(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년07월15일
(11) 등록번호 10-2684627
(24) 등록일자 2024년07월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2866 (2013.01)
A61P 13/12 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2020-7016060
(22) 출원일자(국제) 2018년11월29일
심사청구일자 2021년11월25일
(85) 번역문제출일자 2020년06월04일
(65) 공개번호 10-2020-0093562
(43) 공개일자 2020년08월05일
(86) 국제출원번호 PCT/AU2018/051272
(87) 국제공개번호 WO 2019/104385
국제공개일자 2019년06월06일
(30) 우선권주장
2017904822 2017년11월29일 오스트레일리아(AU)
(56) 선행기술조사문헌
US20130259824 A1
WO2007025166 A1

(73) 특허권자
씨에스엘 리미티드
오스트레일리아, 3000 빅토리아, 멜버른, 655 엘리자베스 스트리트
(72) 발명자
빅스톰 인겔라
오스트레일리아 빅토리아 3052 파크빌 포플라 로드 45씨에스엘 리미티드 내
바즈 모렐리 안드리아나
오스트레일리아 빅토리아 3052 파크빌 포플라 로드 45씨에스엘 리미티드 내
피어스 마틴
오스트레일리아 빅토리아 3052 파크빌 포플라 로드 45씨에스엘 리미티드 내
(74) 대리인
이처영, 장제환

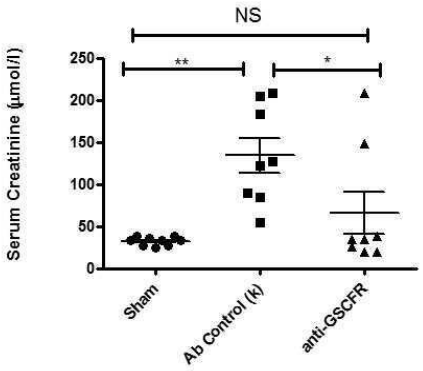
전체 청구항 수 : 총 12 항 심사관 : 이동욱

(54) 발명의 명칭 **허혈-재관류 손상을 치료 또는 예방하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 과립구 집락자극인자 (G-CSF) 신호 전달을 억제하는 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 허혈-재관류 손상을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 예에서, 허혈-재관류 손상은 조직 또는 기관 이식에 기인하거나 이와 연관되어 있다. 일부 예에서, 상기 화합물은 항체이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 43/00 (2018.01)
A61P 9/10 (2018.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2039/54 (2013.01)
A61K 2039/545 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

기관 또는 조직 이식 또는 수술을 받는 대상체에서 허혈-재관류 손상(ischemia-reperfusion injury)을 예방하는데 사용하기 위한 과립구 콜로니 자극인자(granulocyte colony stimulating factor, G-CSF) 신호전달을 억제하는 화합물로서, 상기 G-CSF 신호전달을 억제하는 화합물은 G-CSF 또는 G-CSF 수용체(G-CSF receptor, G-CSFR)에 결합하거나 특이적으로 결합하고 G-CSF 신호전달을 중화시키는 항체 가변영역을 포함하는 단백질인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 기관 이식은 신장 이식인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 G-CSF 신호전달을 억제하는 화합물은 다음의 대상체에게 투여되는 것을 특징으로 하는 화합물:

a) 조직 또는 기관 이식 수여자(recipient); 및/또는

b) 기관 수집(collection) 전 조직 또는 기관 이식 공여자(donor) 및/또는 이식 전 조직 또는 기관 공여자.

청구항 4

조직 또는 기관 이식의 방법에 사용하기 위한 또는 조직 또는 기관 이식의 결과를 개선하기 위한 또는 이식된 조직 또는 기관의 기능을 개선하기 위한 또는 이식편 기능 지연(delayed graft function)을 예방하기 위한, G-CSF 신호전달을 억제하는 화합물로서,

상기 G-CSF 신호전달을 억제하는 화합물은 G-CSF 또는 G-CSF 수용체(G-CSFR)에 결합하거나 특이적으로 결합하고 G-CSF 신호전달을 중화시키는 항체 가변영역을 포함하는 단백질이며, 상기 화합물은 다음의 대상에게 투여되는 것을 특징으로 하는 화합물:

a) 조직 또는 기관을 이식하기 전의 조직 또는 기관 이식 수여자; 이식 시점의 조직 또는 기관 이식 수여자;

b) 조직 또는 기관을 수집하기 전의 조직 또는 기관 이식 공여자; 또는

c) 수득된 조직 또는 기관을 조직 또는 기관 이식 수여자에게 이식하기 전의 생체외에서 수득된 조직 또는 기관.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 화합물은 기관 또는 조직 이식 전후에 수여자에게 투여되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 G-CSF 신호전달을 억제하는 화합물은 허혈 또는 재관류 전에 투여되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 허혈 또는 재관류 0 내지 48시간 전에 투여되는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 G-CSF의 신호 전달을 억제하는 화합물은 Fv를 포함하는 단백질인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 단백질은 다음으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물:

(i) 단일쇄 Fc 단편 (single chain Fv fragment, scFv);

(ii) scFv 이량체 (dimeric scFv, di-scFv);

(iii) 다이아바디 (diabody);

(iv) 트리아바디 (triabody);

(v) 테트라바디 (tetrabody);

(vi) Fab;

(vii) $F(ab')_2$;

(viii) Fv;

(ix) 항체의 불변영역, Fc 또는 중쇄 불변 도메인 (C_H)2 및/또는 C_H3에 연결된 (i) 내지 (viii) 중 어느 하나;

(x) 알부민 또는 이의 기능적 단편 또는 변이 또는 알부민에 결합하는 단백질과 연결된 (i) 내지 (viii) 중 어느 하나; 및

(xi) 항체 (antibody).

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 다음의 특징을 가지는 화합물:

(i) 상기 단백질은 G-CSFR에 결합하거나 특이적으로 결합하는 항체 가변영역을 포함하고, 서열번호 4로 표시되는 서열을 포함하는 중쇄 가변영역 (V_H) 및 서열번호 5로 표시되는 서열을 포함하는 경쇄 가변영역 (V_L)을 포함하는 항체 C1.2G가 G-CSFR에 결합하는 것을 경쟁적으로 저해함; 및/또는

(ii) 상기 단백질은 서열번호 1의 111 내지 115, 170 내지 176, 218 내지 234 및/또는 286 내지 300으로부터 선택된 1개 또는 2개 또는 3개 또는 4개의 영역 내에 잔기를 포함하는 에피토프에 결합함.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 다음을 포함하는 항체인 것을 특징으로 하는 화합물:

(i) 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는

V_L; 또는

(ii) 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 V_H 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 V_L.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 V_H의 3개의 CDR을 포함하는 V_H 및 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 V_L의 3개의 CDR을 포함하는 V_L을 포함하는 항체인 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본원은 2017년 11월 29일 출원되고 "허혈-재관류 손상을 치료 또는 예방하는 방법"의 발명의 명칭을 갖는 호주 특허 출원번호 2017904822에 대한 우선권을 주장한다. 해당 출원의 전체 내용은 본원에 참조로써 통합된다.

[0002] 본원은 전자 양식의 서열 목록과 함께 제출된다. 서열 목록의 전체 내용은 본원에 참조로써 통합된다.

[0003] 본원은 과립구집락자극인자 (granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF)을 길항하여(antagonizing), 대상체에서 허혈-재관류 손상을 치료 또는 예방하는 방법 및 예를 들어, 기관 이식에서의, 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 허혈-재관류 손상 (IRI)은 허혈, 즉 조직 (tissue) 또는 기관 (organ), 예를 들어 사망한 공여자로부터의 이식을 위한 기관에 혈액 공급이 제한되거나 감소되어 야기되는 병리학적 상태이며, 이는 재관류 (reperfusion) 및 재-산소화 (re-oxygenation)로 이어진다. 허혈은 세포에 산소 및 영양분을 박탈시키고 대사 폐기물을 부적절하게 제거하여 급격한 괴사 및 염증을 유발할 수 있다. 허혈 기간 후 조직 또는 기관의 재관류는 혈액 공급 및 산소를 반환하지만, 재관류 자체는 초기 허혈에 의해 야기되는 산화 및 염증을 두드러지게 하고 추가 상해를 야기할 수 있다. 재산소화는 세포 단백질, DNA 및 원형질막에 산화적 손상을 일으킬 수 있다. 이러한 산화적 손상은 차례로 자유 라디칼의 방출을 야기하여 추가의 세포 손상을 초래할 수 있다. 재관류 손상은 무엇보다도 반응성 산소 종의 생성, 보체 활성화, 세포 염증 및 내피 세포 손상을 특징으로 한다.

[0005] 기관 이식에서, 허혈-재관류 손상은 '온 (warm)' IRI 또는 '냉 (cold)' IRI로 정의될 수 있다. 온 IRI는 기관 이식 수술 또는 다양한 형태의 충격 또는 외상 중 현장 (in situ)에서 발생한다. 냉 IRI는 생체 외 (ex vivo) 보존 동안 발생하며 일반적으로 기관 이식 수술 중에 온 IRI와 결부된다.

[0006] 선천성 (innate) 및 후천성 (adaptive) 면역 시스템 둘 모두는 허혈-재관류 손상의 발병에서 중심적인 역할을 한다. 선천성 면역의 관점에서, 죽어가는 세포에 의해 방출된 위험 신호는 케모카인, 사이토카인 및 자유 라디칼과 같은 염증 매개체 (inflammatory mediators)의 생산과 염증 세포 모집을 조절하는 세포성 및 가용성 인자의 활성화 및/또는 생산을 초래하는 톨-유사 수용체를 활성화한다. 호중구는 허혈 및 재관류에 따른 1차 염증성 세포 반응자 (primary inflammatory cell responders) 중 하나이다. 염증성 환경에서, 수지상 세포는 죽어가는 세포로부터 항원을 흡수하고 처리하며, 림프절로 이동하여 후천성 면역계의 항원-특이적 세포를 활성화시킨다. 따라서, 허혈-재관류 손상의 병인은 복잡하고, 세포 사멸, 미세 혈관 기능 장애, 전사 재프로그래밍, 보체 활성화 및 선천적 및 후천성 면역 시스템과 같은 여러 메커니즘을 통해 조직 손상이 발생할 수 있다.

[0007] 허혈-재관류 손상은 신장 이식을 포함하여 이식에서 빈번한 사건이며, 단기 및 장기적으로 이식 결과를 결정하는 데 관련된 요소입니다. 신장 이식에서, IRI는 내피 세포 및 관상피 세포에 영향을 미치며 급성 신장 손상 및 이식편 기능 지연 (DGF)을 유발하여 이식 생존을 손상시킬 수 있다. DGF는 사망한 공여자 또는 확장 된 기준 공여자 신장 이식 후 가장 빈번한 초기 합병증 중 하나이며, 주로 IRI로 인한 관상피 세포 괴사에 의해 발생한다 (Schrϕppel B, *et al.*, *Kidney Int.* 2014).

[0008] 허혈-재관류 손상을 치료하기 위해 현재 임상 시험에서 시험되고 있는 화합물은 보체 캐스케이드의 C5 성분에 대한 인간화 단일 클론 항체인 에쿨리주맙 (eculizumab)을 포함한다 (Rother R, *et al. Nat Biotechnol.* 2007). 과립구-집락자극인자 (G-CSF)는 또한 재관류 손상 치료를 위한 치료제로서 연구되어 왔으며, Nogueira *et al., Cell Phys Biochem* (2006) 및 Li *et al., Nephrology* (2008)를 보라. 이들 연구는 G-CSF 로의 치료가 신장 허혈에서 보호 효과를 갖는 것으로 보여주었다.

[0009] 그러나, 허혈-재관류 손상을 예방 또는 치료하기 위한 효과적인 치료법은 모호하다. 따라서, 상기 기술로부터

당업자에게 허혈-재관류 손상에 의해 야기되는 손상을 예방 또는 치료하기 위한 전략 및 방법이 필요하다는 것이 명백할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명을 제조함에 있어서, 본 발명자들은 G-CSF가 허혈-재관류 손상에서 보호 역할을 할 수 있다는 선행 교시에 반하여 진행하였고, 대신에 허혈-재관류 손상에 대한 G-CSF 신호 전달의 억제 효과를 연구하였다. 본 발명자들은 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물을 투여함으로써 허혈-재관류 손상의 효과가 감소됨을 발견 하였다. 또한, 본 발명자들은 G-CSF 신호 전달을 억제함으로써 C5 수준에서 보체 활성화를 억제하는 것과 유사한 정도로 허혈-재관류 손상을 예방 또는 치료할 수 있음을 발견하였다. 이러한 발견은 G-CSF 신호 전달을 억제함으로써 허혈-재관류 손상을 예방 또는 치료하기 위한 방법의 기초를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 따라서, 일 예로서 본 개시 내용은 대상체에서 허혈-재관류 손상을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 과립구 집락 자극 인자 (G-CSF) 신호 전달을 억제하는 화합물을 투여하는 것을 포함한다.

[0012] 본 개시 내용은 또한 허혈-재관류 손상의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물을 제공한다.

[0013] 본 개시 내용은 또한 허혈-재관류 손상의 예방 또는 치료를 위한 의약의 제조에서 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물의 용도를 제공한다.

[0014] 일부 예에서, 상기 허혈 및/또는 재관류 손상은 기관 이식, 저온 기관 저장 (cold organ storage), 뇌사, 죽상동맥 경화증, 혈전증, 혈전 색전증, 지질 색전증, 외상, 출혈, 스텐트, 수술, 혈관 성형술, 우회 수술, 총 허혈, 심근 경색, 뇌졸중, 말초 혈관 질환, 패혈증, 종양 또는 이들의 조합에 기인하거나 관련되어 있다.

[0015] 일부 예에서, 허혈-재관류 손상은 온 허혈-재관류 손상이다. 일부 예에서, 허혈-재관류 손상은 냉 허혈-재관류 손상이다.

[0016] 일부 예에서, G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물이 대상체에게 투여된다.

[0017] 일 예에서, 상기 허혈-재관류 손상은 다음 중 하나 이상에 기인하거나 이와 관련된다 :

[0018] (i) 기관 이식;

[0019] (ii) 수술;

[0020] (iii) 외상;

[0021] (iv) 패혈증;

[0022] (v) 종양; 및

[0023] (vi) 뇌졸중.

[0024] 일 예에서, 허혈-재관류 손상은 수술에 기인하거나 수술과 관련되어 있다. 일 예에서, 허혈-재관류 손상은 관상동맥 우회 수술, 예를 들어 이중 우회술 (2 개의 관상 동맥이 우회된다 (예를 들어, 좌측 전방 하강 관상 동맥 (LAD) 및 우측 관상 동맥 (RCA))); 3 회 우회술 (3 개의 혈관이 우회된다. 예 : LAD, RCA 및 좌회선지 동맥 (LCX)); 4 회 우회술 (4 개의 혈관이 우회된다. (예 : LAD, RCA, LCX 및 LAD의 1차 사선 동맥)); 5 회 우회술 (5 개의 혈관이 우회된다)에 기인하거나 이와 관련되어 있다.

[0025] 일 예에서, 허혈-재관류 손상은 기관 이식, 예를 들어 고형 기관 이식에 기인하거나 이와 관련된다. 일 예에서, 상기 기관 이식은 신장 이식이다. 일 예에서, 상기 기관 이식은 간 이식이다. 일 예에서, 상기 기관 이식은 심장 이식이다. 일 예에서, 상기 기관 이식은 췌장 이식이다. 일 예에서, 상기 기관 이식은 폐 이식이다. 일 예에서, 상기 기관 이식은 위 이식이다. 일 예에서, 상기 기관 이식은 장 이식이다. 일 예에서, 상기 기관 이식은 고환 이식이다.

[0026] 또 다른 예에서, 상기 기관 이식은 피부 이식, 예를 들어 전층 피부 이식 (full thickness skin

transplantation)이다.

[0027] 일 예에서, 상기 허혈-재관류 손상은 조직 이식에 기인하거나 조직 이식과 관련된다. 일 예에서, 상기 조직 이식은 혈관 이식이다. 일 예에서, 상기 조직 이식은 피부 이식, 예를 들어 혈관화 된 피부 이식이다. 일 예에서, 상기 조직 이식은 췌장 섬 (pancreatic islet) 이식이다. 일 예에서, 상기 조직 이식은 각막 이식이다. 일 예에서, 상기 조직 이식은 근골격 이식이다.

[0028] 상기 허혈-재관류 손상이 이식 (예를 들어, 기관 이식)에 기인하거나 이와 관련될 때, G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 이식 전 (before), 동안 (during) 및/또는 후(after)에 투여될 수 있다. 일부 예에서, G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 대상체에 투여되며, 여기서 상기 대상체는 조직 또는 기관 이식 수여자이다. 일부 예에서, G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 조직 또는 기관 이식 공여자에게 투여된다.

[0029] 일부 예에서, 조직 또는 기관 이식 공여자는 살아있는 공여자이다. 일부 예에서, 조직 또는 기관 이식 공여자는 사망한 공여자이다. 일부 예에서, 조직 또는 기관 이식 공여자는 뇌사 (DBD) 후 공여하는 공여자이다. 일부 예에서, 조직 또는 기관 이식 공여자는 순환정지 후 (DCD) 공여자이다. 일부 예에서, 조직 또는 기관 이식 공여자는 확장범주 공여자 (ECD)이다. 일부 예에서, 조직 또는 기관 이식 공여자는 표준범주 공여자 (SCD)이다.

[0030] 일부 예에서, G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 기관 이식 전에 생체 외에서 채취된 (harvested) 기관에 투여된다. 예를 들어, 채취된 기관은 이식 전에 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물을 포함하는 용액으로 관류 (perfuse)되거나 주입 (infuse)될 수 있다.

[0031] 본 개시 내용은 또한 조직 또는 기관 이식 방법, 또는 조직 또는 기관 이식의 결과 개선을 위한 방법 또는 이식된 조직 또는 기관의 기능 개선을 위한 방법 또는 이식편 기능 지연 예방을 위한 방법을 제공하며, 상기 방법은 생체 외에서 채취된 조직 또는 기관에 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물을 투여하는 단계 및 상기 채취된 조직 또는 기관을 조직 또는 기관 이식 수여자에게 이식하는 단계를 포함한다.

[0032] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 기관 이식 공여자 및/또는 기관 이식 수여자 및/또는 채취된 기관에 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 기관 이식 공여자 및 기관 이식 수여자에게 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 기관 이식 공여자 및 채취된 기관에 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 기관 이식 수여자와 채취된 기관에 투여된다.

[0033] 본 개시의 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 전에 투여되며, 예를 들어 이식 (예: 기관 이식)의 경우, G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 이식된 기관의 재관류 전 (예를 들어, G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 이식 전에 또는 이식 동안, 그러나 재관류 전에, 예를 들어, 혈액의 흐름을 제한하는 클램프가 풀리기 전에) 기관 이식 수여자에 투여된다.

[0034] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 허혈 전에 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 0 일 (예를 들어, 허혈 또는 재관류 직전) 내지 허혈 또는 재관류 전 7 일 사이에 투여된다. 예를 들어, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 또는 허혈 전 0 일 내지 6 일 또는 5 일 또는 4 일 사이에 투여된다. 예를 들어, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 또는 허혈 전 0 내지 72 시간 사이에 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 또는 허혈 전 6 내지 48 시간 사이에 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 또는 허혈 전 12 내지 36 시간 사이에 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 또는 허혈 약 24 시간 전에 투여된다.

[0035] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 또는 허혈 전 적어도 1 시간 전에 (및 재관류 또는 허혈 전 최대 7 일까지) 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 또는 허혈 전 적어도 2 또는 적어도 4 또는 적어도 6 또는 적어도 8 또는 적어도 10 또는 적어도 12 시간 또는 적어도 14 시간 또는 적어도 16 시간 또는 적어도 18 시간 또는 적어도 20 시간 또는 적어도 22 시간 또는 적어도 24 시간에 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 또는 허혈 전 적어도 24 시간에 투여된다.

[0036] 본원의 화합물의 투여시기를 논의할 때, 논의는 화합물의 다중 투여에 관련될 것이다. 예를 들어, 화합물이 허혈 또는 재관류 전에 0 일 내지 7 일 사이에 투여된다는 것을 언급 할 때, 본 개시는 허혈 또는 재관류 전 0 일 내지 7 일 사이에 화합물의 다중 투여 (예를 들어, 2 또는 3 또는 4 또는 5 등)를 포괄한다.

[0037] 또한, 이식의 경우, 상기 화합물은 이식 후 여러 번 투여 될 수있다.

[0038] 본원의 화합물의 투여시기를 논의할 때, 본 개시 내용은 또한 화합물의 단일 투여에 대한 명백한 지지를 제공하기 위해 취해질 것이다.

[0039] 전술한 것으로부터 당업자는 본 개시 내용이, 조직 또는 기관의 수집 (collection) 전에 이식 공여자에게 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물을 투여하는 단계; 이식물 (예를 들어, 조직/기관)를 수집하는 단계; 및 상기 조직 또는 기관을 기관 이식 수여자에게 이식하는 단계를 포함하는, 이식 방법 (예를 들어, 기관 이식) 또는 이식 결과 (예를 들어, 기관 이식)를 개선시키기 위한 방법 또는 이식물 (예를 들어, 이식된 기관)의 기능 을 개선시키기 위한 방법 또는 이식편 기능 지연을 예방하는 방법을 제공한다는 것이 명백할 것이다.

[0040] 본 개시 내용은 또한 조직 또는 기관 공여자에게 조직 또는 기관의 수집 전에 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 조직 또는 기관 이식 수여자에서 조직 또는 기관 기능을 개선시키기 위해 조직 또는 기관 공여자로부터 이식 조직 또는 기관을 준비 (preparing)하는 방법을 제공한다.

[0041] 본 개시 내용은 추가로 조직 또는 기관의 수집 전에 조직 또는 기관 공여자에게 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물을 투여하는 단계, 상기 조직 또는 기관을 수집하는 단계 및 상기 조직 또는 기관을를 조직 또는 기관 이식 수여자에게 이식하는 단계를 포함하는, 조직 또는 기관 이식 거부를 예방하는 방법을 제공한다.

[0042] 일부 예에서, 상기 방법은 이식 수여자에게 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물을 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 예를 들어, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 이식 전 또는 조직 또는 기관 이식 시 또는 그 즈음에서 이식 수여자에게 투여된다. 다른 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 조직 또는 기관 이식 수술 동안 이식 수여자에게 투여된다.

[0043] 본 개시 내용은 또한 상기 방법은 조직 또는 기관을 이식하기 전 이식 수여자에게 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물을 투여하고 기관을 이식 수여자에게 이식하는 단계를 포함하는, 기관 이식 방법 또는 조직 또는 기관 이식의 결과를 개선시키기 위한 방법 또는 이식된 조직 또는 기관의 기능을 개선시키기 위한 방법 또는 이식편 기능 지연을 예방하기 위한 방법을 제공한다.

[0044] 일 예에서, 상기 기관 이식 공여자는 뇌사자이다. 예를 들어, 상기 기관 공여자는 살아있고 생명 유지 장치를 사용하고 있지만 뇌사자이다. 추가 공여자가 본원에 기재되어 있고 해당 개시가 이 예에 적용되도록 취해진다.

[0045] 기관 공여자에게 투여하는 경우, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 기관이 수집되기 전에, 예를 들어 기관 수집 전 0 내지 72 시간 사이에 투여될 수있다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 기관 수집 전 6 내지 48 시간 사이에 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 기관 수집 전 12 내지 36 시간 사이에 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 기관 수집 전 약 24 시간에 투여된다.

[0046] 뇌사 공여자에게 투여하는 경우, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은뇌사와 기관이 수집되는 시간 사이에 투여될 수 있다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 뇌사가 선언된 후 48 시간 이내에, 예를 들어 뇌사가 선언된 후 24 시간 또는 12 시간 또는 6 시간 내에 투여될 수 있다.

[0047] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 단일 용량으로 투여된다.

[0048] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 복수의 용량으로 투여된다. 예를 들어, 상기 화합물은 이식 전 또는 이식 동안 이식 수여자에게 투여되고, 이식 후 수여자에게 하나 이상의 추가 용량으로 투여된다. 다른 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 이식 공여자 또는 기증된 조직 또는 기관에 투여되고, 이식 후 이식 수여자에게 하나 이상의 추가 용량으로 투여된다.

[0049] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 예방적 또는 치료적 유효량으로 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.01mg/kg 내지 약 50mg/kg, 예컨대 약 0.05mg/kg 내지 약 30mg/kg, 예를 들어 약 0.1mg/kg 내지 약 20mg/kg, 예를 들어, 약 1mg/kg 내지 약 10mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.1mg/kg 내지 약 1mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.4mg/kg 내지 약 0.5mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.1 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.2 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.3 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.4 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.5

mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.6 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.7 mg/kg의 용량으로 투여된다.일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.8 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 1 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 2 mg/kg 내지 약 8 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 4 mg/kg 내지 약 6 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 5 mg/kg의 용량으로 투여된다.

[0050] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 호중구 감소증 (neutropenia)을 유발하는 양으로 투여된다. 예를 들어, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 예컨대 일주일 미만 또는 5 일 미만 또는 3 일 미만 또는 1 일 미만의 기간 동안 일시적 호중구 감소증을 유발하는 양으로 투여된다.

[0051] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 호중구 감소증을 유발하지 않는 양으로 투여된다.

[0052] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 염증을 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 산화적 손상 (oxidative damage)을 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다.

[0053] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 다음 효과 중 하나 이상을 갖기에 충분한 양으로 투여된다 :

[0054] (i) 호중구 침윤 (neutrophil infiltration)을 감소 또는 예방, 예를 들어, 기관 이식의 경우 이식된 기관으로의 호중구 침윤을 감소 또는 예방; 및

[0055] (ii) 대식세포 침윤 (macrophage infiltration)을 감소 또는 예방, 예를 들어, 기관 이식의 경우 이식된 기관으로의 대식세포 침윤을 감소 또는 예방.

[0056] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 호중구 침윤을 감소 시키거나 방지하기에 충분한 양으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 대식세포 침윤을 감소시키거나 방지하기에 충분한 양으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 인터루킨 8 수용체 베타 (IL-8Rβ)의 발현을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 단핵구 화학 유인 단백질 1 (MCP-1)의 발현을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양으로 투여된다.

[0057] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 다음 효과 중 하나 이상을 갖기에 충분한 양으로 투여된다 :

[0058] (i) 혈청 또는 혈장 크레아티닌 수치 (level)의 증가를 감소 또는 예방; 및

[0059] (ii) 혈청 또는 혈장 우레아 수치 (level)의 증가를 감소 또는 예방.

[0060] 혈청 또는 혈장 크레아티닌 수치 및 혈청 또는 혈장 우레아 수치는 신장 기능의 척도이며, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 신장 이식의 경우 이식편 기능 지연을 평가하는데 유용하다.

[0061] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 혈청 또는 혈장 크레아티닌 수치의 증가를 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 혈청 또는 혈장 우레아 수치의 증가를 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다.

[0062] 소변의 알부민 및/또는 혈액 수치가 증가하면 신장 기능 장애 또는 신장 손상이 있음을 나타낼 수도 있다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 소변 알부민 수치의 증가를 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 대상체의 소변에서 혈액 수치의 증가를 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다.

[0063] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은, 예를 들어 기관 이식의 경우 이식된 기관의 세포에서 의해, 다음 중 하나 이상의 발현을 감소시키거나 억제하기에 충분한 양으로 투여된다:

[0064] (i) 신장 손상 분자 1 (kidney injury molecule 1, KIM-1);

[0065] (ii) 호중구 젤라티나제-관련 리포칼린 (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL);

[0066] (iii) 인터루킨 1 베타 (interleukin 1 beta, IL-1β);

[0067] (iv) 인터루킨 6 (interleukin 6, IL-6);

[0068] (v) 종양 괴사 인자 알파 (tumor necrosis factor alpha, TNFα);

[0069] (vi) 보체 성분 5a 수용체 1 (complement component 5a receptor 1, C5AR1);

[0070] (vii) 대식세포 염증성 단백질 2-알파 (macrophage inflammatory protein 2-alpha, MIP2-α);

[0071] (viii) 세포 간 접착 분자 1 (intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1);

[0072] (ix) E- 셀렉틴 (E-selectin);

[0073] (x) C-X-C 모티프 케모카인 리간드 1 (C-X-C motif chemokine ligand 1, CXCL1);

[0074] (xi) 인터루킨 8 수용체 베타 (interleukin 8 receptor beta, IL-8Rβ); 및

[0075] (xii) 단핵구 화학유인물질 단백질 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1).

[0076] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 보체 C5 활성화를 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다.

[0077] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은, 예를 들어, 기관 이식의 경우 이식된 기관의 세포 표면에, C5b-9 침착 (deposition)을 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다.

[0078] 전술한 각각의 평가 방법은 본 기술 분야에 공지 및/또는 본원에 기재되어있다. 또한, 당업자는 본원에서 용어 "감소"는 G-CSF를 억제하는 화합물의 투여 전 대상체에서의 양과 비교하여 또는 상응하는 대조군 대상체에서의 양과 비교하여 상기 열거된 임의의 항목이 더 적은 양을 지칭하는 것으로 본원에서 사용됨을 이해할 것이다.

