(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년02월06일
(11) 등록번호 10-1358600
(24) 등록일자 2014년01월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7017904
(22) 출원일자(국제) 2006년12월21일
심사청구일자 2011년03월10일
(85) 번역문제출일자 2008년07월22일
(65) 공개번호 10-2008-0085054
(43) 공개일자 2008년09월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/048879
(87) 국제공개번호 WO 2007/120252
국제공개일자 2007년10월25일
(30) 우선권주장
60/753,218 2005년12월22일 미국(US)
60/786,131 2006년03월27일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2004075775 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
조마 테크놀로지 리미티드
미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트 2910 조마 (유에스) 엘엘씨 씨/오
노바르티스 아게
스위스 바젤 씨에이치-4056 리크트스트라세 35
(72) 발명자
리우 청
미국 캘리포니아주 94803 리치몬드 브리스틀콘 드라이브 2266
두테르-라인하르드 마자
미국 캘리포니아주 94501 알라메다 클린톤 애버뉴 1633
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김성기, 김진희

전체 청구항 수 : 총 16 항 심사관 : 한상일

(54) 발명의 명칭 **가용성 인간 M-C S F 수용체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 가용성 인간 M-CSF 수용체와 함께, 이러한 수용체를 함유하는 약학 조성물, 약학 조성물을 함유하는 키트, 및 골용해성 질환을 앓고 있는 피험체에서 골 손실 등과 같은 M-CSF와 관련된 질병 및 질환의 진단 및 치료 방법을 제공한다.

(72) 발명자

쿠니치 존

미국 캘리포니아주 94662-8097 에머리빌 피.오.박스 8097

카바노흐 미카엘

미국 캘리포니아주 94662-8097 에머리빌 피.오.박스 8097

특허청구의 범위

청구항 1

암의 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자 유래의 체액 샘플을 분석하는 단계를 포함하고, 가용성 인간 M-CSF 수용체(shM-CSFR)의 농도를 측정하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 체액 샘플은 소변, 혈장 또는 혈청으로 구성된 군에서 선택되는 방법.

청구항 3

암의 예후의 결정에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자 유래의 체액 샘플을 분석하는 단계를 포함하고, 가용성 인간 M-CSF 수용체의 농도를 측정하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 체액 샘플은 소변, 혈장 또는 혈청으로 구성된 군에서 선택되는 방법.

청구항 5

암 치료법의 모니터링에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 환자 유래의 체액 샘플을 분석하는 단계를 포함하고, 가용성 인간 M-CSF 수용체의 농도를 측정하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 체액 샘플은 소변, 혈장 또는 혈청으로 구성된 군에서 선택되는 방법.

청구항 7

제1항, 제3항 또는 제5항 중 어느 하나의 항에 있어서, 암은 유방암, 폐암 신장암, 다발성 골수종, 갑상선암, 전립선암, 선암종, 백혈병 및 림프종을 비롯한 혈액 세포 악성 종양; 두경부암; 식도암, 위암, 결장암, 장암, 직결장암, 직장암, 췌장암, 간암, 담관암 또는 담낭암을 비롯한 위장암; 난소 암종, 자궁 내막암, 질암 및 자궁 경부암을 비롯한 여성 생식기의 악성 종양; 방광암; 신경아세포종을 비롯한 뇌암; 육종, 골육종; 및 악성 흑색종 또는 편평 세포 암을 비롯한 피부암으로 구성된 군에서 선택되는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 암은 유방암인 방법.

청구항 9

(a) 가용성 인간 M-CSF 수용체의 농도에 대해 여성 환자 유래의 체액 샘플을 분석하는 단계를 포함하고, 여기서 가용성 인간 M-CSF 수용체의 농도가 한계치보다 높은 것은 환자가 가임기일 수 있음을 의미하고, 농도가 상기 한계치보다 낮은 것은 환자가 가임기가 아닐 수 있음을 의미하는 것인 여성의 월경 주기의 모니터링 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 체액 샘플은 소변, 혈장 또는 혈청으로 구성된 군에서 선택되는 방법.

청구항 11

(a) 가용성 인간 M-CSF 수용체에 특이적으로 결합하는 제1 항체; 및

(b) 기지량의 M-CSFR을 함유하는 M-CSFR 표준물

을 포함하는 키트.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 제1 항체는 검출가능한 표지에 결합된 키트.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 표지는 효소인 키트.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 효소가 검출가능한 신호를 방출시키는 기질을 추가로 포함하는 키트.

청구항 15

제11항에 있어서, 가용성 인간 M-CSF 수용체에 결합하는 제2 항체를 추가로 포함하는 키트.

청구항 16

제11항에 있어서, 상기 제1 항체에 결합하는 제2 항체를 추가로 포함하는 키트.

청구항 17

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 M-CSF에 결합할 수 있는 인간 M-CSF에 대한 수용체의 천연 발생적인 가용성 단편, 상기 가용성 단편을 치료법에 사용하는 방법, 및 환자 샘플에서 상기 수용성 단편을 검출하여 질환 및 병태를 진단하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 해마다 대략 1.4백만 명의 새로운 암 환자가 발생하고, 약 0.6백만 명이 암으로 인해 사망한다. 검출법 및 치료법의 개선으로, 암환자 중 다수는 상당 기간 동안 생존할 수 있게 되었다. 2002년 1월 1일 현재, 암 생존자는 대략 10.1백만 명으로 추정되는데, 이는 전체 환자 집단 중 약 3.4%에 해당되는 것이다. 이들 암 생존자들에 있어, 가장 공통된 암 부위는 유방(22%), 전립선(18%), 직결장(10%) 및 여성 생식기(10%)이다.

[0003] 일반적으로, 암은 그 진행을 초기에 검출하지 못하면 암 이병률 및 사망률이 급격하게 증가된다. 치료법의 결정은 대체로 진단 시 암의 병기와 연관된다. 따라서, 암의 진단, 병기 결정, 예후 예측, 및 치료 동안 암의 진행 또는 퇴행을 모니터링하기 위해 정확하면서, 감도가 높은 방법이 상당히 요구되고 있다.

[0004] 마크로파지 콜로니 자극 인자(M-CSF 또는 CSF-1)는 마크로파지 및 이의 전구체 및 파골세포 및 이의 전구체의 생존, 증식 및 분화를 조절한다. M-CSF 활성은 M-CSF와 이의 멤브레인 결합 수용체(M-CSFR)의 유전자 발현 조절 기전을 통해서 뿐만 아니라, 수용체 매개 엔도사이토시스, 대사 과정, 및 하류 신호 전달 억제를 통해서 엄격하게 제어된다.

[0005] M-CSF는 기질 세포, 골아세포 및 기타 세포에서 발현된다. 이는 또한 유방, 자궁 및 난소 종양 세포에서도 발현된다. 이들 종양에서 발현량은 높은 병기 및 좋지 못한 예후와 상관 관계가 있다(Kacinski Ann. Med. 27: 79-85 (1995); Smith 외, Clin. Cancer Res. 1 : 313-25 (1995)). 유방 암종에서, M-CSF 발현은 선관내(침윤전) 암과 대조적으로 침윤성 종양 세포에서 우세하다(Scholl 외, J. Natl. Cancer Inst. 86: 120-6 (1994)). 또한, M-CSF는 유방 종양의 악성 종양으로의 진행을 촉진시키는 것으로 확인되었다(Lin 외, J. Exp. Med. 93: 727-39 (2001)).

[0006] 인간 멤브레인 결합 M-CSF 수용체는 c-fms 원암유전자가 암호화하고, 골수 및 분화된 혈액 단핵 세포에서 발현되는 단백질 티로신 키나제 트랜스멤브레인 수용체로서, I형 멤브레인 단백질이다. M-CSF 수용체는 Tyr 단백질 키나제 패밀리 및 CSF-1/PDGF 수용체 서브패밀리에 속한다. 이는 다섯개의 Ig 유사 C2형(면역글로불린 유사) 도메인, 하나의 트랜스멤브레인 도메인, 및 2개의 키나제 도메인을 갖는 세포내 단속적인 Src 관련 도메인을 함유한다. M-CSF는 생물학적 효능을 발현하기 위해 대체로 이의 수용체에 결합한다. c-fms에 M-CSF가 결합하면 수용체의 동종 이량체화가 일어나고, 세포질 키나제 도메인이 활성화되며 그 결과 자기 인산화 및 다른 세포 단백질의 인산화가 야기된다. 이러한 이벤트는 JAK/STAT, P13K, 및 ERK 경로를 비롯한 신호 전달 경로의 캐스케이드를 개시시켜서 다양한 세포 반응: 유사분열, 사이토카인 분비, 멤브레인 러플링, 및 M-CSFR의 전사 조절 등이 일어

나게 된다(Hamilton J. A., J Leukoc Biol.,62(2): 145-55 (1997); Hamilton J, A., Immuno Today., 18(7): 313-7(1997); Fixe and Praloran, Cytokine 10: 32-37 (1998)).

[0007] [본 발명의 요약]

[0008] 본 발명의 재료 및 방법은 상기 언급한 요구 및 당 분야의 다른 관련 요구를 충족시킨다. 본 발명의 일 측면에 있어서, 인간 M-CSF(CSF-1) 수용체의 천연 발생적인 가용성 단편(들)(트랜스멤브레인 도메인이 결여됨)의 발견으로 M-CSF 활성의 중성화가 요구되는 경우에서 치료적 용도를 위해, 이러한 천연 발생적 단편의 재조합 생산이 가능하게 되었다.

[0009] 관련 구체예에서, 본 발명은 상기 언급한 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드를 포함하는 융합 단백질을 제공하며, 여기서 상기 언급한 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드는 상기 언급한 폴리펩티드의 정상적인 생물학적 활성이 손상되지 않도록 결합된다. 융합 단백질의 예로는 면역글로불린 Fc 융합물이 포함된다.

[0010] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 가용성 M-CSF 수용체의 특이적인 천연 발생 형태 또는 융합 단백질을 포함하는 약학 조성물, 및 파골세포 활성 증가와 관련된 대사성 골 질환 또는 암의 치료를 위한 상기 약학 조성물의 사용 방법을 제공한다.

[0011] 다른 구체예에서, 본 발명은 (a) 가용성 M-CSF 수용체의 농도에 대해 환자 유래의 체액 샘플을 분석하는 단계를 포함하고, 여기서 가용성 M-CSF 수용체의 농도가 한계치보다 높은 것은 암의 존재와 상호 관련이 있고, 농도가 상기 한계치보다 낮은 것은 암이 있을 것 같지 않은 것을 의미하는 것인 암의 진단 방법을 제공한다. 본 발명의 다른 구체예에서, (a) 가용성 M-CSF 수용체의 농도에 대해 환자 유래의 체액 샘플을 분석하는 단계를 포함하고, 여기서 가용성 M-CSF 수용체의 농도가 한계치보다 높은 것은 환자의 예후가 좋지 않을 수 있다는 것을 의미하는 것이고, 농도가 상기 한계치보다 낮은 것은 환자의 예후가 좋을 수 있다는 것을 의미하는 것인 암을 앓고 있는 피험체에서 예후의 결정 방법을 제공한다. 다른 구체예에서, (a) 암 치료법으로 치료를 개시하기 전에 가용성 M-CSF 수용체의 농도에 대해 환자 유래의 체액 샘플을 분석하는 단계; 및 (b) 암 치료법으로 치료를 개시한 후 상기 체액 샘플을 분석하는 단계를 포함하고, 여기서 암치료법으로 치료를 개시한 후에 가용성 M-CSF 수용체의 농도가 감소한 것은 환자가 암 치료법의 치료적 유효 용량을 수용하고 있다는 것을 의미하는 것인 암을 앓고 있는 피험체에서 암 치료법의 모니터링 방법을 제공하다.

[0012] 본 발명은 진단, 예후, 또는 암 치료법의 모니터링을 포함하는 전술한 모든 방법을 임의 암에 대해 수행할 수 있다는 것을 고려한다. 암의 예로는 유방암, 폐암, 신장암, 다발성 골수종, 갑상선암, 전립선암, 선암종, 백혈병 및 림프종을 비롯한 혈액 세포 악성 종양, 두경부암, 식도암, 위암, 결장암, 장암, 직결장암, 직장암, 췌장암, 간암, 담관암 또는 담낭암을 비롯한 위장암, 난소 암종, 자궁 내막암, 질암 및 자궁 경부암을 비롯한 여성 생식기의 악성 종양, 방광암, 신경아세포종을 비롯한 뇌암, 육종, 골육종, 및 악성 흑색종 또는 편평 세포암을 비롯한 피부암 등이 포함된다.

