추가적인 종양발생성인 암 줄기 세포가 초래됨) 및 모든 다른 종양 세포가 생성되는 증식 (분화되고, 따라서 비-종양발생성인 종양 세포가 초래됨)의 성질이 포함되는 암 줄기 세포의 기능적인 특색을 지칭한다.

[0076] 본원에서 사용되는 경우의 "종양발생성"이라는 용어는 면역손상 숙주 (예를 들어, 마우스) 내로의 연속 이식 시

촉진성 종양을 형성하는 종양으로부터의 세포의 무작위 샘플의 능력을 지칭한다.

[0077] "대상체"라는 용어는 특정 치료의 수용자가 될, 인간, 비-인간 영장류, 개과 동물, 고양이과 동물, 설치류 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 동물(예를 들어, 포유동물)을 지칭한다. 전형적으로, "대상체" 및 "환자"라는 용어들은 인간 대상체와 관련하여 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0078] "제약상 허용되는"이라는 용어는 인간이 포함되는 동물에서의 사용에 대해 연방 정부 또는 주 정부의 감독 기관에 의해 승인되었거나 또는 승인가능하거나, 또는 미국 약전 또는 기타 일반적으로 인정되는 약전에 열거된 것을 지칭한다.

[0079] "제약상 허용되는 부형제, 담체 또는 아주반트(adjuvant)" 또는 "허용되는 제약 담체"는 하나 이상의 본 개시내용의 결합제(예를 들어, 항체)와 함께 대상체에게 투여될 수 있고 이의 약리학적 성질을 파괴하지 않으며, 치료 효과를 전달하는데 충분한 용량으로 투여되었을 때 비독성인 부형제, 담체 또는 아주반트를 지칭한다.

[0080] "유효량" 또는 "치료 유효량" 또는 "치료 효과"라는 용어는 대상체 또는 포유동물에서 질환 또는 장애를 "치료"하는데 효과적인 결합제, 항체, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 소형 유기 분자, 또는 기타 약물의 양을 지칭한다. 암의 경우, 치료 유효량의 약물(예를 들어, 항체)은 치료 효과가 있고, 따라서 암 세포의 개수를 감소시킬 수 있거나; 종양발생성, 종양발생 빈도 또는 종양발생 능력을 감소시킬 수 있거나; 암 줄기 세포의 개수 또는 빈도를 감소시킬 수 있거나; 종양 크기를 감소시킬 수 있거나; 암 세포 집단을 감소시킬 수 있거나; 주변기관 내로의 암 세포 침윤(예를 들어, 연질 조직 및 골 내로의 암 확산이 포함됨)을 억제하거나 정지시킬 수 있거나; 종양 또는 암 세포 전이를 억제하고 정지시킬 수 있거나; 종양 또는 암 세포 성장을 억제하고 정지시킬 수 있거나; 암과 연관된 증상 중 하나 이상을 어느 정도로 완화시킬 수 있거나; 이환율 및 사망률을 감소시킬 수 있거나; 삶의 질을 개선할 수 있거나; 또는 이같은 효과들의 조합이 가능하다. 작용제, 예를 들어 항체가 기준의 암 세포의 성장을 방지하고/하거나 이를 사망시킨다는 점에서, 이는 세포증식억제성 및/또는 세포독성으로 지칭될 수 있다.

[0081] "치료하는" 또는 "치료" 또는 "치료한다", 또는 "경감시키는" 또는 "경감시킨다"는 1) 진단된 병리학적 용태 또는 장애를 치유하고/하거나, 늦추고/늦추거나, 이의 증상을 줄이고/줄이거나 이의 진행을 중단시키는 치료적 수단, 및 2) 표적화된 병리학적 용태 또는 장애의 발달을 방지하거나 느리게 하는 예방적 또는 방지적 수단 양쪽 모두를 지칭한다. 따라서, 치료를 필요로 하는 이에는 이미 장애에 걸린 이; 장애에 걸리기 쉬운 이; 및 장애가 방지되어야 하는 이가 포함된다. 일부 실시양태에서, 환자가 하기의 것들 중 하나 이상을 나타내면 대상체가 본 발명의 방법에 따라 성공적으로 "치료"된다: 암 세포 개수의 감소 또는 암 세포의 완전한 부재; 종양 크기 감소; 연조직 및 골 내로의 암 세포 확산이 포함되는 주변 기관 내로의 암 세포 침윤의 억제 또는 부재; 종양 또는 암 세포 전이의 억제 또는 부재; 암 성장의 억제 또는 부재; 특정 암과 연관된 하나 이상의 증상의 완화; 이환율 및 사망율 감소; 삶의 질 개선; 종양발생성 감소; 암 줄기 세포의 개수 또는 빈도 감소; 또는 효과들의 일부 조합.

[0082] 본 개시내용 및 청구항에서 사용되는 경우, 단수 형태의 관사 ("a", "an" 및 "the")는 문맥적으로 명확하게 달리 지시되지 않는 한 복수 형태를 포함한다.

[0083] 실시양태가 본원에서 "포함하는"이라는 술어와 함께 기술되는 어떠한 경우에든, "~로 이루어진" 및/또는 "본질적으로 ~로 이루어진"의 표현으로 기술된, 다른 면에서는 유사한 실시양태가 또한 제공되는 것으로 이해된다.

[0084] 본원에서 "A 및/또는 B"와 같은 구절에서 사용되는 경우의 "및/또는"이라는 용어는 A 및 B 양쪽 모두; A 또는 B; A (단독); 및 B (단독)을 포함하도록 의도된다. 마찬가지로, "A, B, 및/또는 C"와 같은 구절에서 사용되는 경우의 "및/또는"이라는 용어는 하기의 실시양태 각각을 포함하도록 의도된다: A, B, 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A (단독); B (단독); 및 C (단독).

## II. RSPO-결합제

[0085] 본 발명은 인간 RSPO 단백질에 결합하는 작용제를 제공한다. 이러한 작용제는 본원에서 "RSPO-결합제"로 지칭된다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는 항체이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는 폴리펩티드이다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합제는 RSP01에 결합한다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합제는 RSP02에 결합한다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합제는 RSP03에 결합한다. 특정 실시양태에서, RSPO-작용제는 하나 이상의 다른 인간 RSPO에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합제가 결합하는 하나 이상의 다른 인간 RSPO는 RSP02, RSP03, 및 RSP04로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합제가 결합하는 하나 이상의 다른 인간 RSPO는 RSP01, RSP03, 및 RSP04로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서,

RSP03-결합체가 결합하는 하나 이상의 다른 인간 RSP0는 RSP01, RSP02, 및 RSP04로 이루어진 군으로부터 선택된다. 인간 RSP01, RSP02, RSP03, 및 RSP04에 대한 전장 아미노산 (aa) 서열이 업계에 공지되어 있고, 본원에서 서열 1 (RSP01), 서열 2 (RSP02), 서열 3 (RSP03), 및 서열 4 (RSP04)로서 제공된다.

[0087] 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 RSP0-결합체 (예를 들어, 항체)의 항원-결합 부위는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 RSP0에 결합할 수 있다 (또는 결합한다). 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 RSP01-결합체 (예를 들어, 항체)의 항원-결합 부위는 RSP01, 뿐만 아니라 1개, 2개 또는 3개의 다른 RSP0에 결합할 수 있다 (또는 결합한다). 예를 들어, 특정 실시양태에서, RSP01-결합체의 항원-결합 부위는 RSP01, 뿐만 아니라 RSP02, RSP03, 및 RSP04로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 다른 RSP0에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 RSP01 및 RSP02에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 RSP01 및 RSP03에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 RSP01 및 RSP04에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 RSP01, RSP02, 및 RSP03에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 RSP01, RSP02, 및 RSP04에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 RSP01, RSP03, 및 RSP04에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 인간 RSP01에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체 (예를 들어, 항체)는 인간 RSP01 및 마우스 RSP01 양쪽 모두에 특이적으로 결합한다.

[0088] 특정 실시양태에서, 작용제-결합체는 인간 RSP01의 아미노산 21-263 내에서 특이적으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 작용제-결합체는 인간 RSP01의 아미노산 31-263 내에서 특이적으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 항원-결합체는 인간 RSP01의 아미노산 34-135 내에서 특이적으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 항원-결합체는 인간 RSP01의 아미노산 91-135 내에서 특이적으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 5 내에서 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 9 내에서 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체 또는 항체는 RSP01의 푸린-유사 시스테인-풍부 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 작용제 또는 항체는 RSP01의 푸린-유사 시스테인-풍부 도메인 내의 하나 이상의 아미노산에 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체 또는 항체는 서열 6 또는 서열 7의 서열 내에서 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체 또는 항체는 서열 6 및 서열 7의 서열 내에서 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 RSP01의 트롬보스폰딘 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체 또는 항체는 RSP01의 트롬보스폰딘 도메인 내의 하나 이상의 아미노산에 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체 또는 항체는 서열 8 내에서 결합한다.

[0089] 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)의 항원-결합 부위는 RSP02, 뿐만 아니라 1개, 2개 또는 3개의 다른 RSP0에 결합할 수 있다 (또는 결합한다). 예를 들어, 특정 실시양태에서, RSP02-결합체의 항원-결합 부위는 RSP02, 뿐만 아니라 RSP01, RSP03, 및 RSP04로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 다른 RSP0에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 RSP02 및 RSP01에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 RSP02 및 RSP03에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 RSP02 및 RSP04에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 RSP02, RSP03, 및 RSP04에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 RSP02, RSP01, 및 RSP03에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 인간 RSP02에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)는 인간 RSP02 및 마우스 RSP02 양쪽 모두에 특이적으로 결합한다.

[0090] 특정 실시양태에서, 작용제-결합체는 인간 RSP02의 아미노산 22-243 내에서 특이적으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 작용제-결합체는 인간 RSP02의 아미노산 22-205 내에서 특이적으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 항원-결합체는 인간 RSP02의 아미노산 31-146 내에서 특이적으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 항원-결합체는 인간 RSP02의 아미노산 31-89 내에서 특이적으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 항원-결합체는 인간 RSP02의 아미노산 90-134 내에서 특이적으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 항원-결합체는 인간 RSP02의 아미노산 90-146 내에서 특이적으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 서열 43 내에서 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 서열 44 내에서 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체 또는 항체는 RSP02의 푸린-유사 시스테인-풍부 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 작용제 또는 항체는 RSP02의 푸린-유사 시스테인-풍부 도메인 내의 하나 이상의 아미노산에 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체 또는 항체는 서열 45 또는 서열 46의 서열 내에서 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체 또는 항체는 서열 45 및 서열 46의 서열 내에서 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 RSP02의 트롬보스폰딘 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체 또는 항체는

RSP02의 트롬보스폰딘 도메인 내의 하나 이상의 아미노산에 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체 또는 항체는 서열 47 내에서 결합한다.

[0091] 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 RSP03-결합체 (예를 들어, 항체)의 항원-결합 부위는 RSP03, 뿐만 아니라 1개, 2개 또는 3개의 다른 RSP04에 결합할 수 있다 (또는 결합한다). 예를 들어, 특정 실시양태에서, RSP03-결합체의 항원-결합 부위는 RSP03, 뿐만 아니라 RSP01, RSP02, 및 RSP04로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 다른 RSP04에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, RSP03-결합체는 RSP03 및 RSP01에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP03-결합체는 RSP03 및 RSP02에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP03-결합체는 RSP03 및 RSP04에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP03-결합체는 RSP03, RSP01, 및 RSP02에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP03-결합체는 RSP03, RSP01, 및 RSP04에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP03-결합체는 RSP03, RSP02, 및 RSP04에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP03-결합체는 인간 RSP03에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP03-결합체 (예를 들어, 항체)는 인간 RSP03 및 마우스 RSP03 양쪽 모두에 특이적으로 결합한다.

[0092] 특정 실시양태에서, 작용제-결합체는 인간 RSP03의 아미노산 22-272 내에서 특이적으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 작용제-결합체는 인간 RSP03의 아미노산 22-207 내에서 특이적으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 항원-결합체는 인간 RSP03의 아미노산 35-135 내에서 특이적으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 항원-결합체는 인간 RSP03의 아미노산 35-86 내에서 특이적으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 항원-결합체는 인간 RSP03의 아미노산 92-135 내에서 특이적으로 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, RSP03-결합체는 서열 48 내에서 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP03-결합체 또는 항체는 RSP03의 푸린-유사 시스테인-풍부 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 작용제 또는 항체는 RSP03의 푸린-유사 시스테인-풍부 도메인 내의 하나 이상의 아미노산에 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP03-결합체 또는 항체는 서열 49 또는 서열 50의 서열 내에서 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP03-결합체 또는 항체는 서열 49 및 서열 50의 서열 내에서 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP03-결합체는 RSP03의 트롬보스폰딘 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP03-결합체 또는 항체는 RSP03의 트롬보스폰딘 도메인 내의 하나 이상의 아미노산에 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP03-결합체 또는 항체는 서열 51 내에서 결합한다.

[0093] 특정 실시양태에서, RSP0-결합체 또는 항체는 하나 이상의 RSP0 단백질에 약 1  $\mu\text{M}$  이하, 약 100 nM 이하, 약 40 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하, 또는 약 0.1 nM 이하의 해리 상수 ( $K_D$ )로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체 또는 항체는 RSP01에 약 1  $\mu\text{M}$  이하, 약 100 nM 이하, 약 40 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하, 또는 약 0.1 nM 이하의 해리 상수 ( $K_D$ )로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체 또는 항체는 RSP01에 약 1 nM 이하의  $K_D$ 로 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 RSP01-결합체 또는 항체는 하나 이상의 다른 RSP0에 결합한다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 다른 RSP0에 결합하는 본원에 기술된 RSP01-결합체 또는 항체는 하나 이상의 다른 RSP0에 약 100 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하 또는 약 0.1 nM 이하의  $K_D$ 로 결합한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, RSP01-결합체 또는 항체는 또한 RSP02, RSP03, 및/또는 RSP04에 약 10 nM 이하의  $K_D$ 로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체 (예를 들어, 항체)는 인간 RSP01에 약 0.1 nM 이하의  $K_D$ 로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP0-결합체는 인간 RSP0 및 마우스 RSP0 양쪽 모두에 약 10 nM 이하의  $K_D$ 로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 인간 RSP01 및 마우스 RSP01 양쪽 모두에 약 1 nM 이하의  $K_D$ 로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 인간 RSP01 및 마우스 RSP01 양쪽 모두에 약 0.1 nM 이하의  $K_D$ 로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체 또는 항체는 RSP02에 약 1  $\mu\text{M}$  이하, 약 100 nM 이하, 약 40 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하, 또는 약 0.1 nM 이하의 해리 상수 ( $K_D$ )로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체 또는 항체는 RSP02에 약 10 nM 이하의  $K_D$ 로 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 RSP02-결합체 또는 항체는 하나 이상의 다른 RSP0에 결합한다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 다른 RSP0에 결합하는 본원에 기술된 RSP02-결합체 또는 항체는 하나 이상의 다른 RSP0에 약 100 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하 또는 약 0.1 nM 이하의  $K_D$ 로 결합한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, RSP02-결합체 또는 항체는 또한 RSP01, RSP03, 및/또는 RSP04에 약 10 nM 이하의  $K_D$ 로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)는 인간 RSP02에 약 1 nM 이하의  $K_D$ 로 결합한다.

결합한다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 인간 RSPO 및 마우스 RSPO 양쪽 모두에 약 10 nM 이하의  $K_D$ 로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합체는 인간 RSPO2 및 마우스 RSPO2 양쪽 모두에 약 1 nM 이하의  $K_D$ 로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합체는 인간 RSPO2 및 마우스 RSPO2 양쪽 모두에 약 0.1 nM 이하의  $K_D$ 로 결합한다. 일부 실시양태에서, RSPO 단백질에 대한 결합체 (예를 들어, 항체)의 해리 상수는 비아코어 (Biacore) 침 상에 고정된 RSPO 단백질의 적어도 일부분을 포함하는 RSPO 융합 단백질을 사용하여 결정된 해리 상수이다.

[0094] 특정 실시양태에서, RSPO-결합체 (예를 들어, 항체)는 하나 이상의 인간 RSPO 단백질에 약 1  $\mu\text{M}$  이하, 약 100 nM 이하, 약 40 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하, 또는 약 0.1 nM 이하의 절반 최대 유효 농도 ( $EC_{50}$ )로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSPO1-결합체 (예를 들어, 항체)는 인간 RSPO1에 약 1  $\mu\text{M}$  이하, 약 100 nM 이하, 약 40 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하, 또는 약 0.1 nM 이하의 절반 최대 유효 농도 ( $EC_{50}$ )로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSPO1-결합체 (예를 들어, 항체)는 또한 인간 RSPO2, RSPO3, 및/또는 RSPO4에 약 40 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하 또는 약 0.1 nM 이하의  $EC_{50}$ 으로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSPO2-결합체 (예를 들어, 항체)는 인간 RSPO2에 약 1  $\mu\text{M}$  이하, 약 100 nM 이하, 약 40 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하, 또는 약 0.1 nM 이하의 절반 최대 유효 농도 ( $EC_{50}$ )로 결합한다. 특정 실시양태에서, RSPO2-결합체 (예를 들어, 항체)는 또한 인간 RSPO1, RSPO3, 및/또는 RSPO4에 약 40 nM 이하, 약 20 nM 이하, 약 10 nM 이하, 약 1 nM 이하 또는 약 0.1 nM 이하의  $EC_{50}$ 으로 결합한다.

[0095] 특정 실시양태에서, RSPO-결합체는 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 재조합 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 IgG1 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 IgG2 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체는 항원-결합 부위를 포함하는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체는 1가, 단일특이적, 2가, 이중특이적, 또는 다중특이적이다. 일부 실시양태에서, 항체는 세포독성 모이어티에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항체는 단리된다. 일부 실시양태에서, 항체는 실질적으로 순수하다.

[0096] 본 발명의 RSPO-결합체 (예를 들어, 항체)를 업계에 공지된 임의의 방법에 의해 특이적 결합에 대해 검정할 수 있다. 사용될 수 있는 면역검정법에는 비아코어 분석, FACS 분석, 면역형광, 면역세포화학, 웨스턴(Western) 블롯, 방사성면역검정법, ELISA, "샌드위치" 면역검정법, 면역침전 검정법, 침전 반응, 겔 확산 침강소 반응, 면역확산 검정법, 응집 검정법, 보체-고정 검정법, 면역방사능측정 검정법, 형광 면역검정법 및 단백질 A 면역 검정법과 같은 기술을 사용하는 경쟁적 및 비-경쟁적 검정 시스템이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 이 같은 검정법들은 일상적이고, 업계에 주지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Ausubel et al., Editors, 1994-present, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, NY] 참조).

[0097] 예를 들어, 인간 RSPO1에 대한 항체의 특이적 결합을 ELISA를 사용하여 결정할 수 있다. ELISA 검정법은 항원을 제조하는 단계, 96웰 미량역가 플레이트의 웰을 항원으로 코팅하는 단계, 검출가능한 화합물 예컨대 효소 기질 (예를 들어, 양고추냉이 과산화효소 또는 알칼리성 포스파타제(phosphatase))에 접합된 RSPO1-결합 항체 또는 기타 RSPO1-결합체를 웰에 첨가하는 단계, 일정 기간 동안 인큐베이션하는 단계, 및 항원에 결합된 항체의 존재를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSPO1-결합 항체 또는 작용제가 검출가능한 화합물에 접합되지 않고, 대신 RSPO1-결합 항체 또는 작용제를 인식하는 제2의 접합된 항체가 웰에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 웰을 항원으로 코팅하는 대신, RSPO-결합 항체 또는 작용제를 웰에 코팅할 수 있고, 코팅된 웰에 항원을 첨가한 후에 검출가능한 화합물에 접합된 제2 항체를 첨가할 수 있다. 당업자는 검출되는 신호를 증가시키도록 변형될 수 있는 파라미터, 뿐만 아니라 업계에 공지된 ELISA의 기타 변동에 관하여 정통할 것이다.

[0098] 또 다른 예에서, 인간 RSPO1에 대한 항체의 특이적 결합을 FACS를 사용하여 결정할 수 있다. FACS 스크리닝 검정법은 항원을 융합 단백질 (예를 들어, RSPO1-Fc 또는 RSPO1-CD4TM)로서 발현하는 cDNA 구축물을 생성시키는 단계, 구축물을 세포 내로 형질감염시키는 단계, 항원을 세포 표면에서 발현시키는 단계, RSPO1-결합 항체 또는 기타 RSPO1-결합체를 형질감염된 세포와 혼합하는 단계, 및 일정 기간 동안 인큐베이션하는 단계를 포함할 수 있다. 검출가능한 화합물에 접합된 제2 항체 (예를 들어, PE-접합 항-Fc 항체) 및 유동 세포측정기를 사용함으로써, RSPO1-결합 항체 또는 기타 RSPO-결합체에 결합된 세포를 확인할 수 있다. 당업자는 검출되는 신호를 최적화하도록 변형될 수 있는 파라미터, 뿐만 아니라 스크리닝 (예를 들어, 차단 항체에 대한 스크리닝)을 강화할

수 있는 FACS의 기타 변동에 관하여 정통할 것이다.

[0099] 항원 (예를 들어, RSPO 단백질)에 대한 항체 또는 기타 결합제의 결합 친화력, 및 항체-항원 상호작용의 오프 (off)-속도를 경쟁적 결합 검정법에 의해 결정할 수 있다. 경쟁적 결합 검정법의 한 예는 표지된 항원 (예를 들어,  $^3\text{H}$  또는  $^{125}\text{I}$ ), 또는 이의 단편 또는 변이체를 증가되는 양의 미표지 항원의 존재 하에 관심 항체와 함께 인큐베이션한 후, 표지된 항원에 결합된 항체를 검출하는 것을 포함하는 방사성면역검정법이다. 항원 (예를 들어, RSPO 단백질)에 대한 항체의 친화력 및 결합 오프-속도를 스캐차드(Scatchard) 플롯 분석에 의해 데이터로부터 결정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비아코어 동역학 분석이 항원 (예를 들어, RSPO 단백질)에 결합하는 항체 또는 작용제의 결합 온(on) 및 오프 속도를 결정하는데 사용된다. 비아코어 동역학 분석은 칩 표면 상에 항원 (예를 들어, RSPO 단백질)이 고정되어 있는 칩으로부터의 항체의 결합 및 해리를 분석하는 것을 포함한다.

[0100] 특정 실시양태에서, 본 발명은 항체 89M5 (표 1 참조)의 CDR 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 및/또는 6개를 포함하는, 인간 RSP01에 특이적으로 결합하는 RSP01-결합제 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합제는 89M5의 CDR 중 1개 이상, 89M5의 CDR 중 2개 이상, 89M5의 CDR 중 3개 이상, 89M5의 CDR 중 4개 이상, 89M5의 CDR 중 5개 이상, 또는 89M5의 CDR 6개 모두를 포함한다.

### 표 1

	89M5	130M23
HC CDR1	TGYTMH (서열 12)	SSYAMS (서열 29)
HC CDR2	GINPNNGGTTYNQNFKG (서열 13)	SISSGGSTYYPDSVKKG (서열 30)
HC CDR3	KEFSDGYYFFAY (서열 14)	RGGDPGVYNGDYEDAMDY (서열 31)
LC CDR1	KASQDVIFAVA (서열 15)	KASQDVSSAVA (서열 32)
LC CDR2	WASTRHT (서열 16)	WASTRHT (서열 33)
LC CDR3	QQHYSTPW (서열 17)	QQHYSTP (서열 34)

[0101]

[0102] 특정 실시양태에서, 본 발명은 TGYTMH (서열 12)를 포함하는 중쇄 CDR1, GINPNNGGTTYNQNFKG (서열 13)를 포함하는 중쇄 CDR2, 및 KEFSDGYYFFAY (서열 14)를 포함하는 중쇄 CDR3을 포함하는, 인간 RSP01에 특이적으로 결합하는 RSP01-결합제 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합제는 KASQDVIFAVA (서열 15)를 포함하는 경쇄 CDR1, WASTRHT (서열 16)를 포함하는 경쇄 CDR2, 및 QQHYSTPW (서열 17)를 포함하는 경쇄 CDR3을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합제는 KASQDVIFAVA (서열 15)를 포함하는 경쇄 CDR1, WASTRHT (서열 16)를 포함하는 경쇄 CDR2, 및 QQHYSTPW (서열 17)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합제는 (a) TGYTMH (서열 12)를 포함하는 중쇄 CDR1, GINPNNGGTTYNQNFKG (서열 13)를 포함하는 중쇄 CDR2, 및 KEFSDGYYFFAY (서열 14)를 포함하는 중쇄 CDR3, 및 (b) KASQDVIFAVA (서열 15)를 포함하는 경쇄 CDR1, WASTRHT (서열 16)를 포함하는 경쇄 CDR2, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (c) KEFSDGYYFFAY (서열 14)를 포함하는 중쇄 CDR3, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (d) KASQDVIFAVA (서열 15)를 포함하는 경쇄 CDR1, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (e) WASTRHT (서열 16)를 포함하는 경쇄 CDR2, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및 (f) QQHYSTPW (서열 17)를 포함하는 경쇄 CDR3, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함하는, 인간 RSP01에 특이적으로 결합하는 RSP01-결합제 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 특정 실시양태에서, 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환이다.

[0103] 특정 실시양태에서, 본 발명은 (a) TGYTMH (서열 12)를 포함하는 중쇄 CDR1, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (b) GINPNNGGTTYNQNFKG (서열 13)를 포함하는 중쇄 CDR2, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (c) KEFSDGYYFFAY (서열 14)를 포함하는 중쇄 CDR3, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (d) KASQDVIFAVA (서열 15)를 포함하는 경쇄 CDR1, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (e) WASTRHT (서열 16)를 포함하는 경쇄 CDR2, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및 (f) QQHYSTPW (서열 17)를 포함하는 경쇄 CDR3, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함하는, 인간 RSP01에 특이적으로 결합하는 RSP01-결합제 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 특정 실시양태에서, 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환이다.

[0104] 특정 실시양태에서, 본 발명은 서열 10에 대한 서열 동일성이 약 80% 이상인 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열 11에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는, RSP01에 특이적으로 결합하는 RSP01-결합제 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합제는 서열 10에 대한 서열 동일성이 약 85% 이상,

약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상 또는 약 99% 이상인 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 11에 대한 서열 동일성이 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상 또는 약 99% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 10에 대한 서열 동일성이 약 95% 이상인 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열 11에 대한 서열 동일성이 약 95% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 10을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열 11을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 본질적으로 서열 10으로 이루어지는 중쇄 가변 영역, 및 본질적으로 서열 11로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0105] 특정 실시양태에서, 본 발명은 서열 55에 대한 서열 동일성이 약 80% 이상인 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열 59에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는, RSP01에 특이적으로 결합하는 RSP01-결합체 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 55에 대한 서열 동일성이 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상 또는 약 99% 이상인 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 59에 대한 서열 동일성이 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상 또는 약 99% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 55에 대한 서열 동일성이 약 95% 이상인 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열 59에 대한 서열 동일성이 약 95% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 55를 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열 59를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 본질적으로 서열 55로 이루어지는 중쇄 가변 영역, 및 본질적으로 서열 59로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0106] 특정 실시양태에서, 본 발명은 (a) 서열 25에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 중쇄; 및/또는 (b) 서열 26에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 경쇄를 포함하는, RSP01에 특이적으로 결합하는 RSP01-결합체 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 (a) 서열 25에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 중쇄; 및/또는 (b) 서열 26에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 25를 포함하는 중쇄, 및/또는 서열 26을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 25로 본질적으로 이루어지는 중쇄, 및/또는 서열 26으로 본질적으로 이루어지는 경쇄를 포함한다.

[0107] 특정 실시양태에서, 본 발명은 (a) 서열 68에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 중쇄; 및/또는 (b) 서열 69에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 경쇄를 포함하는, RSP01에 특이적으로 결합하는 RSP01-결합체 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 (a) 서열 68에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 중쇄; 및/또는 (b) 서열 69에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 68을 포함하는 중쇄, 및/또는 서열 69를 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 68로 본질적으로 이루어지는 중쇄, 및/또는 서열 69로 본질적으로 이루어지는 경쇄를 포함한다.

[0108] 특정 실시양태에서, 본 발명은 항체 130M23 (표 1 참조)의 CDR 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 및/또는 6개를 포함하는, 인간 RSP02에 특이적으로 결합하는 RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 130M23의 CDR 중 1개 이상, 130M23의 CDR 중 2개 이상, 130M23의 CDR 중 3개 이상, 130M23의 CDR 중 4개 이상, 130M23의 CDR 중 5개 이상, 또는 130M23의 CDR 6개 모두를 포함한다.

[0109] 특정 실시양태에서, 본 발명은 SSYAMS (서열 29)를 포함하는 중쇄 CDR1, SISSGGSTYYPDPSVKG (서열 30)를 포함하는 중쇄 CDR2, 및 RGGDPGVYNGDYEDAMDY (서열 31)를 포함하는 중쇄 CDR3를 포함하는, 인간 RSP02에 특이적으로 결합하는 RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 KASQDVSSAVA (서열 32)를 포함하는 경쇄 CDR1, WASTRHT (서열 33)를 포함하는 경쇄 CDR2, 및 QQHYSTP (서열 34)를 포함하는 경쇄 CDR3을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 KASQDVSSAVA (서열 32)를 포함하는 경쇄 CDR1, WASTRHT (서열 33)를 포함하는 경쇄 CDR2, 및 QQHYSTP (서열 34)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 (a) SSYAMS (서열 29)를 포함하는 중쇄 CDR1, SISSGGSTYYPDPSVKG (서열 30)를 포함하는 중쇄 CDR2, 및 RGGDPGVYNGDYEDAMDY (서열 31)를 포함하는 중쇄 CDR3, 및 (b) KASQDVSSAVA (서열 32)를 포함하는 경쇄 CDR1, WASTRHT (서열 33)를 포함하는 경쇄 CDR2, 및 QQHYSTP (서열 34)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함한다.

[0110] 특정 실시양태에서, 본 발명은 (a) SSYAMS (서열 29)를 포함하는 중쇄 CDR1, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (b) SISSGGSTYYPDPSVKG (서열 30)를 포함하는 중쇄 CDR2, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (c) RGGDPGVYNGDYEDAMDY (서열 31)를 포함하는 중쇄 CDR3, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (d) KASQDVSSAVA (서열 32)를 포함하는 경쇄 CDR1, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; (e) WASTRHT (서

열 33)를 포함하는 경쇄 CDR2, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체; 및 (f) QQHYSTP (서열 34)를 포함하는 경쇄 CDR3, 또는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 아미노산 치환을 포함하는 이의 변이체를 포함하는, 인간 RSP02에 특이적으로 결합하는, RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 특정 실시양태에서, 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환이다.

[0111] 특정 실시양태에서, 본 발명은 서열 27에 대한 서열 동일성이 약 80% 이상인 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열 28에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는, RSP02에 특이적으로 결합하는 RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 서열 27에 대한 서열 동일성이 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상 또는 약 99% 이상인 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 서열 28에 대한 서열 동일성이 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상 또는 약 99% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 서열 27에 대한 서열 동일성이 약 95% 이상인 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열 28에 대한 서열 동일성이 약 95% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 서열 27을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열 28을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 본질적으로 서열 27로 이루어지는 중쇄 가변 영역, 및 본질적으로 서열 28로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0112] 특정 실시양태에서, 본 발명은 서열 63에 대한 서열 동일성이 약 80% 이상인 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열 67 또는 서열 76에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함하는, RSP02에 특이적으로 결합하는 RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 서열 63에 대한 서열 동일성이 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상 또는 약 99% 이상인 중쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 서열 67 또는 서열 76에 대한 서열 동일성이 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상 또는 약 99% 이상인 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 서열 63을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열 67을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 서열 63을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및/또는 서열 76을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 본질적으로 서열 63으로 이루어지는 중쇄 가변 영역, 및 본질적으로 서열 67로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 본질적으로 서열 63으로 이루어지는 중쇄 가변 영역, 및 본질적으로 서열 76으로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0113] 특정 실시양태에서, 본 발명은 (a) 서열 41에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 중쇄; 및/또는 (b) 서열 42에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 경쇄를 포함하는, RSP02에 특이적으로 결합하는 RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 (a) 서열 41에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 중쇄; 및/또는 (b) 서열 42에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 41을 포함하는 중쇄, 및/또는 서열 42를 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 41로 본질적으로 이루어지는 중쇄, 및/또는 서열 42로 본질적으로 이루어지는 경쇄를 포함한다.

[0114] 특정 실시양태에서, 본 발명은 (a) 서열 70에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 중쇄; 및/또는 (b) 서열 71 또는 서열 74에 대한 서열 동일성이 90% 이상인 경쇄를 포함하는, RSP02에 특이적으로 결합하는 RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)를 제공한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 (a) 서열 70에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 중쇄; 및/또는 (b) 서열 71 또는 서열 74에 대한 서열 동일성이 95% 이상인 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 서열 70을 포함하는 중쇄, 및/또는 서열 71을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 서열 70을 포함하는 중쇄, 및/또는 서열 74를 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 서열 70으로 본질적으로 이루어지는 중쇄, 및/또는 서열 71로 본질적으로 이루어지는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 서열 70으로 본질적으로 이루어지는 중쇄, 및/또는 서열 74로 본질적으로 이루어지는 경쇄를 포함한다.

[0115] 본 발명은 인간 RSPO 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하지만 이에 한정되지 않는 폴리펩티드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 인간 RSP01에 결합한다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 인간 RSP02에 결합한다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 인간 RSP03에 결합한다.

[0116] 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 항체 89M5 (본원의 표 1 참조)의 CDR 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 및/또는 6개를 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 항체 130M23 (본원의 표 1 참조)의 CDR 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 및/또는 6개를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드는 CDR 당 4개 이하 (즉, 0개, 1개, 2개,



는 서열 41을 포함하는 아미노산 서열, 및/또는 서열 42를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 본질적으로 서열 41 및/또는 서열 42로 이루어진다.

[0122] 일부 실시양태에서, 본 발명은 서열 70에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 아미노산 서열, 및/또는 서열 71 또는 서열 74에 대한 서열 동일성이 80% 이상인 아미노산 서열을 포함하는, 인간 RSP02에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드를 제공한다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 70에 대한 서열 동일성이 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상 또는 약 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 71 또는 서열 74에 대한 서열 동일성이 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상 또는 약 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 70에 대한 서열 동일성이 약 95% 이상인 아미노산 서열, 및/또는 서열 71 또는 서열 74에 대한 서열 동일성이 약 95% 이상인 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 70을 포함하는 아미노산 서열, 및/또는 서열 71을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 서열 70을 포함하는 아미노산 서열, 및/또는 서열 74를 포함하는 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 본질적으로 서열 70 및/또는 서열 71로 이루어진다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 본질적으로 서열 70 및/또는 서열 74로 이루어진다.

[0123] 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 서열 10, 서열 11, 서열 21, 서열 22, 서열 25, 서열 26, 서열 53, 서열 55, 서열 57, 서열 59, 서열 68 및 서열 69로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 서열 27, 서열 28, 서열 37, 서열 38, 서열 41, 서열 42, 서열 61, 서열 63, 서열 65, 서열 67, 서열 70, 서열 71, 서열 73, 서열 74 및 서열 76으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다.

[0124] 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 89M5 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 89M5 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함한다 (리더(leader) 서열과 함께 또는 리더 서열 없이). 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 89M5 항체이다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 인간화 형태의 항체 내에 89M5 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 h89M5-H2L2 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 인간화 형태의 항체 내에 89M5 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함한다 (리더 서열과 함께 또는 리더 서열 없이). 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 h89M5-H2L2 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함한다 (리더 서열과 함께 또는 리더 서열 없이). 일부 실시양태에서, 89M5의 인간화 버전은 IgG1 항체이다. 일부 실시양태에서, 89M5의 인간화 버전은 IgG2 항체이다. 89M5 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주가 2011년 6월 30일에 부다페스트 조약의 조건 하에 미국 버지니아주 머내서스 유니버시티 대로 10801의 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection) (ATCC)에 기탁되었고, ATCC 기탁 지정 번호 PTA-11970가 이에 할당되었다.

[0125] 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 항체 89M5를 포함하거나, 항체 89M5로 본질적으로 이루어지거나, 또는 항체 89M5로 이루어진다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 항체 h89M5-H2L2를 포함하거나, 항체 h89M5-H2L2로 본질적으로 이루어지거나, 또는 항체 h89M5-H2L2로 이루어진다.

[0126] 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 130M23 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 130M23 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함한다 (리더 서열과 함께 또는 리더 서열 없이). 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 130M23 항체이다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 인간화 형태의 항체 내에 130M23 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 h130M23-H1L2 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 h130M23-H1L6 항체의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 인간화 형태의 항체 내에 130M23 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함한다 (리더 서열과 함께 또는 리더 서열 없이). 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 h130M23-H1L2 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함한다 (리더 서열과 함께 또는 리더 서열 없이). 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 h130M23-H1L6 항체의 중쇄 및 경쇄를 포함한다 (리더 서열과 함께 또는 리더 서열 없이). 일부 실시양태에서, 130M23의 인간화 버전은 IgG1 항체이다. 일부 실시양태에서, 130M23의 인간화 버전은 IgG2 항체이다. 130M23 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주가 2011년 8월 10일에 부다페스트 조약의 조건 하에 미국 버지니아주 머내서스 유니버시티 대로 10801의 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (ATCC)에 기탁되었고, ATCC 기탁 지정 번호 PTA-12021이 이에 할당되었다.

[0127] 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 항체 130M23을 포함하거나, 항체 130M23으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 항체 130M23으로 이루어진다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 항체 h130M23-H1L2를 포함하거나, 항체 h130M23-H1L2로 본질적으로 이루어지거나, 또는 항체 h130M23-H1L2로 이루어진다. 특정 실시양태에서, RSP02-

결합체는 항체 h130M23-H1L6을 포함하거나, 항체 h130M23-H1L6으로 본질적으로 이루어지거나, 또는 항체 h130M23-H1L6으로 이루어진다.

[0128] 항체가 포함되는 다수의 단백질은 다양한 위치로 단백질이 운반되는 것을 지시하는 신호 서열을 함유한다. 신호 서열 (신호 웨პ티드 또는 리더 서열로도 지칭됨)은 신생 폴리웨პ티드의 N-말단에 위치한다. 이는 폴리웨პ티드를 소포체로 표적화하고, 단백질이 이의 목적지, 예를 들어, 세포소기관의 내부 공간으로, 내부 막으로, 세포의 외막으로, 또는 분비를 통해 세포 외부로 분류된다. 대부분의 신호 서열은 단백질이 소포체로 운반된 후에 신호 웨პ티다제(peptidase)에 의해 단백질로부터 절단된다. 폴리웨პ티드로부터의 신호 서열 절단은 일반적으로 아미노산 서열 내의 특정 부위에서 발생하고, 신호 서열 내의 아미노산 잔기에 좌우된다. 일반적으로는 1개의 특이적인 절단 부위가 있지만, 신호 웨პ티다제가 1개를 초과하는 절단 부위를 인식할 수 있고/있거나 사용할 수 있어 폴리웨პ티드의 균질하지 않은 N-말단이 초래된다. 예를 들어, 신호 서열 내의 상이한 절단 부위의 사용은 N-말단 아미노산들이 상이하게 발현된 폴리웨პ티드를 초래할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 폴리웨პ티드는 N-말단이 상이한 폴리웨პ티드들의 혼합물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, N-말단들이 아미노산 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 만큼 길이가 상이하다. 일부 실시양태에서, 폴리웨პ티드는 실질적으로 균질하고, 즉, 폴리웨პ티드들의 N-말단이 동일하다. 일부 실시양태에서, 폴리웨პ티드의 신호 서열은 "천연" 또는 "모" 신호 서열과 비교하여 하나 이상 (예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 등)의 아미노산 치환 및/또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리웨პ티드의 신호 서열은 1개의 절단 부위가 우세하게 하는 아미노산 치환 및/또는 결실을 포함하고, 이에 의해 1개의 N-말단이 있는 실질적으로 균질한 폴리웨პ티드가 초래된다. 일부 실시양태에서, 폴리웨პ티드의 신호 서열이 상이한 신호 서열로 교체된다. 일부 실시양태에서, 폴리웨პ티드의 신호 서열이 폴리웨პ티드의 발현 수준에 영향을 미친다. 일부 실시양태에서, 폴리웨პ티드의 신호 서열이 폴리웨პ티드의 발현 수준을 감소시킨다.

[0129] 특정 실시양태에서, RSP01-결합체 (예를 들어, 항체)는 RSP01에 대한 특이적 결합에 대해 서열 10을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 11을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체 (예를 들어, 항체)는 RSP01에 대한 특이적 결합에 대해 서열 55를 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 59를 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체 (예를 들어, 항체)는 RSP01에 대한 특이적 결합에 대해 서열 25를 포함하는 중쇄 및 서열 26을 포함하는 경쇄를 포함하는 항체와 경쟁한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체 (예를 들어, 항체)는 RSP01에 대한 특이적 결합에 대해 서열 68을 포함하는 중쇄 및 서열 69를 포함하는 경쇄를 포함하는 항체와 경쟁한다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 인간 RSP01에 대한 특이적 결합에 대해 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2와 경쟁한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체 또는 항체는 시험관내 경쟁 결합 검정법에서 RSP01에 대한 특이적 결합에 대해 경쟁한다. 일부 실시양태에서, RSP01은 인간 RSP01이다. 일부 실시양태에서, RSP01은 마우스 RSP01이다.

[0130] 특정 실시양태에서, RSP01-결합체 (예를 들어, 항체)는 본 발명의 항체와 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 RSP01 상의 에피토프에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, RSP01-결합체는 본 발명의 항체가 결합하는 RSP01 상의 에피토프와 중첩되는 RSP01 상의 에피토프에 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, RSP01-결합체 (예를 들어, 항체)는 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2와 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 RSP01 상의 에피토프에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, RSP01-결합체는 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2가 결합하는 RSP01 상의 에피토프와 중첩되는 RSP01 상의 에피토프에 결합하는 항체이다.

[0131] 특정 실시양태에서, RSP01-결합체는 (예를 들어, 경쟁적 결합 검정법에서) RSP01에 대한 특이적 결합에 대해 ATCC 기탁 지정 번호가 PTA-11970인 하이브리도마에 의해 생산된 항체와 경쟁하는 작용제이다.

[0132] 특정 실시양태에서, RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)는 RSP02에 대한 특이적 결합에 대해 서열 27을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 28을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)는 RSP02에 대한 특이적 결합에 대해 서열 63을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열 67 또는 서열 76을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체와 경쟁한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)는 RSP02에 대한 특이적 결합에 대해 서열 41을 포함하는 중쇄 및 서열 42를 포함하는 경쇄를 포함하는 항체와 경쟁한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)는 RSP02에 대한 특이적 결합에 대해 서열 70을 포함하는 중쇄 및 서열 71 또는 서열 74를 포함하는 경쇄를 포함하는 항체와 경쟁한다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 인간 RSP02에 대한 특이적 결합에 대해 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6과 경쟁한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체 또는 항체는 시험관내 경쟁 결합 검정법에서 RSP02에 대한 특이적 결합에 대해 경쟁한다. 일부 실시양태에서, RSP02는 인간 RSP02이다. 일부

실시양태에서, RSP02는 마우스 RSP02이다.