[0079] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 다른 화합물과 조합하여 투여된다. 일부 예에서, 상기 다른 화합물은 황화수소 (hydrogen sulfide)이다. 일부 예에서, 상기 다른 화합물은 항 염증성 화합물 (anti-inflammatory compound) 및/또는 상기 (i)-(x)에 열거된 하나 이상의 분자의 발현 또는 활성을 억제 또는 감소시킨다. 일부 예에서, 상기 다른 화합물은 면역 억제제 (immunosuppressant), 예를 들어 사이클로스포린 (cyclosporine)이다. 적합한 면역 억제제는 당업계에 공지되어 있으며, James & Mannon, Curr Transplant Rep (2015)에 기재된 것을 포함하고, 이는 본원에 참조로써 포함된다. 대안적으로 또는 추가적으로, 상기 다른 화합물은 코르티코스테로이드 (corticosteroid), 예컨대 프레드니손 (prednisone) 및/또는 프레드니솔론 (prednisolone)이다. 대안적으로 또는 추가적으로, 상기 다른 화합물은 메토트렉세이트 (methotrexate)이다. 대안 W적으로 또는 추가적으로, 상기 다른 화합물은 시클로포스파미드 (cyclophosphamide)이다. 대안적으로 또는 추가적으로, 상기 다른 화합물은 미코페놀레이트 모페틸 (mycophenolate mofetil)이다. 일부 예에서, 상기 다른 화합물은 Le Lamer et al., J Transl Med (2014)에 기술된 바와 같이 TRO40303이다. 일부 예에서, 상기 다른 화합물은 수퍼 옥사이드 디스뮤타제 (superoxide dismutase)이다. 일부 예에서, 상기 다른 화합물은 메트포르민 (metformin)이다. 일부 예에서, 상기 다른 화합물은 카나비노이드 (cannabinoid) 또는 이의 합성 유사체이다. 일부 예에서, 상기 다른 화합물은 이식 수술에 일반적으로 사용되는 화합물이다.

[0080] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 세포와 함께 투여된다. 일부 예에서, 상기 세포는 중간엽 줄기 세포와 같은 줄기 세포이다.

[0081] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 유전자 요법과 함께 투여된다.

[0082] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 다른 화합물과 동시에 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 다른 화합물보다 먼저 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 다른 화합물 이후에 투여된다.

[0083] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물 및 다른 화합물 모두 기관 이식 수여자에게 투여된다. 적합한 다른 화합물이 상기에 기재되어 있다.

[0084] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 이식용 기관의 수집 전에 기관 이식 공여자에게 투여되고 다른 화합물은, 선택적으로 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물과 조합하여, 기관 이식 수여자에게 투여된다. 적합한 다른 화합물은 위에 기재되어있다.

[0085] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 G-CSF 또는 G-CSF 수용체 (G-CSFR)에 결합한다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 G-CSF에 결합한다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하

는 화합물은 G-CSF 수용체 (G-CSFR)에 결합한다.

[0086] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 단백질이다.

[0087] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 G-CSFR에 결합하거나 G-CSFR에 특이적으로 결합하고 G-CSF 신호 전달을 중화시키는 항체 가변 영역을 포함하는 단백질이다. G-CSFR에 "결합하는 (binds to)" 단백질 또는 항체에 대한 본원의 언급은 G-CSFR에 "특이적으로 결합하는 (binds specifically to)" 단백질 또는 항체에 대한 문자적 지지 (literal support)를 제공한다.

[0088] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 G-CSF에 결합하거나 G-CSF에 특이적으로 결합하고 G-CSF 신호를 중화시키는 항체 가변 영역을 포함하는 단백질이다. G-CSF에 "결합하는" 단백질 또는 항체에 대한 본원의 언급은 G-CSF에 "특이적으로 결합하는" 단백질 또는 항체에 대한 문자적 지지를 제공한다.

[0089] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물을 Fv를 포함하는 단백질이다. 일부 예에서, 상기 단백질은 다음으로 구성된 군에서 선택된다:

[0090] (i) 단일 쇄 Fv 단편 (a single chain Fv fragment, scFv);

[0091] (ii) 이량체 scFv (dimeric scFv, di-scFv); 또는

[0092] (iv) 다이아바디 (diabody);

[0093] (v) 트리아바디 (triabody);

[0094] (vii) Fab;

[0095] (viii) $F(ab')_2$;

[0096] (ix) Fv;

[0097] (x) 항체의 불변 영역, Fc 또는 중쇄 불변 도메인 (C_H)2 및/또는 C_H3의 불변 영역에 연결된 (i) 내지 (ix) 중 하나;

[0098] (xi) 알부민, 이의 기능적 단편 또는 변이체 또는 알부민에 결합하는 단백질 (예 : 항체 또는 이의 항원 결합 단편)에 연결된 (i) 내지 (ix) 중 하나; 또는

[0099] (xii) 항체.

[0100] 일 예에서, 상기 단백질은 항체이다. 일 예에서, 상기 항체는 네이키드 항체 (naked antibody)이다. 예시적인 항체는 WO2012171057에 기재되어 있으며, 이는 본원에 참고로 포함된다.

[0101] 일 예에서, 상기 단백질은 세포 표면에 발현되는 hG-CSFR에 약 5 nM 이상의 친화도로 결합하는 항체이다. 일 예에서, 상기 단백질은 세포 표면에 발현되는 hG-CSFR에 약 4 nM 이상의 친화도로 결합하는 항체이다. 일 예에서, 상기 단백질은 세포 표면에 발현되는 hG-CSFR에 약 3 nM 이상의 친화도로 결합하는 항체이다. 일 예에서, 상기 단백질은 세포 표면에 발현되는 hG-CSFR에 약 2 nM 이상의 친화도로 결합하는 항체이다. 일 예에서, 상기 단백질은 세포 표면에 발현되는 hG-CSFR에 약 1 nM 이상의 친화도로 결합하는 항체이다.

[0102] 일 예에서, 상기 단백질은 적어도 약 5 nM의 IC50로 hG-CSFR을 발현하는 BaF3 세포의 G-CSF-유도된 증식을 억제하는 항체이다. 일 예에서, 상기 단백질은 적어도 약 4 nM의 IC50로 hG-CSFR을 발현하는 BaF3 세포의 G-CSF-유도된 증식을 억제하는 항체이다. 일 예에서, 상기 단백질은 적어도 약 3 nM의 IC50로 hG-CSFR을 발현하는 BaF3 세포의 G-CSF-유도된 증식을 억제하는 항체이다. 일 예에서, 상기 단백질은 적어도 약 2 nM의 IC50로 hG-CSFR을 발현하는 BaF3 세포의 G-CSF-유도된 증식을 억제하는 항체이다. 일 예에서, 상기 단백질은 적어도 약 1 nM의 IC50로 hG-CSFR을 발현하는 BaF3 세포의 G-CSF-유도된 증식을 억제하는 항체이다. 일 예에서, 상기 단백질은 적어도 약 0.5 nM의 IC50로 hG-CSFR을 발현하는 BaF3 세포의 G-CSF-유도된 증식을 억제하는 항체이다

[0103] 일 예에서, 상기 단백질은 키메라 (chimeric), 탈 면역화 (de-immunized), 인간화 (humanized), 인간 (human) 또는 영장류화 (rimatized) 되어 있다. 일 예에서, 상기 단백질 또는 항체는 인간이다.

[0104] 일 예에서, 상기 단백질은 서열번호 4로 표시되는 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 서열 번호 5로 표시되는 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 항체 C1.2G가 G-CSFR에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제하는 항체 가변 영역을 포함한다.

[0105] 일 예에서, 상기 단백질은 서열 번호 1의 111-115, 170-176, 218-234 및/또는 286-300에서 선택된 1개 또는 2개 또는 3개 또는 4개의 영역 내에 잔기를 포함하는 에피토프에 결합한다.

[0106] 일 예에서, 상기 단백질은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 항체이다.

[0107] 일 예에서, 상기 단백질은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함하는 항체이다.

[0108] 일 예에서, 상기 단백질은 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH의 3 개의 CDR을 포함하는 VH 및 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL의 3 개의 CDR을 포함하는 VL을 포함하는 항체이다.

[0109] 일 예에서, 상기 단백질은 서열번호 2로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VH의 3 개의 CDR을 포함하는 VH 및 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 VL의 3 개의 CDR을 포함하는 VL을 포함하는 항체이다.

[0110] 일 예에서, 상기 단백질은 다음을 포함하는 항체이다 :

[0111] (i) 서열번호 14 또는 18로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 또는

[0112] (ii) 서열번호 14로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 하나의 중쇄 및 서열번호 18로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 하나의 중쇄 및 서열번호 15로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 두 개의 경쇄.

[0113] **서열목록의 핵심**

[0114] 서열번호 1 - C- 말단 폴리히스티딘 태그를 갖는 호모 사피엔스 G-CSFR (hG-CSFR)의 아미노산 25-335

[0115] 서열번호 2 - C1.2의 V_H

[0116] 서열번호 3 - C1.2의 V_L

[0117] 서열번호 4 - C1.2G의 V_H

[0118] 서열번호 5 - C1.2G의 V_L

[0119] 서열번호 6 - C1.2의 HCDR1

[0120] 서열번호 7 - C1.2의 HCDR2

[0121] 서열번호 8 - C1.2의 HCDR3

[0122] 서열번호 9 - C1.2의 LCDR1

[0123] 서열번호 10 - C1.2의 LCDR2

[0124] 서열번호 11 - C1.2의 LCDR3

[0125] 서열번호 12 - C1.2의 HCDR3의 공통 서열

[0126] 서열번호 13 - C1.2의 LCDR3의 공통 서열

[0127] 서열번호 14 - 안정화된 IgG4 불변 영역을 갖는 C1.2G의 중쇄

[0128] 서열번호 15 - 카파 불변 영역을 갖는 C1.2G의 경쇄

[0129] 서열번호 16 - 예시적인 h-G-CSFR의 서열

[0130] 서열번호 17 - C- 말단 폴리히스티딘 태그를 갖는 *Macaca fascicularis* G-CSFR (cynoG-CSFR)의 Ig 및 CRH 도메인을 포함하는 폴리펩티드

[0131] 서열번호 18 - 안정화된 IgG4 불변 영역을 갖고 C- 말단 리신이 결여된 C1.2G의 중쇄.

도면의 간단한 설명

[0132] 도 1은 신장 온 허혈-재관류 손상 모델에서 재관류 24 시간 후에 혈청 크레아티닌 농도를 그래프로 표현한 것이

다. 100 ㎍의 항-G-CSFR 항체 VR81로 마우스를 처리하면 100 ㎍의 이소타입 대조군 항체로 마우스를 처리하는 것에 비해 혈청 크레아티닌 농도가 유의하게 감소되었다. One-Way ANOVA (Bonferroni correction), * p <0.05, *** p <0.005 (그룹당 n = 8 마리 마우스). 결과는 두 개의 독립적인 실험을 나타낸다 (도 7 참조).

도 2는 신장 온 허혈-재관류 손상 모델에서 재관류 24 시간 후 혈장 우레아 농도를 그래프로 표현한 것이다. 100 ㎍의 항-G-CSFR 항체 VR81로 마우스를 처리하면 100 ㎍의 이소타입 대조군 항체로 마우스를 처리하는 것과 비교하여 혈장 우레아 농도가 상당히 감소되었다. Unpaired T-test * p <0.05 (n = 8 마우스 그룹 당). 결과는 두 개의 독립적인 실험을 나타낸다 (도 8 참조).

도 3은 신장 조직에서 HPF 당 호중구 수 (neutrophil count per high power field)를 그래프로 표현한 것이다. 100 ㎍의 항-G-CSFR 항체 VR81로 마우스를 처리하면 100 ㎍의 이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스와 비교하여 재관류 후 24 시간에 평가된 결과에서 온 신장 IRI 모델의 호중구 신장 침윤이 유의하게 감소되었다. One-Way ANOVA (Bonferroni 보정), * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005 (그룹당 n = 5-6 마우스).

도 4는 신장 조직에서 HPF 당 대식세포 수 (macrophage count per high power field)를 그래프로 표현한 것이다. 100 ㎍의 항-G-CSFR 항체 VR81로 마우스에 처리하면 100 ㎍의 이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스와 비교하여 재관류 후 24 시간에 평가된 결과에서 온 신장 IRI 모델의 대식세포 신장 침윤이 유의하게 감소되었다. One-Way ANOVA (Bonferroni 보정), * p <0.05, ** p <0.01 (그룹당 n = 5-6 마우스).

도 5는 신장 조직에서 HPF 당 (A) 호중구 및 (B) 대식세포 수의 그래프로 표현한 것이다. 500 ㎍의 항-G-CSFR 항체 VR81로 처리된 마우스는 500 ㎍의 이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스의 호중구 침윤과 비교하여 재관류 후 24 시간에 평가된 결과에서 온 신장 IRI 모델의 호중구와 대식세포 신장 침윤이 유의하게 감소되었다. One-Way ANOVA (Bonferroni 보정), **** p <0.0001 (그룹당 n = 5-6 마우스).

도 6은 처리된 마우스의 신장 피질에서 관찰된 관 괴사 (tubular necrosis)의 정도에 의해 결정된 온 IRI 모델에서의 신장 관 손상을 그래프로 표현한 것이다 (sham; 항-G-CSFR 항체 VR81 100 μg; 이소타입 대조군 항체 100 μg). 형광 현미경 법을 사용하여 반 정량적 방법 (semiquantitative method) (Lu B et al. Nephrology 2008)에 의해 괴사를 평가하였다. 관 괴사의 정도를 등급화하고 수정 된 점수 시스템 (modified scoring system)을 사용하였다 (표 3 참조). One-Way ANOVA Kruskal-Wallis test, Dunn's Multiple Comparison Test, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005 (Sahm의 경우 n = 3, 이외의 경우 그룹당 n = 8 마리 마우스).

도 7은 온 신장 IRI 모델에서 qRT-PCR로 평가된 신장 조직의 KIM-1, NGAL, IL-6, IL-8Rβ/CXCR2, MCP-1/CCL2, CXCL1, MIP-2/CXCL2, ICAM-1, 및 C5aR의 mRNA 발현의 그래프로 표현한 것이다. (A) KIM-1, NGAL, IL-6, IL-8Rβ/CXCR2, MCP-1/CCL2, CXCL1, 및 (B) MIP-2/CXCL2, ICAM-1, 및 C5aR의 발현을 유의하게 감소시켰다. VR81 vs 대조군 Ab에 대한 One-Way ANOVA Kruskal-Wallis test, Dunn's Multiple Comparison Test * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005.

도 8은 100 μg의 이소타입 대조군 항체 처리된 마우스 및 Sahm 마우스와 비교하여 100 μg의 항-G-CSFR 항체 VR81 또는 100 μg의 항-C5 항체 (BB5.1)로 처리 된 마우스의 (A) 신장 및 (B) 말초 혈액에서 유세포 분석에 의해 평가된 온 신장 IRI 모델에서 호중구의 백분율 빈도 ($CD11b^{+}Gr1^{+}$)를 그래프로 표현한 것이다. 이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스에서 관찰된 수준과 비교하여, Sham 마우스 및 VR81 또는 BB5.1로 처리된 마우스의 신장에서 호중구 현저히 낮은 수준의 ($CD11b^{+}Gr1^{+}$)가 관찰되었다. 혈액 내 호중구 수는 모든 그룹에서 비슷했으며 처리의 영향을 받지 않았다. One-Way ANOVA Kruskal-Wallis test, Dunn's Multiple Comparison Test, * p <0.05, ** p <0.01 (Sahm의 경우 n = 4, 그 이외의 경우 그룹 당 n = 7-8 마우스).

도 9는 온 신장 IRI 모델에서 혈청 크레아티닌 농도를 그래프로 표현한 것이다. 100 ㎍의 항-G-CSFR 항체 VR81 또는 100 ㎍의 항-C5 항체 BB5.1 로의 처리는 100 ㎍의 이소타입 대조군 항체로 마우스를 처리하는 것에 비해 크레아티닌 농도를 유의하게 감소시켰다. VR81과 BB5.1의 사이의 감소는 크게 다르지 않았다. One-Way ANOVA Kruskal-Wallis test, Dunn's Multiple Comparison Test, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005 (그룹 당 n = 7-8 마우스).

도 10은 온 신장 IRI 모델에서 혈장 우레아 농도를 그래프로 표현한 것이다. 100 ㎍의 항-G-CSFR 항체 VR81 또는 100 ㎍의 항-C5 항체 BB5.1 로의 처리는 100 ㎍의 이소타입 대조군 항체로 마우스를 처리하는 것과 비교하여 혈장 우레아 농도를 상당히 감소시켰다. VR81과 BB5.1 사이의 감소는 크게 다르지 않았다. One-Way ANOVA Kruskal-Wallis test, Dunn's Multiple Comparison Test , * p <0.05, ** p <0.01 (그룹 당 n = 7-8 마우스

).

도 11은 온 신장 IRI 모델에서 혈청 우레아 농도를 그래프로 표현한 것이다. 500 μg의 항-G-CSFR 항체 VR81로 마우스를 처리한 경우 500 μg의 이소타입 대조군 항체로 마우스를 처리한 경우에 비해 혈청 우레아 농도가 유의하게 감소되었다. One-Way ANOVA Kruskal-Wallis test, Dunn's Multiple Comparison Test * p <0.05, ** p <0.01 (그룹 당 n = 6-8 마우스).

도 12는 온 신장 IRI 모델 에서의 혈청 크레아티닌 농도 (평균 ± SEM)를 그래프로 표현한 것이다. 500 μg 항-G-CSFR 항체 (VR81)로 마우스를 처리하면 500 μg의 이소타입 대조군 항체로 마우스를 처리하는 것에 비해 혈청 크레아티닌 농도가 유의하게 감소되었다. One-Way ANOVA Kruskal-Wallis test, Dunn's Multiple Comparison Test * p <0.05 (그룹 당 n = 6-8 마우스).

도 13은 온 신장 IRI 모델의 (A) 혈액 및 (B) 신장에서 호중구 ($CD11b^{+}Gr1^{+}Ly6G^{+}$)의 퍼센트 빈도의 그래프로 표현한 것이다. 200 μg/마우스 및 500 μg/마우스의 항-G-CSFR 항체 VR81 처리는 500 μg/마우스의 이소타입 대조군 항체 처리에 비해 신장에서 호중구의 빈도를 유의하게 감소시켰다. 통계 : One-Way ANOVA (Bonferroni 보정), * p <0.05, ** p <0.01 (그룹당 n = 6-7 마우스).

도 14는 혈장 C5a (A) 및 신장 C5b-9 침착 (B)을 그래프로 표현한 것이다.

도 15는 온 신장 IRI 모델에서 혈액 및 신장에서 호중구 (CD11b+Gr1+Ly6G+)의 빈도를 그래프로 나타낸 것이다. 허혈 1 시간 전에 500 μg/마우스의 항-G-CSFR 항체 VR81로 처리하면 이소타입 대조 항체로 처리하는 것에 비해 신장에서 호중구의 빈도가 유의하게 감소되었다. 500 μg/마우스의 대조 항체 BB5.1 로의 처리는 이소타입 대조 항체로의 처리와 비교하여 신장에서 호중구의 빈도를 유의하게 감소시키지 않았다. 통계 : One-Way ANOVA Kruskal-Wallis test, Dunn's Multiple Comparison Test, * p <0.05, ** p <0.01 (그룹 당 n = 5-8 마우스).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0133] **일반**

[0134] 본 명세서 전체에서, 달리 구체적으로 언급되지 않거나 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단일 단계, 물질의 조성, 단계의 집단 또는 물질의 조성의 집단의 구성은 이들 단계, 물질의 조성, 단계의 집단 또는 물질의 조성의 집단 중 하나 및 복수 (즉, 하나 이상)를 포함하는 것으로 간주되어야 한다.

[0135] 당업자는 본 발명이 구체적으로 설명된 것 이외의 변형 및 수정에 쉽게 영향을 받을 수 있다는 것을 이해할 것이다. 본 개시는 이러한 모든 변형 및 수정을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 개시 내용은 또한 본 명세서에서 언급되거나 지시된 모든 단계, 특징, 조성물 및 화합물을 개별적으로 또는 집합적으로 포함하며, 임의의 및 모든 조합 또는 상기 단계 및 특징의 임의의 둘 이상을 포함한다.

[0136] 본 개시는 단지 예시의 목적으로 의도된 본 명세서에 기술된 특정예에 의해 범위가 제한되지 않아야 한다. 기능적으로 균등한 제품, 조성물 및 방법은 본 발명의 범위 내에 명확하게 포함된다.

[0137] 본 개시의 임의의 예는 달리 구체적으로 언급되지 않는 한 본 개시의 임의의 다른 예에 필요한 부분만 일부 수정하여 (*mutatis mutandis*) 적용되어야 한다.

[0138] 달리 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에 사용 된 모든 기술 및 과학 용어는 당업자에게 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 간주된다 (예를 들어, 세포 배양, 분자 유전학, 면역학, 면역 조직 화학, 단백질 화학 및 생화학).

[0139] 달리 지시되지 않는 한, 본 개시 내용에 사용된 재조합 단백질, 세포 배양 물 및 면역학적 기술은 당업자에게 공지된 표준 절차이다. 이러한 기술은 문헌 J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984), J. Sambrook *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989), T.A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991), D.M. Glover and B.D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996), and F.M. Ausubel *et al.* (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, including all updates until present), Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory, (1988), 및 J.E. Coligan *et al.* (editors) Current Protocols in Immunology, John Wiley &

Sons (현재까지의 모든 업데이트 포함) 등의 자료에서 문헌 전체에 걸쳐 기술되고 설명된다.

[0140] 본원의 가변 영역 및 이의 부분, 면역 글로불린, 항체 및 이의 단편에 대한 설명 및 정의는 Kabat *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991, Bork *et al., J Mol. Biol. 242*, 309-320, 1994, Chothia and Lesk *J. Mol Biol. 196*:901 -917, 1987, Chothia *et al. Nature 342*, 877-883, 1989 및/또는 Al-Lazikani *et al., J Mol Biol 273*, 927-948, 1997에 논의된 바에 따라 또한 명확해 질 수 있다.

[0141] 용어 "및/또는", 예를 들어 "X 및/또는 Y"는 "X 및 Y" 또는 "X 또는 Y"를 의미하는 것으로 이해되며, 이 둘 모두를 의미하거나 이 둘 중 어느 하나를 의미하는 명백한 지지를 제공하기 위한 것으로 받아들여져야 한다.

[0142] 본 명세서 전체에서, "포함하다 (comprise)"라는 단어, 또는 "포함하다 (comprises)" 또는 "포함하는 (comprising)"과 같은 변형은 언급된 요소 (element), 정수 (integer) 또는 단계 (step), 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹을 포함하지만, 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소, 정수 또는 단계의 그룹을 배제하는 않는 것으로 이해될 것이다.

[0143] 본 명세서에 사용된 용어 "유래된 (derived from)"은 특정된 정수(specified integer)가 비록 그 소스로부터 필수적으로 직접 수득될 수는 없을지라도 그 특정 소스로붜 얻을 수 있는 것임을 나타내기 위한 것으로 받아들여져야 한다.

[0144] **선택된 정의**

[0145] 본 발명에 의해 고려되는 "화합물 (compound)"은 천연 화합물, 화학적 소분자 화합물 또는 생물학적 화합물 또는 거대 분자를 포함하는 임의의 다양한 형태를 취할 수 있다. 예시적인 화합물은 항체 또는 항체의 항원 결합 단편, 핵산, 폴리펩티드, 펩티드 및 소분자를 포함한다.

[0146] 본원에서 "과립구 집락자극인자"(G-CSF)에 대한 언급은 고유 형태의 G-CSF, 이의 돌연변이 형태, 예를 들어, 필그라스팀 (filgrastim) 및 페길화 된 형태의 G-CSF 또는 필그라스팀을 포함한다. 이 용어는 또한 G-CSFR (예를 들어, 인간 G-CSFR)에 결합하고 신호 전달을 유도하는 활성을 유지하는 돌연변이 형태의 G-CSF를 포함한다.

[0147] G-CSF는 과립구 생산의 주요 조절자이다. G-CSF는 골수 간질 세포, 내피 세포, 대식세포 및 섬유 모세포 (fibroblasts)에 의해 생성되며, 염증 자극에 의해 생성이 유도된다. G-CSF는 초기 골수성 전구체, 성숙한 호중구, 단핵구/대식세포, T 및 B 림프구 및 내피 세포에서 발현되는 G-CSF 수용체 (G-CSFR)를 통해 작용한다.

[0148] 명명법의 목적으로 그리고 제한없이, 인간 G-CSFR의 예시적인 서열은 NCBI 참조 서열: NP_000751.1 (및 서열번호 : 16)에 제시되어 있다. 다른 종으로부터의 G-CSFR의 서열은 본원 및/또는 공개적으로 이용 가능한 데이터베이스에서 제공하는 서열 및/또는 표준 기술을 사용하여 결정될 수 있다 (예를 들어, Ausubel *et al.*, (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 현재까지 모든 업데이트 포함) 또는 Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). 인간 G-CSFR에 대한 언급은 hG-CSFR과 같이 약칭될 수 있고 시노몰구스 원숭이 G-CSFR에 대한 언급은 cynoG-CSFR로 약칭될 수 있다. 가용성 G-CSFR에 대한 언급은 G-CSFR의 리간드 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. G-CSFR의 Ig 및 CRH 도메인은 리간드 결합 및 수용체 이량체화에 관여한다 (Layton et al., J. Biol Chem., 272 : 29735-29741, 1997, Fukunaga et al, EMBO J. 10 : 2855-2865). 1991). 수용체의 이들 부분을 포함하는 G-CSFR은 수용체의 가용성 형태는 수용체에 대한 다양한 연구에 사용되어 왔고, 상기 수용체의 위치 78, 163 및 228에서 자유 시스테인의 돌연변이는 리간드 결합에 영향을 미치지 않으며 가용성 수용체 폴리펩티드의 발현 및 단리를 돕는다 (Mine *et al., Biochem., 43*: 2458-2464 2004)

[0149] 본원에 사용된 용어 "허혈-재관류 손상 (ischemia-reperfusion injury)"은 허혈 기간 또는 산소 부족 (무산소증 또는 저산소증) 후 혈액 공급이 조직 또는 기관으로 회복될 때 발생하는 조직 또는 기관 손상을 지칭한다. 허혈 기간 동안 혈액으로부터의 산소 및 영양분이 없으면 순환의 회복이 정상적인 기능의 회복보다는 산화 스트레스의 유도를 통한 염증 및 산화적 손상을 초래하는 상태를 유발한다. 허혈-재관류 손상 (IRI)은 "재관류 손상 (reperfusion injury)", "재관류 손상 (reperfusion insult)" 및 "재산소화 손상 (reoxygenation injury)"으로도 알려져 있다. 본원에서 사용되는 "허혈-재관류 손상"은 온 (warm) 허혈-재관류 손상 및 냉 (cold) 허혈-재관류 손상을 모두 포함한다.

[0150] 본원에서 사용되는 용어 "허혈 (ischemia 또는 ischaemia)"은 조직으로의 혈액 공급의 제한을 말하여 세포 대사

에 필요한 산소 및 포도당의 부족을 유발할 뿐만 아니라 대사 찌꺼기 (metabolic waste)를 축적하고 제거를 감소시킨다.

[0151] 본원에 사용된 용어 "재관류 (reperfusion)"는 조직으로의 혈류 또는 산소의 회복에 관한 것이다.

[0152] 본원에 사용된 용어 "상태 (condition)"는 정상적인 기능의 파괴 (disruption) 또는 방해 (interference)를 말하며, 이는 임의의 특정 상태로 제한되지 않으며, 질병 (disease) 또는 장애 (disorder)를 포함할 것이다.

[0153] 본원에 사용된 용어 "예방하는 (preventing)", "예방하다 (prevent)" 또는 "예방 (prevention)"은 본 개시 내용의 화합물을 투여하여 상태 (condition)의 적어도 하나의 증상 (symptom)의 발생을 적어도 부분적으로 중지 (stop) 시키거나 방해 (hinder)하는 것을 포함한다. 이 용어는 또한 재발을 예방하거나 방해하기 위해 완화되는 대상체의 치료를 포함한다.

[0154] 본원에 사용된 용어 "치료하는 (treating)", "치료하다 (treat)" 또는 "치료 (treatment)"는 본원에 기재된 화합물을 투여하여 특정 질환 (disease) 또는 상태 (condition)의 적어도 하나의 증상을 감소시키거나 제거하는 것을 포함한다.

[0155] 본원에 사용된 용어 "호중구 감소증 (neutropenia)"은 정상 범위의 하한치 미만의 절대 호중구 수 (ANC), 예를 들어 2000 세포/μL 혈액 미만, 또는 1500 세포/μL 혈액 미만, 또는 1000 세포/μL 혈액 미만, 예를 들어 500 세포/μL 혈액 미만의 ANC를 지칭하는데 사용된다 (Sibille et al. 2010 Br J Clin Pharmacol 70 (5) : 736-748 참조). 일부 예에서, G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 중증 호중구 감소증을 유발하지 않는 양으로 투여된다. 본원에 사용된 용어 "중증 호중구 감소증 (severe neutropenia)"은 1000 세포/μL 혈액 미만의절대 호중구 수 (ANC)를 지칭하기 위해 사용된다.

[0156] 본원에 사용된 용어 "대상체 (subject)"는 인간을 포함하는 임의의 동물, 예를 들어 포유 동물을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 예시적인 대상체는 인간 및 비인간 영장류를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 예를 들어, 상기 대상체는 인간이다.

[0157] 공여자 (예를 들어, 기관 공여자) 또는 수여자 (예를 들어, 기관 수여자)가 포유 동물, 예를 들어 인간을 포함한다는 것은 상기 단락으로부터 당업자에게 명백 할 것이다.

[0158] 용어 "단백질 (protein)"은 단일 폴리펩티드 사슬, 즉 펩티드 결합에 의해 연결된 일련의 연속된 아미노산, 또는 서로 공유적으로 또는 비공유적으로 연결된 일련의 폴리펩티드 사슬들 (즉, 폴리펩티드 복합체)을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 일련의 폴리펩티드 사슬들은 적합한 화학적 또는 이황화 결합을 사용하여 공유적으로 연결될 수 있다. 비공유 결합의 예는 수소 결합, 이온 결합, 반 데르 발스 힘 및 소수성 상호 작용을 포함한다.

