



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0088852
(43) 공개일자 2009년08월20일

(51) Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01) C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7006592

(22) 출원일자 2007년09월05일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년03월31일

(86) 국제출원번호 PCT/US2007/019652

(87) 국제공개번호 WO 2008/030611

국제공개일자 2008년03월13일

(30) 우선권주장

60/824,596 2006년09월05일 미국(US)

(71) 출원인

메다렉스, 인코포레이티드

미국 08540-1437 뉴저지주 프린스턴 스테이트 로드 707

(72) 발명자

짐마만, 데보라

미국, 94131 캘리포니아, 오크랜드, 애스핀월 로드 6262

셀비, 마크

미국, 94131 캘리포니아, 샌프란시스코, 게일우드 씨클 136

(뒷면에 계속)

(74) 대리인


조용식

전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 골형성 단백질의 항체와 이의 수용체 및 이의 사용방법

(57) 요약

본 발명은 고 친화도로 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 특이적으로 결합하는 분리된 단일 클론성 항체, 특히 인간 단일클론성 항체를 제공한다. 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자, 본 발명의 항체를 발현하기 위한 발현 벡터, 숙주 세포 및 방법이 또한 제공된다. 또한, 본 발명의 항체 및 조건적으로 하나 이상의 추가 치료제를 포함하는, 면역접합체, 이중특이성 분자 및 약학 조성물이 제공된다. 본 발명은 또한, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 의해 매개되는 비정상적 골형성 및 골화와 연관된 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1a

(72) 발명자

스리니바산, 모한

미국, 95129 캘리포니아, 산 호세, 알링تون 레인
1044

벨, 알라스데어

미국, 94041 캘리포니아, 마운틴 뷰, 에이피티.
2135, 하이스쿨 웨이 900

싱, 수자타

미국, 95070 캘리포니아, 사라토가, 말로리 코트
19942

쎄울리스, 리챠드, 쥬니어

미국, 95060 캘리포니아, 산타 크루즈, 내셔널 스
트리트 407

레블랑크, 헤이디, 엔.

미국, 94041 캘리포니아, 마운틴 뷰, 쳐치 스트리
트 649

젠스, 키라, 디.

미국, 94040 캘리포니아, 마운틴 뷰, 에이피티.
38, 더블유 엘 카미노 리얼 100

스프로울, 티모씨, 윌리암

미국, 94550 캘리포니아, 리버모어, 알덴 레인 673

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 32에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 35에 나타낸 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체에 의해 인식되는, 인간 BMP2 또는 BMP4 상의 에피토프와 결합하는, 분리된 단일클론성 항체 또는 이의 항원 결합부, 항체 단편 또는 항체 의태체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 이소타입의 전장(full-length) 항체임을 특징으로 하는 분리된 항체.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 항체는 온전한 항체, 항체 단편, 인간화된 항체, 단일 사슬 항체, 면역접합체, 탈퓨코실화된 항체 및 이중 특이성 항체로 구성되는 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 분리된 항체.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 단편은 유니바디(UniBody), 도메인 항체, 및 나노바디(Nanobody)로 구성되는 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 항체 단편.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 의태체는 어피바디(Affibody), 디에이알핀(DARPin), 안티칼린, 아비머(Avimer), 베르사바디(Versabody) 및 듀오칼린(Duocalin)으로 구성되는 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 항체 의태체.

청구항 6

제 3 항에 있어서,

상기 면역접합체는 치료제를 포함함을 특징으로 하는 면역접합체.

청구항 7

제 3 항에 있어서,

상기 치료제는 세포독소 또는 방사능 동위원소임을 특징으로 하는 면역접합체.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

상기 항체는 인간 BMP2 또는 BMP4에 5.5×10^{-9} M 이하의 K_D 로 결합함을 특징으로 하는 분리된 항체.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 항체는 인간 BMP2 또는 BMP4에 3×10^{-9} M 이하의 K_D 로 결합함을 특징으로 하는 분리된 항체.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 항체는 인간 BMP2 또는 BMP4에 2×10^{-9} M 이하의 K_D 로 결합함을 특징으로 하는 분리된 항체.

청구항 11

제 1 항의 분리된 항체 또는 이의 항원-결합부 및 약학적 허용 담체를 포함하는 조성물.

청구항 12

제 1 항의 분리된 항체 또는 이의 항원-결합부의 중쇄 또는 경쇄를 암호화하는 분리된 핵산 분자.

청구항 13

제 12 항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 14

제 13 항의 발현벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 15

a) 제 1 항의 항체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자를 함유하는 숙주세포를 수득하는 단계;

b) 상기 숙주 세포를 숙주 세포 배양액에서 성장시키는 단계;

c) 하나 이상의 핵산 분자가 발현되는 숙주 세포 배양 조건을 제공하는 단계; 및

d) 상기 숙주세포로부터 또는 상기 숙주세포 배양액으로부터 상기 항체를 회수하는 단계;

를 포함하는 항-BMP2 또는 항-BMP4 항체를 제조하는 방법.

청구항 16

대상체에, 항-BMP2 또는 항-BMP4 항체, 또는 이의 항원-결합부를 상기 질병을 치료하거나 예방하기에 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함하는 비정상적인 골형성 및 골화와 관련된 질병을 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 17

제 14 항에 있어서,

상기 질병은 진행성 골화성 섬유이형성증(FOP), 진행성 골이형성증(POH), 척수손상, 근육내 혈종, 정형외과 수술로부터 나타나는 합병증, 건선성 관절염, 골관절염, 강직성 척추염 (AS), 혈청반응음성 관절증, 골격 골형성 과다증, 이경화증, 등자골 강직증, 골암, 전립선암, 뼈돌출증, 죽상경화증, 판막성 심장 질환으로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 18

제 16 항에 있어서,

상기 질병은: 골암, 전립선암, 폐암, 흑색종, 혈액암, 신장암, 및 유방암으로 구성되는 군으로부터 선택되는 암임을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

a. 서열번호 33에 나타낸 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열번호 36에 나타낸 경쇄 가변 영역 아미노산 서열;

b. 서열번호 34에 나타낸 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열번호 37에 나타낸 경쇄 가변 영역 아미노산 서열;

c. 서열번호 56에 나타낸 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열번호 64에 나타낸 경쇄 가변 영역 아미노산 서열;

- d. 서열번호 57에 나타낸 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열번호 65에 나타낸 경쇄 가변 영역 아미노산 서열;
- e. 서열번호 58에 나타낸 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열번호 66에 나타낸 경쇄 가변 영역 아미노산 서열;
- f. 서열번호 59에 나타낸 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열번호 67에 나타낸 경쇄 가변 영역 아미노산 서열;
- g. 서열번호 60에 나타낸 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열번호 68에 나타낸 경쇄 가변 영역 아미노산 서열;
- h. 서열번호 61에 나타낸 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열번호 69에 나타낸 경쇄 가변 영역 아미노산 서열;
- i. 서열번호 62에 나타낸 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열번호 70에 나타낸 경쇄 가변 영역 아미노산 서열; 및
- j. 서열번호 63에 나타낸 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열번호 71에 나타낸 경쇄 가변 영역 아미노산 서열;

로 구성되는 군으로부터 선택된 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체에 의해 인식되는 인간 BMP2 또는 BMP4 상의 에피토프에 결합하는, 분리된 단일클론성 항체 또는 이의 항원 결합부, 항체 단편 또는 항체의 태체.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

상기 항체는 온전한 항체, 항체 단편, 인간화된 항체, 단일 사슬 항체, 면역접합체, 탈퓨코실화된 항체 및 이중 특이성 항체로 구성되는 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 분리된 항체.

청구항 21

제 19 항에 있어서,

상기 단편은 유니바디(UniBody), 도메인 항체, 및 나노바디(Nanobody)로 구성되는 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 항체 단편.

청구항 22

제 19 항에 있어서,

상기 의태체는 어피바디(Affibody), 디에이알핀(DARPin), 안티칼린, 아비머(Avimer), 베르사바디(Versabody) 및 듀오칼린(Duocalin)으로 구성되는 군으로부터 선택됨을 특징으로 하는 항체 의태체.

청구항 23

제 19 항의 분리된 항체 또는 이의 항원-결합부 및 약학적 허용 담체를 포함하는 조성물.

청구항 24

제 19 항의 분리된 항체 또는 이의 항원-결합부의 중쇄 또는 경쇄를 암호화하는 분리된 핵산 분자.

청구항 25

제 24 항의 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터.

청구항 26

제 25 항의 발현벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 27

제 1 항 또는 제 19 항의 항체 또는 이의 항원 결합부를 발현하는 하이브리도마.

청구항 28

- a. 인간 면역글로불린 유전자를 포함하는 유전자이식 동물을 BMP2 또는 BMP4 펩티드로 면역화시키는 단계;
 - b. 상기 유전자이식 동물로부터 B-세포를 회수하는 단계;
 - c. 상기 B-세포로부터 하이브리도마를 만드는 단계;
 - d. BMP2 또는 BMP4에 결합하는 항체를 발현하는 하이브리도마를 선택하는 단계; 및
 - e. BMP2 또는 BMP4에 결합하는 상기 항체를 상기 선택된 하이브리도마로부터 회수하는 단계;
- 를 포함하는 제 1 항 또는 제 19 항의 항체를 제조하는 방법.

청구항 29

- a. 인간 면역글로불린 유전자를 포함하는 유전자이식 동물을 BMP2 또는 BMP4 펩티드로 면역화시키는 단계;
 - b. mRNA를 상기 유전자이식 동물의 B 세포로부터 회수하는 단계;
 - c. 상기 mRNA를 cDNA로 전환시키는 단계;
 - d. 상기 cDNA를 파지에서 발현시켜 상기 cDNA에 의해 암호화되는 항-BMP2 또는 항-BMP4 항체를 상기 파지의 표면상에 제시하는 단계;
 - e. 항-BMP2 또는 항-BMP4 항체를 제시하는 파지를 선택하는 단계;
 - f. 핵산 분자를 상기 항-BMP2 또는 항-BMP4 면역글로불린을 암호화하는 상기 선택된 파지로부터 회수하는 단계;
 - g. 상기 회수된 핵산 분자를 숙주세포에서 발현시키는 단계; 및
- 상기 숙주세포로부터 BMP2 또는 BMP4에 결합하는 항체를 회수하는 단계;
- 를 포함하는 항-BMP2 또는 항-BMP4 항체를 제조하는 방법.

명세서

기술분야

<1>

본 발명은 일반적으로 면역학 및 분자 생물학 분야에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 골 형성 단백질 (bone morphogenic proteins, BMPs)에 대한 항체 및 다른 치료적 단백질과 이의 수용체, 그러한 항체와 치료적 단백질을 암호화하는 핵산, 본 발명의 단일클론성 항체와 다른 치료적 단백질을 제조하는 방법, BMP 발현/활성에 의해 매개되고 및/또는 이의 수용체의 비정상적인 발현/활성과 연관이 있는 골질환 및 암과 같은 질병을 치료하는 방법이 제공된다.

배경기술

<2>

<관련 출원의 상호 참조>

<3>

본 출원은 2006년 9월 5일자로 출원된 미국 임시 출원 일련 번호 60/824,596의 우선권을 청구하며, 이는 그 전체로 본 출원서에 참조문헌으로 기입된다.

<4>

인체 골격은 200 개가 넘는 관절 뼈를 포함하고 있다. 배아형성 기간동안, 시간적 및 공간적 형성을 지시하는 유전적 프로그램에 따라서 미분화된 중간엽으로부터 골격이 발달된다. 건강체에서의 후천적 발생에서는, 새로운 골격 요소가 골절 위치에서 골재생을 통해 시작한다.

<5>

골격 형성의 정상적인 조절에서의 변화는, 연질-조직에서의 뼈의 비정상적 형성으로 나타날 수 있다. Shafritz 등., *N. Engl. J. Med.* 335:555-561 (1996) 및 Kaplan 등., *J. Am. Acad. Orthop. Surg.* 2:288-296 (1994). 극단의 경우, 이소성골화 (heterotopic ossification)라고도 지칭되는, 그러한 비정상적 뼈 형성은, 이는 환자의 삶의 질을 극적으로 악화시킬 수 있는 임상적으로 심대하거나 황폐한 결과로 이어질 수 있다. 이소성 골화의 원인은 다양하며, 및 중추신경계 또는 연질 조직의 상해를 통해 나타날 수 있다; 혈관질환 (예, 죽상동맥경화증

및 판막성 심장 질환); 및 관절증 (예, 강직성 척추염, 건선성 관절염, 혈청반응음성 관절증, 및 미만성 특발성 골격성 과골화증). 다른 경우에서, 이소성 골화는 진행성 골화성 섬유이형성증(fibrodysplasia ossificans progressiva) 또는 진행성골화 (progressive osseous heteroplasia)와 같은 유전적 원인을 통해 발생될 수 있다. Kaplan 등에 의해 검토됨, "Heterotopic Ossification" *J. Amer. Acad. of Orth. Surg.* 12(2):116-125 (2004).

<6> 척추관절염(SpA)들은 모두, 척추 염증, 심대한 통증 및 기능적 불능으로 특징지워지는 일단의 질병들을 지칭한다; 이러한 질병들은 환자의 삶의 질에 커다란 충격을 가한다. Braun 등, *Arthritis Rheum.* 41:58-67 (1998); Zink 등, *J. Rheumatol.* 27:613-622 (2000); 및 Dagfinrud 등, *Ann. Rheum. Dis.* 63:1605-1610 (2004). SpA는 예를 들어, 강직성 척추염, 건선성 척추관절염, 반응성 척추관절염, 염증성 장질환과 연관된 척추관절염, 및 미분화된 척추관절염과 같은 쇠약성 질환을 포함한다.

<7> 강직성 척추염(AS) 및 관련 척추관절증은 가장 공통적인 염증성 류마티스성 질환들이다. 미국 및 북유럽에서는, 이러한 질환들은 20 내지 40 대에 주로 발병하며, 약 0.1% 내지 0.3%의 추정되는 유병율로 나타나고 있다. Khan, "A Worldwide Overview: The Epidemiology of HLA-B27 and Associated Spondyloarthritides," (Oxford: Oxford University Press (1998)) 및 Saraux 등, *J. Rheumatol.* 26:2622-2627 (1999). AS의 특징적인 임상 특성은 통상 천장골염과 골부착부염(enthesitis)에 의해 유발되는 염증성 허리 통증을 포함한다. AS는 통상적으로 축골격(몸통뼈대)를 포함하나, 말초관절들(어깨 및 엉덩이)과 관절외(extra-articular) 구조에 영향을 줄 수 있다.

<8> 강직성 척추염을 앓고 있는 환자는 인대돌기(syndesmophytes) 및 관절 강직(ankylosis)으로 유도되는 새로운 뼈 형성으로 인하여 극심한 척추 통증을 겪는다. AS는 따라서 이소성 골화를 동반하는 다중 질환의 하나이다. Gladman 등, *Arthritis Rheum.* 50:24-35 (2004) 및 Edmunds 등, *J. Rheumatol.* 18:696-698 (1991). 점점 많은 증거들이, AS에서, 섬유부착부로 지칭되는, 힘줄과 인대가 뼈아래 부착되는 해부학적 영역이 병리학적 과정의 일차 타겟이라고 제시하고 있다. Ball, *Ann. Rheum. Dis.* 30:213-223 (1971) 및 Benjamin 및 McGonagle, *J. Anat.* 199:503-526 (2001).

<9> 강직성 척추염 및 관련 척추관절증에 대한 동물 모델 시스템이 설명되어 왔고, 이의 대부분은 AS와 인간 백혈구 항원-B27(HLA-B27) 발현 간의 밀접한 연관 관계에 기초하고 있다. Zhang 등의 검토, *Current Rheum. Reports* 4:507-512 (2002). HLA-B27 트랜스유전자(transgene)를 래트에 도입하면 척추염을 포함하는 다중 시스템 질환으로 자연적으로 발전한다. Hammer 등, *CeII* 63:1099-1112 (1990). HLA-B27 유전자이식(transgenic) 마우스(C57BL/10)들은, 비록 척추는 영향을 받지 않지만, 발목관절 또는 족관절의 진행성 강직을 가지는 말초관절염을 나타낸다. Weinreich 등, *Hum. Immunol.* 42:103-115 (1995). 프로테오글리칸 어그리칸 및 베르시칸의 G1 도메인들 중 어느 하나에 대하여 면역화하면 BALB/c 마우스에서, 척추염, 천장골염, 및 골부착부염을 포함하는 AS-유사 (AS-like) 병리를 유도할 수 있다. Giant 등, *Arthritis Rheum.* 30:201-212 (1987) 및 Shi 등, *Arthritis Rheum.* 44:S240 (2001). DBA/1 마우스는 관절염, 강직성 골부착부염 및 비정상적인 골 형성의 자연적 모델이다. Lories 등., *J. Clin. Invest.* 115(6):1571-9 (2005). 매트릭스 GLA 단백질이 부족한 마우스는 동맥 및 연골의 자연적 석회화를 보이는 것으로 나타나고 따라서 혈관성 석회화에 대한 모델 시스템으로서 사용된다. Luo 등, *Nature* 386:78-81 (1997).

<10> 골형성 단백질들(BMPs)은 형질전환 성장 인자 β (TGF β) 상과(superfamily)의 일원인 다기능 성장인자들이다. BMP 신호전달은, 심장, 신경 및 연골 발생에는 물론 후천적 골 형성에서 중요한 역할을 하고 있다. BMP들은 연쇄적(cascade) 연골내 골형성을 이소적으로(ectopically) 유도하고 및 골격 및 관절 형태발생에 결정적인 역할을 한다. Urist, *Science* 150:893-899 (1965); Olsen 등, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:191-220 (2000); Kronenberg, *Nature* 423:332-336 (2003); Thomas 등, *Nat. Genet.* 12:315-317 (1996); Thomas 등, *Nat. Genet.* 17:58-64 (1997); Polinkowsky 등, *Nat. Genet.* 17:18-19 (1997); 및 Storm 등., *Nature* 368:639-643 (1994).

<11> BMP 군(family)의 약 20 개 구성체가 확인되었다. BMP들은 타입 I 및 II 둘 다를 포함하는 세린/트레오닌 키나제 수용체를 통해 신호전달한다. 세가지의 타입 I 수용체들은 BMP 리간드들과 결합한다 (타입 IA 및 IB BMP 수용체들 및 타입 I 액티빈 수용체 (ActRI). Koenig 등, *Mol. Cell. Biol.* 14:5961-5974 (1994) 및 Ten Dijke 등, *J. Biol. Chem.* 269:16985-16988 (1994); 및 Macias-Silva 등, *J. Biol. Chem.* 273:25628-25636 (1998). BMP들은 커다란 이량성 전구-단백질로서 세포질에서 합성되고 접히며 분비시 단백질 분해효소에 의해 절단된다. 각 단량체들은 전구단백질로서 300 아미노산을 포함하고 있다. 관능성 카르복시 부위(각 단량체에서 100-120 아

미노산)가 세포외 구역으로 분비되어 타겟 세포 상의 세포막 수용체와 결합한다. 비록 BMP들의 이량화는 두 개 서브유닛 간의 수 개 이황화 결합에 달려있지만, 이량화 및 절단의 정확한 생화학적 특성이 규명되어야 한다. 추가로, BMP들의 기능을 길항하거나 또는 다르게 변경시키는 일련의 세포외 단백질이 있는 것으로 나타난다; 이러한 단백질들은 글리피칸(Glycan)-3, 노긴(Noggin), 코르딘(Chordin), 세르비러스(Cerberus), 및 폴리스타틴(Follistatin)을 포함한다. Fainsod 등, *Mech. Dev.* 63:39-50 (1997); Grisaru 등, *Dev. Biol.* 231:31-46 (2001); Holley 등, *CeII* 86:607-617 (1996); Iemura 등, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 95:9337-9342 (1998); Jackson 등, *Development* 124:4113-4120 (1997); Paine-Saunders 등, *Dev. Biol.* 225:179-187 (2000); Piccolo 등, *CeII* 86:589-598 (1996); Re'em-Kalma 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:12141-12145 (1995); Sasai 등, *Nature* 376:333-336 (1995); 및 Zimmerman 등, *CeII* 86:599-606 (1996). BMP 들에 대한 세 가지 타입 II 수용체들이 동정되었다 (즉, BMPRI, ActRII 및 ActRIIB). Yamashita 등, *J. Cell. Biol.* 130:217-226 (1995); Rosenzweig 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:7632-7636 (1995); Kawabata 등, *J. Biol. Chem.* 270:5625-5630 (1995).