- [0133] 특정 실시양태에서, RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)는 본 발명의 항체와 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 RSP02 상의 에피토프에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, RSP02-결합체는 본 발명의 항체가 결합하는 RSP02 상의 에피토프와 중첩되는 RSP02 상의 에피토프에 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)는 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6과 동일하거나 또는 본질적으로 동일한 RSP02 상의 에피토프에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, RSP02-결합체는 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6이 결합하는 RSP02 상의 에피토프와 중첩되는 RSP02 상의 에피토프에 결합하는 항체이다.
- [0134] 특정 실시양태에서, RSP02-결합체는 (예를 들어, 경쟁적 결합 검정법에서) RSP02에 대한 특이적 결합에 대해 ATCC 기탁 지정 번호가 PTA-12021인 하이브리도마에 의해 생산된 항체와 경쟁하는 작용제이다.
- [0135] 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 RSPO-결합체 (예를 들어, 항체)는 하나 이상의 인간 RSPO 단백질에 결합하고, RSPO 활성을 조절한다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSPO 길항체이고, RSPO 활성을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSPO 길항체이고,  $\beta$ -카테닌 활성을 감소시킨다.
- [0136] 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 RSP01-결합체 (예를 들어, 항체)는 인간 RSP01에 결합하고, RSP01 활성을 조절한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 RSP01 길항체이고, RSP01 활성을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 RSP01 길항체이고,  $\beta$ -카테닌 활성을 감소시킨다.
- [0137] 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 RSP02-결합체 (예를 들어, 항체)는 인간 RSP02에 결합하고, RSP02 활성을 조절한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 RSP02 길항체이고, RSP02 활성을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 RSP02 길항체이고,  $\beta$ -카테닌 활성을 감소시킨다.
- [0138] 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 RSP03-결합체 (예를 들어, 항체)는 인간 RSP03에 결합하고, RSP03 활성을 조절한다. 일부 실시양태에서, RSP03-결합체는 RSP03 길항체이고, RSP03 활성을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSP03-결합체는 RSP03 길항체이고,  $\beta$ -카테닌 활성을 감소시킨다.
- [0139] 특정 실시양태에서, RSPO-결합체 (예를 들어, 항체)는 하나 이상의 인간 RSPO 단백질의 길항체이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 하나 이상의 RSPO의 길항체이고, RSPO 활성을 억제한다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체는 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 50% 이상, 약 75% 이상, 약 90% 이상, 또는 약 100% 만큼 RSPO 활성을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 RSPO 단백질의 활성을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 인간 RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04의 활성을 억제한다. 특정 실시양태에서, 인간 RSP01 활성을 억제하는 RSP01-결합체는 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2이다. 특정 실시양태에서, 인간 RSP02 활성을 억제하는 RSP02-결합체는 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6이다.
- [0140] 특정 실시양태에서, RSPO-결합체 (예를 들어, 항체)는 하나 이상의 인간 RSPO 단백질의 길항체이다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체는 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 50% 이상, 약 75% 이상, 약 90% 이상, 또는 약 100% 만큼 RSPO 신호전달을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 1개, 2개, 3개 또는 4개의 RSPO 단백질에 의한 신호전달을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 인간 RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04의 신호전달을 억제한다. 특정 실시양태에서, RSP01 신호전달을 억제하는 RSP01-결합체는 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2이다. 특정 실시양태에서, RSP02 신호전달을 억제하는 RSP02-결합체는 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6이다.
- [0141] 특정 실시양태에서, RSPO-결합체 (예를 들어, 항체)는  $\beta$ -카테닌 신호전달의 길항체이다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체는 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 50% 이상, 약 75% 이상, 약 90% 이상, 또는 약 100% 만큼  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제한다. 특정 실시양태에서,  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는 RSP01-결합체는 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2이다. 특정 실시양태에서,  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는 RSP02-결합체는 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6이다.
- [0142] 특정 실시양태에서, RSPO-결합체 (예를 들어, 항체)는 하나 이상의 RSPO 단백질이 수용체에 결합하는 것을 억제한다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체는 인간 RSPO 단백질이 이의 수용체 중 하나 이상에 결합하는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSPO 단백질이 하나 이상의 LGR 단백질에 결합하는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSPO 단백질이 LGR4, LGR5, 및/또는 LGR6에 결합하는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 RSP01이 LGR4에 결합하는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 RSP01이 LGR6에 결합하는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSP01이 LGR5에 결합하는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 RSP01이 LGR6에 결합하는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 RSP02가 LGR4에 결합하는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서,

RSPO2-결합체는 RSPO2가 LGR5에 결합하는 것을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합체는 RSPO2가 LGR6에 결합하는 것을 억제한다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체가 하나 이상의 LGR 단백질에 결합하는 것의 억제는 약 10% 이상, 약 25% 이상, 약 50% 이상, 약 75% 이상, 약 90% 이상, 또는 약 95% 이상이다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 RSPO가 하나 이상의 LGR 단백질에 결합하는 것을 억제하는 RSPO-결합체는  $\beta$ -카테닌 신호전달을 추가로 억제한다. 특정 실시양태에서, 인간 RSPO1이 하나 이상의 LGR 단백질에 결합하는 것을 억제하는 RSPO1-결합체는 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2이다. 특정 실시양태에서, 인간 RSPO2가 하나 이상의 LGR 단백질에 결합하는 것을 억제하는 RSPO2-결합체는 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6이다.

[0143] 특정 실시양태에서, RSPO-결합체 (예를 들어, 항체)는 하나 이상의 RSPO가 수용체에 결합하는 것을 차단한다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체는 인간 RSPO 단백질이 이의 수용체 중 하나 이상에 결합하는 것을 차단한다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSPO가 하나 이상의 LGR 단백질에 결합하는 것을 차단한다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 하나 이상의 RSPO 단백질이 LGR4, LGR5, 및/또는 LGR6에 결합하는 것을 차단한다. 일부 실시양태에서, RSPO1-결합체는 RSPO1이 LGR4에 결합하는 것을 차단한다. 일부 실시양태에서, RSPO1-결합체는 RSPO1이 LGR5에 결합하는 것을 차단한다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합체는 RSPO2가 LGR4에 결합하는 것을 차단한다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합체는 RSPO2가 LGR6에 결합하는 것을 차단한다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체가 하나 이상의 LGR 단백질에 결합하는 것의 차단은 약 10% 이상, 약 25% 이상, 약 50% 이상, 약 75% 이상, 약 90% 이상, 또는 약 95% 이상이다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 RSPO 단백질이 하나 이상의 LGR 단백질에 결합하는 것을 차단하는 RSPO-결합체는  $\beta$ -카테닌 신호전달을 추가로 억제한다. 특정 실시양태에서, 인간 RSPO1이 하나 이상의 LGR 단백질에 결합하는 것을 차단하는 RSPO1-결합체는 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2이다. 특정 실시양태에서, 인간 RSPO2가 하나 이상의 LGR 단백질에 결합하는 것을 차단하는 RSPO2-결합체는 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6이다.

[0144] 특정 실시양태에서, RSPO-결합체 (예를 들어, 항체)는  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제한다.  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는 RSPO-결합체는, 특정 실시양태에서,  $\beta$ -카테닌 신호전달 경로 내의 하나 이상의 수용체에 의한 신호전달을 억제할 수 있지만 필수적으로 모든 수용체에 의한 신호전달을 억제하지는 않는 것으로 이해된다. 특정한 별법적인 실시양태에서, 모든 인간 수용체에 의한  $\beta$ -카테닌 신호전달이 억제될 수 있다. 특정 실시양태에서, LGR4, LGR5 및 LGR6으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 수용체에 의한  $\beta$ -카테닌 신호전달이 억제된다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체에 의한  $\beta$ -카테닌 신호전달의 억제는 약 10% 이상, 약 25% 이상, 약 50% 이상, 약 75% 이상, 약 90% 이상 또는 약 95% 이상의  $\beta$ -카테닌 신호전달 수준의 감소이다. 일부 실시양태에서,  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는 RSPO1-결합체는 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2이다. 일부 실시양태에서,  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는 RSPO2-결합체는 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6이다.

[0145] 특정 실시양태에서, RSPO-결합체 (예를 들어, 항체)는  $\beta$ -카테닌의 활성화를 억제한다.  $\beta$ -카테닌의 활성화를 억제하는 RSPO-결합체는, 특정 실시양태에서, 하나 이상의 수용체에 의한  $\beta$ -카테닌의 활성화를 억제할 수 있지만 필수적으로 모든 수용체에 의한  $\beta$ -카테닌의 활성화를 억제하지는 않는 것으로 이해된다. 특정한 별법적인 실시양태에서, 모든 인간 수용체에 의한  $\beta$ -카테닌의 활성화가 억제될 수 있다. 특정 실시양태에서, LGR4, LGR5 및 LGR6으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 수용체에 의한  $\beta$ -카테닌의 활성화가 억제된다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체에 의한  $\beta$ -카테닌의 활성화의 억제는 약 10% 이상, 약 25% 이상, 약 50% 이상, 약 75% 이상, 약 90% 이상 또는 약 95% 이상의  $\beta$ -카테닌의 활성화 수준의 감소이다. 일부 실시양태에서,  $\beta$ -카테닌의 활성화를 억제하는 RSPO1-결합체는 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2이다. 일부 실시양태에서,  $\beta$ -카테닌의 활성화를 억제하는 RSPO2-결합체는 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6이다.

[0146] RSPO-결합체 (또는 후보 RSPO-결합체)가  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는지 여부를 결정하기 위한 생체내 및 시험관내 검정법이 업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 초파리 루시퍼라제 리포터 유전자의 상류에 TCF-결합 도메인의 다중 카페를 함유하는 TCF/Luc 리포터 벡터를 활용하는 세포-기반, 루시퍼라제 리포터 검정법을 사용하여, 시험관 내에서  $\beta$ -카테닌 신호전달 수준을 측정할 수 있다 (문헌 [Gazit et al., 1999, Oncogene, 18; 5959-66]; 탑플래시, 밀리포어(Millipore) (매사추세츠주 빌레리카)). RSPO-결합체가 존재하는 경우의 RSPO 단백질 또는 RSPO-컨디셔닝 배지와 함께 또는 RSPO 단백질 또는 RSPO-컨디셔닝 배지 없이 하나 이상의 Wnt (예를 들어, 형질감염된 세포에 의해 발현되거나 또는 Wnt-컨디셔닝 배지에 의해 제공되는 Wnt(들))가 존재할 때의  $\beta$ -카테닌 신호전달 수준을 RSPO-결합체가 존재하지 않는 경우의 신호전달 수준과 비교한다. TCF/Luc 리포터 검정법에 더하여,  $\beta$ -카테닌에 의해 조절되는 유전자, 예컨대 c-myc (문헌 [He et al., 1998, Science, 281:1509-12]), 사이클린 D1 (문헌 [Tetsu et al., 1999, Nature, 398:422-6]) 및/또는 피브로넥틴 (문헌 [Gradl et al. 1999,

Mol. Cell Biol., 19:5576-87])의 발현 수준에 대한 작용제의 효과를 측정하는 것에 의해  $\beta$ -카테닌 신호전달에 대한 RSPO-결합제 (또는 후보 작용제)의 효과를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 측정할 수 있다. 특정 실시양태에서, 디쉐블드(Dishevelled)-1, 디쉐블드-2, 디쉐블드-3, LRP5, LRP6, 및/또는  $\beta$ -카테닌의 인산화 상태에 대한 작용제의 효과를 측정하는 것에 의해  $\beta$ -카테닌 신호전달에 대한 RSPO-결합제의 효과를 또한 평가할 수 있다.

[0147] 특정 실시양태에서, RSPO-결합제에는 하기 효과 중 하나 이상이 있다: 종양 세포 증식을 억제함, 종양 성장을 억제함, 종양의 종양발생성을 감소시킴, 종양 내의 암 줄기 세포의 빈도를 감소시킴으로써 종양의 종양발생성을 감소시킴, 종양 성장을 억제함, 종양 세포의 세포 사망을 유발함, 종양 내의 세포를 분화되도록 유도함, 종양발생성인 세포를 비-종양발생성인 상태로 분화시킴, 종양 세포 내의 분화 마커의 발현을 유도함, 종양 세포의 전이를 방지함, 또는 종양 세포의 생존을 감소시킴.

[0148] 특정 실시양태에서, RSPO-결합제는 종양 성장을 억제할 수 있다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합제는 생체 내에서 (예를 들어, 이종이식 마우스 모델에서, 및/또는 암에 걸린 인간에서) 종양 성장을 억제할 수 있다.

[0149] 특정 실시양태에서, RSPO-결합제는 종양의 종양발생성을 감소시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합제 또는 항체는 동물 모델, 예컨대 마우스 이종이식 모델에서 암 줄기 세포를 포함하는 종양의 종양발생성을 감소시킬 수 있다. 특정 실시양태에서, 종양 내의 암 줄기 세포의 개수 또는 빈도가 적어도 약 2배, 약 3배, 약 5배, 약 10배, 약 50배, 약 100배, 또는 약 1000배만큼 감소된다. 특정 실시양태에서, 동물 모델을 사용하는 한계 희석 검정법에 의해 암 줄기 세포의 개수 또는 빈도의 감소가 결정된다. 종양 내의 암 줄기 세포의 개수 또는 빈도의 감소를 결정하기 위한 한계 희석 검정법의 사용에 관한 추가적인 예 및 지침을, 예를 들어, 국제 공개 번호 WO 2008/042236, 미국 특허 공개 번호 2008/0064049, 및 미국 특허 공개 번호 2008/0178305에서 확인할 수 있다.

[0150] 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 RSPO-결합제의 마우스, 시노몰구스 원숭이 또는 인간에서의 순환 반감기는 적어도 약 5시간, 적어도 약 10시간, 적어도 약 24시간, 적어도 약 3일, 적어도 약 1주, 또는 적어도 약 2주이다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합제는 마우스, 시노몰구스 원숭이 또는 인간에서의 순환 반감기가 적어도 약 5시간, 적어도 약 10시간, 적어도 약 24시간, 적어도 약 3일, 적어도 약 1주, 또는 적어도 약 2주인 IgG (예를 들어, IgG1 또는 IgG2) 항체이다. 폴리펩티드 및 항체와 같은 작용제의 반감기를 증가시키는 (또는 감소시키는) 방법이 업계에 공지되어 있다. 예를 들어, IgG 항체의 순환 반감기를 증가시키는 공지된 방법에는 pH 6.0에서 신생아 Fc 수용체 (FcRn)에 대한 항체의 pH-의존적 결합을 증가시키는 Fc 영역 내의 돌연변이의 도입이 포함된다 (예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2005/0276799, 2007/0148164 및 2007/0122403 참조). Fc 영역이 결여된 항체 단편의 순환 반감기를 증가시키는 공지된 방법에는 PEG화와 같은 기술이 포함된다.

[0151] 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는 폴리클로날 항체이다. 임의의 공지된 방법으로 폴리클로날 항체를 제조할 수 있다. 일부 실시양태에서, 관련 항원 (예를 들어, 정제된 웨პ티드 단편, 전장 재조합 단백질, 또는 융합 단백질)의 다중 피하 또는 복막내 주사에 의해 동물 (예를 들어, 토끼, 래트, 마우스, 염소, 당다귀)를 면역화시킴으로써 폴리클로날 항체가 생성된다. 임의적으로는, 키홀 럼펫 헤모시아닌 (KLH) 또는 혈청 알부민과 같은 캐리어에 항원이 접합될 수 있다. 항원 (담체 단백질이 있음 또는 없음)이 무균성 염수에 희석되고, 일반적으로는 아주반트 (예를 들어, 완전 또는 불완전 프로인트 아주반트)와 조합되어 안정적인 에멀션이 형성된다. 충분한 기간 후에, 면역화된 동물의 혈액, 복수 등으로부터 폴리클로날 항체를 회수한다. 친화력 크로마토그래피, 이온-교환 크로마토그래피, 젤 전기영동 및 투석을 포함하지만 이에 한정되지 않는 업계의 표준 방법에 따라 혈청 또는 복수로부터 폴리클로날 항체를 정제할 수 있다.

[0152] 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는 모노클로날 항체이다. 당업자에게 공지된 하이브리도마 방법을 사용하여 모노클로날 항체를 제조할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Kohler and Milstein, 1975, Nature, 256:495-497] 참조). 일부 실시양태에서, 하이브리도마 방법을 사용하여, 마우스, 햄스터 또는 기타 적합한 숙주 동물을 상기 기술된 바와 같이 면역화시켜서 림프구로부터 면역화 항원에 특이적으로 결합할 항체 생산을 유발한다. 일부 실시양태에서, 림프구가 시험관 내에서 면역화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역화 항원은 인간 단백질 또는 이의 일부분일 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역화 항원은 마우스 단백질 또는 이의 일부분일 수 있다.

[0153] 면역화 후에, 림프구를 단리하고, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 적절한 골수종 세포주와 융합시켜서, 하이브리도마 세포를 형성시키고, 그 후 이를 융합되지 않은 림프구 및 골수종 세포로부터 선별할 수 있다. 선택된 항원에 대해 특이적으로 지시된 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 면역침전, 면역불롯팅 및 시험관내 결합 검정법 (예를 들어, 유동 세포측정법, FACS, ELISA, 및 방사성면역검정법)이 포함되지

만 이에 한정되지 않는 다양한 방법에 의해 확인할 수 있다. 표준 방법을 사용하는 시험관내 배양 (문헌 [J.W. Goding, 1996, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 3rd Edition, Academic Press, San Diego, CA])으로 또는 생체 내에서 동물 내의 복수 종양으로서 하이브리도마를 증식시킬 수 있다. 친화력 크로마토그래피, 이온-교환 크로마토그래피, 겔 전기영동 및 투석을 포함하지만 이에 한정되지 않는 업계의 표준 방법에 따라 배양 배지 또는 복수액으로부터 모노클로날 항체를 정제할 수 있다.

[0154] 특정 실시양태에서, 당업자에게 공지된 바와 같은 재조합 DNA 기술을 사용하여 모노클로날 항체를 제조할 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조). 모노클로날 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를, 예컨대 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자를 특이적으로 증폭시키는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하는 RT-PCR에 의해, 성숙형 B-세포 또는 하이브리도마 세포로부터 단리하고, 통상적인 기술을 사용하여 이의 서열을 결정한다. 그 후, 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 적절한 발현 벡터 내로 클로닝하고, 이러한 벡터는 다르게는 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 이. 콜라이(*E. coli*), 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염되는 경우에 모노클로날 항체를 생산한다. 다른 실시양태에서, 재조합 모노클로날 항체 또는 이의 단편을 원하는 종의 CDR을 발현하는 파지 디스플레이 라이브러리로부터 단리할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [McCafferty et al., 1990, Nature, 348:552-554]; [Clackson et al., 1991, Nature, 352:624-628]; 및 [Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581-597] 참조).

[0155] 모노클로날 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드(들)를 별법적인 항체가 생성되도록 재조합 DNA 기술을 사용하여 다수의 상이한 방식으로 추가로 변형시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어 마우스 모노클로날 항체의 경쇄 및 중쇄의 불변 도메인을 예를 들어 인간 항체의 이러한 영역들로 치환하여 키메라 항체가 생성될 수 있거나, 또는 비-면역글로불린 폴리펩티드로 치환하여 융합 항체가 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 불변 영역이 말단절단되거나 제거되어 모노클로날 항체의 원하는 항체 단편이 생성된다. 가변 영역의 부위-지정 또는 고밀도 돌연변이유발을 사용하여 모노클로날 항체의 특이성, 친화력 등을 최적화할 수 있다.

[0156] 일부 실시양태에서, 인간 RSPO 단백질에 대한 모노클로날 항체는 인간화 항체이다. 전형적으로, 인간화 항체는 CDR로부터의 잔기가 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 원하는 특이성, 친화력 및/또는 결합 능력이 있는 비-인간 종 (예를 들어, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터 등)의 CDR로부터의 잔기로 교체된 인간 면역글로불린이다. 일부 실시양태에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역 잔기가 원하는 특이성, 친화력 및/또는 결합 능력이 있는 비-인간 종으로부터의 항체 내의 상응하는 잔기로 교체된다. 일부 실시양태에서, 항체 특이성, 친화력 및/또는 결합 능력을 정련하고 최적화하기 위해 Fv 프레임워크 영역 내 및/또는 교체된 비-인간 잔기 내의 추가적인 잔기의 치환에 의해 인간화 항체가 추가로 변형될 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간 면역글로불린에 상응하는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR을 함유하는 하나 이상, 전형적으로는 2개 또는 3개의 가변 도메인영역을 실질적으로 모두 포함할 것인 한편, 모든 또는 실질적으로 모든 프레임워크 영역은 인간 면역글로불린 컨센서스 서열의 것이다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역 또는 도메인 (Fc)의 적어도 일부분, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 것을 또한 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 인간 대상체에게 투여되는 경우에 항원성 및 HAMA (인간 항-마우스 항체) 반응을 감소시킬 수 있기 때문에 이같은 인간화 항체는 치료적으로 사용된다. 당업자는 공지된 기술을 따라 면역원성이 감소된 기능성 인간화 항체를 수득할 수 있을 것이다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,225,539; 5,585,089; 5,693,761; 및 5,693,762 참조).

[0157] 특정 실시양태에서, RSPO-결합체는 인간 항체이다. 업계에 공지된 다양한 기술을 사용하여 인간 항체를 직접적으로 제조할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시험관 내에서 면역화되거나 또는 표적 항원에 대해 지시된 항체를 생산하는 면역화된 개체로부터 단리된 불멸화 인간 B 림프구가 생성될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77]; [Boemer et al., 1991, J. Immunol., 147:86-95]; 및 미국 특허 번호 5,750,373; 5,567,610 및 5,229,275 참조). 일부 실시양태에서, 인간 항체를 발현하는 파지 라이브러리로부터 인간 항체를 선택할 수 있다 (문헌 [Vaughan et al., 1996, Nature Biotechnology, 14:309-314]; [Sheets et al., 1998, PNAS, 95:6157-6162]; [Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227:381]; [Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222:581]). 별법적으로, 파지 디스플레이 기술을 사용하여 면역화되지 않은 도너로부터의 면역글로불린 가변 도메인 유전자 레퍼토리로부터 시험관 내에서 인간 항체 및 항체 단편을 생산할 수 있다. 항체 파지 라이브러리의 생성 및 사용을 위한 기술이 미국 특허 번호 5,969,108; 6,172,197; 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915; 6,593,081; 6,300,064; 6,653,068; 6,706,484; 및 7,264,963; 및 문헌 [Rothe et al., 2008, J. Mol. Bio., 376:1182-1200]에 또한 기술되어 있다. 사슬 셔플링 (문헌 [Marks et al., 1992, Bio/Technology, 10:779-783]) 및 부위-지정 돌연변

이유발을 포함하지만 이에 한정되지 않는 친화력 성숙 전략이 업계에 공지되어 있고, 이를 고친화력 인간 항체를 생성시키는데 사용할 수 있다.

[0158] 일부 실시양태에서, 인간 면역글로불린 유전자좌를 함유하는 트랜스제닉 마우스에서 인간 항체가 제조될 수 있다. 면역화 시, 이러한 마우스는 내인성 면역글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있다. 이러한 접근법이 미국 특허 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016에 기술되어 있다.

[0159] 본 발명은 하나 이상의 인간 RSPO 단백질을 특이적으로 인식하는 이중특이적 항체를 또한 포함한다. 이중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 에피토프를 특이적으로 인식하여 이에 결합할 수 있다. 상이한 에피토프들은 동일한 문자 내에 있을 수 있거나 (예를 들어, 인간 RSPO1 상의 2개의 에피토프), 또는 상이한 문자 상에 있을 수 있다 (예를 들어, RSPO1 상의 1개의 에피토프 및 RSPO2 상의 1개의 에피토프). 일부 실시양태에서, 이중특이적 항체는 모노클로날 인간 또는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, 세포 방어 메커니즘을 제1 항원 표적을 발현하는 세포에 집중시키도록, 항체가 제1 항원 표적 (예를 들어, RSPO1), 뿐만 아니라 제2 항원 표적, 예컨대 백혈구 상의 이펙터 문자 (예를 들어, CD2, CD3, CD28, 또는 B7) 또는 Fc 수용체 (예를 들어, CD64, CD32, 또는 CD16)를 특이적으로 인식하고 이에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포독성제를 특정 표적 항원을 발현하는 세포에 지시하도록 항체가 사용될 수 있다. 이러한 항체는 항원에 결합하는 팔 및 세포독성제 또는 방사성핵종 칼레이터, 예컨대 EOTUBE, DPTA, DOTA, 또는 TETA에 결합하는 팔을 보유한다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 RSPO1, 뿐만 아니라 RSPO2, RSPO3, 및 RSPO4로 이루어진 군으로부터 선택된 추가적인 RSPO 단백질에 특이적으로 결합한다. 특정 실시양태에서, 이중특이적 항체는 RSPO2, 뿐만 아니라 RSPO1, RSPO3, 및 RSPO4로 이루어진 군으로부터 선택된 추가적인 RSPO 단백질에 특이적으로 결합한다.

[0160] 이중특이적 항체를 제조하는 기술이 당업자에게 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Millstein et al., 1983, Nature, 305:537-539]; [Brennan et al., 1985, Science, 229:81]; [Suresh et al., 1986, Methods in Enzymol., 121:120]; [Traunecker et al., 1991, EMBO J., 10:3655-3659]; [Shalaby et al., 1992, J. Exp. Med., 175:217-225]; [Kostelny et al., 1992, J. Immunol., 148:1547-1553]; [Gruber et al., 1994, J. Immunol., 152:5368]; 미국 특허 번호 5,731,168; 및 미국 특허 공개 번호 2011/0123532를 참조한다. 이중특이적 항체는 무손상 항체 또는 항체 단편일 수 있다. 2가를 초과하는 항체가 또한 구상된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다 (문헌 [Tutt et al., 1991, J. Immunol., 147:60]). 따라서, 특정 실시양태에서, RSPO1에 대한 항체는 다중특이적이다.

[0161] 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 항체 (또는 기타 폴리펩티드)는 단일특이적일 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 항체가 함유하는 하나 이상의 항원-결합 부위 각각이 RSPO 단백질 상의 상동성 에피토프에 결합할 수 있다 (또는 결합한다). 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 단일특이적 항체의 항원-결합 부위가, 예를 들어, RSPO1 및 RSPO2에 결합할 수 있다 (또는 결합한다) (즉, 동일한 에피토프가 RSPO1 및 RSPO2 단백질 양쪽 모두에서 발견된다).

[0162] 특정 실시양태에서, RSPO-결합체는 항체 단편이다. 항체 단편은 무손상 항체와 기능 또는 능력이 상이할 수 있다; 예를 들어, 항체 단편은 종양 침투가 증가될 수 있다. 무손상 항체의 단백질분해성 소화를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 기술이 항체 단편의 생산을 위해 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 항체 단편에는 항체 분자의 펩신 소화에 의해 생산된  $F(ab')_2$  단편이 포함된다. 일부 실시양태에서, 항체 단편에는  $F(ab')_2$  단편의 디슬피드 다리를 환원시킴으로서 생성된 Fab 단편이 포함된다. 다른 실시양태에서, 항체 단편에는 항체 분자를 파파인 및 환원제로 처리하여 생성된 Fab 단편이 포함된다. 특정 실시양태에서, 재조합에 의해 항체 단편이 생산된다. 일부 실시양태에서, 항체 단편에는 Fv 또는 단일쇄 Fv (scFv) 단편이 포함된다. 이. 콜라이 또는 기타 숙주 세포로부터 Fab, Fv, 및 scFv 항체 단편이 발현 및 분비될 수 있어, 다양한 이러한 단편의 생산을 허용한다. 일부 실시양태에서, 본원에 논의된 바와 같이 항체 파지 라이브러리로부터 항체 단편이 단리된다. 예를 들어, RSPO 단백질 또는 이의 유도체, 단편, 유사체 또는 상동체에 대한 원하는 특이성이 있는 모노클로날 Fab 단편의 신속하고 효과적인 확인을 허용하도록 Fab 발현 라이브러리의 구축을 위한 방법을 사용할 수 있다 (문헌 [Huse et al., 1989, Science, 246:1275-1281]). 일부 실시양태에서, 항체 단편은 선형 항체 단편이다. 특정 실시양태에서, 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적이다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체는 scFv이다. 하나 이상의 인간 RSPO에 대해 특이적인 단일쇄 항체의 생산을 위해 다양한 기술을 사용할 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,946,778 참조).

[0163] 특히 항체 단편의 경우, 혈청 반감기를 증가시키기 위해 항체를 변형시키는 것이 추가로 바람직할 수 있다. 이

는, 예를 들어, 항체 단편 내의 적합한 영역의 돌연변이에 의해 살비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 항체 단편 내로 흡입시키는 것에 의해, 또는 이러한 에피토프를 웨티드 태그(tag) 내로 흡입한 후, 이러한 태그를 끝 부분에서 또는 중간에서 (예를 들어, DNA 또는 웨티드 합성에 의해) 항체 단편에 융합시킴으로써 달성될 수 있다.

[0164] 이종접합체 항체 또한 본 발명의 범주 내에 포함된다. 이종접합체 항체는 2개의 공유결합으로 연결된 항체로 구성된다. 이같은 항체는, 예를 들어, 면역 세포를 원치 않는 세포에 표적화하도록 제안되었다 (미국 특허 번호 4,676,980). 가교체를 수반하는 것이 포함되는, 합성 단백질 화학에서의 공지된 방법을 사용하여 시험관 내에서 이종접합체 항체를 제조할 수 있는 것으로 또한 구상된다. 예를 들어, 디슬피드 교환 반응을 사용하여 또는 티오에테르 결합을 형성시킴으로써 면역독소를 구축할 수 있다. 이러한 목적을 위한 적절한 시약의 예로는 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토부티리미데이트가 포함된다.

[0165] 본 발명의 목적을 위해, 변형된 항체가 항체와 표적 (즉, 인간 RSP01 또는 인간 RSP02)의 회합을 제공하는 임의 유형의 가변 영역을 포함할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 이와 관련하여, 가변 영역은 체액성 반응을 개시하고 원하는 종양 관련 항원에 대한 면역글로불린을 생성하도록 유도될 수 있는 임의 유형의 포유동물을 포함하거나 이로부터 유래될 수 있다. 그러므로, 변형된 항체의 가변 영역은, 예를 들어, 인간, 뮤린, 비-인간 영장류 (예를 들어, 시노몰구스 원숭이, 마카크 등) 또는 토끼로부터 기원할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 면역글로불린의 가변 및 불변 영역 양쪽 모두 인간의 것이다. 다른 실시양태에서, 분자의 결합 성질을 개선하거나 이의 면역원성을 감소시키기 위해 호환성 항체 (일반적으로, 비-인간 원천으로부터 유래됨)의 가변 영역이 조작되거나 또는 특이적으로 맞춤 제작될 수 있다. 이러한 점에서, 본 발명에서 유용한 가변 영역은 인간화될 수 있거나 또는 수입 아미노산 서열의 포함을 통해 다른 방식으로 변경될 수 있다.

[0166] 특정 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 양쪽 모두 내의 가변 도메인이 하나 이상의 CDR의 적어도 부분적인 교체에 의해, 그리고 필요하다면 부분적인 프레임워크 영역 교체 및 서열 변형 및/또는 변경에 의해 변경된다. 프레임워크 영역이 유래된 항체와 동일한 클래스 또는 심지어 서브클래스의 항체로부터 CDR이 유래될 수 있지만, 상이한 클래스의 항체로부터, 바람직하게는 상이한 종으로부터의 항체로부터 CDR이 유래될 것으로 구상된다. 한 가변 도메인의 항원 결합 능력을 또 다른 가변 도메인으로 전달하기 위해 모든 CDR을 도너 가변 영역으로부터의 CDR로 교체하는 것이 필수적이지 않을 수 있다. 오히려, 항원-결합 부위의 활성을 유지하는데 필요한 찬기들만 전달하는 것만이 필요할 수 있다. 미국 특허 번호 5,585,089, 5,693,761 및 5,693,762에 기재된 설명을 고려하여, 일상적인 실험을 수행함으로써 또는 면역원성이 감소된 기능성 항체를 수득하기 위한 시행 착오 테스트에 의해 이는 충분히 당업자의 능력 내에 속할 것이다.

[0167] 가변 영역에 대한 변경에도 불구하고, 당업자는 본 발명의 변형된 항체가 천연 불변 영역 또는 변경되지 않은 불변 영역을 포함하는 면역원성이 대략적으로 동일한 항체와 비교했을 때 증가된 종양 국소화 또는 증가된 혈청 반감기와 같은 원하는 생화학적 특성을 제공하도록 불변 영역 도메인 중 하나 이상의 적어도 일부분이 결실되거나 또는 다른 방식으로 변경된 항체 (예를 들어, 전장 항체 또는 이의 면역반응성 단편)를 포함할 것임을 인지 할 것이다. 일부 실시양태에서, 변형된 항체의 불변 영역은 인간 불변 영역을 포함할 것이다. 본 발명과 상용 성인 불변 영역에 대한 변경은 하나 이상의 도메인에서의 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실 또는 치환을 포함한다. 본원에 개시된 변형된 항체는 3개의 중쇄 불변 도메인 (CH1, CH2 또는 CH3) 중 어느 하나 및/또는 경쇄 불변 도메인 (CL)에 대한 변경 또는 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 항체의 불변 영역으로부터 하나 이상의 도메인이 부분적으로 또는 전체적으로 결실된다. 일부 실시양태에서, 변형된 항체는 전체 CH2 도메인이 결실된 도메인 결실 구축물 또는 변이체 ( $\Delta$ CH2 구축물)을 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 생략된 불변 영역 도메인이 부재하는 불변 영역이 전형적으로 부여하는 분자 유연성의 일부를 제공하는 짧은 아미노산 스페이서 (예를 들어, 10개의 아미노산 잔기)로 교체된다.

[0168] 일부 실시양태에서, 변형된 항체가 CH3 도메인을 항체의 힌지(hinge) 영역에 직접적으로 융합시키도록 조작된다. 다른 실시양태에서, 웨티드 스페이서가 힌지 영역과 변형된 CH2 및/또는 CH3 도메인 사이에 삽입된다. 예를 들어, CH2 도메인이 결실되었고 나머지 CH3 도메인 (변형 또는 미변형)이 아미노산 5-20개의 스페이서로 힌지 영역에 연결된 구축물이 발현될 수 있다. 불변 도메인의 조절 요소가 여전히 자유롭고 접근 가능하거나 또는 힌지 영역이 여전히 가요성인 것을 확실하게 하도록 이같은 스페이서가 부가될 수 있다. 그러나, 일부 경우, 아미노산 스페이서가 면역원성이고 구축물에 대한 원치않는 면역 반응을 일으키는 것으로 입증될 수 있음을 주지하여야 한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 구축물에 부가되는 임의의 스페이서는 변형된 항체의 원하는 생물학적 품질을 유지하도록 비교적 비-면역원성일 것이다.

[0169]

일부 실시양태에서, 변형된 항체는 불변 도메인의 부분적인 결실 또는 소수의 아미노산 또는 심지어 단일 아미노산의 치환만이 있을 수 있다. 예를 들어, CH2 도메인의 선택된 구역 내의 단일 아미노산의 돌연변이가 Fc 결합을 실질적으로 감소시키는데, 그리고 이에 의해 암 세포 국소화 및/또는 종양 침투를 증가시키는데 충분할 수 있다. 유사하게, 조절될 특이적 이펙터 기능 (예를 들어, 보체 C1q 결합)을 제어하는 하나 이상의 불변 영역의 일부분을 간단히 결실시키는 것이 바람직할 수 있다. 불변 영역의 이같은 부분적인 결실은 무손상인 대상 불변 영역 도메인과 연관된 다른 바람직한 기능은 남기면서 항체의 선택된 특성 (혈청 반감기)를 개선시킬 수 있다. 또한, 상기에 언급된 바와 같이, 개시된 항체의 불변 영역이 생성된 구출물의 프로파일을 강화하는 하나 이상의 아미노산의 돌연변이 또는 치환을 통해 변형될 수 있다. 이러한 점에서, 변형된 항체의 형상 및 면역원성 프로파일을 실질적으로 유지시키면서, 보존된 결합 부위가 제공하는 활성 (예를 들어, Fc 결합)을 파괴하는 것이 가능할 수 있다. 특정 실시양태에서, 변형된 항체는 원하는 특성 예컨대 이펙터 기능을 증가 또는 감소시키는 것을 강화하도록 또는 더 많은 세포독소 또는 탄수화물 부착 부위를 제공하도록 불변 영역에 하나 이상의 아미노산을 부가하는 것을 포함한다.

[0170]

불변 영역이 여러 이펙터 기능을 매개한다는 것이 업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 보체의 C1 성분이 IgG 또는 IgM 항체 (항원엔 결합됨)의 Fc 영역에 결합하는 것은 보체 시스템을 활성화시킨다. 보체 활성화는 세포 병원체의 읍소닌화 및 용해에서 중요하다. 보체 활성화는 또한 염증성 반응을 자극하고, 자가면역 과민증에서 또한 수반될 수 있다. 또한, 항체의 Fc 영역은 Fc 수용체 (FcR)를 발현하는 세포에 결합할 수 있다. IgG (감마 수용체), IgE (엡실론 수용체), IgA (알파 수용체) 및 IgM (뮤 수용체)가 포함되는, 여러 항체 클래스에 대해 특이적인 다수의 Fc 수용체가 있다. 항체가 세포 표면 상의 Fc 수용체에 결합하는 것은 항체-코팅 입자의 포식 및 파괴, 면역 복합체의 제거, 킬러(killer) 세포에 의한 항체-코팅 표적 세포의 용해 (항체-의존적 세포 세포 독성 또는 ADCC로 칭해짐), 염증 매개물의 방출, 태반 통과, 및 면역글로불린 생산의 제어가 포함되는 다수의 중요하고 다양한 생물학적 반응을 유발한다.

[0171]

특정 실시양태에서, RSPO-결합 항체는 변경된 이펙터 기능을 제공하고, 차례로 이는 투여된 항체의 생물학적 프로파일에 영향을 미친다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, (점 돌연변이 또는 기타 수단을 통한) 불변 영역 도메인의 결실 또는 불활성화는 순환 중인 변형된 항체 (예를 들어, 항-RSPO1 항체)의 Fc 수용체 결합을 감소시킴으로써 암 세포 국소화 및/또는 종양 침투를 증가시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, 불변 영역 변형은 항체의 혈청 반감기를 증가 또는 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 디슬피드 결합 또는 올리고사카라이드 모이어티가 제거되도록 불변 영역이 변형된다. 본 발명에 따른 불변 영역에 대한 변형은 충분히 당업자의 범위 내인 주제된 생화학 또는 분자 공학 기술을 사용하여 쉽게 이루어질 수 있다.

[0172]

특정 실시양태에서, 항체인 RSPO-결합체는 하나 이상의 이펙터 기능이 없다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 이러한 항체는 ADCC 활성이 없고/없거나 보체-의존적 세포독성 (CDC) 활성이 없다. 특정 실시양태에서, 이러한 항체는 Fc 수용체 및/또는 보체 인자에 결합하지 않는다. 특정 실시양태에서, 이러한 항체는 이펙터 기능이 없다.

[0173]

본 발명은 본원에 기재된 키메라, 인간화 및 인간 항체, 또는 이의 항체 단편과 실질적으로 상동성인 변이체 및 등가물을 추가로 포함한다. 이들은, 예를 들어, 보존적 치환 돌연변이, 즉 유사한 아미노산에 의한 하나 이상의 아미노산의 치환을 함유할 수 있다. 예를 들어, 보존적 치환은 아미노산이 동일한 일반 클래스 내의 또 다른 아미노산으로, 예를 들어, 한 산성 아미노산이 또 다른 산성 아미노산으로, 한 염기성 아미노산이 또 다른 염기성 아미노산으로, 또는 한 중성 아미노산이 또 다른 중성 아미노산으로 치환되는 것을 지칭한다. 보존적 아미노산 치환이 의미하는 것은 당업계에 주지되어 있고, 본원에서 기술된다.

[0174]

따라서, 본 발명은 하나 이상의 RSPO 단백질에 결합하는 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 RSPO 단백질에 결합하는 항체를 생산하는 방법은 하이브리도마 기술을 사용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 RSPO1에 결합하는 항체를 생산하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 인간 RSPO1의 아미노산 31-263을 사용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 서열 1의 아미노산 31-263을 사용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 RSPO2에 결합하는 항체를 생산하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 인간 RSPO2의 아미노산 22-205를 사용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 서열 2의 아미노산 22-205를 사용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 RSPO3에 결합하는 항체를 생산하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 인간 RSPO3의 아미노산 22-272를 사용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 서열 3의 아미노산 22-272를 사용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 인간 RSPO 단백질에 결합하는 항체를 생성시키는 방법은 인간 파지 라이브러리를 스크리닝하는 것을 포함한다. 본 발명은 하나 이상의 RSPO 단백질에 결

합하는 항체를 확인하는 방법을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, RSPO 단백질 또는 이의 일부분에 결합하는 것에 대해 FACS에 의해 스크리닝함으로써 항체가 확인된다. 일부 실시양태에서, RSPO 단백질에 결합하는 것에 대해 ELISA를 사용하여 스크리닝함으로써 항체가 확인된다. 일부 실시양태에서, RSPO 단백질이 인간 LGR 단백질에 결합하는 것을 차단하는 것에 대해 FACS에 의해 스크리닝함으로써 항체가 확인된다. 일부 실시양태에서,  $\beta$ -카테닌 신호전달의 억제 또는 차단에 대해 스크리닝함으로써 항체가 확인된다.

[0175] 일부 실시양태에서, 인간 RSPO1 단백질에 대한 항체를 생성시키는 방법은 포유동물을 인간 RSPO1의 아미노산 31-263을 포함하는 폴리펩티드로 면역화시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 RSPO1 단백질에 대한 항체를 생성시키는 방법은 포유동물을 인간 RSPO1의 아미노산 21-263의 적어도 일부분을 포함하는 폴리펩티드로 면역화시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 포유동물로부터 항체 또는 항체-생산 세포를 단리하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, RSPO1 단백질에 결합하는 모노클로날 항체를 생성시키는 방법은 (a) 인간 RSPO1의 아미노산 21-263의 적어도 일부분을 포함하는 폴리펩티드로 포유동물을 면역화시키는 단계; (b) 면역화된 포유동물로부터 항체 생산 세포를 단리하는 단계; (c) 항체-생산 세포를 골수종 세포주의 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 (d) RSPO1 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 하이브리도마 세포를 선별하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 RSPO1의 아미노산 21-263의 적어도 일부분은 서열 5-9로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 인간 RSPO1의 아미노산 21-263의 적어도 일부분은 서열 9이다. 일부 실시양태에서, 인간 RSPO1의 아미노산 21-263의 적어도 일부분은 서열 6 또는 서열 7이다. 일부 실시양태에서, 인간 RSPO1의 아미노산 21-263의 적어도 일부분은 서열 6 및 서열 7이다. 특정 실시양태에서, 포유동물은 마우스이다. 일부 실시양태에서, 인간 RSPO1의 아미노산 21-263의 적어도 일부분을 포함하는 폴리펩티드를 사용하여 항체가 선별된다. 특정 실시양태에서, 인간 RSPO1의 아미노산 21-263의 적어도 일부분을 포함하는 선별용으로 사용된 폴리펩티드는 서열 5-9로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 항체는 RSPO1 및 하나 이상의 다른 RSPO 단백질에 결합한다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 다른 RSPO 단백질은 RSPO2, RSPO3 및 RSPO4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSPO1 및 RSPO2에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSPO1 및 RSPO3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSPO1 및 RSPO4에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSPO1, RSPO2 및 RSPO3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSPO1, RSPO2 및 RSPO4에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 RSPO1, RSPO3 및 RSPO4에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 RSPO1 및 마우스 RSPO1 양쪽 모두에 결합한다.

[0176] 일부 실시양태에서, 인간 RSPO2 단백질에 대한 항체를 생성시키는 방법은 포유동물을 인간 RSPO2의 아미노산 22-205를 포함하는 폴리펩티드로 면역화시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 RSPO2 단백질에 대한 항체를 생성시키는 방법은 포유동물을 인간 RSPO2의 아미노산 22-243의 적어도 일부분을 포함하는 폴리펩티드로 면역화시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 포유동물로부터 항체 또는 항체-생산 세포를 단리하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, RSPO2 단백질에 결합하는 모노클로날 항체를 생성시키는 방법은 (a) 인간 RSPO2의 아미노산 22-243의 적어도 일부분을 포함하는 폴리펩티드로 포유동물을 면역화시키는 단계; (b) 면역화된 포유동물로부터 항체 생산 세포를 단리하는 단계; (c) 항체-생산 세포를 골수종 세포주의 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 (d) RSPO2 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 하이브리도마 세포를 선별하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 RSPO2의 아미노산 22-243의 적어도 일부분은 서열 44-47로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 인간 RSPO2의 아미노산 22-243의 적어도 일부분은 서열 44이다. 일부 실시양태에서, 인간 RSPO2의 아미노산 22-243의 적어도 일부분은 서열 45 또는 서열 46이다. 일부 실시양태에서, 인간 RSPO2의 아미노산 22-243의 적어도 일부분은 서열 45 및 서열 46이다. 특정 실시양태에서, 포유동물은 마우스이다. 일부 실시양태에서, 인간 RSPO2의 아미노산 22-243의 적어도 일부분을 포함하는 폴리펩티드를 사용하여 항체가 선별된다. 특정 실시양태에서, 인간 RSPO2의 아미노산 22-243의 적어도 일부분을 포함하는 선별용으로 사용된 폴리펩티드는 서열 44-47로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 항체는 RSPO2 및 하나 이상의 다른 RSPO 단백질에 결합한다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 다른 RSPO 단백질은 RSPO1, RSPO3 및 RSPO4로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSPO2 및 RSPO1에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSPO2 및 RSPO3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSPO2 및 RSPO4에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSPO2, RSPO1 및 RSPO3에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSPO2, RSPO3 및 RSPO4에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSPO2, RSPO1 및 RSPO4에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 RSPO2 및 마우스 RSPO2 양쪽 모두에 결합한다.

[0177] 일부 실시양태에서, 인간 RSPO3 단백질에 대한 항체를 생성시키는 방법은 포유동물을 인간 RSPO3의 아미노산

22-272를 포함하는 폴리펩티드로 면역화시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 RSP03 단백질에 대한 항체를 생성시키는 방법은 포유동물을 인간 RSP03의 아미노산 22-272의 적어도 일부분을 포함하는 폴리펩티드로 면역화시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 포유동물로부터 항체 또는 항체-생산 세포를 단리하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, RSP03 단백질에 결합하는 모노클로날 항체를 생성시키는 방법은 (a) 인간 RSP03의 아미노산 22-272의 적어도 일부분을 포함하는 폴리펩티드로 포유동물을 면역화시키는 단계; (b) 면역화된 포유동물로부터 항체 생산 세포를 단리하는 단계; (c) 항체-생산 세포를 골수종 세포주의 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 (d) RSP03 단백질에 결합하는 항체를 발현하는 하이브리도마 세포를 선별하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 RSP03의 아미노산 22-272의 적어도 일부분은 서열 48-51로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 인간 RSP03의 아미노산 22-272의 적어도 일부분은 서열 48이다. 일부 실시양태에서, 인간 RSP03의 아미노산 22-272의 적어도 일부분은 서열 49 또는 서열 50이다. 일부 실시양태에서, 인간 RSP03의 아미노산 22-272의 적어도 일부분은 서열 49 및 서열 50이다. 특정 실시양태에서, 포유동물은 마우스이다. 일부 실시양태에서, 인간 RSP03의 아미노산 22-272의 적어도 일부분을 포함하는 폴리펩티드를 사용하여 항체가 선별된다. 특정 실시양태에서, 인간 RSP03의 아미노산 22-272의 적어도 일부분을 포함하는 선별용으로 사용된 폴리펩티드는 서열 48-51로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 항체는 RSP03 및 하나 이상의 다른 RSPO 단백질에 결합한다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 다른 RSPO 단백질은 RSP02, RSP04 및 RSP01로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSP03 및 RSP01에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSP03 및 RSP02에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSP03 및 RSP04에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSP03, RSP01 및 RSP02에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSP03, RSP01 및 RSP04에 결합한다. 특정 실시양태에서, 항체는 RSP03, RSP02 및 RSP04에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 RSP03 및 마우스 RSP03 양쪽 모두에 결합한다.