[0159] 용어 "폴리펩티드 (polypeptide)" 또는 "폴리펩티드 사슬 (polypeptide chain)"은 상기 단락으로부터 펩티드 결합에 의해 연결된 일련의 연속된 아미노산을 의미하는 것으로 이해될 것이다.

[0160] "단리된 단백질 (isolated protein)" 또는 "단리된 폴리펩티드 (isolated polypeptide)"라는 용어는 그 오리진이나 유래된 소스에 의해 자연 상태에서 동반되는 자연적으로 관련된 성분과 관련되지 않는 단백질 또는 폴리펩티드이며; 동일 소스로부터 유래한 다른 단백질이 실직적으로 없다는 것이다. 단백질은 당업계에 공지된 단백질 정제 기술을 사용하여 자연적으로 관련된 성분이 실질적으로 없도록 만들어 내거나 단리에 의해 실질적으로 정제될 수 있다. "실질적으로 정제된 (substantially purified)"은 단백질에 실질적으로 오염 물질이 없음을 의미하고, 예를 들어 오염물질의 약 70 % 또는 75 % 또는 80 % 또는 85 % 또는 90 % 또는 95 % 또는 96 % 또는 97 % 또는 98 % 또는 99 %가 없음을 의미한다.

[0161] "재조합 (recombinant)"이라는 용어는 인공 유전자 재조합의 생성물을 의미하는 것으로 이해되어야한다. 따라서, 항체 항원 결합 도메인을 포함하는 재조합 단백질과 관련하여, 이 용어는 B 세포 성숙 동안 발생하는 자연 재조합의 산물인 대상체 내에 자연적으로 발생하는 항체를 포함하지 않는다. 그러나, 이러한 항체가 단리되면, 항체 항원 결합 도메인을 포함하는 단리된 단백질로 간주되어야 한다. 유사하게, 단백질을 암호화하는 핵산이 재조합 수단을 사용하여 단리되고 발현되는 경우, 이에 따른 단백질은 항체 항원 결합 도메인을 포함하는 재조합 단백질이다. 재조합 단백질은 또한 그것이 발현되는 세포, 조직 또는 대상체 내에 있을 때 인공 재조합 수단에 의해 발현되는 단백질을 포함한다.

[0162] 본원에 사용된 용어 "항원 결합 부위 (antigen binding site)"는 항원에 결합하거나 특이적으로 결합할 수 있는 단백질에 의해 형성된 구조를 의미하는 것으로 이해되어야한다. 항원 결합 부위는 일련의 인접한 아미노산, 또

는 단일 폴리펩티드 쇄의 아미노산 일 필요는 없다. 예를 들어, 2 개의 상이한 폴리 펩타이드 쇄로부터 생성된 Fv에서, 항원 결합 부위는 항원과 상호 작용하는 V_L 및 V_H의 일련의 아미노산으로 구성되고, 항상 그렇지는 않으나 일반적으로 각 가변 영역에 하나 이상의 CDR에 있다. 일부 예에서, 항원 결합 부위는 V_H 또는 V_L 또는 Fv이다.

[0163] 당업자는 "항체"가 일반적으로 복수의 폴리펩티드 쇄, 예를 들어 V_L을 포함하는 폴리펩티드 및 V_H를 포함하는 폴리펩티드로 구성된 가변 영역을 포함하는 단백질로 간주된다는 것을 알 것이다. 항체는 또한 일반적으로 불변 도메인을 포함하며, 이들 중 일부는 중쇄의 경우 불변 단편 (constant fragment) 또는 결정 단편 (fragment crystallizable, Fc)을 포함하는 불변 영역으로 배열 될 수 있다. V_H 및 V_L 은 하나 또는 몇 개의 밀접하게 관련된 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결합 영역을 포함하는 Fv를 형성하도록 상호 작용한다. 일반적으로, 포유 동물로부터의 경쇄는 κ경쇄 또는 λ경쇄이고 포유 동물로부터의 중쇄는 α, δ, ε, γ 또는 μ이다. 항체는 임의의 유형 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 클래스 (예를 들어, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 및 IgA_2) 또는 서브클래스 일 수 있다. 용어 "항체"는 또한 인간화 항체, 영장류화 항체, 인간 항체 및 키메라 항체를 포함한다.

[0164] 용어 "전장 항체 (full-length antibody)", "온전한 항체 (intact antibody)" 또는 "전체 항체 (whole antibody)"는 항체의 항원 결합 단편과 대조적으로 실질적으로 온전한 형태의 항체를 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용된다. 구체적으로, 전체 항체는 Fc 영역을 포함하는 중쇄 및 경쇄를 갖는 항체를 포함한다. 불변 도메인은 야생형 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 야생형 서열 불변 도메인) 또는 이의 아미노산 서열 변이체일 수 있다.

[0165] 본원에 사용된 "가변 영역 (variable region)"은 항원에 특이적으로 결합할 수 있고 상보성 결정 영역 (CDR); 즉, CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 프레임 워크 영역 (FR)의 아미노산 서열을 포함하는 본원에 정의된 바와 같은 항체의 경쇄 및/또는 중쇄의 부분을 지칭한다. 예시적인 가변 영역은 3 개의 CDR과 함께 3 개 또는 4 개의 FR (예를 들어, FR1, FR2, FR3 및 선택적으로 FR4)을 포함한다. IgNAR로부터 유래된 단백질의 경우, 상기 단백질은 CDR2가 결여될 수 있다. V_H는 중쇄의 가변 영역을 지칭한다. V_L은 경쇄의 가변 영역을 지칭한다.

[0166] 본원에 사용된 용어 "상보성 결정 영역 (complementarity determining regions)" (*syn.* CDR; 즉, CDR1, CDR2 및 CDR3)은 그 존재가 항원 결합에 필요한 항체 가변 영역의 아미노산 잔기를 지칭한다. 각각의 가변 영역은 전형적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 식별되는 3 개의 CDR 영역을 갖는다. CDR 및 FR에 할당된 아미노산 위치는 Kabat *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 and 1991 또는 본 개시 내용의 수행에서의 다른 넘버링 시스템, 예를 들어 Chothia and Lesk *J. Mol Biol. 196*: 901-917, 1987; Chothia *et al. Nature* 342, 877-883, 1989; 및/또는 l-Lazikani *et al., J Mol Biol 273*: 927-948, 1997;의 캐노니칼 넘버링 시스템 (canonical numbering system) 또는 Lefranc *et al., Devel. And Compar. Immunol., 27*: 55-77, 2003의 IMGT 넘버링 시스템 또는 Honnegher and Plückthun *J. Mol. Biol., 309*: 657-670, 2001의 AHO 넘버링 시스템에 따라 정의될 수 있다. 예를 들어, Kabat의 넘버링 시스템에 따르면 V_H 프레임 워크 영역 (FR) 및 CDR은 다음과 같이 배치된다 : 잔기 1-30 (FR1), 31-35 (CDR1), 36-49 (FR2), 50-65 (CDR2), 66-94 (FR3), 95-102 (CDR3) 및 103-113 (FR4). Kabat의 넘버링 시스템에 따르면, V_L FR 및 CDR은 다음과 같이 배치된다 : 잔기 1-23 (FR1), 24-34 (CDR1), 35-49 (FR2), 50-56 (CDR2), 57-88 (FR3), 89-97 (CDR3) 및 98-107 (FR4). 본 개시는 Kabat 넘버링 시스템에 의해 정의된 FR 및 CDR로 제한되지 않고, 전술한 것을 포함하여 모든 넘버링 시스템을 포함한다. 일 예에서, CDR (또는 FR)에 대한 본원의 언급은 Kabat 넘버링 시스템에 따른 이들 영역에 관한 것이다.

[0167] "프레임 워크 영역 (Framework regions)"(FR)은 CDR 잔기 이외의 가변 영역 잔기이다.

[0168] 본원에 사용된 용어 "Fv"는 다수의 폴리펩티드 또는 단일 폴리펩티드로 구성 되든 V_L 및 V_H가 회합하여 항원 결합 부위를 갖는 복합체를 형성하는, 즉 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 단백질을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 항원 결합 부위를 형성하는 V_H 및 V_L은 단일 폴리펩티드 쇄 또는 상이한 폴리펩티드 쇄에있을 수 있다. 또한, (본 개시 내용의 임의의 단백질뿐만 아니라) 본 개시 내용의 Fv는 동일한 항원에 결합하거나 결합하지 않을 수 있는 다수의 항원 결합 부위를 가질 수 있다. 이 용어는 항체로부터 직접 유래된 단편뿐만 아니라 재조합 수단을 사용하여 생성된 이러한 단편에 상응하는 단백질을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 일부

예에서, V_H는 중쇄 불변 도메인 (C_H)1에 연결되지 않고/않거나 V_L은 경쇄 불변 도메인 (C_L)에 연결되지 않는다. 예시적인 Fv 함유 폴리펩티드 또는 단백질은 Fab 단편, Fab' 단편, F(ab') 단편, scFv, 다이아바디, 트리아바디, 테트라 바디 또는 고차 복합체 (higher order complex), 또는 불변 영역 또는 이의 도메인, 예를 들어 C_H2 또는 C_H3 도메인에 연결된 전술한 것 중 임의의 것, 예를 들어 미니바디를 포함한다. "Fab 단편 (Fab fragment)"은 면역 글로불린의 1가 (monovalent) 항원-결합 단편으로 구성되며, 온전한 경쇄 및 중쇄의 일부로 구성된 단편을 생성하기 위해 효소 파파인 (papain)으로 전체 항체를 분해 (digestion)하여 생성될 수 있거나 재조합 수단을 사용하여 제조될 수 있다. 항체의 "Fab'단편 (Fab' fragment)"은 전체 항체를 펩신으로 처리한 후 환원시켜, 온전한 경쇄 및 V_H 및 단일 불변 도메인을 포함하는 중쇄의 일부로 구성된 분자를 생성함으로써 수득될 수있다. 이러한 방식으로 처리된 항체 당 2 개의 Fab' 단편이 수득된다. Fab' 단편은 또한 재조합 수단에 의해 생성될 수 있다. 항체의 "F(ab')2 단편 (F(ab')2 fragment)"은 2 개의 이황화 결합에 의해 함께 연결된 2 개의 Fab'단편의 이량체로 구성되는데, 후속 환원없이 전체 항체 분자를 효소 펩신으로 처리함으로써 수득된다. "Fab_2"단편은 예를 들어 류신 지퍼 또는 C_H3 도메인을 사용하여 연결된 2 개의 Fab 단편을 포함하는 재조합 단편이다. "단일 사슬 Fv (single chain Fv)"또는 "scFv"는 경쇄의 가변 영역 및 중쇄의 가변 영역이 적합하고 유연한 폴리펩티드 링커에 의해 공유적으로 연결된 항체의 가변 영역 단편 (Fv)을 함유하는 재조합 분자이다.

[0169] 화합물 또는 이의 항원 결합 부위와 항원의 상호 작용과 관련하여, 본원에 사용된 용어 "결합하다 (binds)"는 그 상호 작용이 항원 상의 특정 구조 (예를 들어, 항원 결정기 또는 에피토프)의 존재에 의존한다는 것을 의미한다. 예를 들어, 항체는 일반적으로 단백질이 아닌 특정 단백질 구조를 인식하고 이에 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 결합하는 경우, 표지된 "A" 및 그 단백질을 함유하는 반응에서 에피토프 "A"를 함유하는 분자 (또는 유리, 비표지된 "A")의 존재는 항체에 결합하는 표지된 "A"의 양을 감소시킬 것이다.

[0170] 본원에 사용된 용어 "특이적으로 결합하는 (specifically binds)" 또는 "특이적으로 결합하는 (binds specifically)"은 본 개시 내용의 화합물이 다른 (alternative) 항원이나 세포를 가지고 있는 경우 보다 특정 항원이나 이를 발현하는 세포와 보다 자주, 보다 신속하게, 보다 긴 지속 시간 및/또는 더 큰 친화도로 반응하거나 회합하는 것을 의미하는 것으로 이해되어야한다. 예를 들어, 화합물은 다른 사이토 카인 수용체 또는 다반응성 천연 항체에 의해 (즉, 인간에서 자연적으로 발견되는 다양한 항원에 결합하는 것으로 알려진 자연 발생 항체에 의해) 일반적으로 인식되는 항원보다 실질적으로 더 큰 친화성 (예를 들어, 20 배 또는 40 배 또는 60 배 또는 80 배 내지 100 배 또는 150 배 또는 200 배)으로 G-CSFR (예를 들어, hG-CSFR)에 결합한다. 필수적인 것은 아니나, 일반적으로 결합에 대한 언급은 특이적 결합을 의미하고, 각 용어는 다른 용어에 대한 명백한 지지를 제공하는 것으로 이해되어야 한다.

[0171] 단백질 또는 항체가 다른 폴리펩티드에 대한 그 단백질 또는 그 항체의 해리 상수 (K_D)보다 작은 해리 상수 (K_D)로 폴리펩티드에 결합하는 경우, 그 단백질 또는 항체는 그 폴리펩티드에 "선호적으로 결합하는 (preferentially bind)" 것으로 간주될 수 있다. 일 예에서, 단백질 또는 항체가 다른 폴리펩티드에 대한 K_D 보다 적어도 약 20 배 또는 40 배 또는 60 배 또는 80 배 또는 100 배 또는 120 배 또는 140 배 또는 160 배인 친화성 (즉, K_D)으로 폴리펩티드에 결합하는 경우, 그 폴리펩티드에 선호적으로 결합하는 것으로 간주된다.

[0172] 명확화를 위해 그리고 본원의 예시된 주제에 기초하여 당업자에게 명백한 바와 같이, 본 명세서에서 "친화도 (affinity)"에 대한 언급은 단백질 또는 항체의 K_D에 대한 언급이다.

[0173] 명확화를 위해 그리고 본원의 설명에 기초하여 당업자에게 명백한 바와 같이, "적어도 약 ~ 친화도 (affinity of at least about)"에 대한 언급은 친화도 (또는 K_D))가 인용된 값 이상임을 의미하는 것으로 이해될 것이다 (즉, 친화도로 인용된 값이 더 작다). 즉, 2nM의 친화도는 3nM의 친화도보다 크다는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 다른 방식으로 말하면, 이 용어는 "X 이하의 친화도 (an affinity of X or less)"일 수 있으며, 여기서 X는 본원에 인용된 값이다.

[0174] "적어도 약 ~ IC_{50}"은 IC_{50}이 인용된 값 이상임을 의미하는 것으로 이해될 것이다 (즉, IC_{50}로 인용된 값이 더 작다). 즉 2nM의 IC_{50}이 3nM의 IC_{50}보다 크다는 것을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 다른 방식으로 말하면,이 용어는 "X 이하의 IC_{50} (IC_{50} of X or less)"일 수 있으며, 여기서 X는 본원에 인용된 값이다.

[0175] 본원에 사용된 용어 "에피토프 (epitope)" (*syn.* "항원 결정기 (antigenic determinant)")는 항체의 항원 결합

부위를 포함하는 단백질이 결합하는 hG-CSFR의 영역을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 이 용어는 단백질이 접촉하는 특정 잔기 또는 구조에 반드시 한정되는 것은 아니다. 예를 들어,이 용어는 단백질에 의해 접촉되는 아미노산에 걸친 영역 및/또는 이 영역 외부의 5-10 또는 2-5 또는 1-3개의 아미노산을 포함한다. 일부 예에서, 에피토프는 hG-CSFR이 접힐 (folded) 때 서로 인접해있는 일련의 불연속 아미노산, 즉 "입체 형태적 에피토프 (conformational epitope)"를 포함한다. 예를 들어, 입체 형태적 에피토프는 서열번호 1의 111-115, 170-176, 218-234 및/또는 286-300에 상응하는 하나 이상의 또는 둘 이상의 또는 모든 영역의 아미노산을 포함한다. 당업자는 용어 "에피토프 (epitope)"가 펩티드 또는 폴리펩티드로 제한되지 않음을 인식할 것이다. 예를 들어, 용어 "에피토프"는 당 측쇄, 포스포릴 측쇄 또는 설포닐 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면 그룹을 포함하고, 특정 예에서 특정 3 차원 구조적 특성 및/또는 특정 전하 특성을 가질 수 있다.

[0176] 용어 "경쟁적으로 억제한다 (competitively inhibits)"는 본 개시 내용의 단백질 (또는 이의 항원 결합 부위)이 G-CSFR, 예를 들어 hG-CSFR에 대한 인용된 항체 또는 단백질의 결합을 감소시키거나 방지 (prevent)하는 것으로 이해될 것이다. 이는 단백질 (또는 항원 결합 부위) 및 항체의 동일하거나 중복되는 에피토프에 대한 결합 때문일 수 있다. 상기로부터 단백질이 그 항체의 결합을 완전히 억제할 필요는 없으며, 통계적으로 유의한 양, 예를 들어 적어도 약 10 % 또는 20 % 또는 30 % 또는 40 % 또는 50 % 또는 60 % 또는 70 % 또는 80 % 또는 90 % 또는 95 % 까지 결합을 감소시킬 필요가 있음은 명백하다. 바람직하게는, 상기 단백질은 항체의 결합을 적어도 약 30 %,표보다 바람직하게는 적어도 약 50 %, 더욱 바람직하게는 적어도 약 70 %, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 75 %, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 80 % 또는 85 %, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 90 % 까지 감소시킨다. 결합의 경쟁적 억제를 결정하는 방법은 당업계에 공지 및/또는 본원에 기재되어 있다. 예를 들어, 항체는 그 단백질의 존재 또는 부재하에 G-CSFR에 노출된다. 단백질의 부재 하에서보다 단백질의 존재 하에서 더 적은 항체가 결합하는 경우, 단백질은 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 것으로 간주된다. 일 예에서, 경쟁적 억제는 입체 장애로 인한 것이 아니다.

[0177] 2 개의 에피토프와 관련하여 "중첩 (Overlapping)"은 하나의 에피토프에 결합하는 단백질 (또는 이의 항원 결합 부위)이 다른 에피토프에 결합하는 단백질 (또는 항원 결합 부위)의 결합을 경쟁적으로 억제하도록 2 개의 에피토프가 충분한 숫자의 아미노산 잔기를 공유한다는 것을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, "중첩" 에피토프는 적어도 1 또는 2 또는 3 또는 4 또는 5 또는 6 또는 7 또는 8 또는 9 또는 20 개의 아미노산을 공유한다.

[0178] 본원에 사용된 용어 "중화 (neutralize)"는 화합물이 G-CSFR을 통한 세포에서의 G-CSF 매개 신호 전달을 차단, 감소 또는 예방할 수 있음을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 중화를 결정하는 방법은 당업계에 공지 및/또는 본원에 기술되어 있다.

[0179] **허혈-재관류 손상의 예방 또는 치료**

[0180] 본 개시 내용은 예를 들어 과립구 집락자극인자 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물을 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 허혈-재관류 손상을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 상기 화합물은 G-CSF 또는 G-CSFR에 결합한다.

[0181] 허혈-재관류 손상은 자연적 사건 (예를 들어, 심근 경색 또는 뇌졸중에 따른 혈류의 회복), 외상, 종양, 또는 혈액 또는 산소 공급이 감소 된 조직 또는 기관에 혈류 또는 산소를 회복시키는 하나 이상의 수술 절차 또는 다른 치료적 중재에 의해 야기 될 수 있다.

[0182] 일 예에서, 허혈-재관류 손상은 수술 절차에 의해 야기된다. 이러한 수술 과정은 예를 들어, 관상 동맥 우회술 (coronary artery bypass), 이식 수술 (graft surgery), 관상 동맥 혈관 성형술 (coronary angioplasty), 기관 이식 수술 (organ transplant surgery) 등 (예를 들어, 심폐 우회 수술 (cardiopulmonary bypass surgery))을 포함한다.

[0183] 일부 예에서, 허혈 및/또는 재관류 손상은 기관 이식, 저온 기관 저장, 뇌사, 죽상 동맥 경화증, 혈전증, 혈전색전증, 지질 색전증, 외상, 출혈, 스텐트, 수술, 혈관 성형술, 우회 수술, 총 허혈, 심근 경색, 뇌졸중, 말초 혈관 질환, 수술, 패혈증 또는 이들의 조합에 기인하거나 이와 관련되어 있다.

[0184] 일부 예에서, 상기 허혈-재관류 손상은 기관 이식에 기인하거나 이와 관련되어 있다. 일부 예에서, 상기 기관은 고형 기관이다. 일부 예에서, 상기 기관 이식은 신장 이식이다. 일부 예에서,상기 기관 이식은 간 이식이다. 일부 예에서, 상기 기관 이식은 심장 이식이다. 일부 예에서, 상기 기관 이식은 췌장 이식이다. 일 예에서, 상기 기관 이식은 폐 이식이다. 일 예에서, 상기 기관 이식은 위 이식이다. 일 예에서, 기관 이식은 장 이식이다. 일

예에서, 상기 기관 이식은 고환 이식이다.

[0185] 일 예에서, 상기 허혈-재관류 손상은 조직 이식에 기인하거나 이와 관련되어 있다. 일 예에서, 상기 조직 이식은 혈관 이식이다. 일 예에서, 상기 조직 이식은 피부 이식, 예를 들어 혈관화 된 피부이다. 일 예에서, 상기 조직 이식은 췌장 섬 이식이다.

[0186] 허혈 재관류 손상의 영향은 기관 기능 장애, 경색 (infarct), 염증, 산화적 손상, 미토콘드리아 막 전위 손상, 아폽토시스, 재관류 관련 부정맥, 심장 충격 (cardiac stunning), 심장 지방 독성 (ardiac lipotoxicity), 허혈-유래 흉터 형성 및 이들의 조합을 포함한다. 신장 이식에 기인하거나 이와 관련된 허혈-재관류 손상의 경우, 급성 신장 손상 및 이식편 기능 지연 (DGF)이 영향에 포함된다.

[0187] 일부 예에서, 본 개시 내용의 방법은 이식 후 급성 신장 손상의 가능성을 예방하거나 감소시킨다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 다음 중 하나 이상의 위험 (risk)를 예방하거나 감소시킨다 :

[0188] · 혈장 크레아티닌 수준의 dL 당 적어도 ≥ 0.3 mg (L 당 26.52 μmol) 또는 기준선으로부터 ≥ 1.5 내지 2 배 증가;

[0189] · 적어도 6 시간 동안 시간당 kg 당 약 0.5mL 미만의 소변; 및/또는

[0190] · 필요한 신장 대체 치료.

[0191] 일부 예에서, 본 개시 내용의 방법은 이식, 예를 들어 신장 이식 후 이식편 기능 지연 (delayed graft function) 가능성을 예방하거나 감소시킨다. 당업자에게 인지된 바와 같이, 이식편 기능 지연은 장기간에 걸친 (long-term) 이식 결과 불량, 만성 이식 거부 및/또는 장기 생존과 관련이 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 다음 중 하나 이상의 위험 (risk)을 예방하거나 감소시킨다 :

[0192] · 이식 기능이 시작되기 (onset) 전에 이식 후 약 7 일 이내에 1회 이상의 혈액 투석 (hemodialysis) 치료의 필요성;

[0193] · 0 일과 7 일 사이에 70 % 미만의 크레아티닌 감소 비율.

[0194] 일부 예에서, 본 개시 내용의 방법은 다음 중 하나 이상의 가능성을 예방하거나 감소시킨다 :

[0195] · 1 차 이식 비-기능 (Primary graft non-function) : 이식 후 신장이 제대로 기능하지 않는 상태이며 이식에도 불구하고 환자는 계속 투석이 필요; 및/또는

[0196] · 느린 이식 기능 (Slow graft function) : 데시리터 (deciliter) 당 3 밀리그램 (mg)보다 큰 혈청 크레아티닌으로 정의되며 이식 후 5 일에 투석 할 필요가 없음.

[0197] 일부 예에서, G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 예를 들어 이식된 기관에서 염증을 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다. 본원에 사용된 용어 "염증 (inflammation)" 또는 "염증 반응"은 염증이 진행되는 조직에서 발생하는 일련의 변화에 관한 것이다. 특히, 염증은 병원체, 손상된 세포 또는 자극제 (irritants)를 포함한 유해한 자극에 대한 생물학적 반응과 관련이 있다. 염증을 결정하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 적혈구 침강 속도 (ESR)의 측정 (여기서 높은 ESR은 염증을 나타냄), C-반응성 단백질 (CRP)의 측정 (여기서 높은 수준의 CRP는 염증을 나타냄), 및 백혈구 수 (염증에서 증가)을 포함한다.

[0198] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은, 예를 들어 이식 된 기관에서 산화적 손상을 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다. 본원에 사용된 용어 "산화적 손상 (oxidative damage)"은 산소 회복 동안 반응성 종에 의해 야기될 수 있는 생체 분자 손상에 관한 것이다. 산화적 손상은 지질 과산화 (lipid peroxidation), 산화적 DNA 손상 (oxidative DNA damage) 및 단백질에 대한 산화적 손상을 포함할 수 있다. 지질 과산화를 측정하는 방법은 HPLC에 의한 MDA (말론디알데히드)-TBA (티오바르비투르산) 측정, 및 질량 분석법에 의한 이소 프로스탄 (다가 불포화 지방산의 과산화의 특정 최종 생성물임)의 정량화를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. DNA 산화적 손상을 측정하는 방법은 8-하이드록시 -2'-데옥시구아노신 (8OHdG)의 측정을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 단백질에 대한 산화적 손상을 측정하는 방법은, 이에 제한되는 것은 아니나, 카보닐 분석 (단백질 카보닐기의 측정을 포함) 뿐만 아니라, 키누레닌 (트립토판으로부터의), 비티로신 (대사적으로 안정적으로 보이고 소변에서 검출될 수 있음), 발린 및 류신 하이드록사이드, L-디하이드 록시 페닐알라닌 (L-DOPA), 오르토-티로신, 2-옥소-히스티딘, 글루타메이트 세미알데히드 및 아디프산 세미알데히드를 포함하는 개별 아미노산 산화 생성물의 정량화를 포함한다. 미토콘드리아 막 전위 ($\Delta\Psi_{in}$)는 미토콘드리아 내부 막을 가로지르는 양성자 구배 형태의 막 전위와 관련이 있다. 미토콘드리아 막 전위 손상의 평가 방법은 당업자에게

공지되어 있으며, JC1 염료 (Cell Technology)를 포함한 막 전위를 모니터링 하기 위한 형광 프로브의 사용 및 녹색(485 nm 및 535 nm) 및 적색 형광 (550 nm 및 600 nm)의 정량화를 허용하는 여기 및 방출 파장에서의 전체 형광의 측정을 포함한다. 모든 조직 또는 기관의 연장된 허혈은 미토콘드리아 막 전위의 손상을 유도하는 것으로 알려져 있다.

[0199] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 호중구 및/또는 대식세포 침윤을 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다. 본원에 사용된 용어 "호중구 침윤 (neutrophil infiltration)" 및 "대식세포 침윤 (macrophage infiltration)"은 허혈-재관류 손상으로 인한 염증 반응 부위에서 방출되는 다양한 물질에 반응하여 조직 또는 세포에서 호중구 및 대식세포의 모집 (recruitment) 또는 축적 (accumulation)하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 호중구 및/또는 대식세포의 침윤은 기관 이식 후 공여자 기관 조직에서 발생할 수 있다. 호중구 및/또는 대식세포 침윤의 측정 방법은 당업자에게 공지된 것이다. 예를 들어, 호중구 또는 대 식세포는 형광 현미경에 의한 가시화에 의해 직접적으로 측정되거나 영향을 받는 조직에서 호중구/대식세포 특이적 단백질 또는 효소의 풍부 (abundance) 또는 활성 (activity)을 간접적으로 측정함으로써 직접적으로 평가될 수있다. 호중구 및/또는 대식세포 침윤을 측정하기 위한 적절한 방법은 Soo-Jeong Yu et al. J Intern Med (2008) 및 Pulli et al PloS One (2013)에 기술되어 있다.

[0200] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 보체 C5 활성화를 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다. 보체 C5a 활성화를 측정하는 방법은 효소 결합 면역 흡착 분석법 (ELISA)에 의한 혈장 C5a 수준의 평가를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0201] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 C5b-9 침착을 감소 시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다. C5b-9 침착을 측정하는 방법은 신장 섹션의 면역 형광 염색에 의한 분석을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0202] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 다음 중 하나 이상의 발현을 감소시키기에 충분한 양으로 투여된다 :

[0203] · 인터루킨 8 수용체 베타 (interleukin 8 receptor beta, IL-8Rβ);

[0204] · 단핵구 화학 유인 물질 단백질 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1);

[0205] · 신장 손상 분자 1 (kidney injury molecule 1, KIM-1);

[0206] · 호중구 젤라티나제 관련 리포칼린 (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL);

[0207] · 인터루킨 1 베타 (interleukin 1 beta, IL-1β);

[0208] · 인터루킨 6 (interleukin 6, IL-6);

[0209] · 종양 괴사 인자 알파 (tumor necrosis factor alpha, TNFα);

[0210] · 보체 성분 5a 수용체 1 (complement component 5a receptor 1, C5AR1);

[0211] · 대식세포 염증성 단백질 2-알파 (macrophage inflammatory protein 2-alpha, MIP2-alpha);

[0212] · 세포 간 접착 분자 1 (intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1);

[0213] · E-셀렉틴 (E-selectin); 및

[0214] · C-X-C 모티프 케모카인 리간드 1 (C-X-C motif chemokine ligand 1, CXCL1).