[0013] 본 발명의 다른 구체예에서, (a) 가용성 M-CSF 수용체의 농도에 대해 여성 환자 유래의 체액 샘플을 분석하는 단계를 포함하고, 가용성 M-CSF의 농도가 한계치보다 높은 것은 환자가 가임기일 수 있다는 것을 의미하고, 농도가 한계치보다 낮은 것은 환자가 가임기가 아닐 수 있다는 것을 의미하는 것인 여성에서 월경 주기의 모니터링 방법을 제공한다. 관련 구체예에서는, 유사한 단계들을 포함하는 여성에서 내막 증식의 검출 방법으로서, 여기서 가용성 M-CSF 수용체의 농도가 한계치보다 높은 것은 비정상적인 자궁 내막 증식, 예를 들어 자궁 내막증과 상호 관련이 있고, 농도가 한계치보다 낮은 것은 환자의 자궁 내막 증식이 정상적인 상태일 수 있다는 것을 의미하는 것인 방법을 제공한다.

[0014] 암 또는 자궁 내막 증식에 관한 전술한 임의 방법들에 따라 분석할 수 있는 체액 샘플의 예에는 소변, 혈장 또는 혈청 등이 포함된다.

[0015] 관련 구체예에서, 본 발명은 또한 프로세서, 컴퓨터 판독 메모리, 및 전술한 임의 방법을 수행하고/하거나 출력물로서 가용성 M-CSF 수용체의 검출 농도 및 "정상"으로 간주하는 한계치 또는 한계치 농도 범위를 산출하여서 "정상" 범위를 벗어난 농도는 하나 이상의 상술한 병태와 관련시키는 것을 프로세서 상에서 실행하도록 적합화되고 컴퓨터 판독 메모리 상에 저장되는 루틴을 제공한다. 본 발명은 또한 유사한 기능을 수행하기 위한 프로그램 또는 루틴을 포함하는 컴퓨터 판독 매체를 제공한다. 적절한 컴퓨터 시스템, 환경 및/또는 구성의 예로는 개인 컴퓨터, 서버 컴퓨터, 소형 또는 랩탑 장치, 멀티프로세서 시스템, 마이크로프로세서 기반 시스템, 셋탑 박스, 프로그램가능한 소비자 가전 제품, 네트워크 PC, 미니컴퓨터, 메인프레임 컴퓨터, 임의의 상기 시스템 또는 장치를 포함하는 분산 컴퓨팅 환경, 또는 당분야에서 공지인 임의 다른 시스템을 포함한다.

[0016] 본 발명의 다른 구체예에서, (a) 가용성 M-CSF 수용체에 특이적으로 결합하는 제1 항체; 및 (b) 기지량의 M-CSF 수용체를 함유하는 M-CSF 수용체 표준물을 포함하는 키트를 제공한다. 관련 측면에서, 상기 언급한 키트에 있어서, 제1 항체는 검출가능한 표지와 연결되어 제공된다. 추가 관련 측면에서, 표지는 효소이다. 다른 측면에서, 상기 키트는 효소가 검출가능 신호를 방출시키는 기질을 추가로 포함한다. 다른 관련 측면에서, 상기 키트는 가용성 M-CSF 수용체에 결합하는 제2 항체를 추가로 포함한다. 또 다른 관련 측면에서, 상기 키트는 제1 항체에 결합하는 제2 항체를 추가로 포함한다. 다른 관련 측면에서, 상기 언급한 키트는 가용성 M-CSF 수용체에 결합하는 제2 항체를 추가로 포함한다.

[0017] 본 발명의 다른 구체예에서, 가용성 M-CSF 수용체의 농도를 통해서, 대사성 골 질환, 내분비병증(고코르티솔혈증, 생식샘 기능 저하증, 원발성 또는 재발성 부갑상선 기능 항진증, 갑상선 기능 항진증), 고칼슘혈증, 결핍상태(구루병/골연화증, 괴혈병, 영양실조), 만성 질환(흡수 장애 증후군, 만선 신부전(신장성 골이영양증), 만성 간질환(간 골이영양증), 약물(글루코코르티코이드(글루코코르티코이드 유도 골다공증), 헤파린, 알콜), 및 유전성 질환(불완전 골형성증, 호모시스틴뇨증), 암, 골다공증, 보철주변 골손실(예를 들어, 고관절 치환술을 비롯한 보철을 이용한 골 또는 관절 치환술에서 외부 이식물에 의한 것), 관절염 및 류마티스 관절염과 관련된 골염증, 치주 질환, 섬유 이형성증 및/또는 파제트병을 비롯한, 상대적으로 증가된 파골 세포 활성 또는 골 재형성에 필요한 파골세포/골아세포 프로세스와 관련된 골용해성 질환들로 구성된 군으로부터 선택된 질환의 존재를 검출하거나, 예후 또는 중증도를 예측하거나, 또는 진행을 모니터링한다.

발명의 상세한 설명

[0035] 본 발명은 정상적인 멤브레인 결합 수용체인, 인간 M-CSF 수용체의 천연 발생적인 가용성 형태의 발견을 기초로 한다. 상기 수용체의 이러한 가용성 형태(shM-CSFR)의 농도는 암, 파골세포 분화 및 월경 주기와 상호 관련이 있는 것으로 확인되었다. shM-CSFR의 농도 증가는 세포의 증식 상태 및 암의 중증도와 상호 관련되어 있는 것으로 확인되었다.

[0036] 따라서, 본 발명은 세포 증식 상태, 구체적으로 암, 자궁 내피증, 및 여성 가임기 동안 자궁 내층의 축적시에서 발견되는 증식 상태를 검출 또는 모니터링하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 예를 들어, 암 화학요법, 자궁 내막증 치료법 동안 및/또는 이후 또는 월경 주기 동안, 이러한 증식성 상태의 진단, 병기 결정(staging), 예후 또는 중증도 예측, 및 진행 또는 퇴행의 모니터링 방법을 포함한다.

[0037] 다른 측면에서, 본 발명은 또한, 파골세포의 증식 상태, 구체적으로 파골세포 분화를 포함하는 증식 상태를 검출 또는 모니터링하는 방법을 제공한다. 이 방법은 치료법 동안 및/또는 이후에 대사성 골질환의 진단, 병기 결정, 예후 또는 중증도 예측, 및 진행 또는 퇴행의 모니터링 방법을 포함한다.

[0038] 다른 측면에서, 본 발명은 또한 정제된 shM-CSFR을 제공한다. shM-CSFR은 당분야에 공지된 방법에 따라 인간 혈청 또는 소변으로부터 정제하고 서열 분석을 수행하였다. 예를 들어, c-fms에 대한 특이적 항체를 이용한 친화성 크로마토그래피를 이용하여 친화성 정제하였다. 본 발명에서 기술한 가용성 수용체 ELISA 분석법(실시예 1 참조)에서 사용된 항체(Duo Set Elisa development system hM-CSFR(R&D systems, Cat# DY329))를 사용하였다. 다르게 또는 추가적으로, shM-CSFR은 글리코실화된 것으로 확인되었으므로, 글리코실화된 단백질을 정제하는 렉틴 친화성 크로마토그래피 단계를 이용할 수 있다. 또한, 이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 shM-CSFR을 추가 정제할 수 있다. 정제된 shM-CSFR에 대해 단백질 서열 분석을 수행하기 전에, 당분야에서 공지되고 본 발명에서 기술한 방법(예를 들어, 실시예 1)을 이용하여 탈글리코실화 반응을 수행한다. shM-CSFR의 전체 서열을 결정하기 위하여 N 말단 서열분석, 펩티드 맵핑 및 질량 분광법을 조합한 방법을 사용한다.

[0039] 환자 샘플에서 가용성 단백질을 검출하는 임의 방법을 사용하여 상기 기술한 임의 질환 또는 병태와 연관된 shM-CSFR의 존재 또는 이의 상대량을 검출할 수 있다. 특히 바람직한 방법은 당분야에서 공지된 임의 항체 기반 면역분석법, 예컨대 ELISA(Enzyme-Linked ImmunosorbentAssay), RIA(Radioimmunoassay), LIA(Luminescent ImmunoAssay) 및 FIA(Fluorescent ImmunoAssay) 등을 포함한다. 항체(1차 또는 2차)는 방사선 동위원소(예컨대, ^{125}I), 형광 염료(예를 들어, FITC), 또는 형광발생 반응이나 발광 반응을 촉매화하는 효소(예를 들어, HRP 또는 AP) 등을 비롯한, 당분야에서 공지인 임의 표지로 표지화될 수 있다.

[0040] 이러한 방법의 단계에는 shM-CSF 수용체의 존재 또는 상대량에 대해 환자 유래의 체액 샘플을 분석하는 단계가 포함되고, 여기서 가용성 M-CSF 수용체의 농도가 한계치보다 높은 것은 환자가 병태 또는 질환 상태일 수 있음을 의미하고, 농도가 상기 한계치보다 낮은 것은 환자가 이러한 병태 또는 질환 상태가 아닐 수 있다는 것을 의미한다. 감도 및 특이도는 각각 임의 바람직한 수준, 예를 들어, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그

이상으로 설정할 수 있다.

[0041] 임의 환자 샘플을 사용할 수 있지만, 바람직하게는 혈액(전체 혈액, 혈장 또는 혈청 포함), 소변, 타액, 뇌척수액, 복수액, 늑막액, 흡입물, 또는 기타 임의 신체유출물 또는 분비물 등과 같은 체액 샘플이다.

[0042] 본 발명에서 사용되는 용어 "진단"은 질환 또는 질병의 검출 또는, 질환 또는 질병의 정도 또는 병기를 결정하는 것을 의미한다. 용어 "진단"은 또한 질환 또는 질병에 대한 소인의 검출, 약물 치료의 치료 효능 결정, 또는 약물 치료에 대한 반응 패턴의 예측을 포함한다. 본 발명의 진단 방법은 독립적으로 사용하거나, 또는 특정 질환 또는 질병에 대해 의학 분야에서 공지된 다른 진단 및/또는 병기 결정 방법과 병용하여 사용할 수 있다. 따라서, 일 구체예에서, 진단 방법은 본 발명에서 기술한 어떠한 한 방법을 이용하여 환자에서 본 발명의 shM-CSFR의 농도를 검출하고, 환자가 이상 농도로 상기 단백질을 갖는지 확인하는 것을 통해 수행한다. 예시적인 구체예에서, 진단 방법은 질환의 다른 임상적 징후 또는 증상때문에 병태 또는 질환이 있을 것으로 의심되는 환자의 하위세트에 적용된다.

[0043] "예후"는 발병 또는 질환의 가능한 결과에 대한 예상, 및/또는 질환의 성질 및 증상에 의해 나타나는 질환으로부터의 회복에 대한 예측이다. 예를 들어, 좋지 않은 예후는 회복 가망이 있을 듯하지 않고 아마도 사망할 것으로 예측되는데 반해, 좋은 예후는 회복 가망이 있을듯하고 아마도 건강이 완전하게 복귀될 것으로 예측된다.

[0044] 용어 "한계치(threshold)"는 병태의 존재 또는 부재와 관련되어 정의된 조건 하에서 기지의 물질(예를 들어, 분자, 화합물 등)의 정량적 또는 정성적 측정값(예를 들어, 농도, 수준, 활성 등)을 의미한다. 이 방법에 있어서, 다양한 조건하에서 기지 물질의 측정값을 한계치 측정값과 비교하여 환자가 병태를 앓고 있는지에 대한 결정을 보조할 수 있다.

[0045] 용어 "표준"은 정의된 조건하에서 기지 물질(예를 들어, M-CSFR)의 특정한 측정값(예를 들어, 농도)의 설정 범위를 의미한다.

[0046] 용어 "분석하다"는 복합 물질(예를 들어, 혈청 등의 체액) 내의 성분을 검출하거나 또는 측정하는 것을 의미한다. "모니터링"은 진행과정(예를 들어, 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 진행과정)의 효과를 주기적으로 관찰 또는 테스트하는 과정이다. "병기 결정(staging)"은 승인된 의학적 절차를 통해 결정된 임상 병기와 관련이 있는 마커의 농도를 분석하여 암이나 다른 질환의 임상 병기(예를 들어, 초기 병기 또는 진행 병기 등)를 예측하는 것을 의미한다.

[0047] 본 발명에서 사용되는 "종양"은 악성 또는 양성에 관계없이 모든 신생 세포 성장 및 증식, 그리고 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 의미한다.

[0048] 용어 "암" 및 "암성"은 대체로 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 포유류의 생리적 병태를 기술하거나 의미하는 것이다. 암의 예에는 암종, 림프종, 아세포종, 육종 및 백혈병 등이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 구체적인 이러한 암의 예에는 유방암, 전립선암, 결장암, 편평 세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위장암, 췌장암, 교아세포종, 자궁 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 직결장암, 자궁 내막 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 외음부암, 갑상선암, 간암종 및 다양한 유형의 두경부암 등이 포함된다.