<12> 상기 타입 I 및 II BMP 수용체들은 다양한 조직에서 차등적으로 발현되지만, 아직 둘 다는 신호 전달에 필수적이다. 리간드 결합시, 상기 타입 I 및 II BMP 수용체들은 이종사량성(heterotetrameric)-활성화된 수용체 복합체들을 형성하고 이들은 두 쌍의 타입 I과 II 수용체 복합체들을 포함한다. Moustakas 및 Heldi, *Genes Dev.* 16:67-87 (2002). 양쪽 수용체 타입들은 신호전달에 필수적이다. Hogan, *Genes Dev.* 10:1580-1594 (1996); Nellen 등, *CeII* 78:225-237 (1994); Ruberte 등, *CeII* 80:889-897 (1995); ten Dijke 등, *Curr. Opin. Cell Biol.* 8:139-145 (1996); Weis-Garcia 및 Massague, *EMBO J.* 15:276-289 (1996); 및 Wrana 등, *Nature* 370:341-347 (1994). 타입 II 수용체들은 리간드 결합시 타입 I 수용체들을 인산화시키는, 상시 (constitutively) 활성화 키나제 활성을 가진다. 인산화된 타입 I 수용체들은 신호를 하류 타겟 단백질로 전달한다.

<13> 타입 I BMP 수용체들은 Smad 단백질들(smad 1/5)을 통해 신호를 전달하는 데, 이 단백질들은 BMP 신호를 상기 수용체에서 핵 내의 타겟 유전자로 중계하는 데 중요하다. 상기 수용체로부터 분비시, 상기 인산화된 Smad 단백질들은 공유된 파트너로서 활동하는 관련 단백질 Smad4와 연합한다. 이러한 복합체는 핵 내로 진입하게 되고 다른 전사인자들과 같이 유전자 전사에 참여하게 된다.

<14> BMP 신호전달은 노긴과 같은 세포외 길항체를 통하는 것을 포함하여, 여러 수준에서 제어된다. Massague, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 1:169-178 (2000). 정상적인 발생에 기본적인 신호전달 연쇄사건들이 비적절한 시간에 또는 원치않게 활성화되면 척추관절증과 같은 질병 과정을 촉진하는 것으로 제시되었다. 노긴의 유전자 전달에 의한 관절염의 개시 및 진행에 대한 BMP 신호전달의 효과는 설명되어 있다. Lories 등, *J. Clin. Invest.* 115(6):1571-1579 (2005).

<15> 골격 및 사지 발생을 포함하는 정상적인 골 형성에서의 BMP 및 BMP 수용체 신호전달의 생리적 역할은, 연구되었고 최근 Zhao, *Genetics* 35:43-56 (2003)에서 검토되었다. 연골내 골화 중에, 중간엽 세포가 밀집되고 연골세포로 분화한다. 이러한 연골세포들은 고도로 조직화된 분화 프로그램을 겪어, 골 형성에 대한 주형을 형성한다. Kronenberg, *Nature* 423:332-336 (2003) 및 Olsen 등, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16:191-220 (2000). BMP 들은 이소성(ectopic) 연골 및 골 형성을 촉진시키는 능력으로 특징지워진다. Wozney, *Prog. Growth Factor Res.* 1:267-280 (1989). 상기 세 가지 타입 I 수용체들, BMPR1A, BMPR1B, 및 ActR1(액티빈 수용체 타입 I)에 대한 특징적인 BMP 리간드의 차등적 친화도는, 발생 과정 중에 신호를 다양화하는 데 공헌한다. 이러한 수용체들은 연골형성에 참여하고, 각각은 특이적 조직 분포 및 기능을 가진다.

<16> BMP2 및 BMP4가 결핍인 마우스는 생존할 수 없다. 동종접합성 BMP2 변이 배아들은 배아기 7.5 및 10.5일 사이에 죽고 심장 발생에서 결함을 가진다. Zhang 및 Bradley, *Development* 122:2977-2986 (1996). 동형접합성 BMP4 변이 배아들은 배아기 6.5 및 9.5 일 사이에 죽고 중간엽 분화에서 결함이 있다. Winnier 등, *Genes Dev.* 9:2105-2116 (1995).

<17> 윤(Yoon) 등은 연골세포에서 *Bmp1a* 및 *Bmp1b* 둘 다에 대하여 무위화된 (null) 마우스의 생성을 설명하고 있다. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102(14):5062-5067 (2005). 이러한 저자들은 *Bmp1b* 널(null) 마우스와 같이 *Bmp1a* 조건적 네아웃 마우스가 골격 결함을 거의 보이지 않는다는 것을 증명하고 있다. 그러나 양쪽 변이를 둘 다를 가지는 마우스들은 극심하고 일반화된 연골형성이상증을 나타낸다. 이러한 데이터는 초기 연골형성 기간 동안 BMPR1A 및 BMPR1B에 대하여 중첩적으로 기능하며 BMP 신호전달이 연골 세포 증식, 생존 및 분화에 필요하다는 것을 보이고 있다. BMPR1A 유전자의 널(null) 변이는 마우스에서 배아 사망을 야기한다; 동물들은 배

아기 9.5 일에 죽는다. 형태 이상적 결함을 가진 동종접합성변이체들은 배아기 7.5 일에 검출가능하고 그 배아들은 중배엽 형성에서 결함이 있다. Mishina 등, *Genes Dev.* 9:3027-3037 (1995).

<18> BMPR1B결핍 마우스는 살 수는 있지만, 사지골격(appendicular skeleton)에 결함을 나타낸다. BMPR1B 결핍 마우스에서, 전구연골생성 세포의 증식과 지질골 부위에서의 연골 분화가 감소된다. 다 자란 변이 마우스에서는, 근위 지질골간(proximal interphalangeal) 관절이 없고, 상기 지질골은 단일 미발달 요소로 대체되는 반면, 끝마디뼈(distal phalanges)들은 영향이 없다. 요골(radius), 척골(ulna) 및 경골(tibia)의 길이는 정상이나, 중수골(metacarpals) 및 중족골(metatarsals)은 감소된다. Yi 등, *Development* 127:621-630 (2000). BMPR1B가 아마도 생체 내에서 연골 형성에 비-환원적 역할을 하는 것으로 제시되었다. Gannon 등, *Hum. Pathol.* 28:339-343 (1997). BMP 리간드들은 다중 타입 I BMP 수용체들을 사용하여 연골 및 골 형성 동안 신호 전달을 매개할 수 있고, BMPR1B 및 ActR1A(A1k2)는 생체 내에서 연골과 골 형성에 상승적 및/또는 중첩되는 역할을 수행하는 것으로 제시된다. Macias-Silva 등, *J. Biol. Chem.* 273:25628-25636 (1998).

<19> 노긴은 BMP-2와 BMP4에 결합하여 이를 불활성화 시키는 분비 폴리펩티드다. 노긴과 BMP들의 공결정 구조를 살펴보면, 노긴이 타입 I 및 타입 II BMP 수용체 둘 다에 대한 결합 에피토프의 분자적 계면을 막음으로써 BMP 신호 전달을 저해하는 것으로 나타난다. 유전자 이식 마우스 모델은 노긴 트랜스유전자를 주도하는 오스테오칼신 프로모터를 사용하여 설정되었다. 이러한 동물들은 골 미네랄 밀도, 골 부피 및 골형성율에서 유의한 감소로 증명되는 바와 같이 골다공증을 발현시켰다. Devlin 등, *Endocrinology* 144:1972-1978 (2003) 및 Wu 등, *J. Clin. Investig.* 112:924-924 (2003). 전체적으로, BMP 길항체를 사용한 이러한 실험들은 BMP 신호전달 단백질들의 조절이 생체 내에서 골 형성에 중심이라는 것을 증명하고 있다.

<20> 동물 모델 시스템들이 개시되었고 연골형성 및 골 형성을 개시함으로써 골 결함을 치유하는 BMP2의 능력을 평가하는 데 사용되었다. BMP2의 골유도능력은 래트, 토끼, 개, 양 및 비-인간 영장류에서 보여진 이러한 성장 인자에 의해 매개되는 긴 뼈에 대한 치유 효과와 일치한다. Murakami 등, *J. Biomed. Mater. Res.* 62:169-174 (2002). 마우스의 두개관 표면에 걸쳐 국소적으로 BMP-2를 주사하면 선행 연골 위상 없이 두개관의 표면 상에 골막성 골(periosteal bone) 형성을 유도하였다. Chen 등, *Calcif. Tissue Int.* 60:283-290 (1997). 또한, 재조합 인간 BMP2를 전신적으로 투여하면, 마우스 모델에서, 중간엽 줄기 세포 활성을 증가시키고 및 난관적제-유도 및 노화-관련 골 손실을 역전시키게 되고, 이는 BMP2가 골다공증의 치료에 치료적으로 효과적일 수 있다는 것을 암시한다. Turgeman 등, *J. Cell. Biochem.* 86:461-474 (2002).

<21> BMP2 및 4는 물론 BMPR1A의 과발현은 구강 상피의 악성화와 연관이 있고 BMP2의 과발현은 전립선 암세포에서 보고되고 있다. 각각 Jin 등, *Oral Oncol.* 37:225-233 (2001) 및 Harris 등, *Prostate* 24:204-211 (1994). BMP는 또한 흑색종 세포주에서 전이 양태를 촉진하는 것으로 나타나고 있다. Rothhammer 등, *Cancer Res.* 65(2):448-56 (2005).

<22> 진행성 골화성 섬유이형성증(FOP)은 염지 발가락의 선천성 기형 및 예측가능한 해부학적 상태로 진행성 이소성 연골내 골화 (progressive heterotopic endochondral ossification)로 특징지워지는 희귀하고 무력화하는 유전 질환이다. BMP4의 이소성 발현이 FOP 환자에게서 발견되었다. Gannon 등, *Hum. Pathol.* 28:339-343 (1997) 및 Xu 등, *Clin. Genet.* 58:291-298 (2000). 최근에, FOP 환자는 BMP 타입 I 수용체 ACVRI에서 활성화하는 변이를 가진다는 것이 밝혀졌다. Shore 등, *Nat. Gen.* 23 April advance online publication (2006). 뉴런-특이성 애놀라제(NSE) 프로모터의 제어하에서 BMP4를 과발현하는 유전자이식 마우스는 또한 FOP-유사(like) 표현형을 발달시키는 것으로서 설명되고 있다. Kan 등, *Am. J. of Path.* 165(4):1107-1115 (2004). 이러한 동물들을 노гин을 과발현시키는 유전자이식 마우스와 짹짓기시키면, 이러한 질환을 예방하며, 따라서, 이러한 질병의 병리에서의 BMP4의 역할을 확인한다.

<23> SpA는 이소적 또는 비정상적 골형성에 연루된 또 다른 의학적 조건이다. SpA, 특히 강직성 척추염에 대한 현재의 치료법에 대하여 Zochling 등, *Curr. Opin Rheumatol.* 17:418-425 (2005) 및 van der Heijde 등, *Ann. Rheum. Dis.* 61:24-32 (2002)에서 검토된다. 기본 요법은 비스테로이드성 항염증 약제 (NSAID)들의 사용과 구조화된 운동을 포함한다. Dougados 등, *Arthritis Rheum.* 44:180-185 (2001); Khan, *Sem. Arthritis Rheum.* 15(Suppl 1):80-84 (1985); Wasner 등, *JAMA* 246:2168-2172 (1981); Hidding 등, *Arthritis Care Res.* 6:117-125 (1993); Sweeney 등, *J. Rheumatol.* 29:763-766 (2002); 및 Dagfinrud 등, "The Cochrane Database of Systematic Reviews", Issue 4, Art. No.: CD002822, DOI: 10.1002/14651858.CD002822.pub2 (2004). 강직성 척추염을 항류마티스성 약제로 치료하려는 시도는 실망스러웠다. 설파살라진은 SpA-연관 말초 관절염을 개선시켰으나, 척추 통증은 아니었다. Clegg 등, *Arthritis Rheum.* 39:2004-2012 (1996); Clegg 등, *Arthritis*

Rheum. 42:2325-2329 (1999); Dougados 등, *Arthritis Rheum.* 38:618-627 (1995); 및 Nissila 등, *Arthritis Rheum.* 31:1111-1116 (1988). 유사하게도, 메토트렉세이트 및 레플루노마이드는, 류마티스성 관절염의 치료에는 유효하지만, 강직성 척추염에 대해서는 거의 효능을 보이지 않는다. Chen 등, "The Cochrane Database of Systematic Reviews", Iss. 3, Art. No.: CD004524, DOI: 10.1002/14651858.CD004524.pub2 (2003); Haibel 등, *Ann. Rheum Dis.* 64:124-126 (2005); 및 Van Denderen 등, *Ann. Rheum. Dis.* 63(Suppl 1):397 (2004).

<24> 더 최근에는, 종양 피사 인자(TNF) 차단제의 사용이 시도되었고 이는 제한된 성공을 가져왔다. 예를 들어, 반데르 하이데(Van der Heijde) 등, *Arthritis Rheum.* 52:582-591 (2005)은 치료 군의 61%가 인플릭시맙(infliximab)으로 24 주간 치료 후에 ASAS20 반응이 나타난 것으로 보고하고 있다. 또한 Braun 등, *Ann. Rheum. Dis.* 64:229-234 (2005); Braun 등, *Lancet* 359:1187-1193 (2002); 및 Mease 등, *Lancet* 356:385-390 (2000)을 참조. 유사하게, 에타너셉트(etanercept)를 사용한 최근의 연구는 강직성 척추염의 치료에 약 60% 반응율을 보였으며, 여기서 양성 반응은 감소된 척추염, 허리 통증 및 신체장애를 포함한다. Brandt 등, *Arthritis Rheum.* 48:1667-1675 (2003), Davis 등, *Arthritis Rheum.* 48:3230-3236 (2003); 및 Gorman 등, *N. Engl. J. Med.* 346:1349-1356 (2002).

<25> 비록 초보적이지만, 인간화 단일클론성 항-TNF 항체인, 아달리무맙(adalimumab)을 사용한 초기 연구는 이러한 요법이, 강직성 척추염의 치료에서 인플릭시맙 및 에타너셉트와 비견될 수 있다는 것을 나타냈다. Haibel 등, *Arthritis Rheum.* 50(Suppl):S217 (2004). 또한, 재조합 인간 인터류킨-1 수용체 길항체인 아나킨라(anakinra); 비스포스포네이트류 및 탈리도마이드(thalidomide); 및 항생제 요법을 강직성 척추염의 치료에 적용하였으나, 그 결과는 아직까지 결론이 나지 않고 있다. Tan 등, *Ann. Rheum. Dis.* 63:1041-1045 (2004); Maksymowycz 등, *Arthritis Rheum.* 46:766-773 (2002); 및 Kvein 등, *Ann. Rheum. Dis.* 63:1113-1119 (2004) 참조.

<26> 일반적으로, 강직성 척추염 및 다른 척추관절염 질환의 치료에 대한 치료 섭생법을 개발하는 데 진전이 없는 데, 이는 특히 상기 치료법들이 골형성 및 척추골 융합을 예방하지 않기 때문이다. 상기 질병의 완전히 제어하기 위해, 특히 연골 및 골 형성을 타겟하는 치료전략이, 현재의 면역억제 요법에 대안으로서 또는 보조로서 요구될 수 있다. 따라서, 강직성 척추염과 다른 척추관절염 질환과 연관된 골 질환은 물론 골형성 단백질 및 이의 수용체의 비정상적인 발현/활성에 의해 야기되는 것들을 위시한, 비정상적인 골형성 및 골화와 연관된 다른 질환의 치료에 대한 새로운 치료법에 대하여 당해 분야에서는 그 필요성이 여전하다.

발명의 상세한 설명

<27> <발명의 개요>

<28> 본 발명은 골형성 단백질들과 이에 대한 수용체들에 대하여 지향된 항체 및 다른 치료적 단백질, 그러한 항체 및 치료적 단백질들을 암호화하는 핵산류, 항-BMP 및 항-BMPR 단일클론성 항체 및 다른 치료적 단백질을 제조하는 방법, 및 진행성 골화성 섬유이형성증(FOP), 진행성 끌이형성증(POH), 척수손상, 근육내 혈종을 야기하는 둔기 외상, 정형외과 수술, 건선성 관절염, 골관절염, 강직성 척추염, 혈청반응음성 관절증, 골격 골형성 과다증, 이경화증(otosclerosis), 등자골 강직증, 골암, 전립선암 및 뼈돌출증, 즉상경화증, 판막성 심장 질환, 폐암, 흑색종, 혈액암(hematopoietic cancer), 신장암, 및 유방암을 포함하지만 이에 한정되지 않는 골질환 및 암과 같은 질병을 치료하는 방법을 제공함으로써 이러한 그리고 다른 관련된 필요를 다룬다.

<29> 따라서, 본 발명은, 하나 이상의 골형성 단백질과 이의 수용체에 결합하고 하나 이상의 소망의 기능적 특성을 보이는, 분리된 단일클론성 항체류, 특히, 쥐의, 키메릭, 인간화된, 및 완전한 인간 단일클론성 항체들을 제공한다. 그러한 특성들은, 예를 들어, BMP2 및/또는 BMP4와 같은 인간 골형성 단백질에 특이적으로 결합하는 고친화도 또는 BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2와 같은 골형성 단백질 수용체에 특이적으로 결합하는 고친화도를 포함한다. 또한, 본 발명의 항체, 단백질 및 조성물을 사용하여 다양한 골형성 단백질-매개 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

<30> 본 명세서에서 개시된 항체들과 치료적 단백질들은 (a) 동족(cognate) 수용체 (즉, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2)에 결합하는 리간드 (즉, BMP2 및/또는 BMP4) 및/또는 (b) 수용체 이종이량 형성 및/또는 (c) 수용체 신호전달을 차단할 수 있다.

<31> 일 관점에 있어서, 본 발명은 분리된 단일클론성 항체 또는 이의 항원-결합부에 관한 것으로서, 상기 항체는:

<32> (a) 인간 골형성 단백질 (예, BMP2, 또는 BMP4) 또는 이의 수용체 (예, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 또는 BMPR2)와

1×10^{-7} M 이하의 K_D 로 결합하고; 및/또는

<33> (b) 인간 골형성 단백질 및/또는 이의 수용체를 발현하는 세포(예, 인간 또는 CHO)에 결합한다.