[0215] 유전자의 발현 수준을 측정하는 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있을 것이다. 예를 들어, 유전자의 발현 수준은 예를 들어, 노던 블롯 또는 Riedy et al Biotechniques (1995)에 기술된 바와 같은 정량적 역전사 PCR (qRT-PCR)에 의해 mRNA의 양을 정량함으로써 측정될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 유전자의 발현 수준은 유전자에 의해 코딩된 단백질의 수준을 정량함으로써, 예를 들어 효소-결합 면역 흡착 분석 (ELISA), 형광 결합 면역 흡착 분석 (FLISA), 면역 형광 또는 면역 블롯팅에 의해 측정될 수 있다 (참조 : Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)).

[0216] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 예를 들어 신장 이식과 관련된 이식편 기능 지연을 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다. 이식편 기능 지연은 이식 후 핍뇨 (post-transplantation oliguria)를 초래하는 급성 신장 손상의 징후, 동종 이식 면역원성 및 급성 거부 에피소드의 위험 증가, 및 장

기간 (long-term) 생존 감소이다. 이식편 기능 지연을 검출하기 위한 적합한 바이오마커는 NGAL, KIM-1, 간형 지방산 결합 단백질 (L-FABP), 인터루킨 18 (IL-18), YKL-40 (40kDa 헤파린-및 키틴-결합 당 단백질, 예를 들어 Hakala et al., J Biol Chem 1993 참조), 클러스테린 (clusterin) 및 시스타틴 C. (cystatin C.)를 포함한다. 이식편 기능 지연을 검출하기 위한 이러한 바이오마커는 Malyszko et al., Sci Rep (2015)에 기술되어 있으며, 이는 본원에 참조로써 포함된다.

[0217] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 혈청 또는 혈장 크레아티닌 수준의 증가를 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다. 당업자는 증가된 혈청 (또는 혈장) 크레아티닌 수준이 신장 기능 장애 (impaired kidney function)의 지표라는 것을 이해할 것이다. 예를 들어 허혈-재관류 손상과 같이 어떠한 이유에서 신장이 손상되면 신장에 의한 크레아티닌 제거율이 낮아져 혈액 내 크레아티닌 수치가 상승할 것이다. 비정상적으로 높은 수준의 크레아티닌은 신장의 오작동 (malfunction) 또는 부전 (failure) 가능성을 경고한다. 혈청 (또는 혈장) 크레아티닌 수준을 측정하기 위한 적절한 방법은, 예를 들어 알칼리성 피크레이트 (alkaline picrate)를 사용하는 Jaffe 반응과 같이, 당업계에 공지되어 있으며 Peake and Whiting, Clin Biochem Rev (2006)에 기재되어 있다.

[0218] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 혈청 또는 혈장 우레아 수준의 증가를 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다. 증가된 혈청 또는 혈장 우레아 수준은 신장 기능 장애의 지표이며, 허혈-재관류 손상으로 인해 발생할 수 있다. 혈청 또는 혈장 우레아는 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 측정될 수있다. 예를 들어, 혈청 또는 혈장 우레아는 다아진(diazine)을 형성하기 위한 디아세틸 (디아세틸 모노옥심 및 산으로부터 생성됨)과 우레아와의 반응과 같은 화학적 방법, 또는 예를 들어 우레아제 (urease)를 사용하여 암모니아 또는 글루타메이트 데하이드로게나제를 생성 및 측정하는 효소적 방법 (여기에서는 NADH의 소비가 측정됨)에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, Cell Biolabs의 Urea Assay Kit는 우레아가 암모니아와 이산화탄소로 먼저 분해되는 Berthelot 반응을 기반으로 하며, 이는 알칼리 현상액 (alkaline developer)과 추가 반응하여 580-630 nm의 광학 밀도에서 표준 분광 광도계 플레이트로 측정 할 수있는 청록색 산물을 생성한다. 혈청 또는 혈장 우레아 수준을 측정하기 위한 적절한 방법은 Lamb E et al., Kidney Function Tests (Chapter 25) : Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (2012)에 기재된 방법을 포함한다.

[0219] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 소변 알부민 수준의 증가를 감소시키거나 예방하기에 충분한 양으로 투여된다. 소변 알부민 수치의 증가는 신장 기능 장애의 지표이며 허혈 재관류 손상으로 인한 것일 수 있다. 소변 알부민 수준은 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 소변 알부민 수준은 미세 알부민뇨 검사 (microalbuminuria test)를 사용하여 측정할 수 있다.

[0220] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 대상체의 소변에서 혈액 수준의 증가를 감소 또는 예방하기에 충분한 양으로 투여된다. 소변에 혈액이 존재 ("혈뇨 (haematuria)"라고도 함)하는 것은 신장 기능 장애의 지표이며 허혈-재관류 손상으로 인해 발생할 수 있다. 대상체의 소변에서 혈액의 수준은 당업계에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 대상체의 소변 내 혈액 수준은 소변 계량봉 (urine dipstick)을 사용하거나 소변 샘플의 현미경 검사에 의해 적혈구의 존재를 검출함으로써 측정될 수 있다.

[0221] **항체**

[0222] 일 예에서, 임의의 예에 따른 본원에 기술된 화합물은 항체의 항원 결합 부위를 포함하는 단백질이다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 항체이다. 일부 예에서, 상기 항체는 G-CSFR에 결합한다. 일부 예에서, 상기 항체는 G-CSF에 결합한다.

[0223] 항체를 생성하는 방법은 당업계에 공지 및/또는 Harlow and Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)에 기재되어 있다. 일반적으로, 이러한 방법에서 G-CSFR 또는 G-CSF (예를 들어, hG-CSFR 또는 hG-CSF) 또는 이의 영역 (예를 들어, 세포 외 도메인) 또는 이의 면역원성 단편 또는 에피토프 또는 이를 발현 및 제시 (displying) 하는 세포 (면역원), 선택적으로 임의의 적합한 또는 요구되는 담체로 제형화된, 어쥬번트 (adjuvant), 또는 약학적으로 허용되는 부형제는 비인간 동물, 예를 들어 마우스, 닭, 래트, 토끼, 기니피그, 개, 말, 소에 투여하고, 염소 또는 돼지에 투여된다. 면역원은 비강 내, 근육 내, 피하, 정맥 내, 피내 (intradermally), 복강 내 또는 다른 공지된 경로로 투여될 수 있다.

[0224] 모노클로날 항체는 본 발명에 의해 고려되는 항체의 하나의 예시적인 형태이다. "단일 클론 항체"또는 "mAb"라는 용어는 동일한 항원, 예를 들어 항원 내의 동일한 에피토프에 결합할 수 있는 균질한 (homogeneous) 항체 집단을 지칭한다. 이 용어는 항체의 공급원 또는 항체가 제조되는 방식과 관련하여 제한하는 것으로 의도되지 않

는다.

[0225] mAb의 제조를 위해, 예를 들어 상기 US4196265 또는 Harlow and Lane (1988), *supra*에 예시된 절차와 같은 다수의 공지된 기술 중 하나가 사용될 수 있다.

[0226] 대안적으로, ABL-MYC 기술 (eoClone, Madison WI 53713, USA)이 MAbs를 분비하는 세포주를 생성하는데 사용된다 (예를 들어, Largaespada et al., J. Immunol. Methods. 197 : 85-95, 1996).

[0227] 항체는 또한 예를 들어 US6300064 및/또는 US5885793에 기재된 바와 같은 예를 들어 파지 디스플레이 라이브러리와 같은 디스플레이 라이브러리를 스크리닝함으로써 생성되거나 단리될 수 있다. 예를 들어, 본 발명자들은 파지 디스플레이 라이브러리로부터 완전 인간 항체를 분리하였다.

[0228] 본 개시 내용의 항체는 합성 항체 일 수있다. 예를 들어, 상기 항체는 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체 또는 탈 면역화 항체이다.

[0229] 일 예에서, 본원에 기술된 항체는 키메라 항체이다. 용어 "키메라 항체 (chimeric antibody)"는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종 (예를 들어, 마우스와 같은 뮤린)으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 서브 클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 반면, 쇄(들)의 나머지는 다른 종 (예를 들어, 인간과 같은 영장류)로부터 유래되거나 다른 항체 클래스 또는 서브 클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 항체를 지칭한다. 키메라 항체의 생산 방법은 예를 들어 US4816567; 및 US5807715에 기재되어 있다.

[0230] 본 개시 내용의 항체는 인간화 또는 인간일 수있다.

[0231] "인간화 항체 (humanized antibody)"라는 용어는 비인간 종으로부터의 항체에서 유래된 항원 결합 부위 또는 가변 영역와 인간 항체의 구조 및/또는 서열에 기초한 나머지 항체 구조를 갖는 키메라 항체의 서브 클래스를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 인간화 항체에서,항원-결합 부위는 일반적으로 인간 항체의 가변 영역에서 적절한 FR 상에 이식된 비-인간 항체로부터의 상보성 결정 영역 (CDR) 및 인간 항체로부터의 나머지 영역을 포함한다. 항원 결합 부위는 야생형 (즉, 비인간 항체의 것과 동일)이거나 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 변형될 수 있다. 일부 경우에, 인간 항체의 FR 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 대체된다.

[0232] 비인간 항체 또는 이의 일부 (예를 들어, 가변 영역)를 인간화하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 인간화는 US5225539 또는 US5585089의 방법에 따라 수행 될 수 있다. 항체를 인간화하기 위한 다른 방법은 배제되지는 않는다.

[0233] 본원에 사용된 용어 "인간 항체 (human antibody)"는 가변 영역 (예를 들어, V_H, V_L) 및 선택적으로 인간에서 (예컨대 인간 생식선 또는 체세포에서) 발견된 서열로부터 유래되거나 이에 상응하는 불변 영역을 갖는 항체를 지칭한다.

[0234] 예시적인 인간 항체가 본원에 기재되어 있고 C1.2 및 C1.2G 및/또는 이의 가변 영역을 포함한다. 이들 인간 항체는 비인간 항체와 비교하여 인간에서 면역원성이 감소되는 이점을 제공한다. 예시적인 항체는 WO2012171057에 기재되어 있으며, 이는 본원에 참고로 포함된다.

[0235] **항원 결합 도메인 함유 단백질**

[0236] *단일-도메인 항체*

[0237] 일부 예에서, 본 개시 내용의 화합물은 단일 도메인 항체 ("도메인 항체" 또는 "dAb"라는 용어와 상호 교환적으로 사용됨)이거나 이를 포함하는 단백질이다. 단일 도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 영역의 전부 또는 일부를 포함하는 단일 폴리펩티드 쇄이다. 특정 예에서, 단일 도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체이다 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 예를 들어, US6248516 참조).

[0238] *다이아바디, 트리아바디, 테트라바디*

[0239] 일부 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 WO98/044001 및/또는 WO94/007921에 기재된 것과 같은 다이아바디, 트리아바디, 테트라바디 또는 고차 단백질 복합체 (higher order protein complex)이거나 이를 포함한다.

[0240] *단일 쇄 Fv (scFv)*

[0241] 당업자는 scFv가 단일 폴리펩티드 쇄에서 V_H 및 V_L 영역 및 scFv가 항원 결합을 위해 원하는 구조를 형성할 수

있도록 (즉, 단일 폴리펩티드 사슬의 V_H 및 V_L 이 서로 결합하여 Fv를 형성하도록) 하는 V_H와 V_L 사이의 폴리펩티드 링커를 포함한다는 것을 알 것이다. 예를 들어, 링커는 scFv에 대해 더 선호되는 링커 중 하나인 $(Gly_4Ser)_3$ 와 함께 12 개 초과의 아미노산 잔기를 포함한다.

[0242] *중쇄 항체*

[0243] 중쇄 항체는 중쇄를 포함하지만 경쇄를 포함하지 않으며, 많은 다른 형태의 항체와 구조적으로 상이하다. 따라서, 이들 항체는 또한 "중쇄 단독 항체 (heavy chain only antibodies)"로 지칭된다. 중쇄 항체는 예를 들어 낙타와 연골 어류 (IgNAR이라고도 함)에서 발견된다.

[0244] 낙타류로부터의 중쇄 항체 및 이의 가변 영역 및 이의 생산 및/또는 단리 및/또는 사용 방법에 대한 일반적인 설명은 특히 다음 참고 문헌 WO94/04678, WO97/ 49805 및 WO 97/49805에서 확인된다.

[0245] 연골 어류로부터의 중쇄 항체 및 이의 가변 영역 및 이의 생산 및/또는 단리 및/또는 사용 방법에 대한 일반적인 설명은 특히 WO2005/118629에서 확인된다.

[0246] *다른 항체 및 항체 단편*

[0247] 본 개시 내용은 또한 다음과 같은 다른 항체 및 항체 단편을 고려한다 :

[0248] (i) US5,731,168에 기재된 "키 앤드 홀 (key and hole)" 이중 특이적 단백질 (bispecific proteins);

[0249] (ii) 예를 들어 US4,676,980에 기재된 바와 같은 이종 접합 단백질 (heteroconjugate proteins);

[0250] (iii) 예를 들어 US4,676,980에 기재된 바와 같은 화학적 가교제를 사용하여 생성 된 이종 접합 단백질 (heteroconjugate proteins); 과

[0251] (iv) Fab_3 (예를 들어, EP19930302894에 기술된 바와 같음).

[0252] V-유사 단백질

[0253] 본 개시 내용의 화합물의 예는 T-세포 수용체이다. T 세포 수용체는 항체의 Fv 모듈과 유사한 구조로 결합되는 2 개의 V-도메인을 갖는다. Novotny et al., Proc Natl Acad Sci USA 88 : 8646-8650, 1991은 T-세포 수용체의 2 개의 V-도메인 (알파 및 베타로 지칭됨)이 어떻게 단일 사슬 폴리펩티드로서 융합되고 발현될 수 있는지 및 항체 scFv와 유사하게 어떻게 직접적으로 소수성을 감소시키기 위해 표면 잔기를 변경하는지를 설명한다. 단일쇄 T-세포 수용체 또는 2 개의 V-알파 및 V-베타 도메인을 포함하는 다량체 T 세포 수용체의 생산을 기술하는 다른 공보에는 WO1999/045110 또는 WO2011/107595가 포함된다.

[0254] 항원 결합 도메인을 포함하는 다른 비-항체 단백질은 일반적으로 단량체 인 V-유사 도메인을 갖는 단백질을 포함한다. 이러한 V-유사 도메인을 포함하는 단백질의 예는 CTLA-4, CD28 및 ICOS를 포함한다. 이러한 V-유사 도메인을 포함하는 단백질의 추가 개시는 WO1999/045110에 포함된다.

[0255] 아드넥틴 (Adnectins)

[0256] 일 예에서, 본 개시 내용의 화합물은 아드넥틴이다. 아드넥틴은 루프 영역이 항원 결합을 부여하도록 변경된 인간 피브로넥틴의 제10 피브로넥틴 III 형 ($^{10}Fn3$) 도메인에 기초한다. 예를 들어, $^{10}Fn3$ 도메인의 β-샌드위치의 하나의 말단에 3개의 루프는 아드넥틴이 항원을 특이적으로 인식할 수 있도록 조작될 수 있다. 자세한 내용은 US20080139791 또는 WO2005/056764를 참조하라.

[0257] 안티칼린 (Anticalins)

[0258] 추가의 예에서, 본 개시 내용의 화합물은 안티칼린이다. 안티칼린은 리포 칼린 (lipocalin)에서 유래하며, 이는 스테로이드, 빌린 (bilins), 레티노이드 및 지질과 같은 작은 소수성 분자를 운반하는 세포 외 단백질의 패밀리이다. 리포칼린은 항원과 결합하도록 조작할 수 있는 원뿔 구조의 개방형 말단에 다수의 루프를 갖는 단단한 β-시트 이차 구조를 갖는다. 이러한 조작된 리포칼린은 안티 칼린으로 알려져 있다. 안티칼린에 대한 추가 설명은 US7250297B1 또는 US20070224633을 참조하라.

[0259] 아피바디 (Affibodies)

[0260] 추가의 예에서, 본 개시 내용의 화합물은 아피바디이다. 아피바디는 항원과 결합하도록 조작될 수 있는 *Staphylococcus aureus*의 단백질 A의 Z 도메인 (항원 결합 도메인)으로부터 유래된 스캐폴드이다. Z 도메인은

대략 58개 아미노산의 3-나선 다발로 구성된다. 표면 잔기의 무작위화 (randomization)에 의해 라이브러리가 생성되었다. 자세한 내용은 EP1641818을 참조하라.

[0261] 아비머 (Avimers)

[0262] 추가의 예에서, 본 개시 내용의 화합물은 아비머이다. 아비머는 A-도메인 스캐폴드 패밀리로부터 유래된 다중 도메인 단백질이다. 대략 35개 아미노산의 천연 도메인은 한정된 이황화 결합 구조를 채택한다. 다양성은 A-도메인 패밀리에 의해 나타나는 자연적 변이를 섞어서 (shuffling) 생성된다. 자세한 내용은 WO2002088171을 참조하라.

[0263] DARPins

[0264] 추가의 예에서, 본 개시 내용의 화합물은 Designed Ankyrin Repeat Protein (DARPin)이다. DARPin은 세포질 골격 (cytoskeleton)에 통합 막 단백질의 부착을 매개하는 단백질 패밀리인 안키린 (Ankyrin)으로부터 유래된다. 단일 안키린 리피트 (single ankyrin repeat)는 2개의 α- 나선 및 하나의 β-턴으로 구성된 33개 잔기 모티프이다. 이들은 각 리피트의 첫 번째 α-나선과 하나의 β-턴에서 잔기를 무작위화하여 상이한 표적 항원에 결합하도록 조작할 수 있다. 이들의 결합 인터페이스는 모듈의 수를 증가시킴으로써 증가시킬 수 있다 (친화도 성숙 방법 (a method of affinity maturation)). 자세한 내용은 US20040132028을 참조하라.

[0265] 가용성 G-CSFR (Soluble G-CSFR)

[0266] 본 발명은 또한 G-CSF 상호 작용을 위해 자연 발생하는 막-관련 G-CSFR과 경쟁하는 G-CSFR의 가용성 형태를 고려한다. 당업자는 가용성 형태 (soluble form)의 수용체를 용이하게 제조할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 5,589,456 및 Honjo et al, *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 61(Pt 8):788-790, 2005를 참조하라.

[0267] **탈-면역화 항체 및 단백질 (De-immunized Antibodies and Proteins)**

[0268] 본 개시 내용은 또한 탈 면역화된 항체 또는 단백질을 고려한다. 탈-면역화 항체 및 단백질은 이에 의해 포유동물이 항체 또는 단백질에 대한 면역 반응을 일으킬 가능성을 감소시키기 위하여, 제거된 (즉, 돌연변이된) 하나 이상의 에피토프, 예를 들어 B 세포 에피토프 또는 T 세포 에피토프를 가진다. 탈 면역화된 항체 및 단백질을 생성하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 WO2000/34317, WO2004/108158 및 WO2004/064724에 기재되어 있다.

[0269] 적합한 돌연변이를 도입하고 생성된 단백질을 발현 및 분석하는 방법은 본원의 설명에 기초하여 당업자에게 명백할 것이다.

[0270] **단백질 돌연변이 (Mutations to Proteins)**

[0271] 본 발명은 또한 본 발명의 단백질의 돌연변이 형태를 고려한다. 이와 관련하여, 본원에 제시된 데이터는 만들어질 수 있는 예시적인 변화 (change)에 더하여 변화될 수 있는 본 개시 내용의 단백질의 CDR 내의 부위를 나타낸다. 당업자는 본 개시의 맥락에서 그의 기능을 억제하거나 현저하게 감소시키지 않으면서 단백질을 함유하는 가변 영역의 프레임워크 영역 ((framework region)) 내에서 추가적 또는 대안적으로 변화 (change)가 만들어질 수 있음을 이해할 것이다.

[0272] 예를 들어, 이러한 돌연변이 단백질은 본원에 제시된 서열과 비교하여 하나 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함한다. 일부 예에서, 단백질은 30 이하 또는 20 이하 또는 10 이하, 예를 들어 9 또는 8 또는 7 또는 6 또는 5 또는 4 또는 3 또는 2개의 보존적 아미노산 치환을 포함한다. "보존적 아미노산 치환 (conservative amino acid substitution)"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄 및/또는 친수성 (hydropathicity) 및/또는 친수성 (hydrophilicity)을 갖는 아미노산 잔기로 대체 된 것이다.

[0273] 일 예에서, 돌연변이 단백질은 자연 발생 단백질과 비교할 때, 단지 1 또는 2 또는 3 또는 4 또는 5 또는 6개 또는 그 이하의 보존적 아미노산 변화를 갖는다. 보존적 아미노산 변화의 세부 사항은 아래에 제공된다. 당업자가 예를 들어 본원의 개시 내용으로부터 알 수 있는 바와 같이, 이러한 작은 변화는 단백질의 활성을 변화시키지 않는 것으로 합리적으로 예측될 수 있다.

[0274] 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), β- 분 지형 측쇄 (예

를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함하여, 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 관련 기술 분야에 정의되어 있다.

[0275] 본 개시 내용은 또한 본 개시 내용의 단백질, 예를 들어 CDR3 과 같은 CDR에서의 비-보존적 아미노산 변화 (예를 들어, 치환)를 고려한다. 예를 들어, 본 발명자들은 본 개시 내용의 단백질의 활성을 유지하면서 만들어질 수 있는 몇몇 비-보존적 아미노산 치환을 확인하였다. 일 예에서, 상기 단백질은 예를 들어 CDR3에서와 같이 CDR3에서 6 또는 5 또는 4 또는 3 또는 2 또는 1개 미만의 비보존적 아미노산 치환을 포함한다.

[0276] 본 발명은 또한 본원에 제시된 서열과 비교하여 하나 이상의 삽입 또는 결실을 고려한다. 일부 예에서, 상기 단백질은 10 이하, 예를 들어 9 또는 8 또는 7 또는 6 또는 5 또는 4 또는 3 또는 2개의 삽입 및/또는 결실을 포함한다.

[0277] **불변 영역 (Constant Regions)**

[0278] 본 개시 내용은 항체의 불변 영역을 포함하는 본원에 기재된 단백질 및/또는 항체를 포함한다. 이것은 Fc에 융합된 항체의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0279] 본 개시 내용의 단백질을 생성하는데 유용한 불변 영역의 서열은 다수의 상이한 공급원으로부터 수득 될 수 있다. 일부 예에서, 단백질의 불변 영역 또는 이의 부분은 인간 항체로부터 유래된다. 상기 불변 영역 또는 이의 부분은 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 포함하여 임의의 항체 클래스 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하여 임의의 항체 이소 타입으로부터 유래될 수 있다. 일 예에서, 상기 불변 영역은 인간 이소 타입 IgG4 또는 안정화된 IgG4 불변 영역이다.

[0280] 일 예에서, 상기 불변 영역의 Fc 영역은 예를 들어 천연 또는 야생형 인간 IgG1 또는 IgG3 Fc 영역과 비교하여 효과기 기능 (effector function)을 유도하는 능력이 감소된다. 일 예에서, 상기 효과기 기능은 항체-의존적 세포-매개 세포 독성 (ADCC) 및/또는 항체-의존적 세포-매개성 식세포 작용 (ADCP) 및/또는 보체-의존적 세포 독성 (CDC)이다. 단백질을 함유하는 Fc 영역의 효과기 기능 수준을 평가하는 방법은 당업계에 공지 및/또는 본원에 기재되어 있다.

[0281] 일 예에서, 상기 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역 (즉, IgG4 불변영역으로부터의), 예를 들어 인간 IgG4 Fc 영역이다. 적합한 IgG4 Fc 영역의 서열은 당업자에게 명백 및/또는 공개적으로 이용 가능한 데이터베이스 (예를 들어, National Center for Biotechnology Information)에서 이용 가능할 것이다.

[0282] 일 예에서, 상기 불변 영역은 안정화된 IgG4 불변 영역이다. "안정화된 IgG4 불변 영역 (stabilized IgG4 constant region)"이란 용어는 Fab 팔 교환 (Fab arm exchange) 또는 Fab 팔 교환의 경향 또는 반-항체 (half-antibody) 형성 또는 반-항체의 형성 경향을 감소시키도록 변형된 IgG4 불변 영역을 의미하는 것으로 이해될 것이다. "Fab 팔 교환 (Fab arm exchange)"은 인간 IgG4에 대한 단백질 변형 유형을 말하며, 여기서 IgG4 중쇄 및 부착된 경쇄 (반-분자 (half-molecule))는 또 다른 IgG4 분자로부터의 중쇄-경쇄 쌍으로 교체된다. 따라서, IgG4 분자는 2개의 별개의 항원을 인식하는 2개의 별개의 Fab 팔을 얻을 수 있다 (이중 특이적 분자가 발생함). Fab 팔 교환은 생체 내에서 자연적으로 발생하며, 정제된 혈액 세포 또는 환원된 글루타티온과 같은 환원제에 의해 시험관 내에서 유도될 수 있다. "반 항체 (half antibody)"는 IgG4 항체가 해리되어 각각 단일 중쇄 및 단일 경쇄를 함유하는 2 개의 분자를 형성할 때 형성된다.

[0283] 일 예에서, 안정화된 IgG4 불변 영역은 Kabat 시스템에 따른 힌지 영역의 위치 241에 프롤린을 포함한다 (Kabat et al., Proteins of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 1987 및/또는 1991). 이 위치는 EU 넘버링 시스템에 따른 힌지 영역의 위치 228에 해당한다 (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest Washington DC United States Department of Health and Human Services, 2001 and Edelman *et al., Proc. Natl. Acad. USA, 63*, 78-85, 1969). 인간 IgG4에서, 이 잔기는 일반적으로 세린이다. 세린을 프롤린으로 치환하여, IgG4 힌지 영역은 서열 CPPC를 포함한다. 이와 관련하여, 당업자는 "힌지 영역 (hinge region)"이 항체의 2개의 Fab 팔 상에 이동성을 부여하는 Fc 및 Fab 영역을 연결하는 항체 중쇄 불변 영역의 프롤린-풍부 부분임을 인식할 것이다. 힌지 영역은 중쇄 간 이황화 결합에 관여하는 시스테인 잔기를 포함한다. 이는 Kabat의 넘버링 시스템에 따라 인간 IgG1의 Glu226에서 Pro243으로의 신장 (stretching)으로 일반적으로 정의된다. 다른 IgG 이소타입의 힌지 영역은 중쇄 이황화 (S-S) 결합을 형성하는 첫 번째 및 마지막 시스테인 잔기를 동일한 위치에 배치함으로써 IgG1 서열과 정렬될 수 있다 (예를 들어, WO2010/080538 참조).

[0284] 안정화된 IgG4 항체의 추가 예는 인간 IgG4의 중쇄 불변 영역에서 409 위치 (EU 넘버링 시스템에 따름)의 아르

기닌이 리신, 트레오닌, 메티오닌 또는 류신으로 치환된 항체이다 (예를 들어, WO2006/033386). 불변 영역의 Fc 영역은 405 (EU 넘버링 시스템에 따름)에 상응하는 위치에서 알라닌, 발린, 글리신, 이소류신 및 류신으로 구성된 군으로부터 선택된 잔기를 추가적 또는 대안적으로 포함할 수 있다. 선택적으로, (상기한 바와 같이) 상기 힌지 영역은 위치 241에서 프롤린 (즉, CPPC 서열)을 포함한다.

[0285] 또 다른 예에서, 상기 Fc 영역은 감소된 효과기 기능, 즉 "비-면역 자극 Fc 영역 (non-immunostimulatory Fc region)"을 갖도록 변형된 영역이다. 예를 들어, Fc 영역은 268, 309, 330 및 331로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 위치에서 치환을 포함하는 IgG1 Fc 영역이다. 또 다른 예에서, 상기 Fc 영역은 하나 이이상의 다음의 변화 E233P, L234V, L235A 및 G236의 결실 및/또는 하나 이상의 다음의 변화 A327G, A330S 및 P331S를 포함한다 (Armour *et al., Eur J Immunol. 29*:2613-2624, 1999; Shields *et al., J Biol Chem. 276(9)*:6591-604, 2001). 비-면역 자극 Fc 영역의 추가적인 예는 예를 들어, Dall'Acqua *et al., J Immunol. 177* : 1129-1138 2006; and/or Hezareh *J Virol ;75*: 12161-12168, 2001에 개시되어 있다.

[0286] 또 다른 예에서, Fc 영역은, 예를 들어 IgG4 항체로부터의 적어도 하나의 C_H2 도메인 및 IgG1 항체로부터의 적어도 하나의 C_H3 도메인을 포함하는, 키메라 Fc 영역이며, 여기서 Fc 영역은 240, 262, 264, 266, 297, 299, 307, 309, 323, 399, 409 및 427 (EU 넘버링)으로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산에서의 치환을 포함한다 (예를 들어, WO2010/085682에 기재된 바와 같음). 예시적인 치환은 240F, 262L, 264T, 266F, 297Q, 299A, 299K, 307P, 309K, 309M, 309P, 323F, 399S 및 427F를 포함한다.

[0287] **추가적 변형 (Additional Modifications)**

[0288] 본 개시 내용은 또한 본 개시 내용의 항체 또는 단백질에 대한 추가의 변형을 고려한다.

[0289] 예를 들어, 항체는 단백질의 반감기를 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 예를 들어, 항체는 신생 Fc 영역 (neonatal Fc region, FcRn)에 대한 Fc 영역의 친화성을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 예를 들어, Fc 영역은 엔도좀에서 Fc/FcRn 결합을 촉진시키기기 위하여 더 낮은 pH, 예를 들어 약 pH 6.0에서 FcRn에 대한 증가된 친화력을 갖는다. 일 예에서, Fc 영역은 약 pH 7.4에서의 친화도와 비교하여 약 pH 6에서 FcRn에 대한 친화도가 증가하여, 세포 재순환 후 혈액으로의 Fc의 재방출을 촉진시킨다. 이러한 아미노산 치환은 혈액으로부터의 제거를 감소시킴으로써 단백질의 반감기를 연장시키는 데 유용하다.