[0049] "치료"는 병의 병변을 변경시키거나 진행을 방지하려는 의도로 수행되는 중재이다. 따라서, "치료"는 치료학적 치료 및 예방 또는 방지 수단 둘 다를 의미하는 것이다. 치료를 필요로 하는 것에는 이미 질병이 있는 것과 질병을 예방해야하는 것을 포함한다. 종양(예를 들어, 암) 치료에서, 치료제는 직접적으로 종양 세포의 병변을 줄이거나, 또는 다른 치료제, 예를 들어 방사선 및/또는 화학요법을 통한 치료에 종양 세포가 보다 감응성을 갖도록 할 수 있다. 골용해와 같은 질환의 임상적, 생화학적, 방사선학적 징후 또는 자각 증상을 앓고 있는 환자의 치료에는 이러한 징후의 일부 또는 전부를 완화시키거나, 또는 이러한 질환에 대한 소인을 감소시키는 것 등이 포함된다. 암의 "병변(pathology)"은 환자의 웰빙을 손상시키는 모든 현상을 포함한다. 이는, 비정상적이거나 제어되지 않는 세포 성장, 전이, 이웃 세포의 정상 기능의 간섭, 사이토카인 또는 다른 분비물의 비정상적 수준의 방출, 염증 또는 면역 반응의 억제 또는 악화 등이 포함되며, 이에 제한되지 않는다. 따라서, 치료 후 개선은 종양 크기의 감소, 종양 성장률 저하, 현존하는 종양 세포 또는 전이성 세포의 파괴 및/또는 전이물의 크기 또는 수의 감소 등으로 나타날 수 있다.

[0050] 치료 목적을 위한 "포유류"는 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예컨대 개, 말, 고양이, 소 등을 비롯한 포유류로 분류된 임의 동물을 의미한다. 바람직하게, 포유류는 인간이다.

[0051] 본 발명에서 사용하는 어구 "전이성 암"은 몸의 다른 부분, 특히 뼈로 퍼질 가능성이 있는 암으로 정의된다. 다

양한 암이 뼈로 전이될 수 있지만, 가장 일반적인 전이성 암은 유방암, 폐암, 신장암, 다발성 골수종, 갑상선암 및 전립선암이다. 예를 들어, 뼈로 전이될 가능성이 있는 다른 암에는 선암종, 백혈병 및 림프종을 비롯한 혈액 세포 악성 종양, 두경부암, 식도암, 위암, 결장암, 장암, 직결장암, 직장암, 췌장암, 간암, 담관암 또는 담낭암을 비롯한 위장암, 난소 암종, 자궁 내막암, 질암 및 자궁 경부암을 비롯한 여성 생식기의 악성 종양, 방광암, 신경아세포종을 비롯한 뇌암, 육종, 골육종, 및 악성 흑색종 및 편평 세포 암을 비롯한 피부암 등이지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명은 특히 뼈에서 종양으로 유도된 골파손 병변의 예방 및 치료를 고려한다.

[0052] 본 발명에서 사용되는 어구 "치료적 유효량"은 바람직한 치료 방식에 따라서 투여시 목적하는 치료 또는 예방 효과 또는 반응이 유도되는, 본 발명의 구체예를 위해 적합한 M-CSF 수용체의 치료적 또는 예방적 가용성 단편의 양을 의미한다.

[0053] 본 발명에서 사용되는 인간 "M-CSF"는 문헌 [Kawasaki 외, Science 230:291 (1985), Cerretti 외, Molecular Immunology, 25:761 (1988), 또는 Ladner 외, EMBO Journal 6:2693 (1987)]에 기술된 성숙한 인간 M-CSFα, M-CSFβ 또는 M-CSFɣ 폴리펩티드와 아미노 서열이 실질적으로 동일한 인간 폴리펩티드를 의미하며, 상기 각 문헌은 참조하여 본 발명에 포함시킨다. 이러한 용어는 상기 기술한 바와 같이, 3종의 성숙한 M-CSF가 상이한 아미노산 서열을 가지고, M-CSF의 활성 형태는 이황화 결합 이량체라는 이해를 반영하는 것이며, 따라서, 용어 "M-CSF"가 생물학적 활성 형태를 의미하는 경우에는, 이량체 형태를 지칭하고자 하는 바이다. "M-CSF 이량체"는 이량체화된 두 개의 M-CSF 폴리펩티드 단량체를 의미하며, 동종이량체(두 개의 동일 유형의 M-CSF 단량체로 구성) 및 이종이량체(두 개의 상이한 단량체로 구성) 둘 다를 포함한다. M-CSF 단량체는 미국 특허 제4,929,700호에 기술된 바와 같이 시험관 내에서 M-CSF 이량체로 전환될 수 있으며, 상기 문헌은 참조하여 본 발명에 포함시킨다.

[0054] "가용성 인간 M-CSF 수용체"(shM-CSFR)는 서열 번호 2의 M-CSFR의 세포외 부분과 아미노산 서열이 실질적으로 동일한 폴리펩티드를 의미한다.

[0055] **항-shM-CSFR 항체**

[0056] 단일클론 항체의 일관성 및 특이성 때문에 이를 사용하는 것이 보다 이롭지만, 본 발명의 검출 방법에서는 단일클론 또는 폴리클론 항체를 사용할 수 있다. 설치류 항체 예컨대 쥣과 동물의 단일클론 항체가 진단 방법에서 사용하기 적합하다. 수식어 "단일클론"은 실질적으로 동종의 항체 집단에서 얻어지는 항체의 특징을 의미하는 것이고, 임의 특정 방법을 통한 항체의 생산을 요구하는 것을 의미하는 것이 아니다.

[0057] 항체의 생산에 사용되는 항원은 예를 들어, 완전한 shM-CSFR, 또는 에피토프가 이의 본래 입체 구조로 존재할 수 있게 다른 폴리펩티드에 임의 융합시킨, 바람직한 에피토프를 보유하는 shM-CSFR의 단편일 수 있다. 다르게는 shM-CSFR을 발현하는 세포를 사용하여 항체를 생성시킬 수 있다. 이러한 세포는 M-CSF를 발현하도록 형질전환시키거나 또는 shM-CSFR을 발현하는 다른 천연 발생 세포일 수 있다. 항체를 생성하는데 유용한 shM-CSFR의 다른 형태는 당분야의 당업자에게 자명하다.

[0058] shM-CSFR의 재조합 생산을 위해서, 당분야에서 공지된 바와 같이 이를 암호화하는 핵산을 단리하고 후속 클로닝(DNA의 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능 벡터에 삽입시킨다. 모노클론 항체를 암호화하는 DNA는 통상의 과정(예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브 이용)을 이용하여 용이하게 단리 및 서열 분석한다. 다양한 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로, 신호 서열, 복제 원점, 하나 이상의 선별 마커 유전자, 인핸서 성분, 프로모터 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 항원은 당분야에서 공지된 임의 방법, 예를 들어 문헌 [Kohler 외, Nature, 256:495 [19751)에 처음 기술된 하이브리도마 방법, 또는 재조합 DNA 방법(예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 참조)을 이용하여 단일클론 항체를 생성하는데 사용되거나, 또는 문헌 [Clackson 외, Nature, 352:624628[1991] 및 [Marks 외, J. MoI. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기술된 방법을 이용한 파지 항체 라이브러리로부터 단리한다.

[0060] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터 또는 짧은 꼬리 원숭이 등을 본 발명에서 기술한 바와 같이 면역화시켜서 면역화를 위해 사용된 단백질에 특이적으로 결합하게 되는 항체를 생산하거나, 또는 생산할 수 있는 림프구를 유도시킨다. 다르게는, 림프구를 시험관 내에서 면역화시킬 수 있다. 이어 적절한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용하여 림프구를 골수종 세포와 융합시켜서 하이브리도마 세포를 형성시킨다(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59- 103 (Academic Press, 1986)).

[0061] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를 융합되지 않은 모골수종 세포의 생존 또는 성장을 억제하는 하나 이상의 물질을 바람직하게 함유하는 적절한 배양 배지에 접종하고 성장시킨다. 예를 들어, 모골수종 세포가 효소 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(HGPRT 또는 HPRT)가 결핍되어 있으면, 하이브리도마용 배양 배지에는 대체로 HGPRT-결핍 세포의 성장을 억제하는 물질인 하이포잔틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함시킨다(HAT 배지).

[0062] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합되어, 선별된 항체 생산 세포가 안정하게 고농도로 항체를 생산하도록 지원하고, 배지에 감응성인 것들이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주에 의한 인간 단일클론 항체의 생산에 대해 또한 기술되어 있다(Kozbor, J. Immunol., 133: 3001(1984); Brodeur 외, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). 예시적인 쥣과 동물 골수종 세포주는 Salk Institute Cell Distribution Center(미국, 캘리포니아, 샌디에고 소재)에서 입수가능한 MOP-21 및 M.C.-11 마우스 종양 유래의 세포주, 및 American Type Culture Collection(미국, 메릴랜드, 락빌 소재)에서 입수가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포 유래의 세포주 등을 포함한다.

[0063] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 항원에 대한 단일클론 항체의 생산에 대해 분석한다. 바람직하게, 하이브리도마 세포가 생산한 단일클론 항체의 결합 특이성은 면역 침강법 또는 시험관 내 결합 분석법, 예컨대 방사선 면역분석법(RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석법(ELISA) 등을 통해 측정한다. 단일클론 항체의 결합 친화력은 예를 들어 Scatchard 분석법(Munson 외, Anal. Biochem., 107:220 (1980))을 통해 측정한다.

[0064] 목적하는 특이성, 친화력 및/또는 활성을 갖는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 동정한 후, 이 클론을 제한 희석 과정을 통해 서브클로닝하고 표준 방법을 통해 성장시킬 수 있다(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103(Academic Press, 1986)). 이러한 목적에 적합한 배양 배지에는 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지가 포함된다. 또한, 하이브리도마 세포는 동물 내 복수 종양으로서 생체 내에서 성장시킬 수 있다. 서브클론에서 분비되는 단일클론 항체는 통상의 면역글로불린 정제법 예컨대 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기 영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피 등을 통해 배양 배지, 복수액, 또는 혈청으로부터 적절하게 분리시킨다.

[0065] 용어 "항체"는 광범위한 의미로 사용되며 완전하게 회합된 항체, 단일클론 항체, 폴리클론 항체, 다특이성 항체(예를 들어, 이중특이성 항체), 항원에 결합할 수 있는 항체 단편(예를 들어, Fab', F'(ab)2, Fv, 단쇄 항체, 디아바디), 키메라 항체, 인간화 또는 인간 유래 항체, 및 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 한 상기의 것을 포함하는 재조합 펩티드 등이 포함된다.

[0066] 키메라 또는 인간화 항체는 마우스 단일클론 모항체에 비하여 인간에서 면역원성이 떨어지기 때문에, 과민증의 위험성이 덜하게 인간 치료에 사용할 수 있다. 따라서, 이들 항체는 인간에 대한 생체내 투여를 포함하는 치료 분야에서 바람직할 수 있다.

[0067] 마우스 단일클론 항체의 가변 Ig 도메인이 인간 불변 Ig 도메인에 융합된 키메라 단일클론 항체를 당분야의 공지 표준 방법을 이용하여 생성할 수 있다(예를 들어 문헌 [Morrison, S. L. 외, (1984) Chimeric Human Antibody Molecules; Mouse Antigen Binding Domains with Human Constant Region Domains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6841-6855; 및 Boulianne, G. L. 외, Nature 312, 643-646. (1984)] 참조). 비록 일부 키메라 단일클론 항체가 인간에서 면역원성이 덜한 것으로 확인되었지만, 마우스 가변 Ig 도메인은 여전히 상당한 인간 항마우스 반응을 일으킬 수 있다.

[0068] 인간화 항체는 예를 들어 (1) 인간 골격 및 불변 영역 상에 인간이외의 상보성 결정 영역(CDR)을 그라프팅시키는 방법(당분야에서는 "CDR 그라프팅"을 통한 인간화로 알려진 방법), 또는 다르게는 (2) 인간이외의 전체 가변 도메인으로 이식하지만, 표면 잔기의 교체를 통해서 인간 유사 표면으로 "피복(cloaking)"시키는 방법(당분야에서는 "베니어링"이라고 하는 방법) 등을 포함하는 다양한 방법으로 생성시킬 수 있다. 본 발명에서, 인간화 항체는 "인간화" 및 "베니어링된" 항체 둘다를 포함하게 된다. 이들 방법은 예를 들어, 문헌 [Jones 외, Nature 321:522 525(1986); Morrison 외, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81:6851 6855(1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44:65 92(1988); Verhoeyer 외, Science 239:1534 1536(1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489 498(1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169217(1994); and Kettleborough, CA. 외, Protein Eng. 4(7):773 83(1991)] 등에 개시되어 있으며, 이들 각각을 본 발명에서 참조하여 포함시킨다.