<34> 더 상세한 구체예에 있어서, 상기 항체는 인간 골형성 단백질 또는 이의 수용체와 5×10^{-8} M 이하, 일반적으로 2×10^{-8} M 이하, 더 일반적으로는 1×10^{-8} M 이하, 더더욱 일반적으로는 6×10^{-9} M 이하, 3×10^{-9} M 이하, 또는 2×10^{-9} M 이하의 K_D 로 결합한다.

<35> 다른 구체예에서, 본 발명은 골형성 단백질, 또는 이의 수용체와의 결합에 대하여, 참조 항체와 교차 경쟁 (cross-compete)을 하는, 분리된 단일클론성 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하며, 상기 참조 항체는:

<36> (a) 인간 골형성 단백질 또는 이의 수용체와 1×10^{-7} M 이하의 K_D 로 결합하고; 및/또는

<37> (b) 인간 골형성 단백질 및/또는 이의 수용체를 발현하는 세포와 결합한다.

<38> 또 다른 구체예에서, 본 발명은, BMP2 또는 BMP4와의 결합에 대하여 참조 항체와 교차 경쟁을 하는, 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원 결합부를 제공하며, 상기 참조항체는:

<39> (a) 서열번호 31, 32, 또는 33으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

<40> (b) 서열번호 34, 35, 또는 36으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

<41> 다양한 구체예에서, 상기 참조 항체는:

<42> (a) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

<43> (b) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고;

<44> 또는 상기 참조 항체는:

<45> (a) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

<46> (b) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고;

<47> 또는 상기 참조 항체는:

<48> (a) 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

<49> (b) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

<50> 다른 관점에서, 본 발명은, 인간 V_H 3-33 유전자의 생성물이거나 또는 이로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합부에 관한 것으로서, 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4와 특이적으로 결합한다. 본 발명은 또한 인간 V_H 4-34 유전자의 생성물이거나 이로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는 것으로서, 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4와 특이적으로 결합한다. 본 발명은 또한 인간 V_K A27 유전자의 생성물이거나 이로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는 것으로서, 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4와 특이적으로 결합한다. 본 발명은 또한, 인간 V_K L6 유전자의 생성물이거나 이로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는 것으로서, 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4와 특이적으로 결합한다. 본 발명은 또한 인간 V_K L15 유전자의 생성물이거나 이로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는 것으로서, 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4와 특이적으로 결합한다.

<51> 바람직한 구체예에서, 본 발명은:

<52> (a) 인간 V_H 3-33, 4-34, 또는 4-59 유전자의 중쇄 가변 영역; 및

- <53> (b) 인간 V_K A27, L6, 또는 V_K L15의 경쇄 가변 영역을 포함하는,
- <54> 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는 것으로서;
- <55> 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4와 특이적으로 결합한다.
- <56> 바람직한 구체예에서, 상기 항체는 인간 V_H 4-59 유전자의 중쇄 가변 영역 및 인간 V_K A27 유전자의 경쇄 가변 영역을 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, 상기 항체는 인간 V_H 4-34 유전자의 중쇄 가변 영역 및 인간 V_K L6 유전자의 경쇄 가변 영역을 포함한다. 다른 바람직한 구체예에서, 상기 항체는 인간 V_H 3-33 유전자의 중쇄 가변 영역 및 인간 V_K L15 유전자의 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- <57> 다른 관점에서, 본 발명은 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론성 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하며,
- <58> (a) 상기 중쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열번호19, 20, 및 21의 아미노산 서열 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며;
- <59> (b) 상기 경쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열번호28, 29, 및 30의 아미노산 서열 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 및
- <60> (c) 상기 항체는 인간 BMP2 또는 BMP4와 1×10^{-7} M 이하의 K_D로 결합한다.
- <61> 바람직하게는, 상기 중쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열번호16, 17, 및 18의 아미노산 서열 및 이의 보존적 변형물로 구성된 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 및 상기 경쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열번호25, 26, 및 27의 아미노산 서열들 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는 상기 중쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열번호13, 14, 및 15의 아미노산 서열들, 및 이의 보존적 변형물들로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고; 및 상기 경쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열번호22, 23, 및 24의 아미노산 서열들, 및 이의 보존적 변형물들로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- <62> 바람직한 조합은,
- <63> (a) 서열번호 13을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <64> (b) 서열번호 16을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <65> (c) 서열번호 19를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <66> (d) 서열번호 22를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <67> (e) 서열번호 25를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <68> (f) 서열번호 28을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다.
- <69> 다른 바람직한 조합은,
- <70> (a) 서열번호 14를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <71> (b) 서열번호 17을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <72> (c) 서열번호 20을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <73> (d) 서열번호 23을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <74> (e) 서열번호 26을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <75> (f) 서열번호 29를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다.
- <76> 또 다른 바람직한 조합은,
- <77> (a) 서열번호 15를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <78> (b) 서열번호 18을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

- <79> (c) 서열번호 21을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <80> (d) 서열번호 24를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <81> (e) 서열번호 27을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <82> (f) 서열번호 30을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다.
- <83> 본 발명의 다른 바람직한 항체들, 또는 이의 항원 결합부는:
- <84> (a) 서열번호 31, 32, 및 33로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- <85> (b) 서열번호 34, 35, 및 36으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하고,
- <86> 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4와 특이적으로 결합한다.
- <87> 바람직한 조합은:
- <88> (a) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- <89> (b) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- <90> 다른 바람직한 조합은:
- <91> (a) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- <92> (b) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- <93> 또 다른 바람직한 조합은:
- <94> (a) 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및
- <95> (b) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- <96> 본 발명의 다른 관점에서, BMP2 또는 BMP4와의 결합에 대하여 전술한 항체들과 경쟁하는 항체들, 또는 이의 항원-결합부들을 제공한다.
- <97> 본 발명의 항체들은, 예를 들어, 전장(full-length) 항체들, 기본적으로, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 이소타입들일 수 있다. 대안적으로, 상기 항체들은 Fab, Fab' 또는 Fab'₂ 단편 또는 단일 사슬 항체들 (예, scFv)과 같은 항체 단편일 수 있다.
- <98> 본 발명은 또한, 세포독소 또는 병사성 동위체와 같은 치료제제와 연결된 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합부를 포함하는 면역접합체(immunoconjugate)를 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합부가, 상기 항체 또는 이의 항원 결합부와 상이한 결합 특이성을 가지는 제 2 관능성 분체와 연결된 것을 포함하는 이중특이성 분자를 제공한다. 본 발명은 또한 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 또는 BMPR2에 지향된 어피바디(Affibodies), 도메인 항체, 나노바디(Nanobodies), 유니바디(UniBodies), 디에이알핀(DARPins), 앤티칼린(Anticalins), 아비머(Avimers), 베르사바디(Versabodies) 및 듀오칼린(Duocalins)을 제공한다.
- <99> 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합부 또는 면역접합체 또는 이중특이성 분자 및 약학적 허용 담체를 포함하는 조성물이 또한 제공된다.
- <100> 상기 항체들 또는 이의 항원-결합부들을 암호화하는 핵산 분자들 또한 본 발명에 포함되며 그러한 핵산을 포함하는 발현 벡터, 그러한 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포, 및 그러한 숙주 세포를 이용하여 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들을 제조하는 방법이 포함된다.
- <101> 또한, 본 발명은 인간 면역글로불린 중쇄 및 경쇄 트랜스유전자를 포함하는 마우스로서, 본 발명의 항체를 발현하는 유전자이식 마우스를 제공하는 것은 물론 그러한 마우스로부터 제조된 것으로서, 본 발명의 항체를 생산하는 하이브리도마를 제공한다.
- <102> 다른 구체예에서, 본 발명은 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2를 발현하는 골 및/또는 종양 세포의 성장에 의해 특징지워지는 질병을 치료하거나 예방하는 방법에 있어서, 대상체에, 본 발명의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 인간 항체를 상기 질병을 치료 또는 예방하기에

유익한 양으로 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 상기 질병은 골질환 및/또는 암일 수 있다.

<103> 다른 관점에 있어서, 본 발명은 자가면역 질환을 치료하는 방법에 있어서, 대상체에 본 발명의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 인간 항체를 상기 질환을 치료하는 데 유익한 양으로 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

<104> 본 발명의 다른 특징 및 장점들은 하기 상세한 설명 및 제한적으로 해석되지 않는 실시예로부터 명확해질 것이다. 본 명세서를 통틀어 인용된 모든 참조문헌, GenBank 수탁 번호, 특히 및 공개된 특허 출원서들은 참조물로서 본 발명에 합류되었음을 명백히 밝히는 바이다.

<골형성 단백질 서열의 간단한 설명>

<106> 서열번호 1은 인간 골형성 단백질 2(BMP2)를 암호화하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열이고, 진뱅크 (GenBank) 수탁 번호 NM_001200으로 개시되어 있다.

<107> 서열번호 2는 서열번호 1로 제시되는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 인간 골형성 단백질 2(BMP2)의 아미노산 서열이다.

<108> 서열번호 3은 인간 골형성 단백질 4(BMP4)를 암호화하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열이고, 진뱅크 수탁번호 NM_130851로 개시되어 있다.

<109> 서열번호 4는 서열번호 3으로 제시되는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 인간 골형성 단백질 4(BMP4)의 아미노산 서열이다.

<110> 서열번호 5는 인간 골형성 단백질 수용체 1A(BMPR1A)를 암호화하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열이고, 진뱅크 수탁번호 NM_004329로 개시되어 있다.

<111> 서열번호 6은 서열번호 5로 제시되는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 인간 골형성 단백질 수용체 1A(BMPR1A)의 아미노산 서열이다.

<112> 서열번호 7은 인간 골형성 단백질 수용체 1B(BMPR1B)를 암호화하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열이고, 진뱅크 수탁 번호 NM_001203으로 개시되어 있다.

<113> 서열번호 8은 서열번호 7로 제시되는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 인간 골형성 단백질 수용체 1B(BMPR1B)의 아미노산 서열이다.

<114> 서열번호 9는 인간 액티빈(actinin) A 수용체, 타입 I(ACTR1)을 암호화하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열이고, 진뱅크 수탁번호 BC033867로 개시되어 있다.

<115> 서열번호 10은 서열번호 9로 제시되는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 인간 액티빈 A 수용체, 타입 I(ACTR1)의 아미노산 서열이다.

<116> 서열번호 11은 인간 골형성 단백질 수용체 2(BMPR2)를 암호화하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열이고, 진뱅크 수탁 번호 NM_001204로 개시되어 있다.

<117> 서열번호 12는 서열번호 11로 제시되는 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 인간 골형성 단백질 수용체 2(BMPR2)의 아미노산 서열이다.

<상세한 설명>

<119> 본 발명은, 하나 이상의 골형성 단백질(BMP) 또는 하나 이상의 골형성 단백질 수용체(BMPR) 및/또는 액티빈 A 수용체(ACTR1)와 특이적으로 높은 친화도로 결합하는, 분리된 단일클론성 항체들, 특히, 쥐, 키퍼, 인간화된 및 완전-인간 단일클론성 항체들에 관한 것이다. 특정 구체예에서, 본 발명의 항체들은 특정 중쇄 및 경쇄 생식 세포계열 서열들로부터 유래되고, 및/또는 특정 아미노산 서열들을 포함하는 CDR 영역들과 같은 특정 구조적 특징을 포함한다. 따라서 본 발명은 분리된 항체들, 면역접합체들, 이중특이성 분자들, 어피바디류, 도메인 항체들, 나노바디류, 유니바디류, 디에이알핀류, 안티칼린류, 아비머류, 베르사바디류 및 듀오칼린류, 이를 분자를 제조하는 방법, 및 상기 분자들과 약학 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 상기 항체들, 면역접합체, 이중특이성 분자, 어피바디류, 도메인 항체들, 나노바디류, 유니바디류, 디에이알핀류, 안티칼린류, 아비머류, 베르사바디류 및 듀오칼린류를 사용하여 비정상적인 골 형성과 연관된 질환 및 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

<120>

정의

<121>

본 발명을 더 잘 이해하기 위해서, 먼저 특정 용어들을 정의한다. 추가 정의들이 상세한 설명에서 설정될 것이다.

<122>

용어 "항체"는 본 명세서 상에서 지칭되는 바와 같이, 온전한 항체들 및 이의 임의의 항원 결합 단편(즉, "항원-결합부") 또는 단일 사슬을 포함한다. "항체"는 이황화 결합에 의해 상호 연결된 적어도 두개의 중쇄(H) 및 적어도 두개의 경쇄(L) 또는 이의 항원 결합부를 포함하는 당단백질을 지칭한다. 각 중쇄는 중쇄 가변 영역(V_H 로 약자화) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 이러한 중쇄 불변 영역은 세가지 도메인 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변 영역(V_L 로 약자화) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 이러한 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 C_L 으로 구성된다. V_H 및 V_L 영역들은, 상보성 결정부위(CDR)로 불리우지는, 초가변 영역으로 더 나눌 수 있고, 이들은 골격부(framework region, FR)로 불리우는 더 보존적인 부위와 섞여있다. 각 V_H 및 V_L 은 세 개 CDR과 네 개 FR로 구성되고 이들은 아미노 말단에서부터 카르복시 말단방향으로 하기 순서로 정렬되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 상기 중쇄 및 경쇄의 가변 영역들은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 포함한다. 상기 항체들의 불변 영역은, 면역계(예, 작동(effector) 세포) 및 전통적인 보체계(classical complement system)의 제 1 요소(Clq)를 위시한, 숙주 조직 또는 인자에 면역글로불린을 결합시키는 것을 매개 할 수 있다.

<123>

용어 항체의 "항원-결합부"(또는 "항체 부분")는, 본 명세서상에서 사용되는 바와 같이, 항원(본 명세서에서 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2으로 예시되는)에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하고 있는 항체의 하나 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있다는 것이 나타나 있다. 용어 항체의 "항원-결합부" 내에 내포되는 결합 단편의 예는 (i) Fab 단편, 즉, V_L , V_H , C_L 및 C_{H1} 도메인들로 구성되는 일가 단편; (ii) $F(ab')_2$ 단편, 즉, 헌지 부위에서 이황화 다리에 의해 연결된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 이가 단편; (iii) Fab' 단편, 즉, 상기 헌지 부위의 일부를 가지는, 본질적으로 Fab 인 단편, (Fundamental Immunology (Paul ed., 3rd ed. 1993) 참조); (iv) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 구성되는 Fd 단편; (v) 항체의 단일 팔의 V_L 와 V_H 도메인으로 구성되는 Fv 단편, (vi) dAb 단편 (Ward 등, (1989) *Nature* 341:544-546)으로서, V_H 도메인으로 구성된 단편; 및 (vii) 분리된 상보성 결정 부위(CDR)를 포함한다. 더욱이, Fv 단편의 두 개 도메인, V_L 및 V_H 가 별개의 유전자에 의해 암호화 되어 있지만, 이들은 재조합 방법들을 사용하여, 합성 링커에 의해 결합되어 단일 단백질 사슬로서 만들어 질 수 있고, 여기서 V_L 및 V_H 부위들은 짹을 이뤄 단일가 분자를 형성하게 된다(단일 사슬 Fv (scFv)로서 공지됨; 예, Bird 등 (1988) *Science* 242:423-426; 및 Huston 등 (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 참조). 그러한 단일 사슬 항체들은 또한 항체의 "항원-결합부" 용어의 범위내에 내포되는 것으로 의도된다. 이러한 항체 단편들은 당해 분야의 숙련자들에게 공지된 기술을 사용하여 얻을 수 있고 상기 단편들을 본래의 항체들과 동일한 방식으로 검출하여 이용할 수 있다.

<124>

"분리된 항체"는, 본 명세서에서 사용한 바와 같이, 상이한 항원 특이성들을 가지는 다른 항체들이 실질적으로 없는 항체를 지칭하는 것으로 의도된다(예를 들어, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2와 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 이러한 여섯개 단백질의 임의의 하나 또는 그 이상의 다른 항원과 특이적으로 결합하는 항체들이 실질적으로 없는 것). 그러나 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2와 특이적으로 결합하는 분리된 항체는 다른 종으로부터 유래한 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 분자와 같은 다른 항원에 교차 반응성(cross-reactivity)을 가진다. 더욱이, 분리된 항체는 다른 세포성 물질 및/ 또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다.

<125>

용어 "단일클론성 항체" 또는 "단일클론성 항체 조성물"은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단일 분자 조성물의 항체 분자들의 제조물을 지칭한다. 단일클론성 항체 조성물은 특정 에피토프에 대하여 단일 결합 특이성 및 친화도를 보인다.

<126>

용어 "인간 항체" 또는 "인간 서열 항체"는 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 골격 부위 및 CDR 부위 양쪽 다 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열들로부터 유래한 가변 영역을 가지는 항체들을 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 상기 항체가 불변 영역을 포함한다면, 그 불변 영역 또한 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열로부터 유래한다. 이러한 인간 항체들은 자연적 또는 합성적 변경을 포함한 후기 변형을 포함할 수 있다. 본 발명의 인간

항체들은 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열들에 의해 암호화되지 않은 아미노산 잔기들(예, 시험관 내 랜덤 또는 부위-특이적(site-specific) 돌연변이생성(mutagenesis)에 의해 또는 생체 내 체세포 돌연변이에 의해 유도된 돌연변이들)을 포함할 수 있다. 그러나, 용어 "인간 항체"는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 쥐와 같은 다른 포유동물 종의 생식세포계열로부터 유래된 CDR 서열들이 인간 골격 서열들에 이식된 항체들을 포함하는 것으로 의도하지 않는다.

<127> "인간" 뒤의 용어 "서열"을 포함할 수 있는, 용어 "인간 단일클론성 항체"는 골격 부위 및 CDR 부위 둘 다가 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열들로부터 유래된 가변 부위를 가지는 단일 결합 특이성을 보이는 항체들을 지칭한다. 일 구체예에서, 상기 인간 단일클론성 항체들은, 무한증식 세포에 융합된 인간 중쇄 트랜스유전자 및 경쇄 트랜스유전자를 포함하는 계놈을 가지는 유전자이식 비인간 동물, 예를 들어, 유전자이식 마우스로부터 얻어진 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성된다.

<128> 용어 "재조합 인간 항체"는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 재조합 수단에 의해 제조되고, 발현되며, 창출되고 또는 분리된 모든 인간 항체들, 예를 들어, (a) 인간 면역글로불린 유전자들에 대하여 유전자이식성(transgenic) 이거나 트랜스염색체성(transchromosomal)인 동물(예, 마우스)로부터 또는 이로부터 얻어진 하이브리도마(후속적으로 설명됨)로부터 분리된 항체들, (b) 형질전환되어 인간 항체를 발현하는 숙주 세포로부터, 예를 들어 트랜스펙토마로부터 분리된 항체들, (c) 재조합, 조합성 인간 항체 라이브러리로부터 분리된 항체들, 및 (d) 인간 면역글로불린 유전자 서열들을 다른 DNA 서열들에 대하여 스플라이싱하는 것을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조되고, 발현되며, 창출되거나 분리된 항체들을 포함한다. 그러한 재조합 인간 항체들은 골격 부위 및 CDR 부위가 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열들로부터 유래되는 가변 부위를 가지고 있다. 그러나 다른 구체예에서, 그러한 재조합 인간 항체들은 시험관 내 돌연변이생성(mutagenesis) (또는 인간 Ig 서열들에 대해 유전자이식된 동물이 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이생성)으로 처리될 수 있고, 따라서 재조합 항체들의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열들은 인간 생식세포계열 V_H 및 V_L 서열들로부터 유래되고 이에 관련된 것이지만, 생체 내에서 인간 항체 생식세포계열 원천에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열들이다.