[0290] 예시적인 아미노산 치환은 EU 넘버링 시스템에 따른 T250Q 및/또는 M428L 또는 T252A, T254S 및 T266F 또는 M252Y, S254T 및 T256E 또는 H433K 및 N434F를 포함한다. 추가적이거나 대안적인 아미노산 치환은 예를 들어 US20070135620 또는 US7083784에 기재되어있다.

[0291] 일 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 알부민, 이의 기능적 단편 또는 변이체를 추가로 포함한다. 일 예에서, 상기 알부민, 이의 기능적 단편 또는 변이체는 혈청 알부민, 예컨대 인간 혈청 알부민이다. 일 예에서, 상기 알부민, 이의 기능적 단편 또는 변이체는 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 또는 삽입, 예를 들어 5 또는 4 또는 3 또는 2 또는 1 개 이하의 치환을 포함한다. 본 개시에 사용하기에 적합한 아미노산 치환은 당업자에게 명백할 것이며, WO2011051489, WO2014072481, WO2011103076, WO2012112188, WO2013075066, WO2015063611 및 WO2014179657에 기술 된 것과 같은 자연 발생 치환 및 조작된 치환을 포함한다.

[0292] **단백질 생산**

[0293] 일 예에서, 임의의 예에 따라 본원에 기술된 단백질은 예를 들어 본원에 기술 및/또는 당업계에 공지된 바와 같이 단백질을 생성하기에 충분한 조건 하에서 하이브리도마를 배양함으로써 생성된다.

[0294] *재조합 발현*

[0295] 다른 예에서, 임의의 예에 따라 본원에 기술된 단백질은 재조합이다.

[0296] 재조합 단백질의 경우, 이를 코딩하는 핵산은 발현 작제물 또는 벡터로 클로닝 될 수 있고, 이어서 대장균 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 포유 동물 세포, 예컨대 예를 들어 시미안 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 인간 배아 신장 (HEK) 세포, 또는 달리 단백질을 생성하지 않는 골수종 세포로 형질 감염된다. 단백질을 발현시키기 위해 사용되는 예시적인 세포는 CHO 세포, 골수종 세포 또는 HEK 세포이다. 이러한 목적을 달성하기 위한 분자 클로닝 기술은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 Ausubel *et al.,* (editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988, 현재까지 모든 업

데이트 포함) 또는 Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)에 기재되어 있다. 재조합 핵산의 구축에는 다양한 클로닝 및 시험관 내 증폭 방법이 적합하다. 재조합 항체의 생산 방법은 또한 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 US4816567 또는 US5530101을 참조한다.

[0297] 단리 후, 핵산은 추가 클로닝 (DNA 증폭) 또는 무-세포 시스템 또는 세포에서의 발현을 위해 발현 작제물 또는 발현 벡터에서 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 삽입된다.

[0298] 본원에 사용된 용어 "프로모터"는 가장 넓은 맥락에서 취해지고, 예를 들어, 발달 및/또는 외부 자극에 반응하여, 또는 조직 특이적 방식으로 핵산의 발현을 변경시키는 추가적인 조절 요소 (예를 들어, 업스트림 활성화 서열, 전사 인자 결합 부위, 인핸서 및 사일런서)의 존재 또는 부재와 함께, 정확한 전사 개시에 필요한 TATA 박스 또는 개시자 (initiator) 요소를 포함하는 게놈 유전자의 전사 조절 서열을 포함한다. 본 맥락에서, 용어 "프로모터"는 또한 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현을 부여 (confer), 활성화 또는 향상시키는 재조합, 합성 또는 융합 핵산, 또는 유도체를 설명하는데 사용된다. 예시적인 프로모터는 상기 핵산의 발현을 추가로 향상 및/또는 공간적 발현 및/또는 시간적 발현을 변경시키기 위한 하나 이상의 특정 조절 요소의 추가적인 카피를 함유할 수 있다.

[0299] 본원에 사용된 용어 "작동 가능하게 연결된 (operably linked to)"은 핵산의 발현이 프로모터에 의해 제어되도록 핵산에 대해 프로모터를 위치시키는 것을 의미한다.

[0300] 세포에서의 발현을 위한 많은 벡터가 이용 가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 이에 제한되지는 않으나, 신호 서열, 단백질을 암호화하는 서열 (예를 들어, 본원에 제공된 정보로부터 유도된 서열), 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함한다. 당업자는 단백질의 발현에 적합한 서열을 알고 있을 것이다. 예시적인 신호 서열은 원핵생물 분비 신호 (예를 들어, pelB, 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Ipp 또는 열-안정성 엔도톡신 II), 효모 분비 신호 (예를 들어, 인버타제 리더, α 인자 리더 또는 산 포스파타제 리더) 또는 포유 동물 분비 신호 (예를 들어, 단순 포진 gD 신호)를 포함한다.

[0301] 포유동물 세포에서 활성인 예시적인 프로모터에는 시토메갈로바이러스 전 초기 프로모터 (CMV-IE), 인간 신장 인자 1-a 프로모터 (EF1), 소핵 RNA 프로모터 (U1a and U1b), a-미오신 중쇄 프로모터, 원숭이 바이러스 40 프로모터 (SV40), 라우스 사코마 바이러스 프로모터 (RSV), 아데노바이러스 주요 후기 프로모터, β-액틴 프로모터, CMV 인핸서/β- 액틴 프로모터 또는 면역 글로불린 프로모터 또는 이의 활성 단편을 포함하는 하이브리드 조절 요소를 포함한다. 유용한 포유 동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환 된 원숭이 신장 CV1 계통 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 라인 (현탁 배양에서 성장을 위해 서브 클로닝 된 293 또는 293 세포; 아기 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10) 또는 중국 햄스터 난소 세포 (CHO))이다.

[0302] 예를 들어 *Pichia pastoris, Saccharomyces cerevisiae* 및 *S. pombe*로 구성된 군에서 선택되는 효모 세포와 같은 효모 세포에서 발현을 적합한 전형적인 프로모터는, 이에 제한되지는 않으나, *ADH1* 프로모터, *GAL1* 프로모터, *GAL4* 프로모터, *CUP1* 프로모터, *PHO5* 프로모터, *nmt* 프로모터, *RPR1* 프로모터, 또는 *TEF1* 프로모터를 포함한다.

[0303] 발현을 위하여 단리된 핵산 또는 이를 포함하는 발현 작제물을 세포에 도입하기 위한 수단은 당업자에게 공지되어 있다. 주어진 세포 (given cell)에 사용되는 기술은 이미 알려진 성공적인 기술에 따라 다르다. 재조합 DNA를 세포 내로 도입하기 위한 수단은 무엇보다도 미세 주입 (microinjection), DEAE-덱스트란에 의해 매개되는 트랜스펙션, 예컨대 리포펙타민 (Gibco, MD, USA) 및/또는 셀펙틴 (Gibco, MD, USA)과 같은 리포좀에 의해 매개되는 트랜스펙션, PEG-매개 DNA 흡수 (uptake), 전기천공 (electroporation) 및 DNA 코팅된 텅스텐 또는 금 입자 (Agracetus Inc., WI, USA)를 사용하는 것과 같은 미세 입자 충격 (microparticle bombardment)(Agracetus Inc., WI, USA)을 포함한다.

[0304] 단백질을 생성하는데 사용되는 숙주 세포는 사용되는 세포 유형에 따라 다양한 배지에서 배양될 수 있다. Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma))과 같은 시판되는 배지는 포유류 세포 배양에 적합하다. 본원에 논의된 다른 세포 유형을 배양하기 위한 배지은 당업계에 공지되어 있다.

[0305] *단백질 단리 (isolation of proteins)*

[0306] 단백질을 단리하는 방법은 관련 기술 분야에 공지 및/또는 본원에 기재되어있다.

[0307] 단백질이 배양 배지로 분비되는 경우, 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액은 시판되는 단백질 농충 필터, 예를 들어 Amicon 또는 Millipore Pellicon 초여과 장치를 사용하여 먼저 농축될 수 있다. PMSF와 같은 단백질 분해 효소 억제제는 단백질 분해를 억제하기 위해 전술한 단계 중 임의의 단계에 포함될 수 있고, 항생제는 우발적인 오염 물질의 성장을 방지하기 위해 포함될 수 있다. 대안적 또는 추가적으로, 상청액은 예를 들어 연속 원심 분리를 사용하여 단백질을 발현하는 세포로부터 여과 및/또는 분리 될 수 있다.

[0308] 세포로부터 제조된 단백질은 예를 들어 이온 교환, 히드록시 아파타이트 크로마토그래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 친화성 크로마토그래피 (예를 들어, 단백질 A 친화성 크로마토그래피 또는 단백질 G 크로마토그래피), 또는 상기의 임의의 조합을 사용하여 정제될 수 있다. 이들 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 Ed Harlow and David Lane (editors) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, (1988)에 기재되어 있다.

[0309] 당업자는 또한 정제 또는 검출을 용이하게 하기 위한 태그, 예를 들어 폴리-히스티딘 태그, 예를 들어 헥사-히스티딘 태그, 또는 인플루엔자 바이러스 헤마글 루티닌 (HA) 태그 또는 시미안 바이러스 5 (V5) 태그, 또는 FLAG 태그, 또는 글루타치온 S-트랜스퍼라제 (GST) 태그를 포함하도록 단백질이 변형될 수 있음을 인식할 것이다. 이어서, 생성된 단백질은 친화성 정제와 같은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 정제된다. 예를 들어, 헥사-히스 태그를 포함하는 단백질은 그 단백질을 포함하는 샘플을 고체 또는 반-고체 지지체 상에 고정된 헥사-히스 태그에 특이적으로 결합하는 니켈-니트릴로 아세트산 (Ni-NTA)과 접촉시키고, 결합되지 않은 단백질을 제거하기 위하여 샘플을 세척하고 이어서 결합된 단백질을 용출시켜 정제된다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 태그에 결합하는 리간드 또는 항체가 친화성 정제 방법에 사용된다.

[0310] **핵산 기반 G-CSF 신호 전달 억제제**

[0311] 본 개시 내용의 한 예에서, 본 개시 내용의 임의의 예에 따른 본원에 기재된 바와 같은 치료 및/또는 예방 방법은 G-CSF 및/또는 G-CSFR의 발현을 감소시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 이러한 방법은 G-CSF 또는 G-CSFR을 암호화하는 핵산의 전사 및/또는 번역을 감소시키는 화합물을 투여하는 것을 포함한다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 핵산, 예를 들어 안티센스 폴리뉴클레오티드, 리보자임, PNA, 간섭 RNA, siRNA, 마이크로 RNA이다.

[0312] 다른 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 G-CSF 신호 전달을 억제하는 단백질 화합물 (예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)을 코딩하는 핵산이다.

[0313] 안티센스 핵산

[0314] 용어 "안티센스 핵산 (antisense nucleic acid)"은 본 개시 내용의 임의의 예에서 본원에 기재된 바와 같은 폴리펩티드를 코딩하는 특정 mRNA 분자의 적어도 일부에 상보적이고 mRNA 번역과 같은 전사 후 사건을 방해할 수 있는 DNA 또는 RNA 또는 이의 유도체 (예를 들어, LNA 또는 PNA) 또는 이들의 조합을 의미하는 것으로 간주되어야 한다. 안티센스 방법의 용도는 당업계에 공지되어 있다. 본 개시 내용의 임의의 예는 mRNA 번역과 같은 전사 후 사건을 방해할 수 있다. 안티센스 방법의 사용은 당 업계에 공지되어있다 (예를 들어, Hartmann and Endres (editors), Manual of Antisense Methodology, Kluwer (1999) 참조).

[0315] 본 개시 내용의 안티센스 핵산은 생리학적 조건하에서 표적 핵산에 혼성화 될 것이다. 안티센스 핵산은 구조적 유전자 또는 코딩 영역 또는 유전자 발현이나 스플라이싱에 대한 제어에 영향을 미치는 서열에 상응한다. 예를 들어, 안티센스 핵산은 G-CSF 또는 G-CSFR을 코딩하는 핵산의 표적화된 코딩 영역, 또는 5'- 비번역 영역 (UTR) 또는 3'-UTR 또는 이들의 조합에 상응할 수 있다. 이는 전사 동안 또는 이후에, 예를 들어 표적 유전자의 엑손 서열로만 스플라이싱 되는 인트론 서열에 부분적으로 상보적일 수 있다. 안티센스 서열의 길이는 적어도 19 개의 인접 뉴클레오티드, 예를 들어 G-CSF 또는 G-CSFR을 암호화하는 핵산의 100 개, 200 개, 500 개 또는 1000 개 이상의 뉴클레오티드와 같이, 50 개 이상의 뉴클레오티드이어야 한다. 전체 유전자 전사체에 상보적인 전장 서열이 사용될 수 있다. 상기 길이는 100-2000 뉴클레오티드 일 수 있다. 표적화된 전사체에 대한 안티센스 서열의 동일성 정도는 적어도 90 %, 예를 들어 95-100 %이어야 한다.

[0316] G-CSF 또는 G-CSFR에 대한 예시적인 안티센스 핵산은 예를 들어 WO2011032204에 기재되어있다.

[0317] 촉매 핵산

[0318] 용어 "촉매 핵산 (catalytic nucleic acid)"은 별개의 기질을 특이적으로 인식하고 이 기질의 화학적 변형을 촉매하는 DNA 분자 또는 DNA-함유 분자 (당업계에 "데옥시리보자임" 또는 "DNAzyme"로도 알려져 있음) 또는 RNA

또는 RNA-함유 분자 ("리보자임" 또는 "RNAzyme"으로도 알려져 있음)를 지칭한다. 촉매 핵산의 핵산 염기는 염기 A, C, G, T (및 RNA의 경우 U) 일 수 있다.

[0319] 전형적으로, 촉매 핵산은 표적 핵산의 특이적 인식하기 위한 안티센스 서열, 및 핵산 절단 효소 활성(본 명세서에서 "촉매 도메인"으로도 지칭됨)을 함유한다. 본 개시에 유용한 리보자임의 유형은 해머헤드 리보자임 (hammerhead ribozyme) 및 헤어핀 리보자임 (hairpin ribozyme)이다.

[0320] RNA 간섭

[0321] RNA 간섭 (RNAi)은 특정 단백질의 생성을 특이적으로 억제하는데 유용하다. 이론에 의해 제한되지 않고, 이 기술은 관심 유전자 또는 이의 일부의 mRNA, 이 경우에는 G-CSF 또는 G-CSFR을 암호화하는 mRNA와 본질적으로 동일한 서열을 함유하는 dsRNA 분자의 존재에 의존한다. 편리하게는, dsRNA는 재조합 벡터 숙주 세포에서 단일 프로모터로부터 생성될 수 있으며, 여기서 센스 및 안티센스 서열은 관련되지 않은 서열 (unrelated sequence)에 의해 플랭킹되어, 센스 및 안티센스 서열이 루프 구조를 형성하는 상기 관련되지 않은 서열과 dsRNA 분자를 형성하도록 하이브리드화 할 수 있게 한다. 본 개시 내용에 적합한 dsRNA 분자의 디자인 및 생산은 특히 WO99/32619, WO99/53050, WO99/49029 및 WO01/34815를 고려하며, 당업자의 능력 내에 있다. RNAi에 대한 이러한 dsRNA 분자는 short hairpin RNA (shRNA) 및 bi-functional shRNA를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0322] 혼성화하는 센스 및 안티센스 서열의 길이는 각각 적어도 19 개의 인접 뉴클레오티드, 예를 들어 적어도 30 또는 50 뉴클레오티드, 예를 들어 적어도 100, 200, 500 또는 1000 뉴클레오티드이어야 한다. 전체 유전자 전사체에 상응하는 전장 서열이 사용될 수 있다. 그 길이는 100-2000 뉴클레오티드 일 수 있다. 표적화 된 전사체에 대한 센스 및 안티센스 서열의 동일성 정도는 적어도 85 %, 예를 들어, 95-100 %와 같이, 적어도 90 %이어야 한다.

[0323] 예시적인 작은 간섭 RNA ("siRNA") 분자는 표적 mRNA의 약 19-21 개의 인접한 뉴클레오티드와 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예를 들어, siRNA 서열은 디뉴클레오티드 AA로 시작하고, 약 30-70 % (예를 들어, 30-60 %, 예컨대 40-60 %, 예를 들어 약 45 %-55 %)의 GC 함량을 포함하고, 예를 들어 표준 BLAST 검색에 의해 결정된 바와 같이, 이것이 도입될 포유 동물의 게놈에서 표적 이외의 임의의 뉴클레오티드 서열과 높은 백분율 동일성을 갖지 않는다.

[0324] 압타머

[0325] 다른 예에서, 화합물은 핵산 앱타머 (적응성 올리고머)이다. 압타머는 단백질 또는 소분자, 예를 들어 G-CSF 또는 G-CSFR과 같은 특정 표적 분자에 결합하는 능력을 제공하는 2차 및/또는 3차 구조를 형성할 수 있는 단일 가닥 올리고 뉴클레오티드 또는 올리고 뉴클레오티드 유사체이다. 따라서, 압타머는 항체와 유사한 올리고 뉴클레오티드이다. 일반적으로, 압타머는 약 15 내지 약 100 개의 뉴클레오티드, 예를 들어 약 15 내지 약 40 개의 뉴클레오티드, 예를 들어 약 20 내지 약 40 개의 뉴클레오티드를 포함하는데, 이러한 범위 내에 속하는 길이의 올리고 뉴클레오티드는 통상적인 기술에 의해 제조될 수 있기 때문이다.

[0326] 압타머는 압타머 라이브러리로부터 분리되거나 식별될 수 있다. 압타머 라이브러리는 예를 들어 랜덤 올리고 뉴클레오타이드를 벡터 (또는 RNA 앱타머의 경우 발현 벡터)로 클로닝함으로써 생성되며, 여기서 랜덤 서열은 PCR 프라이머에 대한 결합 부위를 제공하는 공지된 서열에 의해 플랭킹 된다. 원하는 생물학적 활성을 제공하는 압타머 (예를 들어, G-CSF 또는 G-CSFR에 특이적으로 결합)가 선택된다. 증가된 활성을 갖는 압타머는 예를 들어 SELEX (Sytematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)를 사용하여 선택된다. 압타머 라이브러리를 생성 및/또는 스크리닝하기 위한 적절한 방법은 예를 들어 Elloington and Szostak, *Nature 346*:818-22, 1990; US 5270163; 및/또는 US 5475096에 기재되어 있다.

[0327] **화합물의 활성 분석**

[0328] *G-CSFR 및 그 돌연변이체에 대한 결합*

[0329] 본 개시 내용의 일부 화합물이 hG-CSFR의 리간드 결합 도메인 및 hG-CSFR의 리간드 결합 도메인의 특정 돌연변이 형태에 결합 (예를 들어, 특정 점 돌연변이를 가지거나 가지지 않는 서열번호 1) 및/또는 인간 및 시노몰구스 원숭이 G-CSFR 모두에 결합한다는 것은 본원의 개시로부터 당업자에게 명백할 것이다. 단백질에 대한 결합을 평가하는 방법은 예컨대 Scopes (In: Protein purification: principles and practice, Third Edition, Springer Verlag, 1994)에 기재된 것과 같이 당업계에 공지되어 있다. 이러한 방법은 일반적으로 단백질을 표지하고 이를 고정화된 화합물과 접촉시키는 것을 포함한다. 비특이적 결합 단백질을 제거하기 위해 세척한 후, 표

지의 양 및 결과적으로 결합 단백질이 검출된다. 물론, 단백질이 고정화 될 수 있고 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물이 표지될 수도 있다. 패닝형 분석이 또한 사용될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 표면 플라즈몬 공명 분석법이 사용될 수 있다.

[0330] 상기 기재된 분석법은 또한 hG-CSFR 또는 이의 리간드 결합 도메인 (예를 들어, 서열번호 1) 또는 이의 돌연변이 형태에 대한 화합물의 결합 수준을 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0331] 일 예에서, 본 발명의 단백질은 서열번호 1에 결합하는 것과 실질적으로 동일한 수준에서 (예를 들어, 10 % 또는 5 % 또는 1 % 이내) 서열번호 1의 위치 167에서 알라닌이 리신으로 치환 및/또는 서열번호 1의 위치 168에서 알라닌이 히스티딘으로 치환된 서열번호 1의 폴리펩티드에 결합한다.

[0332] 일 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 서열번호 1의 위치 287에서 알라닌이 아르기닌으로 치환된 서열번호 1의 폴리펩티드와 서열번호 1의 폴리펩티드에 결합하는 것에 비해 적어도 약 100배 또는 150배 또는 160배 또는 200배 낮은 수준으로 결합한다. 일 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 서열번호 1의 위치 287에서 알라닌이 아르기닌으로 치환된 서열번호 1의 폴리펩티드와 서열번호 1의 폴리펩티드에 결합하는 것에 비해 적어도 약 160배 낮은 수준으로 결합한다.

[0333] 일 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 서열번호 1의 위치 237에서 알라닌이 히스티딘으로 치환된 서열번호 1의 폴리펩티드와 서열번호 1의 폴리펩티드에 결합하는 것에 비해 적어도 약 20배 또는 40배 또는 50배 또는 60배 더 낮은 수준으로 결합한다. 일 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 서열번호 1의 위치 237에서 알라닌이 히스티딘으로 치환된 서열번호 1의 폴리펩티드와 서열번호 1의 폴리펩티드에 결합하는 것에 비해 적어도 약 50배 더 낮은 수준으로 결합한다.

[0334] 일 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 서열번호 1의 위치 198에서 알라닌이 메티오닌으로 치환된 서열번호 1의 폴리펩티드와 서열번호 1의 폴리펩티드에 결합하는 것에 비해 적어도 약 20배 또는 40배 또는 50배 또는 60배 또는 70배 더 낮은 수준으로 결합한다. 일 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 서열번호 1의 위치 198에서 알라닌이 메티오닌으로 치환된 서열번호 1의 폴리펩티드와 서열번호 1의 폴리펩티드에 결합하는 것에 비해 적어도 약 40배 더 낮은 수준으로 결합한다.

[0335] 일 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 서열번호 1의 위치 172에서 알라닌이 티로신으로 치환된 서열번호 1의 폴리펩티드와 서열번호 1의 폴리펩티드에 결합하는 것에 비해 적어도 약 20배 또는 30배 또는 40배 더 낮은 수준으로 결합한다. 일 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 서열번호 1의 위치 172에서 알라닌이 티로신으로 치환된 서열번호 1의 폴리펩티드와 서열번호 1의 폴리펩티드에 결합하는 것에 비해 적어도 약 40배 더 낮은 수준으로 결합한다.

[0336] 일 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 서열번호 1의 위치 171에서 알라닌이 루신으로 치환된 서열번호 1의 폴리펩티드와 서열번호 1의 폴리펩티드에 결합하는 것에 비해 적어도 약 100배 또는 120배 또는 130배 또는 140배 더 낮은 수준으로 결합한다. 일 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 서열번호 1의 위치 172에서 알라닌이 루신으로 치환된 서열번호 1의 폴리펩티드와 서열번호 1의 폴리펩티드에 결합하는 것에 비해 적어도 약 140배 더 낮은 수준으로 결합한다.

[0337] 일 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 서열번호 1의 위치 111에서 알라닌이 루신으로 치환된 서열번호 1의 폴리펩티드와 서열번호 1의 폴리펩티드에 결합하는 것에 비해 적어도 약 20배 또는 40배 또는 60배 또는 70배 더 낮은 수준으로 결합한다. 일 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 서열번호 1의 위치 111에서 알라닌이 루신으로 치환된 서열번호 1의 폴리펩티드와 서열번호 1의 폴리펩티드에 결합하는 것에 비해 적어도 약 60배 더 낮은 수준으로 결합한다.

[0338] 일 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 서열번호 1의 위치 168에서 알라닌이 히스티딘으로 치환된 서열번호 1의 폴리펩티드와 서열번호 1의 폴리펩티드에 결합하는 것에 비해 5배 또는 4배 또는 3배 또는 2배 또는 1배 이하의 더 낮은 수준으로 결합한다.

[0339] 일 예에서, 본 개시 내용의 단백질은 서열번호 1의 위치 167에서 알라닌이 라이신으로 치환된 서열번호 1의 폴리펩티드와 서열번호 1의 폴리펩티드에 결합하는 것에 비해 5배 또는 4배 또는 3배 또는 2배 또는 1배 이하의 더 낮은 수준으로 결합한다.

[0340] 결합 수준은 바이오 센서를 사용하여 편리하게 결정된다.

[0341] 본 기술 내용은 전술한 특성의 임의의 조합을 고려한다. 일 예에서, 본원에 기술된 단백질은 이전 7 개의 단락

에 제시된 모든 결합 특성을 갖는다.

[0342] *에피토프 맵핑*

[0343] 또 다른 예에서, 본원에 기재된 단백질에 의해 결합되는 에피토프가 맵핑된다. 에피토프 맵핑 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어, 관심있는 에피토프를 포함하는 hG-CSFR 서열 또는 이의 영역에 걸쳐있는 일련의 중첩 펩티드 (overlapping peptides), 예를 들어 10-15 아미노산을 포함하는 펩티드가 생성된다. 이어서 상기 단백질을 각각의 펩티드에 접촉시키고, 이것이 결합하는 펩티드를 결정한다. 이는 단백질이 결합하는 에피토프를 포함하는 펩티드 (들)을 결정할 수 있게 한다. 다수의 비 연속 펩티드가 단백질에 의해 결합되면, 그 단백질은 입체 형태 에피토프 (conformational epitope)에 결합하는 것일 수 있다.

[0344] 대안적 또는 추가적으로, hG-CSFR 내의 아미노산 잔기는 예를 들어 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발에 의해 돌연변이 되고, 단백질 결합을 감소시키거나 방지하는 돌연변이가 결정된다. 단백질의 결합을 감소시키거나 방지하는 임의의 돌연변이는 단백질에 의해 결합된 에피토프 내에 있을 가능성이 있다.

[0345] 추가의 방법이 본원에 예시되고, 이는 hG-CSFR 또는 이의 영역을 본 개시 내용의 고정화된 단백질에 결합시키고 생성된 복합체를 프로테아제로 분해시키는 것을 포함한다. 이어서 고정화된 단백질에 결합되어 남아 있는 펩티드를 단리하고, 예를 들어 질량 분석법을 사용하여 이들의 서열을 결정한다.

[0346] 추가 방법은 hG-CSFR 또는 이의 영역에서 수소를 중양성자 (deutrons)로 전환시키고, 생성된 단백질을 본 발명의 고정화 단백질에 결합시키는 것을 포함한다. 이어서, 중양성자는 다시 수소로 전환되고, 분리된 hG-CSFR 또는 이의 영역은 효소로 분해되고, 예를 들어 질량 분석법을 사용하여 분석하여, 본원에 기재된 단백질의 결합에 의해 수소로의 전환으로부터 보호되는 중양성자를 포함하는 영역을 확인한다.

[0347] 선택적으로, hG-CSFR 또는 이의 에피토프에 대한 단백질의 해리 상수 (Kd)가 결정된다. hG-CSFR 결합 단백질에 대한 "Kd" 또는 "Kd 값"은 일 예에서 방사성 표지 또는 형광 표지된 hG-CSFR 결합 분석에 의해 측정된다. 이 분석은 비표지된 hG-CSFR의 적정 시리즈 (titration series)의 존재 하에서 최소 농도의 표지된 G-CSFR로 단백질을 평형화시킨다. 결합되지 않은 hG-CSFR을 제거하기 위한 세척 후, 단백질의 Kd를 나타내는 표지의 양이 결정된다.

[0348] 다른 예에 따르면, Kd 또는 Kd 값은 고정화된 hG-CSFR 또는 이의 영역과 함께 표면 플라즈몬 공명 분석, 예를 들어 BIAcore 표면 플라즈몬 공명 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)을 사용하여 측정된다.

[0349] 일부 예에서, C1.2 또는 C1.2G와 유사한 Kd 또는 더 높은 Kd를 갖는 단백질이 선택되는데, 이는 이들이 hG-CSFR에 대한 결합을 위해 경쟁할 가능성이 있기 때문이다.

[0350] *경쟁적 결합의 결정 (Determining Competitive Binding)*

[0351] 모노클로날 항체 C1.2 또는 C1.2G의 결합을 경쟁적으로 억제하는 단백질을 결정하기 위한 분석은 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어, C1.2 또는 C1.2G는 검출 가능한 표지, 예를 들어 형광 표지 또는 방사성 표지에 접합된다. 이어서, 표지된 항체 및 시험 단백질을 혼합하여 hG-CSFR 또는 이의 영역 (예를 들어, 서열번호 1을 포함하는 폴리펩티드) 또는 이를 발현하는 세포와 접촉시킨다. 이어서, 표지된 C1.2 또는 C1.2G의 수준이 단백질이 없는 상태에서 표지된 항체가 hG-CSFR, 이의 영역 또는 세포와 접촉할 때 결정되는 수준과 비교하고 결정된다. 시험 단백질의 존재하에 표지된 C1.2 또는 C1.2G의 수준이 그 단백질의 부재와 비교하여 감소되면, 그 단백질은 hG-CSFR에 대한 C1.2 또는 C1.2G의 결합을 경쟁적으로 억제하는 것으로 간주된다.

[0352] 선택적으로, 시험 단백질은 C1.2 또는 C1.2G와 다른 표지와 접합된다. 이러한 대안적 표지는 시험 단백질의 hG-CSFR 또는 이의 영역 또는 세포에 대한 결합 수준의 검출을 허용한다.