[0069] **shM-CSFR의 검출 방법**

[0070] 본 발명은 shM-CSFR에 특이적으로 결합하는 항체와 생물학적 샘플을 접촉시키는 단계 및 shM-CSFR에 결합된 항

체 또는 미결합 항체를 검출하는 단계를 포함하는 생물학적 샘플에서 shM-CSFR을 검출하는 방법을 제공한다. 이들의 상대량은 샘플 내 shM-CSFR의 양과 상호 관련이 있다. 항체는 검출가능한 표지로 직접적으로 또는 간적접으로 표지화된다.

[0071] 적절한 검출가능 표지는 다양한 효소, 결합기, 형광 물질, 발광 물질 및 방사선 물질 등을 포함한다. 효소 표지의 예로는 홀스래디시 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, 베타-갈락토시다제 또는 아세틸콜린에스터라제 등이 포함되고, 결합기 착체의 예로는 스트렙타비딘/바이오틴 및 아비딘/바이오틴이 포함되며, 형광 표지의 예로는 엄벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 파이코에리쓰린 등이 포함되며, 발광 표지의 예로는 루미놀이 포함되고, 방사선 표지의 예에는 $^{125}1$, $^{131}1$, ^{35}S 또는 ^{3}H가 포함된다.

[0072] RIA(방사선 면역 분석법)에서, shM-CSFR은 검출가능 표지에 결합된 shM-CSFR 표준물 및 미표지화된 항-shM-CSFR 항체를 이용한 경쟁적 면역 분석법을 통해 검출할 수 있다. 생물학적 샘플, 표지화된 shM-CSFR 표준물 및 항-shM-CSFR 항체를 배합하고 미표지화된 항체에 결합된 표지화된 항-shM-CSFR 표준물의 양을 측정한다. 생물학적 샘플 내 shM-CSFR의 양은 항-shM-CSFR 항체에 결합된 표지화된 shM-CSFR 표준물의 양에 반비례한다.

[0073] ELISA 분석법은 우선 shM-CSFR에 특이적인 항체, 바람직하게는 단일클론 항체를 제조하는 단계를 포함한다. 또한, 일반적으로, shM-CSFR에 특이적으로 결합하는 리포터 항체를 제조한다. 리포터 항체는 검출가능한 시약 예컨대 방사성 시약, 형광 시약 또는 효소 시약, 예를 들어 홀스래디시 퍼옥시다제 효소(HRP) 또는 알칼리성 포스파타제(AP) 등에 부착된다. ELISA를 수행하기 위해서, shM-CSFR에 특이적인 항체를 항체가 결합하는 고상 지지체, 예를 들어 폴리스티렌 디쉬 상에서 항온 반응시킨다. 상기 디쉬 상의 임의 유리 단백질 결합 부위는 비특이적 단백질 예컨대 소 혈청 알부민(BSA)과 항온반응시켜서 피복시킨다. 다음으로, 분석할 샘플을 디쉬에서 항온 반응시키고, 그 시간 동안 shM-CSFR은 폴리스티렌 디쉬에 부착된 특이적 항체에 결합한다. 미결합 샘플은 완충액으로 세정해낸다. shM-CSFR에 특이적이고 홀스래디시 퍼옥시다제에 결합된 리포터 항체를 디쉬에 위치시키며, 그 결과 shM-CSFR에 결합된 임의 단일클론 항체에 리포터 항체가 결합한다. 이후 미부착 리포터 항체를 세정해낸다. 이어서, 발색 물질을 포함하는 퍼옥시다제 활성용 시약을 상기 디쉬에 첨가한다. 항-shM-CSFR 항체에 결합된 고정 퍼옥시다제가 유색 반응 생성물을 생성시킨다. 주어진 시간 기간에 현상된 색의 양은 샘플에 존재하는 shM-CSFR 단백질의 양에 비례한다. 대체로 정량적 결과는 표준 곡선과 대조하여 얻는다.

[0074] 이러한 일반적인 분석법은 이하에 기술된 장치 및 키트를 비롯한 다양한 형태로 사용할 수 있다.

[0075] **shM-CSFR 검출용 장치 및 키트**

[0076] 일 구체예에서, 분석 장치는 경우에 따라 외피에 싸여진, 측면 유동 테스트 스트립이다. shM-CSFR에 대한 제1 표지화 항체는 용액 중에 있는 반면, shM-CSFR에 대한 제2 항체는 테스트 스트립 상에 고정된다. shM-CSFR을 함유하는 환자 샘플을 두 항체와 접촉시키면, 항체-표적-항체 샌드위치 복합체가 형성되고, 고상 지지체에 고정된 최종 복합체는 표지를 통해 검출가능하다. 이어 테스트 스트립을 판독기에 삽입하면, 여기서 복합체의 표지 유래 신호를 측정한다. 결과는 양성 또는 음성 결과이거나, 샘플 내 shM-CSFR 농도의 정량적 측정치이며, 이는 질환 또는 질병의 존재 또는 위험율에 대한 최종 지표와 관련된다. 전체적인 과정은 자동화되고/되거나 컴퓨터로 제어될 수 있다. 다르게는, 테스트 스트립을 적절한 색상의 시각 표준물과 비교하여 육안으로 판독할 수 있다. 이러한 테스트는 shM-CSFR ELISA와 유사한 임상적으로 관련된 정보를 제공하지만, 시간이 상당히 덜들고 관리 시점에 대한 정보를 제공한다.

[0077] 다른 구체예에서, 장치는 제한된 표지화 항체 결합 부위에 대해서 체액 샘플 내 shM-CSFR이 고정된 shM-CSFR과 경쟁하는 면역 분석 방법을 이용한, shM-CSFR 고속 검출법에서 사용하는 테스트 스트립이다. 이 분석 과정에서, 체액 샘플을 표지화된 항체-염료 접합체와 혼합하고 다공성 멤브레인을 따라 이동시킨다. shM-CSFR의 농도가 테스트의 검출 한계 이하인 경우, 미결합 항체-염료 접합체가 멤브레인에 고정된 shM-CSFR 접합체에 결합하여, "음성" 테스트 구역에 색상 밴드가 생성된다. 반대로, shM-CSFR 농도가 검출 한계치이거나 그 이상인 경우, 유리 shM-CSFR이 항체-염료 접합체에 결합하여, 항원-항체 복합체가 형성되고, 그에 따라 색상 밴드의 현상을 방지하는 것을 통해서, 멤브레인 상에 고정된 shM-CSFR 접합체와 경쟁한다. 샘플 내 shM-CSFR 농도와 무관하게, 색상 밴드는 각 대조 구역에서 생성되는데, 이는 시약이 화학적으로 활성이 있다는 것을 증명하는 정량적 대조 측정치로서의 역할을 한다.

[0078] shM-CSFR 농도를 보다 정량적으로 측정하기 위해, 색상 강도의 구배를 기반으로 하는, 유사한 방법을 사용할 수 있다.

[0079] 질환 상태, 예후 등을 측정하는데 사용되는 한계치 설정 방법은 당분야에서 공지되어 있다. 예를 들어, 충분한 대표수의 정상 피험체(예를 들어, 검출할 병태가 없는 건강 집단) 유래의 체액 샘플 중 shM-CSFR 단백질 농도를 충분한 대표수의 질환이 있는 개체 유래(예를 들어, 질환 또는 병태가 있는 것으로 확증된 집단) shM-CSFR 단백질 농도에 대하여 분석한다. 대부분의 질환 집단으로부터 대부분의 정상 집단을 구분짓는 한계치 컷오프를 측정할 수 있다. 다르게는, 음성 결과, 불확실 결과 및 양성 결과에 대한 유용한 적정값을 데이타로부터 결정할 수 있다. 예를 들어, 대부분의 정상 집단의 shM-CSFR 농도를 포함하지만, 거의 모든 질환 집단은 배제한 정상 범위(음성 결과의 지표)를 결정할 수 있다. 유사하게, 대부분의 질환 집단의 shM-CSFR 농도는 포함하지만 거의 모든 정상 집단은 배제한 양성 결과의 범위 지표를 결정할 수 있다.

[0080] 사전 결정된 한계치보다 높은(또는 적절하게는 낮은) shM-CSFR 단백질의 측정 농도는 질환과 shM-CSFR 단백질의 관련성에 대한 지표이다. 한계치를 이용하기 위해서, 정상 집단 유래 샘플에 대해 건강하지 못한 집단 유래 샘플과 동일한 프로토콜(즉, 제조 및 보관)을 적용해야 한다. 정상 집단 유래 샘플에서 측정된 shM-CSFR 단백질 농도 범위를 검토하면, 건강하지 않은 집단 유래 샘플에서 측정한 shM-CSFR 단백질 농도 범위를 고려하여 비교, 예후 및 진단하기 위한 적절한 한계치 수준 및 바람직한 특이성 또는 감응성을 판단하는 것이 당업자에게 분명해진다.

[0081] 이상적으로, 이러한 한계치의 측정은 모든 의학적 인자 및 유행병학적인 인자를 고려한다. 고려해야할 인자들에는 실험실 테스트의 임상 목적을 비롯하여, 높은 양성 예측치를 가질 필요가 있거나, 또는 높은 음성 예측치를 가질 필요가 있건간에, 테스트 집단 내 질환의 유병률 등도 포함된다.

[0082] 또한, 본 발명의 범주에는 키트도 포함된다. 대표적인 키트는 경우에 따라 검출가능한 표지에 결합되는, shM-CSFR에 특이적으로 결합하는 제1 항체, 및 기지량의 M-CSFR을 함유하는 M-CSFR 표준물을 포함할 수 있다. 다른 성분으로는 shM-CSFR 또는 제1 항체에 결합하는 검출가능한 표지에 결합된 제2 항체 등과 같은 면역 분석법을 수행하는데 필요한 시약이 선택적으로 포함될 수 있고, 표지가 효소인 경우, 키트는 또한 효소가 검출가능 신호를 방출시키는 기질을 포함할 수 있다.

[0083] **병용 치료법**

[0084] M-CSF와 관련된 질환 또는 질병(예를 들어, 암, 암 전이 및/또는 골용해 등)에 대한 효능을 개선시키도록 둘 이상의 M-CSFR 길항제(예를 들어, shM-CSFR 및 항-M-CSF 항체)를 함께 혼합하는 것이 이로울 수 있다. 하나 이상의 M-CSF 길항제를 포함하는 조성물을 암 전이 및/또는 암 전이와 관련된 골손실을 앓거나, 또는 이에 걸릴 소인이 있는 포유류 또는 인간에게 투여할 수 있다. 치료제들이 치료 효능을 발휘하는 시간 기간이 겹치는 한, 두 치료제의 동시 투여는 치료제를 동일 경로를 통해서 또는 동시에 투여하는 것을 요구하지 않는다. 다른 날 또는 다른 주에 투여하는 것과 같은, 동시 또는 순차적 투여를 고려할 수 있다. 화학 요법 또는 방사선 치료법과 shM-CSFR 치료법을 병용하여 수행할 수도 있다.

[0085] **투여 및 제조**

[0086] 본 발명의 방법을 실시하는데 사용되는 shM-CSFR은 바람직한 전달 방법에 적합한 담체를 포함하는 약학 조성물로 제형화할 수 있다. 적절한 담체는 shM-CSFR과 배합시, shM-CSFR의 항종양 기능을 보유하고 피험체의 면역계에 비반응성인 임의의 물질을 포함한다. 예로는 임의의 다수의 표준 약학 담체 예를 들어 멸균된 인산 완충 식염수 용액, 세균발육저지된 물 등이 포함되지만 이에 제한되는 것은 아니다. 다양한 수성 담체를 사용할 수 있는데, 예를 들어 물, 완충수, 0.4% 염수, 0.3% 글리신 등이 있으며, 안정성 강화를 위한 다른 단백질, 예컨대 적절하게 화학 변형된, 알부민, 지단백질, 글로불린 등을 포함할 수 있다.