<129> 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "이소타입"은 중쇄 불변 영역 유전자들에 의해 암호화되는 항체 등급 (예, IgM 또는 IgG1)을 지칭한다.

<130> 어구 "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"는 용어 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"와 상호교환적으로 사용된다.

<131> 용어 "인간 항체 유도체"는 인간 항체의 임의의 개질형태, 예를 들어, 항체 및 또다른 제제나 항체의 접합체를 지칭한다.

<132> 용어 "인간화 항체"는 마우스와 같은 다른 포유동물 종의 생식세포계열로부터 유래된 CDR 서열들이 인간 골격 서열들에 접합된 항체를 지칭하는 것으로 의도된다. 추가의 골격 부위 변형이 인간 골격 서열내에서 이루어 질 수 있다.

<133> 용어 "키메릭 항체"는 가변 영역 서열들이 하나의 종으로부터 유래되고 불변 영역 서열들이 다른 종으로부터 유래된 항체들, 예를 들어, 가변 영역 서열들이 마우스 항체로부터 유래되고 불변 영역 서열들이 인간 항체로부터 유래된 항체를 지칭하는 것으로 의도된다.

<134> 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "특이적으로 결합하는" 항체는 그의 동족성 항원과 1×10^{-7} 이하, 특히 $5 \times 10^{-8} M$ 이하, 더 특별하게는 $1 \times 10^{-8} M$ 이하, 더욱 특별하게는 $6 \times 10^{-9} M$ 이하, 더욱 특별하게는 $3 \times 10^{-9} M$ 이하, 더더욱 특별하게는 $2 \times 10^{-9} M$ 이하의 K_D 로 결합하는 항체를 지칭하는 것으로 의도된다.

<135> 용어 단백질 또는 세포와 "실질적으로 결합하지 않는"은, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단백질 또는 세포에 결합하지 않거나 또는 높은 친화도로 결합하지 않는 것, 즉, 단백질 또는 세포에 $1 \times 10^{-6} M$ 이상, 더 바람직하게는 $1 \times 10^{-5} M$ 이상, 더욱 바람직하게는 $1 \times 10^{-4} M$ 이상, 더욱더 바람직하게는 $1 \times 10^{-3} M$ 이상, 더욱더 바람직하게는 $1 \times 10^{-2} M$ 이상의 K_D 로 결합하는 것을 의미한다.

<136> 용어 " K_{assoc} " 또는 " K_a "는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 특정 항체-항원 상호작용의 결합 속도(association

rate)를 지칭하는 것이고, 용어 " K_{dis} " 또는 " K_d ,"는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 특정 항체-항원 상호작용의 해리 속도를 지칭하는 것으로 의도된다. 용어 " K_b "는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, K_d 대 K_a 의 비율(즉, K_d/K_a)로부터 얻어지고, 몰 농도(M)로 표시되는 해리 상수를 지칭하는 것으로 의도된다. 항체들에 대한 K_D 값은 당해 분야에 설정된 방법들을 사용하여 결정될 수 있다. 항체의 K_D 를 결정하는 바람직한 방법은 표면 플라즈몬(Plasmon) 공명, 전형적으로, Biacore 시스템과 같은 바이오센서 시스템을 사용하여 수행될 수 있다.

<137> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, IgG 항체에 대한 용어 "고 친화도"는 타겟 항원에 대하여 $10^{-7} M$ 이하, 더 일반적으로는 $10^{-8} M$ 이하, 더 일반적으로는 $10^{-9} M$ 이하, 및 더더욱 일반적으로는 $10^{-10} M$ 이하의 K_D 를 가지는 항체를 지칭한다. 그러나, "고 친화도" 결합은 다른 항체 이소타입들에 대하여는 다양해질 수 있다. 예를 들어, IgM 이소타입에 대한 "고 친화도" 결합은 $10^{-7} M$ 이하, 더 일반적으로는 $10^{-8} M$ 이하, 더더욱 일반적으로는 $10^{-9} M$ 이하의 K_D 를 가지는 항체를 지칭한다.

<138> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 임의의 인간 또는 비인간 동물을 포함한다. 용어 "비인간 동물"은 포유 동물 및 비포유동물을 망라한, 모든 척추동물, 예를 들어, 비인간 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류, 어류, 파충류 등을 포함한다.

<139> 용어 "면역 반응"은 예를 들어, 임파구, 항원 제시 세포, 대식 세포, 과립구, 및 상기 세포들 또는 간에 의해 생성되는 용해성 거대분자 (항체, 사이토카인 및 보체를 위시한)의 활동으로서, 인체로부터 침입 병원균, 병원균으로 감염된 세포 또는 조직, 암성 세포 또는, 자가 면역성이나 병리적 염증의 경우, 정상적인 인간 세포 또는 조직을 선택적으로 손상시켜 파괴하거나 제거하는 작용을 지칭한다.

<140> "신호 전달 경로"는 세포의 일부분으로부터 세포의 다른 부분으로 신호를 전달하는 데 역할을 하는 다양한 신호 전달 분자들간의 생화학적 관계를 지칭한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 어구 "세포 표면 수용체"는, 예를 들어, 신호를 전달받고 세포의 세포막을 건너서 그러한 신호를 전달할 수 있는 분자들 및 분자들의 복합체를 포함한다. 본 발명의 "세포 표면 수용체"의 예는 BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및 BMPR2 수용체들이다.

<141> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "BMP2"는 인간 골형성 단백질 2를 지칭하는 데 사용된다. 인간 BMP2의 뉴클레오티드 서열은 진뱅크 수탁번호 NM_001200을 참조하면 공공적으로 이용가능하고 본 명세서에서 서열번호 1로서 개시되어 있다. BMP2의 상응하는 아미노산 서열은 본 명세서에서 서열번호 2로서 제시된다.

<142> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "BMP4"는 인간 골형성 단백질 4를 지칭하는 데 사용된다. 인간 BMP4의 뉴클레오티드 서열은 진뱅크 수탁번호 NM_130851을 참조하면 공공적으로 이용가능하고 본 명세서에서 서열번호 3으로서 개시되어 있다. BMP4의 상응하는 아미노산 서열은 본 명세서에서 서열번호 4로서 제시된다.

<143> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "BMPR1A" (aka Alk3)는 인간 골형성 단백질 수용체 1A를 지칭하는 데 사용된다. 인간 BMPR1A의 뉴클레오티드 서열은 진뱅크 수탁번호 NM_004329를 참조하면 공공적으로 이용가능하고 본 명세서에서 서열번호 5로서 개시되어 있다. BMPR1A의 상응하는 아미노산 서열은 본 명세서에서 서열번호 6으로서 제시된다.

<144> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "BMPR1A" (aka Alk6)는 인간 콜형성 단백질 수용체 1B를 지칭하는 데 사용된다. 인간 BMPR1B의 뉴클레오티드 서열은 진뱅크 수탁번호 NM_001203을 참조하면 공공적으로 이용가능하고 본 명세서에서 서열번호 7로서 개시되어 있다. BMPR1B의 상응하는 아미노산 서열은 본 명세서에서 서열번호 8로서 제시된다.

<145> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "ACTR1"은 인간 액티빈 A 수용체 1을 지칭하는 데 사용된다. 인간 ACTR1의 뉴클레오티드 서열은 진뱅크 수탁번호 BC033867을 참조하면 공공적으로 이용가능하고 본 명세서에서 서열번호 9로서 개시되어 있다. ACTR1의 상응하는 아미노산 서열은 본 명세서에서 서열번호 10으로서 제시된다.

<146> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "BMPR2"는 인간 골형성 단백질 수용체 2를 지칭하는 데 사용된다. 인간 BMPR2의 뉴클레오티드 서열은 진뱅크 수탁번호 NM_001204를 참조하면 공공적으로 이용가능하고 본 명세서에서 서열번호 11로서 개시되어 있다. BMPR2의 상응하는 아미노산 서열은 본 명세서에서 서열번호 12로서 제시된다.

<147> 본 발명의 다양한 관점들이 하기 소단락에서 더 상세하게 설명되어 있다.

BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및 BMPR2에 지향된 항체

<149> 본 발명의 항체들은 특정 기능적 특성 또는 특징으로 구별된다. 예를 들어, 일정 구체예에서, 항체들은 인간 BMP2 및 인간 BMP4로부터 선택된 하나 이상의 골형성 단백질에 특이적으로 결합한다. 대안적 구체예에서, 항체들은 BMPR1A, BMPR1B, 및 BMPR2로부터 선택되는 하나 이상의 골형성 단백질 수용체에 및/또는 ACTR1로부터 선택되는 하나 이상의 액티빈 타입 1 수용체에 특이적으로 결합한다. 일반적으로, 본 발명의 항체는 고 친화도, 예를 들어, 5×10^{-7} M 이하, 더 일반적으로는 5.5×10^{-9} 이하, 더욱 일반적으로는 3×10^{-9} 이하, 더더욱 일반적으로는 2×10^{-9} 이하, 또는 더더욱 일반적으로는 1.5×10^{-9} 이하의 K_D 로 결합한다.

<150> 일 구체예에서, 상기 항체들은 바람직하게는 BMP2 또는 BMP4에는 존재하지만, 다른 단백질에는 존재하지 않는 항원성 에피토프와 결합한다. 상기 항체들은 일반적으로 BMP2 또는 BMP4에 결합하지만, 다른 단백질들에는 결합하지 않거나, 또는 다른 단백질에는, 저 친화도, 예를 들어, 1×10^{-6} M 이상, 더 바람직하게는 1×10^{-5} M 이상, 더욱 바람직하게는 1×10^{-4} M 이상, 더욱 바람직하게는 1×10^{-3} M 이상, 더욱 바람직하게는 1×10^{-2} M 이상의 K_D 로 결합한다. 바람직하게는, 상기 항체들은 실질적으로 연관된 단백질에 결합하지 않고, 예를 들어, 상기 항체들은 BMP3 또는 BMP8b에 실질적으로 결합하지 않는다.

<151> 하나 이상의 골형성 단백질 또는 이의 수용체를 향한 상기 항체들의 결합능을 평가하기 위한 표준 분석 방법은, 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블랏, 유세포 분석 및 RIA 등을 위시하여 당해 분야에 공지되어 있다. 적절한 분석방법은 실시예에서 상세히 설명한다. 항체들의 결합 동력학(예, 결합 친화도)는 ELISA, 스캣차드(Scatchard) 및 바이아코어(Biacore) 분석과 같이, 당해 분야에 공지된 표준 분석방법으로 산정될 수 있다. 다른 예로서, 본 발명의 항체들은 선구연골세포 및/또는 연골세포와 같은 골 세포에 결합할 수 있다.

BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 지향된 인간 단일클론성 항체들

<153> BMP2에 지향된 항체들은 바람직하게 BMP4와 교차반응할 수 있고, BMP4에 지향된 항체들은 바람직하게 BMP2와 교차반응할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 유사하게, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및 BMPR2의 임의의 하나에 지향된 항체들은 바람직하게 교호적인 BMP 및/또는 ACV 수용체 중 임의의 것과 교차반응할 수 있다. 따라서, 본 발명은 V_H 및 V_L 서열들이 유리하게 "혼합되고 짹을 이뤄" 본 발명의 청구범위 내에서 다른 항원-특이성 결합 분자들을 창출하는 것에 관한 것이다. 그러한 "혼합되고 짹을 이룬" 항체들의 특이적 결합은 상기 및 실시예에서 설명한 결합 분석방법(예, FACS 또는 ELISA)을 사용하여 시험될 수 있다. 일반적으로, V_H 및 V_L 사슬들이 혼합되고 짹을 이를 때, 특정 V_H/V_L 짹짓기로부터 나온 V_H 서열은 구조적으로 유사한 V_H 서열로 대체된다. 마찬가지로, 일반적으로 특정 V_H/V_L 짹짓기로부터 나온 V_L 서열은 구조적으로 유사한 V_L 서열로 대체된다.

<154> 본 발명의 바람직한 항체들을 분리하고, 실시예 1 과 2에서 설명된 바와 같이 구조적으로 동정하였고, 이들은 인간 단일클론성 항체 6H4, 11F2, 및 12E3를 포함한다. 6H4, 11F2, 및 12E3의 V_H 아미노산 서열들은 각각 서열 번호 31, 32, 및 33으로 표시된다. 6H4, 11F2, 및 12E3의 V_L 아미노산 서열들은 서열번호 34, 35, 및 36으로 각각 표시된다.

<155> 일 관점에서, 본 발명은:

<156> (a) 서열번호 31, 32, 및 33으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

<157> (b) 서열번호 34, 35 및 36으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원 결합부를 제공하며,

<158> 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4와, 바람직하게는 인간 BMP2 또는 BMP4와 결합한다.

<159> 바람직한 중쇄 및 경쇄 조합은:

<160> (a) 서열번호 31의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 34의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

<161> (b) 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 35의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역; 또는

<162> (b) 서열번호 33의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및 (b) 서열번호 36의 아미노산 서열을 포함하는

경쇄 가변 영역을 포함한다.

<163> 다른 관점에서, 본 발명은 6H4, 11F2, 및 12E3의 중쇄 및 경쇄 CDR1류, CDR2류 및 CDR3류, 또는 이의 조합물을 포함하는 항체들을 제공한다. 6H4, 11F2, 및 12E3의 V_H CDR1들의 아미노산 서열들이 서열번호13, 14, 및 15에 나타나 있다. 6H4, 11F2, 및 12E3의 V_H CDR2들의 아미노산 서열들이 서열번호16, 17, 및 18에 나타나 있다. 6H4, 11F2, 및 12E3의 V_H CDR3들의 아미노산 서열들이 서열번호19, 20, 및 21에 나타나 있다. 6H4, 11F2, 및 12E3의 V_K CDR1들의 아미노산 서열들이 서열번호22, 23, 및 24에 나타나 있다. 6H4, 11F2, 및 12E3의 V_K CDR2들의 아미노산 서열들이 서열번호25, 26, 및 27에 나타나 있다. 6H4, 11F2, 및 12E3의 V_K CDR3들의 아미노산 서열들이 서열번호28, 29, 및 30에 나타나 있다. 카밧 (Kabat) 시스템 (Kabat, E. A., 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 제5판, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)을 사용하여 CDR 부위들의 윤곽을 표시하였다.

<164> 여기서 제공된 단일클론성 항체들의 각각이 (1) BMP2 및 BMP4로부터 선택된 골형성 단백질에 또는 (2) BMPR1A, BMPR1B, BMPR2로부터 선택된 골형성 단백질에 및/또는 ACTR1로부터 선택된 엑티빈 타입 1 수용체에 결합할 수 있고 항원-결합 특이성이 일차적으로 CDR1, CDR2 및 CDR3 부위에 의해 제공된다면, V_H CDR1, CDR2 및 CDR3 서열들 및 V_k CDR1, CDR2 및 CDR3 서열들은 "혼합되고 짹지워"져서 (즉, 비록 각 항체가 V_H CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 V_k CDR1, CDR2 및 CDR3를 포함하여야만 하지만 상이한 항체들의 CDR들을 혼합하고 짹지울 수 있다) 본 발명의 다른 항원-특이성 결합 분자를 만들 수 있다. 그러한 "혼합되고 짹지워진" 항체들의 결합은 상기 및 실시예에서 설명된 결합 분석 방법으로 검사될 수 있다(예, FACS, ELISA, Biacore 분석). 일반적으로, V_H CDR 서열들이 혼합되고 짹지워질 때, 특정 V_H 서열로부터 나온 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3 서열이 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 마찬가지로, V_k CDR 서열들이 혼합되고 짹지워질 때, 특정 V_k 서열로부터 나온 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열은 일반적으로 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체된다. 하나 이상의 V_H 및/또는 V_L CDR 부위 서열들을, 본 발명의 단일클론성 항체들에 대하여 개시된 CDR 서열들로부터 유래된, 구조적으로 유사한 서열들로 대체함으로써 신규 V_H 및 V_L 서열들을 만들 수 있다는 것이 당해분야의 숙련자들에게는 당연하게 받아들여질 것이다.

<165> 다른 관점에서, 본 발명은:

(a) 중쇄 가변 영역 CDR1;

(b) 중쇄 가변 영역 CDR2;

(c) 중쇄 가변 영역 CDR3;

(d) 경쇄 가변 영역 CDR1;

(e) 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

(f) 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 분리된 단일클론성 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하며;

<172> 각 중쇄 가변 영역 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3 및 각 경쇄 가변 영역 CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3는 한 개, 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개 또는 여섯 개 골형성 단백질 수용체 결합 항체(들)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고; 및 상기 항체(들)은 BMP2 및/또는 BMP4 (일반적으로는 인간 BMP2 및/또는 BMP4)에 특이적으로 결합한다.

<173> 따라서, 다른 관점에 있어서, 본 발명은:

(a) 서열번호 13, 14, 및 15로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;

(b) 서열번호 16, 17, 및 18로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;

(c) 서열번호 19, 20, 및 21로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;

(d) 서열번호 22, 23, 및 24로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;

(e) 서열번호 25, 26, 및 27로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및

- <179> (f) 서열번호 28, 29, 및 30으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함하는 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원 결합부를 제공하며,
- <180> 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4, 바람직하게는 인간 BMP2 또는 BMP4에 결합한다.
- <181> 바람직한 구체예에서, 상기 항체는:
- <182> (a) 서열번호 13을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <183> (b) 서열번호 16을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <184> (c) 서열번호 19를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <185> (d) 서열번호 22를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <186> (e) 서열번호 25를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <187> (f) 서열번호 28을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다.
- <188> 다른 바람직한 구체예에서, 상기 항체는:
- <189> (a) 서열번호 14를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <190> (b) 서열번호 17을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <191> (c) 서열번호 20을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <192> (d) 서열번호 23을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <193> (e) 서열번호 26을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <194> (f) 서열번호 29를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다.
- <195> 또 다른 바람직한 구체예에서, 상기 항체는:
- <196> (a) 서열번호 15를 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR1;
- <197> (b) 서열번호 18을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR2;
- <198> (c) 서열번호 21을 포함하는 중쇄 가변 영역 CDR3;
- <199> (d) 서열번호 24를 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR1;
- <200> (e) 서열번호 27을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR2; 및
- <201> (f) 서열번호 30을 포함하는 경쇄 가변 영역 CDR3을 포함한다.
- <202> CDR1 및/또는 CDR2 도메인(들)과 독립적으로, 상기 CDR3 도메인은 홀로 동족체 항원에 대한 항체의 결합 특이성을 결정질 수 있다는 것과 공통의 CDR3 서열에 근거하여 동일한 결합 특이성을 가지는 다중 항체들을 발생시킬 수 있다는 것이 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, Klimka 등, *British J. of Cancer* 83(2):252-260 (2000) 참조. [쥐 항-CD30 항체 Ki-4의 중쇄 가변 영역 CDR3만을 사용하여 인간화된 항-CD30의 생성을 설명함]; Beiboer 등, *J. Mol. Biol.* 296:833-849 (2000) [부모 쥐 MOC-31 항-EGP-2 항체의 중쇄 CDR3 서열만을 사용하여 재조합 상피 당단백질-2 (EGP-2) 항체들을 설명함]; Rader 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:8910-8915 (1998) [쥐 항-인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 항체 LM609의 중쇄 및 경쇄 가변 CDR3 도메인을 사용하여 인간화된 항-인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 항체들의 패널을 설명하고 있고 여기서 각 항체 구성원은 CDR3 도메인 외부에 있고 부모 쥐 항체와 동일하거나 더 높은 친화도를 가지고 부모 쥐 항체와 동일한 에피토프를 결합할 수 있는 구별된 서열을 가진다]; Barbas 등, *J. Am. Chem. Soc.* 116:2161-2162 (1994) [CDR3 도메인은 항원 결합에 가장 중대한 공헌을 한다는 것을 설명함]; Barbas 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92:2529-2533 (1995) [인간 태반 DNA에 대한 세 개 Fab (SI-1, SI-40, 및 SI-32)의 중쇄 CDR3 서열들을 항-파상풍 유독소(toxoid) Fab의 중쇄에 접합하고 이로써 기존의 중쇄 CD3를 대체하는 것을 설명하고, CDR3 도메인 단독으로 결합 특이성을 부여한다는 것을 증명함]; 및 Ditzel 등, *J. Immunol.* 157:739-749 (1996) [부모 다중특이성 Fab LNA3의 중쇄 CDR3 만을 단일특이적인 IgG 파상풍 유독소-결합 Fab p313 항체의 중쇄에 전달하는 것으로도 부모 Fab의 결합 특이성을 유지하는 데 충분하다는 결과를 나타낸 이식 연구를 설명함]. 이러한 각 참고문헌들은 전체적으로 본 명세서상에 참조문헌으

로 통합되어 있다.