[0353] 또 다른 예에서, 상기 단백질은 상기 hG-CSFR, 영역 또는 세포를 C1.2 또는 C1.2G와 접촉시키기 전에 hG-CSFR 또는 이의 영역 (예를 들어, 서열번호 1을 포함하는 폴리펩티드) 또는 이를 발현하는 세포에 결합하는 것이 허용된다. 단백질이 없을 때와 비교하여 단백질의 존재 하에서 결합되는 C1.2 또는 C1.2G의 양의 감소는 상기 단백질이 hG-CSFR에 대한 C1.2 또는 C1.2G 결합을 경쟁적으로 억제한다는 것을 나타낸다. 표지된 단백질을 사용하고 먼저 C1.2 또는 C1.2G가 G-CSFR에 결합하게 함으로써 상호 검정 (reciprocal assay)을 수행할 수 있다. 이 경우, C1.2 또는 C1.2G의 부재하에 비해 C1.2 또는 C1.2G의 존재 하에서 hG-CSFR에 결합되는 표지된 단백질의 양이 감소하면 이는 상기 단백질이 C1.2 또는 C1.2G의 hG-CSFR에 대한 결합을 경쟁적으로 억제한다는 것을 나타낸다.

[0354] 전술한 분석 중 임의의 것은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이, C1.2 또는 C1.2G가 결합하는 hG-CSFR 리간드 결합 영역 및/또는 서열번호 1 및/또는 hG-CSFR의 돌연변이 형태를 이용하여 수행될 수 있다.

[0355] *중화 결정 (Determining Neutralization)*

[0356] 본 개시의 일부 예에서, 화합물은 hG-CSFR 신호 전달을 중화시킬 수 있다.

[0357] 수용체를 통한 리간드의 신호 전달을 중화시키는 화합물의 능력을 평가하기위한 다양한 분석법이 당업계에 공지되어 있다.

[0358] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 hG-CSFR에 대한 G-CSF 결합을 감소시키거나 방지한다. 이들 분석은 표지된 G-CSF 및/또는 표지된 단백질을 사용하여 본원에 기재된 바와 같은 경쟁적 결합 분석으로 수행될 수 있다.

[0359] 또 다른 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 $CD34^+$ 골수 세포가 G-CSF의 존재 하에서 배양될 때 CFU-G의 형성을 감소시킨다. 이러한 분석에서, $CD34^+$ 골수 세포는 시험 화합물의 존재 또는 부재하에, G-CSF (예를 들어, 약 10ng/ml 세포 배양 배지), 및 선택적으로 줄기 세포 인자 (예를 들어, 약 10ng/ml 세포 배양 배지)의 존재 하에서 반고체 세포 배양 배지에서 배양된다. 과립구 클론 (CFU-G)이 형성되기에 충분한 시간 후에, 클론 또는 콜로니의 수가 결정된다. G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물의 부재에서와 비교하여 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물의 존재에서 콜로니 수의 감소는 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물이 G-CSF 신호 전달을 중화한다는 것을 나타낸다. G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물의 다중 농도를 시험함으로써, IC_{50}, 즉 CFU-G 형성 최대 억제의 50 %가 발생하는 농도가 결정된다. 일 예에서, IC_{50}은 0.2nM 이하, 예를 들어 0.1nM 이하, 예를 들어 0.09nM 이하, 또는 0.08nM 이하, 또는 0.07nM 이하, 또는 0.06nM 이하 또는 0.05nM 이하이다. 일 예에서, IC_{50}은 0.04nM 이하이다. 다른 예에서, IC_{50}은 0.02nM 이하이다. 상기 IC_{50}은 본원에 기재된 임의의 CFU-G 분석과 관련이 있다.

[0360] 추가의 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 G-CSF의 존재 하에서 배양되는 hG-CSFR을 발현하는 세포 (예를 들어, BaF3 세포)의 증식을 감소시킨다. 세포는 G-CSF의 존재 (예를 들어, 0.5 ng/ml) 및 시험 화합물의 존재 또는 부재 하에서 배양된다. 세포 증식을 평가하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 MTT 감소 및 티미딘 혼입 (thymidine incorporation)을 포함한다. 화합물의 부재 하에서 관찰되는 수준과 비교하여 증식 수준을 감소시키는 화합물은 G-CSF 신호 전달을 중화시키는 것으로 간주된다. 화합물의 다중 농도를 시험함으로써, IC_{50}, 즉 세포 증식의 최대 억제의 50 %가 발생하는 농도가 결정된다. 일 예에서, 상기 IC_{50}은 6nM 이하, 예컨대 5.9nM 이하이다. 다른 예에서, 상기 IC_{50}은 2nM 이하 또는 1nM 이하 또는 0.7nM 또는 세포 또는 0.6nM 이하 또는 0.5nM 이하이다. 상기 IC_{50}은 본원에 기술된 임의의 세포 증식 분석에 관한 것이다.

[0361] 추가의 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 G-CSF 투여 후 생체 내 조혈 줄기 세포 및/또는 내피 전구 세포의 동원 (mobilization)을 감소 및/또는 예를 들어, G-CSF 투여 후 생체 내 호중구의 수를 감소시킨다 (그러나 이것이 필수적인 것은 아님). 예를 들어, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 선택적으로 G-CSF 또는 이의 변형된 형태 (예를 들어, PEG화된 G-CSF 또는 필그라스팀)의 투여 전에, 동시에 또는 후에 투여된다. 조혈 줄기 세포 (예를 들어, CD34 및/또는 Thy1을 발현함) 및/또는 내피 전구 세포 (예를 들어, CD34 및 VEGFR2를 발현함) 및/또는 호중구 (형태적으로 식별 및/또는 예를 들어, CD10, CD14, CD31 및/또는 CD88 발현)의 수가 평가된다. 화합물의 부재에서 관찰된 수준과 비교하여 상기 세포(들)의 수준을 감소시키는 화합물은 G-CSF 신호 전달을 중화시키는 것으로 간주된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 호중구 감소증 (neutropenia)을 유발하지 않으면서 호중구의 수를 감소시킨다.

[0362] G-CSF 신호 전달의 중화를 평가하기 위한 다른 방법들이 본 발명에 의해 고려된다.

[0363] *효과기 기능의 결정 (Determining Effector Function)*

[0364] 본원에 논의된 바와 같이, 본 개시 내용의 일부 단백질은 감소된 효과기 기능을 갖는다. ADCC 활성을 평가하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0365] 일 예에서, ADCC 활성 수준은 ^{51}Cr 방출 검정, 유로퓸 방출 검정 또는 ^{35}S 방출 검정을 사용하여 평가된다. 이들 각각의 분석에서, G-CSFR을 발현하는 세포는 화합물이 세포에 의해 흡수되기에 충분한 시간 및 조건 하에서 G-

CSF 신호 전달을 억제하는 하나 이상의 언급된 화합물과 함께 배양된다. ^{35}S 방출 검정의 경우, hG-CSFR을 발현하는 세포는 ^{35}S-표지된 메티오닌 및/또는 시스테인과 함께 상기 표지된 아미노산이 새로 합성되는 단백질에 혼입되기에 충분한 시간 동안 배양될 수 있다. 이어서, 세포는 단백질의 존재 또는 부재 및 면역 효과기 세포, 예를 들어 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및/또는 NK 세포의 존재 하에서 배양된다. 세포 배양 배지에서 ^{51}Cr, 유로퓸 및/또는 ^{35}S의 양이 검출되고, 단백질의 부재시와 비교하여 단백질의 존재시 변화가 거의 없거나 전혀 없다 (또는 또는 인간 IgG1 Fc를 포함하는 항-hG-CSFR 항체의 존재시 관찰된 수준과 비교하여 감소된 수준인 경우)는 것은 상기 단백질이 감소된 효과기 기능을 가짐을 나타낸다. 단백질에 의해 유도되는 ADCC의 수준을 평가하기 위한 분석을 개시하는 예시적인 공보는 Hellstrom, *et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 83*:7059-7063, 1986 및 Bruggemann, *et al., J. Exp. Med. 166*:1351-1361, 1987를 포함한다.

[0366] 단백질에 의해 유도되는 ADCC의 수준을 평가하기 위한 다른 분석으로는 유세포 분석 (CellTechnology, Inc. CA, USA) 또는 CytoTox 96® 비 방사성 세포 독성 분석 (Promega, WI, USA)에 대한 ACTI™ 비 방사성 세포 독성 분석을 포함한다.

[0367] 단백질이 C1q에 결합할 수 있고 CDC를 유도할 수 있음을 확인하기 위해 C1q 결합 분석을 수행할 수도 있다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 분석이 수행될 수 있다 (예컨대, Gazzano-Santoro *et al, J. Immunol. Methods 202*: 163, 1996 참조).

[0368] *반감기 결정*

[0369] 본 개시 내용에 포함되는 일부 단백질은 개선된 반감기를 가지며, 예를 들어 변형되지 않은 단백질에 비해 반감기를 연장 시키도록 변형된다. 반감기가 개선된 단백질을 결정하는 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어, FcRn (neonatal Fc receptor)에 결합하는 단백질의 능력이 평가된다. 이와 관련하여, FcRn에 대한 증가된 결합 친화도는 분자의 혈청 반감기를 증가시켰다 (예를 들어, Kim *et al., Eur J Immunol., 24*:2429, 1994 참조).

[0370] 본 개시 내용의 단백질의 반감기는 또한 예를 들어 Kim *et al*, *Eur J of Immunol 24*:542, 1994에 기재된 방법에 따라 약동학적 연구에 의해 측정될 수 있다. 이 방법에 따르면, 방사성 표지된 단백질은 마우스에 정맥 내 주사되고, 그 혈장 농도는 시간의 함수로서, 예를 들어, 주사 후 3 분 내지 72 시간에 주기적으로 측정된다. 이렇게 얻어진 클리어런스 곡선 (clearance curve)은 2 상, 즉 알파상 및 베타상이어야 한다. 단백질의 생체 내 반감기를 결정하기 위해, 베타상의 제거율을 계산하여 야생형 또는 변형되지 않은 단백질의 제거율과 비교한다.

[0371] *치료 효능*

[0372] 허혈-재관류 손상을 치료하기 위한 화합물의 효능은 생체 내 분석을 사용하여 평가될 수 있다. 예를 들어, Bohl *et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2009), Hartsock *et al., J Vis Exp* (2016), Greenberg *et al., Methods Enzymol* (2008), 또는 Zhang *et al., The FASEB Journal* (2016)에 기재된 마우스 모델을 사용할 수 있다 .

[0373] **조성물**

[0374] 일부 예에서, 본원에 기술된 바와 같은 화합물은 통상적인 비 독성 약학상 허용되는 담체를 함유하는 투여 제형으로 이식된 저장소 (reservoir)를 통해, 또는 임의의 다른 편리한 투여 형태에 의해, 경구, 비경구, 흡입 스프레이, 흡착, 흡수, 국소적, 직장, 비강, 구강, 질, 심실로 투여될 수 있다. 본원에 사용된 용어 "비경 구"는 피하, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 척수강 내 (intrathecal), 심실 내 (intraventricular), 흉골 내 (intrasternal) 및 두개 내 (intracranial) 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

[0375] 투여를 위해 적합한 형태로 화합물을 제조하는 방법 (예를 들어, 약학 조성물)은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990) 및 U.S. Pharmacopeia: National Formulary (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1984)에 기재된 방법을 포함한다.

[0376] 본 개시 내용의 약학 조성물은 비경구 투여, 예컨대 정맥 내 투여 또는 피하 투여 또는 기관 또는 관절의 체강 또는 내강 내 투여에 특히 유용하다. 투여용 조성물은 일반적으로 약학상 허용되는 담체, 예를 들어 수성 담체에 용해된 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물의 용액을 포함할 것이다. 다양한 수성 담체, 예를 들어 완충 식염수 등이 사용될 수 있다. 상기 조성물은 pH 조절제 및 완충제, 독성 조절제 등과 같은 생리학적 조건에 근사

하는데 필요한 약학적으로 허용되는 보조 물질, 예를 들어 나트륨 아세테이트, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 나트륨 락테이트 등을 함유할 수 있다. 이들 제형에서 본 개시 내용의 화합물의 농도는 광범위하게 변할 수 있으며, 선택된 특정 투여 방식 및 환자의 니즈에 따라 주로 유체 부피, 점도, 체중 등에 기초하여 선택될 것이다. 예시적인 담체는 물, 식염수, 링거액, 덱스트로스 용액 및 5 % 인간 혈청 알부민을 포함한다. 혼합 오일 및 에틸 올레에이트와 같은 비 수성 비히클이 또한 사용될 수 있다. 리포좀이 또한 담체로서 사용될 수 있다. 비히클은 등장성 및 화학적 안정성을 향상시키는 소량의 첨가제, 예를 들어 완충제 및 보존제를 함유할 수있다.

[0377] 제제화시, 본 개시 내용의 화합물은 정량 제제 (dosage formulation)와 양립 가능한 방식 및 치료적/예방적 유효량으로 투여될 것이다. 제제는 상기 기재된 주 사용 용액의 유형과 같은 다양한 투여 형태로 용이하게 투여되지만, 다른 약학적으로 허용되는 형태, 예를 들어 경구 투여를 위한 정제, 환제, 캡슐 또는 다른 고형물, 좌약, 질 좌약, 코 용액 또는 스프레이, 에어로졸, 흡입제, 리포좀 형태 등도 고려된다. 약학적 "서방형 (slow release)" 캡슐 또는 조성물이 또한 사용될 수 있다. 서방형 제제는 일반적으로 장기간에 걸쳐 일정한 약물 수준을 제공하도록 설계되며 본 개시 내용의 화합물을 전달하는데 사용될 수 있다.

[0378] WO2002/080967은 예를 들어 천식의 치료를 위한 항체를 포함하는 에어로졸 화된 조성물 투여를 위한 조성물 및 방법을 기술하며, 이는 본 개시 내용의 단백질의 투여에도 적합하다.

[0379] **병용 요법 (Combination Therapies)**

[0380] 일 예에서, 본 개시 내용의 화합물은 조합된 또는 추가의 치료 단계 또는 치료적 제형의 추가 성분으로서 본원에 기재된 질환 또는 상태를 치료하는데 유용한 또 다른 화합물과 함께 투여된다.

[0381] 예를 들어, 상기 다른 화합물은 항염증제 화합물 (anti-inflammatory compound)이다. 대안적 또는 추가적으로, 상기 다른 화합물은 면역 억제제 (immunosuppressant)이다. 대안적 또는 추가적으로, 상기 다른 화합물은 코르티코스테로이드 (corticosteroid), 예컨대 프레드니손 (prednisone) 및/또는 프레드니솔론 (prednisolone)이다. 대안적으로 또는 추가적으로, 상기 다른 화합물은 메토트렉세이트 (methotrexate)이다. 대안적 또는 추가적으로, 상기 다른 화합물은 시클로포스파미드 (cyclophosphamide)이다. 대안적 또는 추가적으로, 상기 다른 화합물은 미코페놀레이트 모페틸 (mycophenolate mofetil)이다. 대안적 또는 추가적으로 상기 다른 화합물은 조직 플라스미노겐 활성화 제 (t-PA)이다.

[0382] 일부 예에서, 다른 화합물은 다음 중 하나 이상의 발현 또는 활성을 억제 또는 감소시킨다 :

[0383] (i) 신장 손상 분자 1 (kidney injury molecule 1, KIM-1);

[0384] (ii) 호중구 젤라티나제-관련 리포칼린 (neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL);

[0385] (iii) 인터루킨 1 베타 (interleukin 1 beta, IL-1β);

[0386] (iv) 인터루킨 6 (interleukin 6, IL-6);

[0387] (v) 종양 괴사 인자 알파 (tumor necrosis factor alpha, TNFα);

[0388] (vi) 보체 성분 5a 수용체 1 (complement component 5a receptor 1, C5AR1);

[0389] (vii) 대식세포 염증성 단백질 2-알파 (macrophage inflammatory protein 2-alpha, MIP2-α);

[0390] (viii) 세포 간 접착 분자 1 (intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1);

[0391] (ix) E- 셀렉틴 (E-selectin);

[0392] (x) C-X-C 모티프 케모카인 리간드 1 (C-X-C motif chemokine ligand 1, CXCL1);

[0393] (xi) 인터루킨 8 수용체 베타 (interleukin 8 receptor beta, IL-8Rβ); 및

[0394] (xii) 단핵구 화학유인물질 단백질 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1).

[0395] 일부 예에서, 상기 다른 화합물은 황화수소 (hydrogen sulfide)이다. 일부 예에서, 상기 다른 화합물은 시클로스포린 (cyclosporine)이다. 일부 예에서, 상기 다른 화합물은 Le Lamer *et al., J Transl Med* (2014)에 기술된 바와 같이 TRO40303이다. 일부 예에서, 상기 다른 화합물은 수퍼옥사이드 디스뮤타제 (superoxide dismutase)이다. 일부 예에서, 상기 다른 화합물은 카나비노이드 (cannabinoid) 또는 이의 합성 유사체이다.

[0396] 일부 예에서, 상기 다른 화합물은 이식 수술에 일반적으로 사용되는 화합물이다.

[0397] 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 다른 화합물과 동시에 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 다른 화합물보다 먼저 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 다른 화합물 후에 투여된다.

[0398] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 세포와 함께 투여된다. 일부 예에서, 상기 세포는 중간엽 줄기 세포와 같은 줄기 세포이다.

[0399] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 유전자 요법과 함께 투여된다.

[0400] **투여량 및 투여시기**

[0401] 본 개시 내용의 화합물의 적합한 투여량은 특정 화합물, 치료될 상태 및/또는 치료되는 대상체에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 차선의 투여량 (sub-optimal dosage)으로 시작하여 투여량을 변경하며 최적 또는 유용한 투여량을 결정하는 것과 같이, 적합한 투여량을 결정하는 것은 숙련된 의사의 능력 내에 있다. 대안적으로, 치료/예방을 위한 적절한 투여량을 결정하기 위해, 세포 배양 분석 또는 동물 연구로부터의 데이터가 사용되며, 여기서 적절한 투여량은 독성이 거의 없거나 전혀없는 활성 화합물의 ED_{50}을 포함하는 순환 농도 범위 내에 있다. 투여량은 채용된 투여 형태 및 사용되는 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 변할 수있다. 치료적/예방적 유효량은 세포 배양 분석으로부터 초기에 추정될 수 있다. 세포 배양 물에서 결정된 바와 같이 IC50 (즉, 증상의 절반-최대 억제를 달성하는 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하기 위해 용량을 동물 모델에서 공식화 할 수 있다. 이러한 정보는 인간의 유용한 복용량을 보다 정확하게 결정하는 데 사용될 수 있다. 혈장에서의 수준은 예를 들어 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 측정될 수 있다.

[0402] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 전신 (systemically) 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 국소적으로 투여된다.

[0403] 대상체에서 허혈-재관류 손상을 예방 또는 치료하기 위하여, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물이 대상체에게 직접 투여될 필요는 없다는 것이 당업자에게 이해될 것이다. 예를 들어, 상기 화합물은 대상체에 이식하기 전에 기관 공여자 또는 기관 (예를 들어, 수확된 기관)에 투여될 수 있으며, 이로써 이식 후 대상체에서 뒤따르는 허혈-재관류 손상의 영향을 감소시킨다. 따라서, 대상에서의 허혈-재관류 손상은 대상체에 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물을 직접 투여하지 않고 치료될 수 있다.

[0404] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 대상체에 투여된다. 일부 예에서, 상기 대상체는 기관 이식 수여자이다.

[0405] 일부 예에서, 본 개시 내용의 방법은 예방적 또는 치료적 유효량의 본원에 기재된 화합물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0406] 용어 "치료적 유효량"은 투여시 대상체의 예후 및/또는 상태를 개선시키고/시키거나 본원에 기재된 임상 상태의 하나 이상의 증상을 해당 상태의 임상 진단 또는 임상 특성으로 인정되고 관찰되는 수준 이하로 감소 또는 억제시키는 양이다. 투여되는 양은 치료될 상태의 특정 특성, 치료되는 상태의 유형 및 단계, 투여 방식, 및 대상체의 특성, 예컨대 일반 건강, 기타 질병, 연령, 성별, 유전자형 및 체중에 따라 달라질 것이다. 당업자는 이들 및 다른 인자에 따라 적절한 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 따라서, 이 용어는 본 발명을 특정한 양, 예를 들어 중량 또는 화합물의 양으로 제한하는 것으로 해석되어서는 안되며, 오히려 본 발명은 대상체에서 상기 언급된 결과를 달성하기에 충분한 G-CSF 신호 전달을 억제하는 임의의 양의 화합물을 포함하는 것이다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물의 치료적 유효량은 호중구 감소증을 유도하지 않는다.

[0407] 본원에 사용된 용어 "예방적 유효량 (prophylactically effective amount)"은 임상 상태의 하나 이상의 검출 가능한 증상의 발병을 예방 (prevent) 또는 억제 (inhibit) 또는 지연 (delay) 시키기에 충분한 양의 화합물을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 통상의 기술자는 이러한 양이 예를 들어 투여된 특정 화합물 및/또는 특정 대상체 및/또는 상태의 유형 또는 심각도 또는 수준 및/또는 상태에 대한 소인 (유전적 또는 그 밖의)에 따라 달라질 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 이 용어는 본 발명을 특정한 양, 예를 들어 중량 또는 화합물의 양으로 제한하는 것으로 해석되어서는 안되며, 오히려 본 발명은 대상체에서 언급된 결과를 달성하기에 충분한 G-CSF 신호 전달을 억제하는 임의의 양의 화합물을 포함한다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물의 예방적 유효량은 호중구 감소증을 유도하지 않는다.

[0408] 본원에 기술된 화합물의 생체 내 투여를 위해, 정상 투여량은 하루 당 개인의 체중의 약 10ng/kg 내지 약 100mg/kg 또는 이상으로 다양할 수 있다. 예시적인 투여량 및 이의 범위가 본원에 기재되어 있다. 치료될 질환(disease) 또는 장애 (disorder)의 중증도에 따라 수일 또는 그 이상에 걸친 반복 투여되는 경우, 원하는 증상 억제가 달성될 때까지 치료를 지속할 수 있다.

[0409] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.1mg/kg 내지 약 30mg/kg, 예컨대 약 1mg/kg 내지 약 10mg/kg, 또는 약 2mg/kg 내지 8mg/kg, 또는 약 4mg/kg 내지 6mg/kg 의 초기 (또는 로딩) 용량으로 투여된다. 이어서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.1mg/kg 또는 0.5mg/kg 또는 1mg/kg 또는 2mg/kg 또는 3mg/kg 또는 4mg/kg 또는 5mg/kg 같이, 약 0.01mg/kg 내지 약 5mg/kg, 예컨대 약 0.05mg/kg 내지 약 1mg/kg, 예를 들어 약 0.1mg/kg 내지 약 1mg/kg의 더 낮은 유지 용량으로 투여될 수 있다. 유지 용량은 7-30 일마다, 예컨대 10-15 일마다, 예를 들어 10 또는 11 또는 12 또는 13 또는 14 또는 15 일마다 투여될 수 있다. 이와 관련하여, 예를 들어 기관 이식 수술 후 대상체의 혈액에서 화합물의 치료적 유효 수준을 장기간 동안 유지하기 위해 유지 용량이 사용될 수 있다.

[0410] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.1mg/kg 내지 약 1mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.4mg/kg 내지 약 0.5mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.1 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.2 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.3 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.4 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.5 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.6 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.7 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.8 mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 1 mg/kg의 용량으로 투여된다.

[0411] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 0.01mg/kg 내지 약 50mg/kg, 예컨대 약 0.1mg/kg 내지 약 40mg/kg, 예를 들어 약 2mg/kg 내지 약 30mg/kg, 예를 들어 약 5mg/kg 내지 약 25mg/kg의 용량으로 투여된다.

[0412] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 2mg/kg 내지 약 8mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 4mg/kg 내지 약 6mg/kg의 용량으로 투여된다.

[0413] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 10mg/kg 내지 약 40mg/kg의 용량으로 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 20mg/kg 내지 약 30mg/kg의 용량으로 투여된다.

[0414] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 5mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 예에서 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 10mg/kg의 용량으로 투여된다. 일부 예에서 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 약 25mg/kg의 용량으로 투여된다.

[0415] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 더 높은 로딩 용량 또는 더 낮은 로딩 용량 없이 투여된다.

[0416] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 단일 용량으로 투여된다.

[0417] 일부 예에서, 다수의 용량, 예를 들어, 7-30 일마다, 예컨대 10-22 일마다, 예를 들어, 10-15 일마다, 예를 들어, 10 또는 11 또는 12 또는 13 또는 14 또는 15 또는 16 또는 17 또는 18 또는 19 또는 20 또는 21 또는 22 일마다, 투여된다. 예를 들어, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 7 일마다 또는 14 일마다 또는 21 일마다 투여된다.

[0418] 일부 예에서, 요법 개시시, 포유 동물에게 연속 7 일 또는 연속 6 일 또는 연속 5 일 또는 연속 4 일 이내로 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물이 투여된다.

[0419] 치료에 적절하게 반응하지 않는 포유 동물의 경우, 일주일에 여러 번 투여 될 수 있다. 대안적 또는 추가적으로, 증가하는 용량이 투여될 수 있다.

[0420] 또 다른 예에서, 부작용을 겪는 포유 동물의 경우, 초기 (또는 로딩) 용량은 1 주일에 수일에 걸쳐 또는 연속적인 수일에 걸쳐 분할될 수 있다.

[0421] 본 개시 내용의 방법에 따른 화합물의 투여는, 예를 들어, 수여자의 생리학적 상태, 투여의 목적이 치료적 또는 예방적인지 여부, 및 숙련된 전문가에게 공지 된 다른 요인에 따라 연속적이거나 간헐적 일 수 있다. 화합물의 투여는 미리 선택된 기간 동안 본질적으로 연속적 일 수 있으나, 예를 들어 상태의 발생 동안 또는 후에 일련의 이격된 용량 (spaced doses) 일 수 있다.

[0422] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 허혈 전에 투여된다. 따라서, 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 0 일 (예를 들어, 허혈 바로 직전) 내지 허혈 7 일 전에 투여된다. 예를 들어, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 허혈 전 0 일 내지 6 일 또는 5 일 또는 4 일에 투여된다. 예를 들어, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 허혈 전 0 내지 48 시간에 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 허혈 12 내지 36 시간 전에 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 허혈 약 24 시간 전에 투여된다. 다른 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 허혈 후에 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 허혈 전과 후에 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 허혈 동안, 예를 들어 조직 또는 기관 이식 수술 동안 투여된다.

[0423] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 허혈 적어도 1 시간 전에 (예를 들어, 허혈 전 7 일까지 또는 그 이상) 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 허혈 적어도 2 또는 적어도 4 또는 적어도 6 또는 적어도 8 또는 적어도 10 또는 적어도 12 시간 또는 적어도 14 시간 또는 적어도 16 시간 또는 적어도 18 시간 또는 적어도 20 시간 또는 적어도 22 시간 또는 적어도 24 시간 전에 투여된다.

[0424] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 전에 투여된다. 따라서, 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 전 0 일 (예를 들어, 재관류 바로 직전) 내지 7 일 사이에 투여된다. 예를 들어, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 전 0 일 내지 6 일 또는 5 일 또는 4 일 사이에 투여된다. 예를 들어, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 전 0 내지 48 시간 사이에 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 전에 12 시간 내지 36 시간 사이에 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 약 24 시간 전에 투여된다. 다른 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 후에 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 전과 후에 투여된다.

[0425] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 적어도 1 시간 전에 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 적어도 2 또는 적어도 4 또는 적어도 6 또는 적어도 8 또는 적어도 10 또는 적어도 12 시간 또는 적어도 14 시간 또는 적어도 16 시간 또는 적어도 18 시간 또는 적어도 20 시간 또는 적어도 22 시간 또는 적어도 24 시간 (예를 들어, 7 일까지 또는 그 이상) 전에 투여된다.

[0426] *조직 또는 기관 이식*

[0427] 허혈-재관류 손상이 조직 또는 기관 이식에 기인하거나 이와 관련될 때, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 이식 전, 동안 또는 후에 투여될 수 있다. 따라서, 일부 예에서 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 이식 전에 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 이식 동안, 예를 들어 혈류가 이식된 기관으로 회복되는 시간인 클램프 방출 (clamp release) 전에 투여된다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 이식 후에 투여된다.

[0428] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 대상체 (subject)에게 투여되며, 여기서 상기 대상체는 조직 또는 기관 이식 수여자이다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 전에 조직 또는 기관 이식 수여자에게 투여된다. 일 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 재관류 후 조직 또는 기관 이식 수여자에게 투여된다.

[0429] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 조직 또는 기관 수확 (harvest) 전에 조직 또는 기관 이식 공여자에게 투여된다.

[0430] 일부 예에서, 상기 조직 또는 기관 이식 공여자는 살아있는 공여자이다. 일부 예에서, 상기 공여자는 사망한 공여자이다. 사망한 공여자는 기관의 질 (quality) 및/또는 순환 및 호흡 기능의 중단 (cessation) 의 순서 및 메커니즘에 따라 여러 그룹으로 분류될 수 있다. 사망한 기증자의 분류는 Panduranga & Akinlolu에 기재되어 있다 (Clin J Am Soc Nephrol 4: 1827-1831, 200).

[0431] 일부 예에서, 공여자는 뇌사 후 공여 (DBD) 공여자이며, '뇌사 (brain-dead)' 공여자로도 불린다. DBD 공여자는

일차적인 뇌사를 겪었지만 자연적으로 또는 의료 조치 (예 : 기계적 환기 (mechanical ventilation,), 약물, 대동맥 벌룬 펌프 (intra-aortic balloon pump) 또는 체외 기계 산소화 장치 (extracorporeal machine oxygenation device))에 의해 순환 시스템이 기능을 유지하는 공여자이다. 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 기관 수확 전에 DBD 공여자에게 투여되고 혈액 순환에 의해 잠재적 이식 기관에 분배된다.