[0087] 바람직한 순도의 약물을 선택적인 생리적 허용 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합하여((Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), 동결 건조 제형 또는 수용액의 형태로 보관을 위한 약물의 치료 제형을 제조한다. 허용가능 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 용량 및 농도에서 수용체에게 비독성인 것이고, 인산, 시트레이트 및 기타 유기산 등의 완충제, 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 산화 방지제, 보존제(예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 헥사메토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜, 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 레소르시놀, 시클로헥산올, 3-펜탄올 및 m-크레솔 등), 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩티드, 단백질 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린, 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리돈, 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신, 글루코스, 만노스 또는 덱스트린을 비롯한 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물류, 킬레이트화제 예컨대 EDTA, 당류 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는

솔비톨, 염 형성 반대 이온 예컨대 나트륨, 금속 착체(예를 들어, Zn-단백질 착체) 및/또는 비이온성 계면 활성제 예컨대 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 등을 포함한다.

[0088] 본 발명의 조성물은 암의 진행, 암 전이 및/또는 골용해를 방지하거나 또는 적어도 부분적으로 정지시키는데 충분한 양으로 포유류에게 투여된다. 이를 수행하기 위해 적절한 양을 "치료적 유효 용량"으로 정의한다. 상기 조성물의 단독 또는 다중 투여는 치료 담당의가 선택한 용량 수준 및 패턴에 따라 수행할 수 있다. 질환의 예방 또는 치료를 위해서, 적절한 용량은 상기 정의된 바와 같은 치료할 질환의 유형, 질환의 중증도 및 진행 정도, 약물의 투여 목적(예방 또는 치료 목적인가에 따름), 사전 치료법, 환자의 임상 병력 및 약물에 대한 반응성, 및 참관의의 판단에 따라 좌우된다.

[0089] **비치료적 용도**

[0090] 본 발명의 shM-CSFR은 또한 M-CSF의 친화성 정제제로서 또는 M-CSF 단백질의 진단 분석, 예를 들어 특정 세포, 조직 또는 혈청에서 이의 발현 검출법에서 사용할 수도 있다. shM-CSFR은 또한 생체 내 진단 분석법을 위해 사용할 수도 있다. 일반적으로, 이러한 목적을 위해서, shM-CSFR을 방사성 핵종(예컨대, ^{111}In, ^{99}Tc, ^{14}C, ^{131}I, ^{125}I, ^{3}H, ^{32}P 또는 ^{35}S)을 이용하여 표지화하여, 면역 섬광 조영술을 이용하여 종양의 위치를 확인할 수 있다.

[0091] 본 발명의 shM-CSFR은 임의 공지 분석 방법, 예컨대 경쟁적 결합 분석법, 직접 및 간접 샌드위치 분석법, 예컨대 ELISA, 및 면역 침강 분석법 등에 사용할 수 있다. 문헌 [Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of 50 Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc. 1987)]을 참조한다.

[0092] 편의상, M-CSF를 검출하기 위해 사용하는 경우 본 발명의 shM-CSFR은 키트, 즉 기지량의 M-CSF를 함유하는 M-CSF 표준물을 선택적으로 포함하고, 진단 분석을 수행하기 위한 설명서와 함께, 사전 결정된 양의 시약들이 포장된 조합물로 제공될 수 있다. 또한, 안정화제, 완충제(예를 들어, 블록 완충제 또는 용해 완충제) 등의 다른 첨가제를 포함할 수도 있다. 다양한 시약들의 상대량은 분석의 감응성을 실질적으로 최적화하는 시약의 용액 중 농도가 제공되도록 광범위하게 다양할 수 있다. 특히, 용해시 적절한 농도의 시약 용액을 제공할 수 있는 부형제를 포함시켜서, 시약들을 건조 분말, 일반적으로 동결 건조물로서 제공한다.

실 시 예

[0093] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 구체적으로 설명하지만, 임의 방식으로 본 발명을 한정하려는 의도는 아니다.

[0094] 실시예 1

[0095] 본 실시예에서는 인간 M-CSF에 대한 가용성 수용체의 동정 결과에 대해 기술하고, 이 가용성 수용체가 M-CSF에 결합할 수 있음을 보여준다.

[0096] I. 혈청 샘플에서 가용성 인간 M-CSF 수용체의 동정

[0097] A. 재료 및 방법

[0098] PBS 중 100 ng/㎖의 워킹 희석액(working dilution)으로 하여 포획 항체를 100 ㎕/웰(Duo Set Elisa development system hM-CSFR(R&D systems, Cat# DY329))로 마이크로타이터 평판(R&D systems, Cat# CPO011)에 코팅하였다. 이 평판을 밀봉하고 실온에서 밤새 항온 반응시켰다. 매니폴드 분배기/세정기를 이용하여 세정 완충액(PBS 중 0.05% Tween, pH 7.2~7.4)으로 웰을 3회 세정한 후, 300 ㎕/웰의 블록킹 완충액(PBS 중 1% BSA, 5% 수크로스, pH 7.2~7.4)으로 실온에서 1시간 이상 평판을 블록킹하였다.

[0099] 세정 단계를 반복한 후, 평판에 샘플을 첨가할 준비가 완료되었다. 시약 희석액 중 샘플 또는 표준물 100 ㎕/웰을 첨가하였다. 평판을 부착제로 덮고 실온에서 2시간 동안 항온 반응시킨 후, 3회 반복 세정하였다. 100 ㎕의 검출 항체(Duo Set Elisa development system hM-CSFR(R&D systems, Cat# DY329))를 첨가한 후, 이 평판을 덮고 실온에서 2시간 동안 항온 반응시킨 후, 3회 반복 세정하였다.

[0100] 다음으로, 스트렙타비딘 HRP(Duo Set Elisa development system hM-CSFR(R&D systems, Cat# DY329))의 워킹 희석액 100 ㎕를 첨가하고, 암실 내 실온에서 20분간 항온 반응시켰다. 3회 반복 세정 후, 평판을 웰당 100 ㎕ 기질 용액(시약 A 및 B의 1:1 혼합물(R&D systems, Cat# DY999))으로 5분간 발색시킨 후, 50 ㎕ 정지 용액(2N H_2SO_4)을 첨가하고, 완전하게 혼합되도록 평판을 가볍게 두드렸다. 정지 용액을 첨가한 직후에 450~540 nm에서 광학 밀도로 최종 판독하였다.

[0101] B. 결과

[0102] 혈청 샘플 중 가용성 인간 M-CSF 수용체의 존재를 확인하기 위하여 ELISA 분석법을 사용한 경우 인간 혈청 샘플에서 강한 양성 신호가 검출되었다. 이 ELISA 분석법에서 사용된 포획 항체 및 검출 항체 둘 모두 인간 M-CSF 수용체의 세포외 도메인에 대해 특이적이었다. 도 2에 도시한 바와 같이, 인간 혈청 샘플에서 강한 양성 신호가 검출되었다. 이 신호는 인간 혈청의 농도에 의존적이었다. 포획 항체를 사용하지 않은 경우 신호가 존재하지 않았다.

[0103] 기준 단백질로서 재조합 인간 M-CSF 수용체 및 인간 항체 Fc 단편 융합 단백질을 이용하여, 가용성 인간 M-CSF 수용체의 농도를 정량하기 위한 표준 곡선을 확립하였다(도 1). ELISA 분석법을 이용시, 인간 혈청 내 가용성 수용체의 양은 기준물로 c-fms 인간 Fc 융합 단백질을 사용하여 산출하였다. 약 0.5 ㎍/㎖의 가용성 인간 M-CSF 수용체가 인간 혈청 중에 존재하는 것으로 확인되었다(도 2).

[0104] II. 가용성 M-CSF 수용체에 대한 ELISA 결합 분석법

[0105] A. 재료 및 방법

[0106] PBS 중 100 ng/㎖의 워킹 희석액(working dilution)으로 하여 포획 항체를 100 ㎕/웰(Duo Set Elisa development system hM-CSFR(R&D systems, Cat# DY329))로 마이크로타이터 평판(R&D systems, Cat# CPO011)에 코팅하였다. 이 평판을 밀봉하고 실온에서 밤새 항온 반응시켰다. 매니폴드 분배기/세정기를 이용하여 세정 완충액(PBS 중 0.05% Tween, pH 7.2~7.4)으로 웰을 3회 세정한 후, 300 ㎕/웰의 블록킹 완충액(PBS 중 1% BSA, 5% 수크로스 PBS, pH 7.2~7.4)으로 실온에서 1시간 이상 평판을 블록킹하였다.

[0107] 세정 단계를 반복한 후, 평판에 샘플을 첨가할 준비가 완료되었다. 시약 희석액 중 샘플 또는 표준물 100 ㎕/웰을 첨가하였다. 평판을 부착제로 덮고 실온에서 2시간 동안 항온 반응시킨 후, 3회 반복 세정하였다. 1 ㎍/㎖의 인간 M-CSF를 평판에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 항온 반응시켰다. 100 ㎕의 인간 M-CSF에 대한 검출 항체(HRP-접합된 폴리클론 항-인간 M-CSF 항체; R&D systems, Cat DMC00, part# 890154)를 첨가한 후, 이 평판을 덮고 실온에서 2시간 동안 항온 반응시킨 후, 3회 반복 세정하였다. 평판을 웰당 100 ㎕ 기질 용액(시약 A 및 B의 1:1 혼합물(R&D systems, Cat# DY999))으로 5분간 발색시킨 후, 이어 50 ㎕ 정지 용액(2N H_2SO_4)을 첨가하고, 완전하게 혼합되도록 평판을 가볍게 두드렸다. 정지 용액을 첨가한 직후에 450~540 nm에서 광학 밀도로 최종 판독하였다.

[0108] B. 결과

[0109] 인간 혈청에 존재하는 가용성 수용체는 M-CSF에 결합할 수 있다. 도 3에 도시한 바와 같이, 인간 혈청 샘플의 연속 희석물을 마우스 단일클론 항-인간 c-fms 항체로 코팅된 ELISA 평판에 가하였다. 1 ㎍/㎖의 외생성 인간 M-CSF(네모) 또는 PBS(다이아몬드)를 알칼리 포스파타제 접합된 폴리클론 항인간 M-CSF 항체를 이용하여 인간 M-CSF를 검출하기 전에 첨가하였다. M-CSF의 분명한 결합이 5%가 넘게 인간 혈청에서 확인되었다. 하지만, 인간 혈청 내 가용성 수용체는 재조합 c-fms Fc 융합 단백질과 비교하여 결합 친화력이 보다 낮은 것으로 확인되었다(도 4)[재조합 c-fms Fc 융합 단백질의 결합 친화력은 리간드에 의해 유도된 이량체화로 인해 천연 멤브레인 결합 c-fms의 친화력에 가까운 것으로 여겨진다]. 가용성 수용체의 친화력이 보다 낮은 것은 가용성 수용체는 리간드에 대한 결합 부위가 단지 하나인데 반해, 재조합 c-fms Fc 융합 단백질은 화합력 효과로 인해 결합 부위가 두 개라는 것이 하나의 설명이 될 수 있을 것이다.

[0110] III. 혈청 샘플 유래 인간 M-CSF 수용체의 면역 침강

[0111] A. 재료 및 방법

[0112] 15 ㎖ Falcon 튜브내 10 ㎖ 20% 인간 혈청(Sigma Cat.# S7023, 사전 동결됨)에 500 ㎕ 스트렙타비딘 비드(#20347, Pierce)를 첨가하고, 1시간 동안 적당하게 흔들어주면서 4℃에서 항온 반응시켰다. 이 샘플을 400 rpm에서 5분간 원심분리하고 상등액을 새로운 튜브에 옮겼다. 이 상등액에 10 ㎍ 항-hMCSFR 항체(R&D #BAF 329)를 첨가하고 적당하게 흔들어주면서 4℃에서 1시간 동안 항온 반응시켰다. 500 ㎕ 스트렙타비딘 비드를 첨가한 후, 이 샘플을 4℃에서 흔들어주면서 밤새 항온 반응시켰다. 상기 샘플을 400 rpm에서 5분간 원심 분리시키고 상등액을 새로운 튜브에 옮긴 후, 이 상등액을 동시에 보관하였다. 비드를 에펜도르프 튜브에 옮기고, 각 세정 완충액 #1(0.5 M $LiCl_2$), #2(0.5 M $LiCl_2$/0.5% Triton) 및 #3(10 mM TRIS pH 7.4) 1 ㎖로 1회씩 세정하였다. 마지막 원심 분리 후, 대부분의 세정 완충액을 제거하였다(비드가 거의 건조될 때까지). 이어 이 비드를 500 ㎕ PBS

에 재현탁하였다. 겔(10% Novex)을 러닝시키기 전, DTT가 포함된 5×SDS 샘플 완충액을 첨가하고, 이 샘플을 100℃에서 2분간 비등시켰다.