[0178] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 방법에 의해 생성된 항체는 RSPO 길항제이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 방법에 의해 생성된 항체는  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제한다.

[0179] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 인간 RSPO 단백질에 대한 항체를 생산하는 방법은 단일 항원-결합 부위를 포함하는 막-결합 이종이량체성 분자를 사용하여 항체를 확인하는 것을 포함한다. 일부 비제한적인 실시양태에서, 본원에 전문이 참고로 포함된 국제 공개 WO 2011/100566에 기술된 방법 및 폴리펩티드를 사용하여 항체가 확인된다.

[0180] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 인간 RSPO 단백질에 대한 항체를 생산하는 방법은 인간 RSPO 단백질에 결합하는 항체에 대해 항체-발현 라이브러리를 스크리닝하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체-발현 라이브러리는 파지 라이브러리이다. 일부 실시양태에서, 스크리닝은 패닝(panning)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 RSP01의 아미노산 21-263의 적어도 일부분을 사용하여 항체-발현 라이브러리 (예를 들어, 파지 라이브러리)가 스크리닝된다. 일부 실시양태에서, 1차 스크리닝에서 확인된 항체를 상이한 RSPO 단백질을 사용하여 다시 스크리닝함으로써, RSP01 및 제2 RSPO 단백질에 결합하는 항체가 확인된다. 특정 실시양태에서, 스크리닝에 사용된 폴리펩티드는 서열 5-9로 이루어진 군으로부터 선택된 인간 RSP01의 아미노산 21-263의 적어도 일부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 스크리닝에서 확인된 항체는 RSP01 및 하나 이상의 다른 RSPO 단백질에 결합한다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 다른 RSPO 단백질은 RSP02, RSP03 및 RSP04로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 스크리닝에서 확인된 항체는 RSP01 및 RSP02에 결합한다. 특정 실시양태에서, 스크리닝에서 확인된 항체는 RSP01 및 RSP03에 결합한다. 특정 실시양태에서, 스크리닝에서 확인된 항체는 RSP01 및 RSP04에 결합한다. 일부 실시양태에서, 스크리닝에서 확인된 항체는 인간 RSP01 및 마우스 RSP01 양쪽 모두에 결합한다. 일부 실시양태에서, 스크리닝에서 확인된 항체는 RSP01 길항제이다. 일부 실시양태에서, 스크리닝에서 확인된 항체는 RSP01에 의해 유도되는  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제한다. 일부 실시양태에서, 인간 RSP02의 아미노산 22-205의 적어도 일부분을 사용하여 항체-발현 라이브러리 (예를 들어, 파지 라이브러리)가 스크리닝된다. 일부 실시양태에서, 1차 스크리닝에서 확인된 항체를 상이한 RSPO 단백질을 사용하여 다시 스크리닝함으로써, RSP02 및 제2 RSPO 단백질에 결합하는 항체가 확인된다. 특정 실시양태에서, 스크리닝에 사용된 폴리펩티드는 서열 44-47로 이루어진 군으로부터 선택된 인간 RSP02의 아미노산 22-205의 적어도 일부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 스크리닝에서 확인된 항체는 RSP02 및 하나 이상의 다른 RSPO 단백질에 결합한다. 특정 실시양태에서, 하나 이상의 다른 RSPO 단백질은 RSP01, RSP03 및 RSP04로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 스크리닝에서 확인된 항체는 RSP02 및 RSP03에 결합한다. 특정 실시양태에서, 스크리닝에서 확인된 항체는 RSP02 및 RSP04에 결합한다. 특정 실시양태에서, 스크리닝에서 확인된 항체는 RSP02 및 RSP01에 결합한다. 일부 실시양태에서, 스크리닝에서 확인된 항체는 인간 RSP02 및 마우스

RSPO2 양쪽 모두에 결합한다. 일부 실시양태에서, 스크리닝에서 확인된 항체는 RSPO2 길항제이다. 일부 실시양태에서, 스크리닝에서 확인된 항체는 RSPO2에 의해 유도된  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제한다.

[0181] 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 항체가 단리된다. 특정 실시양태에서, 본원에 기술된 항체는 실질적으로 순수하다.

[0182] 본 발명의 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는 폴리펩티드이다. 이러한 폴리펩티드는 하나 이상의 인간 RSPO 단백질에 결합하는 항체 또는 이의 단편을 포함하는 재조합 폴리펩티드, 천연 폴리펩티드 또는 합성 폴리펩티드일 수 있다. 단백질의 구조 또는 기능에 대한 유의한 효과 없이 본 발명의 일부 아미노산 서열이 변할 수 있다는 것이 업계에서 인정될 것이다. 따라서, 본 발명은 실질적인 활성을 나타내거나 또는 인간 RSPO 단백질에 대한 항체 또는 이의 단편의 영역을 포함하는 폴리펩티드의 변형물을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합 폴리펩티드의 아미노산 서열 변형에는 결실, 삽입, 역전, 반복 및/또는 기타 유형의 치환이 포함된다.

[0183] 정상적으로는 폴리펩티드의 일부분이 아닌 추가적인 화학 모이어티를 함유하도록 폴리펩티드, 이의 유사체 및 변이체가 추가로 변형될 수 있다. 유도체화된 모이어티는 폴리펩티드의 용해도, 생물학적 반감기 및/또는 흡수를 개선할 수 있다. 이러한 모이어티는 폴리펩티드 및 변이체의 임의의 바람직하지 않은 부작용을 감소시키거나 제거할 수도 있다. 화학적 모이어티에 대한 개관을 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, 2005, University of the Sciences, Philadelphia, PA]에서 확인할 수 있다.

[0184] 업계에 공지된 임의의 적절한 방법에 의해 본원에 기술된 단리된 폴리펩티드가 생산될 수 있다. 이같은 방법은 직접적인 단백질 합성 방법에서 폴리펩티드 서열을 코딩하는 DNA 서열을 구축하고 이러한 서열을 적절한 숙주에서 발현시키는 것까지에 이른다. 일부 실시양태에서, 관심 야생형 단백질을 코딩하는 DNA 서열을 단리하거나 합성함으로써 재조합 기술을 사용하여 DNA 서열이 구축된다. 임의적으로, 이러한 서열을 부위-지정 돌연변이 유발에 의해 돌연변이시켜 이의 기능적 유사체를 제공할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Zoeller et al., 1984, PNAS, 81:5662-5066 및 미국 특허 번호 4,588,585] 참조.

[0185] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 합성기를 사용하여 화학적 합성에 의해 관심 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 서열이 구축될 수 있다. 원하는 폴리펩티드의 아미노산 서열을 기초로 하고, 관심 재조합 폴리펩티드가 생산될 숙주 세포에서 유리한 코돈을 선택하여, 올리고뉴클레오티드를 디자인할 수 있다. 표준 방법을 적용하여 단리된 관심 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 합성할 수 있다. 예를 들어, 완전한 아미노산 서열을 사용하여 역번역 유전자를 구축할 수 있다. 추가로, 특정한 단리된 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 DNA 올리고머를 합성할 수 있다. 예를 들어, 원하는 폴리펩티드의 일부분을 코딩하는 여러 소형 올리고뉴클레오티드를 합성한 후 결찰시킬 수 있다. 개별적인 올리고뉴클레오티드들은 상보적인 조립을 위해 5' 또는 3' 오버행(overhang)을 전형적으로 함유한다.

[0186] 일단 조립되면 (합성, 부위-지정 돌연변이 유발, 또는 또 다른 방법에 의해), 특정 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 발현 벡터 내로 삽입할 수 있고, 원하는 숙주에서의 단백질 발현에 적합한 발현 제어 서열에 작동적으로 연결시킬 수 있다. 뉴클레오티드 서열분석, 반응 효소 지도작성, 및/또는 적절한 숙주에서의 생물학적으로 활성인 폴리펩티드의 발현에 의해 올바른 조립이 확증될 수 있다. 업계에 주지된 바와 같이, 숙주에서 형질감염된 유전자의 높은 발현 수준을 수득하기 위해, 선택된 발현 숙주에서 기능성인 전사 및 번역 발현 제어 서열에 유전자가 작동적으로 연결되어야 한다.

[0187] 특정 실시양태에서, 재조합 발현 벡터를 사용하여, 인간 RSPO 단백질에 대한 항체 또는 이의 단편을 코딩하는 DNA를 증폭 및 발현시킬 수 있다. 예를 들어, 재조합 발현 벡터는 포유동물, 미생물, 바이러스 또는 곤충 유전자로부터 유래된 적절한 전사 및/또는 번역 조절 요소에 작동 가능하게 연결된, RSPO-결합제, 항-RSPO 항체 또는 이의 단편의 폴리펩티드 사슬을 코딩하는 합성 또는 cDNA-유래 DNA 단편이 있는 복제 가능한 DNA 구축물일 수 있다. 일반적으로 전사 단위는 (1) 유전자 발현에서 조절 역할이 있는 유전 요소 또는 요소들, 예를 들어, 전사 프로모터 또는 인핸서, (2) mRNA로 전사되고 단백질로 번역되는 구조적 또는 코딩 서열, 및 (3) 적합한 전사 및 번역 개시 및 종결 서열의 조립물을 포함한다. 조절 요소는 전사를 제어하는 오퍼레이터 서열을 포함할 수 있다. 숙주에서 복제되는 능력 (일반적으로 복제 기원에 의해 부여됨), 및 형질전환체의 인식을 용이하게 하는 선별 유전자가 추가적으로 혼입될 수 있다. DNA 영역들은 이들이 서로 기능적으로 관련될 때 "작동 가능하게 연결"된다. 예를 들어, 폴리펩티드의 분비에 참여하는 전구체로서 발현되는 경우에 신호 웨პ티드 (분비 리더)에 대한 DNA가 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동 가능하게 연결되거나; 서열의 전사를 제어하는 경우에 프로모터가 코딩 서열에 작동 가능하게 연결되거나; 또는 번역을 허용하도록 위치하는 경우에 리보솜 결합 부위가 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 효모 발현 시스템에서의 사용에 의도되는 구조 요소에는 숙주 세

포에 의한 번역된 단백질의 세포외 분비를 가능하게 하는 리더 서열이 포함된다. 다른 실시양태에서, 재조합 단백질이 리더 또는 운반 서열 없이 발현되는 경우, 이는 N-말단 메티오닌 잔기를 포함할 수 있다. 임의적으로는 이어서 이러한 잔기가 발현된 재조합 단백질로부터 제거되어 최종 생성물을 제공할 수 있다.

[0188] 발현 제어 서열 및 발현 벡터의 선택은 숙주의 선택에 좌우된다. 광범위한 발현 숙주/벡터 조합을 사용할 수 있다. 진핵생물 숙주를 위한 유용한 발현 벡터에는, 예를 들어, SV40, 소 유두종 바이러스, 아데노바이러스 및 사이토메갈로바이러스로부터의 발현 제어 서열을 포함하는 벡터가 포함된다. 박테리아 숙주를 위한 유용한 발현 벡터에는 공지된 박테리아 플라스미드, 예컨대 이. 콜라이로부터의 플라스미드 (pCR1, pBR322, pMB9 및 이들의 유도체가 포함됨), 및 더 넓은 숙주 범위의 플라스미드, 예컨대 M13 및 기타 필라멘트형 단일 가닥 DNA 과자가 포함된다.

[0189] RSPO-결합 폴리펩티드 또는 항체 (또는 항원으로서 사용하기 위한 RSPO 단백질)의 발현을 위한 적절한 숙주 세포에는 적합한 프로모터의 제어 하의 원핵생물, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 고급 진핵생물 세포가 포함된다. 원핵생물에는 그람(gram)-음성 또는 그람-양성 생물, 예를 들어 이. 콜라이 또는 바실루스(Bacillus)가 포함된다. 고급 진핵생물 세포에는 하기 기술되는 바와 같은 포유동물 기원의 확립된 세포주가 포함된다. 무세포 번역 시스템을 또한 사용할 수 있다. 박테리아, 진균, 효모 및 포유동물 세포 숙주와 함께 사용하기 위한 적합한 클로닝 및 발현 벡터가 문헌 [Pouwels et al. (1985, Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, NY)]에 기술되어 있다. 항체 생산이 포함되는 단백질 생산 방법에 관한 추가적인 정보를, 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2008/0187954, 미국 특허 번호 6,413,746 및 6,660,501, 및 국제 특허 공개 번호 WO 04009823에서 확인할 수 있다.

[0190] 다양한 포유동물 또는 곤충 세포 배양 시스템이 재조합 폴리펩티드를 발현시키는데 사용된다. 포유동물 세포에서의 재조합 단백질 발현이 바람직할 수 있는데, 이같은 단백질이 일반적으로 정확하게 풀딩되고, 적합하게 변형되며, 완전히 기능성이기 때문이다. 적절한 포유동물 숙주 세포주의 예로는 COS-7 (원숭이 신장-유래), L-929 (뮤린 섬유모세포-유래), C127 (뮤린 유방 종양-유래), 3T3 (뮤린 섬유모세포-유래), CHO (차이니즈 햄스터 난소-유래), HeLa (인간 자궁경부암-유래), BHK (햄스터 신장 섬유모세포-유래), 및 HEK-293 (인간 배아 신장-유래) 세포주 및 이의 변이체가 포함된다. 포유동물 발현 벡터는 비-전사 요소들 예컨대 복제 기원, 발현될 유전자에 연결된 적절한 프로모터 및 인핸서, 및 5' 또는 3'에 플랭킹(flanking)된 기타 비-전사 서열, 및 5' 또는 3' 비-번역 서열, 예컨대 필요한 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 부위, 스플라이스 도너 및 어셉터 부위, 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 곤충 세포에서의 이종성 단백질의 생산을 위한 배클로바이러스 시스템이 당업자에게 주지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Luckow and Summers, 1988, Bio/Technology, 6:47] 참조).

[0191] 따라서, 본 발명은 본원에 기술된 RSPO-결합체를 포함하는 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 이러한 세포는 본원에 기술된 RSPO-결합체를 생산한다. 특정 실시양태에서, 이러한 세포는 항체를 생산한다. 특정 실시양태에서, 이러한 세포는 항체 89M5를 생산한다. 특정 실시양태에서, 이러한 세포는 항체 h89M5-H2L2를 생산한다. 특정 실시양태에서, 이러한 세포는 항체 130M23을 생산한다. 특정 실시양태에서, 이러한 세포는 항체 h130M23-H1L2를 생산한다. 특정 실시양태에서, 이러한 세포는 항체 h130M23-H1L6를 생산한다. 일부 실시양태에서, 이러한 세포는 ATCC 기탁 번호가 PTA-11970인 하이브리도마 세포주이다. 일부 실시양태에서, 세포는 ATCC 기탁 번호가 PTA-12021인 하이브리도마 세포주이다.

[0192] 형질전환된 숙주에 의해 생산된 단백질이 임의의 적절한 방법에 따라 정제될 수 있다. 표준 방법에는 크로마토그래피 (예를 들어, 이온 교환, 친화력, 및 사이징(sizing) 칼럼 크로마토그래피), 원심분리, 차별적 용해도, 또는 단백질 정제를 위한 임의의 기타 표준 기술이 포함된다. 적합한 친화력 칼럼에 통과시킴으로써 정제를 용이하게 하도록 친화력 태그 예컨대 헥사-히스티딘, 말토스 결합 도메인, 인플루엔자 코트 서열 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제(transferase)가 단백질에 부착될 수 있다. 단리된 단백질을 단백질용해, 질량 분광법 (MS), 핵 자기 공명 (NMR), 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC), 및 x선 결정학과 같은 기술을 사용하여 물리적으로 특성화할 수도 있다.

[0193] 일부 실시양태에서, 재조합 단백질을 배양 배지 내로 분비하는 발현 시스템으로부터의 상청액을 먼저 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어, 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 초원심분리 유닛을 사용하여 농축할 수 있다. 수 있다. 농축 단계에 이어서, 농축물을 적절한 정제 매트릭스에 적용할 수 있다. 별법적으로, 음이온 교환 수지, 예를 들어, 디에틸아미노에틸 (DEAE) 기가 매달려있는 매트릭스 또는 기판을 사용할 수 있다. 매트릭스는 아크릴아미드, 아가로스, 텍스트란, 셀룰로스 또는 단백질 정제에서 통상적으로 사용되는 기타 유형일 수 있다. 일부 실시양태에서, 양이온 교환 단계가 사용될 수 있다. 적절한 양이온 교환체

에는 술포프로필 또는 카르복시메틸 기를 포함하는 다양한 불용성 매트릭스가 포함된다. 일부 실시양태에서, 세라믹 히드록시아파타이트 (CHT)가 포함되지만 이에 한정되지 않는 히드록시아파타이트 배지가 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 소수성 RP-HPLC 매질, 예를 들어, 메틸 또는 기타 지방족 기가 매달려 있는 실리카겔을 사용하는 1회 이상의 역상 HPLC 단계를 사용하여 RSPO-결합제를 추가로 정제할 수 있다. 균질한 재조합 단백질을 제공하기 위해 상기 정제 단계들 중 일부 또는 전체가 다양하게 조합되어 사용될 수도 있다.

[0194] 일부 실시양태에서, 박테리아 배양에서 생산된 재조합 단백질이, 예를 들어, 세포 펠릿으로부터의 초기 추출에 이어지는 1회 이상의 원심분리, 염석, 수성 이온 교환 또는 크기 배제 크로마토그래피 단계에 의해 단리될 수 있다. HPLC가 최종 정제 단계에 사용될 수 있다. 재조합 단백질의 발현에서 사용된 미생물 세포를 동결-해동 사이클링, 초음파처리, 기계적 파괴, 또는 세포 용해제의 사용이 포함되는 임의의 편리한 방법에 의해 파괴할 수 있다.

[0195] 항체 및 기타 단백질을 정제하기 위한 업계에 공지된 방법에는, 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2008/0312425, 2008/0177048, 및 2009/0187005에 기술된 것들이 또한 포함된다.

[0196] 특정 실시양태에서, RSPO-결합제는 항체가 아닌 폴리펩티드이다. 단백질 표적에 높은 친화력으로 결합하는 비-항체 폴리펩티드를 확인 및 생산하기 위한 다양한 방법이 업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Skerra, 2007, Curr. Opin. Biotechnol., 18:295-304]; [Hosse et al., 2006, Protein Science, 15:14-27]; [Gill et al., 2006, Curr. Opin. Biotechnol., 17:653-658]; [Nygren, 2008, FEBS J., 275:2668-76]; 및 [Skerra, 2008, FEBS J., 275:2677-83] 참조. 특정 실시양태에서, 파지 디스플레이 기술이 RSPO-결합 폴리펩티드를 생산 및/또는 확인하는데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 폴리펩티드는 단백질 A, 단백질 G, 리포칼린, 피브로넥틴 도메인, 안키린 컨센서스 반복 도메인 및 티오레독신으로 이루어진 군으로부터 선택된 유형의 단백질 스캐폴드를 포함한다.

[0197] 특정 실시양태에서, RSPO-결합제 또는 항체는 다수의 접합 형태 (즉, 면역접합체 또는 방사성접합체) 또는 비-접합 형태 중 어느 하나로 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 보체-의존적 세포독성 및 항체 의존적 세포 독성이 포함되는 대상체의 천연 방어 메커니즘을 이용하여 악성 또는 암 세포를 제거하도록 항체가 비-접합 형태로 사용될 수 있다.

[0198] 일부 실시양태에서, RSPO-결합제 (예를 들어, 항체 또는 폴리펩티드)가 세포독성제에 접합된다. 일부 실시양태에서, 세포독성제는 메토트렉세이트, 아드리아마이신, 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 기타 인터칼레이팅제(intercalating agent)가 포함되지만 이에 한정되지 않는 화학요법제이다. 일부 실시양태에서, 세포독성제는 디프테리아 A 사슬, 디프테리아 독소의 비-결합 활성 단편, 외독소 A 사슬, 리신 A 사슬, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 파이틀라카 아메리카나(Phytolaca americana) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(Momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(Sapaonaria officinalis) 억제제, 젤로닌, 미토젤린, 레스트릭토신, 폐노마이신, 에노마이신 및 트리코테센이 포함되지만 이에 한정되지 않는, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소, 또는 이의 단편이다. 일부 실시양태에서, 세포독성제는 방사성접합체 또는 방사성접합 항체를 생산하기 위한 방사성 동위원소이다. <sup>90</sup>Y, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>111</sup>In, <sup>131</sup>In, <sup>105</sup>Rh, <sup>153</sup>Sm, <sup>67</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga, <sup>166</sup>Ho, <sup>177</sup>Lu, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re 및 <sup>212</sup>Bi가 포함되지만 이에 한정되지 않는 다양한 방사성핵종이 방사성접합 항체의 생산에 이용 가능하다. 항체와 하나 이상의 소형 분자 독소, 예컨대 칼리키아마이신, 메이탄시노이드, 트리코테센 및 CC1065 및 독소 활성이 있는 이러한 독소들의 유도체의 접합체가 또한 사용될 수 있다. N-숙신이미딜-3-(2-파리딜디티올)프로파오네이트 (SPDP), 이미노티울란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오르 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)과 같은 다양한 이관능성 단백질-커플링제를 사용하여 항체와 세포독성제의 접합체가 제조될 수 있다.

### III. 폴리뉴클레오티드

[0200] 특정 실시양태에서, 본 발명은 하나 이상의 인간 RSPO에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 또는 이같은 폴리펩티드의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. "폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드"라는 용어는 폴리펩티드에 대한 코딩 서열만 포함하는 폴리뉴클레오티드, 뿐만 아니라 추가적인

코딩 및/또는 비-코딩 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, 본 발명은 인간 RSP0 단백질에 대한 항체를 코딩하거나 이같은 항체의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 RNA 형태 또는 DNA 형태일 수 있다. DNA에는 cDNA, 개놈 DNA 및 합성 DNA가 포함되고, 이는 이중 가닥 또는 단일 가닥일 수 있으며, 단일 가닥인 경우 코딩 가닥 또는 비-코딩 (안티-센스) 가닥일 수 있다.

[0201]

특정 실시양태에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 서열 10, 서열 11, 서열 21, 서열 22, 서열 25, 서열 26, 서열 53, 서열 55, 서열 57, 서열 59, 서열 68, 및 서열 69로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 서열 27, 서열 28, 서열 37, 서열 38, 서열 41, 서열 42, 서열 61, 서열 63, 서열 65, 서열 67, 서열 70, 서열 71, 서열 73, 서열 74, 및 서열 76으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 서열 19, 서열 20, 서열 23, 서열 24, 서열 52, 서열 54, 서열 56 및 서열 58로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 폴리뉴클레오티드는 서열 35, 서열 36, 서열 39, 서열 40, 서열 60, 서열 62, 서열 64, 서열 66, 서열 72, 및 서열 75로 이루어진 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0202]

일부 실시양태에서, 서열 52를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 플라스미드가 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열 56의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 플라스미드가 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열 60의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 플라스미드가 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열 64의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 플라스미드가 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열 72의 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 플라스미드가 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열 68 및/또는 서열 69를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 플라스미드가 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열 70 및/또는 서열 71을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 플라스미드가 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열 70 및/또는 서열 74를 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 플라스미드가 포함한다.

[0203]

특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 19, 서열 20, 서열 23, 서열 24, 서열 52, 서열 54, 서열 56, 및 서열 58로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드와 80% 이상 동일한, 85% 이상 동일한, 90% 이상 동일한, 95% 이상 동일한, 일부 실시양태에서는 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 서열 35, 서열 36, 서열 39, 서열 40, 서열 60, 서열 62, 서열 64, 서열 66, 서열 72, 및 서열 75로 이루어진 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드와 80% 이상 동일한, 85% 이상 동일한, 90% 이상 동일한, 95% 이상 동일한, 일부 실시양태에서는 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 서열 19, 서열 20, 서열 23, 서열 24, 서열 52, 서열 54, 서열 56, 및 서열 58, 서열 35, 서열 36, 서열 39, 서열 40, 서열 60, 서열 62, 서열 64, 서열 66, 서열 72, 또는 서열 75에 혼성화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드가 또한 제공된다. 특정 실시양태에서, 혼성화는 고 엔격성 조건 하에서의 혼성화이다.

[0204]

일부 실시양태에서, 서열 23 및 서열 24를 포함하는 폴리뉴클레오티드에 의해 항체가 코딩된다. 일부 실시양태에서, 서열 52 및 서열 56을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 의해 항체가 코딩된다. 일부 실시양태에서, 서열 39 및 서열 40을 포함하는 폴리뉴클레오티드에 의해 항체가 코딩된다. 일부 실시양태에서, 서열 60 및 서열 64를 포함하는 폴리뉴클레오티드에 의해 항체가 코딩된다. 일부 실시양태에서, 서열 60 및 서열 72를 포함하는 폴리뉴클레오티드에 의해 항체가 코딩된다.

[0205]

특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 폴리펩티드의 발현 및 숙주 세포로부터의 분비를 돋는 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 세포로부터의 폴리펩티드의 운반을 제어하기 위한 분비성 서열로서 기능하는 리더 서열 또는 신호 서열)에 동일한 리딩 프레임(reading frame) 내에서 융합된 성숙형 폴리펩티드에 대한 코딩 서열을 포함한다. 리더 서열이 있는 폴리펩티드는 프리(pre)-단백질이고, 성숙 형태의 폴리펩티드가 형성되도록 숙주 세포에 의해 절단되는 리더 서열이 있을 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 성숙형 단백질 + 추가적인 5' 아미노산 잔기인 프로(pro)-단백질을 또한 코딩할 수 있다. 프로(pro)-서열이 있는 성숙형 단백질이 프로-단백질이고, 이는 불활성 형태의 단백질이다. 프로-서열이 절단되면, 활성인 성숙형 단백질이 남는다.

[0206]

특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 예를 들어 코딩된 폴리펩티드의 정제를 허용하는 마커 서열에 동일한 리딩 프레임 내에서 융합된 성숙형 폴리펩티드에 대한 코딩 서열을 포함한다. 예를 들어, 마커 서열은 박테리아 숙주의 경우에 마커에 융합된 성숙형 폴리펩티드의 정제를 제공하도록 pQE-9 벡터가 공급하는 헥사-히스티딘

태그일 수 있거나, 또는 포유류 숙주 (예를 들어 COS-7 세포)가 사용되는 경우에는 마커 서열이 인플루엔자 해마글루티닌 단백질로부터 유래된 해마글루티닌 (HA) 태그일 수 있다. 일부 실시양태에서, 마커 서열은 다른 친화력 태그와 함께 사용될 수 있는 서열 DYKDDDDK (서열 18)의 웹티드인 FLAG-태그이다.

- [0207] 본 발명은 예를 들어 단편, 유사체 및/또는 유도체를 코딩하는 본원에서 상기에 기술된 폴리뉴클레오티드의 변이체에 추가로 관련된다.
- [0208] 특정 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기술된 RSPO-결합체 (예를 들어, 항체) 또는 이의 단편을 포함하는 폴리웹티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드와 약 80% 이상 동일한, 약 85% 이상 동일한, 약 90% 이상 동일한, 약 95% 이상 동일한, 일부 실시양태에서는 약 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0209] 본원에서 사용되는 경우, 기준 뉴클레오티드 서열과 예를 들어 95% 이상 "동일한" 뉴클레오티드 서열의 폴리뉴클레오티드라는 구절은 폴리뉴클레오티드 서열이 기준 뉴클레오티드 서열의 각각 100개의 뉴클레오티드 당 5개 까지의 점 돌연변이를 포함할 수 있다는 것을 제외하고는 이러한 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열이 기준 서열과 동일하다는 것을 의미하도록 의도된다. 바꿔 말하면, 기준 뉴클레오티드 서열과 95% 이상 동일한 뉴클레오티드 서열의 폴리뉴클레오티드를 수득하기 위해, 기준 서열 내의 뉴클레오티드의 5%까지가 결실되거나 또다른 뉴클레오티드로 치환될 수 있거나, 또는 기준 서열 내의 전체 뉴클레오티드의 5%까지의 얼마간의 뉴클레오티드가 기준 서열 새로 삽입될 수 있다. 기준 서열의 이러한 돌연변이는 기준 뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 위치 또는 이러한 말단 위치들 사이의 임의의 위치 (기준 서열 내의 뉴클레오티드들 사이에 개별적으로 또는 기준 서열 내의 하나 이상의 인접한 군으로 산재됨)에서 일어날 수 있다.
- [0210] 폴리뉴클레오티드 변이체는 코딩 영역, 비-코딩 영역, 또는 양쪽 모두에서의 변경을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 변이체는 침묵 치환, 부가 또는 결실을 일으키는 변경을 함유하지만, 코딩된 폴리웹티드의 성질 또는 활성을 변경시키지 않는다. 일부 실시양태에서, 유전자 코드의 동의성으로 인해 침묵 치환에 의해 뉴클레오티드 변이체가 생산된다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드 변이체는 아미노산 서열은 변화되지 않더라도 발현 차이 (예를 들어, 증가된 발현 또는 감소된 발현)을 초래하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 다양한 이유로, 예를 들어, 특정 숙주에 대한 코돈 발현을 최적화하기 위해 (즉, 인간 mRNA에서의 코돈을 이. 콜라이와 같은 박테리아 숙주가 선호하는 것으로 변화시키기 위해), 폴리뉴클레오티드 변이체가 생산될 수 있다.
- [0211] 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드가 단리된다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 실질적으로 순수하다.
- [0212] 본원에 기술된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 및 세포가 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는 발현 벡터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함한다.
- [0213] IV. 사용 방법 및 제약 조성물
- [0214] 본 발명의 RSPO-결합체 (폴리웹티드 및 항체가 포함됨)는 치료적 처치 방법, 예컨대 암의 처치를 포함하지만 이에 한정되지 않는 다양한 용도에서 유용하다. 특정 실시양태에서, 이러한 작용제는  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는데, 종양 성장을 억제하는데, 분화를 유도하는데, 종양 부피를 감소시키는데, 종양 내의 암 줄기 세포의 빈도를 감소시키는데, 및/또는 종양의 종양발생성을 감소시키는데 유용하다. 사용 방법은 시험관내, 생체외 또는 생체내 방법일 수 있다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체 또는 폴리웹티드 또는 항체는 인간 RSP01의 길항제이다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체 또는 폴리웹티드 또는 항체는 인간 RSP02의 길항제이다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체 또는 폴리웹티드 또는 항체는 인간 RSP03의 길항제이다.
- [0215] 특정 실시양태에서, RSPO-결합체는  $\beta$ -카테닌의 활성화, 증가된  $\beta$ -카테닌 신호전달, 및/또는 비정상적인  $\beta$ -카테닌 신호전달과 연관된 질환의 치료에서 유용하다. 특정 실시양태에서, 이러한 질환은  $\beta$ -카테닌 신호전달에 의존적인 질환이다. 특정 실시양태에서, 이러한 질환은  $\beta$ -카테닌 활성화에 의존적인 질환이다. 특정 실시양태에서, 증가된 수준의 줄기 세포 및/또는 전구 세포를 특징으로 하는 장애의 치료에서 RSPO-결합체가 사용된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 치료 유효량의 RSPO1-결합체 (예를 들어, 항체)를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 치료 유효량의 RSPO2-결합체 (예를 들어, 항체)를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 치료 유효량의 RSPO3-결합체 (예를 들어, 항체)를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0216]

본 발명은 본원에 기술된 RSPO-결합체 또는 항체를 사용하여 종양 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 종양 성장을 억제하는 방법은 세포를 시험관 내에서 RSPO-결합체 (예를 들어, 항체)와 접촉시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 불멸화된 세포주 또는 암 세포주를 배지에서 배양하고, 여기에 항-RSPO 항체 또는 기타 작용제를 투여하여 종양 성장을 억제한다. 일부 실시양태에서, 종양 세포를 환자 샘플, 예컨대 조직 생검, 흉막 삼출액 또는 혈액 샘플로부터 단리하고, 배지에서 배양하며, 여기에 RSPO-결합체를 첨가하여 종양 성장을 억제한다.

[0217]

일부 실시양태에서, 종양 성장을 억제하는 방법은 종양 또는 종양 세포를 생체 내에서 RSPO-결합체 (예를 들어, 항체)와 접촉시키는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 종양 또는 종양 세포를 RSPO-결합체와 접촉시키는 것은 동물 모델에서 착수된다. 예를 들어, RSPO-결합체를 이종이식편이 있는 면역손상 마우스 (예를 들어 NOD/SCID 마우스)에 투여할 수 있다. 일부 실시양태에서, 암 세포 또는 암 줄기 세포를 환자 샘플, 예컨대 조직 생검, 흉막 삼출액 또는 혈액 샘플로부터 단리하고, 이를 면역손상 마우스 내로 주사한 후, 이러한 마우스에 RSPO-결합체를 투여하여 종양 세포 성장을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체가 동물에게 투여된다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체가 동물에게 투여된다. 일부 실시양태에서, RSP03-결합체가 동물에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양 성장을 방지하기 위해 종양발생성인 세포를 동물 내로 도입하는 것과 동시에 또는 이러한 도입 직후에 RSPO-결합체가 투여된다 ("예방 모델"). 일부 실시양태에서, 종양이 특정 크기로 성장된 후에 치료제로서 RSPO-결합체가 투여된다 ("치료 모델"). 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 항체이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 항-RSP01 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP01 항체는 항체 89M5이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP01 항체는 항체 h89M5-H2L2이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 항-RSP02 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP02 항체는 항체 130M23이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP02 항체는 항체 h130M23-H1L2이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP02 항체는 항체 h130M23-H1L6이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 항-RSP03 항체이다.

[0218]

특정 실시양태에서, 종양 성장을 억제하는 방법은 대상체에게 치료 유효량의 TGYTMH (서열 12)를 포함하는 중쇄 CDR1, GINPNNGGTTYNQNFKG (서열 13)를 포함하는 중쇄 CDR2, 및 KEFSDGYYFFAY (서열 14)를 포함하는 중쇄 CDR3, 및/또는 KASQDVIFAVA (서열 15)를 포함하는 경쇄 CDR1, WASTRHT (서열 16)를 포함하는 경쇄 CDR2, 및 QQHYSTPW (서열 17)를 포함하는 경쇄 CDR3를 포함하는 RSPO-결합체를 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 종양 성장을 억제하는 방법은 대상체에게 치료 유효량의 SSYAMS (서열 29)를 포함하는 중쇄 CDR1, SISSGGSTYYPDHSVKG (서열 30)를 포함하는 중쇄 CDR2, 및 RGGDPGVYNGDYEDAMDY (서열 31)를 포함하는 중쇄 CDR3, 및/또는 KASQDVSSAVA (서열 32)를 포함하는 경쇄 CDR1, WASTRHT (서열 33)를 포함하는 경쇄 CDR2, 및 QQHYSTP (서열 34)를 포함하는 경쇄 CDR3을 포함하는 RSPO-결합체를 투여하는 것을 포함한다.

[0219]

특정 실시양태에서, 종양 성장을 억제하는 방법은 대상체에게 치료 유효량의 RSPO-결합체를 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 특정 실시양태에서, 대상체에 종양이 있거나, 대상체에서 종양이 제거되어 있다. 일부 실시양태에서, 대상체에 하나 이상의 RSPO 단백질 (예를 들어, RSP01, RSP02, 또는 RSP03)의 발현 수준이 상승된 종양이 있다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP01-결합체이다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 항체이다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 항체 89M5이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP01 항체는 항체 h89M5-H2L2이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP02-결합체이다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 항체이다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 항체 130M23이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP02 항체는 항체 h130M23-H1L2이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP03-결합체이다. 일부 실시양태에서, RSP03-결합체는 항체이다.

[0220]

특정 실시양태에서, 종양은  $\beta$ -카테닌 신호전달이 활성인 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은  $\beta$ -카테닌 신호전달이 비정상적인 종양이다. 특정 실시양태에서, 종양은 APC 종양 억제인자 유전자에서의 불활성화 돌연변이 (예를 들어, 말단절단 돌연변이)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 종양은 APC 종양 억제인자 유전자에서의 불활성화 돌연변이를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 종양은 야생형 APC 유전자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양은  $\beta$ -카테닌 유전자에서의 활성화 돌연변이를 포함하지 않는다. 특정 실시양태에서, 대상체가 이에 대해 치료 중인 암이 이같은 종양을 수반한다.

[0221]

특정 실시양태에서, 종양은 RSP01-결합체 또는 항체가 결합하는 RSP01을 발현한다. 특정 실시양태에서, 종양에 상승된 발현 수준의 RSP01이 있거나 또는 종양이 RSP01을 과발현한다. 일부 실시양태에서, 종양에 높은 발현 수준의 RSP01이 있다. 일반적으로, "종양에 상승된 발현 수준의" 단백질이 있다라는 구절 (또는 유사한 구절)은 동일한 조직 유형의 정상 조직 내의 동일한 단백질의 발현 수준에 비교되었을 때의 종양 내의 단백질의 발현 수준을 지칭한다. 그러나, 일부 실시양태에서, 일군의 조직 유형 내의 단백질의 평균 발현 수준에 비교되었을

때 종양 내의 단백질의 발현 수준이 "상승"되거나 또는 "높다". 일부 실시양태에서, 동일한 조직 유형 또는 상이한 조직 유형의 다른 종양 내의 단백질의 발현 수준에 비교되었을 때 종양 내의 단백질의 발현 수준이 "상승"되거나 또는 "높다". 특정 실시양태에서, 종양은 RSP02-결합체 또는 항체가 결합하는 RSP02를 발현한다. 특정 실시양태에서, 종양에 상승된 발현 수준의 RSP02가 있거나 또는 종양이 RSP02를 과발현한다. 일부 실시양태에서, 종양에 높은 발현 수준의 RSP02가 있다. 특정 실시양태에서, 종양은 RSP03-결합체 또는 항체가 결합하는 RSP03을 발현한다. 특정 실시양태에서, 종양에 상승된 발현 수준의 RSP03이 있거나 또는 종양이 RSP03을 과발현한다. 일부 실시양태에서, 종양에 높은 발현 수준의 RSP03이 있다. 특정 실시양태에서, 종양은 RSP04-결합체 또는 항체가 결합하는 RSP04를 발현한다. 특정 실시양태에서, 종양에 상승된 발현 수준의 RSP04가 있거나 또는 종양이 RSP04를 과발현한다. 일부 실시양태에서, 종양에 높은 발현 수준의 RSP04가 있다. 일부 실시양태에서, 종양은 정상 조직에서 발현된 RSPO 수준에 비교되었을 때 상승된 수준의 RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04를 발현한다. 일부 실시양태에서, 정상 조직은 종양과 동일한 조직 유형의 조직이다.

[0222] 또한, 본 발명은 치료 유효량의 RSPO-결합체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 성장을 억제하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 종양은 암 줄기 세포를 포함한다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합체의 투여에 의해 종양 내의 암 줄기 세포의 빈도가 감소된다. 본 발명은 종양을 유효량의 RSPO-결합체 (예를 들어, 항-RSPO 항체)와 접촉시키는 것을 포함하는, 종양 내의 암 줄기 세포의 빈도를 감소시키는 방법을 또한 제공한다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 치료 유효량의 RSPO-결합체 (예를 들어, 항-RSPO 항체)를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 내의 암 줄기 세포의 빈도를 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 항체이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 항-RSP01 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP01 항체는 89M5이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP01 항체는 항체 h89M5-H2L2이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 항-RSP02 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP02 항체는 130M23이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP02 항체는 항체 h130M23-H1L2이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP02 항체는 항체 h130M23-H1L6이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 항-RSP03 항체이다.

[0223] 일부 실시양태에서, 종양은 고형 종양이다. 특정 실시양태에서, 종양은 결장직장 종양, 췌장 종양, 폐 종양, 난소 종양, 간 종양, 유방 종양, 신장 종양, 전립선 종양, 위장 종양, 흑색종, 자궁경부 종양, 방광 종양, 교모세포종, 및 두경부 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된 종양이다. 특정 실시양태에서, 종양은 결장직장 종양이다. 특정 실시양태에서, 종양은 난소 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 폐 종양이다. 특정 실시양태에서, 종양은 췌장 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이를 포함하는 결장직장 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이를 포함하지 않는 결장직장 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP01의 발현 수준이 상승된 난소 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP02의 발현 수준이 상승된 췌장 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP02의 발현 수준이 상승된 폐 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP02의 발현 수준이 상승된 흑색종 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP02의 발현 수준이 상승된 유방 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP03의 발현 수준이 상승된 폐 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP03의 발현 수준이 상승된 난소 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP03의 발현 수준이 상승된 유방 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP03의 발현 수준이 상승된 결장 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP04의 발현 수준이 상승된 유방 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP04의 발현 수준이 상승된 폐 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP04의 발현 수준이 상승된 난소 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP01의 발현 수준이 높은 난소 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP02의 발현 수준이 높은 췌장 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP02의 발현 수준이 높은 유방 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP03의 발현 수준이 높은 폐 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP03의 발현 수준이 높은 난소 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP03의 발현 수준이 높은 유방 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP04의 발현 수준이 높은 유방 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP04의 발현 수준이 높은 폐 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 RSP04의 발현 수준이 높은 난소 종양이다.

[0224] 본 발명은 치료 유효량의 RSPO-결합체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 암은 정상 조직에서의 동일한 RSPO 단백질의 발현 수준에 비교되었을 때 상승된 수준의 하나 이상의 RSPO 단백질을 발현하는 세포를 특징으로 한다. 특정 실시양태에서, 암은 RSP01을 과발현하는 세포를 특징으로 한다. 특정 실시양태에서, 암은 RSP02를 과발현하는 세포를 특징으로 한다. 특정 실시

양태에서, 암은 RSP03을 과발현하는 세포를 특징으로 한다. 특정 실시양태에서, 암은 RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 RSPO 단백질을 과발현한다. 특정 실시양태에서, 암은  $\beta$ -카테닌을 발현하는 세포를 특징으로 하고, 이때 RSPO-결합체 (예를 들어, 항체)가 RSPO-유도  $\beta$ -카테닌 신호 전달 및/또는 활성화를 방해한다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP01에 결합하고, 암 성장을 억제하거나 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP02에 결합하고, 암 성장을 억제하거나 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP03에 결합하고, 암 성장을 억제하거나 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP01에 결합하고, RSP01/LGR 상호작용을 방해하며, 암 성장을 억제하거나 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP02에 결합하고, RSP02/LGR 상호작용을 방해하며, 암 성장을 억제하거나 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP03에 결합하고, RSP03/LGR 상호작용을 방해하며, 암 성장을 억제하거나 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP01에 결합하고,  $\beta$ -카테닌 활성화를 억제하며, 암 성장을 억제하거나 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP02에 결합하고,  $\beta$ -카테닌 활성화를 억제하며, 암 성장을 억제하거나 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP03에 결합하고,  $\beta$ -카테닌 활성화를 억제하며, 암 성장을 억제하거나 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP01에 결합하고, 암 내의 암 줄기 세포의 빈도를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP02에 결합하고, 암 내의 암 줄기 세포의 빈도를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP03에 결합하고, 암 내의 암 줄기 세포의 빈도를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 항체이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 항-RSP01 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP01 항체는 항체 89M5이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP01 항체는 항체 h89M5-H2L2이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 항-RSP02 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP02 항체는 항체 130M23이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP02 항체는 항체 h130M23-H1L2이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP02 항체는 항체 h130M23-H1L6이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 항-RSP03 항체이다.

[0225] 본 발명은 치료 유효량의 RSPO-결합체를 대상체 (예를 들어, 치료를 필요로 하는 대상체)에게 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 암성 종양이 있다. 특정 실시양태에서, 대상체에서 종양이 제거되어 있다. 일부 실시양태에서, 암을 치료하는 방법은 치료 유효량의 RSPO-결합체를 대상체에게 투여하는 것을 포함하고, 이때 대상체에 하나 이상의 RSPO 단백질의 발현이 상승된 종양이 있다. 일부 실시양태에서, 대상체에 RSP01의 발현이 상승된 난소 종양이 있고, RSP01-결합체가 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에 RSP01의 발현이 상승된 난소 종양이 있고, 항-RSP01 항체가 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에 RSP01의 발현이 상승된 난소 종양이 있고, 항체 89M5가 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에 RSP01의 발현이 상승된 난소 종양이 있고, 항체 h89M5-H2L2가 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에 RSP02의 발현이 상승된 난소 종양이 있고, RSP02-결합체가 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에 RSP02의 발현이 상승된 난소 종양이 있고, 항-RSP02 항체가 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에 RSP02의 발현이 상승된 난소 종양이 있고, 항체 130M23이 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에 RSP02의 발현이 상승된 난소 종양이 있고, 항체 h130M23-H1L2가 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에 RSP02의 발현이 상승된 난소 종양이 있고, 항체 h130M23-H1L6이 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에 RSP02의 발현이 상승된 결장 종양이 있고, 항체 130M23이 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에 RSP02의 발현이 상승된 결장 종양이 있고, 항체 h130M23-H1L2가 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에 RSP02의 발현이 상승된 결장 종양이 있고, 항체 h130M23-H1L6이 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체에 RSP03의 발현이 상승된 폐 종양이 있고, 항-RSP03 항체가 대상체에게 투여된다.