[0432] 일부 예에서, 공여자는 순환 사망 후 공여 (DCD) 공여자이며, '심장 사망 후 공여자 (donation after cardiac death)' 또는 '심장이 정지된 공여자 (non-heart-beating donor)'로도 불린다. DCD 공여자는 기관 수확 전에 순환 기능이 상실된 (예를 들어, 심장사) 공여자이다. 일부 예에서, 심장 폐 우회기구 (heart-lung bypass instruments)에 의한 것과 같은 인공 순환이 DCD 공여자에게 투여된 화합물을 수확 및 이식을 위해 고려되는 기관 (들)에 전달하기 위해 필요할 수 있다. DCD 공여자는 추가의 하위 그룹으로 더 분류될 수있다. 일부 예에서, 사기 DCD 공여자는 제어 (controlled) DCD (cDCD) 공여자이다. cDCD 공여자는 그의 생명 유지가 철회되고 가족이 수술실의 통제된 환경에서 기관 기증에 대한 서면 동의를 한 공여자입니다. 일부 예에서, 상기 DCD 공여자는 비 제어 (uncontrolled) DCD (uDCD) 공여자이다. 예를 들어, 상기 uDCD 공여자는 기관 기증에 대한 동의가 얻어지기 전에 응급실 또는 병원의 다른 곳에서 사망한 (expired) 공여자로, 동의가 얻어질 때까지 기관을 냉각시키기 위하여 대퇴골 혈관 및 복막에 카테터를 배치한다. uDCD 공여자는 기관 기증에 동의했지만 기관를 조달하는 동안 심폐 소생술을 요구하는 심정지를 겪는 공여자이기도 하다.

[0433] 일부 예에서, 공여자는 확장 기준 공여자 (expanded-criteria donor, ECD)이다. ECD는 사망시 60 세 이상이거나 50 세에서 59 세 사이의 기증자이며 다음 세 가지 기준 중 임의의 두 개를 갖는다: (1) 사망 원인은 뇌 혈관 사고; (2) 전신 고혈압의 과거력; 및 (3) 1.5 mg / dL 초과의 말단 혈청 크레아티닌.

[0434] 일부 예에서, 공여자는 표준 기준 공여자 (standard-criteria donor, SCD)이다. SCD는 50 세 미만의 공여자이다. 일반적으로 뇌사 후 기증하고 ECD 기준 (상기 참조)을 충족하지 않는 사망한 모든 공여자는 SCD로 간주된다.

[0435] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 뇌사 결정 직후 또는 실현가능한 주어진 합법적, 윤리적 및 환자 고려 사항에 따라 뇌사 후 곧바로 투여된다. 담당 의사 또는 이식 외과의는 적합한 공여자로부터 기관 수확시기 및 수확된 기관을 적합한 수여자에게 이식하는데 영향을 미치는 여러 요인을 인식 할 것이다. 따라서, 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 뇌사 발생과 이식을 위한 기관의 제거 사이에 언제든지 공여자에게 투여된다.

[0436] 일부 예에서, 상기 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물은 조직 또는 기관 이식 전에 수확된 조직 또는 기관에 생체 외로 (*ex vivo*) 투여된다. 예를 들어, 수확 된 조직 또는 기관은 이식 전에 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물을 포함하는 용액으로 관류되거나 주입될 수 있다.

[0437] **키트**

[0438] 본 개시 내용의 또 다른 예는 상기 기재된 허혈-재관류 손상의 치료에 유용한 화합물을 함유하는 키트를 제공한다.

[0439] 일 예에서, 상기 키트는 (a) 선택적으로 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제 내의, 본원에 기술된 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물을 포함하는 용기 (container) 및 (b) 대상체에서 허혈-재관류 손상의 영향을 감소시키기 위한 지시 사항을 갖는 패키지 삽입물을 포함한다.

[0440] 본 개시의 이러한 예에 따르면, 상기 패키지 삽입물은 용기 상에 있거나 용기와 관련된다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 등을 포함한다. 상기 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로 형성될 수 있다. 상기 용기는 허혈-재관류 손상을 치료하는데 효과적인 조성물을 보유하거나 함유하며, 멸균 접근 포트 (sterile access port)를 가질 수 있다 (예를 들어, 상기 용기는 피하 주사 바늘 (hypodermic injection needle)에 의해 관통될 수있는 마개를 갖는 정맥 용액 백 (intravenous solution bag) 또는 바이알 일 수 있다). 상기 조성물 중 적어도 하나의 활성제는 G-CSF 신호 전달을 억제하는 화합물이다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 화합물의 투여량 및 간격 및 제공되는 임의의 다른 약제에 관한 특정 지침과 함께 상기 조성물이 치료할 수 있는 대상체, 예를 들어 기관 이식 수여자를 치료하는데 사용된다는 것을 나타낸다. 상기 키트는 약제학상 허용되는 희석용 완충제 (diluent buffer), 예컨대 정균 주사 용수 (bacteriostatic water for injection, BWFI), 포스페이트 완충 식염수, 링거액 및/또는 덱스트로스 용액을 포함하는 추가 용기를 추가로 포함 할 수있다. 상기 키트는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 포함하여 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한

다른 물질을 추가로 포함 할 수 있다.

[0441] 본 개시 내용은하기 비 제한적 실시예를 포함한다.

[0442] **실시예**

[0443] **실시예 1: 방법 및 물질**

[0444] *마우스*

[0445] 10주 내지 12주령의 성체 수컷 C57BL/6 야생형 마우스를 호주 퍼스의 동물 자원 센터 (Animal Resource Centre, Perth, Australia)로부터 입수하였다. 마우스는 St. Vincent's Hospital Melbourne 내의 승인된 동물 시설에 수용되었으며, 동물과 관련된 모든 실험은 St. Vincent's Hospital Melbourne의 동물 윤리위원회 (Animal Ethics Committee)의 승인을 받았다.

[0446] 온 (warm) *신장 허혈 재관류 손상 모델*

[0447] 마우스는 케타민 85 mg/kg 및 자일라진 15 mg/kg의 i.p. 투여로 마취되었다. 마우스를 마취시킨 후, 가열 패드에 올려 놓고 수술 중에 코어 체온을 37 ℃로 유지시켰다. 복부 중앙 절개 (midline abdominal incision) 가 이루어졌고 신장 페디클(renal pedicles)은 뭉뚝하게(bluntly) 해부되었다. 우측 신장 절제술 (right nephrectomy) 후, 미세 혈관 클램프 (Roboz, Rockville, MD)를 22 분 동안 좌측 신장 패디클에 놓고 동물을 인큐베이터에서 37 ℃로 유지하고 적절히 수화시켰다. 허혈 후에 클램프를 제거하고 신장이 완전한 재관류 되는지 관찰하였다. 수술 상처를 5-0 실크로 2층으로 봉합하였다. 이러한 과정 동안 따뜻한 정상 식염수 (100 ml/kg)를 복강 내로 주입하였다. 가열 램프 하에서 마우스를 2 시간 동안 회복시킨 후 가열 패드에 유지시켰다. 재관류 후 24 시간에 마우스를 안락사시키고, 혈액 및 신장 샘플을 수득하였다. 샴-작동 마우스 (Sham-operated mice)는 IR없이 오른쪽 신장 절제술만을 진행하였다.

[0448] *항체*

[0449] 항-마우스 G-CSFR (Ch5E2-VR81-mIgG1κ), 이소타입 대조군 (BM4, 마우스 이소타입 IgG1κ) 또는 항-C5 항체 (muBB5.1-mIgG1κ) (Rother et al. Nat Biotechnol. 2007)을 허혈을 시작하기 24 시간 전에 복강 내 0.2 ml PBS 중 100 μg/마우스로 주사하였다. 용량 적정 연구에서는, 항-마우스 G-CSFR (Ch5E2-VR81-mIgG1κ)을 허혈 24 시간 전에 복강 내 0.2 ml PBS 중 200 μg/마우스 또는 500 μg/ 마우스로 주사하였다. 이소타입 대조군은 최고 용량, 즉 500 μg/마우스로 주사되었다. VR81은 마우스 G-CSFR의 세포 외 도메인에 대해 생성된 마우스 단일클론 IgG1κ 항체이고, 기재된 바와 같이 G-CSFR에 대한 G-CSF 결합을 차단한다 (Campbell et al. Journal of Immunology, 197 (11) (2016) 4392-4402). 이와 관련하여, VR81은 본원 및 WO2012171057에 기재된 C1.2 및 C1.2G에 대한 마우스 대리항체 (mouse surrogate antibody)이다.

[0450] *신장기능평가*

[0451] 재관류 후 24 시간에 혈청 크레아티닌 및 혈청 또는 혈장 우레아를 측정하여 신장 기능을 평가하였다. 크레아티닌은 자페 방법 (Jaffe method)에 기초한 동역학적 비색 분석법을 사용하여 측정되었고, 로슈 (Roche) COBAS Integra 400 Plus 분석기에서 분석되었다. Cell Biolabs의 요소 분석 키트 (Urea Assay Kit)는 Berthelot 반응을 기반으로 한다. 우레아는 먼저 암모니아와 이산화탄소로 분해되며, 알칼리 현상액 (alkaline developer)과 추가로 반응하여 580-630 nm의 광학 밀도에서 표준 분광 광도계 플레이트 리더로 측정할 수 있는 청록색 산물을 생성한다.

[0452] *신장 조직학 및 점수*

[0453] 신장 조직 섹션 (4 mm)은 10 % 포르말린 고정 및 파라핀 포매된 후 H & E로 염색되었다. 조직학 점수는 반 정량적 방법에 의해 평가되었다 (Lu B et al. Nephrology 2008). 간단히 말해서, 최소 2 개의 섹션에서 각각의 피질 (cortex), 피질수질 접합부 (cortical-medullary junction) 및 수질 (medulla) 각각의 3 개의 HPF (high-power fields)를 블라인드 방식으로 평가하였다. 관 괴사 (tubular necrosis)의 정도를 등급화하고 수정된 점수 시스템을 사용하였다 : 0 = 정상 신장; 1 = 최소 (# 10 % 관련); 2 = 약함 (10-25 % 관련); 3 = 보통 (26-50 % 관련); 4 = 심함 (51-75 % 관련); 5 = 매우 심함 (.75 % 관련).

[0454] *보체 활성화 및 침착 (deposition)*

[0455] 마우스 혈장에서의 보체의 활성화는 제조사의 지시에 따라 마우스 C5a DuoSet ELISA 키트 (DY2150; R & D

Systems, Minneapolis, MN)를 사용하여 측정되었다. 신장 섹션에서 C5b-9의 침착을 면역 형광법으로 측정 하였다 (하기 참조).

[0456] *면역 형광*

[0457] 급속 동결 (Snap-frozen) 샘플을 5mm 두께의 섹션으로 절단하고, 공기 건조시킨 후, 즉시 분석하거나 추가 분석이 있을 때까지 280 ℃에서 보관하였다. 아세톤 및 수화로 고정한 후, 토끼 항-마우스 C9 Alexa 488 (Bioss Antibodies, Woburn, MA), 랫트 항-마우스 Ly-6GFITC (Hycult Bio-tech), 랫트 항-마우스 F4/80 FITC (Bio-Rad, Raleigh, NC) 또는 FITC-접합된 이소타입-매칭 대조군 Ab : 랫트 IgG1 (BD Biosciences, San Diego, CA)을 사용하여 절편을 염색 하였다. 형광/공 초점 현미경 (Nikon A1R)을 사용하여 슬라이드를 분석하였다. 가공 전 통합 밀도 (raw integrated density)로서 형광 강도의 정량화는 조작되지 않은 TIFF 이미지상에서 ImageJ 소프트웨어, 버전 10.2 (National Institutes of Health)를 사용하여 수행되었다.

[0458] *RNA 추출, 상보적 DNA 합성 및 정량적 실시간 중합 효소 연쇄 반응*

[0459] 냉동된 마우스 신장으로부터의 총 RNA는 제조사의 지침에 따라 PureLink RNA 미니 키트 (Life Technologies, Carlsbad, CA)를 사용하여 단리되었다. NanoDrop 분광 광도계 (NanoDrop Technologies, Oxfordshire, UK)를 사용하여 총 RNA 품질 및 양을 측정하였다. 0.5 ㎍ 올리고 (dT) 프라이머 및 1 ㎍ 랜덤 프라이머 (둘 다 Invitrogen, Carlsbad, CA)를 함유하는 50 ㎕ 반응 혼합물에서 1.0 ㎍ 총 RNA를 70 ℃에서 10분간 인큐베이션함으로써 제1 가닥 상보성 DNA 합성을 수행하였다. 이어서 10 mM dNTP, 300 U SuperScript III 재조합 리보뉴클레아제 억제제, 60 U RNaseOUT 재조합 리보뉴클레아제 억제제, 0.1 M DTT 및 5 제1 가닥 완충용액 (모두 Invitrogen)를 함유하는 50 μL 반응 혼합물을 첨가하였다. 역전사를 42 ℃에서 1 시간 동안 및 70 ℃에서 10분 동안 수행하였다. 상보적 DNA를 -20 ℃에서 저장 하였다. 제조사의 지침 (Applied Biosystem, Bedford, MA)에 따라 TaqMan Universal PCR Master Mix 시스템을 사용하여 실시간 중합 효소 연쇄 반응을 수행하였다.

[0460] *신장 분해 및 말초 혈액 준비*

[0461] 1/8 조각의 신장을 메스로 더 작은 조각으로 자르고, 이를 37 ℃에서 30 분 동안 진탕 조건하에 500ul 콜라게나제 타입 I (PBS 2mM EDTA 중 10 ug/ml)에서 분해시켰다. 조직 분해물을 70um 스트레이너를 통과시켜 세포를 단리시켰다. 적혈구를 RCRB 완충제 (156mM NH_4Cl, 11.9mM $NaHCO_3$, 0.097mM EDTA, pH7.3)를 사용하여 용해시켰다. 세포를 최종적으로 PBS 2mM EDTA에 재현탁시켰다.

[0462] 말초 혈액을 EDTA-코팅된 튜브에 수집하고, 적혈구를 RCRB 완충액 (상기와 같음)을 사용하여 용해시키고, 세포를 PBS 2mM EDTA에 재현탁시켰다.

[0463] *유세포 분석*

[0464] 신장 및 말초 혈액의 단일 세포 현탁액을 2mM EDTA와 함께 PBS에 재현탁시켰다. PE-접합된 항-마우스 Gr-1 (R86-8C5; BD Biosciences), 알로피코시아닌 Cy7- 접합된 항-마우스 Ly6G (1A8; BD Biosciences), FITC-접합된 항-마우스 CD11b (M1/70; BD Biosciences), PECy7-접합된 항-마우스 CD69 (H1.2F3; BD Biosciences), eFluor450-접합 된 항-마우스 CD62L (MEL-14; eBiosecience), 알로 피코시아닌-접합된 항-마우스 CD45.2 (104; eBioseciences)로 세포를 염색 하였다. 비특이적 결합을 감소시키기 위해 FcR 블록 항-마우스 CD16/32 (93; Biolegend)를 첨가하고 Fixable Live/Dead Yellow (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 죽은 세포를 배제시켰다. BD Cytofix Fixation buffer (BD Biosciences)를 사용하여 샘플을 밤새 고정한 다음 FlowJo 소프트웨어를 사용하여 BD Fortessa에서 분석하였다.

[0465] *통계 분석*

[0466] GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여 통계 테스트를 수행하였다. 다중 그룹은 post-test Bonferroni 보정과 함께 one-way ANOVA를 사용하거나 Dunn's multiple comparison test와 함께 ruskal-Wallis test를 사용하여 비교되었습니다. 두 그룹은 unpaired Student t test (two-tailed) 또는 Mann-Whitney U test를 사용하여 비교되었다. 결과는 평균±SEM으로 표시되었다. p 값 <0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0467] **실시예 2 : 온 신장 IRI 모델에서 G-CSF 신호 전달의 억제는 혈청 크레아티닌 및 혈장 우레아 농도를 감소시킨다**

[0468] 온 신장 허혈-재관류 손상 (IRI)된 마우스에서 G-CSF 신호 전달의 억제가 신장 손상을 감소시키는지 여부를 평가하기 위해, 혈청 크레아티닌 및 혈장 / 혈청 우레아 농도의 분석을 수행 하였다.

[0469] 100 ㎍의 항-G-CSFR 항체 (VR81) 로 처리된 마우스 (n = 8; 평균 ± SEM; 66.13 ± 25.18) 에서 100 ㎍의 이소타입 대조군 항체 처리된 마우스 (n = 8; 평균 ± SEM; 134.38 ± 20.57)와 비교하여 혈청 크레아티닌 농도의 현저한 감소가 관찰되었다 (도 1, 표 1).

[0470] 항-G-CSFR 항체 (VR81)로 처리된 마우스 (n = 8; 평균 ± SEM; 159.02 ± 44.42)에서 이소타입 대조군 항체 처리된 마우스 (n = 8; 평균 ± SEM; 292.49 ± 21.35)와 비교하여 혈장 우레아 농도의 현저한 감소가 관찰되었다 (도 2, 표 1). IRI 이전에 항-G-CSFR 항체 (VR81)로 처리된 마우스의 혈청 크레아티닌 및 혈장 우레아의 농도는 처리 또는 수술을 받지 않은 마우스 (sham)에서 관찰된 것과 비교할 만 하였다 (도 1 및 도2; 표 1). 또한, VR81로 처리된 마우스에서 혈청 크레아티닌 및 혈장 우레아의 농도는 항-C5 항체(BB5.1)로 처리된 마우스에서 관찰되는 바와 통계적으로 상이하지 않았다 (도 9 및 도 10).

표 1

[0471] 100㎍ 항-G-CSFR 항체 (VR81) 또는 이소타입 대조군 항체를 복강 내 (IP) 처리한 마우스의 혈청 크레아티닌 및 혈장 요소 수준 - 온 신장 IRI 모델

Mouse number	Treatment Group	Serum Creatinine (㎛ol/l)	Plasma Urea (mg/dL)
2276	Isotype control	183	324
2278	Isotype control	90	225
2279	Isotype control	208	373
2285	Isotype control	122	302
2286	Isotype control	85	295
2289	Isotype control	205	335
2290	Isotype control	55	185
2275	Isotype control	127	299
2277	anti-G-CSFR (VR81)	148	322
2280	anti-G-CSFR (VR81)	19	71
2281	anti-G-CSFR (VR81)	35	94
2282	anti-G-CSFR (VR81)	208	384
2283	anti-G-CSFR (VR81)	38	159
2284	anti-G-CSFR (VR81)	35	117
2287	anti-G-CSFR (VR81)	26	57
2288	anti-G-CSFR (VR81)	20	64

[0472] **실시예 3 : 온 신장 IRI 모델에서 G-CSF 신호 전달의 억제는 신장 조직에서 염증성 침윤을 감소시킨다**

[0473] 온 신장 허혈-재관류 손상 (IRI)된 마우스에 항-G-CSFR 항체 (VR81)의 투여 효과를 평가하기 위해, 신장 조직으로의 호중구 및 대식세포 침윤을 실시예 1에 따른 면역 형광 현미경 법에 의해 측정하였다.

[0474] 신장의 피질수질 접합부에서 관 간극(tubular interstitium) 내로의 호중구 및 대식세포의 침윤은 100 ㎍의 이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스에 비해 100 ㎍의 항-G-CSFR 항체 (VR81)로 처리된 마우스에서 유의하게 감소되었다. Sham 마우스에서는 침윤이 거의 없거나 전혀 관찰되지 않았다 (도 3 및 도 4). One-Way ANOVA (Bonferroni 보정과 함께) 유의성을 테스트하기 위해 사용되었다.

[0475] 별도의 실험에서, 500 ㎍의 이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스와 비교하여 200 ㎍ 및 500 ㎍의 VR81로 처리된 마우스에서도 호중구 및 대식세포의 침윤은 현저히 감소되었다 (표 2 및 도 5).

표 2

[0476] 신장의 피질수질 접합부(corticomedullary junctions)에서 관 간극 (tubular interstitium) 내의 호중구 및 대식세포 침윤 감소. D' Agostino & Pearson 옴니버스 정규성 테스트. VR81 vs Ab 대조군에 대한 One-Way ANOVA Kruskal-Wallis test, Dunn's Multiple Comparison Test (* p<0.05, ** p<0.01).

Treatment	Neutrophils (counts/HPF)	Macrophages (counts/HPF)
Sham	2.28±0.52	2.29±0.61
Ab control (500 ㎍)	51.0±6.40	52.0±3.38
VR81 (200 ㎍)	27.0±5.15	20.0±7.07

VR81 (500 μg)	8.17±1.99**	7.00±1.73*

[0477] **실시예 4 : 온 신장 IRI 모델에서 G-CSF 신호 전달의 억제는 신장 피질의 괴사를 감소시킨다**

[0478] 100 μg의 항-G-CSFR 항체 (VR81)로 처리된 마우스에서 온 신장 IRI 모델에서 신장 피질의 신장 손상을 평가 하였다. 관 괴사 (tubular necrosis)의 정도는 등급화되고 표 3과 같이 관 손상 (Tubular Injury, TI) 점수로 표시되었다. TI는 신장 관 손상 관련 (괴사 (necrosis), 캐스트 형성 (cast formation), 세포 팽창 (cell swelling) 및 확장(dilatation)) 백분율을 평가하는 두 독립적 오퍼레이터에 의해 치료군에 대한 정보 (knowledge) 없이 결정되었다.

[0479] 항-G-CSFR 항체 (VR81)로 처리된 마우스의 신장에서 감소된 관 손상 경향이 관찰되었다 (도 6; 마우스 당 2 개의 독립적 평가의 평균이 도시됨). Sham 마우스는 예상대로 관 손상을 보여주지 않았다.

표 3

[0480] 신장 피질에서의 괴사 세포의 백분율 및 이에 상응하는 관상 손상 (TI) 점수를 정의하는 참조 표.

Tubular Injury (TI) score	% tubular necrosis (cortex only)
0	Normal
1	<10
2	10-25
3	26-50
4	51-75
5	>75

[0481] **실시예 5 : 신장 조직에서의 KIM-1, NGAL, IL-6, IL-8Rβ/CXCR2, MCP-1 / CCL2, CXCL1, MIP-2/CXCL2, ICAM-1 및 C5aR mRNA 발현 - 온 신장 IRI 모델**

[0482] 초기 실험에서, 온 신장 IRI 모델에서 허혈/재관류 손상이 유발되기 24 시간 전에 마우스에 100 μg/마우스의 항-G-CSFR 항체 VR81을 주사하였다. 재관류 후, RNA를 신장으로부터 단리하고 실시예 1에 기재된 바와 같이 qRT-PCR에 적용하였다. KIM-1, NGAL, IL-6, IL-8Rβ/CXCR2, MCP-1/CCL2, ICAM-1, C5aR, IL-1β, TNFα, CXCL1, MIP-2/CXCL2 및 E-selectin의 mRNA 전사 수준을 결정하였다. 이들 유전자의 전사 수준을 정량하고 GAPDH에 대해 정규화 하였다.

[0483] 이소타입 대조군 항체로의 처리와 비교하여, 항-G-CSFR 항체 (VR81)의 100 μg/마우스 24 시간 처리는 NGAL, IL-6, IL-8Rβ/CXCR2, ICAM-1, C5aR, MIP-2/CXCL2, MCP-1/CCL2, E-selectin, 및 CXCL1 유전자 발현을 감소시켰다. 이들 데이터는 G-CSF 신호 전달의 억제가 IRI와 관련된 염증 반응을 감소시키는데 효과적임을 시사한다. 항-C5 항체 (BB5.1)로 처리된 마우스의 신장에서도 상기 유전자의 발현 감소와 유사한 패턴이 관찰되었다.

[0484] 초기 결과는 200 μg/마우스 또는 500 μg/마우스 용량의 VR81을 사용하여 재확인되었다. 표 4 및 도 7은 이소타입 대조군 항체로의 처리와 비교하여 500 μg/마우스 용량의 VR81 처리가 KIM-1, NGAL, IL-6, IL-8Rβ/CXCR2, ICAM-1, C5aR, MIP-2/CXCL2, MCP-1/CCL2, 및 CXCL1 의 발현을 유의하게 감소시켰음을 보여준다.

표 4

[0485] 200 μg 또는 500 μg의 VR81이 투여된 마우스의 신장 조직에서 케모카인 수용체 및 사이토카인의 상대적 발현. D'Agostino & Pearson 옴니버스 정규성 테스트. VR81 vs Ab 대조군에 대한 One-Way ANOVA Kruskal-Wallis test, Dunn's Multiple Comparison Test (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.005).

	KIM-1	NGAL	IL-6	CXCR2 /IL-8R	MCP-1 /CCL2	CXCL1	MIP-2 /CXCL2	ICAM-1	C5aR
Control (500ug)	343.4 ± 69.70	386 ± 83.32	1.42 ± 0.787	0.917 ± 0.173	1.195 ± 0.273	3.786 ± 0.410	1.38 ± 0.249	5.09 ± 0.936	2.44 ± 0.176
VR81 (200ug)	183.3 ± 48.6†	213.8 ± 83.03†	0.488 ± 0.258†	0.244± 0.159†	0.650 ± 0.112†	2.45 ± 0.597†	0.788 ± 0.169†	3.13 ± 0.748	1.45 ± 0.312

VR81 (500ug)	0.271 ± 0.076**	2.859 ± 0.583**	0.0207 ± 0.015**	0.141 ± 0.077**	0.005 ± 0.016**	0.168 ± 0.040***	0.016 ± 0.003***	1.40 ± 0.196**	0.435 ± 0.089***

[0486] **실시예 6 : G-CSF 신호 전달의 억제는 온 신장 IRI 모델에서 신장으로의 호중구 침윤을 감소시킨다**

[0487] 신장 호중구 ($CD11b^{+}Gr1^{+}$) 및 백혈구 ($CD11b^{-}Gr1^{-}CD45.2^{+}$)를 실시예 1에 기재된 방법에 따라 조직 분해 (tissue digestion) 및 유세포 분석법에 의해 계수하였다. 살아있는 세포의 백분율은 총 세포 군집 중 PI 염색에 기초하여 결정되었다.

[0488] 이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스와 비교하여 100 ㎍/마우스의 항-GCSFR 항체 (VR81) 또는 항-C5 항체 (BB5.1)로 처리된 마우스 (및 sham 마우스)의 신장에서 호중구 수가 감소된 것으로 관찰되었다 (도 8A). 말초 혈액 호중구 수는 모든 실험군에서 유사하게 나타났다 (도 8B).

[0489] 유사하게, 200 μg/마우스 또는 500 μg/마우스의 VR81로 처리된 마우스의 신장에서 이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스와 비교하여 호중구 수가 현저하게 감소하였다 (도 13A). 그러나, 이소타입 대조군 항체와 비교하여 말초 혈액에서 호중구의 현저한 감소는 관찰되지 않았다 (도 13B).

[0490] 이들 데이터는 항-G-CSFR 항체 (VR81)로의 처리가 신장으로의 호중구 침윤을 감소시키고 말초 혈액의 호중구 수에 유의하게 영향을 미치지 않음을 시사한다.

[0491] 모든 실험군 마우스 전반의 신장 또는 말초 혈액에서 호중구에 의한 CD69 또는 CD62L의 발현에서 유의미한 차이는 관찰되지 않았다.

[0492] 이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스와 비교하여 항-G-CSFR 항체 (VR81) 또는 항-C5 항체 (BB5.1)로 처리 된 마우스의 신장에서 백혈구 백분율 ($CD11b^{-}Gr1^{-}CD45.2$)에서 유의미한 차이가 관찰되지 않았다.

[0493] **실시예 7: 온 신장 IRI 모델에서 VR81 용량 적정**

[0494] 실시예 1에 기재된 온 신장 IRI 모델에서의 용량 적정 연구에서, 항-마우스 G-CSFR 항체 (VR81)를 200 ㎍/마우스 또는 50 0㎍/마우스의 용량으로 허혈-재관류 손상 24 시간 전에 주입하였다. 500 ㎍/마우스의 이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스는 대조군으로서 사용하였다.

[0495] 표 5 및 도 11과 12에 나타낸 바와 같이, 500 μg의 VR81로 처리된 마우스에서 혈청 크레아티닌 및 혈청 우레아 수준의 현저한 감소가 있었지만, 200 μg의 VR81 또는 500 μg의 이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스에서는 이러한 효과가 확인되지 않았다.

표 5

[0496] 200 μg 및 500 μg VR81/마우스를 투여한 마우스에서의 혈청 크레아티닌 및 우레아 수치. D'Agostino & Pearson 옴니버스 정규성 테스트. VR81 vs Ab 대조군에 대한 One-Way ANOVA Kruskal-Wallis 테스트, Dunn's Multiple Comparison Test. (* p <0.05, ** p <0.01).

	Creatinine (μM)	Urea (mg/dL)
Control (500ug)	127.3±19.5	507.7±75.2
VR81 (200ug)	116.0±38.5	344±94.2
VR81 (500ug)	22.4±1.0*	84.42±3.27**

[0497] **실시예 8 : G-CSF 신호 전달의 억제는 온 신장 IRI 모델에서 보체 C5 활성화 및 C5b-9 침착을 감소시킨다**

[0498] 온 신장 허혈-재관류 손상 (IRI)의 대상이 된 마우스에 대한 항-G-CSFR 항체 (VR81)의 투여 효과를 평가하기 위해, 보체 C5 활성은 마우스 C5a ELISA 키트를 사용하여 혈장에서 C5a를 분석함으로써 측정하였고, C5b-9 침착은 실시예 1에 따른 신장 섹션의 면역 형광 염색에 의해 측정하였다.

[0499] 표 6 및 도 14A에 나타낸 바와 같이 500 μg의 이소타입 대조군 항체로 처리 된 마우스와 비교하여, 500 μg의 VR81로 처리된 마우스에서 혈장 C5a 수준의 현저한 감소가 있었다.