[0113] 면역 침강된 인간 M-CSF 수용체를 탈글리코실화시키기 위해서, 상기 면역 침강 과정에서 얻은 동결 비드(~200 ㎕)를 1:1의 비율로 200 ㎕ PBS로 희석하였다. 희석된 샘플을 10분간 100℃에서 1×변성 완충액(PNGase F, NEB# P0705S) 중에서 항온 반응시켰다. 1×최종 농도로 G7 반응 완충액(PNGase F, NEB # P0705S), 및 NP40(최종 농도 1%)을 첨가한 후, 샘플을 37℃에서 1시간 동안 5 ㎕ PNGase F와 항온 반응시켰다.

[0114] B. 결과

[0115] 가용성 인간 M-CSF 수용체가 분자량 약 97 KD인 글리코실화된 단백질로서 확인되었다(도 5). 탈글리코실화 후, 가용성 인간 M-CSF 수용체의 분자량은 약 60 KD이었다(도 6).

[0116] 가용성 인간 M-CSF 수용체는 적어도 부분적으로, 인간 M-CSF에 대한 멤브레인 결합 수용체인 인간 c-fms 단백질의 단백질 서열을 공유하는 것으로 확인되었다. 상기 도면들에 도시한 바와 같이, 가용성 인간 M-CSF 수용체는 인간 c-fms 단백질도 인지하는 다중 항체들에 의해 인지될 수 있다. 가용성 인간 M-CSF 수용체의 단백질 서열을 추가로 확인하기 위해서, 다음과 같이 단백질 분석을 수행하였다: 탈글리코실화된 후 가용성 수용체에 해당하는 단백질 밴드를 SDS-PAGE 겔 상에서 확인하였다(도 7의 밴드 #4). 이 밴드의 단백질을 트립신으로 분해하였다. 펩티드 혼합물인 이 분해 산물을 분석하였다. 인간 c-fms 단백질의 세포외 도메인의 단편에 정확한 분자량 및 아미노산 서열(서열 번호 1)을 갖는 한 폴리펩티드가 확인되었다(도 8). 이러한 증명 결과는 가용성 인간 M-CSF 수용체가 인간 M-CSF에 대한 멤브레인 결합 수용체인 인간 c-fms 단백질과 단백질 서열을 공유한다는 것을 의미하는 것이다.

[0117] 실시예 2

[0118] 이 실시예는 인간 소변 샘플에서 가용성 M-CSF 수용체가 발견되었음을 보여준다. 이 실시예는 또한 상기 수용체가 정상 피험체 및 유방암 환자 유래의 두 혈청에 모두 존재하고, 가용성 M-CSF 수용체 농도가 M-CSF 농도와 상호 관련있음을 보여준다. 마지막으로, 이 실시예에서는 가용성 M-CSF 수용체가 영장류에서도 발견된다는 것을 보여준다.

[0119] I. 가용성 인간 M-CSF 수용체가 소변 샘플에서도 발견되었다.

[0120] 실시예 1에 기술한 바와 동일한 ELISA 셋업을 사용하여, 건강한 인간 지원자에서 다수의 소변 샘플을 채취하고 가용성 인간 M-CSF 수용체의 존재에 대해 분석하였다. 성인 여성(연령 25 내지 66세), 성인 남성(연령 35 내지 70세) 및 3세 내지 9세의 어린이에서 다양한 농도로 가용성 인간 M-CSF 수용체가 검출되었다. 가용성 인간 M-CSF 수용체의 농도 정량화는 기준물로서 재조합 c-fms 인간 Fc 융합 단백질을 이용하여 결정하였다(도 9).

[0121] 한 명의 여성 피험체의 월경 주기 전반에 걸쳐 매일 소변 샘플을 채취하였다. 오전의 최초 배설물을 샘플로 채취하고 -20℃에서 동결시켰다. 모든 샘플은 동일한 날에 분석하였다. 본 발명에서 기술한 바와 같이 가용성 수용체를 분석하였다. 도 10에 도시한 바와 같이, 소변 샘플 내 가용성 수용체의 농도는 월경 주기 동안 변동하였다. 이러한 발견으로 가용성 수용체를 월경 주기 동안 진단 마커로서 사용하거나, 또는 임신 테스트에 사용 가능하다.

[0122] II. 유방암 환자에서 M-CSF 농도와 가용성 M-CSF 수용체 농도의 상관 관계

[0123] 다음과 같이 유방암 혈청 샘플에서 가용성 인간 M-CSF 수용체의 농도를 분석하였다. 상기 기술한 바와 같이 ELISA를 통해 가용성 인간 M-CSF 수용체의 존재 여부에 대해 인간 혈청 샘플의 연속 희석액을 분석하였다. 이 ELISA 포맷("정규"로 나타냄)으로 인간 혈청을 분석한 경우 강한 양성 신호가 검출되었다. 대조군으로서, 포획 항체나 검출 항체를 제거하면 신호가 없어졌으며, 이는 상기 신호가 항-인간 c-fms 항체에 대해 특이적이라는 것을 의미한다. 기준물로서 재조합 c-fms 인간 Fc 융합 단백질을 사용하여, 가용성 인간 M-CSF 수용체의 농도를 정량한 바에 따르면 0.5 ㎍/㎖인 것으로 확인되었다.

[0124] 도 11에 도시한 바와 같이, 가용성 수용체의 농도는 환자들 사이에서 다양하였다. 주목할 것은 환자 샘플 내 가용성 수용체의 농도가 상기 기술한 것보다 상당히 낮다는 것이다(도 2). 이는 아마도 혈청 샘플의 제조 및 보관에 사용된 프로토콜이 다르기 때문인 듯하다. 결과적으로, M-CSF 및 M-CSF 가용성 수용체의 농도 비교 결과는 동일한 프로토콜에 따라 채취하고 처리한 샘플들에 대해서만 유효하다. 도 12는 유방암 환자에서의 M-CSF 농도 대 동일 샘플 내 M-CSF 가용성 수용체 농도 간의 선형 상관 관계를 보여준다. 이러한 발견으로 M-CSF 가용성 수용체를 암 진행에 대한 생체마커로서 이용 가능하게 되었다. 또한, M-CSF 가용성 수용체는 M-CSF의 직접 측정이

어려워지는 경우(예를 들어, M-CSF 중성화 항체를 암 치료에 사용하는 경우), 보다 유용한 생체마커가 된다.

[0125] III. 가용성 M-CSF 수용체는 다른 영장류에서도 발견되었다.

[0126] 인간 M-CSF 가용성 수용체에 대해 기술한 상기 ELISA 분석법을 또한 사용하여 다른 동물종 유래의 혈청 샘플을 테스트하였다(도 13). 사이노멀거스(Cynomulgus) 원숭이 및 레서스(Rhesus) 원숭이 혈청 샘플에서 강한 양성 신호가 나타났는데, 이는 가용성 수용체가 존재함을 의미하는 것이다. 사이노 및 레서스 원숭이에 대한 멤브레인 결합 M-CSF 수용체의 단백질 서열은 입수가 불가능하다. 하지만, 이들은 이의 인간 대응체와의 단백질 상동성이 높을 것으로 생각된다. 따라서, 인간 멤브레인 결합 M-CSF 수용체의 세포외 도메인을 인지하는, ELISA 분석에서 사용된 항체도 역시 사이노 및 레서스 원숭이의 것을 인지할 것이다.

[0127] 중요한 것은 영장류 이외의 동물 혈청에서 양성 신호가 나타나지 않는다는 것이 M-CSF 가용성 수용체가 없다는 것을 의미하지 않는다는 것이다. 이는 가용성 수용체의 존재를 검출하기 위해 사용된 ELISA 분석의 항체 특이성에 기인한 결과일 수 있다.

[0128] 실시예 3

[0129] 이 실시예에서는 가용성 인간 M-CSF 수용체의 발현이 파골세포 분화와 밀접하게 연결되어 있다는 것을 보여준다. 이 실시예는 또한 분화된 파골세포만이 가용성 인간 M-CSF 수용체를 발현하고, M-CSF의 제거시에 이의 농도가 증가된다는 것을 보여준다.

[0130] A. 재료 및 방법

[0131] M-CSF 가용성 수용체의 발현을 인간 파골 세포를 이용한 시험관 내 시스템에서 시험하였는데, 여기서 멤브레인 결합 M-CSF 수용체의 발현이 확인되었다. 구체적으로, 파골세포의 분화 과정에서 가용성 수용체의 발현을 실험하였다. 30 ng/㎖ 인간 M-CSF 및 100 ng/㎖ RANKL를 함유한 세포 배양 배지 0.2 ㎖/웰에 10,000 세포/웰로 초대 인간 파골세포 전구체(Cambrex Bio Science Walkersville, Inc. Cat# 2T- 110)를 접종하였다. 세포를 플레이팅한 동일한 날에 1 ㎍/㎖의 테스트 항체를 웰에 첨가하였다. 세포를 5% CO_2의 습윤성 대기에 37℃에서 배양하였다. 7일 경, 보통 이상으로 거대한 다핵 세포로서 파골세포를 위상차 현미경에서 확인하였다. 영양분을 공급하면서 추가 1주일간 계속 배양하였으며, 이 기간 동안 파골세포는 계속적으로 크기가 증가하였다. 배양 종료시, TRAP(tartrate-resistant acid phosphatase)에 대해 세포를 염색시켰는데, 이의 양성 염색은 파골세포의 존재를 의미하는 것이다. 각 웰의 파골세포 수를 광학 현미경하에서 계측하였으며, 현미경의 시야 범위하에서 파골세포의 평균치를 그래프로 도시하였다.

[0132] 파골세포 조건 배지 내 TRAP 활성은 SBS-Science에서 판매하는 BoneTRAP Assay kit(TR201)로 분석하였다. BoneTRAP® Assay(TR201)는 인간 혈청 샘플로부터 골 재흡수를 신속하고 특이적으로 측정하기 위한 고체상 면역고정 효소 활성 분석을 위한 것이다.

[0133] B. 결과

[0134] 도 14에 도시한 바와 같이, M-CSF 가용성 수용체는 파골세포에서 발현되었다. 분화된 파골세포의 조건 배지 내 가용성 수용체의 농도를 측정하였다. 가용성 수용체의 발현은 파골세포에 특이적이었다. M-CSF 중성화 항체, 이 경우에는 Chir-RX1을 이용하여 파골세포의 분화를 억제한 결과 가용성 수용체가 억제되었다.

[0135] 가용성 수용체는 분화된 파골세포에서만 발현되었고, 파골세포 전구체에서는 발현되지 않았다. 시간 경과에 따른 실험 결과를 도시한 도 15a에 따르면, 가용성 수용체의 발현은 파골세포 분화 분석에서 10일경에 시작되었고 12일경에 평탄역에 도달하였다. 이러한 발현 패턴은 도 15b에 도시된, TRAP 활성으로 나타낸 바와 같은 파골세포 분화 패턴과 유사하였다.

[0136] 흥미롭게도, M-CSF 가용성 수용체의 발현은 분화된 파골세포에서 M-CSF를 제거하여 상향 조절된다. 도 16에는 IgG1 대조군 항체 또는 M-CSF 중성화 항체인 Chir-RX1의 첨가 후 24시간 이내의 M-CSF 가용성 수용체의 발현을 도시한 것이다. 이 결과에 의하면 M-CSF 활성이 중성화된 경우 가용성 수용체 발현이 올라가는 것을 분명하게 알 수 있다. 발현 증가는 8일경 시작되어 12일경에 최고치에 도달하는데, 이는 발현 증가는 분화된 파골세포에서 일어난다는 것을 의미하는 것이다.

[0137] 파골세포 활성 억제제인 Zometa는 분화된 파골세포에서의 M-CSF 가용성 수용체의 발현에 어떠한 영향도 주지 않았다(도 7). 동일 실험에서, M-CSF 중성화 항체는 발현을 촉진시켰지만, IgG1 대조군 항체는 그렇지 않았다.

[0138] 상기 모든 미국 특허, 미국 공개 특허 출원, 미국 특허 출원, 외국 특허, 외국 특허 출원 및 본 명세서에 언급

및/또는 출원 데이타 시트에 열거한 비특허 출판물을 전체로서 참조하여 본 발명에 포함시킨다.

[0139] 비록 본 발명의 특정 구체예를 구체적인 설명을 목적으로 기술하였지만, 상술한 바로부터, 본 발명의 의도 및 범주를 벗어나지 않으면서 본 발명을 다양하게 변형할 수 있음은 자명하다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 가용성 인간 M-CSF 수용체의 농도를 정량하기 위해 사용한 표준 곡선을 나타낸다.

[0019] 도 2는 인간 혈청 샘플에서 가용성 인간 M-CSF 수용체를 검출한 결과를 나타내는 도면이다.