[0226] 특정 실시양태에서, 암은 결장직장암, 췌장암, 폐암, 난소암, 간암, 유방암, 신장암, 전립선암, 위장암, 흑색종, 자궁경부암, 방광암, 교모세포종, 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택된 암이다. 특정 실시양태에서, 암은 췌장암이다. 특정 실시양태에서, 암은 난소암이다. 특정 실시양태에서, 암은 결장직장암이다. 특정 실시양태에서, 암은 유방암이다. 특정 실시양태에서, 암은 전립선암이다. 특정 실시양태에서, 암은 폐암이다.

[0227] 또한, 본 발명은 대상체에게 치료 유효량의 RSPO-결합체를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양의 종양발생성을 감소시키는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 종양은 암 줄기 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양 내의 암 줄기 세포의 빈도를 감소시키는 것에 의해 종양의 종양발생성이 감소된다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 본원에 기술된 RSP01-결합체, RSP02-결합체, 또는 RSP03-결합체를 사용하는 것을 포함한다.

특정 실시양태에서, RSPO-결합체의 투여에 의해 종양 내의 암 줄기 세포의 빈도가 감소된다.

[0228] 특정 실시양태에서, 이러한 방법은 종양 또는 암에서의 하나 이상의 RSPO 단백질 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양 또는 암에서 RSPO 발현 수준을 측정하는 단계는 RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04의 발현 수준을 측정하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양 또는 암에서의 RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04의 발현 수준이 정상 조직에서의 RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04의 발현 수준에 비교된다. 일부 실시양태에서, 종양 또는 암에서의 RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04의 발현 수준이 정상 조직에서의 RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04의 미리 결정된 발현 수준에 비교된다. 특정 실시양태에서, 이러한 방법은 종양 또는 암에 APC 유전자에서의 불활성화 돌연변이가 있는지를 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 종양 또는 암에  $\beta$ -카테닌 유전자에서의 활성화 돌연변이가 있는지를 결정하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, RSPO 발현 수준을 측정하는 것이 치료 전에 행해진다. 일부 실시양태에서, 정상 조직 내의 동일한 RSPO 단백질의 발현에 비교되었을 때 종양 또는 암에 상승된 수준의 RSPO 발현이 있으면 대상체에게 본원에 기술된 RSPO-결합체 또는 항체가 투여된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 정상 조직 내의 RSP01 발현 수준에 비교되었을 때 종양 또는 암에 상승된 수준의 RSP01 발현이 있으면 대상체에게 RSP01-결합체 (예를 들어, 항-RSP01 항체)가 투여된다. 일부 실시양태에서, 정상 조직 내의 RSP02 발현 수준에 비교되었을 때 종양 또는 암에 상승된 수준의 RSP02 발현이 있으면 대상체에게 RSP02-결합체 (예를 들어, 항-RSP02 항체)가 투여된다. 일부 실시양태에서, 정상 조직 내의 RSP03 발현 수준에 비교되었을 때 종양 또는 암에 상승된 수준의 RSP03 발현이 있으면 대상체에게 RSP03-결합체 (예를 들어, 항-RSP03 항체)가 투여된다. 종양에 1가지를 초과하는 RSPO 단백질의 발현 수준이 상승되어 있으면, 정상 조직에 비교되었을 때 가장 과발현된 RSPO 단백질에 대한 RSPO-결합체 또는 항체가 대상체에게 먼저 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양 또는 암에 APC 유전자에서의 돌연변이가 있으면 본원에 기술된 RSPO-결합체 또는 항체가 대상체에게 투여된다.

[0229] 또한, 본 발명은 정상 조직에서의 동일한 RSPO 단백질의 발현에 비교되었을 때 RSPO 발현 수준이 상승된 종양이 대상체에 있는지를 결정하는 것을 포함하는, RSPO-결합체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 확인하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 종양에 상승된 수준의 RSPO 발현이 있으면, 대상체가 RSPO 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 선택된다. 일부 실시양태에서, 치료를 위해 선택되면, 대상체에게 본원에 기술된 RSPO-결합체 또는 항체가 투여된다. 일부 실시양태에서, 종양에서 1가지를 초과하는 RSPO 단백질의 수준이 상승되어 있으면, 발현 수준이 가장 높은 RSPO 단백질에 결합하는 RSPO-결합체가 대상체에게 투여된다. 특정 실시양태에서, 대상체에서 종양이 제거되어 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 종양에서의 RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04의 발현 수준이 결정되고, 정상 조직에서의 RSP01 수준에 비교되었을 때 종양에 상승된 수준의 RSP01 발현이 있으면, 대상체가 RSP01에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 선택된다. 치료를 위해 선택되면, 대상체에게 본원에 기술된 항-RSP01 항체가 투여된다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 항체 89M5이다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 항체 h89M5-H2L2이다. 특정 실시양태에서, 대상체에서 종양이 제거되어 있다. 일부 실시양태에서, 종양에서의 RSP01, RSP02, RSP03 및/또는 RSP04의 발현 수준이 결정되고, 정상 조직에서의 RSP02 수준에 비교되었을 때 종양에 상승된 수준의 RSP02 발현이 있으면, 대상체가 RSP02에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 선택된다. 치료를 위해 선택되면, 대상체에게 본원에 기술된 항-RSP02 항체가 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-RSP02 항체는 항체 130M23이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP02 항체는 항체 h130M23-H1L2이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP02 항체는 항체 h130M23-H1L6이다. 특정 실시양태에서, 대상체에서 종양이 제거되어 있다.

[0230] 본 발명은 하나 이상의 RSPO 단백질의 발현 수준이 상승된 종양이 대상체에 있는지를 결정하는 것을 포함하고, 이때 종양에 상승된 발현 수준의 하나 이상의 RSPO 단백질이 있으면, 대상체가 발현 수준이 상승된 RSPO 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 선택되는, RSPO-결합체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 선택하는 방법을 제공한다. 본 발명은 하나 이상의 RSPO 단백질의 발현 수준이 높은 종양이 대상체에 있는지를 결정하는 것을 포함하고, 이때 종양에 높은 발현 수준의 하나 이상의 RSPO 단백질이 있으면, 대상체가 발현 수준이 높은 RSPO 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 이용한 치료를 위해 선택되는, RSPO-결합체를 이용한 치료를 위해 인간 대상체를 선택하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, "상승된" 또는 "높은" 발현 수준은 동일한 조직 유형의 정상 조직에서의 동일한 RSPO 단백질의 발현 수준에 비교된 것이다. 일부 실시양태에서, "상승된" 또는 "높은" 발현 수준은 동일한 종양 유형의 다른 종양에서의 동일한 RSPO 단백질의 발현 수준에 비교된 것이다. 일부 실시양태에서, 치료를 위해 선택되면, 대상체에게 본원에 기술된 RSPO-결합체 또는 항체가 투여된다. 특정 실시양태에서, 대상체에서 종양이 제거되어 있다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP01-결합체이다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 항체 89M5이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP01 항체는

항체 h89M5-H2L2이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는 RSPO2-결합제이다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합제는 항체 130M23이다. 일부 실시양태에서, 항-RSPO2 항체는 항체 h130M23-H1L2이다. 일부 실시양태에서, 항-RSPO2 항체는 항체 h130M23-H1L6이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는 RSPO3-결합제이다.

[0231] 본 발명은 (a) 대상체가 RSPO1의 발현 수준이 상승되었거나 높은 암에 걸린 것을 적어도 부분적으로 기초로 하여 치료를 위해 대상체를 선택하는 단계, 및 (b) 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기술된 RSPO1-결합제를 투여하는 단계를 포함하는, 인간 대상체에서 암을 치료하는 방법을 또한 제공한다. 일부 실시양태에서, RSPO1-결합제는 항체 89M5이다. 일부 실시양태에서, RSPO1-결합제는 항체 h89M5-H2L2이다.

[0232] 본 발명은 (a) 대상체가 RSPO2의 발현 수준이 상승되었거나 높은 암에 걸린 것을 적어도 부분적으로 기초로 하여 치료를 위해 대상체를 선택하는 단계, 및 (b) 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기술된 RSPO2-결합제를 투여하는 단계를 포함하는, 인간 대상체에서 암을 치료하는 방법을 또한 제공한다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합제는 항체 130M23이다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합제는 항체 h130M23-H1L2이다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합제는 항체 h130M23-H1L6이다.

[0233] 본 발명은 (a) 대상체가 RSPO3의 발현 수준이 상승되었거나 높은 암에 걸린 것을 적어도 부분적으로 기초로 하여 치료를 위해 대상체를 선택하는 단계, 및 (b) 대상체에게 치료 유효량의 본원에 기술된 RSPO3-결합제를 투여하는 단계를 포함하는, 인간 대상체에서 암을 치료하는 방법을 또한 제공한다.

[0234] 세포, 종양 또는 암에서 RSPO 발현 수준을 측정하는 방법이 당업자에게 공지되어 있다. 이러한 방법에는 핵산 발현에 대한 PCR-기반 검정법,マイ크로어레이 분석 및 뉴클레오티드 서열분석(예를 들어, 넥스트젠(NextGen) 서열분석)이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 기타 방법에는 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석, 단백질 어레이, ELISA, 및 FACS가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0235] 종양 또는 암에 상승된 또는 높은 수준의 RSPO 발현이 있는지 여부를 결정하는 방법은 다양한 샘플을 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 샘플은 종양 또는 암이 있는 대상체로부터 취해진다. 일부 실시양태에서, 샘플은 신선한 종양/암 샘플이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 냉동 종양/암 샘플이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 포르말린-고정, 파라핀-포매 샘플이다. 일부 실시양태에서, 샘플은 세포 용해물로 프로세싱된다. 일부 실시양태에서, 샘플은 DNA 또는 RNA로 프로세싱된다.

[0236] 대상체에서 비정상적인 (예를 들어, 증가된 수준의)  $\beta$ -카테닌 신호전달과 연관된 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 추가로 제공된다. 대상체에서 증가된 수준의 줄기 세포 및/또는 전구 세포를 특징으로 하는 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 추가로 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 치료 방법들은 치료 유효량의 RSPO-결합제, 폴리펩티드, 또는 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는 RSPO1-결합제이다. 일부 실시양태에서, RSPO1-결합제는 항체이다. 일부 실시양태에서, RSPO1-결합제는 항체 89M5이다. 일부 실시양태에서, RSPO1-결합제는 항체 h89M5-H2L2이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는 RSPO2-결합제이다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합제는 항체이다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합제는 항체 130M23이다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합제는 항체 h130M23-H1L2이다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합제는 항체 h130M23-H1L6이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는 RSPO3-결합제이다. 일부 실시양태에서, RSPO3-결합제는 항체이다.

[0237] 본 발명은 세포를 유효량의 RSPO-결합제와 접촉시키는 것을 포함하는, 세포에서  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는 방법을 또한 제공한다. 특정 실시양태에서, 세포는 종양 세포이다. 특정 실시양태에서, 이러한 방법은 세포를 RSPO-결합제와 접촉시키는 단계가 치료 유효량의 RSPO-결합제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 생체내 방법이다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 시험관내 또는 생체외 방법이다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합제는  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제한다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는  $\beta$ -카테닌의 활성화를 억제한다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합제는 RSPO/LGR 상호작용을 방해한다. 특정 실시양태에서, LGR은 LGR4, LGR5, 및/또는 LGR6이다. 특정 실시양태에서, LGR은 LGR4이다. 특정 실시양태에서, LGR은 LGR5이다. 특정 실시양태에서, LGR는 LGR6이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는 RSPO1-결합제이다. 일부 실시양태에서, RSPO1-결합제는 항체이다. 일부 실시양태에서, RSPO1-결합제는 항체 89M5이다. 일부 실시양태에서, RSPO1-결합제는 항체 h89M5-H2L2이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는 RSPO2-결합제이다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합제는 항체이다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합제는 항체 130M23이다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합제는 항체 h130M23-H1L2이다. 일부 실시양태에서, RSPO2-결합제는 항체 h130M23-H1L6이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는 RSPO3-결합제이다. 일부 실시양태에서, RSPO3-결합제는 항체이다.

[0238]

종양 세포가 포함되지만 이에 한정되지 않는 세포의 분화를 유도하기 위한 본원에 기술된 RSPO-결합체, 폴리펩티드 또는 항체의 용도가 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포를 분화하도록 유도하는 방법은 세포를 유효량의 본원에 기술된 RSPO-결합체 (예를 들어, 항-RSPO 항체)와 접촉시키는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 대상체 내의 종양 내의 세포를 분화하도록 유도하는 방법은 치료 유효량의 RSPO-결합체, 폴리펩티드, 또는 항체를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양 세포 상의 분화 마커를 유도하는 방법은 치료 유효량의 RSPO-결합체, 폴리펩티드, 또는 항체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 종양은 고형 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 결장직장 종양, 췌장 종양, 폐 종양, 난소 종양, 간 종양, 유방 종양, 신장 종양, 전립선 종양, 위장 종양, 흑색종, 자궁경부 종양, 방광 종양, 교모세포종, 및 두경부 종양으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 종양은 난소 종양이다. 특정한 다른 실시양태에서, 종양은 결장 종양이다. 일부 실시양태에서, 종양은 폐 종양이다. 특정 실시양태에서, 이러한 방법은 생체내 방법이다. 특정 실시양태에서, 이러한 방법은 시험관내 방법이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP01-결합체이다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 항체이다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 항체 89M5이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP02-결합체이다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 항체이다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 항체 130M23이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP03-결합체이다. 일부 실시양태에서, RSP03-결합체는 항체이다.

[0239]

본 발명은 종양발생성인 세포를 RSPO-결합체와 접촉시키는 것을 포함하는, 종양발생성인 세포를 비-종양발생성인 세포로 분화시키는 방법을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 RSPO-결합체를 종양발생성인 세포를 포함하는 종양이 있거나 또는 이같은 종양이 제거된 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 종양발생성인 세포는 난소 종양 세포이다. 특정 실시양태에서, 종양발생성인 세포는 결장 종양 세포이다. 일부 실시양태에서, 종양발생성인 세포는 폐 종양 세포이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP01-결합체이다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 항체이다. 일부 실시양태에서, RSP01-결합체는 항체 89M5이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP02-결합체이다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 항체이다. 일부 실시양태에서, RSP02-결합체는 항체 130M23이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 RSP03-결합체이다. 일부 실시양태에서, RSP03-결합체는 항체이다.

[0240]

특정 실시양태에서, 본원에 기술된 RSPO-결합체로 치료되는 질환은 암이 아니다. 예를 들어, 질환은 대사 장애 예컨대 비만 또는 당뇨병 (예를 들어, 제II형 당뇨병)일 수 있다 (문헌 [Jin T., 2008, Diabetologia, 51:1771-80]). 별법적으로, 질환은 골 장애 예컨대 골다공증, 골관절염 또는 류마티스성 관절염일 수 있다 (문헌 [Corr M., 2008, Nat. Clin. Pract. Rheumatol., 4:550-6]; [Day et al., 2008, Bone Joint Surg. Am., 90 Suppl 1:19-24]). 질환은 또한 신장 장애, 예컨대 다낭성 신장 질환일 수 있다 (문헌 [Harris et al., 2009, Ann. Rev. Med., 60:321-337]; [Schmidt-Ott et al., 2008, Kidney Int., 74:1004-8]; [Benzing et al., 2007, J. Am. Soc. Nephrol., 18:1389-98]). 별법적으로, 항반 변성 및 가족성 삼출 유리체망막병증이 포함되지만 이에 한정되지 않는 눈 장애가 치료될 수 있다 (문헌 [Lad et al., 2009, Stem Cells Dev., 18:7-16]). 심근경색, 죽상경화증 및 판막 장애가 포함되는 심혈관 장애가 또한 치료될 수 있다 (문헌 [Al-Aly Z., 2008, Transl. Res., 151:233-9]; [Kobayashi et al., 2009, Nat. Cell Biol., 11:46-55]; [van Gijn et al., 2002, Cardiovasc. Res., 55:16-24]; [Christman et al., 2008, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 294:H2864-70]). 일부 실시양태에서, 질환은 폐 장애 예컨대 특발성 폐 동맥 고혈압 또는 폐 섬유증이다 (문헌 [Laumanns et al., 2008, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 2009, 40:683-691]; [Koenigshoff et al., 2008, PLoS ONE, 3:e2142]). 일부 실시양태에서, RSPO-결합체로 치료되는 질환은 간 질환, 예컨대 간경변 또는 간 섬유증이다 (문헌 [Cheng et al., 2008, Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 294:G39-49]).

[0241]

본 발명은 본원에 기술된 RSPO-결합체를 포함하는 제약 조성물을 추가로 제공한다. 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 제약상 허용되는 비히클을 추가로 포함한다. 이러한 제약 조성물은 종양 성장을 억제하는 것 및 대상체 (예를 들어, 인간 환자)에서 암을 치료하는 것에서 이의 용도가 발견된다.

[0242]

특정 실시양태에서, 정제된 본 발명의 항체 또는 작용체를 제약상 허용되는 비히클 (예를 들어, 담체 또는 부형체)과 조합함으로써 보관 및 사용을 위해 제형이 제조된다. 적절한 제약상 허용되는 비히클에는 비-독성 완충제 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기 산; 염 예컨대 염화나트륨; 아스코르브산 및 메티오닌이 포함되는 항산화제; 방부제 예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 헥사메토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 폐놀, 부틸 또는 벤질 알콜, 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 래소르시놀, 시클로헥사놀, 3-펜타놀; 및 m-크레졸; 저분자량 폴리펩티드 (예를 들어, 약 10개 미만의 아미노산 잔기); 단백질 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리

돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 탄수화물 예컨대 단당류, 이당류, 글루코스, 만노스, 또는 텍스트린; 칼레이팅제 예컨대 EDTA; 당 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 카운터 이온 예컨대 나트륨; 금속 착물 예컨대 Zn-단백질 착물; 및 비-이온성 계면활성제 예컨대 트윈(TWEEN) 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. (문현 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, 2005, University of the Sciences in Philadelphia, PA]).

[0243] 본 발명의 제약 조성물은 국소 또는 전신 치료를 위한 수많은 방식으로 투여될 수 있다. 투여는 표피 또는 경피 패치, 연고, 로션, 크림, 젤, 점적물, 좌약, 스프레이, 액체 및 분말에 의한 국부 투여; 분말 또는 에어로졸의 흡입 또는 통기 (분무기에 의한 것 포함)에 의한 폐 투여, 기관내 투여, 비내 투여; 경구 투여; 또는 정맥내, 동맥내, 종양내, 피하, 복막내, 근육내 (예를 들어, 주사 또는 주입), 또는 두개내 (예를 들어, 수막강내 또는 뇌실내)가 포함되는 비경구 투여일 수 있다.

[0244] 치료 제형은 단위 투여 형태일 수 있다. 이같은 제형에는 정제, 알약, 캡슐, 분말, 과립, 물 또는 비-수성 매질 내의 용액 또는 혼탁액, 또는 좌약이 포함된다. 정제와 같은 고체 조성물에서, 주요 활성 성분이 제약 담체와 혼합된다. 통상적인 정제제조용 성분에는 옥수수 전분, 락토스, 수크로스, 소르비톨, 탈크, 스테아르산, 스테아르산마그네슘, 인산이칼슘 또는 겹, 및 희석제 (예를 들어, 물)가 포함된다. 이들은 본 발명의 화합물 또는 이의 제약상 허용되는 비-독성 염의 균질한 혼합물을 함유하는 고형 예비제형 조성물을 형성하는데 사용될 수 있다. 그 후, 고체 예비제형 조성물을 상기 기술된 유형의 단위 투여 형태로 세분한다. 장기 작용의 장점을 주는 투여 형태를 제공하기 위해 제형 또는 조성물의 정제, 알약 등이 코팅되거나 또는 다른 방식으로 조제될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 알약이 외부 성분으로 덮인 내부 조성물을 포함할 수 있다. 또한, 붕해를 저지하는 작용을 하고, 내부 성분이 손상되지 않고 위를 통과하도록 하거나 이의 방출이 지연되도록 하는 장용성 층에 의해 2개의 성분이 분리될 수 있다. 다양한 물질들이 이같은 장용성 층 또는 코팅물에 사용될 수 있고, 이같은 물질에는 다수의 중합체성 산 및 중합체성 산과 엘락, 세틸 알콜 및 셀룰로스 아세테이트와 같은 물질의 혼합물이 포함된다.

[0245] 본원에 기술된 RSPO-결합제 또는 항체는 마이크로캡슐 내에 포함될 수도 있다. 문현 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, 2005, University of the Sciences in Philadelphia, PA]에 기술된 바와 같이, 이같은 마이크로캡슐은, 예를 들어, 코아세르베이션(coacervation) 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 (예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐), 콜로이드성 약물 전달 시스템 내에 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀션, 나노입자 및 나노캡슐), 또는 마크로에멀션 내에 제조된다.

[0246] 특정 실시양태에서, 제약 제형에는 리포솜과 복합체를 형성한 본 발명의 RSPO-결합제 (예를 들어, 항체)가 포함된다. 리포솜을 생산하는 방법이 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물로 역상 증발에 의해 일부 리포솜이 생성될 수 있다. 원하는 적정의 리포솜이 산출되도록 리포솜을 규정된 세공 크기의 필터를 통해 압출할 수 있다.

[0247] 특정 실시양태에서, 서방성 제제가 생산될 수 있다. 서방성 제제의 적절한 예로는 RSPO-결합제 (예를 들어, 항체)를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되고, 이때 매트릭스는 성형품 (예를 들어, 필름 또는 마이크로캡슐)의 형태이다. 서방성 매트릭스의 예로는 폴리에스테르, 히드로겔 예컨대 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐 알콜), 폴리락티드, L-글루탐산과 7 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체 예컨대 루프론 디포(LUPRON DEPOT)<sup>TM</sup> (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사용 마이크로스피어), 수크로스 아세테이트 이소부티레이트, 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산이 포함된다.

[0248] 특정 실시양태에서, RSPO-결합제 (예를 들어, 항체)를 투여하는 것에 더하여, 하나 이상의 추가적인 치료제를 투여하는 것을 방법 또는 치료가 추가로 포함한다. 추가적인 치료제는 RSPO-결합제를 투여하기 전에, 이의 투여와 동시에, 및/또는 이의 투여 후에 투여될 수 있다. RSPO-결합제 및 추가적인 치료제(들)을 포함하는 제약 조성물이 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 추가적인 치료제는 1개, 2개, 3개 또는 이를 초과하는 개수의 추가적인 치료제를 포함한다.

[0249] 2가지 이상의 치료제로의 조합 요법은, 필요하지는 않지만, 상이한 작용 메커니즘에 의해 작동하는 작용제들을 종종 사용한다. 작용 메커니즘이 상이한 작용제들을 사용하는 조합 요법은 부가적 또는 상승작용성 효과를 초래할 수 있다. 조합 요법은 단독요법에서 사용되는 것보다 더 낮은 용량의 각각의 작용제를 허용할 수 있고,

이에 의해 독성 부작용을 감소시키고/시키거나 작용제(들)의 치료 지수를 증가시킨다. 조합 요법은 저항성 암 세포가 발달될 가능성을 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 조합 요법은 비-종양발생성인 세포에 영향을 미치는 (예를 들어, 이를 억제하거나 사망시키는) 치료제 및 종양발생성인 CSC에 영향을 미치는 (예를 들어, 이를 억제하거나 사망시키는) 치료제를 포함한다.

[0250] 일부 실시양태에서, RSPO-결합제 및 하나 이상의 추가적인 치료제의 조합물은 부가적 또는 상승작용성 효과를 초래한다. 일부 실시양태에서, 조합 요법은 RSPO-결합제의 치료 지수의 증가를 초래한다. 일부 실시양태에서, 조합 요법은 추가적인 작용제(들)의 치료 지수의 증가를 초래한다. 일부 실시양태에서, 조합 요법은 RSPO-결합제의 독성 및/또는 부작용의 감소를 초래한다. 일부 실시양태에서, 조합 요법은 추가적인 작용제(들)의 독성 및/또는 부작용의 감소를 초래한다.

[0251] 유용한 치료제 클래스에는, 예를 들어, 항튜불린 작용제, 오리스타틴, DNA 마이너 그루브(minor groove) 결합제, DNA 복제 억제제, 알킬화제 (예를 들어, 백금 착물 예컨대 시스플라틴, 단핵(백금), 이핵(백금) 및 삼핵 백금 착물 및 카르보플라틴), 안트라사이클린, 항생제, 항염산제, 항대사물질, 화학요법 감작제, 듀오카르마이신, 에토포시드, 플루오르화 피리미딘, 이온운반체, 렉시트롭신, 니트로소우레아, 플라티놀, 퓨린 항대사물질, 퓨로마이신, 방사선 감작제, 스테로이드, 탁산, 토포이소머라제(topoisomerase) 억제제, 빙카 알칼로이드 등이 포함된다. 특정 실시양태에서, 제2 치료제는 알킬화제, 항대사물질, 항유사분열제, 토포이소머라제 억제제 또는 혈관신생 억제제이다. 일부 실시양태에서, 제2 치료제는 백금 착물 예컨대 카르보플라틴 또는 시스플라틴이다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 탁산과 조합된 백금 착물이다.

[0252] RSPO-결합제와 조합되어 투여될 수 있는 치료제에는 화학요법제가 포함된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 방법 또는 치료는 본 발명의 RSPO1-결합제 또는 항체를 화학요법제 또는 여러 상이한 화학요법제들의 카테일과 조합하여 투여하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 방법 또는 치료는 본 발명의 RSPO2-결합제 또는 항체를 화학요법제 또는 여러 상이한 화학요법제들의 카테일과 조합하여 투여하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 방법 또는 치료는 본 발명의 RSPO3-결합제 또는 항체를 화학요법제 또는 여러 상이한 화학요법제들의 카테일과 조합하여 투여하는 것을 수반한다. RSPO-결합제 (예를 들어, 항체)를 이용한 치료는 화학요법의 투여 전에, 이와 동시에, 또는 이에 이어서 일어날 수 있다. 조합 투여에는 단일 제약 제형으로 또는 별도의 제형들을 사용하여 공동으로 투여하는 것, 또는 임의의 순서로, 그러나 일반적으로는 모든 활성 작용제들이 이들의 생물학적 활성을 동시에 발휘할 수 있도록 하는 기간 이내에 연속적으로 투여하는 것이 포함될 수 있다. 이같은 화학요법제들의 제조 및 투여 스케줄은 제조사의 설명서에 따라 또는 당업자에 의해 경험적으로 결정되는 바와 같이 사용될 수 있다. 이같은 화학요법의 제조 및 투여 스케줄은 문헌 [Chemotherapy Source Book, 4th Edition, 2008, M. C. Perry, Editor, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA]에 또한 기술되어 있다.

[0253] 본 발명에서 유용한 화학요법제에는 하기의 것들이 포함되지만 이에 한정되지는 않는다: 알킬화제 예컨대 티오텐파 및 시클로포스파미드 (시톡산(CYTOXAN)); 알킬 술포네이트 예컨대 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민 (알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오프스포르아미드 및 트리메틸올로멜라민이 포함됨); 질소머스터드 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스터드; 니트로소우레아 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제 예컨대 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오토라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캐티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 테토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 폐플로마이신, 포트파로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물질 예컨대 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프데로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자유리딘, 카르모푸르, 사이토신 아라비노시드, 디데옥시유리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스유리딘, 5-FU; 안드로겐 예컨대 칼루스테론, 드로모스탈론, 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-아드레날 예컨대 아미노글루테티미드, 미토坦, 트릴로스탄; 엽산 보충제 예컨대 폴린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데모콜신; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메

트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK.; 라족산; 시조푸란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2'''-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 (Ara-C); 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)) 및 도세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)); 클로람부실; 쟈시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토퓨린; 백금 유사체 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; CPT11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플로오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노산; 에스페라미신; 카페시타빈 (젤로다(XELODA)); 및 상기의 것들 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체. 화학요법제에는 종양에 대한 호르몬 작용을 조절 또는 억제하는 작용을 하는 항호르몬제, 예컨대 타목시펜, 랄록시펜, 아로마타제(aromatase) 억제 4(5)-이미다졸, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 토레미펜 (파레스톤(FARESTON))이 예를 들어 포함되는 항-에스트로겐제; 및 항안드로겐제 예컨대 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 및 상기의 것들 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 또한 포함된다. 특정 실시양태에서, 추가적인 치료제는 시스플라틴이다. 특정 실시양태에서, 추가적인 치료제는 카르보플라틴이다. 특정 실시양태에서, 추가적인 치료제는 파클리탁셀 (탁솔)이다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP01 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2를 시스플라틴과 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP02 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6을 시스플라틴과 조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0254]

특정 실시양태에서, 화학요법제는 토포이소머라제 억제제이다. 토포이소머라제 억제제는 토포이소머라제 효소 (예를 들어, 토포이소머라제 I 또는 II)의 작용을 방해하는 화학요법제이다. 토포이소머라제 억제제에는 독소루비신 HCl, 다우노루비신 시트레이트, 미톡산트론 HCl, 악티노마이신 D, 에토포시드, 토포테칸 HCl, 테니포시드 (VM-26), 및 이리노테칸, 뿐만 아니라 이들 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 이리노테칸이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 방법은 RSP01-결합제를 토포이소머라제 억제제와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP01 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2를 이리노테칸과 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 RSP02-결합제를 토포이소머라제 억제제와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP02 항체 130M23 또는 h130M23-H1L2를 이리노테칸과 조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0255]

특정 실시양태에서, 화학요법제는 항대사물질이다. 항대사물질은 정상적인 생화학적 반응에 필요한 대사물질과 유사하지만 세포의 하나 이상의 정상적인 기능, 예컨대 세포 분열을 방해하기에 충분한 구조를 지니는 화학물질이다. 항대사물질에는 쟈시타빈, 플루오로우라실, 카페시타빈, 메토트렉세이트 소듐, 랄리트렉세드, 페레트렉세드, 테가푸르, 사이토신 아라비노시드, 티오구아닌, 5-아자사이티딘, 6-메르캅토퓨린, 아자티오프린, 6-티오구아닌, 펜토스타틴, 플루다라빈 포스페이트, 및 클라드리빈, 뿐만 아니라 이들 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 추가적인 치료제는 쟈시타빈이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 방법은 RSP01-결합제를 항대사물질과 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP01 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2를 쟈시타빈과 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 RSP02-결합제를 항대사물질과 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP02 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6를 쟈시타빈과 조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0256]

특정 실시양태에서, 화학요법제는 튜불린에 결합하는 작용제가 포함되지만 이에 한정되지 않는 항유사분열제이다. 일부 실시양태에서, 이러한 작용제는 탁산이다. 특정 실시양태에서, 이러한 작용제는 파클리탁셀 또는 도세탁셀, 또는 파클리탁셀 또는 도세탁셀의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체이다. 특정 실시양태에서, 이러한 작용제는 파클리탁셀 (탁솔), 도세탁셀 (탁소테레), 알부민-결합 파클리탁셀 (아브락산(ABRAXANE)), DHA-파클리탁셀, 또는 PG-파클리탁셀이다. 특정한 별법적인 실시양태에서, 항유사분열제는 빈카 알칼로이드, 예컨대 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈, 또는 빈데신, 또는 이의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항유사분열제는 키네신 Eg5의 억제제 또는 오로라(Aurora) A 또는 Plk1와 같은 유사분열 키나제(kinase)의 억제제이다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합제와 조합하여 투여되는 화학요법제가 항유사분열제인 경우, 치료되는 암 또는 종양은 유방암 또는 유방 종양이다.

[0257]

일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 소형 분자와 같은 작용제를 포함한다. 예를 들어, 치료는 본 발명의 RSPO-결합제 (예를 들어 항체)와 EGFR, ErbB2, HER2, 및/또는 VEGF를 포함하지만 이에 한정되지 않는 추가적인 종양-연관 항원에 대한 억제제로서 작용하는 소형 분자의 조합 투여를 수반할 수 있다. 특정 실시양태에서, 추

가적인 치료제는 암 줄기 세포 경로를 억제하는 소형 분자이다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 노치(Notch) 경로의 억제제이다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 Wnt 경로의 억제제이다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 BMP 경로의 억제제이다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는 분자이다.

[0258]

일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 생물학적 분자, 예컨대 항체를 포함한다. 예를 들어, 치료는 본 발명의 RSPO-결합제(예를 들어 항체)와 EGFR, ErbB2, HER2, 및/또는 VEGF에 결합하는 항체가 포함되지만 이에 한정되지 않는, 추가적인 종양-연관 항원에 결합하는 다른 항체의 조합 투여를 수반할 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 제2 항-RSPO 항체이다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 항-RSP01 항체와 조합되어 사용되는 항-RSP02 항체, 항-RSP03 항체, 및/또는 항-RSP04 항체이다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 항-RSP02 항체와 조합되어 사용되는 항-RSP01 항체, 항-RSP03 항체, 및/또는 항-RSP04 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-RSP01 항체가 항-RSP02 항체와 조합되어 사용된다. 특정 실시양태에서, 추가적인 치료제는 항-암 줄기 세포 마커에 대해 특이적인 항체이다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 노치 경로의 성분에 결합하는 항체이다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 Wnt 경로의 성분에 결합하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 추가적인 치료제는 암 줄기 세포 경로를 억제하는 항체이다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 노치 경로의 억제제이다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 Wnt 경로의 억제제이다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는 BMP 경로의 억제제이다. 일부 실시양태에서, 추가적인 치료제는  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하는 항체이다. 특정 실시양태에서, 추가적인 치료제는 혈관신생 억제제(예를 들어, 항-VEGF 또는 VEGF 수용체 항체)인 항체이다. 특정 실시양태에서, 추가적인 치료제는 베바시주맙(bevacizumab)(아바스틴(AVASTIN), 트라스투주맙(trastuzumab)(허셉틴(HERCEPTIN)), 파니투무맙(panitumumab)(벡티비克斯(VECTIBIX)), 또는 세툭시맙(cetuximab)(에르비툭스(ERBITUX))이다.

[0259]

일부 실시양태에서, 본원에 기술된 방법은 치료 유효량의 RSPO-결합제를 Wnt 경로 억제제와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, Wnt 경로 억제제는 프리즐드(FZD) 단백질 결합제인 "FZD-결합제"이다. FZD-결합제의 비제한적인 예를 본원에 전문이 참고로 포함된 미국 특허 번호 7,982,013에서 확인할 수 있다. FZD-결합제에는 항-FZD 항체가 포함될 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 방법은 RSPO-결합제를 항-FZD 항체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 RSPO-결합제를 항-FZD 항체 18R5와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, Wnt 경로 억제제는 Wnt 단백질 결합제인 "Wnt-결합제"이다. Wnt-결합제의 비제한적인 예를 본원에 전문이 참고로 포함된 미국 특허 번호 7,723,477 및 7,947,277; 및 국제 공개 WO 2011/088127 및 WO 2011/088123에서 확인할 수 있다. Wnt-결합제에는 항-Wnt 항체 및 FZD-Fc 가용성 수용체가 포함될 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 방법은 RSPO-결합제를 FZD-Fc 가용성 수용체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 RSPO-결합제를 FZD8-Fc 가용성 수용체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 RSP01-결합제를 항-FZD 항체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP01 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2를 항-FZD 항체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP01 항체 89M5 또는 h89M5H2L2를 항-FZD 항체 18R5와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP01 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2를 FZD-Fc 가용성 수용체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP01 항체 89M5 또는 h89M5-H2L2를 FZD8-Fc 가용성 수용체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 RSP02-결합제를 항-FZD 항체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP02 항체 130M23 또는 h130M23-H1L2를 항-FZD 항체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP02 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6을 항-FZD 항체 18R5와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP02 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6을 FZD-Fc 가용성 수용체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP02 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6을 FZD8-Fc 가용성 수용체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0260]

일부 실시양태에서, 본원에 기술된 방법은 치료 유효량의 RSPO-결합제를 1가지를 초과하는 추가적인 치료제와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 방법은 RSPO-결합제를 화학요법제 및 Wnt 경로 억제제와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 RSP02-결합제를 화학요법제 및 Wnt 경로 억제제와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 RSP02-결합제를 화학요법제 및 항-FZD 항체 18R5와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 RSP02-결합제를 화학요법제 및 FZD8-Fc 가용성 수용체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 RSP02-결합제를 켐시타빈 및 Wnt 경로 억제제와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP02 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6을 켐시타빈 및 항-FZD 항체 18R5와 조합하여 투여하는 것을 포함한

다. 일부 실시양태에서, 방법은 항-RSP02 항체 130M23, h130M23-H1L2, 또는 h130M23-H1L6을 젬시타빈 및 FZD8-Fc 가용성 수용체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다.

[0261] 추가로, 본원에 기술된 RSPO-결합제를 이용한 치료는 다른 생물학적 분자, 예컨대 하나 이상의 사이토카인 (예를 들어, 림포카인, 인터류킨, 종양 괴사 인자 및/또는 성장 인자)와의 조합 치료를 포함할 수 있거나, 또는 종양, 암 세포의 수술적 제거 또는 치료 중인 의사가 필요한 것으로 간주하는 임의의 기타 요법이 이에 동반될 수 있다.

[0262] 특정 실시양태에서, 치료는 본 발명의 RSPO-결합제 (예를 들어 항체)를 방사선 요법과 조합하여 투여하는 것을 수반한다. RSPO-결합제를 이용한 치료는 방사선 요법의 투여 전에, 이와 동시에, 또는 이에 이어서 일어날 수 있다. 이같은 방사선 요법에 대한 투여 일정은 숙련된 의사에 의해 결정될 수 있다.

[0263] 조합 투여에는 단일 제약 제형으로 또는 별도의 제형들을 사용하여 공동으로 투여하는 것, 또는 임의의 순서로, 그러나 일반적으로는 모든 활성 작용제들이 이들의 생물학적 활성을 동시에 발휘할 수 있도록 하는 기간 이내에 연속적으로 투여하는 것이 포함될 수 있다.

[0264] RSPO-결합제와 하나 이상의 추가적인 치료제의 조합이 임의의 순서로 또는 동시에 투여될 수 있는 것으로 이해될 것이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는 이전에 제2 치료제로의 치료를 받은 환자에게 투여될 것이다. 특정한 다른 실시양태에서, RSPO-결합제 및 제2 치료제는 실질적으로 동시에 또는 동반적으로 투여될 것이다. 예를 들어, 제2 치료제로의 치료 과정 (예를 들어, 화학요법)이 진행 중인 동안에 대상체에게 RSPO-결합제 (예를 들어, 항체)가 제공될 수 있다. 특정 실시양태에서, RSPO-결합제는 제2 치료제로의 치료로부터 1년 이내에 투여될 것이다. 특정한 별법적인 실시양태에서, RSPO-결합제는 제2 치료제로의 임의의 치료로부터 10개월, 8개월, 6개월, 4개월 또는 2개월 이내에 투여될 것이다. 특정한 다른 실시양태에서, RSPO-결합제는 제2 치료제로의 임의의 치료로부터 4주, 3주, 2주, 또는 1주 이내에 투여될 것이다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합제는 제2 치료제로의 임의의 치료로부터 5일, 4일, 3일, 2일, 또는 1일 이내에 투여될 것이다. 2가지 (또는 이를 초과하는 가짓수)의 작용제 또는 치료가 약 수시간 또는 수분 이내에 (즉, 실질적으로 동시에) 대상체에게 투여될 수 있다는 것이 추가로 이해될 것이다.

[0265] 질환 치료를 위해, 본 발명의 RSPO-결합제 (예를 들어, 항체)의 적합한 투여량은 치료될 질환의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 질환의 반응성, RSPO-결합제 또는 항체가 치료 목적을 위해 투여되는지 또는 예방 목적을 위해 투여되는지 여부, 사전 요법, 환자의 임상 병력 등에 좌우되고, 모두 치료 중인 의사의 판단에 따른다. RSPO-결합제 또는 항체는 한번에 또는 수일에서 수개월까지 지속되는 일련의 치료에 걸쳐, 또는 치유가 이루어지거나 또는 질환 상태의 축소 (예를 들어, 종양 크기의 감소)가 달성될 때까지 투여될 수 있다. 최적의 투여 일정은 환자 신체 내에서의 약물 축적의 측정으로부터 계산될 수 있고, 개별적인 항체 또는 작용제의 상대적인 효능에 따라 변할 것이다. 투여 중인 의사는 최적의 투여량, 투여 방법, 및 반복율을 쉽게 결정할 수 있다. 특정 실시양태에서, 투여량은 0.01 µg 내지 100 mg/체중 1 kg, 0.1 µg 내지 100 mg/체중 1 kg, 1 µg 내지 100 mg/체중 1 kg, 1 mg 내지 100 mg/체중 1 kg, 1 mg 내지 80 mg/체중 1 kg, 10 mg 내지 100 mg/체중 1 kg, 10 mg 내지 75 mg/체중 1 kg, 또는 10 mg 내지 50 mg/체중 1 kg이다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 기타 RSPO-결합제의 투여량은 약 0.1 mg 내지 약 20 mg/체중 1 kg이다. 특정 실시양태에서, 투여량은 매일, 매주, 매달, 또는 매년 1회 이상 제공될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 기타 RSPO-결합제는 1주마다 1번, 2주마다 1번 또는 3주마다 1번 제공된다.

[0266] 일부 실시양태에서, RSPO-결합제 (예를 들어, 항체)는 초기의 더 높은 "로딩/loading)" 용량에 이어지는 1회 이상의 더 낮은 용량으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여 빈도 또한 변할 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여 체계는 초기 용량에 이어서 추가적인 용량 (또는 "유지" 용량)을 1주일에 1회, 2주마다 1회, 3주마다 1회 또는 매달 1회 투여하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 투여 체계는 초기 로딩 용량에 이어서 예를 들어 초기 용량의 1/2인 주간 유지 용량을 투여하는 것을 포함할 수 있다. 또는 투여 체계는 초기 로딩 용량에 이어서 예를 들어 초기 용량의 1/2인 유지 용량을 격주로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 또는 투여 체계는 3주 동안의 3회의 초기 용량에 이어서 예를 들어 동일한 양인 유지 용량을 격주로 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[0267] 당업자에게 공지된 바와 같이, 임의의 치료제의 투여는 부작용 및/또는 독성에 이를 수 있다. 일부 경우, 이러한 부작용 및/또는 독성은 특정 작용제를 치료적 유효 용량으로 투여하지 못하도록 중증일 수 있다. 일부 경우, 약물 요법이 중단되어야 하고, 다른 작용제가 시도될 수 있다. 그러나, 동일한 치료 클래스의 다수의 작용제들은 종종 유사한 부작용 및/또는 독성을 나타내고, 이는 환자가 요법을 중단해야 하거나 또는 가능한 경우

에는 치료제와 연관된 불쾌한 부작용을 앓는다는 것을 의미한다.

[0268] 따라서, 본 발명은 RSPO-결합체, 화학요법제 등의 투여와 연관된 부작용 및/또는 독성을 감소시킬 수 있는, 하나 이상의 작용제를 투여하기 위한 간헐적 투여 전략을 사용하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 인간 대상체에서 암을 치료하는 방법이 대상체에게 치료적 유효 용량의 RSPO-결합체를 치료적 유효 용량의 화학요법제와 조합하여 투여하는 것을 포함하고, 이때 작용제 중 하나 또는 양쪽 모두가 간헐적 투여 전략에 따라 투여된다. 일부 실시양태에서, 간헐적 투여 전략은 초기 용량의 RSPO-결합체를 대상체에게 투여하는 것 및 약 2주마다 1번 후속 용량의 RSPO-결합체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 간헐적 투여 전략은 초기 용량의 RSPO-결합체를 대상체에게 투여하는 것 및 약 3주마다 1번 후속 용량의 RSPO-결합체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 간헐적 투여 전략은 초기 용량의 RSPO-결합체를 대상체에게 투여하는 것 및 약 4주마다 1번 후속 용량의 RSPO-결합체를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, RSPO-결합체는 간헐적 투여 전략을 사용하여 투여되고, 화학요법제는 매주 투여된다.

#### V. RSPO-결합체를 포함하는 키트

[0269] 본 발명은 본원에 기술된 RSPO-결합체 (예를 들어, 항체)를 포함하고 본원에 기술된 방법을 수행하는데 사용될 수 있는 키트를 제공한다. 특정 실시양태에서, 키트는 하나 이상의 용기 내에 하나 이상의 인간 RSPO 단백질에 대한 하나 이상의 정제된 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트는 모든 대조군, 검정법을 수행하기 위한 지침, 및 분석 및 결과 제시를 위한 임의의 필요한 소프트웨어를 포함하여, 검출 검정법을 수행하는데 필요하고 /하거나 충분한 모든 성분을 함유한다. 당업자는 개시된 본 발명의 RSPO-결합체가 업계에 주지된 확립된 키트 포맷 중 하나 내로 쉽게 혼입될 수 있다는 것을 쉽게 인식할 것이다.

[0270] RSPO-결합체 (예를 들어, 항-RSPO 항체), 뿐만 아니라 하나 이상의 추가적인 치료제를 포함하는 키트가 추가로 제공된다. 특정 실시양태에서, 제2 치료제 (또는 그 이상의 치료제)는 화학요법제이다. 특정 실시양태에서, 제2 치료제 (또는 그 이상의 치료제)는 Wnt 경로 억제제이다. 특정 실시양태에서, 제2 치료제 (또는 그 이상의 치료제)는 혈관신생 억제제이다.