<203> 따라서, 특정 관점내에서, 본 발명은 비-인간 항체, 예를 들어 마우스 또는 래트 항체로부터 유래된 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 단일클론성 항체들을 제공하며, 상기 단일클론성 항체는 BMP2 및/또는 BMP4(일반적으로 인간 BMP2 및/또는 BMP4)에 또는 BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2(일반적으로 인간 BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2)에 특이적으로 결합할 수 있다. 특정 구체예 내에서, 비-인간 항체로부터 유래된 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 그러한 본 발명의 항체들은 (a) 결합에 대하여 경쟁할 수 있고; (b) 기능적 특성을 유지하며; (c) 동일한 에피토프에 결합하고; 및/또는 (d) 상응하는 부모 비-인간 항체와 유사한 결합 친화도를 가진다.

<204> 다른 관점 내에서, 본 발명은 제 1 인간 항체, 예를 들어, 비-인간 동물로부터 얻은 인간 항체와 같은 것으로부터 유래한 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 단일클론성 항체들을 제공하며, 상기 제 1 인간 항체는 BMP2 및/또는 BMP4(일반적으로는 인간 BMP2 및/또는 BMP4)에 또는 BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2(일반적으로는 인간 BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2)에 특이적으로 결합할 수 있고, 상기 제 1 인간 항체로부터 유래한 CDR3 도메인은 BMP2 및/또는 BMP4으로의 또는 BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2으로의 결합 특이성이 결여된 인간 항체에서의 CDR3 도메인을 대체하여 각각 BMP2 및/또는 BMP4에 또는 BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 특이적으로 결합할 수 있는 제 2 인간 항체를 생성할 수 있다. 특정 구체예에서, 상기 제 1 인간 항체로부터 유래한 하나 이상의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3 도메인을 포함하는 본 발명의 항체들은 (a) 결합에 대하여 경쟁할 수 있고; (b) 기능적 특성을 유지하며; (c) 동일한 에피토프에 결합하고; 및/또는 (d) 상응하는 부모 제 1 인간 항체와 유사한 결합 친화도를 가진다.

특정 생식세포계열 서열을 가지는 항체

<206> 특정 구체예에서, 본 발명의 항체는 특정 생식세포계열 중쇄 면역글로불린 유전자로부터 유래된 중쇄 가변 영역 및/또는 특정 생식세포계열 경쇄 면역글로불린 유전자로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함한다.

<207> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 인간 항체는, 항체의 가변 영역들이 인간 생식세포계열 면역글로불린 유전자를 사용하는 시스템으로부터 얻어진다면, 특정 생식세포계열 서열의 "생성물" 또는 "이로부터 유래된" 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 그러한 시스템들은 인간 면역글로불린 유전자를 가지는 유전자 이식 마우스를 관심의 항원으로 면역화하거나 또는 과지 상에 전시된 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리를 관심의 항원으로 스크리닝하는 것을 포함한다. 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열의 "생성물" 또는 "이로부터 유래된" 인간 항체는 인간 항체의 아미노산 서열을 인간 생식세포계열 면역글로불린의 아미노산 서열들과 비교하고 서열에 있어서 인간항체의 서열과 가장 가까운(즉 최대 % 상동성) 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열을 선택함으로써 그러한 것으로 확인될 수 있다.

<208> 예를 들어, 바람직한 구체예에서, 본 발명은 인간 V_H 4-59 유전자의 생성물 또는 이로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하며, 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4와 특이적으로 결합한다. 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 인간 V_H 4-34 유전자의 생성물 또는 이로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하며, 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4와 특이적으로 결합한다. 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 인간 V_H 3-33 유전자의 생성물 또는 이로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하며, 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4와 특이적으로 결합한다. 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 인간 V_H 1-69 유전자의 생성물 또는 이로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하며, 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4와 특이적으로 결합한다.

<209> 다른 바람직한 구체예에서의 다른 실시예에서, 본 발명은 인간 V_K A27 유전자의 생성물 또는 이로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하며, 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4와 특이적으로 결합한다. 또 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 인간 V_K L15 유전자의 생성물 또는 이로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하며, 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4와 특이적으로 결합한다. 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 인간 V_K L6 유전자의 생성물 또는 이로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하는 바, 상기 항체는 BMP2 또는 BMP4와 특이적으로 결합한다.

<210> 다른 바람직한 구체예에서, 본 발명은 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원-결합부를 제공하며, 상기 항체

는:

- <211> (a) 인간 V_H 4-59, 4-34, 또는 3-33 유전자 (이러한 유전자들은 각각 서열번호 43, 51 및 44에 나타낸 아미노산 서열들을 암호화한다)의 생성물 이거나 이로부터 유래된 중쇄 가변 영역을 포함하고;
- <212> (b) 인간 V_K A27, L6, 또는 L15 유전자 (이러한 유전자들은 각각 서열번호 48, 54, 및 49에 나타낸 아미노산 서열들을 암호화한다)의 생성물이거나 이로부터 유래된 경쇄 가변 영역을 포함하고; 및
- <213> (c) BMP2 또는 BMP4, 바람직하게는 인간 BMP2 또는 BMP4에 특이적으로 결합한다.
- <214> 각각 V_H 4-34 및 V_K L6의 V_H 및 V_K 를 가지는 항체의 예는 6H4이다. 각각 V_H 4-59 및 V_K A27의 V_H 및 V_K 를 가지는 항체의 예는 11F2이다. 각각 V_H 3-33 및 V_K L15의 V_H 및 V_K 를 가지는 항체의 예는 12E3이다.
- <215> 특정 인간 생식세포계열 면역글로불린 서열의 "생성물" 이거나 또는 "이로부터 유래된" 인간 항체는, 예를 들어, 자연발생적 체세포 변이 또는 부위-지정 돌연변이(site-directed mutation)의 인위적 도입으로 인해 생식 세포계열 서열과 비교하여 상이한 아미노산을 포함할 수 있다. 그러나, 선택된 인간 항체는 일반적으로는 인간 생식세포계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과 아미노산 서열에 있어서 적어도 90% 동일하고 다른 종의 생식세포계열 면역글로불린 아미노산 서열들(예, 쥐의 생식세포계열 서열들)과 비교할 때, 인간 항체를 인간이라는 것으로 확인하는 아미노산 잔기들을 포함한다. 특정 경우, 인간 항체는, 아미노산 서열에 있어서, 생식세포계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과, 적어도 95%, 또는 더 바람직하게는 적어도 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일할 수 있다. 일반적으로, 특정 인간 생식세포계열 서열로부터 유래된 인간 항체는 인간 생식세포계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과 단지 10개 아미노산 차이만을 보인다. 특정의 경우, 상기 인간 항체는 생식세포계열 면역글로불린 유전자에 의해 암호화된 아미노산 서열과 단지 5 개, 바람직하게는 4, 3, 2 또는 1 개 아미노산 차이만을 보인다.

상동성 항체

- <216>
- <217> 다른 구체예에서, 본 발명의 항체는 본 명세서에서 설명된 항체들의 아미노산 서열들 및 상기 항체들이 본 발명의 항체들의 소망의 기능적 특성을 보유하는 아미노산 서열들과 상동성인 아미노산 서열들을 포함하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- <218> 예를 들어, 본 발명은 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 단일클론성 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하며:
- <219> (a) 상기 중쇄 가변 영역은 서열번호 31, 32, 및 33으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 상동성인 아미노산 서열을 포함하고;
- <220> (b) 상기 경쇄 가변 영역은 서열번호 34, 35, 및 36으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 상동성인 아미노산 서열을 포함하고; 및
- <221> (c) 상기 항체는 인간 BMP2 또는 BMP4와 1×10^{-7} M 이하의 K_D로 결합한다.
- <222> 상기 항체는 또한 세포 표면-결합된 인간 BMP2 또는 BMP4를 가지는 CHO 세포에 결합할 수 있다. 상기 BMP2 또는 BMP4는 세포 표면 상의 수용체들 또는 이가(bivalent) 실체에 결합될 수 있거나 또는 경막(transmembrane) 도메인을 가진 융합 단백질로서 발현될 수 있다.
- <223> 여러 구체예에서, 상기 항체는, 예를 들어, 인간 항체, 인간화된 항체 또는 키메릭 항체일수 있다.
- <224> 다른 구체예에서, V_H 및/또는 V_L 아미노산 서열들은 상기 설명된 서열들에 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 상동성일 수 있다. 상기 설명된 서열들의 V_H 및 V_L 영역에 높은 (즉, 80% 이상) 상동성을 가지는 V_H 및 V_L 영역을 가지는 항체는 서열번호 31, 32, 33, 34, 35, 및 36을 암호화하는 핵산 분자의 돌연변이생성 (부위-지정 또는 PCR-매개 돌연변이생성)으로 얻은 후, 본 명세서에서 설명된 분석방법을 사용하여 보유하고 있는 기능에 대하여 상기 암호화된 변형된 항체를 시험할 수 있다.
- <225> 본 발명은 또한 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 단일클론성 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하며:
- <226> (a) 상기 중쇄 가변 영역은, 본 명세서에서 제시된 중쇄 가변 영역 및 상기 중쇄 가변 영역이 BMPR1A, BMPR1B,

및/또는 BMPR2로부터 선택된 골형성 단백질 수용체에 및/또는 ACTR1로부터 선택된 액티빈 탑 1 수용체에 특이적으로 결합하는 항체로부터 유래한 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함하고;

<227> (b) 상기 경쇄 가변 영역은, 본 명세서에서 제시된 경쇄 가변 영역 및 상기 가변 영역이 BMPR1A, BMPR1B, 및/또는 BMPR2로부터 선택된 골형성 단백질 수용체에 및/또는 ACTR1로부터 선택된 액티빈 탑 1 수용체에 특이적으로 결합하는 항체로부터 유래한 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열과 적어도 80% 상동성인 아미노산 서열을 포함하며; 및

<228> (c) 상기 항체는 BMPR1A, BMPR1B, 및/또는 BMPR2로부터 선택된 골형성 단백질 수용체에 및/또는 ACTR1로부터 선택된 액티빈 탑 1 수용체에 특이적으로 결합한다.

<229> 다른 구체예에서, 상기 V_H 및/또는 V_L 아미노산 서열들은 본 명세서에서 설명된 항-BMPR1A, BMPR1B, 및/또는 BMPR2 항체와 및/또는 항-ACTR1 서열과 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일할 수 있다. 본 명세서에서 설명된 V_H 및 V_L 영역과 높은 (즉 80% 이상) 동일성을 가지는 V_H 및 V_L 영역을 가지는 항체들은 항-BMPR1A, BMPR1B, 및/또는 BMPR2 항체 및/또는 항-ACTR1의 V_H 또는 V_L 영역을 암호화하는 핵산 분자를 돌연변이 생성(예, 부위-지정 또는 PCR-매개 돌연변이 생성) 시킴으로써 얻어질 수 있다.

<230> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 두 개 서열간의 동일성 백분율은, 두 개 서열 간의 최적의 정렬에 대하여 도입될 필요가 있는 간격들의 수 및 각 간격의 길이를 고려하여, 상기 서열들에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다 (즉, % 상동성 = 동일한 위치의 수/위치의 총 수 x 100). 두 개 서열 간의 비교 및 백분율 동일성 결정은 하기 비제한적 실시예에서 설명된 바와 같이 수학적 알고리즘을 사용하여 이를 수 있다.

<231> 두 개 아미노산 서열간의 동일성 백분율은 E. Meyers 및 W. Miller의 알고리즘 (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988))을 사용하여 결정될 수 있고, 이 알고리즘은 ALIGN 프로그램 (버전 2.0)에 통합되어 있으며, PAM120 가중치 잔기 표, 12의 간격 길이 페널티 및 4의 간격 페널티를 사용한다. 또한, 두 개 아미노산 서열 간의 동일성 백분율은 Needleman 및 Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있고, 이 알고리즘은 GCG 소프트웨어 패키지(<http://www.gcg.com>에서 이용가능) 내의 GAP 프로그램에 통합되어 있으며, 블로섬(Blossum) 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스와, 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 간격 가중치와 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 사용한다.

<232> 추가로 또는 대안적으로, 본 발명의 단백질 서열들을 "조회(query) 서열"로 사용하여 공공 데이터베이스에 대하여 검색을 수행함으로써, 예를 들어, 연관 서열들을 확인할 수 있다. 그러한 검색은 Altschul, 등 (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10의 XBLAST 프로그램 (버전 2.0)을 사용하여 수행될 수 있다. XBLAST 프로그램, 스코어 = 50, 단어길이= 3을 사용하여 BLAST 단백질 검색을 수행하여 본 발명의 항체 분자와 상동인 아미노산 서열들을 얻을 수 있다. 비교 목적으로 이격된 정렬들을 얻기 위해, Gapped BLAST를 Altschul 등, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402에서 설명된 바와 같이 이용할 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 사용할 때, 각각의 프로그램 (예, XBLAST 및 NBLAST)의 설정(default) 변수들을 사용할 수 있다. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 참조.

보존적 변형을 지닌 항체

<234> 일정 구체예에서, 본 발명의 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 것으로, 이러한 CDR 서열들의 하나 이상은 본 명세서에서 설명된 예증적 항체들 또는 이의 보존적 변형물에 기초한 특정 아미노산 서열을 포함하며, 상기 항체는 본 발명의 단일클론성 항체들의 바람직한 기능적 특성을 보유한다.

<235> 따라서, 본 발명은 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론성 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하는 것으로서:

<236> (a) 상기 중쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열번호 19, 20, 및 21의 아미노산 서열들, 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;

<237> (b) 상기 경쇄 가변 영역 CDR3 서열은 서열번호 28, 29, 및 30의 아미노산 서열들 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며; 및

- <238> (c) 상기 항체는 인간 BMP2 또는 BMP4에, 1×10^{-7} M 이하의 K_D 로 결합한다.
- <239> 상기 항체는 또한 세포 표면에 결합된 BMP2 또는 BMP4를 가지는 CHO 세포에 결합할 수 있다.
- <240> 바람직한 구체예에서, 상기 중쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열번호 16, 17, 및 18의 아미노산 서열들, 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고; 및 상기 경쇄 가변 영역 CDR2 서열은 서열번호 25, 26, 및 27의 아미노산 서열들, 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.
- <241> 다른 바람직한 구체예에서, 상기 중쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열번호 13, 14, 및 15의 아미노산 서열들, 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열; 및 상기 경쇄 가변 영역 CDR1 서열은 서열번호 22, 23, 및 24의 아미노산 서열들, 및 이의 보존적 변형물로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다.
- <242> 다양한 구체예에서, 상기 항체는, 예를 들어, 인간 항체들, 인간화된 항체들 또는 키메릭 항체들일 수 있다.
- <243> 본 발명은 또한, CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 분리된 단일클론성 항체 또는 이의 항원 결합부를 제공하는 것으로서:
- <244> (a) 상기 중쇄 가변 영역 CDR3 서열은 본 명세서에서 개시된 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및 항-BMPR2 단일클론성 항체 및 이의 보존적 변형물로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고;
- <245> (b) 상기 경쇄 가변 영역 CDR3 서열은 본 명세서에서 개시된 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및 항-BMPR2 단일클론성 항체 및 이의 보존적 변형물로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며; 및
- <246> (c) 상기 항체는 BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2와 특이적으로 결합한다.
- <247> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "보존적 서열 변형물"은 그 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합 특성을 유의하게 변화 또는 또는 변경하지 않는 아미노산 변형체를 지칭하는 것으로 의도된다. 그러한 보존적 변형물은 아미노산 치환, 첨가 및 결실을 포함한다. 부위-지정 돌연변이 생성법 및 PCR-매개 돌연변이 생성법과 같이, 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여, 본 발명의 항체에 변형을 유도할 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 가지는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 측쇄를 가지는 아미노산 잔기의 일 군은 당해 분야에 정의되어 있다. 이러한 군들은 염기성 측쇄(예, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예, 아스파르트 산, 글루탐산), 비하전된 극성 측쇄 (예, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄 (예, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지 측쇄 (예, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 가진 아미노산을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체의 CDR 부위내에서 하나 이상의 아미노산 잔기는 동일한 측쇄 군으로부터 나온 다른 아미노산 잔기와 대체될 수 있고, 이러한 변형된 항체는 본 명세서에서 설명된 기능 분석 방법을 사용하여 보유된 기능 (즉 (c)에서 설명된 기능)에 대하여 시험할 수 있다.
- <248> 본 발명의 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체
- <249> 다른 구체예에서, 본 발명은 본 발명의 단일클론성 항체들 중 임의의 것과 동일한, 인간 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 상에 있는 에피토프(들)에 결합하는 항체를 제공한다 (즉, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2와의 결합에 대하여, 본 발명의 단일클론성 항체들 중 임의의 것과 교차경쟁할 수 있는 능력을 가진 항체들). 특정 구체예에서, 교차경쟁 연구용의 참조 항체는 본 명세서에서 개시된 단일클론성 항체일 수 있다. 그러한 교차경쟁하는 항체들은 표준 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 결합 분석에서, 본 명세서에서 개시된 항체와 교차 경쟁할 수 있는 능력에 기초하여 확인될 수 있다.
- <250> 바람직한 구체예에서, 교차 경쟁 연구에 사용되는 참조 항체는 단일클론성 항체 6H4 (각각 서열번호 31 및 34에 나타난 바와 같은 V_H 및 V_L 서열을 가짐), 단일클론성 항체 11F2 (각각 서열번호 32 및 35에 나타난 바와 같은 V_H 및 V_L 서열을 가짐), 단일클론성 항체 12E3 (각각 서열번호 33 및 36에 나타난 바와 같은 V_H 및 V_L 서열을 가짐), 또는 실시예 1 및 2에서 확인된 단일클론성 항체들 중 어느 하나일 수 있다. 그러한 교차-경쟁하는 항체들은 표준 BMP2 또는 BMP4 결합 분석에서, 이러한 항체들과 교차경쟁하는 능력에 기초하여 확인될 수 있다. 예를 들어, BIACore 분석법, ELISA 분석법 또는 유세포 측정법을 사용하여 본 발명의 항체들과의 교차 경쟁을 증

명할 수 있다. 인간 BMP2 또는 BMP4에 대한, 예를 들어, 6H4, 11F2, 또는 12E3의 결합을 방해하는 시험 항체의 능력은 상기 시험 항체가 인간 BMP2 또는 BMP4에 결합하는 것에 대하여 6H4, 11F2, 또는 12E3과 경쟁할 수 있다 는 것과 따라서 및 6H4, 11F2, 또는 12E3과 동일한, 인간 BMP2 또는 BMP4 상의 에피토프에 결합한다는 것을 나타낸다. 바람직한 구체예에서, 6H4, 11F2, 또는 12E3와 동일한 인간 BMP2 또는 BMP4 상의 에피토프에 결합하는 항체는 인간 단일클론성 항체이다. 그러한 인간 단일클론성 항체들은 실시예에서 설명한 바와 같이 제조 및 분리될 수 있다.