[0020] 도 3은 인간 혈청에서 인간 M-CSF와 가용성 c-fms의 결합을 나타내는 도면이다.

[0021] 도 4는 가용성 인간 M-CSF 수용체의 친화력을 분석한 결과를 나타내는 도면이다.

[0022] 도 5는 가용성 인간 M-CSF 수용체의 면역침강(IP) 결과를 나타내는 도면이다.

[0023] 도 6은 가용성 인간 M-CSF 수용체의 탈글리코실화를 나타내는 도면이다.

[0024] 도 7은 가용성 인간 M-CSF 수용체의 SDS-PAGE 분석 결과를 나타내는 도면이다.

[0025] 도 8은 탈글리코실화된 가용성 인간 M-CSF 수용체를 트립신 분해하여 얻은 펩티드를 서열 분석한 결과(서열 번호 1)를 나타내는 도면이다.

[0026] 도 9는 인간 소변 샘플에서 가용성 인간 M-CSF 수용체를 검출한 결과를 나타내는 도면이다.

[0027] 도 10은 월경 주기 동안의 소변 샘플에서 가용성 인간 M-CSF 수용체의 농도를 나타내는 도면이다.

[0028] 도 11은 유방암 환자의 샘플에서 가용성 인간 M-CSF 수용체의 농도를 나타내는 도면이다.

[0029] 도 12는 유방암 환자의 혈청 샘플에서 가용성 인간 M-CSF 수용체와 M-CSF 농도간의 상관 관계를 나타내는 도면이다.

[0030] 도 13은 사이노멀거스(Cynomulgus) 및 레서스 원숭이에서 가용성 M-CSF 수용체를 확인한 결과를 나타내는 도면이다.

[0031] 도 14는 파골세포 분화 동안 가용성 인간 M-CSF 수용체의 발현이 M-CSF 활성에 의존적임을 나타내는 도면이다.

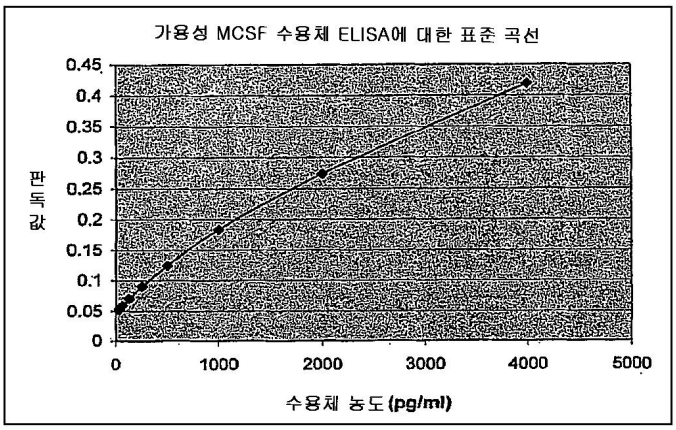
[0032] 도 15는 가용성 인간 M-CSF 수용체의 발현이 파골세포의 TRAP 활성에 따라 후속되어 일어남을 나타내는 도면이다.

[0033] 도 16은 배양 배지에서 M-CSF를 제거하여, 분화된 파골세포의 가용성 인간 M-CSF 수용체의 발현이 자극되었음을 나타내는 도면이다.

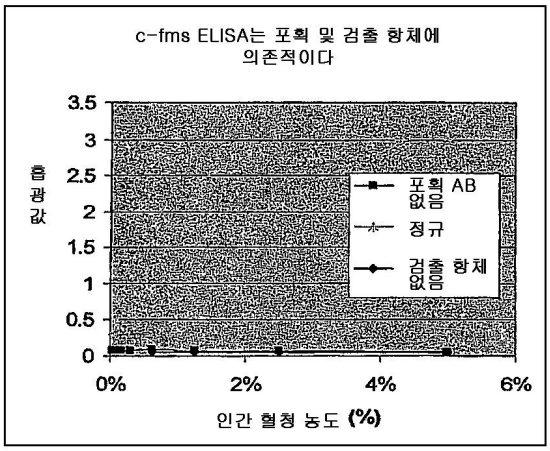
[0034] 도 17은 분화된 파골세포에서 가용성 인간 M-CSF의 발현에 대한 Zometa 및 M-CSF 중성화 항체의 영향을 나타내는 도면이다.

도면

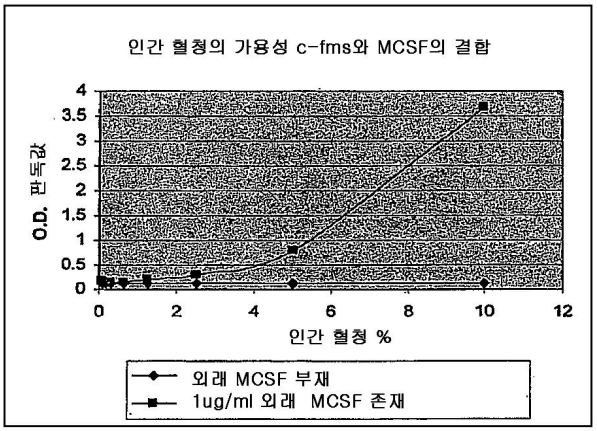
도면1



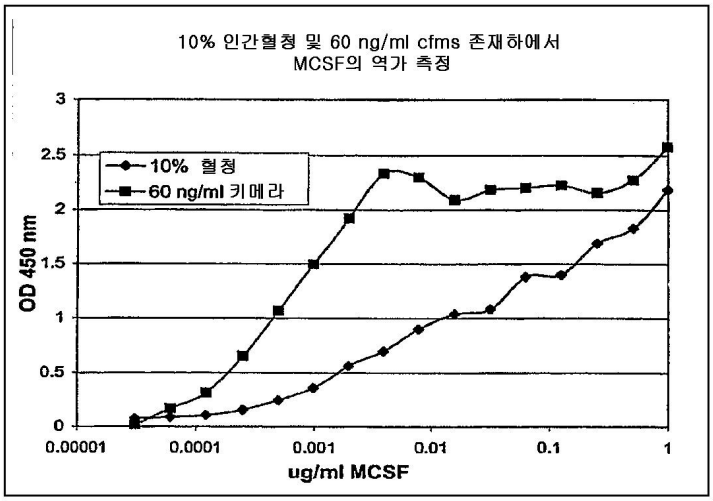
도면2



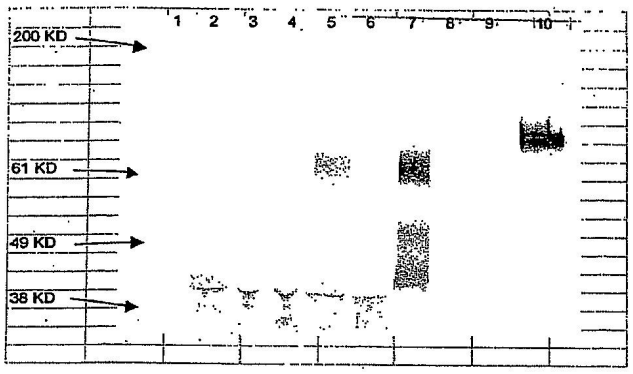
도면3



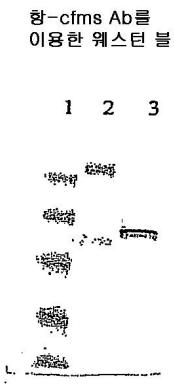
도면4


10% 인간혈청 및 60 ng/ml cfms 존재하에서
MCSF의 역가 측정
10% 혈청
60 ng/ml 키메라
OD 450 nm
ug/ml MCSF
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
0.00001
0.0001
0.001
0.01
0.1
1

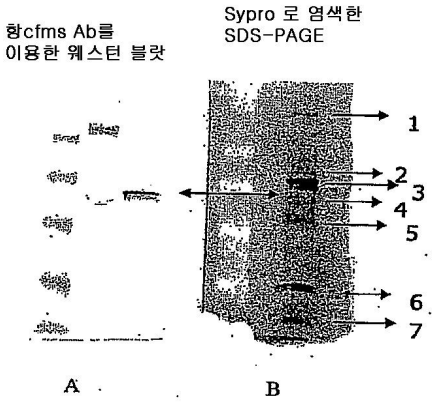
도면5


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
200 KD
61 KD
49 KD
38 KD

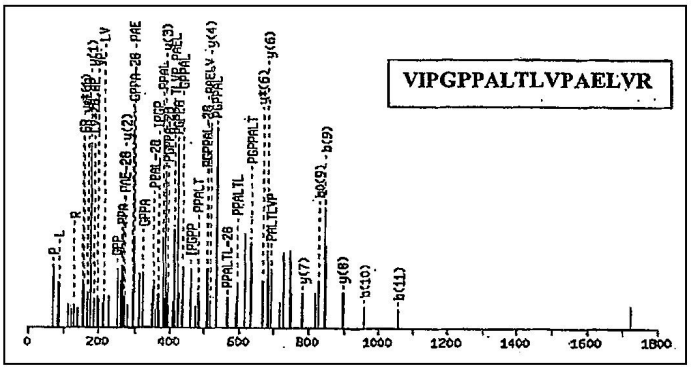
도면6


항-cfms Ab를
이용한 웨스턴 블랏
1 2 3

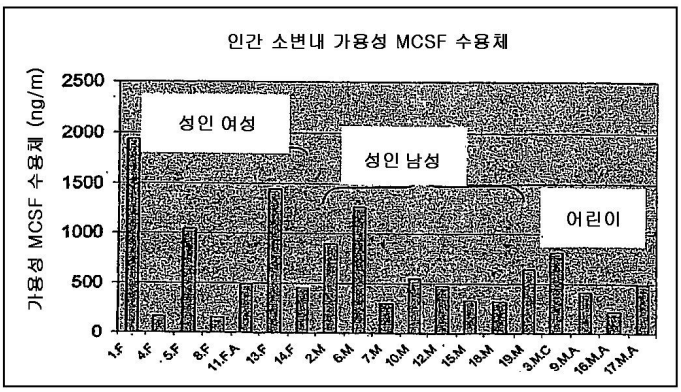
도면7


항cfms Ab를
이용한 웨스턴 블랏
Sypro 로 염색한
SDS-PAGE
1
2
3
4
5
6
7
A
B

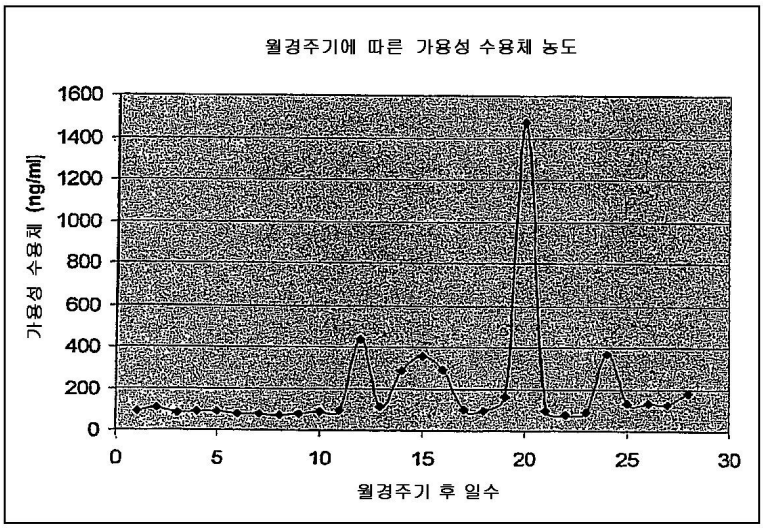
도면8


VIPGPPALTLVPAELVR
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800

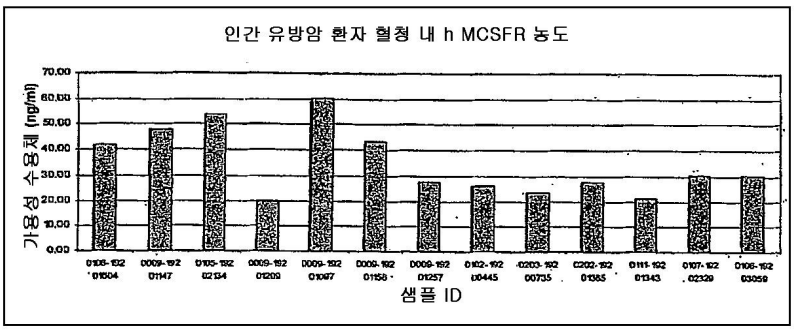
도면9


인간 소변내 가용성 MCSF 수용체
가용성 MCSF 수용체 (ng/m)
2500
2000
1500
1000
500
0
성인 여성
성인 남성
어린이
1.F
4.F
5.F
8.F
11.F.A
13.F
14.F
2.M
6.M
7.M
10.M
12.M
15.M
18.M
19.M
3.M.C
9.M.A
16.M.A
17.M.A