[0271] 본 개시내용의 특정 항체의 제조 및 본 개시내용의 항체를 사용하는 방법을 상세하게 기술하는 하기의 비제한적인 실시예를 참조로 본 개시내용의 실시양태들이 추가로 규정될 수 있다. 본 개시내용의 범주를 벗어나지 않으면서 물질 및 방법 양쪽 모두에 대한 다수의 변형이 실행될 수 있다는 것이 당업자에게 명백할 것이다.

#### 실시예

##### 실시예 1

###### 인간 종양에서의 RSPO 및 LGR의 발현

[0272] 다수의 인간 환자의 정상 조직, 양성 종양 및 악성 종양 샘플로부터의 mRNA를 마이크로어레이 분석 (진로직 바이오익스프레스 데이터스위트(Genelogic BioExpress Datasuite))으로 분석하였다. 이러한 데이터는 신장, 자궁 내막 및 난소가 포함되는 여러 종양 유형에서 정상 조직에 비해 악성 조직에서의 RSPO1의 상승된 발현 수준을 나타냈다. 난소암에서 RSPO1이 빈번하게 과발현되는 것이 주목되었다 (도 1a). 또한, 이러한 데이터는 난소, 췌장 및 폐가 포함되는 여러 종양 유형에서 정상 조직에 비해 악성 조직에서의 RSPO3의 상승된 발현 수준을 시사하였다 (도 1c). 또한, LGR5 및 LGR6이 정상 조직에 비해 악성 유방 종양, 결장 종양, 폐 종양, 및 난소 종양에서 과발현된 한편, LGR4는 폐 종양에서 과발현되었음이 발견되었다. LGR5 및 LGR6 과발현은 기타 유방 종양 아유형에 비해 삼중 음성 (ER<sup>neg</sup> PR<sup>neg</sup> HER2<sup>neg</sup>) 유방 종양에 제한되는 것으로 보였다.

[0273] [0274] 뮤린 이종이식편에서 성장된 일련의 인간 종양으로부터 RNA를 단리하였다. 표지된 cRNA의 생성을 위한 확립된 아피메트릭스(Affymetrix) 프로토콜을 사용하여 RNA 샘플을 제조하고 프로세싱하였다. 프로세싱된 RNA를 제조사의 기술 설명서에 개요된 바와 같이 아피메트릭스 HG-U133 플러스 2.0 마이크로어레이 (아피메트릭스, 캘리포니아 산타클라라)에 혼성화시켰다. 혼성화 후, 마이크로어레이를 세정하고, 스캐닝하고, 분석하였다. GCRMA 알고리즘 (바이오컨덕터(Bioconductor), www.bioconductor.org)를 사용하여, 스캐닝된 어레이 배경 조절 및 신호 강도 표준화를 수행하였다.

[0275] 특정 인간 RSPO 및 인간 LGR를 평가하였다 - RSPO1 (241450\_at), RSPO2 (1554012\_at), RSPO3 (228186\_s\_at), RSPO4 (237423\_at), LGR4 (218326\_s\_at), LGR5 (210393\_at) 및 LGR6 (227819\_at). 마이크로어레이 분석은 LGR4 및 LGR6은 거의 모든 종양에서 광범위하게 발현되는 한편, 다수의 종양이 특정 RSPO 패밀리 구성원 및 LGR5만 크게 과발현하는 것으로 발견되었음을 나타냈지만 (표 2), 이러한 발현 수준은 정상 조직에서의 발현 수

준에 비교되지 않았다. 일반적으로, 단일한 RSPO 패밀리 구성원만 소정의 종양에서 고도로 발현되고, 이는 이러한 RSPO 패밀리 내에 기능적인 과잉성이 있을 수 있음을 시사한다.

표 2

종양	RSPO1	RSPO2	RSPO3	RSPO4	LGR4	LGR5	LGR6
<b>유방 종양</b>							
B34	4.79	4.93	303.31	4.41			
B39	20.59	588.88	22.60	4.40			
B60	4.60	4.92	10.89	64.79			
B02	4.60	4.92	692.34	4.41	2678.95	4.28	50.88
B03	5.56	4.89	1870.42	4.41	686.47	30.78	73.49
B06	4.60	4.91	4.51	120.72	274.54	4.26	20.77
B59	4.60	4.91	4.53	1158.11	200.48	4.26	6467.15
<b>결장 종양</b>							
C11	4.63	4.98	4.56	4.43	3852.26	6.22	11.31
C17	4.64	5.00	4.57	4.44	2822.46	62.34	43.94
C18	4.63	4.95	13.83	4.42	2454.15	4.29	723.15
C27	6.66	980.49	4.75	4.40	5083.84	4.30	20.82
<b>폐 종양</b>							
LU02	4.62	15190.40	4.55	4.43	13.95	4.29	14.56
LU11	4.60	4.92	4.53	4.41	999.55	4.27	146.67
LU25	4.64	5.56	11123.06	4.44	1208.92	4.29	41089
LU33	4.64	5.01	12.02	62.98	329.62	4.30	20.96
LU45	4.64	4.99	4.62	4.44	3877.47	4.29	4.86
<b>흑색종 종양</b>							
M06	4.73	21.80	4.65	4.50	1077.93	4.34	3.90
<b>난소 종양</b>							
OV12	4.72	5.12	4.64	460.40	5383.63	1152.73	115.04
OV19	960.19	4.74	69.77	20.90	494.67	5.72	4302.78
OV22	4.66	5.10	132.85	37.43	3743.91	482.33	812.05
OV27	4.55	4.86	125.78	4.92			
OV38	9.19	4.83	3439.88	16.35	1528.12	4.24	19.49
<b>췌장 종양</b>							
PN07	4.58	689.52	4.51	4.40	6777.41	4.28	746.38
PN18	4.72	2508.47	4.65	4.50	6750.73	51.15	564.94

[0279]

실시예 2

[0281] LGR5에 대한 RSPO 단백질의 결합

[0282] 인간 LGR5의 아미노산 22-564를 N-말단 FLAG 태그 및 CD4의 막횡단 도메인 및 C-말단 GFP 단백질 태그에 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 결찰시킴으로써 세포 표면 LGR5 단백질이 생성되었다 (FLAG-LGR5-CD4TM-GFP). 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 RSPO-Fc 구축물이 생성되었다. 구체적으로, 전장 인간 RSPO1, RSPO2, RSPO3 및 RSPO4를 인-프레임(in-frame)으로 인간 Fc 영역에 결찰시키고, 배콜로바이러스를 사용하여 재조합 RSPO-Fc 단백질을 곤충 세포에서 발현시켰다. 융합 단백질을 곤충 배지로부터 단백질 A 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다.

[0283] HEK-293 세포를 FLAG-LGR5-CD4TM-GFP 구축물로 일시적으로 형질감염시켰다. 48시간 후, 형질감염된 세포를 2% FBS 및 해파린을 함유하는 냉동 PBS에 혼탁시키고, 얼음 상에서 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  RSPO1-Fc, RSPO2-Fc, RSPO3-Fc, RSPO4-Fc, 또는 FZD8-Fc 융합 단백질의 존재 하에 15분 동안 인큐ベ이션하였다. 100  $\mu\text{l}$ 의 PE-접합 항-인간 Fc 2차 항체와의 제2 인큐베이션을 수행하여, Fc 융합 단백질에 결합된 세포를 검출하였다. 세포를 양성 대조군으로서의 항-FLAG 항체 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미주리주 세인트 루이스) 및 음성 대조군으로서의 항-PE 항체와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 팩스캘리버(FACSCalibur) 기구 (BD 바이오사이언시즈(BD Biosciences), 캘리포니아주 산 호세) 상에서 분석하였고, 플로우조(FlowJo) 소프트웨어를 사용하여 데이터를

프로세싱하였다.

[0284] 도 2에 제시된 바와 같이, RSPO1, RSPO2, RSPO3 및 RSPO4 모두가 HEK-293 세포의 표면 상에서 발현된 LGR5에 결합한 한편, 음성 대조군인 FZD8은 LGR5에 결합하지 않았다.

[0285] RSPO 단백질과 LGR5 사이의 결합 친화력을 표면 플라즈몬 공명으로 분석하였다. 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 가용성 LGR5-Fc 구축물이 생성되었다. 구체적으로, 인간 LGR5의 아미노산 1-564를 인-프레임으로 인간 Fc에 결찰시켰고, 배콜로바이러스를 사용하여 재조합 LGR5-Fc 융합 단백질을 곤충 세포에서 발현시켰다. LGR5-Fc 융합 단백질을 곤충 배지로부터 단백질 A 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. LGR5 신호 서열의 절단으로 LGR5의 아미노산 22-564를 함유하는 성숙형 LGR5-Fc 융합 단백질이 초래된다. 재조합 RSPO1-Fc, RSPO2-Fc, RSPO3-Fc 및 RSPO4-Fc 융합 단백질을 표준 아민-기반 화학 (NHS/EDC)을 사용하여 CM5 칩 상에 고정시켰다. 가용성 LGR5-Fc의 2배 희석물을 침 표면에 주입하였다 ( $100 \text{ nM} \rightarrow 0.78 \text{ nM}$ ). 비아코어 라이프 사이언시스 (Biacore Life Sciences) (GE 헬스케어(GE Healthcare))로부터의 비아코어 2000 시스템을 사용하여 동역학 데이터를 경시적으로 수집하였고, 각각의 RSPO 단백질에 대한 친화력 상수 ( $K_D$  값)가 산출되도록 동시성 글로벌 피트(global fit) 식을 사용하여 데이터를 피팅하였다 (표 3).

### 표 3

	LGR5 (nM)
RSPO1	110
RSPO2	14
RSPO3	<1.0
RSPO4	73

[0286]

[0287] 인간 RSPO1, RSPO2, RSPO3 및 RSPO4 모두가 LGR5에 결합하였고, 이는 RSPO 단백질이 LGR 단백질에 대한 리간드 일 수 있음을 입증한다.

[0288] 실시예 3

[0289]  $\beta$ -카테닌 신호전달의 억제에 대한 시험관내 테스트

[0290] 세포 혼탁액을 제조하기 위해, NOD/SCID 마우스에서 증식된 신선한 인간 폐 선암종 이종이식편 종양 (표 2의 폐 종양 #1)을 다지고, 300 U/ml 제3형 콜라제나제 (워싱턴(Worthington), 뉴저지주 레이크우드) 및 200 U/ml DNase I (워싱턴(Worthington), 뉴저지주 레이크우드)을 함유하는 배지 199 (인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아주 칼스배드)에서 1 내지 2시간 동안 37°C에서 소화시켰다. 이러한 폐 종양 세포를 40  $\mu\text{m}$  나일론 스트레이너(strainer) (BD 팔콘(BD Falcon), 뉴저지주 프랭클린 레이크스)로 여과하고, 82×g에서 5분 동안 스피닝(spinning)으로 침강시켰다. 적혈구를 ACK 완충제 (0.8% 염화암모늄, 0.1 mM EDTA, 10 mM 중탄산나트륨, 0.1N HCl)에서 용해시키고, 세정하고, HBSS (미디어테크(Mediatech), 베지니아주 머내서스), 25 mM HEPES 완충제 (미디어테크, 베지니아주 머내서스) 및 2% 열-불활성화 소 태아 혈청 (HI-FBS; 인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드)으로 이루어진 배지에서 150×g에서 5분 동안 원심분리하였다. 죽은 세포 및 잔해물을 82×g에서 8분 동안의 HI-FBS 쿠션 상에서의 원심분리에 의해 제거하였다. SM 내의 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  비오틴-접합 항-H-2Kd 및 2.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  항-마우스 CD45 모노클로날 항체 (바이오레전드, 캘리포니아주 샌디에고)로 염색한 후에, 10<sup>6</sup> 개의 세포/ml 당 50  $\mu\text{l}$  매그나바인드(MagnaBind) 스트렙타비딘 비드 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific), 매사추세츠주 월섬)를 사용하여 마우스 간질 세포를 고갈시켰다.

[0291] 컨디셔닝 배지를 생산하기 위해, B27 보충물 (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드), 인슐린-트랜스페린-셀레늄 (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드), 폐니실린-스트렙토마이신 (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드), 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  히드로코르티손 (스템셀 테크놀러지스(Stemcell Technologies), 캐나다 밴쿠버), 20 ng/ml EGF (MBL 인터내셔널(MBL International), 매사추세츠주 워번), 20 ng/ml 염기성 FGF (MBL 인터내셔널, 매사추세츠주 워번) 및 5 U/ml 혜파린 (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스)이 보충된 DMEM:F12 (3:1) 배지 (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드)에서 폐 종양 세포를 배양하였다. 24시간 후, 컨디셔닝 배지를 수확하였다 (본원에서 "LT"로 지칭됨).

- [0292] STF-293 세포를 6xTCF-루시퍼라제 리포터 벡터로 안정적으로 형질감염시켰다. 1배 부피의 폐 종양 세포-컨디셔닝 배지 (LT) 또는 대조군 배지를 정제된 가용성 LGR5-Fc, FZD8-Fc, Jag-Fc 융합 단백질 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), 항-FZD 모노클로날 항체 ( $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), 또는 항체 LZ1 ( $40 \mu\text{g}/\text{mL}$ )의 존재 하에 STF-293 세포에 첨가하였다. 또한, Wnt3a L-세포-컨디셔닝 배지를 양성 대조군로 사용하였고, 1:4의 최종 희석으로 폐 종양 세포-컨디셔닝 배지 (LT)와 조합하여 테스트하였다. 세포를 16시간 동안 인큐베이션하였고, 제조사 (프로메가Promega), 위스콘신주 매디슨)의 설명서에 따라 스테디-글로(Steady-Glo® 루시퍼라제 검정법 시스템을 사용하여 루시퍼라제 활성을 측정하였다.
- [0293] 정제된 가용성 LGR5-Fc 및 FZD8-Fc 융합 단백질의 효과를 대조군 Jag1-Fc 단백질에 비교하였고, 항-FZD 모노클로날 항체의 효과를 대조군 항-박테리아 라이소자임 항체 LZ1에 비교하였다. 도 3 (왼쪽)에 제시된 바와 같이, 폐 종양 세포-컨디셔닝 배지 (LT)는 Wnt3a-유도  $\beta$ -카테닌 활성을 강화한 활성을 함유한다. LT 배지 내의  $\beta$ -카테닌 활성을 강화하는 단백질이 RSPO 단백질에 결합하는 가용성 LGR5-Fc에 의해 억제되었다. 이러한 활성이 Wnt 신호전달을 차단하는 작용제인 FZD8-Fc 및 항-FZD 항체에 의해 또한 억제되었다. 가용성 Jag-Fc 및 LZ1은 활성을 억제하지 않았다. Wnt3a의 부재 하에서도 (도 3, 오른쪽), LT 배지가  $\beta$ -카테닌 신호전달을 유도하였다. 가용성 Jag-Fc 및 LZ1은 이러한 활성을 억제하지 않았다. 대조적으로, 가용성 LGR5-Fc는 LT 배지-유도  $\beta$ -카테닌 신호전달을 억제하였고, 대부분의 대조군 수준으로 반응을 감소시켰다. 이러한 데이터는 폐 종양 세포가 RSPO-유사 활성이 있는 단백질 (또는 단백질들)을 생산하였고, 이러한 활성이 LGR5에 의해 억제되었으며, 이러한 활성이 Wnt3a 활성과 별개였음을 시사하였다.
- [0294] 폐 종양 세포-컨디셔닝 배지 및 난소 종양 세포-컨디셔닝 배지를 사용하는 공동-배양 검정법을 사용하여 유사한 실험을 수행하였다. 상기 기술된 바와 같이, 간질 세포가 고갈된 신선하게 프로세싱된 종양 세포를 철야로 배양하였다. 배양 배지 및 세포를 Wnt3a L-세포-컨디셔닝 배지와 함께 또는 이러한 배지 없이 STF-293 세포로 옮겼다. LGR5-Fc 융합 단백질, FZD8-Fc 융합 단백질, 또는 대조군 Fc 융합 단백질을 첨가하였다 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). 세포를 20시간 동안 인큐베이션하였고, 상기 기술된 바와 같이 루시퍼라제 활성을 측정하였다.
- [0295] 도 13에 제시된 바와 같이,  $\beta$ -카테닌 신호전달 활성이 종양 세포 및 상청액에 의해 유도되었고, Wnt3a L-세포-컨디셔닝 배지와 조합되어 추가로 강화되었다 (도 13a, 폐 종양 LU2; 도 13b, 폐 종양 LU25; 도 13c, 난소 종양 OV38). Wnt 경로 억제제인 FZD8-Fc는 Wnt3a-유도  $\beta$ -카테닌 활성을 거의 배경 수준으로 감소시킨 한편, LGR5-Fc는 종양-유래  $\beta$ -카테닌 활성을 강하게 감소시켰다. 상기와 같이, 이러한 데이터는 폐 및 난소 종양 세포가 RSPO-유사 활성이 있는 단백질 (또는 단백질들)을 생산하였고, 이러한 활성이 LGR5에 의해 억제되었으며, 이러한 활성이 Wnt3a 활성과 별개였음을 시사하였다.
- [0296] 실시예 4
- [0297] 가용성 LGR5에 의한 RSPO 활성 억제에 대한 시험관내 테스트
- [0298] 인간 폐 종양 #1 세포로부터의 컨디셔닝 배지를 실시예 3에 기술된 바와 같이 제조하였고, 가용성 LGR5-Fc 및 RSPO2-Fc를 실시예 2에 기술된 바와 같이 생산하였다.
- [0299] HEK-293 세포를 6xTCF-루시퍼라제 리포터 벡터 (탭플래시, 밀리포어, 매사추세츠주 빌레리카)로 형질감염시켰다. 24-48시간 후, 형질감염된 세포를 25% 폐 종양 세포-컨디셔닝 배지 + 25% Wnt3a-L 세포-컨디셔닝 배지를 함유하는 배지 또는 RSPO2 ( $10 \text{ ng}/\text{mL}$ ) + 25% Wnt3a-L 세포-컨디셔닝 배지를 함유하는 배지와 함께 인큐베이션하였다. 가용성 LGR5를  $20 \mu\text{g}/\text{mL} \rightarrow 0.02 \mu\text{g}/\text{mL}$ 의 4배 단계 희석으로 세포에 첨가하였다. 가용성 Jag-Fc 단백질이  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 음성 대조군으로 사용되었고, FZD8-Fc 단백질이  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ 로 양성 대조군으로 사용되었다. 세포를 16시간 동안 인큐베이션하고, 제조사 (프로메가, 위스콘신주 매디슨)의 설명서에 따라 스테디-글로® 루시퍼라제 검정법 시스템을 사용하여 루시퍼라제 활성을 측정하였다.
- [0300] 도 4에 제시된 바와 같이, 증가되는 농도의 가용성 LGR5-Fc가 RSPO2-Fc + Wnt3a-컨디셔닝 배지의 조합에 의한 루시퍼라제 활성 유도 (-□-), 뿐만 아니라 폐 종양 세포-컨디셔닝 배지 및 Wnt3a-컨디셔닝 배지의 조합에 의한 루시퍼라제 활성 유도 (-■-)를 감소시켰다. 음성 대조군 Jag-Fc 단백질은 루시퍼라제 활성을 차단하지 않은 한편, Wnt3a를 차단하는 FZD8-Fc는 루시퍼라제 활성을 차단하였다. 중요하게, LGR5는 RSPO2 단백질 및 폐 종양 세포-컨디셔닝 배지 양쪽 모두와 동일한 억제 EC50을 나타냈다. 이러한 데이터는 폐 종양 세포에 의해 생산된 RSPO-유사 활성이 있는 단백질(들)이 LGR5에 의해 억제되었고, 정제된 RSPO 단백질과 유사하게 거동하였음을 입증하였고, 폐 종양 세포-컨디셔닝 배지 내의 활성이 RSPO 단백질에 기인하였음을 시사하였다.
- [0301] 실시예 5

- [0302] 항-RSP01 모노클로날 항체의 생성
- [0303] 재조합 인간 RSP01 단백질 아미노산 31-263 (R&D 시스템즈, 미네소타주 미니애폴리스)에 대한 항체를 생성시켰다. 마우스 ( $n=3$ )를 표준 기술을 사용하여 RSP01 단백질로 면역화시켰다. 개별적인 마우스로부터의 혈청을 FACS 분석을 사용하여 최초 면역화로부터 약 70일 후에 RSP01에 대해 스크리닝하였다. 항체 역가가 가장 높은 동물을 최종 항원 부스트(boost)용으로 선택하였고, 이러한 부스트 후 하이브리도마 생산을 위해 지라 세포를 단리하였다. SP2/0 세포를 마우스 지라 세포에 대한 융합 파트너로서 사용하였다. 하이브리도마 세포를 96웰 플레이트에 웰 당 1개의 세포로 플레이팅하고, FACS 분석에 의해 상청액을 인간 RSP01에 대해 스크리닝하였다.
- [0304] 항-RSP01 항체의 FACS 스크리닝을 위해, 인간 RSP01의 N-말단 푸린-유사 도메인의 세포 표면 발현을 가능하게 하는 키메라 융합 단백질을 구축하였다. 도 5a에 제시된 바와 같이, 이러한 융합 단백질은 N-말단 FLAG 태그에 이어지는 2개의 RSP01의 푸린-유사 도메인 (aa 34-135)을 함유하고, 여기에 인간 CD4의 막횡단 및 세포내 도메인 및 C-말단 녹색 형광 단백질 태그가 융합된다 (FLAG-RSP01푸린-CD4TM-GFP).
- [0305] HEK-293 세포를 FLAG-RSP01푸린-CD4TM-GFP로 형질감염시켰다. 48시간 후, 형질감염된 세포를 2% FBS 및 혼화물을 함유하는 냉장 PBS에 혼탁시키고, 열음 상에서  $50 \mu\text{l}$ 의 하이브리도마 상청액의 존재 하에 30분 동안 인큐베이션하였다.  $100 \mu\text{l}$ 의 PE-접합 항-인간 Fc 2차 항체와의 제2 인큐베이션을 수행하여, 항체에 결합된 세포를 검출하였다. 세포를 양성 대조군으로서의 항-FLAG 항체 (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스) 및 음성 대조군으로서의 항-PE 항체와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 팩스캘리버 기구 (BD 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산 호세) 상에서 분석하였고, 플로우조 소프트웨어를 사용하여 데이터를 프로세싱하였다.
- [0306] 89M2, 89M4, 89M5, 89M7, 89M19 및 89M25를 포함하여, RSP01에 결합한 여러 하이브리도마가 확인되었다 (도 5b). 이러한 항체들 중 몇몇으로부터 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 서열분석하였다. 분석 후, 항체 89M2, 89M4, 89M5, 및 89M25가 동일한 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 것이 발견되었다. 항체 89M5를 발현하는 하이브리도마 세포주가 2011년 6월 30일에 부다페스트 조약의 조건 하에 미국 버지니아주 머내서스 유니버시티 대로 10801의 ATCC에 기탁되었고, ATCC 기탁 지정 번호 PTA-11970가 이에 할당되었다. 89M5의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열 10 및 서열 11이다. 89M5의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은 서열 19 및 서열 20이다. 89M5의 중쇄 및 경쇄 CDR이 본원의 표 1에서 열거된다. 89M5의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열은 서열 21 및 서열 22이고, 89M5의 중쇄 및 경쇄의 뉴클레오티드 서열은 서열 23 및 서열 24이다.
- [0307] 실시예 6
- [0308] RSP01에 의한  $\beta$ -카테닌 신호전달의 유도를 억제하는 항-RSP01 모노클로날 항체의 확인
- [0309] HEK-293 세포를 6xTCF-루시퍼라제 리포터 벡터 (탑플래시, 밀리포어, 매사추세츠주 빌리카)로 형질감염시켰다. 24-48시간 후, 형질감염된 HEK-293 세포를 Wnt3a ( $5 \text{ ng/ml}$ ) 및 인간 RSP01 ( $10 \text{ ng/ml}$ , R&D 바이오시스템즈(R&D BioSystems))의 조합물과 함께 항-RSP01 항체 89M2, 89M4, 89M5, 89M7, 89M19, 및 89M25, 또는 2개의 관련되지 않은 대조군 항체인 254M14 및 254M26 ( $10 \mu\text{g/ml} \rightarrow 0.625 \mu\text{g/ml}$ 의 2배 희석)의 존재 하에 인큐베이션하였다. 세포를 16시간 동안 인큐베이션하고, 제조사 (프로메가, 위스콘신주 매디슨)의 설명서에 따라 스테디-글로® 루시퍼라제 검정법 시스템을 사용하여 루시퍼라제 활성을 측정하였다.
- [0310] 도 6에 제시된 바와 같이, 항-RSP01 항체 89M2, 89M4, 89M5 및 89M25 각각은 신호전달을 차단한 한편, 항-RSP01 항체 89M7 및 89M19는 신호전달을 차단하지 않았다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 서열분석에 의해 결정된 바와 같이, 항체 89M2, 89M4, 89M5 및 89M25 모두는 동일한 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 함유하고, 따라서 아마도 동일한 항원 결합 부위를 함유한다. 이러한 결과는 항-RSP01 항체가 RSP01-유도  $\beta$ -카테닌 신호전달을 차단할 수 있었음을 입증하였다.
- [0311] 실시예 7
- [0312] 항-RSP01 항체가 가용성 RSP01이 LGR5에 결합하는 것을 차단한다
- [0313] HEK-293 세포를 FLAG-LGR5-CD4TM-GFP 구축물 (이전에 실시예 2에서 기술됨)로 일시적으로 형질감염시켰다. 48시간 후, 형질감염된 세포를 2% FBS 및 혼화물을 함유하는 냉장 PBS에 혼탁시키고, 열음 상에서 RSP01-Fc 단백질 ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) 및 항체 89M2, 89M4, 89M5, 89M7, 89M19 또는 89M25 ( $10 \mu\text{g/ml}$ )의 존재 하에 인큐베이션하였다.  $100 \mu\text{l}$ 의 PE-접합 항-인간 Fc 2차 항체와의 제2 인큐베이션을 수행하여, RSP01-Fc 융합 단백질에 결합된 세포를 검출하였다. 세포를 팩스캘리버 기구 (BD 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산 호세) 상에서 분석하였고, 플로우조 소프트웨어를 사용하여 데이터를 프로세싱하였다.

[0314] 도 7에 제시된 바와 같이, 항-RSP01 항체 89M2, 89M4, 89M5 및 89M25 각각은 RSP01이 LGR5에 결합하는 것을 차단한 반면, 항-RSP01 항체 89M7 및 89M19는 RSP01이 LGR5에 결합하는 것을 차단하지 않았다. 이러한 결과는 6×TCF 루시퍼라제 리포터 검정법에서  $\beta$ -카테닌 활성의 유도를 측정하는 검정법에서 항체 89M2, 89M4, 89M5 및 89M25는 RSP01 신호전달을 차단하는 능력이 있는 반면 항체 89M7 및 89M19는 RSP01 신호전달을 차단할 수 없었음을 입증한 실시예 6에 제시된 결과와 상호관련된다. 상기 논의된 바와 같이, 항체 89M2, 89M4, 89M5 및 89M25 모두는 동일한 종쇄 및 경쇄 가변 영역 및 아마도 동일한 항원 결합 부위를 포함하고, 따라서 이러한 항체들 모두가 동일하지는 않더라도 유사한 방식으로 기능한다는 것이 예측될 것이다.

[0315] 실시예 8

[0316] 항-RSP01 항체의 결합 친화력

[0317] 항체 89M4, 89M5, 89M7 및 89M25의  $K_D$ 를 비아코어 라이프사이언스(GE 헬스케어)로부터의 비아코어 2000 시스템을 사용하여 결정하였다. 재조합 인간 RSP01-Fc 또는 마우스 RSP01-Fc 단백질을 표준 아민-기반 화학(NHS/EDC)을 사용하여 CM5 칩 상에 고정시켰다. 항체를 HBS-P (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% v/v 계면활성제 P20)에서 100 nM → 0.78 nM로 2배 단계 희석하고, 칩 표면에 주입하였다. 동역학 데이터를 경시적으로 수집하였고, 각각의 항체에 대한 친화력 상수 ( $K_D$  값)가 산출되도록 동시성 글로벌 피트 식을 사용하여 데이터를 피팅하였다.

#### 표 4

	인간 RSP01 (nM)	마우스 RSP01 (nM)
89M4	< 0.1	< 0.1
89M5	< 0.1	< 0.1
89M7	< 0.1	< 0.1
89M25	< 0.1	< 0.1

[0318]

[0319] 표 4에 제시된 바와 같이, 항체 89M4, 89M5, 89M7 및 89M25 모두는 인간 RSP01에 대한 친화력 상수 ( $K_D$ )가 0.1 nM 미만이었다. 이러한 항체들은 모두 마우스 RSP01에 대한  $K_D$ 가 0.1 nM 미만이었다.

[0320] 실시예 9

[0321] 항-RSP01 항체에 의한 생체 내에서의 난소 종양 성장의 억제

[0322] 해리된 OV19 난소 종양 세포 ( $1 \times 10^5$  개의 세포)를 6-8주령 NOD/SCID 마우스의 유방 지방 패드에 주사하였다. 134 mm<sup>3</sup>의 평균 부피에 도달할 때까지 종양을 45일 동안 성장시켰다. 마우스를 무작위화하고 (n = 군 당 10마리), 항-RSP01 항체 89M5, 89M25, 탁솔, 89M5와 탁솔의 조합물, 89M25와 탁솔의 조합물, 또는 대조군 항체 1B7.11로 처리하였다. 항체는 1주일에 1번 15 mg/kg로 투여하였고, 탁솔은 1주일에 1번 7.5 mg/ml로 투여하였다. 복강 내로의 주사를 통해 항체 및 탁솔 투여를 수행하였다. 종양 성장을 모니터링하였고, 지시된 시점에 전자 캘리퍼스로 종양 부피를 측정하였다. 데이터는 평균 ± S.E.M으로 표현된다.

[0323] 제35일에, 대조군 항체로의 처리와 비교하여 항체 89M5로의 처리는 종양 성장에서의 40% 감소를 초래하였고, 89M25은 종양 성장에서의 25% 감소를 초래하였다 (도 8, 각각 p = 0.37 및 p = 0.19). 탁솔과 조합된 89M5 또는 89M25로의 처리는 어느 한쪽 작용제 단독으로의 처리보다 더 큰 종양 성장 감소를 초래하였다. 89M5 및 탁솔로의 처리는 성장에서의 48% 감소를 초래하였고 (대조군에 대해 p = 0.12), 89M25 및 탁솔로의 처리는 성장에서의 43% 감소를 초래하였다 (대조군에 대해 p = 0.16). 따라서, 항체 89M5 및 89M25는 OV19 난소 종양 모델에서 단일 작용제로서 항-종양 성장 활성을 입증하였고, 탁솔과 조합되어 항-종양 성장 활성을 또한 나타냈다.

[0324] 이러한 실험에 사용된 마우스 (대조군 및 처리 마우스 양쪽 모두)로부터의 종양의 후속 분석에서 종양이 인간 난소 종양 세포(OV19) 및 뮤린 T-세포 림프종 세포의 혼합물이었음이 밝혀졌다.

[0325] 실시예 10

[0326] 항-RSP01 모노클로날 항체 89M5의 에피토프 지도작성

- [0327] 항체 89M5가 결합하는 RSP01의 특정 영역(들)을 추가로 특성화하기 위해, 에피토프 지도작성 실험을 수행하였다. 인간 RSP01의 상이한 영역들을 포함하는 일련의 구축물을 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성시켰다 (도 9a 참조). 구축물들은 각각 N-말단 FLAG 태그에 이어지는 RSP01 단백질을 포함하고 인간 CD4의 막 횡단 및 세포내 도메인에 융합된 융합 단백질이었다. 일부 버전에서, 융합 단백질은 C-말단 녹색 형광 단백질 태그를 또한 포함한다.
- [0328] HEK-293 세포를 개별적인 구축물로 형질감염시켰다. 48시간 후, 형질감염된 세포를 2% FBS 및 해파린을 함유하는 냉장 PBS에 혼탁시키고, 열음 상에서 항-RSP01 항체 89M5의 존재 하에 30분 동안 인큐베이션하였다. 100  $\mu\text{l}$ 의 PE-접합 항-인간 Fc 2차 항체와의 제2 인큐베이션을 수행하여, 항체에 결합된 세포를 검출하였다. 세포를 양성 대조군으로서의 항-FLAG 항체 (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스) 및 음성 대조군으로서의 항-PE 항체와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 팩스캘리버 기구 (BD 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산 호세) 상에서 분석하였고, 플로우조 소프트웨어를 사용하여 데이터를 프로세싱하였다.
- [0329] 도 9b에 제시된 바와 같이, FACS 분석은 RSP01의 푸린2 도메인 내의 아미노산들이 항-RSP01 항체 89M5에 대한 결합 부위에서 수반된다는 것을 시사한다 (실시예 10, 도 9). 이러한 예비 결과는 다른 RSP01 도메인 내의 아미노산들이 결합 부위에서 수반될 수 있다는 사실을 배제하지 않는다.
- [0330] 실시예 11
- [0331] 항-RSP02 모노클로날 항체의 생성
- [0332] 재조합 인간 RSP02 단백질 아미노산 22-205 (R&D 시스템즈, 미네소타주 미니애폴리스)에 대한 항체를 생성시켰다. 마우스 ( $n=3$ )를 표준 기술을 사용하여 RSP02 단백질로 면역화시켰다. 개별적인 마우스로부터의 혈청을 FACS 분석을 사용하여 최초 면역화로부터 약 70일 후에 RSP02에 대해 스크리닝하였다. 항체 역자가 가장 높은 동물을 최종 항원 부스트용으로 선택하였고, 이러한 부스트 후 하이브리도마 생산을 위해 자라 세포를 단리하였다. SP2/0 세포를 마우스 자라 세포에 대한 융합 파트너로서 사용하였다. 하이브리도마 세포를 96웰 플레이트에 웰 당 1개의 세포로 플레이팅하고, FACS 분석에 의해 상청액을 인간 RSP02에 대해 스크리닝하였다.
- [0333] 실시예 5에서 기술된 바와 같이, 항-RSP02 항체의 FACS 스크리닝을 위해, 인간 RSP02의 N-말단 푸린-유사 도메인의 세포 표면 발현을 가능하게 하는 키메라 융합 단백질을 구축하였다. RSP01에 대해 도 5a에 제시된 것과 유사하게, RSP02 융합 단백질은 N-말단 FLAG 태그에 이어지는 RSP02의 푸린-유사 도메인 (aa 31-146)을 함유하고, 여기에 인간 CD4의 막횡단 및 세포내 도메인 및 C-말단 녹색 형광 단백질 태그가 융합된다 (FLAG-RSP02푸린-CD4TM-GFP).
- [0334] HEK-293 세포를 FLAG-RSP02푸린-CD4TM-GFP로 형질감염시켰다. 48시간 후, 형질감염된 세포를 2% FBS 및 해파린을 함유하는 냉장 PBS에 혼탁시키고, 열음 상에서 50  $\mu\text{l}$ 의 하이브리도마 상청액의 존재 하에 30분 동안 인큐베이션하였다. 100  $\mu\text{l}$ 의 PE-접합 항-인간 Fc 2차 항체와의 제2 인큐베이션을 수행하여, 항체에 결합된 세포를 검출하였다. 세포를 양성 대조군으로서의 항-FLAG 항체 (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스) 및 음성 대조군으로서의 항-PE 항체와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 팩스캘리버 기구 (BD 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산 호세) 상에서 분석하였고, 플로우조 소프트웨어를 사용하여 데이터를 프로세싱하였다.
- [0335] 130M23, 130M24, 130M25, 130M26, 130M27, 및 130M28을 포함하여, RSP02에 결합한 여러 하이브리도마가 확인되었다 (도 10). 이러한 항체들 중 몇몇으로부터 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 서열분석하였다. 항체 130M23을 생산하는 하이브리도마 세포주가 2011년 8월 10일에 부다페스트 조약의 조건 하에 미국 버지니아주 머내서스 유니버시티 대로 10801의 ATCC에 기탁되었고, ATCC 기탁 지정 번호 PTA-12021이 이에 할당되었다. 130M23의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열은 서열 27 및 서열 28이다. 130M23의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은 서열 35 및 서열 36이다. 130M23의 중쇄 및 경쇄 CDR이 본원의 표 1에서 열거된다. 130M23의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열은 서열 37 및 서열 38이고, 130M23의 중쇄 및 경쇄의 뉴클레오티드 서열은 서열 39 및 서열 40이다.
- [0336] 실시예 12
- [0337] RSP02에 의한  $\beta$ -카테닌 신호전달의 유도를 억제하는 항-RSP02 모노클로날 항체의 확인
- [0338] HEK-293 세포를 6xTCF-루시퍼라제 리포터 벡터 (탑플래시, 밀리포어, 매사추세츠주 빌레리카)로 형질감염시켰다. 24-48시간 후, 형질감염된 HEK-293 세포를 Wnt3a (5 ng/ml) 및 인간 RSP02 (10 ng/ml, R&D 바이오시스템즈) 또는 인간 RSP03 (10 ng/ml, R&D 바이오시스템즈)의 조합물과 함께 항-RSP02 항체 130M23,

130M24, 130M25, 130M26, 130M27, 및 130M28의 존재 하에 인큐베이션하였다. 대조군으로서 세포를 Wnt3a 및 RSP0의 조합물과 함께, Wnt3a 단독과 함께, 또는 첨가물 없이 인큐베이션하였다. 세포를 16시간 동안 인큐베이션하고, 제조사 (프로메가, 위스컨신주 매디슨)의 설명서에 따라 스테디-글로® 루시퍼라제 검정법 시스템을 사용하여 루시퍼라제 활성을 측정하였다.

[0339] 도 11에 제시된 바와 같이, 항-RSP02 항체 130M23, 130M24, 130M25, 130M26, 130M27, 및 130M28 각각이 RSP02-유도  $\beta$ -카테닌 신호전달을 감소시켰고, 항-RSP02 항체 130M23, 130M24는 RSP02-유도  $\beta$ -카테닌 신호전달을 완전히 차단하였다. 대조적으로, 이러한 항체들은 RSP03에 의해 유도된  $\beta$ -카테닌 신호전달을 차단하지 않았다. 이러한 결과는 항체 130M23, 130M24, 130M25, 130M26, 130M27, 및 130M28이 RSP02의 특이적 억제제이고, RSP02-유도  $\beta$ -카테닌 신호전달을 감소시키고/시키거나 완전히 차단할 수 있다는 것을 입증하였다.

[0340] 실시예 13

[0341] 항-RSP02 항체가 가용성 RSP02가 LGR5에 결합하는 것을 차단한다

[0342] HEK-293 세포를 FLAG-LGR5-CD4TM-GFP 구축물 (이전에 실시예 2에서 기술됨)로 일시적으로 형질감염시켰다. 48시간 후, 형질감염된 세포를 2% FBS 및 혼화PBS에 현탁시키고, 얼음 상에서 RSP02-Fc 단백질 ( $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 및 항체 130M23, 130M24, 130M25, 130M26, 130M27, 및 130M28의 존재 하에 인큐베이션하였다.  $100 \mu\text{l}$ 의 PE-접합 항-인간 Fc 2차 항체와의 제2 인큐베이션을 수행하여, RSP02-Fc 융합 단백질에 결합된 세포를 검출하였다. 세포를 팩스캘리버 기구 (BD 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산 호세) 상에서 분석하였고, 플로우조 소프트웨어를 사용하여 데이터를 프로세싱하였다.

[0343] 도 12에 제시된 바와 같이, 항-RSP02 항체 130M23 및 130M24 각각은 RSP02가 LGR5에 결합하는 것을 차단한 반면, 항-RSP02 항체 130M25, 130M26, 130M27, 및 130M28은 RSP02가 LGR5에 결합하는 것을 약하게만 차단하였거나 차단하지 않았다. 이러한 결과는 항체 130M23 및 130M24는 RSP02-유도  $\beta$ -카테닌 신호전달을 완전히 차단하는 능력이 있는 반면, 항체 130M25, 130M26, 130M27, 및 130M28은 RSP02-유도  $\beta$ -카테닌 신호전달의 덜 강력한 억제제였음을 입증한 실시예 11에 제시된 결과와 상호관련된다.

[0344] 실시예 14

[0345] 항-RSP03 모노클로날 항체의 생성

[0346] 재조합 인간 RSP03 단백질 아미노산 22-272 (R&D 시스템즈, 미네소타주 미니애폴리스)에 대한 항체를 생성시켰다. 마우스 ( $n=3$ )를 표준 기술을 사용하여 RSP03 단백질로 면역화시켰다. 개별적인 마우스로부터의 혈청을 FACS 분석을 사용하여 최초 면역화로부터 약 70일 후에 RSP03에 대해 스크리닝하였다. 항체 역가가 가장 높은 동물을 최종 항원 부스트용으로 선택하였고, 이러한 부스트 후 하이브리도마 생산을 위해 지라 세포를 단리하였다. SP2/0 세포를 마우스 지라 세포에 대한 융합 파트너로서 사용하였다. 하이브리도마 세포를 96웰 플레이트에 웰 당 1개의 세포로 플레이팅하고, FACS 분석에 의해 상청액을 인간 RSP03에 대해 스크리닝하였다.

[0347] 실시예 5에서 기술된 바와 같이, 항-RSP03 항체의 FACS 스크리닝을 위해, 인간 RSP0의 N-말단 푸린-유사 도메인의 세포 표면 발현을 가능하게 하는 키메라 융합 단백질을 구축하였다. RSP01에 대해 도 5a에 제시된 것과 유사하게, RSP03 융합 단백질은 N-말단 FLAG 태그에 이어지는 RSP03의 푸린-유사 도메인 (aa 32-141)을 함유하고, 여기에 인간 CD4의 막횡단 및 세포내 도메인 및 C-말단 녹색 형광 단백질 태그가 융합된다 (FLAG-RSP03푸린-CD4TM-GFP).

[0348] HEK-293 세포를 FLAG-RSP03푸린-CD4TM-GFP로 형질감염시켰다. 48시간 후, 형질감염된 세포를 2% FBS 및 혼화PBS에 현탁시키고, 얼음 상에서  $50 \mu\text{l}$ 의 하이브리도마 상청액의 존재 하에 30분 동안 인큐ベ이션하였다.  $100 \mu\text{l}$ 의 PE-접합 항-인간 Fc 2차 항체와의 제2 인큐베이션을 수행하여, 항체에 결합된 세포를 검출하였다. 세포를 양성 대조군으로서의 항-FLAG 항체 (시그마-알드리치, 미주리주 세인트 루이스) 및 음성 대조군으로서의 항-PE 항체와 함께 인큐베이션하였다. 세포를 팩스캘리버 기구 (BD 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산 호세) 상에서 분석하였고, 플로우조 소프트웨어를 사용하여 데이터를 프로세싱하였다.

[0349] 실시예 15

[0350] 항-RSP02 항체 130M23의 결합 친화력

[0351] 130M23의  $K_D$ 를 비아코어 라이프사이언시즈 (GE 헬스케어)로부터의 비아코어 2000 시스템을 사용하여 결정하였다. 재조합 인간 RSP02-Fc 또는 마우스 RSP02-Fc 단백질을 표준 아민-기반 화학 (NHS/EDC)을 사용하여

CM5 칩 상에 고정시켰다. 항체를 HBS-P (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% v/v 계면활성제 P20)에서 100 nM → 0.78 nM로 2배 단계 희석하고, 칩 표면에 주입하였다. 동역학 데이터를 경시적으로 수집하였고, 각각의 항체에 대한 친화력 상수 ( $K_D$  값)가 산출되도록 동시성 글로벌 피트 식을 사용하여 데이터를 피팅하였다.

[0352] 항체 130M23은 인간 RSP02에 대한 친화력 상수 ( $K_D$ )가 0.14 nM이었고, 마우스 RSP02에 대한  $K_D$ 가 0.35 nM이었다.

실시예 16

항-RSP02 항체에 의한 RSP0 활성 억제에 대한 시험관내 테스트

[0355] 인간 폐 종양 LU2 세포로부터의 컨디셔닝 배지를 실시예 3에 기술된 바와 같이 제조하였고, 가용성 LGR5-Fc를 실시예 2에 기술된 바와 같이 생산하였다.

[0356] STF-293 세포를 LU2 세포 + 25% 폐 종양 세포-컨디셔닝 배지 + 25% Wnt3a-L 세포-컨디셔닝 배지와 함께 인큐베이션하였다. 항체 130M23 및 가용성 LGR5-Fc를 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  → 0.0006  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 5배 단계 희석으로 세포에 첨가하였다. 관련되지 않은 모노클로날 항체 (유사하게 희석됨), 및 대조군 Fc 융합 단백질 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )이 음성 대조군으로서 사용되었다. 세포를 20시간 동안 인큐베이션하고, 제조사 (프로메가, 위스콘신주 매디슨)의 설명서에 따라 스테디-글로® 루시퍼라제 검정법 시스템을 사용하여 루시퍼라제 활성을 측정하였다.