<251>

조작된 및 개질된 항체

<252>

본 발명의 항체는 본 명세서에서 개시된 하나 이상의 V_H 및/또는 V_L 서열들을 가지는 항체를 출발 물질로 사용하여, 이러한 출발 항체와는 변형된 특성을 가지는, 개질된 항체를 조작함으로써 제조될 수 있다. 하나 또는 양 쪽 가변 영역(즉 V_H 및/또는 V_L) 내의, 예를 들어, 하나 이상의 CDR 부위 내 및/또는 하나 이상의 골격 부위 내의 하나 이상의 잔기를 변형시킴으로써 항체를 조작할 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 불변 영역(들) 내의 잔기들을 변형함으로써, 항체를 조작하여, 예를 들어, 항체의 작용(effector) 기능(들)을 바꿀 수 있다.

<253>

수행될 수 있는 가변 영역 조작의 한 유형은 CDR 접합이다. 항체들은 주로, 여섯 개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 부위(CDR)에 위치하는 아미노산 잔기를 통해서 타겟 항원과 상호작용한다. 이러한 이유로, CDR 내에 있는 아미노산 서열들은 CDR바깥의 서열들보다 개별적 항체들 간에 있어서 더욱 다양하다. CDR 서열들이 대부분 항체-항원 상호작용을 담당하기 때문에, 상이한 특성을 가지는 상이한 항체로부터 유래된 골격 서열들에 접합된, 특이적 자연발생 항체들로부터 나온 CDR 서열들을 포함하는 발현 벡터들을 제작함으로써 특이적 자연 발생 항체들의 특성을 닮은 재조합 항체들을 발현하는 것이 가능하다(예, Riechmann, L. 등 (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. 등 (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. 등 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; Winter의 미국 특허 제 5,225,539 호 및 Queen 등의 미국 특허 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,693,762호 및 제6,180,370호 참조).

<254>

따라서, 본 발명의 다른 구체예는 본 명세서에서 제시된 제 1 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열들을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 제 2 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2으로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론성 항체 또는 이의 항원 결합부에 관한 것이다. 바람직한 구체예에서, 분리된 단일클론성 항체, 또는 이의 항원 결합부는 각각 서열번호 13, 14, 및 15, 서열번호 16, 17, 및 18, 및 서열번호 19, 20, 및 21로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열들을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 각각 서열번호 22, 23, 및 24, 서열번호 25, 26, 및 27, 및 서열번호 28, 29, 및 30으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열들을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 따라서, 그러한 항체들은 단일클론성 항체들 6H4, 11F2, 및 12E3의 V_H 및 V_L CDR 서열들을 포함하나, 이러한 항체들로부터 상이한 골격 서열들을 포함할 수 있다.

<255>

그러한 골격 서열들은, 예를 들어, 생식세포계열 항체 유전자 서열들을 포함하는 공공 DNA 데이터베이스 또는 공개된 참조문헌으로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자에 대한 생식세포계열 DNA 서열들은 "VBase" 인간 생식세포계열 서열 데이터베이스(www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase의 인터넷 상에서 이용가능)는 물론 Kabat, E. A., 등 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 제5판, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., 등 (1992) "The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops" *J. Mol. Biol.* 227:776-798; 및 Cox, J. P. L. 등 (1994) "A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" *Eur. J. Immunol.* 24:827-836;에서 발견되며, 이의 각각의 전체 내용은 참조문헌으로 본 명세서에 기입된다. 다른 예로서, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 영역 유전자들에 대한 생식세포계열 DNA 서열들은 진뱅크 데이터베이스에서 발견될 수 있다. 예를 들어, HCo7 HuMAb 마우스에서 발견되는 하기 중쇄 생식세포계열 서열들은 첨부한 진뱅크 수탁 번호: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 및 BC070333), 3-33 (NG_0010109 및 NT_024637) 및 3-7 (NG_0010109 및 NT_024637)에서 이용가능하다. 다른 예로서, HCo12 HuMAb 마우스에서 발견되는 하기 중쇄 생식세포계열 서열들은 첨부한 진뱅크 수탁 번호: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 및 BC070333), 5-51 (NG_0010109 및 NT_024637), 4-34 (NG_0010109 및 NT_024637),

3-30.3 (CAJ556644) 및 3-23 (AJ406678)에서 이용가능하다.

<256>

항체 단백질 서열들은 축척된 단백질 서열 데이터베이스와 비교하는 데 당해분야의 숙련자들에게는 공지된, 서열 유사성 검색 방법들 중 하나, 소위 Gapped BLAST으로 불리우는 방법을 사용할 수 있다 (Altschul 등 (1997) *Nucleic Acids Research* 25:3389-3402). BLAST는 발견적(heuristic) 알고리즘으로, 여기서 항체 서열 및 데이터베이스 서열 간의 통계적으로 유의한 정렬은 정렬된 단어들의 고-득점 분절 쌍 (high-scoring segment pairs (HSP))을 포함하는 것이 유리하다. 연장 또는 가지치기에 의해서 그 득점을 향상시키지 못하는 분절 쌍(segment pair)을 히트(hit)라고 칭한다. 간략하게, VBASE 유래의 뉴클레오티드 서열들(<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>)은 번역되어 있고, FR1 내지 FR3 골격 부위간 및 이를 포함하는 부위는 유지되어 있다. 상기 데이터베이스 서열들은 평균 98 잔기의 길이를 가진다. 단백질의 전체 길이에 걸쳐서 완벽히 들어맞는 이중 서열들은 제외된다. 저 복잡도 필터(complexity filter)를 정지시킨 것을 제외하고는 기설정된 (default), 표준 변수들을 가지고 blastp 프로그램 및 BLOSUM62의 치환 매트릭스를 사용하여 단백질들에 대하여 BLAST 검색을 실시하여 5 등까지의 히트를 걸러내어, 서열 짹(match)들을 생성하였다. 그 뉴클레오티드 서열들을 6 개 모든 프레임에서 번역하고 상기 데이터베이스 서열의 매칭 분절에서 정지 코돈이 없는 프레임이 잠재적인 히트로 고려된다. 이를, 다음, BLAST 프로그램 tblastx를 사용하여 확정하였다. 이것은 상기 항체 서열을 6 개 모든 프레임에서 번역하며 이러한 번역물을 6 개 모든 프레임에서 동적으로 번역된 VBASE 뉴클레오티드 서열들과 비교한다.

<257>

정체확인되는 것들은 서열의 전체 길이에 걸쳐서 항체 서열과 단백질 데이터베이스 간의 아미노산이 정확히 들어 맞는 것들이다. 양성인 것들(정체확인물 + 치환 매치)은 일치하지 않고, BLOSUM62 치환 매트릭스에 의해 가이드되는 아미노산 치환물이다. 상기 항체 서열이 동일한 정체로써 데이터베이스 서열 두 개와 매치한다면, 가장 양성적인 것들을 가지는 히트는 매칭 서열 히트인 것으로 결정될 수 있다.

<258>

본 발명의 항체에 사용하기에 바람직한 골격 서열들은 본 발명의 선택된 항체들에 의해 사용된 골격 서열들과 구조적으로 유사한, 예를 들어, 본 발명의 바람직한 단일클론성 항체들에 의해 사용되는 V_H 4-59 골격 서열들(서열번호 43) 및/또는 V_H 3-33 골격 서열들(서열번호 44) 및/또는 V_H 4-34 골격 서열들(서열번호 51) 및/또는 V_H 1-69 골격 서열들 및/또는 V_K A27 골격 서열들(서열번호 48) 및/또는 V_K L15 골격 서열(서열번호 49) 및/또는 L6 V_K 골격 서열들(서열번호 54)과 유사한 것들이다. 상기 V_H CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열, 및 V_K CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열은, 상기 골격 서열이 유래하는 생식세포계열 면역글로불린 유전자에서 발견되는 것과 동일한 서열을 가지는 골격 부위 상에 접합될 수 있거나, 또는 상기 CDR 서열들은 생식세포계열 서열들에 비하여 하나 이상의 변이를 포함하는 골격 부위 상에 접합될 수 있다. 예를 들어, 특정의 경우, 골격 부위 내의 잔기를 변이시켜 항체의 항원 결합능을 유지 또는 향상시킴이 유익한 것이 알려져 있다(예를 들어, Queen 등의 미국 특허 제 5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,693,762호 및 제6,180,370호 참조).

<259>

다른 유형의 가변 영역 변이는 V_H 및/또는 V_K CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 부위 내의 아미노산 잔기를 변이시켜 관심의 항체의 하나 이상의 결합 특성(예, 친화도)을 향상시키는 것이다. 부위-지정 돌연변이생성 또는 PCR-매개 돌연변이생성을 수행하여 변이(들)를 도입하고 항체 결합 또는 다른 관심의 기능적 특성에 대한 효과는 명세서에서 설명한 바 및 실시예에서 제공된 바와 같이, 시험관내 또는 생체내 분석법으로 평가될 수 있다. 일반적으로, 보존적 변이(전술한 바와 같이)가 도입된다. 이러한 변이는 아미노산 치환, 첨가, 또는 결실일 수 있지만, 일반적으로 치환이다. 더욱이, 일반적으로, 하나의 CDR 부위 내에서 하나, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개 잔기만이 변형된다.

<260>

따라서, 다른 구체예에서, 본 개시물은 (a) 서열번호 13, 14, 및 15로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 13, 14, 및 15에 비하여 하나, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개 아미노산 치환, 결실 또는 첨가물을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR1 부위; (b) 서열번호 16, 17, 및 18로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 서열번호 16, 17, 및 18에 비하여 하나, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개 아미노산 치환, 결실 또는 첨가물을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2 부위; (c) 서열번호 19, 20, 및 21로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 19, 20, 및 21에 비하여 하나, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개 아미노산 치환, 결실 또는 첨가물을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR3 부위; (d) 서열번호 22, 23, 및 24로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 22, 23, 및 24에 비하여 하나, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개 아미노산 치환, 결실 또는 첨가물을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 V_K

CDR1 부위; (e) 서열번호 25, 26, 및 27로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산 서열, 또는 서열번호 25, 26, 및 27에 비하여 하나, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개 아미노산 치환, 결실 또는 첨가물을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 V_H CDR2 부위; 및 (f) 서열번호 28, 29, 및 30으로 구성되는 군으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 서열번호 28, 29, 및 30에 비하여 하나, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개 아미노산 치환, 결실 또는 첨가물을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 V_K CDR3 부위를 포함하는 중쇄 가변 영역;을 포함하는, 분리된 항-BMP2/BMP4 단일클론성 항체들, 또는 이의 항원 결합부를 제공한다

<261> 다른 구체예에서, 본 발명은 (a) V_H CDR1 부위; (b) V_H CDR2 부위; (c) V_H CDR3 부위; (d) V_K CDR1 부위; (e) V_K CDR2 부위; 및 (f) V_K CDR3 부위를 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 분리된 단일클론성 항체들 또는 이의 항원 결합부를 제공하며; 각 V_H CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3 부위 및 각 V_K CDR1, CDR2, 및/또는 CDR3 부위는 하나, 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개 또는 여섯 개의 특징적 항-BMPR1A 항체(들); 하나, 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개 또는 여섯 개의 특징적 항-BMPR1B 항체(들); 하나, 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개 또는 여섯 개의 특징적 항-ACTR1 항체(들), 및/또는 하나, 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개 또는 여섯 개의 특징적 항-BMPR2 항체(들)로부터; 또는 하나, 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개 또는 여섯 개의 특징적 항-BMPR1A 항체(들); 하나, 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개 또는 여섯 개의 특징적 항-BMPR1B 항체(들); 하나, 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개 또는 여섯 개의 특징적 항-ACTR1 항체(들); 및/또는 하나, 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개 또는 여섯 개의 특징적 항-BMPR2 항체(들)에 비하여 하나, 두 개, 세 개, 네 개 또는 다섯 개 아미노산 치환, 결실 또는 첨가물을 가지는 아미노산 서열로부터 유래된다.

<262> 본 발명의 조작된 항체들은 V_H 및/또는 V_K, 내의 골격 잔기에 변이가 만들어져서, 예를 들어, 항체의 특성을 향상시키는 것을 포함한다. 일반적으로 그러한 골격 변이들은 항체의 면역원성을 감소시킨다. 예를 들어, 하나의 접근 방법은 하나 이상의 골격 잔기를 상응하는 생식세포계열 서열로 "복귀돌연변이" 시키는 것이다. 더욱 상세하게는, 체세포 변이된 항체는 항체가 유래되는 생식세포계열 서열과는 상이한 골격 잔기를 포함할 수 있다. 그러한 잔기는 항체 골격 서열들과 항체가 유래되는 생식세포계열 서열들을 비교함으로써 확인될 수 있다. 그러한 "복귀돌연변이된" 항체들은 또한 본 발명에 포함된다.

<263> 예를 들어, 6H4의 경우, 카밧 계수 시스템을 사용하여, V_H 의 아미노산 잔기 #3 (FR1 내)은 히스티딘이고(서열 번호 31) 이에 반해 상응하는 V_H 4-34 생식세포계열 서열 내에서의 이러한 잔기는 글루타민이다(서열번호 51). 상기 골격 부위 서열들을 그들의 생식세포계열 구성으로 복귀시키기 위해, 부위-지정 돌연변이생성 또는 PCR-매개 돌연변이생성에 의해 상기 체세포 변이를 생식세포계열 서열로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다(예를 들어, 6H4의 V_H의 잔기 #3(FR1의 잔기 #3)을 히스티딘에서 글루타민으로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다).

<264> 다른 예로서, 11F2의 경우, V_H의 아미노산 잔기 #27 (FR1 내에서)는 아스파테이트이고(서열번호 32) 이에 반해 상응하는 V_H 4-59 생식세포계열 서열에서의 이러한 잔기는 글리신이다(서열번호 43). 상기 골격 부위 서열들을 그들의 생식세포계열 구성으로 복귀시키기 위해, 부위-지정 돌연변이생성 또는 PCR-매개 돌연변이생성에 의해 상기 체세포 변이를 생식세포계열 서열로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다(예를 들어, 11F2의 V_H의 잔기 #27(FR1의 잔기 #27)을 아스파테이드로부터 글리신으로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다).

<265> 다른 예로서, 11F2의 경우, V_H의 아미노산 잔기 #30(FR1 내에서)은 아르기닌이고(서열번호 32) 이에 반해 상응하는 V_H 4-59 생식세포계열 서열에서의 이러한 잔기는 세린이다(서열번호 43). 상기 골격 부위 서열들을 그들의 생식세포계열 구성으로 복귀시키기 위해, 부위-지정 돌연변이생성 또는 PCR-매개 돌연변이생성에 의해 상기 체세포 변이를 생식세포계열 서열로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다(예를 들어, 11F2의 V_H의 잔기 #30(FR1의 잔기 #30)은 아르기닌으로부터 세린으로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다).

<266> 다른 예로서, 11F2의 경우, V_H의 아미노산 잔기 #54(CDR2 내에서)는 아르기닌이고(서열번호 32) 이에 반해 상응하는 V_H 4-59 생식세포계열 서열에서의 이러한 잔기는 세린이다(서열번호 43). 상기 골격 부위 서열들을 그들의 생식세포계열 구성으로 복귀시키기 위해, 부위-지정 돌연변이생성 또는 PCR-매개 돌연변이생성에 의해 상기 체세포 변이를 생식세포계열 서열로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다(예를 들어, 11F2의 V_H의 잔기 #54 (CDR2의 잔기 #5)는 아르기닌으로부터 세린으로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다).