[0500] 또한, 표 6 및 도 14B에 나타낸 바와 같이 500 ㎍의 이소타입 대조군 항체로 처리된 마우스와 비교하여, 500 ㎍

의 VR81로 처리된 마우스의 신장에서 C5b-9 침착이 상당히 감소되었다

표 6

[0501] 200 μg 또는 500 μg VR81로 처리된 마우스에서 보체 C5 활성화 및 C5b-9 침착 (* p <0.05, ** p <0.02, *** p <0.001 대 Ab 대조군).

Treatment	C5a (ng/mL)	C5b-9 deposition (RawIntDen)
Sham	2.93±0.26	$3.52\pm0.38x10^{5}$
Ab control (500 μg)	25±0.99	$1.14\pm0.17x10^{7}$
VR81 (200 μg)	17.31±1.95	$7.73\pm1.6x10^{6}$
VR81 (500 μg)	10.69±0.90	$4.31\pm0.78x10^{6}$

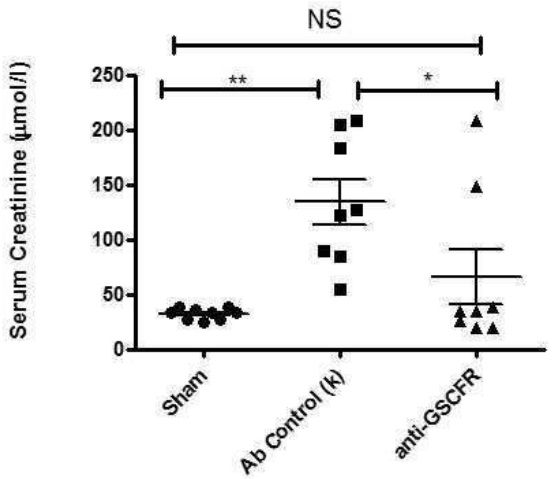
[0502] **실시예 9 : 허혈 1 시간 전 G-CSF 신호 전달 억제제의 투여는 온 (warm) 신장 IRI 모델의 신장 및 혈액에서 호중구의 빈도를 감소시킨다**

[0503] 온 신장 IRI 모델에서 허혈 1 시간 전 마우스에 항-G-CSFR 항체 (VR81)의 투여 효과를 평가하기 위하여, 신장 및 혈액에서 호중구의 빈도 (CD11b + Gr1 + Ly6G +)를 실시예 1에 기술된 방법에 따른 조직 분해 (tissue digestion) 및 유세포 분석법에 의해 측정하였다. 500 μg/마우스의 항-C5 항체, BB5.1을 비교를 위해 사용하였다.

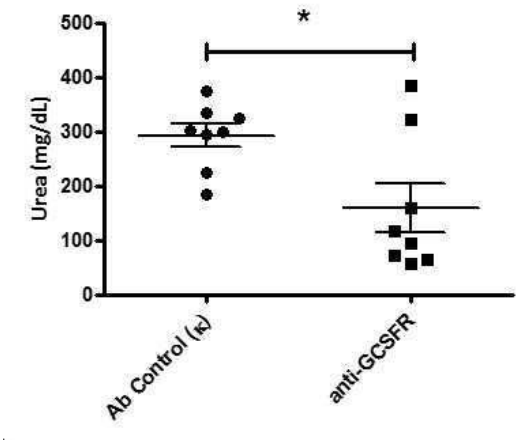
[0504] 허혈 1 시간 전에 500 μg/마우스의 항-G-CSFR 항체 VR81로 처리하면 이소타입 대조군 항체로의 처리와 비교하여 혈액 및 신장에서 호중구의 빈도가 유의하게 감소되었다 (도 15). 500 μg/마우스의 대조 항체 BB5.1 로의 처리는 이소타입 대조 항체로의 처리에 비해 신장에서 호중구의 빈도를 유의하게 감소시키지 않았다. 이 결과는 허혈 1 시간 전 G-CSF 신호 전달 억제제로의 치료가 허혈 24 시간 전에 치료하는 것만 큼 효과적이지는 않지만 (도 13), 혈액 및 신장에서 호중구 수를 상당히 감소시키기에 충분하다는 것을 입증한다.

도면

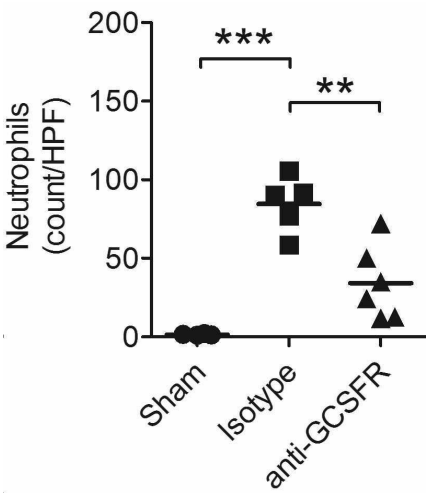
도면1



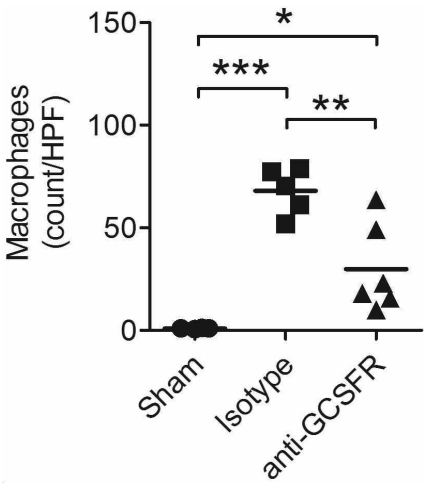
도면2


*
500
400
300
200
100
0
Urea (mg/dL)
Ab Control (κ)
anti-GCSFR

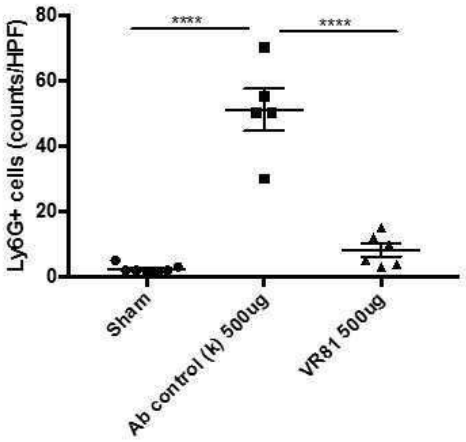
도면3


***
**
200
150
100
50
0
Neutrophils
(count/HPF)
Sham
Isotype
anti-GCSFR

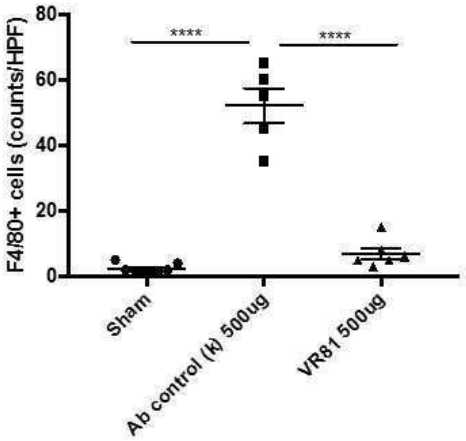
도면4


*
***
**
150
100
50
0
Macrophages
(count/HPF)
Sham
Isotype
anti-GCSFR

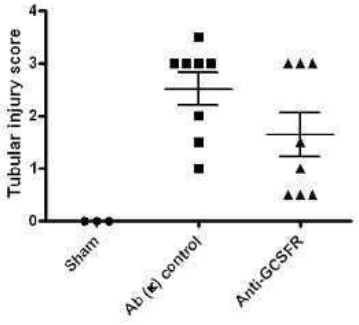
도면5a



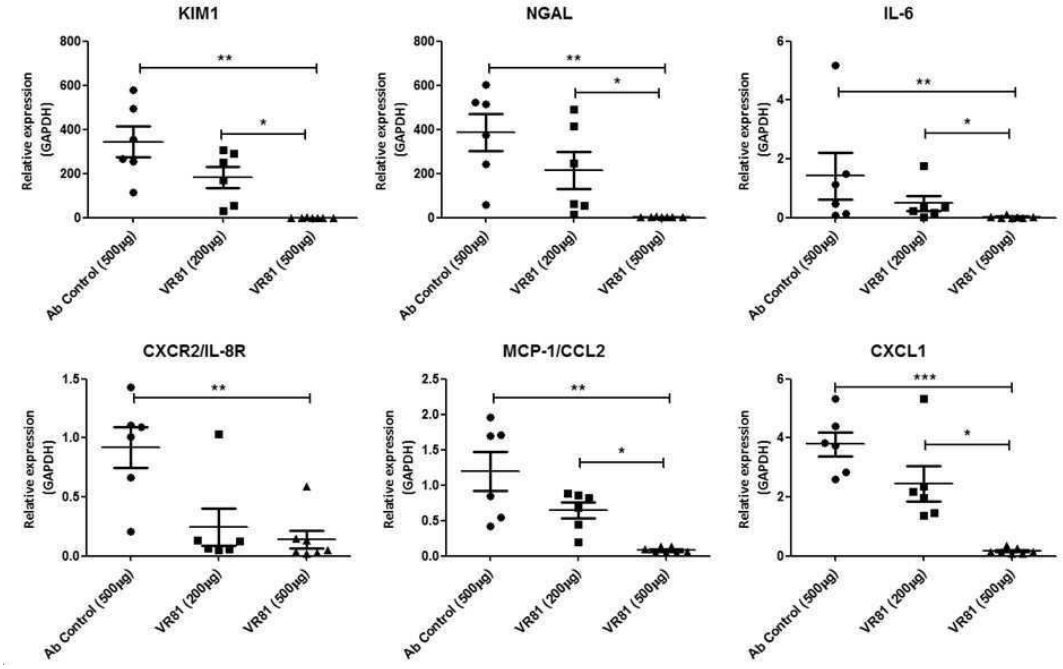
도면5b



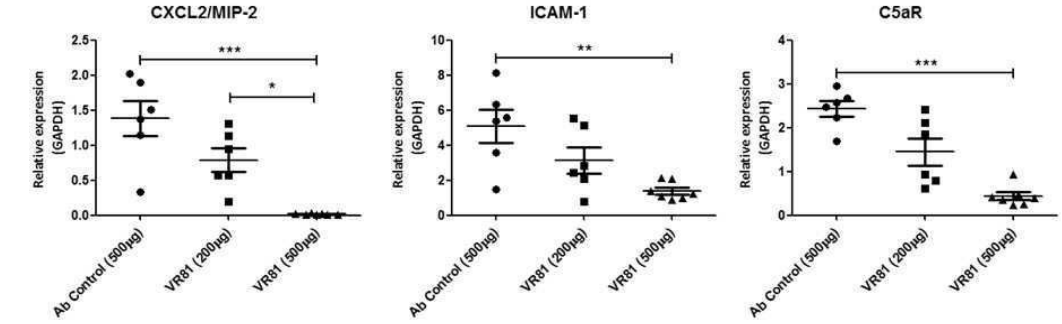
도면6



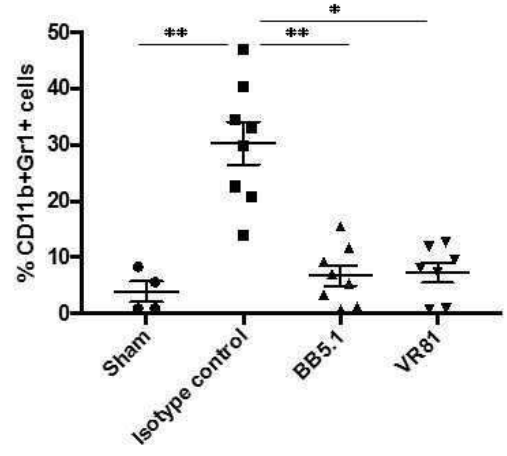
도면7a



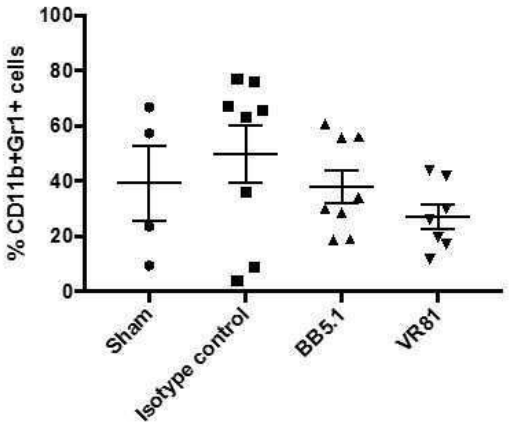
도면7b



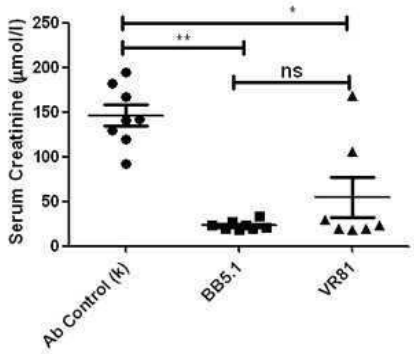
도면8a



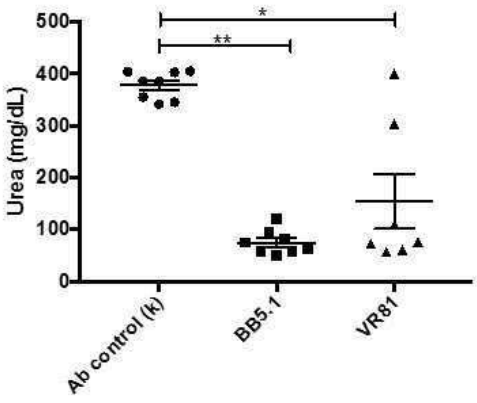
도면8b



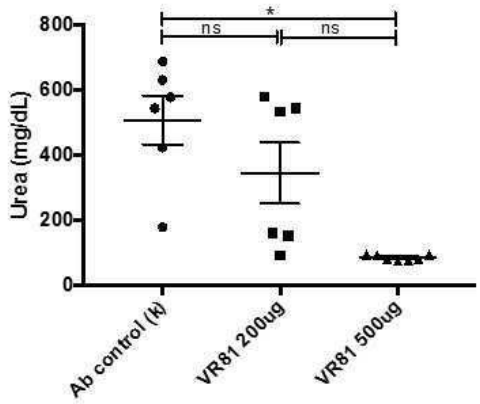
도면9



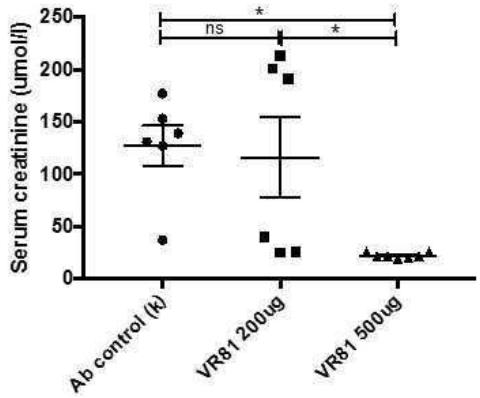
도면10



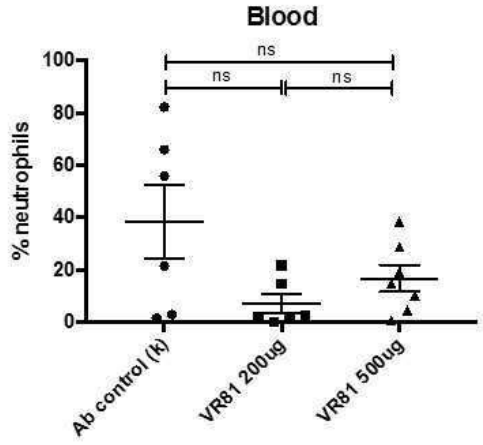
도면11



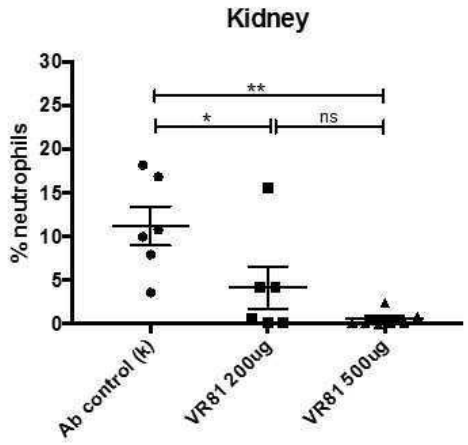
도면12



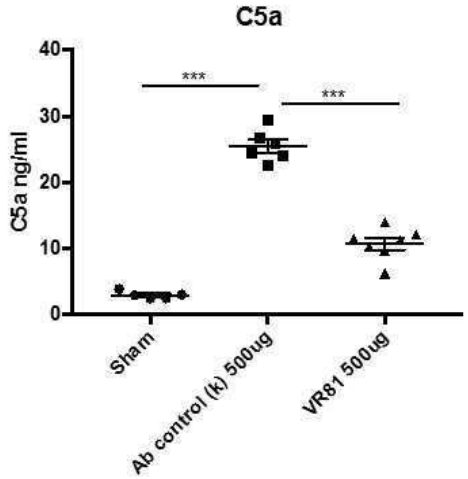
도면13a



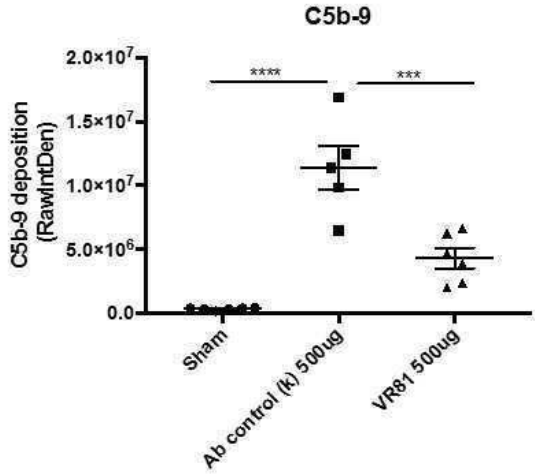
도면13b



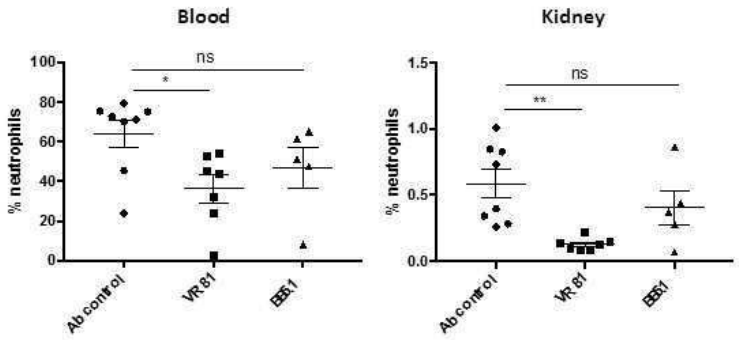
도면14a



도면14b



도면15



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> CSL Limited

<120> 524789

<130> METHOD OF TREATING OR PREVENTING ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 319

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> amino acids 25-335 of Homo sapiens G-CSFR (hG-CSFR) with a C-terminal polyhistidine tag

<400> 1

Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser Ala Pro Ile Val His Leu Gly Asp
1 5 10 15

Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp
20 25 30

Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly
35 40 45

Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile Thr
50 55 60

Leu Pro His Leu Asn His Thr Gln Ala Phe Leu Ser Cys Ala Leu Asn
65 70 75 80

Trp Gly Asn Ser Leu Gln Ile Leu Asp Gln Val Glu Leu Arg Ala Gly

85 90 95

Tyr Pro Pro Ala Ile Pro His Asn Leu Ser Cys Leu Met Asn Leu Thr

100 105 110

Thr Ser Ser Leu Ile Cys Gln Trp Glu Pro Gly Pro Glu Thr His Leu

115 120 125

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

130 135 140

Thr Gln Gly Asp Ser Ile Leu Asp Cys Val Pro Lys Asp Gly Gln Ser

145 150 155 160

His Cys Ser Ile Pro Arg Lys His Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Met Gly

165 170 175

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

180 185 190

Leu Cys Leu Asp Pro Met Asp Val Val Lys Leu Glu Pro Pro Met Leu

195 200 205

Arg Thr Met Asp Pro Ser Pro Glu Ala Ala Pro Pro Gln Ala Gly Cys

210 215 220

Leu Gln Leu Ser Trp Glu Pro Trp Gln Pro Gly Leu His Ile Asn Gln

225 230 235 240

Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro Gln Arg Gly Glu Ala Ser Trp Ala

245 250 255

Leu Val Gly Pro Leu Pro Leu Glu Ala Leu Gln Tyr Glu Leu Cys Gly

260 265 270

Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp

275 280 285

Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg

290 295 300

Thr Thr Glu Arg Ala Pro Thr His His His His His His His His

305 310 315

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VH of C1.2

<400> 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Tyr
20 25 30

Trp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Met Leu Gly Glu Leu Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VL of C1.2

<400> 3

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

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

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Leu Gln Asn Gly Ile 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 His Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Val Glu Ile Arg

100 105

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VH of C1.2G

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 5

<211> 107

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> VL of C1.2G

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr

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

85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> HCDR1 of C1.2

<400> 6

Leu Tyr Trp Met Gly
1 5

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> C1.2 HCDR2

<400> 7

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

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> C1.2 HCDR3

<400> 8

Leu Gly Glu Leu Gly Trp Phe Asp Pro

1 5

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> C1.2 LCDR1

<400> 9

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> C1.2 LCDR2

<400> 10

Ala Ser Asn Leu Gln Asn

1 5

<

210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> C1.2 LCDR3

<400> 11

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> consensus sequence of HCDR3 of C1.2

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> X is an amino acid selected from the group consisting of tryptophan, glutamine, methionine, serine, phenylalanine, glutamic acid and histidine

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> X iis an amino acid selected from the group consisting of phenylalanine, tyrosine, methionine, serine, glycine and isoleucine

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> X is an amino acid selected from the group consisting of aspartic acid, methionine, glutamine, serine, leucine, valine, arginine and histidine

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(8)

<223> X is an amino acid selected from the group consisting of proline gltuamic acid, alanine, leucine, phenylalanine, tyronis,

threonine, asparagine, aspartic acid, serine , glycine, arginine, lysine

<400> 12

Leu Gly Glu Leu Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> consensus sequence of LCDR3 of C1.2

<220><221> VARIANT

<222> (1)..(1)

<223> X is an amino acid selected from the group consisting of glutamine, glutamic acid, histidine, alanine or serine

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(2)

<223> X is an amino acid selected from the group consisting of glutamine, valine, phenylalanine, asparagine and glutamic acid

<220><221> VARIANT

<222> (3)..(3)

<223> X ian amino acid selected from the group consisting of serine or glycine

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(4)

<223> X is an amino acid selected from the group consisting of tryptophan, methionine, phenylalanine, tyrosine, isoleucine and leucine

<220><221> VARIANT

<222> (5)..(5)

<223> X is an amino acid selected from the group consisting of glutamic acid, methionine, glutamine, tryptophan, serine, valine, asparagine, glycine, alanine, arganine, histidine, tyrosine, lysine or threonine

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(6)

<223> X is an amino acid selected from the group consisting of tyrosine, methionine, isoleucine or threonine

<220><221> VARIANT

<222> (7)..(7)

<223> X is an amino acid selected from the group consisting of proline, alanine, histidine, glycine and lysine

<220><221> VARIANT

<222

> (8)..(8)

<223> X is an amino acid selected from the group consisting of leucine, glutamine, methionine, alanine, phenylalanine, isoleucine, lysine, histidine and glycine

<220><221> VARIANT

<222> (9)..(9)

<223> X is an amino acid selected from the group consisting of threonine, phenylalanine, tyrosine, methionine, lysine, serine, histidine, proline, tryptophan, isoleucine, glutamine, glycine and valine

<400> 13

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 14

<211> 445

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> C1.2G heavy chain IgG4 with S241P mutation

<400> 14

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Tyr
20 25 30

Trp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Leu Gly Glu Leu Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

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

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

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

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys

325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> artificial

<220><223> C1.2G with kappa light chain

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly 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

Ser 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> 16

<211> 836

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ala Arg Leu Gly Asn Cys Ser Leu Thr Trp Ala Ala Leu Ile Ile

1 5 10 15

Leu Leu Leu Pro Gly Ser Leu Glu Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser

20 25 30

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

35 40 45

Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp Pro Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg

50 55 60

Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly Gly Arg Gln Gln Arg Leu Ser Asp

65 70 75 80

Gly Thr Gln Glu Ser Ile Ile Thr Leu Pro His Leu Asn His Thr Gln

85 90 95

Ala Phe Leu Ser Cys Cys Leu Asn Trp Gly Asn Ser Leu Gln Ile Leu

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ser Cys Leu Met Asn Leu Thr Thr Ser Ser Leu Ile Cys Gln Trp

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Cys Val Pro Lys Asp Gly Gln Ser His Cys Cys Ile Pro Arg Lys His

180 185 190

Leu Leu Leu Tyr Gln Asn Met Gly Ile Trp Val Gln Ala Glu Asn Ala

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Ala Ala Pro Pro Gln Ala Gly Cys Leu Gln Leu Cys Trp Glu Pro Trp

245 250 255

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

260 265 270

Gln Arg Gly Glu Ala Ser Trp Ala Leu Val Gly Pro Leu Pro Leu Glu

275 280 285

Ala Leu Gln Tyr Glu Leu Cys Gly Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr

290 295 300

Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp

305 310 315 320

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

325 330 335

Arg Leu Asp Thr Trp Trp Arg Gln Arg Gln Leu Asp Pro Arg Thr Val

340 345 350

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

355 360 365

Gln Gly Tyr Val Val Ser Trp Arg Pro Ser Gly Gln Ala Gly Ala Ile

370 375 380

Leu Pro Leu Cys Asn Thr Thr Glu Leu Ser Cys Thr Phe His Leu Pro

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Thr Arg Leu His Ala Met Ala Arg Asp Pro His Ser Leu Trp Val Gly

435 440 445

Trp Glu Pro Pro Asn Pro Trp Pro Gln Gly Tyr Val Ile Glu Trp Gly

450 455 460

Leu Gly Pro Pro Ser Ala Ser Asn Ser Asn Lys Thr Trp Arg Met Glu

465 470 475 480

Gln Asn Gly Arg Ala Thr Gly Phe Leu Leu Lys Glu Asn Ile Arg Pro

485 490 495

Phe Gln Leu Tyr Glu Ile Ile Val Thr Pro Leu Tyr Gln Asp Thr Met

500 505 510

Gly Pro Ser Gln His Val Tyr Ala Tyr Ser Gln Glu Met Ala Pro Ser

515 520 525

His Ala Pro Glu Leu His Leu Lys His Ile Gly Lys Thr Trp Ala Gln

530 535 540

Leu Glu Trp Val Pro Glu Pro Pro Glu Leu Gly Lys Ser Pro Leu Thr

545 550 555 560

His Tyr Thr Ile Phe Trp Thr Asn Ala Gln Asn Gln Ser Phe Ser Ala

565 570 575

Ile Leu Asn Ala Ser Ser Arg Gly Phe Val Leu His Gly Leu Glu Pro

580 585 590

Ala Ser Leu Tyr His Ile His Leu Met Ala Ala Ser Gln Ala Gly Ala

595 600 605

Thr Asn Ser Thr Val Leu Thr Leu Met Thr Leu Thr Pro Glu Gly Ser

610 615 620

Glu Leu His Ile Ile Leu Gly Leu Phe Gly Leu Leu Leu Leu Leu Thr

625 630 635 640

Cys Leu Cys Gly Thr Ala Trp Leu Cys Cys Ser Pro Asn Arg Lys Asn

645 650 655

Pro Leu Trp Pro Ser Val Pro Asp Pro Ala His Ser Ser Leu Gly Ser

660 665 670

Trp Val Pro Thr Ile Met Glu Glu Asp Ala Phe Gln Leu Pro Gly Leu

675 680 685

Gly Thr Pro Pro Ile Thr Lys Leu Thr Val Leu Glu Glu Asp Glu Lys

690 695 700

Lys Pro Val Pro Trp Glu Ser His Asn Ser Ser Glu Thr Cys Gly Leu

705 710 715 720

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

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

Arg Cys Asp Ser Thr Gln Pro Leu Leu Ala Gly Leu Thr Pro Ser Pro

770 775 780

Lys Ser Tyr Glu Asn Leu Trp Phe Gln Ala Ser Pro Leu Gly Thr Leu

785 790 795 800

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

805 810 815

Leu Asn Phe Pro Leu Leu Gln Gly Ile Arg Val His Gly Met Glu Ala
820 825 830
Leu Gly Ser Phe
835

<210> 17

<211> 319
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> Ig and CRH domains of Macaca fascicularis G-CSFR (cynoG-CSFR) with a C-terminal polyhistidine tag

<400> 17
Glu Cys Gly His Ile Ser Val Ser Ala Pro Ile Val His Leu Gly Asp
1 5 10 15
Pro Ile Thr Ala Ser Cys Ile Ile Lys Gln Asn Cys Ser His Leu Asp
20 25 30
Leu Glu Pro Gln Ile Leu Trp Arg Leu Gly Ala Glu Leu Gln Pro Gly
35 40 45

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

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

165 170 175

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

Lys Cys Glu Leu Arg His Lys Pro Gln Ser Gly Glu Ala Ser Trp Ala
245 250 255
Leu Val Gly Pro Leu Pro Leu Glu Ala Leu Arg Tyr Glu Leu Cys Gly
260 265 270
Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp
275 280 285
Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asn Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg
290 295 300

Thr Thr Glu Arg Ala Pro Thr His His His His His His His His
305 310 315

<210> 18
<211> 444
<212> PRT
<213> artificial
<220><223> C1.2G heavy chain IgG4 with S241P mutation and lacking C-terminal lysine residue
<400> 18
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Tyr
20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser

195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys

210 215 220

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

225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu

245 250 255

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

260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320
Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435 440