[0357] 도 14에 제시된 바와 같이, 증가되는 농도의 가용성 LGR5-Fc (-●-)가 폐 종양 세포-컨디셔닝 배지 및 Wnt3a-컨디셔닝 배지의 조합에 의한 루시퍼라제 활성 유도를 감소시켰다. 증가되는 농도의 항-RSP02 항체 130M23 (-■-) 또한 폐 종양 세포-컨디셔닝 배지 및 Wnt3a-컨디셔닝 배지의 조합에 의한 루시퍼라제 활성 유도를 감소시켰다. 130M23은 129nM의 IC<sub>50</sub>으로 컨디셔닝 배지-유도 활성을 차단하였고, LGR5-Fc보다 100배 초과로 더 강력하였다. 대조군 Fc 융합 단백질 (-△-), 뿐만 아니라 관련되지 않은 항체 (-□-)는 루시퍼라제 활성을 차단하지 않았다.

실시예 17

항-RSP0 항체에 의한 생체 내에서의 체장 종양 성장의 억제

[0360] 해리된 PN31 체장 종양 세포 ( $1 \times 10^5$  개의 세포)를 6-8주령 NOD/SCID 마우스의 옆구리 내로 피하 주사하였다. 120  $\text{mm}^3$ 의 평균 부피에 도달할 때까지 종양을 61일 동안 성장시켰다. 마우스를 무작위화하고 (n = 군 당 10마리), 항-RSP01 항체 89M5, 항-RSP02 항체 130M23, 켘시타빈, 89M5와 켘시타빈의 조합물, 130M23과 켘시타빈의 조합물, 또는 대조군 항체 1B7.11로 처리하였다. 항체는 1주일에 1번 15 mg/kg로 투여하였고, 켘시타빈은 1주일에 1번 30  $\text{mg}/\text{mL}$ 로 투여하였다. 복강 내로의 주사를 통해 항체 및 켘시타빈 투여를 수행하였다. 종양 성장을 모니터링하였고, 지시된 시점에 전자 캘리퍼스로 종양 부피를 측정하였다. 데이터는 평균 ± S.E.M으로 표현된다.

[0361] 도 15에 제시된 바와 같이, 단일 작용제로서의 항-RSP01 항체 89M5 또는 항-RSP02 항체 130M23로의 처리는 종양 성장에 대한 효과가 최소일 뿐이었다. 켘시타빈 단독으로의 처리는 대조군과 비교하여 종양 성장을 49%만큼 감소시켰다 ( $p = 0.09$ ). 그러나, 켘시타빈과 조합된 89M5 또는 130M23으로의 처리는 어느 한쪽 작용제 단독으로의 처리보다 더 큰 종양 성장 감소를 초래하였다. 89M5 및 켘시타빈으로의 처리는 성장에서의 59% 감소를 초래하였고 (대조군에 대해  $p = 0.015$ ), 130M23 및 켘시타빈으로의 처리는 성장에서의 58% 감소를 초래하였다 (대조군에 대해  $p = 0.016$ ). 따라서, 항-RSP01 항체 89M5 및 항-RSP02 항체 130M23은 체장 이종이식 모델에서 켘시타빈과 조합되어 강한 항-종양 성장 활성을 입증하였다.

실시예 18

Wnt 경로 억제제와 조합된 항-RSP0 항체에 의한 생체 내에서의 체장 종양 성장의 억제

[0364] 해리된 PN7 체장 종양 세포 ( $1 \times 10^5$  개의 세포)를 6-8주령 NOD/SCID 마우스의 옆구리 내로 피하 주사하였다. 130  $\text{mm}^3$ 의 평균 부피에 도달할 때까지 종양을 25일 동안 성장시켰다. 마우스를 무작위화하고 (n = 군 당 10마리), 항-RSP02 항체 130M23, 항-FZD 항체 18R5, 켘시타빈, 130M23과 켘시타빈의 조합물, 18R5와 켘시타빈의 조합물, 130M23과 18R5의 조합물, 130M23과 18R5와 켘시타빈의 조합물, 또는 대조군 항체 1B7.11로 처리하였다. 항-RSP02 항체 130M23은 1주일에 1번 10 mg/kg로 투여하였고, 항-FZD 항체 18R5는 1주일에 1번 20 mg/kg로 투여하였으며, 켘시타빈은 1주일에 1번 30  $\text{mg}/\text{mL}$ 로 투여하였다. 복강 내로의 주사를 통해 항체 및 켘시타빈

투여를 수행하였다. 종양 성장을 모니터링하였고, 지시된 시점에 전자 캘리퍼스로 종양 부피를 측정하였다. 데이터는 평균 ± S.E.M으로 표현된다. 병행 실험 세트는 켐시타빈과 조합된 FZD8-Fc 가용성 수용체 (10 mg/kg) 및 130M23 및 켐시타빈과 조합된 FZD8-Fc로 처리된 마우스를 포함하였다.

[0365] 단일 작용제로서의 항체 130M23 또는 항체 18R5로의 처리는 대조군 항체로의 처리와 비교하여 종양 성장에서의 약 55% 감소를 초래하였다 (도 16a, p < 0.001). 켐시타빈과 조합된 130M23 또는 18R5로의 처리는 어느 한쪽 작용제 단독으로의 처리보다 더 큰 종양 성장 감소를 초래하였다. 130M23 및 켐시타빈으로의 처리는 성장에서의 68% 감소를 초래하였고 (대조군에 대해 p < 0.001), 18R5 및 켐시타빈으로의 처리는 성장에서의 75% 감소를 초래하였다 (대조군에 대해 p < 0.001). 또한, 130M23과 켐시타빈과 18R5의 조합물은 PN7 종양의 거의 완전한 성장 억제를 초래하였다 (도 16a). 130M23과 켐시타빈과 FZD8-Fc 가용성 수용체의 조합으로 유사한 결과가 나타났다 (도 16b). 따라서, 130M23와 같은 항-RSP02 항체는 췌장 종양 성장을 억제하는 것에서 단일 작용제 활성이 있다. 또한, 항-RSP02 항체와 켐시타빈의 조합, 또는 항-RSP02 항체와 켐시타빈 및 Wnt 경로 억제제 예컨대 항-FZD 항체 18R5 또는 FZD8-Fc 가용성 수용체의 조합이 췌장 종양 모델에서 종양 성장을 억제하기 위한 매우 효과적인 요법인 것으로 나타났다.

[0366] IHC 연구는 항-RSP02 항체 130M23이 미처리 마우스와 비교하여 처리 마우스의 PN7 종양에서의 형태학적 변화를 유도하였음을 나타냈다. 이러한 세포들은 항-Ki67 항체를 사용한 증식에서의 유의한 감소를 또한 나타냈다. 이러한 결과들은 가능하게는 종양 세포의 상실 및 간질의 증가를 반영한다.

[0367] 상기 기술된 PN7 종양을 단일 세포 혼탁액이 산출되도록 프로세싱하였다. 비오틴화 항-H2Kd 및 항-CD45 항체 및 스트렙타비딘-접합 자기 비드를 사용하여 마우스 세포를 세포 혼합물로부터 고갈시켰다. 나머지 인간 종양 세포를 연속적으로 새로운 마우스 코호트 내로 이식하였다. 각각의 처리 군으로부터의 90개의 종양 세포를 NOD-SCID 마우스의 옆구리 내로 주사하였다 (n = 군 당 10마리의 마우스). 처리 없이 종양을 40일 동안 성장시켰고, 전기 캘리퍼스로 종양 부피를 측정하였다.

[0368] 도 16c는 각각의 군의 개별적인 마우스로부터의 종양 부피를 나타낸다. 단일 작용제로서의 항-RSP02 항체 130M23 또는 항-FZD 항체 18R5 또는 조합된 이러한 항체들로 처리된 마우스로부터 단리된 세포는 대조군 항체로 처리된 마우스로부터 단리된 세포와 비교하여 종양발생성이 크게 감소되었다. 이러한 감소된 종양발생성은 켐시타빈 단독으로 관찰된 종양발생성 감소보다 훨씬 더 커졌다. 켐시타빈과 130M23, 켐시타빈과 18R5, 또는 켐시타빈과 FZD8-Fc의 조합물로 처리된 마우스로부터의 세포는 대조군 항체로 처리된 마우스로부터 단리된 세포와 비교하여 약간만 감소된 종양발생성을 나타냈다. 흥미롭게도, 130M23과 18R5와 켐시타빈 또는 130M23과 FZD8-Fc와 켐시타빈의 조합물로 처리된 마우스로부터 단리된 세포가 임의의 작용제 단독 또는 2개의 작용제 조합보다 큰, 유의하고 현저한 종양 성장 결여를 입증하였다. 이러한 결과는 표준 화학요법에 더하여 다중 경로를 억제하는 것이 종양발생성 및 암 줄기 세포를 감소시키는 것에서 부가적인, 가능하게는 상승작용성인 효과를 지닌다는 것을 나타냈다.

[0369] 실시예 19

[0370] RSP0 항체의 인간화

[0371] 인간 RSP01 및 RSP02에 대한 인간화 항체가 생성되었다. 본질적으로 문헌 [Lerrick, J.M., et al., 1989, Biochem. Biophys. Res. Comm. 160: 1250] 및 [Jones, S.T. & Bendig, M.M., 1991, Bio/Technology 9: 88]에 기술된 바와 같이, 동의성 PCR을 사용하여 하이브리도마 세포주로부터 뮤린 모노클로날 항체 89M5 및 130M23의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 단리하고 서열분석하였다. 그 후, 신규 합성 프레임워크의 디자인을 안내하는 것을 돋도록, 모 89M5 또는 130M23 항체 아미노산 서열과 구조적으로 유사할 것 같은 인간 중쇄 및 경쇄 가변 프레임워크 영역을 기준 인간 프레임워크 영역으로서 고려하였다. 뮤린 프레임워크와 유사한 인간 프레임워크 영역을 확인하기 위해, 진뱅크(Genbank)에 기탁된 인간 서열에 대한 BLAST 검색을 사용하여 89M5 및 130M23의 뮤린 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 의해 코딩되는 예상 단백질 서열을 발현된 인간 cDNA에 의해 코딩되는 인간 항체 서열과 비교하였다. 후보 인간화 프레임워크 중쇄와 모 뮤린 모노클로날 항체 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역 간의 아미노산 차이를 가능한 중요성에 대해 평가하였고, 위치에서의 각각의 차이가 가변 영역의 정확한 폴딩 및 기능에 기여하는지 여부에 관하여 판단하였다. 다른 항체 단편의 해석된 결정 구조 (예를 들어, 문헌 [Trakhanov et al, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1999, 55:122-28]에 기술된 바와 같은 Fab 2E8의 구조, 뿐만 아니라 기타 단백질 결정 구조 (예를 들어, 단백질 데이터뱅크 구조 1ADQ 및 1GIG))의 조사가 이러한 분석의 지표가 되었다. Jmol, 퀵(quick) PDB3 및 Pymol이 포함되는 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 구조를 모델링하였다. β-시트 프레임워크의 패킹(packing), 중쇄 가변 도메인과 경쇄 가변 도메인 간의 상

호작용, 아미노산 측쇄의 용매 노출 정도, 및 아미노산이 CDR 루프의 위치결정에 영향을 미칠 가능성에 대한 소정의 위치에서의 아미노산의 잠재적인 영향이 고려되었다. 이러한 분석으로부터, 인간 IgG2 불변 영역에 인-프레임으로 융합된 후보 중쇄 가변 영역 및 인간 IgKC1 불변 영역에 인-프레임으로 융합된 후보 경쇄 가변 영역이 그려졌고, 화학적으로 합성되었다. 후보 중쇄 및 경쇄는 i) 천연 인간 프레임워크와 유사하도록 디자인된 합성 프레임워크 및 ii) 모 89M5 또는 130M23 뮤린 항체 CDR을 포함한다.

[0372] 각각의 후보 변이체 인간화 중쇄 및 경쇄의 기능성을 포유동물 세포 내로의 공동형질감염에 의해 테스트하였다. 상기 기술된 각각의 후보 인간화 중쇄를 뮤린 경쇄 cDNA와 함께 HEK-293 세포 내로 공동형질감염시키고, 컨디셔닝 배지를 FACS에 의해 RSPO 결합 활성에 대해 검정하였다. 인간화 89M5 중쇄 변이체 "89M5-H2" (서열 68)가 가장 강건한 결합을 나타냈고, 이를 선택하였다. 89M5-H2 인간화 중쇄를 각각의 후보 인간화 경쇄와 함께 HEK-293 세포 내로 공동형질감염시켰고, 컨디셔닝 배지를 다시 FACS에 의해 항원 결합에 대해 검정하였다. 경쇄 변이체 "89M5-L2" (서열 69)가 가장 강건한 결합을 나타냈고, 이를 선택하였다. 유사하게, 인간화 130M23 중쇄 변이체 "130M23-H1" (서열 70)이 가장 강건한 결합을 나타냈고, 이를 선택하였다. 130M23-H1 인간화 중쇄를 각각의 후보 인간화 경쇄와 함께 HEK-293 세포 내로 공동형질감염시켰고, 컨디셔닝 배지를 다시 FACS에 의해 항원 결합에 대해 검정하였다. 경쇄 변이체 "130M23-L2" (서열 71)가 가장 강건한 결합을 나타냈고, 이를 선택하였다.

[0373] 항체 생산을 증가시키기 위해, 130M23-H1L2의 변이체를 생성시켰다. 이러한 변이체는 130M23-H1L2와 동일한 중쇄를 포함하지만, 경쇄가 변형되었고, h130M23-H1L6로 지칭된다.

[0374] 실시예 20

[0375] 인간화 89M5 및 인간화 130M23의 결합 친화력

[0376] h89M5-H2L2의  $K_D$ 를 비아코어 라이프사이언시스 (GE 헬스케어)로부터의 비아코어 2000 시스템을 사용하여 결정하였다. 재조합 인간 RSPO1-Fc 또는 마우스 RSPO1-Fc 단백질을 표준 아민-기반 화학 (NHS/EDC)을 사용하여 CM5 칩 상에 고정시켰다. 항체를 HBS-P (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% v/v 계면활성제 P20)에서 100 nM → 0.78 nM로 2배 단계 희석하고, 칩 표면에 주입하였다. 동역학 데이터를 경시적으로 수집하였고, 각각의 항체에 대한 친화력 상수 ( $K_D$  값)가 산출되도록 동시성 글로벌 피트 식을 사용하여 데이터를 피팅하였다.

[0377] h89M5-H2L2는 인간 RSPO1 및 마우스 RSPO1에 대한 친화력 상수 ( $K_D$ )가 0.1 nM 미만이었다.

[0378] h130M23-H1L2 및 h130M23-H1L6의  $K_D$ 를 비아코어 라이프사이언시스 (GE 헬스케어)로부터의 비아코어 2000 시스템을 사용하여 결정하였다. 재조합 인간 RSPO2-Fc 단백질을 표준 아민-기반 화학 (NHS/EDC)을 사용하여 CM5 칩 상에 고정시켰다. 항체를 HBS-P (0.01 M HEPES pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.005% v/v 계면활성제 P20)에서 100 nM → 0.78 nM로 2배 단계 희석하고, 칩 표면에 주입하였다. 동역학 데이터를 경시적으로 수집하였고, 각각의 항체에 대한 친화력 상수 ( $K_D$  값)가 산출되도록 동시성 글로벌 피트 식을 사용하여 데이터를 피팅하였다.

[0379] h130M23-H1L2는 인간 RSPO2에 대한 친화력 상수 ( $K_D$ )가 0.13 nM이었고, h130M23-H1L6는 인간 RSPO2에 대한 친화력 상수 ( $K_D$ )가 0.15 nM이었다.

[0380] 실시예 21

[0381] 항-RSPO 항체의 FACS 결합

[0382] HEK-293 세포를 FLAG-RSPO1푸린-CD4TM-GFP를 코딩하는 발현 벡터로 일시적으로 형질감염시켰다. 실시예 5에 기술된 바와 같이, FLAG-RSPO1푸린-CD4TM-GFP는 인간 RSPO1의 N-말단 푸린-유사 도메인의 세포 표면 발현을 가능하게 하는 키메라 융합 단백질이다. FLAG-RSPO1푸린-CD4TM-GFP로 형질감염된 세포를 항-RSPO1 항체 89M5 또는 인간화 항-RSPO1 항체 h89M5-H2L2의 존재 하에 인큐베이션하였다. 각각의 항체의 5배 단계 희석물을 RSPO1 발현 세포에 결합하는 이의 능력에 대해 시험하였다. 세포를 피코에리트린(Phycoerythrin)이 접합된 항-IgG로 염색하여, 결합된 항체를 드러냈다. 세포를 팩스캘리버 기구 (BD 바이오사이언시스, 켈리포니아주 산 호세) 상에서 분석하였고, 플로우조 소프트웨어를 사용하여 데이터를 프로세싱하였다.

[0383] 도 17a에 제시된 바와 같이, 이러한 연구는 항-RSPO1 항체 89M5 및 인간화 항-RSPO1 항체 h89M5-H2L2 양쪽 모두가 인간 RSPO1에 결합한다는 것을 가리킨다.

- [0384] HEK-293 세포를 FLAG-RSP02푸린-CD4TM-GFP를 코딩하는 발현 벡터로 일시적으로 형질감염시켰다. 실시예 11에 기술된 바와 같이, FLAG-RSP02푸린-CD4TM-GFP는 인간 RSP02의 N-말단 푸린-유사 도메인의 세포 표면 발현을 가능하게 하는 키메라 융합 단백질이다. FLAG-RSP02푸린-CD4TM-GFP로 형질감염된 세포를 항-RSP02 항체 130M23 또는 인간화 항-RSP02 항체 h130M5-H1L2의 존재 하에 인큐베이션하였다. 각각의 항체의 5배 단계 희석물을 RSP02 발현 세포에 결합하는 이의 능력에 대해 시험하였다. 세포를 피코에리트린이 접합된 항-IgG로 염색하여, 결합된 항체를 드러냈다. 세포를 팩스캘리버 기구 (BD 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산 호세) 상에서 분석하였고, 플로우조 소프트웨어를 사용하여 데이터를 프로세싱하였다.
- [0385] 도 17b에 제시된 바와 같이, 이러한 연구는 항-RSP02 항체 130M23 및 인간화 항-RSP02 항체 h130M23-H1L2 양쪽 모두가 인간 RSP02에 결합한다는 것을 가리킨다.
- [0386] 실시예 22
- [0387] 화학요법제와 조합된 항-RSP0 항체에 의한 생체 내에서의 유방 종양 성장의 억제
- [0388] 해리된 OMP-B39 유방 종양 세포 ( $4 \times 10^5$  개의 세포)를 6-8주령 NOD/SCID 마우스의 옆구리 내로 피하 주사하였다. OMP-039는 RSP02 발현 수준이 높은 삼중 음성 유방암 종양이다. 또한, RSP01 수준이 실시예 1에서 특성화된 다른 유방 종양보다 높다 (표 2 참조). 120  $\mu\text{m}^3$ 의 평균 부피에 도달할 때까지 종양을 39일 동안 성장시켰다. 마우스를 무작위화하고 ( $n =$  군 당 10마리), 항-RSP01 항체 89M5 및 항-RSP02 항체 130M23, 시스플라틴, 항-RSP01 및 RSP02 항체와 시스플라틴의 조합물, 또는 대조군 항체로 처리하였다. 항체는 1주일에 1번 15 mg/kg로 투여하였고, 시스플라틴은 1주일에 2번 1.5 mg/kg으로 투여하였다. 복강 내로의 주사를 통해 항체 및 시스플라틴 투여를 수행하였다. 종양 성장을 모니터링하였고, 지시된 날에 전자 캘리퍼스로 종양 부피를 측정하였다. 데이터는 평균  $\pm$  S.E.M으로 표현된다.
- [0389] 도 18에 제시된 바와 같이, 항-RSP01항체 89M5 및 항-RSP02 항체 130M23와 시스플라틴의 조합물이 시스플라틴 단독보다 양호하게 종양 성장을 억제하였다 ( $p = 0.04$ , 조합물 군 대 시스플라틴 단독). 시스플라틴이 없는 항체 89M5와 130M23의 조합물은 이러한 종양에 대한 최소의 효과만 있었다는 사실에도 불구하고, 이러한 삼중 조합물은 유의한 효과가 있었다.
- [0390] 본원에 기술된 실시예 및 실시양태는 오직 설명 목적을 위한 것이고, 이의 견지에서 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 제안될 것이며 이러한 변형 또는 변화가 본 출원의 취지 및 범주 내에 또한 포함되어야 하는 것으로 이해된다.
- [0391] 본원에서 인용된 모든 간행물, 특히, 특히 출원, 인터넷 사이트, 및 접속 번호/데이터베이스 서열 (폴리뉴클레오티드 및 폴리펩ти드 서열 양쪽 모두 포함)은 각각의 개별적인 간행물, 특히, 특히 출원, 인터넷 사이트, 또는 접속 번호/데이터베이스 서열이 이렇게 참고로 포함되는 것으로 구체적으로, 그리고 개별적으로 지시된 것과 동일한 정도로 이에 의해 모든 목적을 위해 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0392]

서열

## 신호 서열이 있는 인간 RSPO1 단백질 서열 (서열 1)

```
MRLGLCVVALVLSWTHLTISRGIGKGRQRRI SAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKL
FILLERNDIRQVGVLCPSCPPGYFDARNPDMMNKCIKCKIEHCEACFSHNFCRKCGEGLYL
HKGRCPACPEGSSAANGTMECSSPAQCEMSEWSPWGPCSQQQLCGFRRGSEERTRRVL
HAPVGDHAACSDTKETRRCTVRRVPCPEGQKRRKGQGRRENANRNLARKESKEAGAGSR
RRKGQQQQQQQGTVGPLTSAGA
```

## 신호 서열이 있는 인간 RSPO2 단백질 서열 (서열 2)

```
MQFRLFSFALIILNCDYSHCQGNWRRSKRASYVSNPICKGCLSCSKDNGCSRQQKLF
FFLREGMRQYGECLHSCPSGGYYGHRAPDMNRARCRRIENCDSCFSKDFCTKCKVGFYLN
RGRCFDECPDGFAPLEETMECVEGCEVGHWEWGTCSRNNRTCGFKWGLETRTRQIVKDP
VKDTIPCPTIAESRRCKMTMRHCPGGKRTPKAKEKRNKKKRKLIERAQEQHSVFLATDR
ANQ
```

## 신호 서열이 있는 인간 RSPO3 단백질 서열 (서열 3)

```
MHLRLISWLFIILNFMEYIGSQNASGRRRQRRMHNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCKPR
LFFALERIGMKQIGVCLSSCPGYYGTRYPDINKCTKCKACDTCFNKFCTKCKSGFYLN
HLGKCLDNCPGLEANNHTMECVSIVHCEVSEWNFWSPCTKKGKTCGFKRGTETRVREII
QHPSAKGNLCPPTNETRKCTVQRKKCQKGERGKKGRERRKPKNGESKEAIPDSKSLES
SKEIPEQRENKQQQKKRKVQDKQKSVSVSTH
```

## 신호 서열이 있는 인간 RSPO4 단백질 서열 (서열 4)

```
MRAPLCLLLVAHAVDMIALNRRKKQVGTGLGNCTGCIICSEENGCTCQQLFLFIRR
EGIRQYGKCLHDCPPGYFGIRGQEVRNCKKGATCESCFSDFCIRCKRQFYLYKGKCLP
TCPGTLAHQNTRRECQGECELGPGWGGWPCTHNGKTCGSAWGLSRRVREAAGRAGHEEAAT
CQVLSESRKCPIQRCPGERSPGQKKGRKDRLRPRKDRLDRRLDVRPRQPLQP
```

## 예상 신호 서열이 없는 인간 RSPO1 단백질 서열 (서열 5)

```
SRGIKGKRQRRI SAEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKL FILLERNDIRQVGVLCPSCP
PGYFDARNPDMMNKCIKCKIEHCEACFSHNFCRKCGEGLYLHKGRCPACPEGSSAANGT
ECSSPAQCEMSEWSPWGPCSQQQLCGFRRGSEERTRRVLHAPVGDHAACSDTKETRRCT
VRRVPCPEGQKRRKGQGRRENANRNLARKESKEAGAGSRKGQQQQQQGTVGPLTSAGA
GPA
```

## 인간 RSPO1 푸린-유사 도메인 1 (서열 6)

AEGSQACAKGCELCSEVNGCLKCSPKL FILLERNDIRQVGVLCPSCPPGYFD

## 인간 RSPO1 푸린-유사 도메인 2 (서열 7)

MNKCIKCKIEHCEACFSHNFCRKCGEGLYLHKGRCPACPEGSSA

## 인간 RSPO1 트립보스존도 도메인 (서열 8)

QCEMSEWSPWGPCSQQQLCGFRRGSEERTRRVLHAPVGDHAACSDTKETRRCTVRRVPCP

## 인간 RSPO1 아미노산 31-263 (서열 9)

[0393]

RISAEGSQACAKGCELCEVNGCLKCSPKLFILLERNDIRQVGVLPCPPGYFDARNPD  
MNKCICKIEHCEACFSHNFCCKEGGLYLNKGRCYPACPEGSSAANGTMECSSPAQCEM  
SEWSPWGPGCSKKQQQLCGFRRGSEERTRRVLHAPVGDHAAACSDTKETRRCTVRRVPCPEGQ  
KRRKGQGRRENANRNLRALKESKEAGAGSRRRKGQQQQQQQGTVGPLTSAGPA

**89M5 중쇄 가변 영역 (서열 10)**

EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYFTGTYTMHWVRQSHGKTLEWIGGINPNNGGTY  
NQNFKGKATLTVEKSSTTAYLRLSLTSEDSALYYCARKEFSDGYYFFAYWGQGTLTVSA

**89M5 경쇄 가변 영역 (서열 11)**

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVIFAVAWYQQKPGQSPKLIIYWASTRHTGVPD  
RFTGSVSGTDYTLTISSVQAEDLALYYCQOHYSTPWTGGGTKEIK

**89M5 중쇄 CDR1 (서열 12)**  
TGYTMH**89M5 중쇄 CDR2 (서열 13)**  
GINPNNGGTTYNQNFKG**89M5 중쇄 CDR3 (서열 14)**  
KEFSDGYYFFAY**89M5 경쇄 CDR1 (서열 15)**  
KASQDVIFAVA**89M5 경쇄 CDR2 (서열 16)**  
WASTRHT**89M5 경쇄 CDR3 (서열 17)**  
QQHYSTPW**FLAG 태그 (서열 18)**  
DYKDDDDK

**89M5 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (서열 19)**  
GAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGCTTCAGTGAAGATA  
TCCGTCAAGACTCTGGATCACATTCACTGGATAACACCATGCACTGGTGGAGGCAGAGC  
CATGGAAAGACCCCTGAGTGGAGGTATTAATCCTAACAAATGGTGGTACTACTTAC  
AACAGAAACTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGAGAAGTCCTCCACACAGCCTAC  
TTGGAGCTCCGCAGCCTGACACTTGAGGATTCTGCACCTATTAATCTGTGCAAGAAAGGAG  
TTCTCTGATGGTTACTACTTTTGCTTACTGGGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCT  
GCA

**89M5 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (서열 20)**

GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCACTGTCCACATCAGTGGAGACAGGGTCAAC  
ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGATTTTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCA  
GGACAATCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGACAGATTATACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCT  
CGCTTCACAGGCAGTGTATCTGGACAGATTATACTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCT  
GAAGACCTGGCACTTATTACTGTCAGCAACATTATAGCACTCCGTGGACGTTGGTGG  
GGCACCAAGCTGAAATCAA

## 예상 신호 서열에 밀줄이 그어진 89M5 중쇄 아미노산 서열 (서열 21)

MGWSWIFLFLLSGTAGVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYFTGTYTMHWVRQSH

[0394]

GKTLIEWIGGINPNNGGTTYNQNFKGATLTVEKSSTTAYLELRSLSLSEDSLALYYCARKEF  
SDGYYFFAYWGQGTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMSMVTLGCLVKGYFPEPVVT  
WNSGSSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLLSSSVPSSWPSETVICNVVAHPASSTKVDKKIVPR  
DCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPPKDVLTTILTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVE  
VHTAQTPREEQFNSTRSVSELIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTGRP  
KAPQVYIIPPPKEQMAKDVKSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGS  
YFVYSKLNQKSNSWEAGNTFTCSVHLHEGLHNHHTEKSLSHSPKG

예상 신호 서열에 밀줄이 그어진 89M5 경쇄 아미노산 서열 (서열 22)  
MGFKMESQIQAFVFVFLWSGVLDIVMTQSHKFMSSTVGRVNITCKASQDVI FAVAWY  
QQKPGQSPKLIIYWA STRHGTGV PDRFTGSVSGTDYTLTISSVQAEDIALYYCQHYSTPW  
T FGGGT KLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKWIDGSERQ  
NGV LNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLKDEYERHNSYTCEATHKTSTPIVKS FNRNEC

#### 89M5 중쇄 뉴클레오티드 서열 (서열 23)

ATGGGATGGAGCTGGATCTTCTCTTGTCAGGAACACTGCAGGTGTCCTCTGAG  
GTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCC  
TGCAAGACTCTGGATACACATTCACTGGATAACACCAGTCACTGGGTGAGGCAGAGCCAT  
GGAAAGACCTGGTGGATTGGAGGTATTAACTCTAACATGGTGGTACTACTAACAC  
CAGAACTTCAGGCCAAGGCCACATTGACTGTAGAGAAAGTCTCCACACAGCCTACTTG  
GAGCTCCGAGCCTGAGCATCTGAGGATTCTGCACTTACTGTGAAGAAAGGAGTTC  
TCTGATGCTTACTACTTTTGCTTACTGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTCA  
GCCAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAAC  
TCCATGGTACCCCTGGGATGCTGCAAGGGCTATTCCTGAGCCAGTGACAGTGACC  
TGGAACTCTGGATCTGGTCAAGGCCAGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACC  
CTCTACACTCTGAGCAGCAGTCACTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTC  
ACCTGCAACGTTGCCACCCGCCAGCAGCACCAAGGTGACAAGAAAATGTGCCAGG  
GATGTGGTTGAAGCTTGCAATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGCTTCACTTC  
CCCCCAAAGCCAAGGATGTGCTCACCATTACTGTACTCTAAGGTACGTGTGTTGTG  
GTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCACTGAGCTGGTTGTAGATGATGAG  
GTGCACACAGCTCAGACGCCAACCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTC  
AGTGAACCTCCCATCATGCACCAAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAATGCAAGGTC  
AACAGTGCAGCTTCCCTGCCACATCGAGAAAACCATCTCAAAACCAAAGGCAGACCG  
AAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCAAAGGAGCAGATGGCAAGGATAAGTC  
AGTCTGACCTGCAATGATAACAGACTCTCCCTGAAGACATTACTGTGAGTGGCAGTGG  
AATGGGCAGCCAGGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCT  
TACCTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAAGAGCAACTGGGAGGAGGAAATACTTC  
ACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCTGCACAACCACCATACTGAGAAGGCCTCTCCAC  
TCTCTGGTAAATGATAA

#### 89M5 경쇄 뉴클레오티드 서열 (서열 24)

ATGGGCTTCAGATGGAGTCACAGATTCAAGCATTGATGACCCAGTCACAAATTCATGTCCACATCAGTGG  
GGTGTGACGGAGACATTGTGATGACCCAGTCACAAATTCATGTCCACATCAGTGG  
GACAGGGTCAACATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGATTTGCTGTAGCCTGGTAT  
CAACAGAAACAGGACAATCTCCTAAACTACTGATTACTGGCATCCACCCGGCACACT  
GGAGTCCCTGATCGCTTCAGGGCAGTGATCTGGGACAGATTATACTCTCACCACAGC  
AGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCACTTATTACTGTCAAGCAACATTATAGCACTCCGG  
ACGTTCGGTGAGGGCCAAGCTGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCAACCAACTGTATCC  
ATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCTCAGTCGTGCTTCTG  
AACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAGATTGATGGCAGTGAAAGCAA  
AATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGC  
AGCACCCCTCACGTTGACCAAGGAGCAGTATGAACGACATAACAGCTACCTGTGAGGCC  
ACTCACAAGACATCAACTCACCAATTGTCAAGAGCTCAACAGGAATGAGTGTAGTGA

**예상 신호 서열이 없는 89M5 중쇄 아미노산 서열 (서열 25)**  
EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFGTGYTMHWVRQSHGKTLEWIGGINPNNGGTTYNQNFKGKATLTVEKSSTTAYLERLSLTSEDSALYYCARKEFSDGYYFFAYWGQGTLVTS  
SAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMVTLGCLVKGYFPEPVTVWNSSGLSSGVHTFPAVLQS  
DLYTLSSSVTPSSTWPSETVCNVAPHASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI  
FPPKPKDVLTTLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPREEQFNSTFRS  
VSELPIHMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD  
VSLTCMITDFFPEDITVEQWQWNGQPAENYKNTQPIMTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNT  
FTCSVHLHEGLHNHHTEKSLSHSPCK

**예상 신호 서열이 없는 89M5 경쇄 아미노산 서열 (서열 26)**  
DIVMTQSHKFMSTSVDGRVNITCKASQDVIFAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPD  
RFTGSVSGTDYTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPP  
SSEQQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT  
LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTPIVKSFNRNEC

**130M23 중쇄 가변 영역 (서열 27)**  
EVKLVESGGLVKPGSSLKFSCAASGFSFSSYAMSWVRQTPKLEWVASISSGGSTYYP  
DSVKGRFTISRDNRNILYLQMSSLRSEDTAMYFCARGGDPGVYNGDYEDAMDYWGQGTS  
VTVSS

**130M23 경쇄 가변 영역 (서열 28)**  
DIVMTQSHKFMSTSVDGRVSITCKASQDVSSAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPD  
RFTNSGSGTDYTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK

**130M23 중쇄 CDR1 (서열 29)**  
SSYAMS

**130M23 중쇄 CDR2 (서열 30)**  
SISGGSTYYPDSVKG

**130M23 중쇄 CDR3 (서열 31)**  
RGGDGPVGVYNGDYEDAMDY

**130M23 경쇄 CDR1 (서열 32)**  
KASQDVSSAVA

**130M23 경쇄 CDR2 (서열 33)**  
WASTRHT

**130M23 경쇄 CDR3 (서열 34)**  
QQHYSTP

**130M23 중쇄 가변 뉴클레오티드 서열 (서열 35)**  
GAAGTGAAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAATT  
TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCAAGTTCACTAGTTATGCCATGTCTGGGGTCGCCAGACT  
CCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGTCGCATCCATTAGTAGTGGTGGTAGTACCTACTATCCA  
GACAGTGAAAGGGCCATTACCATCTCCAGAGATAATGTCAGGAACATCCTGTACCTG  
CAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGCCATGTATTCTGTGCACGAGGCAGGGAT  
CCGGGGGTCTACAATGGTACTACGAAGATGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCA  
GTCACCGTCTCCTCA

**130M23 경쇄 가변 뉴클레오티드 서열 (서열 36)**

[0396]

GACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCAATGTCACATCAGTCGGAGACAGGGTCAGC  
ATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTTCTGCTGTAGCCTGGTATCAACAAAAACCA  
GGGCAATCTCTAAACTACTGATTTACTGGCATCCACCCGGCACACTGGAGTCCCTGAT  
CGCTTCACAAACAGTGGATCTGGGACAGATTATACTCTCACCATCAGTAGTGTGCAGGCT  
GAAGACCTGGCAGCTTATTACTGTCAGCAACATTATAGCACTCCGTGGACGTTGGTGG  
GGCACCAAGCTGGAAATCAA

**예상 신호 서열에 밀줄이 그어진 130M23 중쇄 아미노산 서열 (서열 37)**  
**MNFGLRLVFLVLKGVQCEVKLVESGGLVKGPGSLKFSCAASGFSFSYAMSWVRQTP**  
**EKRELEWVASTISSGGSTYYPDPSVKGRTFISRDNVRNILYLOMSSLRSEDTAMYFCARGGD**  
**GYVNGDYEDAMDYWGQGTSVVSASKTTPSVPPIAPGSAAQTNMVTLGCLVKGYFPEP**  
**VTVTWNNSGLSSGVHVFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKK**  
**IVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFFFPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFV**  
**DDVEVHTAQQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIKST**  
**KGRPKAPQVYTIFFFFKEQMAKDKVSLTCMIDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPMID**  
**TDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPKG**

**예상 신호 서열에 밀줄이 그어진 130M23 경쇄 아미노산 서열 (서열 38)**  
**MGIKMESQIQAFVVFVFLWLSGVVGDIVMTQSHKFMSTSVDGRVSITCKASQDVSSAVAWY**  
**QQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDFNTSGSGTDTLTISSSVQAEDLALYYCQQHYSTPW**  
**TFGGGTKEIKRADAAPTWSIFFPSSEQLTSGGASVCFLNNFYPKDINVWKIDGSERQ**  
**NGVLSWTDQDSKDYSTMSSLTTLTKEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFRNREC**

**130M23 중쇄 뉴클레오티드 서열 (서열 39)**  
**ATGAACCTCGGGCTGAGATTGGTTTCTTCCTGCTCTGTTAAAAGGTGTCAGTGTGAA**  
**GTGAAGCCTGGAGCTGGGCTCATCCATTAGTAGTGTTGAGTACCTACTATCCAGAC**  
**TGTGACGCTCTGGATTCAAGTTCAGTTCTAGTAGTATGCACTGCTTGGGTTGCCAGACTCCA**  
**GAGAAGAGGCTGGAGCTGGGCTCATCCATTAGTAGTGTTGAGTACCTACTATCCAGAC**  
**AGTGTGAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGATAATGTCAGGAACATCCGTACCTGCAA**  
**ATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCATGTTCTGAGTACCTGGGATCCAGTC**  
**GGGGCTACAATGGTACTACAAGATGCTATGGACTACTGGGTCAGGAAACCTCAGTC**  
**ACCGCTCCTCAGGAAACAGACCCCCATCTGTCTATCCACTGCCCCCTGGATCTGCT**  
**GCCCAAACTACTCCATGGTACCCCTGGGATGCCGTCAAGGCTATTCCCTGAGCCA**  
**GTGACAGTGAACCTGAACTCTGGATCCCTGCCAGCGGTGTCACACCTTCCCAGCTGTC**  
**CTGCACTGACCTCTACACTCTGAGCAGTCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCC**  
**AGCGAGACCGTCACTGCAACGTTGCCACCCGGCAGCACGACCAAGGTGACAAGAAA**  
**ATTGTCGCCCAGGGATTGTTGTTGAAGCCTTGCATATGCACTGAGTCCCAGAACATCATCT**  
**GTCTTCATCTCCCCCAAAGGCTTCAAGGATGTGCTACCATTACTCTGACTCTAAAGGT**  
**ACGTGTTGAGGTCACACAGCTCAGACGCAACCCGGGAGGAGCAGTCAACAGCACT**  
**TTCCGCTCAGTCACTGAACTTCCATCATGCAACCGAGACTGGCTAATGGCAAGGAGTTC**  
**AAATGCGAGGGTCAACAGTCAGCTTCCCTGCCACATCGAGAAAACCATCTCCAAAACC**  
**AAAGGCAGACCGAAGGCTTCAAGGTTGACCATCCTCCACCTCCAAAGGAGCAGATGGCC**  
**AAGGATAAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTCCCTGAAGACATTACTGTG**  
**GAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGCGAGCAGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCATGGAC**  
**ACAGATGGCTTACTTCGTCACAGCAAGCTCAATGTGCAAGAAGGCAACTGGGAGGCA**  
**GGAAATACTTCACCTGCTCTGTTACATGAGGGCTGCACAACCACCATACTGAGAAG**  
**AGCCTCTCCACTCTCTGGTAAATGA**

**130M23 경쇄 뉴클레오티드 서열 (서열 40)**  
**ATGGGCATCAAGATGGAGTCACAGATTCAAGGCTTGTATTGTTCTCTGGTTGTCT**  
**GGTGTTGACGGAGACATTGTGATGACCCAGTCTCACAAATTCAATGTCACATCAGTCGG**  
**GACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGAGTTCTGCTGTAGCCTGGTAT**  
**CAACAAAAACCAGGGCAATCTCCTAAACTACTGATTTACTGGGATCCACCCGGCACACT**

GGAGTCCCTGATCGTTACAAACAGTGGATCTGGACAGATTATACTCTACCACATCAGT  
 AGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGACTTATTACTGTCAGCAACATTATAGCACTCCGTGG  
 ACGTTGGTGGAGGCCACCAAGCTGGAAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC  
 ATCTTCCCACCATCCAGTGACCAAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGCTTCTTG  
 AACAACTCTACCCAAAGACATCAATGTCAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAAACGACAA  
 AATGGCCTCTGAACAGTTGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGC  
 AGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACTGTGAGGCC  
 ACTCACAAGACATCAACTCACCCATTGCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTAG

## 예상 신호 서열이 없는 130M23 중쇄 아미노산 서열 (서열 41)

EVKLVESGGGLVKPGSLKFSCASGFSFSYAMSIVRQTPERKLEWVASISGGSTYYP  
 DSVKGRFTISRDNRNVLILQMSSLRSEDTAMYFCARGGDPGVYNGDYEDAMDYWGQGTS  
 VTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVWNSSGLSSGVHTFP  
 VLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSETVTCNVAHPPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVS  
 SVFIFPPPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPREEQFNS  
 TFRSVSELPIMHDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTIISKTKGRKAPQVYIIPPPKEQM  
 AKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMTDGSYFVYSKLNQKSNWE  
 AGNTFTCSVHLHEGLHNHTEKSLSHSPKG

## 예상 신호 서열이 없는 130M23 경쇄 아미노산 서열 (서열 42)

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSSAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPD  
 RFTNSGSGTDYTILTISSSVQAEDLALYYCQOHYSTPWTFGGGTKLEIKRADAAPTWSIFPP  
 SSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKWIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT  
 LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTPIVKSFNREC

## 예상 신호 서열이 없는 인간 RSPO2 단백질 서열 (서열 43)

QGNRWRRSKRASYVSNPICKGCLCSKDNGCSRQQKLFLLRREGMRQYGECLHSCP  
 YYGHRAFDMNRCARCIENCDSCFSKDFCTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFALEETMEC  
 VEGCEVGHWSEWGTCSRNNRTCGFKWGLETRTRQIVKKPVKDTIPCPPTIAESRRCKMTMR  
 HCPGGKRTPKAKEKRNKKKKRLIERAQEQHSVFLATDRANQ

## 인간 RSPO2 아미노산 22-205 (서열 44)

QGNRWRRSKRASYVSNPICKGCLCSKDNGCSRQQKLFLLRREGMRQYGECLHSCP  
 YYGHRAFDMNRCARCIENCDSCFSKDFCTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFALEETMEC  
 VEGCEVGHWSEWGTCSRNNRTCGFKWGLETRTRQIVKKPVKDTIPCPPTIAESRRCKMTMR  
 HCPG

## 인간 RSPO2 푸린-유사 도메인 1 (서열 45)

YVSNPICKGCLCSKDNGCSRQQKLFLLRREGMRQYGECLHSCP  
 GYYG

## 인간 RSPO2 푸린-유사 도메인 2 (서열 46)

MNRCARCIENCDSCFSKDFCTKCKVGFYLHRGRCFDECPDGFA

## 인간 RSPO2 트롬보스폰딘 도메인 (서열 47)

GCEVGHWSEWGTCRNNRTCGFKWGLETRTRQIVKKPVKDTIPCPPTIAESRRCKMTMRHCP

예상 신호 서열이 없는 인간 RSPO3 단백질 서열 (서열 48)

QNASRGRRQRRMHPNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCKPRLFFALERIGMKQIGVCLSSCP  
SGYYGTRYPDINKCKCADCDTCFNKNFCTKCKSGFYHLHGKCLDNCPEGLEANNHTME  
CVSIVHCEVSEWNPWSPCTKKGKTCGFKRGTETRVREIIQHPSAKGNLCPPTRKCTV  
QRKKCQKGERGKKGRERKRKKPNKGESKEAPDSKSLLESSKEIPEQRENKQQQKKRKVQD  
KQKSVSVSTVH

인간 RSPO3 푸린-유사 도메인 1 (서열 49)

PNVSQGCQGGCATCSDYNGCLSCKPRLFFALERIGMKQIGVCLSSCPGYYG

인간 RSPO3 푸린-유사 도메인 2 (서열 50)

INKCTKCKADCDTCFNKNFCTKCKSGFYHLHGKCLDNCPEGLEA

인간 RSPO3 트롬보스풀린 도메인 (서열 51)