- <267> 11F2에 대한 다른 예로서, V_H의 아미노산 잔기 #58(CDR2 내에서)은 히스티딘이고(서열번호 32) 이에 반해 상응하는 V_H 4-59 생식세포계열 서열에서의 이러한 잔기는 아스파라긴이다(서열번호 43). 상기 골격 부위 서열들을 그들의 생식세포계열 구성으로 복귀시키기 위해, 부위-지정 돌연변이생성 또는 PCR-매개 돌연변이생성에 의해 상기 체세포 변이를 생식세포계열 서열로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다(예를 들어, 11F2의 V_H의 잔기 #58(CDR2의 잔기 #9)은 히스티딘으로부터 아스파라긴으로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다).
- <268> 다른 예로서, 12E3의 경우, V_H의 아미노산 잔기 #52A(CDR2 내에서)는 아스파테이트이고(서열번호 33) 이에 반해 상응하는 V_H 3-33 생식세포계열 서열에서의 이러한 잔기는 티로신이다(서열번호 44). 상기 골격 부위 서열들을 그들의 생식세포계열 구성으로 복귀시키기 위해, 부위-지정 돌연변이생성 또는 PCR-매개 돌연변이생성에 의해 상기 체세포 변이를 생식세포계열 서열로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다(예를 들어, 12E3의 V_H의 잔기 #52A(CDR2의 잔기#4)는 아스파테이트로부터 티로신으로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다).
- <269> 12E3에 대한 다른 예로서, V_H의 아미노산 잔기 #55(CDR2 내에서)는 아르기닌이고(서열번호 33) 이에 반해 상응하는 V_H 3-33 생식세포계열 서열에서의 이러한 잔기는 세린이다(서열번호 44). 상기 골격 부위 서열들을 그들의 생식세포계열 구성으로 복귀시키기 위해, 부위-지정 돌연변이생성 또는 PCR-매개 돌연변이생성에 의해 상기 체세포 변이를 생식세포계열 서열로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다(예를 들어, 12E3의 V_H의 잔기 #55(CDR2의 잔기 #7)는 아르기닌으로부터 세린으로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다).
- <270> 12E3에 대한 다른 예로서, V_H의 아미노산 잔기 #56(CDR2 내에서)는 리신이고(서열번호 33) 이에 반해 상응하는 V_H 3-33 생식세포계열 서열에서의 이러한 잔기는 아스파라긴이다(서열번호 44). 상기 골격 부위 서열들을 그들의 생식세포계열 구성으로 복귀시키기 위해, 부위-지정 돌연변이생성 또는 PCR-매개 돌연변이생성에 의해 상기 체세포 변이를 생식세포계열 서열로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다(예를 들어, 12E3의 V_H의 잔기 #56(CDR2의 잔기#8)은 리신으로부터 아스파라긴으로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다).
- <271> 다른 예로서, 11F2의 경우, V_H의 아미노산 잔기 #82(FR3 내에서)는 메티오닌이고(서열번호 32) 이에 반해 상응하는 V_H 4-59 생식세포계열 서열에서의 이러한 잔기는 류신이다(서열번호 43). 상기 골격 부위 서열들을 그들의 생식세포계열 구성으로 복귀시키기 위해, 부위-지정 돌연변이생성 또는 PCR-매개 돌연변이생성에 의해 상기 체세포 변이를 생식세포계열 서열로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다(예를 들어, 11F2의 V_H의 잔기 #82(FR3의 잔기 #17)는 메티오닌으로부터 류신으로 "복귀돌연변이" 시킬 수 있다).
- <272> 다른 유형의 골격 변이는 골격 부위내의 또는 심지어는 하나 이상의 CDR 부위 내의 하나 이상의 잔기를 돌연변이시켜 T 세포 에피토프를 제거하고 그럼으로써 항체의 잠재적 면역원성을 감소시키는 것을 포함한다. 이러한 접근방식은 또한 "탈면역화"로 칭하여지고 Carr 등의 미국 특허 공개 제20030153043호에 상세히 설명되어 있다.
- <273> 본 발명의 조작된 항체들은 또한 아미노산 잔기들을 변이시켜 항체 상의 T-세포 에피토프의 상호작용을 변형시키는 아미노산 변이를 통해 면역원성 반응을 증가시키거나 감소시키는 것을 포함한다 (예, 미국 특허 제 6,835,550호; 제6,897,049호 및 제6,936249호 참조).
- <274> 골격 또는 CDR 부위 내에서 만들어진 변이에 더하여 또는 대안적으로, 본 발명의 항체들을 조작하여 Fc 부위 내에서 변이를 만들어, 일반적으로 항체의 하나 이상의 특성, 예를들어, 혈청 수명, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원-의존성 세포 독성과 같은 기능적 특성을 변경할 수 있다. 더욱이, 본 발명의 항체를 화학적으로 개질하고 (예, 하나 이상의 화학적 분체를 항체에 붙일수 있다) 또는 글리코실화를 변경하는 것으로 개질하여 항체의 하나 이상의 기능적 특성을 변경할 수 있다. 이러한 구체예들 각각이 하기에 더 상세히 설명되어 있다. Fc 부위에서의 잔기의 번호매김은 카밧의 EU 인덱스의 것과 같다.
- <275> 하나의 구체예에서, CH1의 헌지 부분을 개질하여 헌지 부위에서의 시스테인 잔기들의 수를 변경, 예를들어 증가시키거나 감소시킨다. 이러한 접근 방법은 Bodmer 등의 미국 특허 제 5,677,425 호에 더욱 설명되어 있다. CH1의 헌지 부위에서의 시스테인 잔기의 수를 변경하여, 예를 들어, 경쇄 및 중쇄들의 조합을 쉽게하거나 또는 항체의 안정성을 증가 또는 감소시킨다.
- <276> 다른 구체예에서, 항체의 Fc 헌지 부위를 변이화하여 항체의 생물학적 수명을 감소시킨다. 더욱 상세하게는, 하나 이상의 아미노산 변이를 Fc-헌지 단편의 CH2-CH3 도메인 계면 부위에 도입하여 상기 항체가, 천연 Fc-헌지

도메인 SpA 결합에 비하여, 손상된 포도상구균 단백질 A (SpA) 결합을 가지게 된다. 이러한 방법은 Ward 등의 미국 특허 제 6,165,745 호에 더욱 상세하게 기술되어 있다.

<277> 다른 구체예에서, 상기 항체를 개질시켜 생물학적 수명을 증가시킨다. 다양한 접근 방식이 가능하다. 예를 들어, Ward 등의 미국 특허 제6,277,375호에 기술된 바와 같이, 하나 이상의 하기 변이를 도입할 수 있다: T252L, T254S, 및 T256F. 대안적으로, 생물학적 수명을 연장시키기 위해, Presta 등의 미국 특허 제5,869,046 호 및 제6,121,022호에서 설명된 바와 같이, 항체를 CH1 또는 CL 부위에서 변경시켜 IgG의 Fc 부위의 CH2 도메인의 두 개 루프로부터 얻은 살비지 (salvage) 수용체 결합 에피토프를 포함할 수 있다.

<278> 다른 구체예에서, 본 명세서에서 참조문헌으로 기입된 제WO/2007/059782호에서 기술된 바와 같이, 항체를 유니바디 (UniBody)로서 생성한다.

<279> 다른 구체예에서, 적어도 하나의 아미노산 잔기를 상이한 아미노산 잔기로 치환하여 항체의 작용 (effector) 기능을 변경하도록 Fc 부위를 변경할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 잔기 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 및 322로부터 선택된 하나 이상의 아미노산들을 상이한 아미노산 잔기로 치환하여 항체가 작용(effector) 리간드에 대한 변경된 친화도를 가지지만, 부모 항체의 항원-결합 능력을 보유하게 한다. 친화도가 변경되는 상기 작용리간드는, 예를 들어, Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분일 수 있다. 이러한 방법은 Winter 등의 미국 특허 제 5,624,821호 및 제5,648,260호에 더 상세히 기술되어 있다.

<280> 다른 구체예에서, 아미노산 잔기 329, 331 및 322으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산들을 아미노산 잔기로 치환하여 항체가 변경된 C1q 결합을 가지고 및/또는 감소되거나 폐지된 보체 의존성 세포독성(CDC)을 가지게 된다. 이러한 방법은 Idusogie 등의 미국 특허 제6,194,551호에 상세히 설명되어 있다.

<281> 다른 예에서, 아미노산 위치 231 및 239 내의 하나 이상의 아미노산 잔기를 변형시켜 보체를 고정시키는 항체의 능력을 변경한다. 이러한 방법은 Bodmer 등의 PCT 공개 제WO 94/29351호에 기술되어 있다.

<282> 다른 예에서, 하기 위치에서 하나 이상의 아미노산들을 개질하여 Fc 부위를 개질함으로써 항체 의존성 세포성 세포독성(ADCC)을 매개하는 항체의 능력을 증가시키고 및/또는 Fc γ 수용체에 대한 항체의 친화도를 증가시킨다: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 또는 439. 이러한 방법은 Presta의 PCT 공개 번호 제WO 00/42072호에 더 상세히 기술되어 있다. 더욱이, Fc γ R1, Fc γ RII, Fc γ RIII 및 FcRn에 대한 인간 IgG1 상의 결합 위치가 지도화되어 있고 향상된 결합을 가지는 변이체들이 기술되어 있다 (Shields, R.L. 등 (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 참조). 위치 256, 290, 298, 333, 334 및 339에서의 특이적 변이는 Fc γ RIII에 대한 결합을 향상시키는 것으로 나타난다. 추가로, 하기 조합 돌연변이체가 Fc γ RIII 결합을 향상시키는 것으로 나타난다: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A 및 S298A/E333A/K334A.

<283> 다른 구체예에서, 항체의 글리코실화를 개질시킨다. 예를 들어, 비글리코실화된 항체를 만들 수 있다(즉, 항체가 글리코실화를 결여한다). 글리코실화를 변경하여, 예를 들어, 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수 있다. 그러한 탄수화물 개질은, 예를 들어, 항체 서열 내에서 하나 이상의 글리코실화 위치를 변경함으로써 성취될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 가변 영역 골격 글리코실화 위치를 제거하도록 야기하는 하나 이상의 아미노산 치환을 만들어서 그 위치에서 글리코실화를 없애버릴 수 있다. 그러한 비글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수 있다. 그러한 방법은 Co 등의 미국 특허 제5,714,350호 및 제6,350,861호에 더욱 상세하게 기술되어 있다.

<284> 추가적으로 또는 대안적으로, 변경된 유형의 글리코실화를 가지는 항체, 예를 들어, 감소된 양의 퓨코실 잔기를 가지는 저퓨코실화 항체, 또는 증가된 두갈래 GlcNAc 구조를 가지는 항체를 만들 수 있다. 그러한 변경된 글리고실화 패턴은 항체들의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 나타난다. 그러한 탄수화물 개질은, 예를 들어, 변경된 글리코실화 기제(machinery)를 가진 숙주 세포에서 상기 항체를 발현시킴으로써 이루어 질 수 있다. 변경된 글리코실화 기제를 가진 세포들은 당해 분야에 공지되어 있고 본 발명의 재조합 항체들을 발현하여 변경된 글리코실화를 가지는 항체를 생성하는 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포주 Ms704, Ms705 및 Ms709는 퓨코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8(알파 (1,6) 퓨코실트랜스퍼라제)이 결여되어 있어서, Ms704, Ms705 및 Ms709 세포주에서 발현되는 항체들은 그들 탄수화물을 상에서 퓨코스가 결여되어 있다. Ms704, Ms705 및 Ms709 FUT8^{-/-} 세포주들은 두 개의 대체 백터를 사용하여 CHO/DG44 세포에서 FUT8 유전자를 타겟 파괴함으로써 만들 수 있다

(Yamane 등의 미국 특허 공개 제20040110704호 및 Yamane-Ohnuki 등 (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22 참조). 다른 예로서, Hanai 등의 EP 제1,176,195호에는 퓨코실 트랜스퍼라제를 암호화하고 있는 FUT8 유전자가 기능적으로 파괴되어 있는 세포주가 기술되어 있고, 그러한 세포주에서 발현되는 항체들은 알파 1,6 결합-관련 효소를 감소시키거나 제거함으로써 저퓨코실화를 나타내게 된다. Hanai 등은 또한 항체의 Fc 부위에 결합하는 N-아세틸글루코사민에 퓨코즈를 첨가하는데 낮은 효소 활성을 가지는 또는 그러한 효소 활성을 가지지 않는 세포주, 예를 들어, 래트 골수종 세포주 YB2/0(ATCC CRL 1662)를 기술하고 있다. Presta의 PCT 공개번호 제WO 03/035835호는 변형 CHO 세포주인 Lec13 세포에 대해서 기술하고 있는데, 이 세포들은 Asn(297)-연결 탄수화물에 퓨코즈를 첨부하는 능력이 감소되어 있어서, 그러한 숙주 세포에서 발현된 항체들에 저퓨코실화를 야기하게 된다(Shields, R.L. 등 (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740 참조). Umana 등의 PCT 공개번호 제WO 99/54342호는 당단백질-변형 글리코실 트랜스퍼라제 (예, 베타(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII))를 발현하도록 조작된 세포주를 기술하고 있고, 이러한 조작된 세포주에서 발현된 항체들은 증가된 양 갈래 GlcNAc 구조를 보이고, 결과적으로 상기 항체들의 증가된 ADCC 활성을 나타낸다 (참고, Umana 등 (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). 대안적으로, 퓨코시다제 효소를 사용하여 상기 항체의 퓨코즈 잔기를 절단할 수 있다. 예를 들어, 퓨코시다제 알파-L-퓨코시다제는 항체들에서 퓨코실 잔기를 제거한다 (Tarentino, A.L. 등 (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

<285> 탈퓨코실화는 또한 "향상된 항체 의존성 세포독성 활성을 가지는, 항체 조성을 생성하는 세포(Cells Producing Antibody Compositions with Increased Antibody Dependent Cytotoxic Activity)"의 제목의 미국 특허 제6,946,292호 (교와 하코 쿄교사 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) 일본, 동경)에 설명된 Potelligent™ 방법으로 이를수 있다. 이러한 방법에 의해서, 퓨코실트랜스퍼라제-결핍 숙주 세포들을 사용하여 향상된 수준의 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC) 활성을 가지는 항체를 생산한다.

<286> 본 발명의 탈퓨코실화된 항체를 생성하는 대안적 방법은 Zhu 등, "Production of Human Monoclonal Antibody in Eggs of Chimeric Chickens," *Nature Biotech.* 23:1159-1169 (2005)에 기술된 방법론을 사용한다. 이러한 방법에 의해서, 키메릭 달걀의 흰자위에서 완전히 기능성 단일클론성 항체들을 달걀당 3 밀리그램의 효율로 발현시킨다 [Origen Therapeutics, Burlingame, CA]. 이러한 방식으로 발생된 항체들은 말단 시알산 및 퓨코즈 잔기가 결여되어 있고, 결론적으로 통상적인 포유 세포 배양물 (예, 중국 햄스터 난자 세포)에서 생성된 항체들보다 100-배까지 더 큰 항체-의존성 세포성 세포독성을 가진다. 일반적으로, 본 발명의 항체 가변 도메인을 벡터 시스템(Zhu 등에서 설명된)에 클론하고, 이를 닦 배아 줄기로 형질감염시키고, 치킨 배아로 도입하여, 키메릭 조류 생물반응기(avian bioreactor)를 생성한다.

<287> 본 발명에 따른 항체들의 다른 개질방법은 PEG화(pegylation)이다. 항체를 peg화시켜, 예를 들어, 항체의 생물학적(예, 혈청) 수명을 늘릴 수 있다. 항체를 peg화 시키기 위해, 항체 또는 이의 단편을 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 예를 들어, PEG의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체와, 하나 이상의 PEG 군이 항체 또는 항체 단편에 부착되는 조건 하에서, 반응시킨다. 대표적으로, peg화는 반응성 PEG 분자(또는 유사한 반응성 수용성 중합체)와 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 통해 수행된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "폴리에틸렌 글리콜"은 다른 단백질들, 예를들어, 모노(C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이이미드를 유도하는 데 사용된 PEG의 임의의 형태를 포함하는 것으로 의도된다. 다른 구체예에서, peg화될 항체는 비글리코실화된 항체이다. 단백질을 peg화하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있고, 본 발명의 항체에 적용될 수 있다. 예를 들어, Nishimura 등의 EP 제0 154 316로 및 Ishikawa 등의 EP 제0 401 384호 참조.

항체 물리적 특성

<288> <289> 본 발명의 항체들은 BMP2/BMP4 항체들의 다양한 물리적 특성에 의해 더 특성화될 수 있다. 다양한 분석 방법들을 사용하여 이러한 물리적 특성에 근거하여 항체들의 상이한 류를 검출하고 및/또는 분화시킬 수 있다.

<290> 다른 구체예에서, 본 발명의 항체들은 경쇄 또는 중쇄 가변 영역에서 하나 이상의 글리코실화 장소를 가질 수 있다. 가변 영역에서 하나 이상의 글리코실화 장소가 존재하는 것은 항체의 면역원성을 높이거나 또는 변경된 항원 결합으로 인하여 항체의 pK를 변경하는 결과를 가져올 수 있다(Marshall 등 (1972) *Annu Rev Biochem* 41:673-702; Gala FA 및 Morrison SL (2004) *J Immunol* 172:5489-94; Wallick 등 (1988) *J Exp Med* 168:1099-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12:43R-56R; Parekh 등 (1985) *Nature* 316:452-7; Mimura 등 (2000) *Mol Immunol* 37:697-706). 글리코실화는 N-X-S/T 서열을 포함하는 모티프에서 발생한다고 알려져 있다. 가변 영역 글리코실화는 글로코블랏(Glycoblot) 분석법을 사용하여 시험할 수 있는 데, 이는 항체를 절단하여 Fab를 생성한 후, 과요오드산 산화 및 쉬프(Schiff) 염기 형성을 측정하는 분석법을 사용하여 글리코실화를 시험한다. 대

안적으로, 가변 영역 글리코실화는 다이오네스 광 크로마토그래피(Dionex-LC)를 사용하여 시험할 수 있고, 이는 Fab로부터 당류를 단당류로 절단하고 개별적인 당 함유량을 분석한다. 특정 예에서, 가변 영역 글리코실화를 포함하지 않는 항-CD19 항체를 가지는 것이 바람직하다. 이것은 당해 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여, 가변 영역에서 글리코실화 모티프를 포함하지 않는 항체들을 선택함으로써 또는 글리코실화 모티프 내에 잔기를 변이시킴으로써 이루어 질 수 있다.

<291> 바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체들은 아스파라긴 이성화 장소를 포함하지 않는다. 탈아미드화 또는 이소아스파르트 산 효과는 각각 N-G 또는 D-G 서열들에서 발생할 수 있다. 탈아미드화 또는 이소아스파르트 산 효과는 이소아스파르트 산의 생성을 야기하며, 이는 주 사슬보다는 측쇄 카르복시 말단의 얹힘 구조(kinked structure)를 생성함으로써 항체의 안정성을 저하시킨다. 이소아스파르트 산의 생성은 역상 HPLC를 사용하여 이소아스파르트 산에 대하여 시험하는 등량분석법(iso-quant assay)을 사용하여 측정될 수 있다.

<292> 각 항체는 유일한 등전위점 (pI)을 가지나, 일반적으로 항체들은 6 및 9.5 사이의 pH 범위안에 거한다. IgG1 항체에 대한 pI는 대표적으로 7-9.5의 pH 범위에 있고, IgG4 항체에 대한 pI는 대표적으로 6-8의 pH 범위에 거한다. 항체들은 이러한 범위 외에 있는 pI를 가질 수 있다. 비록 상기 효과들이 일반적으로 공지되어 있지 않더라도, 정상적인 범위외의 pI를 가진 항체들이 생체 내 조건 하에서 풀림(unfolding) 및 불안정성을 가질 수 있다고 생각된다. 상기 등전점은 모세관 등전위 초점 분석법(capillary isoelectric focusing assay)을 사용하여 시험될 수 있고, 이는 pH 구배를 만들고 레이저 포커싱을 사용하여 정확성을 높일 수 있다(Janini 등 (2002) *Electrophoresis* 23:1605-11; Ma 등 (2001) *Chromatographia* 53:S75-89; Hunt 등 (1998) *J Chromatogr A* 800:355-67). 특정의 경우, 정상 범위에 들어가는 pI 값을 포함하는 항-CD19 항체를 가지는 것이 바람직하다. 이것은 정상 범위 내의 pI를 가지는 항체를 선택함으로써, 또는 당 분야에 공지된 표준 기술을 사용하여 하전된 표면 잔기를 변이시킴으로써 이를 수 있다.

<293> 각 항체는 열 안정성을 나타내는 용융점을 가질 수 있다(Krishnamurthy R 및 Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3:361-71). 더 높은 열적 안정성은 생체 내에서 더 큰 전체적인 항체 안정성을 나타낸다. 항체의 용융점은 차등 스캐닝 열량계와 같은 기술을 사용하여 측정될 수 있다(Chen 등 (2003) *Pharm Res* 20:1952-60; Ghirlando 등 (1999) *Immuno Lett* 68:47-52). T_{M1} 은 항체의 초기 풀림의 온도를 나타낸다. T_{M2} 는 항체의 완전한 풀림의 온도를 나타낸다. 일반적으로, 본 발명의 항체의 T_{M1} 은 60°C 이상, 바람직하게는 65°C 이상, 더욱 바람직하게는 70°C 이상이다. 대안적으로, 항체의 열적 안정성은 원편광 이색성 분석(circular dichroism)을 사용하여 측정될 수 있다(Murray 등 (2002) *J. Chromatogr Sci* 40:343-9).

<294> 바람직한 구체예에서, 빠르게 분해되지 않는 항체들을 선택한다. 항-CD19 항체의 단편화는 당해 분야에 공지된 모세관 전기영동(CE) 및 MALDI-MS를 사용하여 측정될 수 있다(Alexander AJ 및 Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67:3626-32).