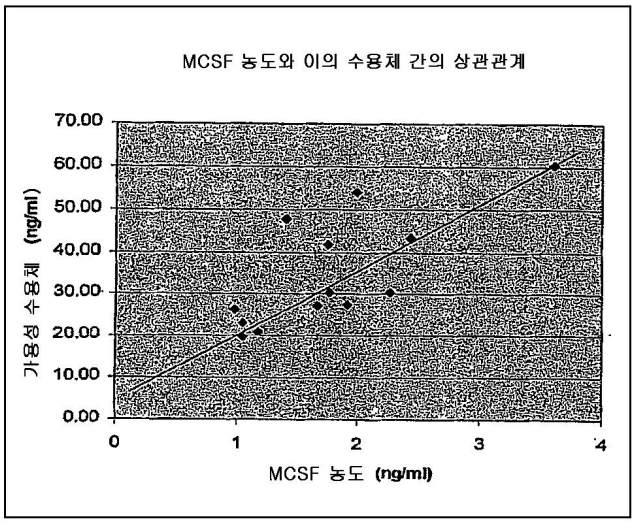
도면10



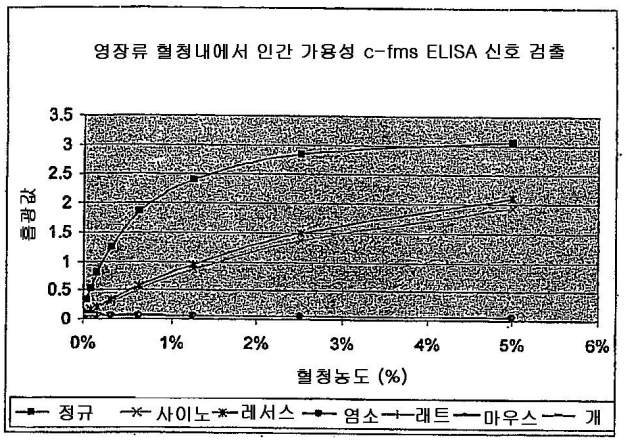
도면11



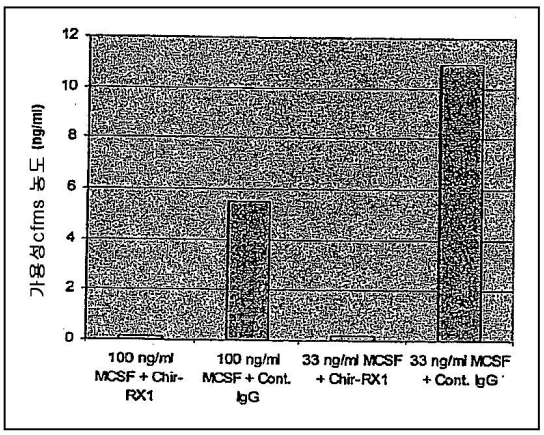
도면12



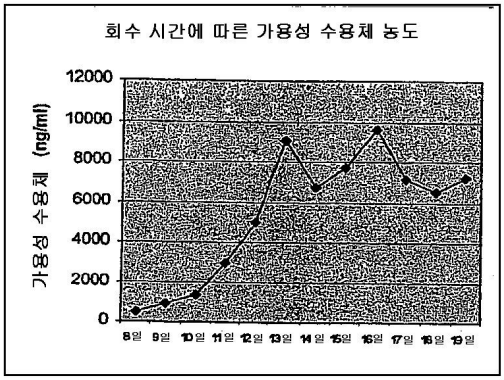
도면13

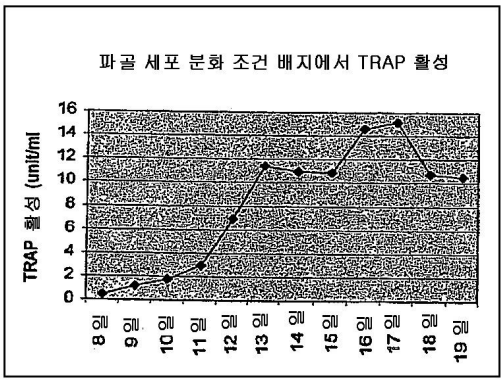

영장류 혈청내에서 인간 가용성 c-fms ELISA 신호 검출
흡광값
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0%
1%
2%
3%
4%
5%
6%
혈청농도 (%)
정규
사이노-레서스
염소
래트
마우스
개

도면14

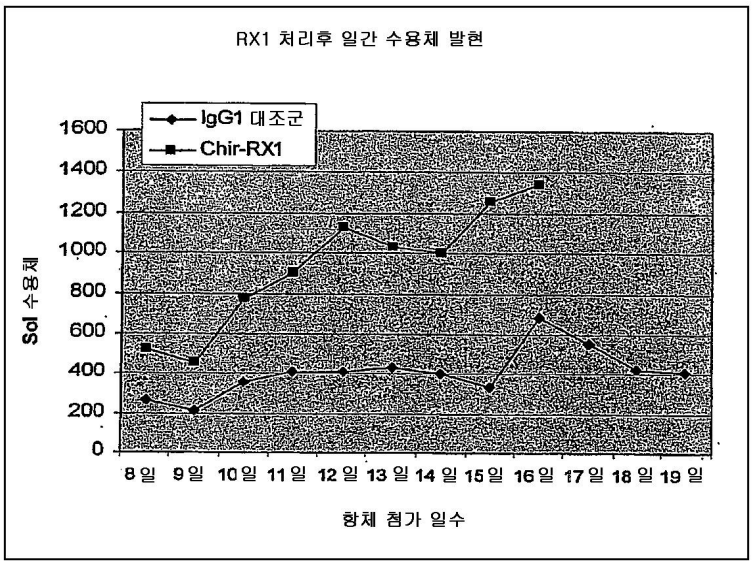

가용성cfms 농도 (ng/ml)
12
10
8
6
4
2
0
100 ng/ml MCSF + Chir-RX1
100 ng/ml MCSF + Cont. IgG
33 ng/ml MCSF + Chir-RX1
33 ng/ml MCSF + Cont. IgG

도면15

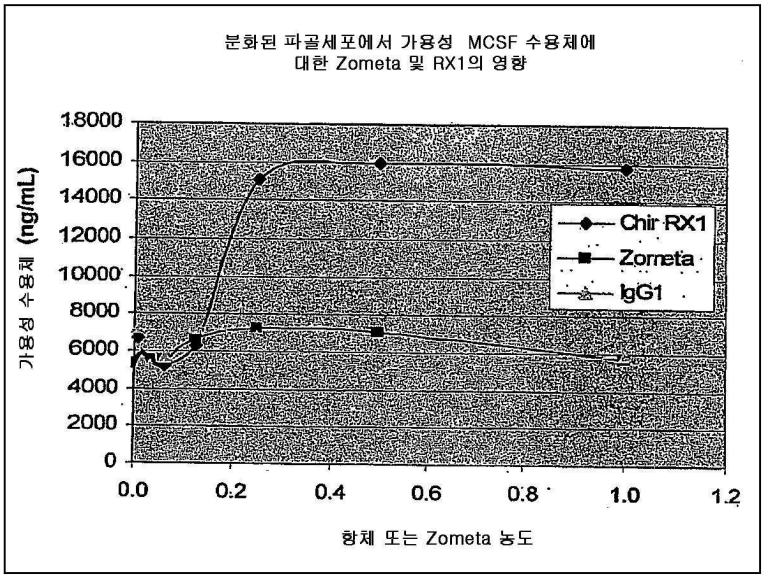

회수 시간에 따른 가용성 수용체 농도
가용성 수용체 (ng/ml)
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
8일 9일 10일 11일 12일 13일 14일 15일 16일 17일 18일 19일


파골 세포 분화 조건 배지에서 TRAP 활성
TRAP 활성 (unit/ml
16
14
12
10
8
6
4
2
0
8 일
9 일
10 일
11 일
12 일
13 일
14 일
15 일
16 일
17 일
18 일
19 일

도면16


RX1 처리후 일간 수용체 발현
IgG1 대조군
Chir-RX1
Sol 수용체
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
8 일 9 일 10 일 11 일 12 일 13 일 14 일 15 일 16 일 17 일 18 일 19 일
항체 첨가 일수

도면17



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Liu et al., Cheng

<120> Soluble Human M-CSF Receptor and Uses Thereof

<130> 27527/41256

<160> 2

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 1

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

Arg

<210> 2
<211> 957
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 2

Met Gly Pro Gly Val Leu Leu Leu Leu Val Ala Thr Ala Trp His
1 5 10 15

Gly Gln Gly Ile Pro Val Ile Glu Pro Ser Val Pro Glu Leu Val Val
20 25 30

Lys Pro Gly Ala Thr Val Thr Leu Arg Cys Val Gly Asn Gly Ser Val
35 40 45

Glu Trp Asp Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly
50 55 60

Ser Ser Ser Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly
65 70 75 80

Cys Thr Glu Pro Gly Asp Pro Leu Gly Gly Ser Ala Ala Ile His Leu
85 90 95

Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala Gln Glu Val
100 105 110

Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu Leu Thr Asp
115 120 125

Pro Val Leu Glu Ala Gly Val Ser Leu Val Arg Val Arg Gly Arg Pro
130 135 140

```
Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His Gly Phe Thr
145                 150                 155                 160

Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln Cys Ser Ala
                165                 170                 175

Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg Leu Lys Val
            180                 185                 190

Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val Pro Ala Glu
        195                 200                 205

Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys Ser Ala Ser
    210                 215                 220

Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn Asn Thr Lys
225                 230                 235                 240

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

Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His Ala Gly Asn
            260                 265                 270

Tyr Ser Cys Val Val Gln Gly Lys His Ser Thr Ser Met Phe Phe Arg
        275                 280                 285

Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser Ser Glu Gln Asn Leu Ile
    290                 295                 300

Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Leu Lys Val Met Val Glu Ala Tyr Pro
305                 310                 315                 320

Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp Thr Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Asp His
                325                 330                 335

Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala Asn Ala Thr Thr Lys Asp Thr Tyr Arg
```

340 345 350

His Thr Phe Thr Leu Ser Leu Pro Arg Leu Lys Pro Ser Glu Ala Gly
355 360 365

Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg Asn Pro Gly Gly Trp Arg Ala Leu Thr
370 375 380

Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr
385 390 395 400

Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro
405 410 415

Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys
420 425 430

Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val
435 440 445

Leu Ser Gln Glu Pro Phe His Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr
450 455 460

Val Glu Thr Leu Glu His Asn Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn
465 470 475 480

Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala
485 490 495

His Thr His Pro Pro Asp Glu Phe Leu Phe Thr Pro Val Val Val Ala
500 505 510

Cys Met Ser Ile Met Ala Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu
515 520 525

Tyr Lys Tyr Lys Gln Lys Pro Lys Tyr Gln Val Arg Trp Lys Ile Ile

```
    530                 535                 540

Glu Ser Tyr Glu Gly Asn Ser Tyr Thr Phe Ile Asp Pro Thr Gln Leu
545                 550                 555                 560

Pro Tyr Asn Glu Lys Trp Glu Phe Pro Arg Asn Asn Leu Gln Phe Gly
                565                 570                 575

Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala
            580                 585                 590

Phe Gly Leu Gly Lys Glu Asp Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met
        595                 600                 605

Leu Lys Ser Thr Ala His Ala Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu
    610                 615                 620

Leu Lys Ile Met Ser His Leu Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu
625                 630                 635                 640

Leu Gly Ala Cys Thr His Gly Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr
                645                 650                 655

Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala
            660                 665                 670

Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val
        675                 680                 685

Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser
    690                 695                 700

Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val
705                 710                 715                 720

Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu
                725                 730                 735
```

Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln
740 745 750

Val Ala Gln Gly Met Ala Phe Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg
755 760 765

Asp Val Ala Ala Arg Asn Val Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys
770 775 780

Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr
785 790 795 800

Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu
805 810 815

Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr
820 825 830

Gly Ile Leu Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Pro Tyr Pro Gly Ile Leu
835 840 845

Val Asn Ser Lys Phe Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Tyr Gln Met Ala
850 855 860

Gln Pro Ala Phe Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys
865 870 875 880

Trp Ala Leu Glu Pro Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln
885 890 895

Glu Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro
900 905 910

Ser Ser Ser Arg Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Glu Leu Glu
915 920 925

Glu Glu Ser Ser Ser Glu His Leu Thr Cys Cys Glu Gln Gly Asp Ile
930 935 940

Ala Gln Pro Leu Leu Gln Pro Asn Asn Tyr Gln Phe Cys
945 950 955