HCEVSEWNPWSPCTKKGKTCGFKRGTETRVREIIQHPSAKGNLCPPTRKCTVQRKKCQ

**h89M5-H2L2 중쇄 뉴클레오티드 서열 (서열 52)**

ATGGACTGGACCTGGAGGATACTCTTCTCGTGGCAGCAGGCCACAGGAGCCCACCTCCAG  
GTCCAGCTCGTGAGCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCTCTGTGAAGGTTTCC  
TGCAGAACTTCTGGATACACCTTCACTGGATAACACCATGCACGGTTAGACAGGCC  
GGACAAAGGCTGGAGTGGATGGGAGGTATAATCCTAACATGGTGGTACTACTTACAAC  
CAGAACTTCAAGGGCAGAGTCACCATTACCAAGGGACACATCCGAAGCACACGCC  
GAGCTGTCAGCTGAGATCTGAAGACACAGCTGTGATTACTGTGCAAGAAAGGGAGTTC  
TCTGATGGATACTACTTTTGTACTGGGGCCAAGGGACCCCTGGTCACCGTCAGCTCA  
GCCAGCACAAAGGGCCCTAGCCTTCCCTGGCTCCCTGGCAAGGACTACTTCCC  
GAACAGCCGCCCTGGCTGGCTCAAGGACTACTTCCCAGCTGTCCTACAGTCC  
TGGAACTCAGGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTCCAGCTGTCCTACAGTCC  
GGACTCTACTCCCTCAGCAGCTGGTGAACGGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAG  
TACACCTGCAACCTGAGATCACAGCCCCAGCACACACCAAGGGAGACAGTTGAGCG  
AAATGTTGTCGAGTGCCTCACCGTGCCCCAGCACACCTGTGGCAGGACCGTCAGTCT  
CTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCGGACCCCTGAGGT  
CACGTGC  
GTGGTGGTGGACGTGAGGCCAGCAAGAACCCCGAGGTCCAGTCAACTGGTACGTGG  
ACGGC  
GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCACGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAC  
GTGGTCAAGCGCTCTCACCGTTGTCACAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC  
AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA  
AAGGG  
CAGGCCCGAGAACCCAGGTGTACACCCCTGCCCTACCCGGAGGAGATGACCAAGAAC  
CAGGTCAAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGGCTCTACCCAGCGACATGCC  
GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCCACCTCCCATGCTGGACTCC  
GGCTCCCTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGG  
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCGTGGAGGCTCTGC  
TCCCTGTCTCCGGTAAATGA

예상 신호 서열에 밀줄이 그어진 h89M5-H2L2 중쇄 아미노산 서열 (서열 53)

[0399]

MDWTWRILFLVAAATGAHSQVLVQSGAEVKPGASVKVSCKTSGYFTGYTMHWVRQAP  
 GQRLEWMGGINPNNGGTTYNQNFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARKEF  
 SDGYYFFAYWGQGTLLVTSSASTKGPSVPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
 WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVER  
 KCCVECPCCPAPPVAGPSVFLFPPPKDITLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDG  
 VEVHNNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCVSNKGLPAPIEKTISKTKG  
 QPREGQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLSD  
 GSFLYSLKLTVDKSRWQQGNFSCVMHEALHNHTQKSLSLSPGK

**h89M5-H2L2 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (서열 54)**

CAGGTCCAGCTCGTGCAGTCTGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGCTCTGTGAAGGTT  
 TCCATGCAAGACTCTCGATACACCTTCACTGGATACACCATGCACTGGGTTAGACAGGCC  
 CCCGGACAAGGCTGGAGTGGATGGAGGTTAACCTAACAAATGGTGGTACTACTTAC  
 AACAGAACTTCAAGGGCAGAGTCACCATTACCAAGGGACACATCCGAAGCACAGCCTAC  
 ATGGAGCTGTCAGCCTGAGATCTGAAGACACAGCTGTATTACTGTGCAAGAAAGGAG  
 TTCTCTGATGGATACTACTTTTGCTTACTGGGCAAGGGACCCTGGTCACCGTCAGC  
 TCA

**h89M5-H2L2 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 (서열 55)**

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKTSGYFTGYTMHWVRQAPGQRLEWMGGINPNNGGTT  
 NQNFKGRVTITRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARKEFSDGYYFFAYWGQGTLLTV  
 S

**h89M5-H2L2 경쇄 뉴클레오티드 서열 (서열 56)**

ATGGACATGAGGGTCCCCGACAGCTCCTGGGCTCCTGCTCCTCTGGCTCCGGGGTGCC  
 AGATGTGACATCCAGATGACCACTGGGCTCCTGCTGCTGCATCTGGAGACAGA  
 GTCACCATCACTGCAAGGCCCTCCAGGATGTTGCTGTTGCTGGTATCAGCAG  
 AAACCAGGGAAAGCCCTAACGGCTCTGATCTATTGGGATCCACCCGACACTGGGTC  
 CCATCAAGGTTCACTGGGAGTGGGATCTGGGAGACATTACACTCTCACCATCAGCAGCTG  
 CAACCTGAAGATTTGCAACTACTACTGTGAGCAACATTAGCACTCTGGACTTTC  
 GGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGGACTGTGGCTGACCACATGTCTCATCTC  
 CCTCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGAACTGCCCTCTGTTGCTGCTGAATAAC  
 TTCTATCCCAGAGGAGGCAAAGTCAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCAATCCGTAAC  
 TCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGAACACC  
 CTGACACTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCAT  
 CAGGGCTGAGCTCCCCGTACAAAGAGCTAACAGGGAGAGTGTAA

**예상 신호 서열에 밀줄이 그어진 h89M5-H2L2 경쇄 아미노산 서열 (서열 57)**

MDMRVPAQLLGLLWLRLGARCDIQMTPSPSSLASVGDRVTITCKASQDVIFAVAWYQQ  
 KPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSGTIDYTLTISSLOPEDFATYYCQQHYSTPWT  
 GGGTKVEIKRTVAAPSVIDFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN  
 SQESVTEQDSKDSTYSLSNTLTSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**h89M5-H2L2 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (서열 58)**

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGCTGCATCTGGAGACAGAGTCACC  
 ATCACTTCAAGGCCCTCCAGGATGTTGCTGTTGCTGGTATCAGCAGAAACCA  
 GGGAAAGCCCTAACGCTCTGATCTATTGGGATCCACCCGGCACACTGGGGTCCCATCA  
 AGGTTCACTGGCAGTGGATCTGGACAGATTACACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT  
 GAAGATTTGCAACTACTACTGTGAGCAACATTAGCACTCCTGGACTTCGGCGGA  
 GGGACCAAGGTGGAGATCAA

**h89M5-H2L2 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (서열 59)**

DIQMTPSPSSLASVGDRVTITCKASQDVIFAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPS

RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK

**h130M23-H1L2 중쇄 뉴클레오티드 서열 (서열 60)**

ATGGAACCTGGGACTCAGATGGGTTTCCTCGTTGCTATTCTGGAAGGAGTCCAGTGTGAG  
GTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGAGGATCTGCGGCTCTCC  
TGTGCAAGCTCTGGATTACACCTCTCTTATGCCATGCTTGGTCCGGCAGGCTCCA  
GGGAAGGGGCTGGAATGGGTCTCATCCATTCTAGTGGAGGTAGCACATATTATCCTGAC  
AGCGTAAGGGCCGTTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACAGCTGTATCTGCAA  
ATGAAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCTGTATTAAGTGTGCTAGAGGTGGAGATCT  
GGGGCTACAATGGAGATTAGCAAGATGCTATGGACTACTGGGGCAAGGAACAACAGTC  
ACAGTCAGCTAGCAGCACAAAGGCCCTAGCGTCTCCCTGGCTGGTCAAGGACTACTCCCCAACCG  
AGCACCAAGCGAGAGCACAGGCCCTGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCAACCG  
GTGACGGTGTGGAACTCAGGGCCTCTGACCAGCGCGTGCACACCTCCCCAGCTGTC  
CTCAGTCCTCAGGACTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGCACCGTGCCTCCAGCAACTTC  
GGCACCCAGACCTACACTGCAACGTAGATACAAGCCCAGCAACACCAAGGGTGGACAAG  
ACAGTTGAGCGCAAAATGTTGAGTGCTGAGTGCCACCGTGCACCCACTGTGGCAGGA  
CCGTAGTCTTCTCTTCCCCAAAACCCAAGGACACCCATGATCTCCGGACCCCT  
GAGGTACAGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAGGTCCAGTTCAACTGG  
TACGTGACGGCGTGGAGGTGATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCTTCAC  
AGCACGTTGGTGGTGGTCAACCTCAGCGTGTGACCCAGGACTGGTGAACGGCAAG  
GAGTACAAGTCAAGGTCTCAACAAAGGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCC  
AAAACCAAAGGGCAGCCCGAGAACCCAGCTGTACACCCCTGCCCATCCGGAGGAG  
ATGACCAAGAACCAAGGTCAAGCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTACCCAGCAGACATC  
GCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCCGAGAACACTACAAGACACCTCCATG  
CTGACTCCGACGGCTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAGAGCAGGTGG  
CAGCAGGGGAACGTCTCATGCTGTGATGAGGCTCTGCACAAACCAACTACACG  
CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAATGA

**예상 신호 서열에 밀줄이 그어진 h130M23-H1L2 중쇄 아미노산 서열 (서열 61)**

MELGLRWVFLVAILABLEGVQCEVQLVESGGGLVKPGGLRSLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAP  
GKGLEWVSSISGGSTYYPPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDP  
GYNGDYEDAMDYWGQGTTVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP  
VTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVTVPSNFQTQTYTCNVDHKPSNTKVDK  
TVERKCCVECPFPAPPVAGPSVFLFPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNW  
YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSILTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTS  
KTKQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPM  
LSDGSSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEHALHNHYTQKSLSLSPGK

**h130M23-H1L2 중쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (서열 62)**

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGGAGGATCTCTGCGGCTC  
TCCGTGCAAGCCCTGGATTACACCTCTCTTATGCCATGTCTGGTCCGGCAGGCT  
CCAGGGAAAGGGGCTGGAATGGGCTCATCCATTCTAGTGGAGGTAGCACATATTATCCT  
GACAGCTGAAGGGCCGTTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACAGCCTGTATCTG  
CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCTGTATTACTGTGCTAGAGGTGGAGAT  
CCTGGGTCTACAATGGAGATTACGAGATGCTATGGACTACTGGGCAAGGAACAACA  
GTCACAGTCAGCTCA

**h130M23-H1L2 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 (서열 63)**

EVQLVESGGGLVKPGGLRSLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGGSTYY  
DSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDPGVYNGDYEDAMDYWGQGTT  
VTVSS

**h130M23-H1L2 경쇄 뉴클레오티드 서열 (서열 64)**

ATGAAATACCTCCCTACAGCTGCCGCTGGACTCCTCCCTCGCTGCCAGCCTGCC  
 ATGGCCGACATCCAGATGACCCAGTCCCAGTCCTCCCTGCTGCTTCCGGAGACAGA  
 GTCACCATCACTGCAAGGCCCTCCAGGATGTCCTCTGCTGCGTTGGTATCAGCAG  
 AAACCAGGAAAAGCTCTTAAGCTCTGATCTATTGGGCATCCACCAGGACACAGGAGTC  
 CCTCCAGGTTCTCCGGCTCTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCTCCGTG  
 CAAGCTGAAGATTGCAACTTACTACTGTCAGCAACATTATAGCACTCTGGACATTC  
 GGACAAGGGACCAAGGTGAAATCAAAGAACAGTGTGGTGACCTCTGCTTCATCTC  
 CCTCCATCTGATGAGCAGCTCAAATCTGGAACAGCCTGCTGCTGCTGAAATAAC  
 TTCTATCTTAGAGAGGCCAAAGCTCAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCCGGTAAC  
 TCCCAGGAGCTGTCACAGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTCAGAACACC  
 CTGACACTGCTAAAGCTGACTACAGAAACAAAGCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT  
 CAGGGACTGAGCTCCCCGTCAAAAATCTCAACAGGGGAGAGTGCTAA

**예상 신호 서열에 밀줄이 그어진 h130M23-H1L2 경쇄 아미노산 서열 (서열 65)**

MKYLLPTAAAGLILLAAQPAMADIQMTPSPSSLASAVGDRVTITCKASQDVSSAVAWYQQ  
 KPGKAPKLLIYWASTRHTGVPSRFSGSQSGTDFTLTISSVQAEDFATYYCQQHYSTPWT  
 GQGTKVEIKRTVAAPSVIDPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN  
 SQESVTEQDSKDSTYSLSNTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**h130M23-H1L2 경쇄 가변 영역 뉴클레오티드 서열 (서열 66)**

GACATCCAGATGACCCAGTCCCTCCCTGCTGCTTCCGTGGAGACAGAGTCACC  
 ATCACTTCAAGGCCTCCAGGATGTCCTCTGCTGCGCTGGTATCAGCAGAAACCA  
 GGAAAAGCTCTAAAGCTCTGATCTATTGGGCATCCACCAGGACACAGGAGTCCCTCC  
 AGGTTCTCCGGCTCTGGATCTGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCTCCGTGCAAGCT  
 GAAGATTTGCAACTTACTACTGTCAGCAACATTATAGCACTCTGGACATTGGACAA  
 GGGACCAAGGTGAAATCAA

**h130M23-H1L2 경쇄 가변 영역 아미노산 서열 (서열 67)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSSAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPS  
 RFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDFATYYCQQHYSTPWTFGQGTKVEIK

**예상 신호 서열이 없는 h89M5-H2L2 중쇄 아미노산 서열 (서열 68)**

QVQLVQSGAEVKPGASVKVSKTSGYTFGYTMHWVRQAPGQRLEWMGGINPNNGGTTY  
 NQNFKGRVITIRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARKEFSDGYYYFAYWGQGLTVVS  
 SASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQS  
 SGLYSLSSVVTVPSSNFTQTYCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPPVAGPSV  
 FLFPKPDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHDEPEVQFNWYVGVEVHNAKTPREEQFNSTF  
 RVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKQPREPQVYTLPPSREEMTK  
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAWEWSNGQPENNYKTPPMULDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG  
 NVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSPKG

**밀줄이 그어진 예상 신호 서열이 없는 h89M5-H2L2 중쇄 아미노산 서열 (서열 69)**

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVIFAVAWYQQKPGKAPKLLIYWASTRHTGVPS  
 RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSTPWTFGGCTKVEIKRTVAAPSVEIFPP  
 SDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSNTLT  
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

**밀줄이 그어진 예상 신호 서열이 없는 h130M23-H1L2 중쇄 아미노산 서열 (서열 70)**

EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISSGGSTYYP  
 DSVKGRFTISRDNNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGDPGVYNGDYEDAMDYWGQGTT  
 VTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPA

[0402]

**수탁번호**

[0403]

기탁기관명 : ATCC

수탁번호 : PTA-12021

수탁일자 : 20110810

기탁기관명 : ATCC

수탁번호 : PTA-11970

수탁일자 : 20110630

도면

## 도면1a

◆ ID	◆ 원천	◆ 순도	◆ 처리	◆ 조작 유형	◆ 평균 신호 편차	◆ PA 총	PA 총			PA 총			PA 총		
							◆ P	◆ A	◆ M	◆ P	◆ A	◆ M	◆ P	◆ A	◆ M
질환 질장	질장	질관	질관	질-:DISE...	4.96	0.14	0	21	0	1	1	1	1	1	1
임상 질장	질장	임상	질-:BENI...	4.92	0.09	0	24	0	1	1	1	1	1	1	1
정상 유방	유방	정상	유방	유방-:NOR...	11.25	13.18	5	17	0	1	1	1	1	1	1
임상 유방	유방	임상	유방	유방-:MAL...	4.96	0.87	1	160	0	1	1	1	1	1	1
임상 유방	유방	임상	유방	유방-:BEN...	42.26	72.70	2	7	0	1	1	1	1	1	1
임상 뇌	뇌	임상	뇌	뇌-:BENI...	4.82	0.05	0	16	0	1	1	1	1	1	1
임상 뇌	뇌	임상	뇌	뇌-:MAIL...	4.82	0.16	0	23	0	1	1	1	1	1	1
임상 간	간	임상	간	간-:BENI...	4.91	0.14	0	4	0	1	1	1	1	1	1
정상 신장	신장	정상	신장	신장-:PER...	4.88	0.12	0	61	0	1	1	1	1	1	1
임상 신장	신장	임상	신장	신장-:MAIL...	5.70	5.24	3	88	0	1	1	1	1	1	1
임상 신장	신장	임상	신장	신장-:BEN...	4.94	0.12	0	15	0	1	1	1	1	1	1
임상 자궁내막	자궁내막	임상	자궁내막	자궁내막-...	11.76	22.09	5	52	0	1	1	1	1	1	1
임상 자궁내막	자궁내막	임상	자궁내막	자궁내막-...	16.09	23.46	3	7	0	1	1	1	1	1	1
정상 질장	질장	정상	질장	질-:HEMOL...	4.92	0.39	0	74	0	1	1	1	1	1	1
임상 질장	질장	임상	질장	질-:MAIL...	4.93	0.85	1	140	0	1	1	1	1	1	1
임상 난소	난소	임상	난소	난소-:MAIL...	33.80	85.09	32	105	1	1	1	1	1	1	1
정상 난소	난소	정상	난소	난소-:NORM...	5.61	1.28	0	7	0	1	1	1	1	1	1
정상 배	배	정상	배	배-:NORM...	5.33	0.95	1	63	0	1	1	1	1	1	1
임상 배	배	임상	배	배-:MAIL...	20.32	38.55	5	30	0	1	1	1	1	1	1
임상 간	간	임상	간	간-:BENI...	4.94	0.73	0	124	0	1	1	1	1	1	1
정상 간	간	정상	간	간-:BENI...	4.80	0.08	0	5	0	1	1	1	1	1	1
정상 간	간	정상	간	간-:DISE...	4.89	0.22	0	22	0	1	1	1	1	1	1
정상 간	간	정상	간	간-:MAIL...	4.92	0.16	0	25	0	1	1	1	1	1	1
정상 간	간	정상	간	간-:NORM...	4.95	0.13	0	6	0	1	1	1	1	1	1
임상 간	간	임상	간	간-:MAIL...	5.00	0.69	0	73	0	1	1	1	1	1	1
임상 전립선	전립선	임상	전립선	전립선-...	6.03	6.23	0	32	0	1	1	1	1	1	1
정상 전립선	전립선	정상	전립선	체장-N...	4.99	0.11	0	13	0	1	1	1	1	1	1
정상 체장	체장	정상	체장	체장-N...	5.97	2.20	2	18	0	1	1	1	1	1	1
질환 체장	체장	질환	체장	체장-ID...	4.93	0.13	0	5	0	1	1	1	1	1	1
임상 체장	체장	임상	체장	체장-B...	4.79	0.11	0	66	0	1	1	1	1	1	1
<b>ID</b>	<b>원천</b>	<b>순도</b>	<b>처리</b>	<b>조작 유형</b>	<b>평균 신호 편차</b>	<b>PA 총</b>	<b>P</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>PA 총</b>	<b>P</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>PA 총</b>	<b>P</b>

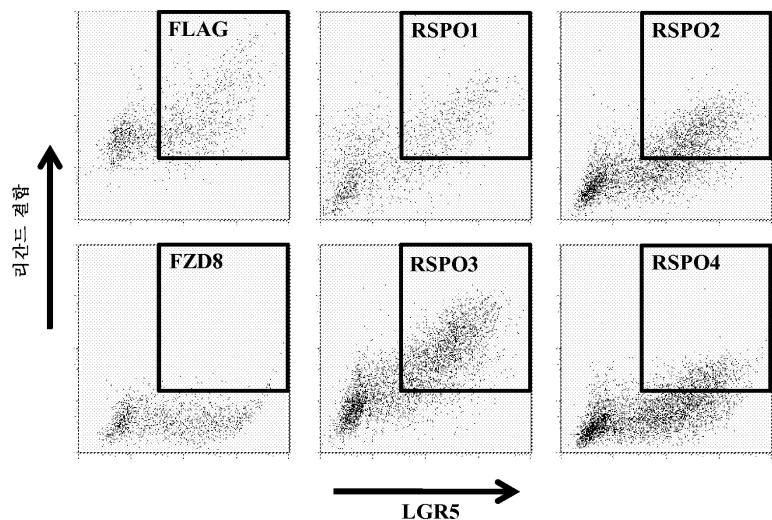
## 도면1b

RSPO2				◆ 원천	◆ 순도	◆ 처리	◆ 유형	PA 총				152	304	456	609
◆ 신호	◆ 폐균	◆ 표준	◆ 편차					P	A	M					
질환 결장	결장	질환	결장:DISE...	28.82	51.62	16	5	0	■■■■■	■	-				
질환 결장	결장	양성	결장:BEN...	7.40	6.38	3	21	0	■■■■■	■	-				
질환 솔방	솔방	양성	솔방:NOR...	7.04	7.00	1	21	0	■■■■■	■	-				
질환 솔방	솔방	양성	솔방:MAL...	5.82	2.16	5	166	0	■■■■■	■	-				
양성 유방	유방	양성	유방:NOR...	5.59	0.12	1	8	0	■■■■■	■	-				
양성 유방	유방	양성	유방:MAL...	5.59	0.12	1	8	0	■■■■■	■	-				
양성 뇌	뇌	양성	뇌:BEN...	5.66	0.15	0	16	0	■■■■■	■	-				
양성 뇌	뇌	양성	뇌:MAL...	16.70	30.11	11	12	0	■■■■■	■■■■■	■	-			
양성 간	간	양성	간:BEN...	6.00	0.43	0	4	0	■■■■■	■	-				
양성 신장	신장	양성	신장:MAL...	5.76	0.22	0	61	0	■■■■■	■	-				
양성 신장	신장	양성	신장:BEN...	5.61	0.20	1	90	0	■■■■■	■	-				
양성 신장	신장	양성	신장:MAL...	18.30	34.71	5	10	0	■■■■■	■■■■■	■	-			
양성 차궁내막	차궁내막	양성	차궁내막...	5.31	3.17	7	49	1	■■■■■	■■■■■	■	-			
양성 차궁내막	차궁내막	양성	차궁내막...	5.54	0.10	0	10	0	■■■■■	■	-				
정상 결장	결장	정장	상행 결장...	14.65	25.57	43	28	3	■■■■■	■■■■■	■	-			
정상 결장	결장	악성	결장:MAL...	6.67	11.61	10	130	1	■■■■■	■■■■■	■	-			
악성 난소	난소	악성	난소:MAL...	10.33	50.15	7	131	0	■■■■■	■■■■■	■	-			
정상 난소	난소	정성	난소:NORM...	5.64	0.14	0	7	0	■■■■■	■	-				
정상 뼈	뼈	정상	뼈:NORM...	16.18	14.17	53	11	0	■■■■■	■	-				
양성 난소	난소	양성	난소:BEN...	5.66	0.41	4	31	0	■■■■■	■	-				
악성 뼈	뼈	악성	뼈:MAUG...	7.00	5.27	26	96	2	■■■■■	■	-				
양성 뼈	뼈	양성	뼈:BENIG...	5.61	0.15	0	5	0	■■■■■	■	-				
정상 간	간	정상	간:DISE...	6.30	2.71	1	21	0	■■■■■	■	-				
양성 간	간	양성	간:MAL...	5.91	0.42	0	24	1	■■■■■	■	-				
양성 전립선	전립선	양성	간:NORM...	5.96	0.27	0	6	0	■■■■■	■	-				
정상 전립선	전립선	정상	전립선:M...	18.11	6.02	40	31	2	■■■■■	■	-				
정상 전립선	전립선	정상	전립선:N...	18.65	23.89	22	9	1	■■■■■	■	-				
정상 배장	배장	정상	배장:N...	5.98	0.23	0	13	0	■■■■■	■	-				
침윤 전립선	침윤	침윤	침윤:D...	23.87	18.90	17	3	0	■■■■■	■	-				
양성 배장	배장	양성	배장:B...	156.95	33.67	1	4	0	■■■■■	■	-				
악성 배장	배장	악성	배장:M...	5.57	0.17	1	65	0	■■■■■	■	-				
ID	원천	순도	처리	조직 유형	폐균 신호	표준 편차	P A M	152	304	456	609				

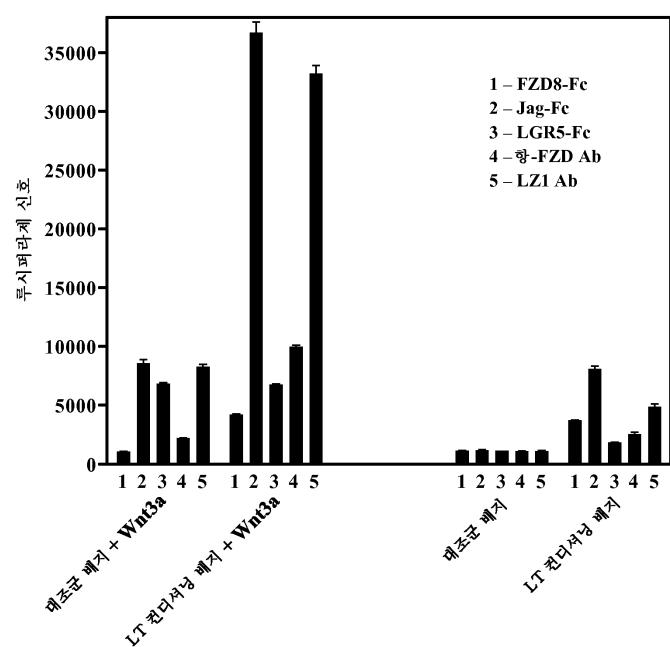
도면1c

RSPO3				PA 총				1405 2810 4216 5621			
ID	원천	순도	처리	조직	유형	생균	표준	P	A	M	
질환 철장	철장	질환	철장::DISE...	424.06	396.34	21	0	■■■■■	1		
양성 철장	철장	양성	철장::BEN...	207.3	33.58	9	15	0	■■■		
정상 유방	유방	정상	유방::NOR...	176.15	140.69	21	1	0	■■■■■		
음성 유방	유방	음성	유방::MAL...	73.62	435.84	13	26	2	■■■■■		
양성 유방	유방	양성	유방::BEN...	237.01	342.37	9	0	0	■■■		
양성 뇌	뇌	양성	뇌::BEN...	803.28	1306.74	13	2	1	■■■■■		
양성 뇌	뇌	양성	뇌::MALI...	10.15	8.10	5	17	1	■■■■■		
양성 간	간	양성	간::BENI...	37.84	68.68	4	0	0	■■■■■		
정상 신장	신장	정상	신장::PERI...	24.72	27.21	39	22	0	■■■		
양성 신장	신장	양성	신장::MAL...	99.46	283.90	54	33	4	■■■■■	11	1
양성 신장	신장	양성	신장::BEN...	1032.08	1889.99	7	8	0	■■■■■	1	1
양성 자궁내막	자궁내막	양성	자궁내막...	176.43	285.60	43	14	0	■■■■■	11	1
양성 자궁내막	자궁내막	양성	자궁내막...	3238.94	1988.11	10	0	0	■■■■■	11	1
정상 혈장	혈장	정상	상행혈장...	118.87	137.80	73	1	0	■■■■■	1	1
양성 혈장	혈장	양성	혈장::MAL...	108.15	360.84	119	20	2	■■■■■	11	1
양성 난소	난소	양성	난소::MALI...	154.28	556.65	76	61	1	■■■■■	11	1
정상 난소	난소	정상	난소::NORM...	23.20	31.46	2	5	0	■■■■■	11	1
정상 폐	폐	정상	폐::NORM...	60.79	43.83	62	2	0	■■■■■	11	1
양성 난소	난소	양성	난소::BENI...	226.13	736.49	8	26	1	■■■■■	11	1
양성 폐	폐	양성	폐::MALIG...	111.01	340.16	103	20	1	■■■■■	11	1
양성 폐	폐	양성	폐::BENIG...	189.94	406.63	1	4	0	■■■■■	11	1
질환 간	간	질환	간::DISE...	67.81	46.12	22	0	0	■■■■■	11	1
양성 간	간	양성	간::MALI...	48.36	128.64	14	11	0	■■■■■	11	1
양성 전립선	전립선	양성	간::NORM...	58.22	18.95	6	0	0	■■■■■	11	1
정상 전립선	전립선	정상	전립선::M...	53.33	76.76	64	8	1	■■■■■	11	1
정상 체장	체장	정상	체장::N...	101.58	188.93	30	2	0	■■■■■	11	1
질환 체장	체장	질환	체장::D...	50.23	47.53	12	0	0	■■■■■	11	1
질환 전립선	전립선	질환	전립선::D...	43.30	45.82	17	2	1	■■■■■	11	1
양성 체장	체장	양성	체장::B...	31.14	27.97	3	2	0	■■■■■	11	1
양성 체장	체장	양성	체장::M...	66.48	83.74	54	10	2	■■■■■	11	1
ID	원천	순도	처리	조직 유형	평균 신호	표준 편차	P A M	1405 2810 4216 5621			

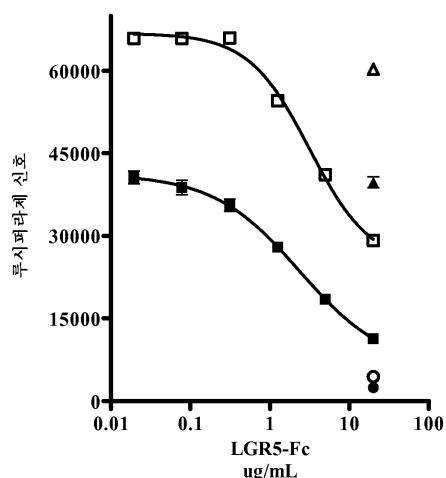
## 도면2



## 도면3



## 도면4

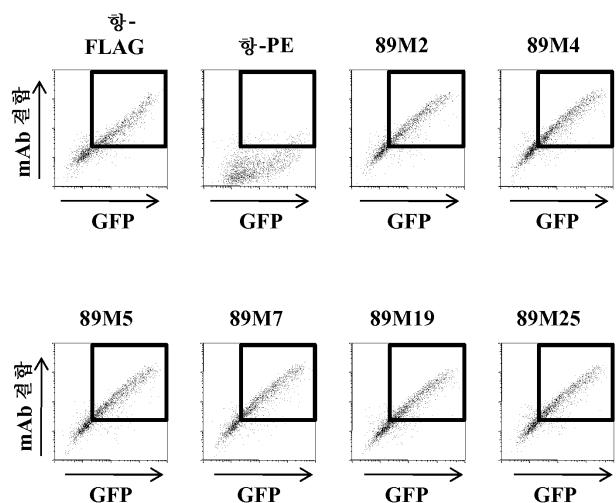


## 도면5a

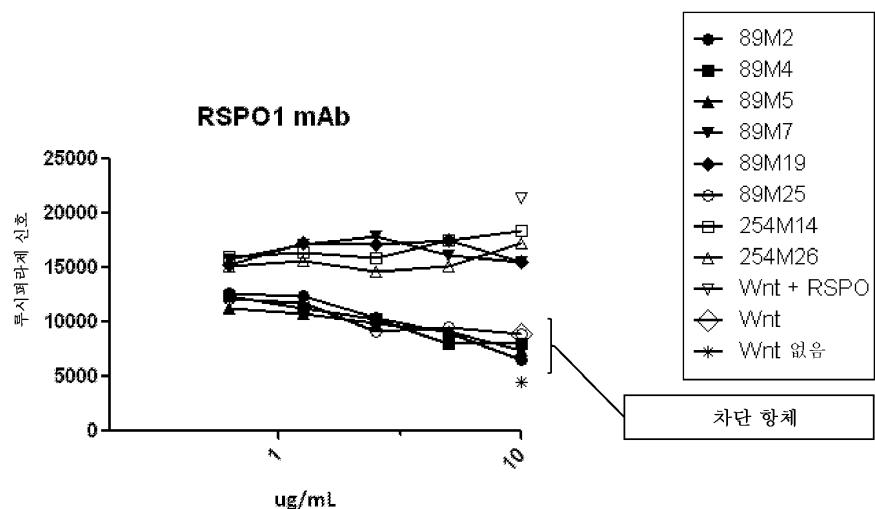
FLAG-RSPO1-푸린-CD4TM-GFP



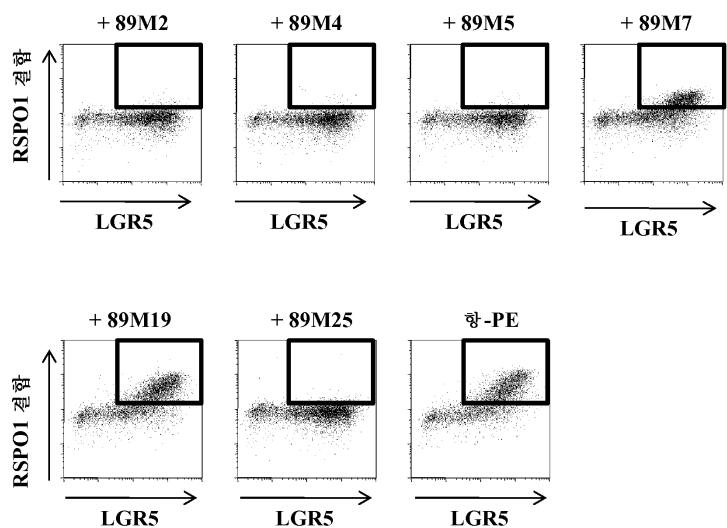
## 도면5b



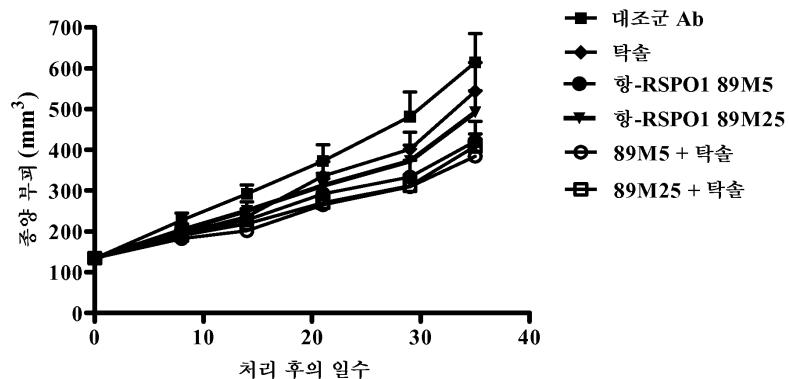
도면6



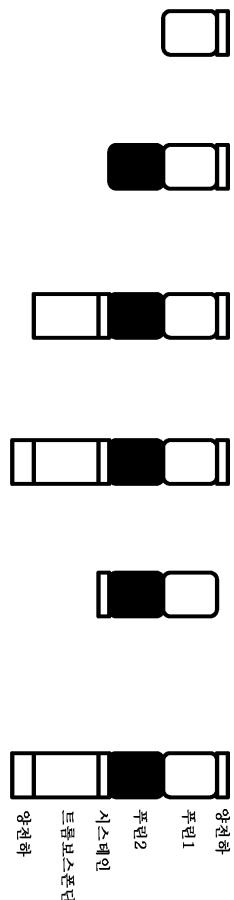
도면7



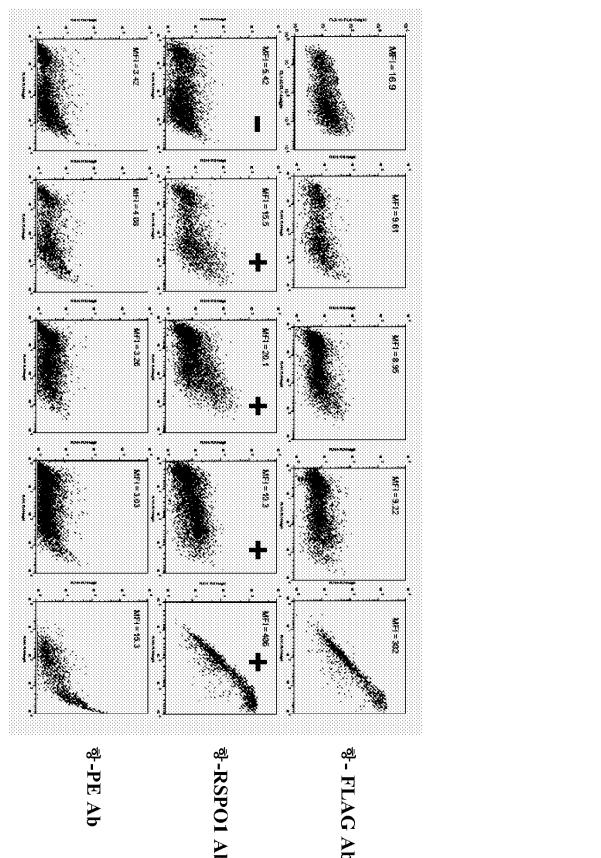
도면8



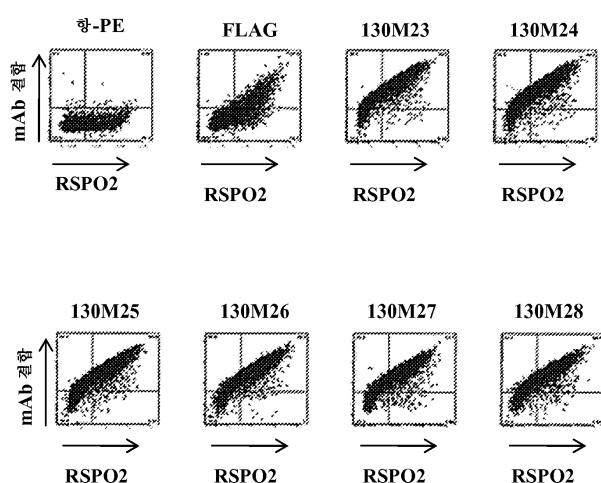
도면9a



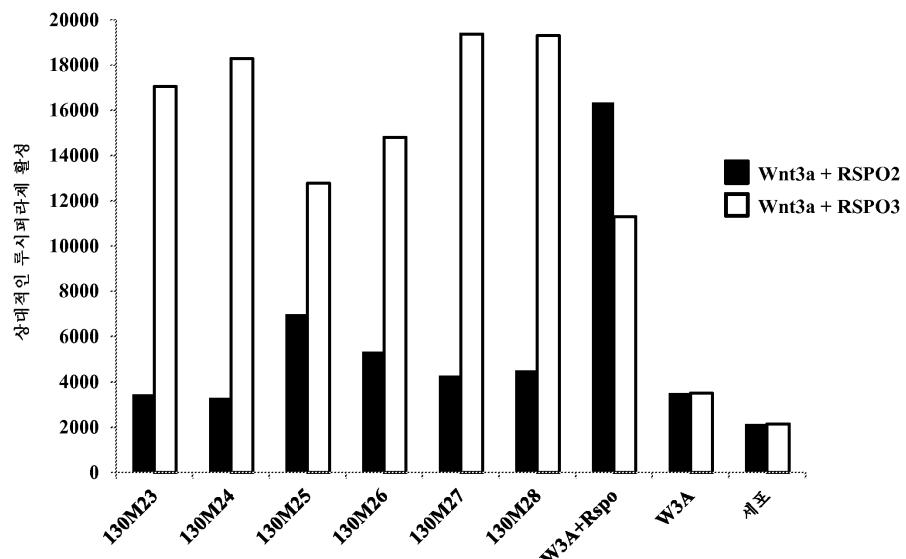
도면9b



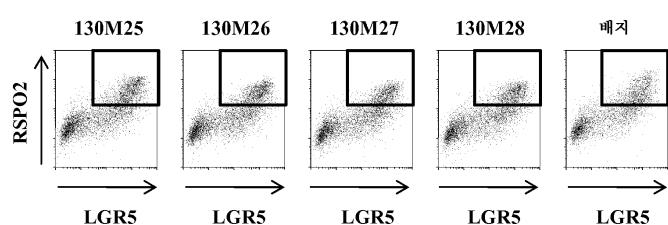
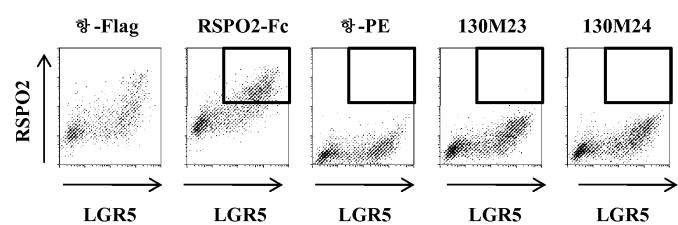
도면10



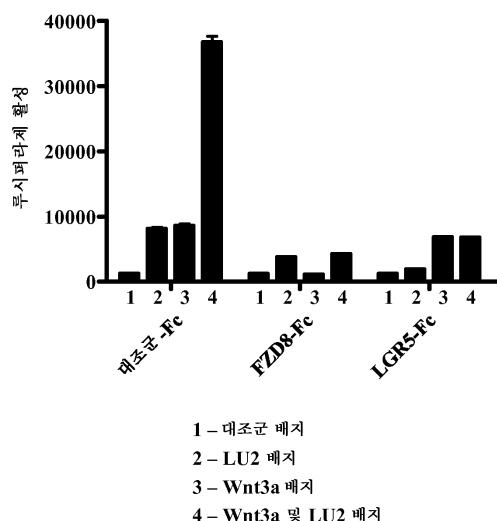
도면11



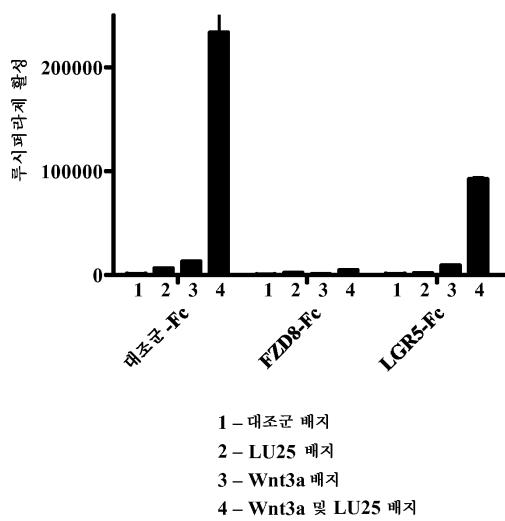
도면12



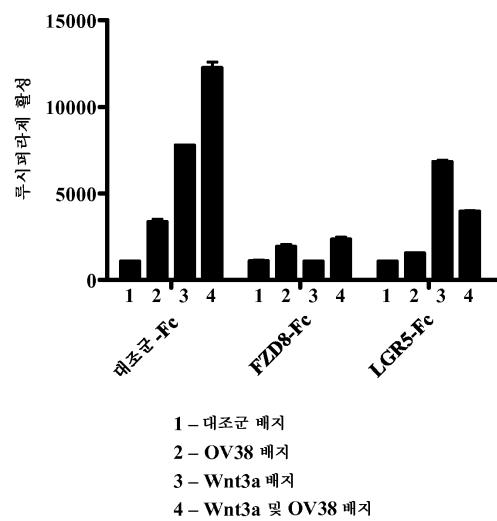
도면13a



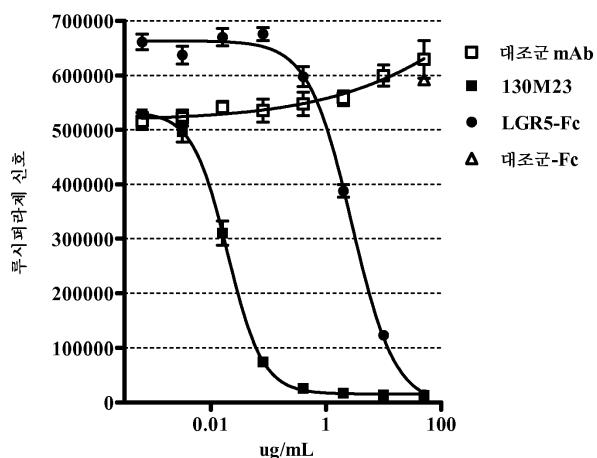
도면13b



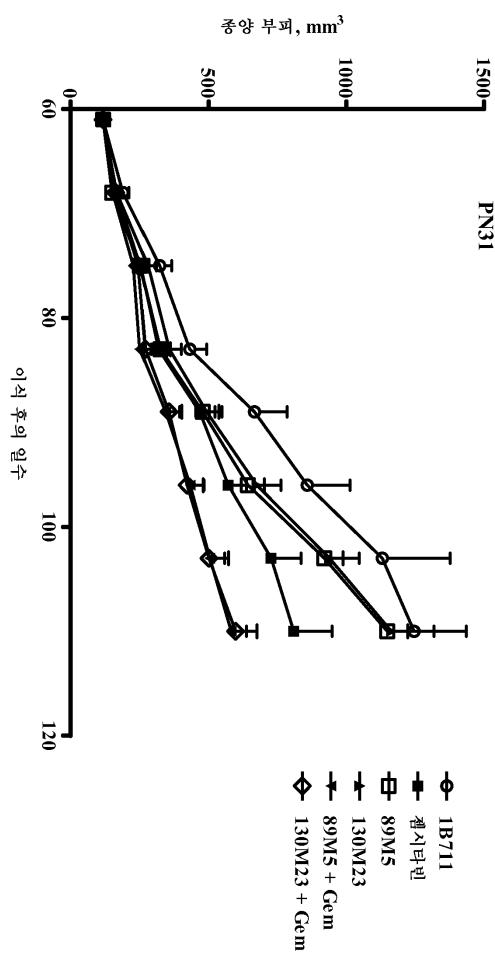
도면13c



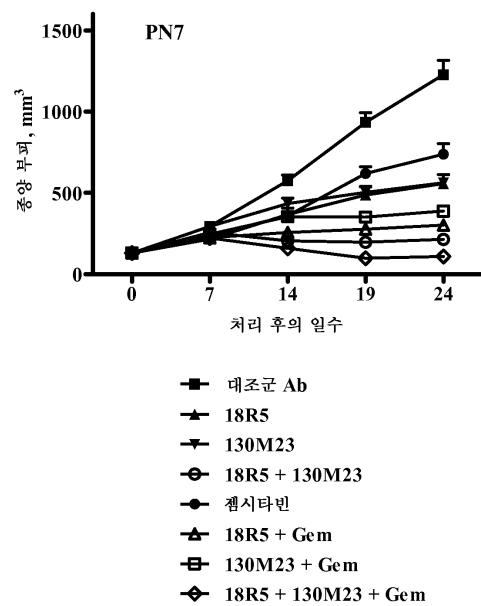
도면14



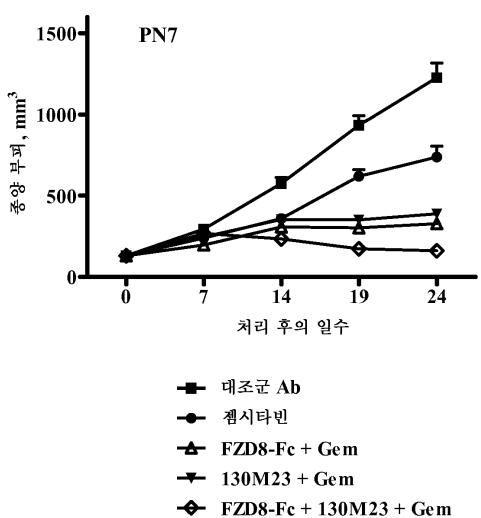
도면15



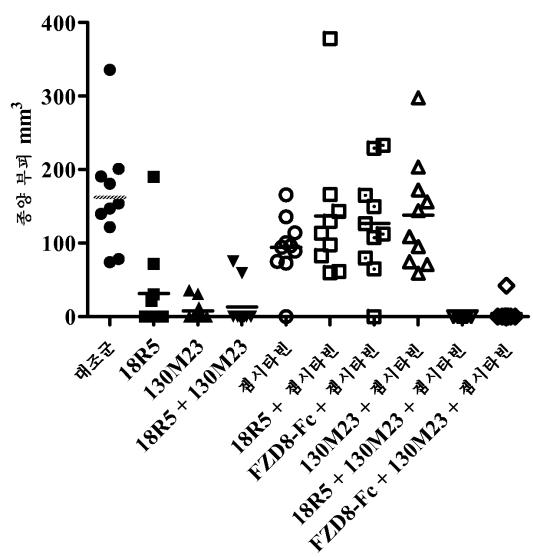
도면16a



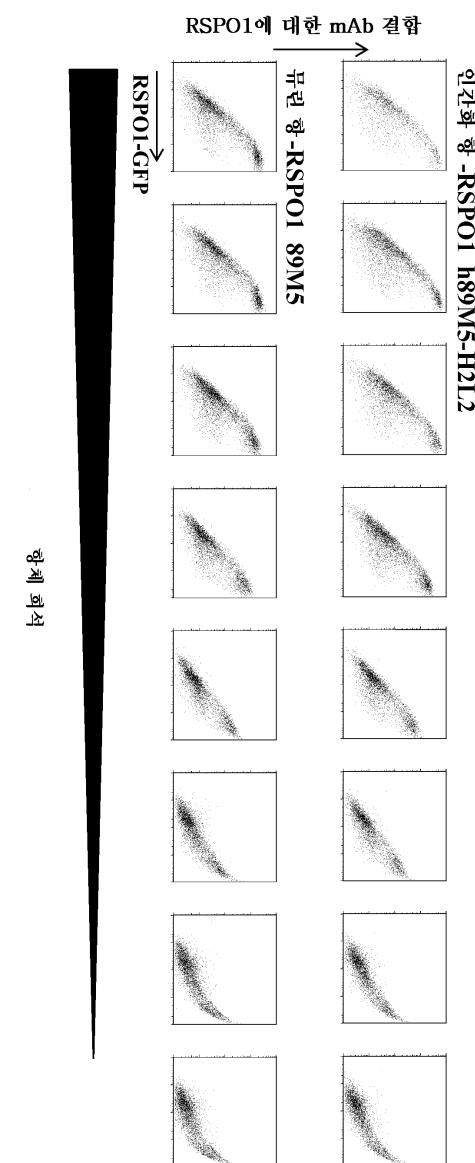
도면16b



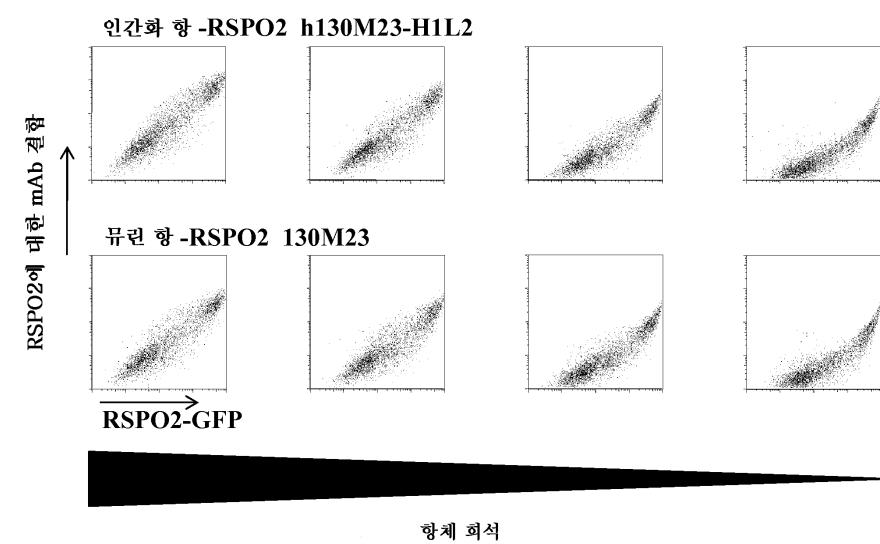
도면16c



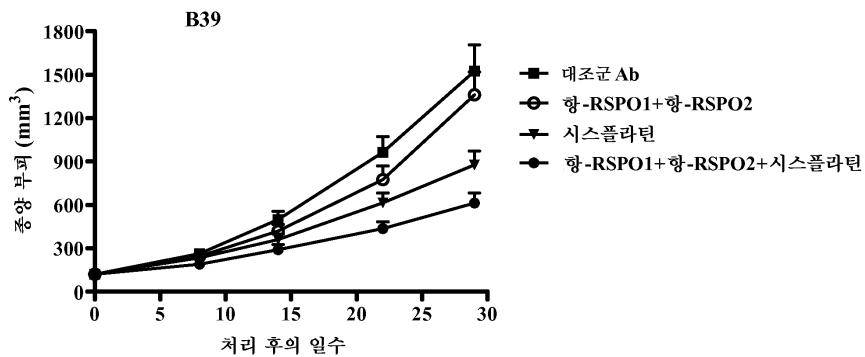
도면17a



도면17b



## 도면18



## 서열 목록

## SEQUENCE LISTING

- <110> GURNEY, Austin L.  
 AXELROD, Fumiko Takada  
 HOEY, Timothy  
 CHARTIER-COURTAUD, Cecile
- <120> RSPO BINDING AGENTS AND USES THEREOF  
 <130> 2293.082PC03/PAC/KBK  
 <140> PCT/US2012/046746  
 <141> 2012-07-13  
 <150> US 61/570,629  
 <151> 2011-12-14  
 <150> US 61/521,547  
 <151> 2011-08-09  
 <150> US 61/508,403  
 <151> 2011-07-15  
 <160> 76  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 263  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 1

Met Arg Leu Gly Leu Cys Val Val Ala Leu Val Ser Trp Thr His

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

Leu Thr Ser Ala Gly Pro Ala

260

<210> 2

<211> 243

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Gln Phe Arg Leu Phe Ser Phe Ala Leu Ile Ile Leu Asn Cys Met

1	5	10	15
---	---	----	----

Asp Tyr Ser His Cys Gln Gly Asn Arg Trp Arg Arg Ser Lys Arg Ala

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Asp Asn Gly Cys Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Leu Arg

50	55	60
----	----	----

Arg Glu Gly Met Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser

65	70	75	80
----	----	----	----

Gly Tyr Tyr Gly His Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

Cys Lys Val Gly Phe Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys

115	120	125
-----	-----	-----

Pro Asp Gly Phe Ala Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu Gly

130	135	140
-----	-----	-----

Cys Glu Val Gly His Trp Ser Glu Trp Gly Thr Cys Ser Arg Asn Asn

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Arg Thr Cys Gly Phe Lys Trp Gly Leu Glu Thr Arg Thr Arg Gln Ile

165	170	175
-----	-----	-----

Val Lys Lys Pro Val Lys Asp Thr Ile Pro Cys Pro Thr Ile Ala Glu

180	185	190
-----	-----	-----

Ser Arg Arg Cys Lys Met Thr Met Arg His Cys Pro Gly Gly Lys Arg

195

200

205

Thr Pro Lys Ala Lys Glu Lys Arg Asn Lys Lys Lys Arg Lys Leu

210

215

220

Ile Glu Arg Ala Gln Glu Gln His Ser Val Phe Leu Ala Thr Asp Arg

225

230

235

240

Ala Asn Gln

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 272

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 3

Met His Leu Arg Leu Ile Ser Trp Leu Phe Ile Ile Leu Asn Phe Met

1

5

10

15

Glu Tyr Ile Gly Ser Gln Asn Ala Ser Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg

20

25

30

Met His Pro Asn Val Ser Gln Gly Cys Gln Gly Cys Ala Thr Cys

35

40

45

Ser Asp Tyr Asn Gly Cys Leu Ser Cys Lys Pro Arg Leu Phe Phe Ala

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr

100

105

110

Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn

115

120

125

Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser

130

135

140

Ile Val His Cys Glu Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr

145

150

155

160

Lys Lys Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val

165 170 175

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

180 185 190

Thr Asn Glu Thr Arg Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln Lys

195 200 205

Gly Glu Arg Gly Lys Lys Gly Arg Glu Arg Lys Arg Lys Pro Asn

210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Lys Glu Ile Pro Glu Gln Arg Glu Asn Lys Gln Gln Lys Lys

245 250 255

Arg Lys Val Gln Asp Lys Gln Lys Ser Val Ser Val Ser Thr Val His

260 265 270

<210> 4

<211> 234

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Arg Ala Pro Leu Cys Leu Leu Leu Val Ala His Ala Val Asp

1 5 10 15

Met Leu Ala Leu Asn Arg Arg Lys Lys Gln Val Gly Thr Gly Leu Gly

20 25 30

Gly Asn Cys Thr Gly Cys Ile Ile Cys Ser Glu Glu Asn Gly Cys Ser

35 40 45

Thr Cys Gln Gln Arg Leu Phe Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gly Ile Arg

50 55 60

Gln Tyr Gly Lys Cys Leu His Asp Cys Pro Pro Gly Tyr Phe Gly Ile

65 70 75 80

Arg Gly Gln Glu Val Asn Arg Cys Lys Lys Cys Gly Ala Thr Cys Glu

85 90 95

Ser Cys Phe Ser Gln Asp Phe Cys Ile Arg Cys Lys Arg Gln Phe Tyr

100 105 110

Leu Tyr Lys Gly Lys Cys Leu Pro Thr Cys Pro Pro Gly Thr Leu Ala

115 120 125

His Gln Asn Thr Arg Glu Cys Gln Gly Glu Cys Glu Leu Gly Pro Trp

130 135 140

Gly Gly Trp Ser Pro Cys Thr His Asn Gly Lys Thr Cys Gly Ser Ala

145 150 155 160

Trp Gly Leu Glu Ser Arg Val Arg Glu Ala Gly Arg Ala Gly His Glu

165 170 175

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

180 185 190

Gln Arg Pro Cys Pro Gly Glu Arg Ser Pro Gly Gln Lys Lys Gly Arg

195 200 205

Lys Asp Arg Arg Pro Arg Lys Asp Arg Lys Leu Asp Arg Arg Leu Asp

210 215 220

Val Arg Pro Arg Gln Pro Gly Leu Gln Pro

225 230

<210> 5

<211> 243

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu Arg Asn Asp

35 40 45

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

50 55 60

Asp Ala Arg Asn Pro Asp Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu

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

<210>	6		
<211>	52		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	6		
Ala Glu Gly Ser Gln Ala Cys Ala Lys Gly Cys Glu Leu Cys Ser Glu			
1	5	10	15
Val Asn Gly Cys Leu Lys Cys Ser Pro Lys Leu Phe Ile Leu Leu Glu			
20	25	30	

Arg Asn Asp Ile Arg Gln Val Gly Val Cys Leu Pro Ser Cys Pro Pro

35 40 45

Gly Tyr Phe Asp

50

<210> 7

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Asn Lys Cys Ile Lys Cys Lys Ile Glu His Cys Glu Ala Cys Phe

1 5 10 15

Ser His Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Glu Gly Leu Tyr Leu His Lys

20 25 30

Gly Arg Cys Tyr Pro Ala Cys Pro Glu Gly Ser Ser Ala

35 40 45

<210> 8

<211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gln Cys Glu Met Ser Glu Trp Ser Pro Trp Gly Pro Cys Ser Lys Lys

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Thr Arg Arg Cys Thr Val Arg Arg Val Pro Cys Pro

50 55 60

<210> 9

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

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

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 10

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Thr Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Lys Glu Phe Ser Asp Gly Tyr Tyr Phe Phe Ala Tyr Trp Gly

100 105 110

Agl Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

115 120

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 11

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Phe Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35                    40                    45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp

85                    90                    95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100                  105

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 12

Thr Gly Tyr Thr Met His

1                    5

<210> 13

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>

><223> Misc.

<400> 13

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

1                    5                    10                  15

Gly

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 14

Lys Glu Phe Ser Asp Gly Tyr Tyr Phe Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 15

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Phe Ala Val Ala

1 5 10

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 16

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

1 5

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 17

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp

1 5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 18

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Lys

1 5

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 363

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 19

gagggtccagc tgcaacagtc tggaccttag ctggtaagc ctggggcttc agtgaagata	60
tcctgcaga ctctggata cacattcaact ggatacacca tgactgggt gaggcagagc	120
catgaaaga cccttgagtg gattggaggt attaatccta acaatggtgg tactacttac	180
aaccagaact tcaaggcCAA ggcacattg actgttagaga agtcctccac cacagectac	240
ttggagctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcacttct attactgtgc aagaaaggag	300
ttctctgatg gttactactt tttgcttac tggggccaag ggactctgg cactgtctct	360

gca	363
-----	-----

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 20

gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtggaga cagggtaaac	60
atcacctgca aggccagtca ggatgtgatt ttgtctgtag cctggtatca acagaaacca	120
ggacaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat	180
cgcttcacag gcagtgtatc tggacagat tatactctca ccatcagcag tgtgcaggct	240
gaagacctgg cacttatta ctgtcagcaa cattatagca ctccgtggac gttcggtgga	300

ggcaccaagc tggaaatcaa a	321
-------------------------	-----

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 464

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 21

Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Gly Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Thr Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Glu Phe Ser Asp Gly Tyr Tyr Phe Phe Ala

115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr

180 185 190

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

195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val

210 215 220

Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg

225 230 235 240

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

245	250	255
Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu		
260	265	270
Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro		
275	280	285
Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala		
290	295	300
Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val		
305	310	315
Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Glu Phe		
325	330	335
Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
340	345	350
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile		
355	360	365
Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys		
370	375	380
Met Ile Thr Asp Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp		
385	390	395
Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp		
405	410	415
Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser		
420	425	430
Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly		
435	440	445
Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys		
450	455	460
<210> 22		
<211> 238		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Misc.		

&lt;400&gt; 22

Met Gly Phe Lys Met Glu Ser Gln Ile Gln Ala Phe Val Phe Val Phe

1 5 10 15

Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His

20 25 30

Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys

35 40 45

Ala Ser Gln Asp Val Ile Phe Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu

115 120 125

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

130 135 140

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu

145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly

165 170 175

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

180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 1398

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 23

atgggatgga gctggatctt tcttttctc ctgtcaggaa ctgcaggtgt cctctgttag	60
gtccagctgc aacagtctgg acctgagctg gtgaaggctg gggcttcagt gaagatatcc	120
tgcaagactt ctggatacac attcaactgga tacaccatgc actgggttag gcagagccat	180
ggaaagaccc ttgagtgat tggaggtatt aatcctaaca atgggtgtac tacttacaac	240
cagaacttca agggcaaggc cacattgact gtagagaagt cctccaccac agcctacttg	300
gagctccgca gcctgacatc tgaggattct gcactctatt actgtgcaag aaaggagttc	360
tctgatggtt actactttt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctttca	420
gccaaaacga cacccccatttgtctatcca ctggccctg gatctgctgc ccaaactaac	480
tccatggta ccctggatg cctggtaag ggctatttc ctgagccagt gacagtgacc	540
tggaactctg gatccctgtc cagcggtgtg cacaccccttcc cagctgtcct gcagtctgac	600
ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc ccctccagca cctggccctg cgagaccgtc	660
acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc accaagggtgg acaagaaaaat tgtgcccagg	720
gattgtggtt gtaaggcttg catatgtaca gtcccagaag tatcatctgt cttcatcttc	780
ccccaaagc ccaaggatgt gtcaccatt actctgactc ctaaggtcac gtgtgttg	840
gtagacatca gcaaggatga tcccgaggc cagttcagct ggtttgtaga ttagtggag	900
gtgcacacag ctcagacgca accccggag gagcagttca acagcacattt ccgctcagtc	960
agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg ctcaatggca aggagttcaa atgcagggtc	1020
aacagtgcag cttccctgc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa aggccagaccg	1080
aaggctccac aggtgtacac cattccacct cccaaaggagc agatggccaa ggataaagtc	1140
agtctgaccc gcatgataac agacttcttc cctgaagaca ttactgtgga gtggcagtgg	1200
aatgggcagc cagcggagaa ctacaagaac actcagccca tcatggacac agatggctct	1260
tacttcgtct acagcaagct caatgtgcag aagagcaact gggaggcagg aaatacttc	1320
acctgctctg ttttacatga gggcctgcac aaccaccata ctgagaagag cctctccac	1380
tctcctggta aatgataa	1398

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 720

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 24

atggcgttca agatggagtc acagatttag gcatttgtat tcgtgtttct ctggttgtct	60
ggtgttgacg gagacattgt gatgacccag tctcacaaat tcatgtccac atcagtggga	120
gacagggtca acatcacctg caaggccagt caggatgtga ttttgcgtt agcctggtat	180
caacagaaac caggacaatc tcctaaacta ctgattact gggcatccac ccggcacact	240
ggagtcctg atcggttac aggcagtgtia tctggacag attatactt caccatcagg	300
agtgtgcagg ctgaagacct ggcactttat tactgtcagc aacattatag cactccgtgg	360

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc	420
atctccac catccagtga gcagtttaaca tctggagggtg cctcagtctgt gtgcttcttg	480
aacaacttct accccaaga catcaatgtc aagtggaaat ttgatggcag tgaacgacaa	540
aatggcgtcc tgaacagttg gactgtatcag gacagcaaaag acagcaccta cagcatgagc	600
agcaccctca ctttgcacca ggacgagttt gaacgcacata acagctatac ctgtgaggcc	660
actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagttca acaggaatga gtgttagtga	720

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 445

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 25

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Thr Leu Glu Trp Ile

35 40 45

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

50 55 60

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

65	70	75	80
Leu Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
Ala Arg Lys Glu Phe Ser Asp Gly Tyr Tyr Phe Phe Ala Tyr Trp Gly			
100	105	110	
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser			
115	120	125	
Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val			
130	135	140	
Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val			
145	150	155	160
Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala			
165	170	175	
Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro			
180	185	190	
Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro			
195	200	205	
Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly			
210	215	220	
Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile			
225	230	235	240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys			
245	250	255	
Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln			
260	265	270	
Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln			
275	280	285	
Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu			
290	295	300	
Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg			
305	310	315	320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 26

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 26

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Phe Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe 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> 27

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 27

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Arg Asn Ile Leu Tyr Leu  
 65                    70                    75                    80  
 Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Ala

                  85                    90                    95  
 Arg Gly Asp Pro Gly Val Tyr Asn Gly Asp Tyr Glu Asp Ala Met  
 100                105                110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

                  115                120                125  
 <210> 28  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> Misc.

<400> 28  
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1                5                10                15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35                40                45  
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Asn  
 50                55                60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65                70                75                80

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

                  100                105  
 <210> 29  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 29

Ser Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 30

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 30

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

1 5 10 15

<210> 31

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 31

Arg Gly Gly Asp Pro Gly Val Tyr Asn Gly Asp Tyr Glu Asp Ala Met

1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 32

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala Val Ala

1 5 10

<210

> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 33

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 34

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro

1 5

<210> 35

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 35

gaagtgaagc tggtgaggc tgggggaggc tttagtgaagc ctggagggtc cctgaaattt	60
tcctgtgcag cctctggatt cagtttca gtttatgccatgtttgggt tcgcccacact	120

ccagagaaga ggctggaggc ggtcgcatcc attagtagtg gtggtagtac ctactatcca	180
gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg tcaggaacat cctgtacactg	240
caaatgagca gtctgaggc tgaggacacg gccatgtatt tctgtgcacg aggccgggat	300
ccgggggtct acaatgggtga ctacgaagat gctatggact actgggtca aggaacctca	360
gtcacccgtct cctca	375

<210> 36

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 36

gacatttgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtcggaga cagggtcagc	60
--	----

atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt tctgctgtag cctggtatca aaaaaacca 120  
 gggcaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat 180  
 cgcttcacaa acagtggatc tggacagat tatactctca ccatcagtag tgtgcaggct 240  
 gaagacctgg cactttatta ctgtcagcaa cattatagca ctccgtggac gttcggtgga 300  
 ggcaccaagc tgaaaatcaa a 321

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 468

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 37

Met Asn Phe Gly Leu Arg Leu Val Phe Leu Val Leu Val Lys Gly

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

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

115	120	125													
Asp	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser

130	135	140													
Ala	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala
145		150		155											
Ala	Gln	Thr	Asn	Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr

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

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

465  
 <210> 38  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> Misc.  
 <400> 38

Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln Ile Gln Ala Phe Val Phe Val Phe  
 1 5 10 15  
 Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His  
 20 25 30  
 Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys

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

100 105 110  
 Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu  
 115 120 125  
 Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro  
 130 135 140

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu  
 145 150 155 160  
 Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly  
 165 170 175  
 Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser  
 180 185 190  
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp  
 195 200 205  
 Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr  
 210 215 220  
 Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

225 230 235  
 <210> 39  
 <211> 1407  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> Misc.  
 <400> 39

atgaacttcg ggctgagatt ggtttcctt gtcctgtt taaaagggtt ccagtgtgaa	60
gtgaagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagccgt gagggtccct gaaatttcc	120
tgtgcagcct ctggattcag tttcagtagt tatgccatgt cttgggttcg ccagactcca	180
gagaagaggc tggagtgggt cgcatccatt agtagtggtg gtatcaccta ctatccagac	240
agtgtgaagg gccgattcac catctccaga gataatgtca ggaacatcct gtacctgcaa	300
atgagcagtc tgaggctctga ggacacggcc atgtatttct gtgcacgagg cggggatccg	360
ggggctaca atgggtgacta cgaagatgtc atggactact ggggtcaagg aacctcagtc	420
accgtctcct cagccaaaac gacacccca tctgtctatc cactggccc tggatctgct	480
gccccaaacta actccatggt gaccctggta tgcctggta agggctattt ccctgagcca	540
gtgacagtga cctggaactc tggatccctg tccagcggtg tgcacacctt cccagctgtc	600
ctgcagtctg acctctacac tctgagcagc tcagtgactg tcccctccag cacctggccc	660
agcgagaccg tcacctgcaa cgttgccac cccggccagca gcaccaaggt ggacaagaaa	720
attgtgccca gggattgtgg ttgttaagcct tgcataatgtc cagtcggcaga agtatcatct	780

gtcttcatct tcccccaaa gccaaggat gtgctcacca ttactctgac tcctaaggc	840
acgtgttgtg tgtagacat cagcaaggat gatcccgagg tccagttcag ctgggttga	900
gatgatgtgg aggtgcacac agctcagacg caaccccggg aggagcagt caacagcact	960
ttccgctcag tcagtgaact tcccatcatg caccaggact ggctcaatgg caaggagttc	1020
aatgcaggg tcaacagtgc agctttccct gccccatcg agaaaaccat ctccaaaacc	1080
aaaggcagac cgaaggctcc acaggtgtac accattccac ctcccaagga gcagatggcc	1140

aaggataaag tcagtctgac ctgcatgata acagacttct tccctgaaga cattactgt	1200
gagtgccagt ggaatggca gccagcggag aactacaaga acactcagcc catcatggac	1260
acagatgct cttaacttcgt ctacagcaag ctcaatgtgc agaagagcaa ctgggaggca	1320
gaaataactt tacctgctc tgtgttacat gagggcctgc acaaccacca tactgagaag	1380
agcctctccc acttccttg taaatga	1407

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 717

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 40

atggcata agatggagtc acagattcag gcatttgat tcgttttct ctgggttct	60
--	----

ggtgttigacg gagacattgt gatgacccag tctcacaaat tcatgtccac atcagtcgga	120
gacagggtca gcatcacctg caaggccagt caggatgtga gttctgtgt agcctggat	180
caacaaaaac cagggcaatc tcctaaacta ctgattact gggcatccac cggcacact	240
ggagtcctg atcgcttcac aaacagtggc tctggacag attatactt caccatcgt	300
agtgtgcagg ctgaagacct ggcactttat tactgtcagc aacattatag cactccgtgg	360
acgttcggtg gaggcacca gctggaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgtatcc	420
atctccacatccactgta gcagttaca tctggaggtg ctcagtcgt gtgttttttg	480

aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaaga ttgatggcag tgaacgacaa	540
aatggcgccc tgaacagttg gactgatcag gacagcaag acagcaccta cagcatgagc	600
agcacccctca cgttgaccaa ggacgagttt gAACGACATA acagctatac ctgtgaggcc	660
actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttag	717

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 449

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 41

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Arg Gly Gly Asp Pro Gly Val Tyr Asn Gly Asp Tyr Glu Asp Ala Met

100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr

115 120 125

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

130 135 140

Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn

195 200 205

Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro

210 215 220

Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser  
 225 230 235 240  
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr  
 245 250 255  
 Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp  
 260 265 270

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

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

Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys  
 405 410 415  
 Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu  
 420 425 430  
 Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly  
 435 440 445

Lys

<210> 42

<211> 214

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 42

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Asn

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe 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> 43

<211> 222

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Gln Gly Asn Arg Trp Arg Arg Ser Lys Arg Ala Ser Tyr Val Ser Asn

1 5 10 15

Pro Ile Cys Lys Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys Asp Asn Gly Cys Ser

20 25 30

Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Leu Arg Arg Glu Gly Met Arg

35 40 45

Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly His

50 55 60

Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys Arg Ile Glu Asn Cys

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys Pro Asp Gly Phe Ala

100 105 110

Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu Gly Cys Glu Val Gly His

115 120 125

Trp Ser Glu Trp Gly Thr Cys Ser Arg Asn Asn Arg Thr Cys Gly Phe

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Asp Thr Ile Pro Cys Pro Thr Ile Ala Glu Ser Arg Arg Cys Lys

165 170 175

Met Thr Met Arg His Cys Pro Gly Gly Lys Arg Thr Pro Lys Ala Lys

180 185 190

Glu Lys Arg Asn Lys Lys Lys Arg Lys Leu Ile Glu Arg Ala Gln

195 200 205

Glu Gln His Ser Val Phe Leu Ala Thr Asp Arg Ala Asn Gln

210 215 220

<210> 44

<211> 184

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400

> 44

Gln Gly Asn Arg Trp Arg Arg Ser Lys Arg Ala Ser Tyr Val Ser Asn

1 5 10 15

Pro Ile Cys Lys Gly Cys Leu Ser Cys Ser Lys Asp Asn Gly Cys Ser

20 25 30

Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Leu Arg Arg Glu Gly Met Arg

35 40 45

Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr Gly His

50 55 60

Arg Ala Pro Asp Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys Arg Ile Glu Asn Cys

65 70 75 80

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

85 90 95

Tyr Leu His Arg Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys Pro Asp Gly Phe Ala

100 105 110

Pro Leu Glu Glu Thr Met Glu Cys Val Glu Gly Cys Glu Val Gly His

115 120 125

Trp Ser Glu Trp Gly Thr Cys Ser Arg Asn Asn Arg Thr Cys Gly Phe

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Asp Thr Ile Pro Cys Pro Thr Ile Ala Glu Ser Arg Arg Cys Lys

165 170 175

Met Thr Met Arg His Cys Pro Gly

180

<210> 45

&lt;211&gt; 51

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 45

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

1 5 10 15

Asn Gly Cys Ser Arg Cys Gln Gln Lys Leu Phe Phe Phe Leu Arg Arg

20 25 30

Glu Gly Met Arg Gln Tyr Gly Glu Cys Leu His Ser Cys Pro Ser Gly

35 40 45

Tyr Tyr Gly

50

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 46

Met Asn Arg Cys Ala Arg Cys Arg Ile Glu Asn Cys Asp Ser Cys Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Arg Cys Phe Asp Glu Cys Pro Asp Gly Phe Ala Pro

35 40 45

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 61

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 47

Gly Cys Glu Val Gly His Trp Ser Glu Trp Gly Thr Cys Ser Arg Asn

1 5 10 15

Asn Arg Thr Cys Gly Phe Lys Trp Gly Leu Glu Thr Arg Thr Arg Gln

20 25 30

Ile Val Lys Lys Pro Val Lys Asp Thr Ile Pro Cys Pro Thr Ile Ala

35 40 45

Glu Ser Arg Arg Cys Lys Met Thr Met Arg His Cys Pro

50 55 60

<210> 48

<211> 251

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Gln Asn Ala Ser Arg Gly Arg Arg Gln Arg Arg Met His Pro Asn Val

1 5 10 15

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

20 25 30

Cys Leu Ser Cys Lys Pro Arg Leu Phe Phe Ala Leu Glu Arg Ile Gly

35 40 45

Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Tyr Tyr

50 55 60

Gly Thr Arg Tyr Pro Asp Ile Asn Lys Cys Thr Lys Cys Lys Ala Asp

65 70 75 80

Cys Asp Thr Cys Phe Asn Lys Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Ser Gly

85 90 95

Phe Tyr Leu His Leu Gly Lys Cys Leu Asp Asn Cys Pro Glu Gly Leu

100 105 110

Glu Ala Asn Asn His Thr Met Glu Cys Val Ser Ile Val His Cys Glu

115 120 125

Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr Lys Lys Gly Lys Thr

130 135 140

Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val Arg Glu Ile Ile Gln

145 150 155 160

His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro Thr Asn Glu Thr Arg

165 170 175

Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln Lys Gly Glu Arg Gly Lys

180	185	190
Lys Gly Arg Glu Arg Lys Arg Lys Lys Pro Asn Lys Gly Glu Ser Lys		
195	200	205
Glu Ala Ile Pro Asp Ser Lys Ser Leu Glu Ser Ser Lys Glu Ile Pro		
210	215	220
Glu Gln Arg Glu Asn Lys Gln Gln Gln Lys Lys Arg Lys Val Gln Asp		
225	230	235
Lys Gln Lys Ser Val Ser Val Ser Thr Val His		
245	250	
<210> 49		
<211> 52		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 49		
Pro Asn Val Ser Gln Gly Cys Gln Gly Gly Cys Ala Thr Cys Ser Asp		
1	5	10
Tyr Asn Gly Cys Leu Ser Cys Lys Pro Arg Leu Phe Phe Ala Leu Glu		
20	25	30
Arg Ile Gly Met Lys Gln Ile Gly Val Cys Leu Ser Ser Cys Pro Ser		
35	40	45
Gly Tyr Tyr Gly		
50		
<210> 50		
<211> 44		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 50		
Ile Asn Lys Cys Thr Lys Cys Lys Ala Asp Cys Asp Thr Cys Phe Asn		
1	5	10
Lys Asn Phe Cys Thr Lys Cys Lys Ser Gly Phe Tyr Leu His Leu Gly		
20	25	30
Lys Cys Leu Asp Asn Cys Pro Glu Gly Leu Glu Ala		

35 <210> 51 <211> 61 <212> PRT <213> Homo sapiens <400> 51	40
His Cys Glu Val Ser Glu Trp Asn Pro Trp Ser Pro Cys Thr Lys Lys 1                5                10                15	
Gly Lys Thr Cys Gly Phe Lys Arg Gly Thr Glu Thr Arg Val Arg Glu 20                25                30	
Ile Ile Gln His Pro Ser Ala Lys Gly Asn Leu Cys Pro Pro Thr Asn 35                40                45	
Glu Thr Arg Lys Cys Thr Val Gln Arg Lys Lys Cys Gln 50                55                60	
<210> 52 <211> 1401 <212> DNA <213> Artificial sequence <220><223> Misc. <400> 52	
atggactgga cctggaggat actctttctc gtggcagcag ccacaggagc ccactccag      60 gtccagctcg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg gggcctctgt gaaggttcc      120 tgcaagactt ctggatacac cttcactgga tacaccatgc actgggttag acaggcccc      180	
ggacaaaggc tggagtggat gggaggtatt aatcctaaca atggtgtac tacttacaac      240 cagaacttca agggcagagt caccattacc agggacacat ccgcaagcac agcctacatg      300 gagctgtcca gcctgagatc tgaagacaca gctgtgtatt actgtgcaag aaaggagttc      360 tctgatggat actactttt tgcttactgg gcccaaggga ccctggtcac cgtagctca      420 gccagcacaa agggccctag cgtttccct ctggctccct gcagcaggag caccagcgag      480 agcacagccg ccctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      540 tggaactcag ggcgtctgac cagcggcgtg cacacccctc cagctgtcct acagtccca      600	
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgcctcca gcaacttcgg cacccagacc      660 tacacctgca acgttagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc      720	

aaatgttgtc tcgagtgcc accgtgccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtctc	780
ctctcccc caaaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc	840
gtgggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc	900
gtggagggtgc ataatgcca gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt	960
gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	1020

aagggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaagg	1080
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac	1140
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg	1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac	1260
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggAAC	1320
gtcttctcat gtcctgtat gcatgagget ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1380
tccctgtctc cggttaaatg a	1401

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 466

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 53

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Thr Gly Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu

50 55 60

Glu Trp Met Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Lys Glu Phe Ser Asp Gly Tyr Tyr Phe Phe Ala

115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn

210 215 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355

360

365

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

370

375

380

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

385 390 395 400

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

405

410

415

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

420

425

430

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

435

440

445

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

450

455

460

Gly Lys

465

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 363

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 54

caggtccagc tcgtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc tgtgaaggtt 60

tcctgcaaga cttctggata caccttcaact ggatacacca tgcactgggt tagacaggcc 120

cccgacaaa ggctggagtg gatgggaggt attaatccta acaatggtg tactactac 180

aaccagaact tcaagggcag agtcaccatt accagggaca catccgcaag cacagcctac 240

atggagctgt ccagcctgag atctgaagac acagctgtgt attactgtgc aagaaaggag 300

ttctctgtatg gatactactt ttttgcattac tggggccaag ggaccctggc caccgtcagc 360

tca 363

&lt;210&gt; 55

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 55

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 Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Lys Glu Phe Ser Asp Gly Tyr Tyr Phe Phe Ala Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

&lt;210&gt; 56

&lt;211&gt; 711

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 56

atggacatga gggccccgc acagctcccg gggctctgc tccctggct ccgggtgcc 60

agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatttgt cggagacaga 120

gtcaccatca ctgcaggc ctcccaggat gtgattttg ctgtgcctg gtatcagcag 180

aaaccaggaa aagccctaa gtcctgatc tattggcat ccacccggca cactgggtc 240

ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggg acagattaca ctctcaccat cagcagtctg 300

caacctgaag atttgcaac ttactactgt cagcaacatt atagcactcc ttggacttc 360

ggcgaggaga ccaaggtgga gatcaaacgg actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 420

cctccatctg atgaggcgtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 480

ttctatccca gagaggccaa agtccagtgg aaggtggata acgccctcca atccggtaac 540

tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcaacacc 600

ctgacactga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat 660

cagggcctga gctccccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgcata a 711

<210> 57

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 57

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser

20	25	30
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

Gln Asp Val Ile Phe Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys

50	55	60
----	----	----

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp

130	135	140
-----	-----	-----

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 210                    215                    220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225                    230                    235

<210> 58

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 58

gacatccaga tgacctagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcgaga cagagtacc	60
atcacttgca aggccccc gatatgtatttttgcgttg cctggatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctattgg gcatccaccc ggcacactgg ggtccatca	180

aggttcagtg gcagtggatc tggacagat tacactctca ccatcagcag tctgcaacct	240
gaagattttgcgttcaacttacta ctgtcagcaa cattatagca ctcctggac tttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 59

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 59

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

1                    5                    10                    15
--

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Phe Ala

20                    25                    30
--

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

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 60

<211> 1413

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 60

atggaactgg gactcagatg gttttcctc gttgttattc tgaaaggagt ccagtgttag	60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcctg gtcaaggctg gaggatctct gcggctctcc	120
tgtgcagcct ctggattcac cttctcttct tatgccatgt ctgggtccg gcaggctcca	180
gggaaggggc tggaatgggt ctcatccatt tctagtggag gtagcacata ttatcctgac	240

agcgtgaagg gccggttcac catctccaga gacaacgcca agaacagcct gtatctgcaa	300
atgaacagcc tgagagccga ggacacagct gtgtattact gtgctagagg tggagatctt	360
ggggctaca atggagatta cgaagatgct atggactact gggggcaagg aacaacagtc	420
acagtcagct cagccagcac aaagggccct agcgctttcc ctctggctcc ctgcagcagg	480
agcaccagcg agagcacagc cgcctggc tgcctggta aggactactt cccgaaccg	540
gtgacggtgt cgtggaactc aggcgctctg accagcggcg tgcacacctt cccagctgtc	600
ctacagtctt caggactcta ctccctcagc agcgtggta ccgtgccctc cagcaacttc	660

ggcacccaga ctttacacccgt caacgttagat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag	720
acagtttgcgc gcaaatttttg tgtcgagtgc ccaccgtgcc cagcaccacc tgtggcagga	780
ccgtcagtctt tcctttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt	840
gagggtcacgt gctgtgggtt ggacgtgagc cacgaagacc ccgaggctca gttcaactgg	900
tacgtggacg gctgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cacgggagga gcagttcaac	960

agcacgttcc gtgtggtcag cgtcctcacc gttgtgcacc aggactggct gaacggcaag 1020  
gagtaacaat gcaagggtctc caacaaaggc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080

aaaacccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag 1140  
atgaccaaga accaggttag cctgacctgc ctggtaaaag gtttctaccc cagcgacatc 1200  
gccgtggagt gggagagcaa tggcagecg gagaacaact acaagaccac acctccatg 1260  
ctggactccg acggctcctt cttctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtag 1320  
cagcagggga acgtttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1380  
cagaagagcc tctccctgtc tccggtaaa tga 1413

&lt;210&gt; 61

&lt;211&gt; 470

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 61

Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly

1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp

65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser

85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Asp Pro Gly Val Tyr Asn Gly Asp Tyr Glu

115 120 125

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

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

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

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 450                    455                    460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465                    470

<210> 62

<211> 375

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 62

gaggtgcgc	tggtgaggc	tgggggaggc	ctggtaagc	ctggaggatc	tctgcggctc	60
tcctgtcag	cctctggatt	caccttctcc	tcttatgcca	tgtcttgggt	ccggcaggct	120
ccagggaaagg	ggctiggaatg	ggtctcatcc	atttctatgt	gagtagcac	atattatcct	180

gacagcgtga	agggccggtt	caccatctcc	agagacaacg	ccaagaacag	cctgtatctg	240
caaataaca	gcctgagagc	cgaggacaca	gctgtgtatt	actgtgttag	aggtggagat	300
cctgggtct	acaatggaga	ttacgaagat	gctatggact	actggggca	aggaacaaca	360
gtcacagtca	gctca					375

<210> 63

<211> 125

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 63

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys 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
----	----	----

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

35	40	45
----	----	----

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

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

Arg Gly Gly Asp Pro Gly Val Tyr Asn Gly Asp Tyr Glu Asp Ala Met

100	105	110
-----	-----	-----

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115	120	125
-----	-----	-----

<210> 64

<211> 711

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 64

atgaaatacc tcctccctac agctgccgtt ggactcctcc ttctcgctgc ccagcctgcc	60
---	----

atggccgaca tccagatgac ccagtccct tcctccctgt ctgtttccgtt cggagacaga	120
---	-----

gtcaccatca ctgtcaaggc ctcccaggat gtgtcctctg ctgtcgcttg gtatcagcag	180
---	-----

aaaccaggaa aagctcctaa gtcctgtatc tattggcat ccaccaggca cacaggagtc	240
--	-----

ccttccaggt tctccggctc tggatctggg acagattca ctctcaccat cagctccgtg	300
--	-----

caagctgaag attttgcacac ttactactgt cagcaacatt atagcactcc ttggacatcc	360
--	-----

ggacaaggga ccaaggtgga aatcaaaaaga actgtggctg caccttctgt cttcatcttc	420
--	-----

cctccatctg atgagcagct caaatctgaa actgcctccg ttgtgtgcct gctgaataac	480
---	-----

ttcttatccta gagaggccaa agtccagtgg aaggtggata acgccctcca atccggtaac	540
--	-----

tcccaggagt ctgtcacaga gcaggactcc aaggacagca cctactccct cagcaacacc	600
---	-----

ctgacactgt ctaaagctga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat	660		
cagggactga gctccccgt cacaaaatcc ttcaacaggg gagagtgcta a	711		
<210> 65			
<211> 236			
<212> PRT			
<213> Artificial sequence			
<220><223> Misc.			
<400> 65			
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala			
1	5	10	15
Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser			
20	25	30	
Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser			
35	40	45	
Gln Asp Val Ser Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys			
50	55	60	
Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val			
65	70	75	80
Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr			
85	90	95	
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln			
100	105	110	
His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile			
115	120	125	
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp			
130	135	140	
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn			
145	150	155	160
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu			
165	170	175	
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp			
180	185	190	

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr

195 200 205

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

210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 66

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 66

gacatccaga tgaccaggc cccttcctcc ctgtctgctt ccgtcgagaa cagagtcc	60
atcacttgca aggccccc gatatgttcc tctgctgtcg ctggatca gcagaaacca	120
ggaaaagctc ctaagctct gatctattgg gcatccacca ggcacacagg agtccctcc	180

aggttctccg gctctggatc tggacagat ttcaactcta ccatcagctc cgtgcaagct	240
gaagattttgc aacttacta ctgtcagcaa cattatagca ctccctggac attcggacaa	300
gggaccaagg tggaaatcaa a	321

<210> 67

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 67

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 68

<211> 447

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 68

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 Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Lys Glu Phe Ser Asp Gly Tyr Tyr Phe Phe Ala Tyr Trp Gly

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His

195	200	205
-----	-----	-----

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys

210	215	220
-----	-----	-----

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

225	230	235
-----	-----	-----

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

245	250	255
-----	-----	-----

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu

260	265	270
-----	-----	-----

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

275	280	285
-----	-----	-----

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

290	295	300
-----	-----	-----

Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

305	310	315
-----	-----	-----

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile

325	330	335
-----	-----	-----

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

340	345	350
-----	-----	-----

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

355	360	365
-----	-----	-----

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

370	375	380
-----	-----	-----

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser

385	390	395
-----	-----	-----

400
-----

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 69

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Misc.

<400> 69

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Phe Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	
Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
180	185	190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
195	200	205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210			

<210> 70  
<211> 451  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220><223> Misc.

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

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

115	120	125	
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser			

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly Lys  
 450  
 <210> 71  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> Misc.  
 <400> 71

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210  
 <210> 72  
 <211> 717  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence  
 <220><223> Misc.  
 <400> 72

atggcata agatggagtc acagattcag gcattgtat tcgtgttct ctggttgct 60

ggtgttacg gagacatcca gatgacccag tcccctcct ccctgtctgc ttccgtcgga 120  
 gacagagtca ccatcacttg caaggcctcc caggatgtgt cctctgtgt cgcttgtat 180  
 cagcagaaac cagaaaagc tcctaagctc ctgatctatt gggcatccac cagcacaca 240  
 ggagtcctt ccaggttctc cggctctgga tctggacag attcactt caccatcagc 300  
 tccctgcaac ctgaagattt tgcaacttac tactgtcagc aacattatag cactcctgg 360  
 acattcggac aaggaccaa ggtggaaatc aaaagaactg tggctgcacc ttctgtttc 420  
 atctccctc catctgatga gcagctaaaa tctggaactg cctccgttgt gtgcctgctg 480

aataacttct atccttagaga ggccaaagtc cagtgaaagg tggataacgc cctccatcc 540  
 ggtaactccc aggagtctgt cacagagcag gactccaagg acagcaccta ctccctcagc 600  
 aacacctgaa cactgtctaa agctgactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660  
 acccatcagg gactgagctc ccccgtaaca aaatcctca acaggggaga gtgctaa 717

<210> 73

<211> 238

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 73

Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln Ile Gln Ala Phe Val Phe Val Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val

115 120 125

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

130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu

145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn

165 170 175

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

180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala

195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

210	215	220
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
225	230	235
<210> 74		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Misc.		
<400> 74		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala		
20 25 30		
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp		
85 90 95		
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145 150 155 160		
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Asn Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		

180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 321

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 75

gacatccaga tgacctagtc cccttcctcc ctgtctgctt ccgtcgaggaga cagagtacc	60
atcaacttgca aggctccca ggatgtgtcc tctgctgtcg ctggatca gcagaaacca	120
ggaaaagctc ctaagctcct gatctattgg gcatccacca ggcacacagg agtccctcc	180
agtttctccg gctctggatc tggacagat ttcaactcta ccatcagctc cctgcaacct	240
gaagattttgc caacttacta ctgtcagcaa cattatagca ctccttggac attcggacaa	300
gggaccaagg tggaaatcaa a	321

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial sequence

&lt;220&gt;&lt;223&gt; Misc.

&lt;400&gt; 76

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Ser Ala

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60  
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

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