<295> 다른 바람직한 구체예에서, 최소 결집 효과를 가지는 항체들을 선택한다. 결집되면 원치 않는 면역 반응 및/또는 변형되거나 바람직하지 않은 약물동력학 특성을 개시하게 할 수 있다. 일반적으로, 25% 이하, 바람직하게는 20% 이하, 더욱 바람직하게는 15% 이하, 더더욱 바람직하게는 10% 이하, 또는 더욱더 바람직하게는 5% 이하로 결집하는 항체가 허용된다. 결집은, 크기 배제 컬럼(SEC) 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC), 및 광 분산을 위시한, 당해 분야에 공지된 몇가지 기술을 사용하여 단량체, 이량체, 삼량체 또는 다량체를 확인하여 측정될 수 있다.

항체 공학조작 방법

<296> 전술한 바와 같이, 본 명세서에서 개시된 V_H 및 V_K 서열들을 가지는 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들을 사용하여 V_H 및/또는 V_K 서열들 또는 이에 부착된 불변 영역(들)을 개질함으로써 새로운 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들을 만들수 있다. 따라서, 본 발명의 다른 관점에서, 본 발명의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체의 구조적 특징을 사용하여, 인간 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 특이적으로 결합하는 것과 같은, 본 발명의 항체들의 적어도 하나의 기능적 특성을 보유하는, 구조적으로 관련된 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들을 만들 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체 또는 이의 변이들의 하나 이상의 CDR 부위를 재조합적으로 공지된 골격 부위 및/또는 다른 CDR과 조합하여 상기 검토한 바와 같이 추가의 재조합적으로 조작된 본 발명의 항체를 만들 수 있다.

<298> 변이의 다른 유형은 이전 단원에서 설명되었던 것들을 포함한다. 이러한 조작 방법에 사용되는 개시 물질은 본 명세서에서 제공된 하나 이상의 V_H 및/또는 V_K 서열들 또는 이의 하나 이상의 CDR 부위이다. 조작된 항체를 생성하기 위해, 본 명세서에서 제공된 하나 이상의 V_H 및/또는 V_K 서열들 또는 이의 하나 이상의 CDR 부위를 가지는 항체를 실제적으로 제조하는(즉, 단백질로서 발현시키는) 것은 필요치 않다. 그 보다는, 그 서열(들)에 포함된 정보를 개시 물질로 사용하여 원래 서열(들)로부터 유래된 "2 세대" 서열(들)을 생성한 후, 상기 "2 세대" 서열(들)을 제조하고 단백질로서 발현시킨다.

<299> 따라서, 다른 구체예에서, 본 발명은 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 본 발명은 항-BMP2/BMP4 항체를 제공하는 방법에 있어서:

<300> (a) (i) 서열번호 13, 14, 및 15로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR1 서열, 서열번호 16, 17, 및 18로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR2 서열, 및/또는 서열번호 19, 20, 및 21로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR3 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 항체 서열; 및/또는 (ii) 서열번호 22, 23, 및 24로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR1 서열, 서열번호 25, 26, 및 27로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR2 서열, 및/또는 서열번호 28, 29, 및 30으로 구성되는 군으로부터 선택된 CDR3 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 항체 서열을 제공하고;

<301> (b) 상기 중쇄 가변 영역 항체 서열 및/또는 상기 경쇄 가변 영역 항체 서열 내에서의 적어도 하나의 아미노산 잔기를 변형하여 적어도 하나의 변형된 항체 서열을 생성하고; 및

<302> (c) 상기 변형된 항체 서열을 단백질로서 발현하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

<303> 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 상기 변형된 항체 서열을 제조하고 발현시킬 수 있다.

<304> 대표적으로, 상기 변형된 항체 서열(들)에 의해 암호화된 항체는 본 명세서에서 설명된 하나 이상의 항체들의 기능적 특성중 하나, 일부 또는 전부를 보유하는 것으로서, 상기 기능적 특성은 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 특이적으로 결합하는 것을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

<305> 상기 변형된 항체들의 기능적 특성들은 당해 분야에 이용가능한 표준 분석법을 사용하여 평가될 수 있고, 예를 들어 실시예에 설명되어 있다(예, 유세포 측정법, 결합 분석).

<306> 본 발명의 항체를 조작하는 방법의 특정 구체예에서, 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체 암호화 서열의 전체 또는 일부를 따라서 변이를 무작위적으로 또는 선택적으로 도입할 수 있고, 생성한 개질된 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들을, 본 명세서에 설명된 바와 같이, 결합 활성에 대하여 및/또는 다른 기능적 특성에 대하여 스크리닝할 수 있다. 돌연변이 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, Short의 PCT 공개번호 제WO 02/092780호는 포화 돌연변이 생성법, 합성 결찰 조립법(synthetic ligation assembly) 또는 이의 조합 방법을 사용하여 항체 돌연변이를 생성하고 검출하는 방법을 기술하고 있다. 대안적으로, Lazar 등의 PCT 공개번호 제WO 03/074679호는 컴퓨터화된 스크리닝 방법을 사용하여 항체들의 생리적 특성을 최적화시키는 방법들을 기술하고 있다.

본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자

<308> 본 발명의 다른 관점은 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 분자에 관한 것이다. 상기 핵산은 온전한 세포, 세포 용해물, 또는 부분적으로 정제되거나 실질적으로 순수한 형태 내에 존재할 수 있다. 핵산은, 알카라인/SDS 처리, CsCl 밴딩, 컬럼 크로마토그래피, 아가로즈 젤 전기영동 및 업계에 공지된 다른 기술을 위시한 표준 기술을 사용하여, 다른 세포 성분 또는 다른 오염물, 예를 들어 다른 세포 핵산 또는 단백질로부터 정제될 때, '분리'되거나 "실질적으로 순수하게 된" 것이다. F. Ausubel 등, 편집. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York 참조. 본 발명의 핵산은, 예를 들어, DNA 또는 RNA일 수 있고 및 인트론성 서열들을 포함할 수도 안할 수도 있다. 바람직한 구체예에서, 상기 핵산은 cDNA 분자이다.

<309> 본 발명의 핵산은 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 하이브리도마(예, 후술하는 바, 인간 면역 글로불린 유전자를 지닌 유전자이식 마우스로부터 제조된 하이브리도마)에 의해 발현되는 항체의 경우, 하이브리도마에 의해 만들어진 항체의 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 cDNA는 표준 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술에 의해 얻을 수 있다. 면역글로불린 유전자 라이브러리로부터 얻어진(예, 파지 디스플레이 기술을 사용하여) 항체를 암호화하는 핵산을 회수할 수 있다. 본 발명의 예증적 핵산 분자들은 본 명세서에 제시된 항-BMP2, 항-BMP4, 항-

-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 단일클론성 항체들의 VH 및 VL 서열들을 암호화하는 것들이다.

<310> 본 발명의 바람직한 핵산 분자들은 6H4, 11F2, 및 12E3 단일클론성 항체들의 V_H 및 V_L 서열들을 암호화하는 것들이다. 6H4, 11F2, 및 12E3의 V_H 서열들을 암호화하는 DNA 서열들은 각각 서열번호 37, 38, 및 39에 나타나 있다. 6H4, 11F2, 및 12E3의 V_L 서열들을 암호화하는 DNA 서열은 각각 서열번호 40, 41, 및 42에 나타나 있다.

<311> 본 발명의 다른 바람직한 핵산들은 서열번호 37, 38, 39, 40, 41, 또는 42에 나타낸 서열들 중 하나와 적어도 80% 서열 동일성, 예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 가지는 핵산이고, 이 핵산은 본 발명의 항체 또는 이의 항원-결합부를 암호화한다.

<312> 두 개 핵산 서열들간의 동일성 백분율은 뉴클레오티드가 동일한 서열에서의 위치들의 수이고, 이는 두 개 서열의 최적 정렬에 도입될 필요가 있는 간격들의 수 및 각 간격의 길이를 고려한 것이다. 서열들의 비교 및 두 개 서열 간의 동일성 백분율의 결정은 전술한 Meyers 및 Miller의 알고리즘 또는 Altschul의 XBLAST 프로그램과 같은 수학적 알고리즘을 사용하여 성취될 수 있다.

<313> 본 발명의 다른 바람직한 핵산은 서열번호 37, 38, 39, 40, 41, 및 42에 나타난 핵산 서열들의 하나 이상의 CDR-암호화 부분을 포함한다. 이러한 구체예에서, 상기 핵산은 6H4, 11F2, 및 12E3의 중쇄 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열 또는 6H4, 11F2, 및 12E3의 경쇄 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열을 암호화할 수 있다.

<314> 서열번호 37, 38, 39, 40, 41, 또는 42의 CDR-암호화 부분과 적어도 80% 이상, 예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 가지는 핵산이 또한 본 발명의 바람직한 핵산이다. 그러한 핵산들은 비-CDR 암호화 부위 및/또는 CDR-암호화 부위 내에서 서열번호 37, 38, 39, 40, 41, 또는 42의 상응하는 부분과 상이할 수 있다. 차이가 CDR-암호화 부위에 있을 때, 핵산에 의해 암호화된 핵산 CDR 부위는 대표적으로, 본 명세서에서 정의된 바와 같이, 6H4, 11F2, 및 12E3의 상응하는 CDR 서열에 비하여, 하나 이상의 보존적 서열 변이를 포함한다.

<315> 일단 V_H 및 V_L 절편을 암호화하는 DNA 단편들을 얻는다면, 이러한 DNA 단편들은, 예를 들어, 가변 영역 유전자를, 전장 항체 사슬 유전자, Fab 단편 유전자 또는 scFv 유전자로 전환시키는 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 더 조작할 수 있다. 이러한 조작에서, a V_L- 또는 V_H-암호화 DNA 단편은 항체 불변 영역이나 유연한 링커와 같은 다른 단백질을 암호화하는 다른 DNA 단편과 작동적으로 연결되어 있다. 용어 "작동적으로 연결된"은, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 두 개 DNA 단편들이 연결되어서 그 두 개 DNA 단편들에 의해 암호화된 아미노산 서열들이 프레임 내에 남아있는 것을 의미하는 것으로 의도된다.

<316> V_H 부위를 암호화하는 분리된 DNA는 V_H-암호화 DNA를 중쇄 불변 영역들 (CH1, CH2, 및 CH3)을 암호화하는 다른 DNA 분자와 작동적으로 연결함으로써 전장 중쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자들의 서열은 당해 분야에 공지되어 있고(예, Kabat, E. A., 등 Sequences of Proteins of Immunological Interest, (제5판, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991 참조). 이러한 부위를 포함하는 DNA 단편들은 표준 PCR 증폭으로 얻을 수 있다. 상기 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 부위일 수 있으나, 가장 대표적으로는 IgG1 또는 IgG4 불변 부위이다. Fab 단편 중쇄 유전자의 경우, V_H-암호화 DNA를 중쇄 CH1 불변 부위만을 암호화하는 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결할 수 있다.

<317> V_L-암호화 DNA를 경쇄 불변 부위, C_L을 암호화하는 다른 DNA 분자에 작동적으로 연결시킴으로써, V_L 부위를 암호화하는 분리된 DNA를 전장 경쇄 유전자(Fab 경쇄 유전자는 물론)로 전환시킬 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역 유전자의 서열들은 당해 분야에 공지되어 있고(예를 들어, Kabat, E. A., 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest (5판, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991 참조) 이러한 영역들을 내포하는 DNA 단편들은 표준 PCR 증폭으로 얻을 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있지만, 가장 대표적으로는 카파 불변 영역이다.

<318> scFv 유전자를 창출하기 위해, V_H- 및 V_L-암호화 DNA 단편들을 유연한 링커를 암호화하는, 예를 들어, 아미노산 서열 (Gly₄-Ser)₃을 암호화하는 다른 단편과 작동적으로 연결시켜 V_H 및 V_L 서열들은, 상기 유연한 링커로 연결된 V_L 및 V_H를 가지는 연속적인 단일 사슬 단백질로서 발현되게 할 수 있다(예를 들어, Bird 등 *Science*

242:423-426 (1988); Huston 등 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); 및 McCafferty 등, *Nature* 348:552-554 (1990) 참조).

<319>

본 발명의 단일클론성 항체들의 생성

<320>

본 발명의 단일클론성 항체들 (mAbs)은, 통상적인 단일클론성 항체 방법, 예를 들어, Kohler 및 Milstein *Nature* 256:495 (1975)의 표준 체세포 하이브리드화 기술을 포함하는 다양한 기술로 생성될 수 있다. 비록 체세포 하이브리드화가 선호되지만, 원칙적으로, 단일클론성 항체를 생성하는 다른 기술, 예를 들어, B 임파구의 바이러스성 또는 종양원성적 형질전환을 사용할 수 있다.

<321>

하이브리도마을 제조하기 위한 바람직한 동물 시스템은 쥐 시스템이다. 마우스에서의 하이브리도마 생성은 매우 공고히 확립된 방법이다. 면역화 프로토콜 및 융합용 면역화된 비장세포의 분리 기술은 당해 분야에 공지되어 있다. 융합 파트너들 (예를 들어, 쥐의 골수종 세포) 및 융합 방법이 공지되어 있다.

<322>

본 발명의 키메릭 또는 인간화된 항체들은 전술한 바와 같이, 제조된 쥐의 단일클론성 항체의 서열에 근거하여 제조될 수 있다. 중쇄 및 경쇄 면역글로불린들을 암호화하는 DNA는 관심의 쥐의 하이브리도마로부터 얻을 수 있고, 표준 분자 생물학 기술로 조작하여 쥐가 아닌(예, 인간) 면역글로불린 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 키메릭 항체를 생성하기 위해, 당해 분야에 공지된 기술을 사용하여 쥐의 가변 영역을 인간 불변 영역에 연결시킬 수 있다(예, Cabilly 등의 미국 특허 제4,816,567호 참조). 인간화된 항체를 생성하기 위해, 업계에 공지된 방법을 사용하여 쥐의 CDR 부위들을 인간 골격으로 삽입할 수 있다(예, Winter의 미국 특허 제5,225,539호 및 Queen 등의 미국 특허 제5,530,101호; 제5,585,089호; 제5,693,762호 및 제6,180,370호 참조).

<323>

바람직한 구체예에서, 본 발명의 항체들은 인간 단일클론성 항체들이다. BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 대한 그러한 인간 단일클론성 항체들은 마우스 시스템보다는 인간 면역 시스템의 부분을 지닌 유전자이식성 또는 트랜스염색체성 마우스를 사용하여 생성될 수 있다. 이러한 유전자이식성 및 트랜스염색체성 마우스는 각각 본 명세서에서 HuMAB mouse[®] 및 KM mouse[®]로 지칭되는 마우스를 포함하고 총칭하여 본원에서 "인간 Ig 마우스"라고 한다.

<324>

HuMAB mouse[®](Medarex, Inc.)는 정렬되지 않은 인간 중쇄(μ 및 γ) 및 κ 경쇄 면역글로불린 서열들을, 내인성 μ 및 γ 사슬 좌위를 불활성화 시키는 타겟된 변이와 함께 암호화하는 인간 면역글로불린 유전자 미소좌위(miniloci)를 포함한다(예, Lonberg, 등 *Nature* 368(6474):856-859 (1994) 참조). 따라서, 그 마우스는 마우스 IgM 또는 κ 의 감소된 발현을 나타내고 면역화에 반응하여, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스유전자들은 클래스 전환(switching)과 체세포 변이를 겪게되어서 고 친화도 인간 IgG 단일클론을 생성한다(Lonberg 등, 상기 문헌; Lonberg *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101 (1994); Lonberg 및 Huszar *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995); 및 Harding 및 Lonberg *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546 (1995)에서 검토). HuMab 마우스의 제조와 사용 및 그러한 마우스에 의해 유지되는 염색체 변이는 Taylor, 등 *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295 (1992); Chen 등 *International Immunology* 5:647-656 (1993); Tuailion 등 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724 (1995); Choi 등 *Nature Genetics* 4:117-123 (1993); Chen 등 *EMBO J.* 12:821-830 (1993); Tuailion 등 *J. Immunol.* 152:2912-2920 (1994); Taylor 등 *International Immunology* 6:579-591 (1994); 및 Fishwild 등 *Nature Biotechnology* 14:845-851 (1996)에 더 설명되어 있고, 이 모든 내용은 전체적으로 참조문헌에 기입된다. Lonberg 및 Kay의 미국 특허 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,789,650호; 제5,877,397호; 제5,661,016호; 제5,814,318호; 제5,874,299호; 및 제5,770,429호; Surani 등의 미국 특허 제5,545,807호; Lonberg 및 Kay의 PCT 공개번호 WO 92/03918호, 제WO 93/12227호, 제WO 94/25585호, 제WO 97/13852호, 제WO 98/24884호 및 제WO 99/45962호; 및 Korman 등의 PCT 공개번호 제WO 01/14424호 참조.

<325>

관련된 구체예에서, 인간 면역글로불린 유전자들의 일부를 지닌 마우스를 면역화할 수 있다. 예를 들어, 마우스는 인간 면역글로불린 유전자의 V 부위만을 지닐 수 있다. 이러한 동물들을 면역화시키면, 키메릭 항체들을 생성할 것이다.

<326>

다른 구체예에서, 인간 중쇄 트랜스유전자 및 인간 경쇄 트랜스염색체를 지닌 마우스와 같은, 트랜스유전자 및 트랜스염색체상에 인간 면역글로불린 서열을 지닌 마우스를 사용하여 본 발명의 인간 항체들을 만들 수 있다. 그러한 마우스는 본 명세서에서 "KM mouse[®]"로 지칭되며, Ishida 등의 PCT 공개번호 WO 02/43478 호에 더 상세하게 설명되어 있다.

- <327> 또한, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적 유전자이식 동물 시스템이 당해 분야에서 이용가능하고 본 발명의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 제노마우스 (Xenomouse, Amgen, Inc., Thousand Oaks, CA)로 지칭되는 대안적 유전자이식 시스템을 사용할 수 있고; 그러한 마우스는, 예를 들어, Kucherlapati 등의 미국 특허 제5,939,598호; 제6,075,181호; 제6,114,598호; 제6, 150,584호 및 제6,162,963호에 설명되어 있다.
- <328> 더구나, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 대안적 트랜스염색체성 동물 시스템이 당해 분야에서 이용가능하고 본 발명의 항체들을 생성하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, "TC 마우스"로 지칭되는, 인간 중쇄 트랜스염색체 및 인간 경쇄 트랜스염색체 둘 다를 지닌 마우스를 사용할 수 있고; 그러한 마우스는 Tomizuka 등 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727 (2000)에 설명되어 있다. 다른 예로서, 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스염색체를 지닌 소가 당해 분야에 알려져 있고(Kuroiwa 등 *Nature Biotechnology* 20:889-894 (2002)) 본 발명의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들을 생성하는 데 사용될 수 있다.
- <329> 또한, 당해 분야에 공지된 네이키드 DNA 면역화를 사용하여 (정제된 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2-관련 단백질 또는 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 발현 세포와 같이 또는 없이) 암호화된 면역원에 면역반응을 일으킬 수 있다(개론 참조용으로, Donnelly 등, 1997, *Ann. Rev. Immunol.* 15: 617-648, 이의 전체적인 내용은 본 명세서에서 참조문헌으로 기재됨을 밝힌다). 따라서, 본 발명은 또한 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 유전자 또는 이의 일부로 DNA 면역화하는 것을 포함한다.
- <330> 본 발명의 인간 단일클론성 항체들은 인간 면역글로불린 유전자의 라이브러리를 스크리닝하는 파지 디스플레이 방법들을 사용하여 제조될 수 있다. 인간 항체들을 분리하는 그러한 파지 디스플레이 방법들은 당해 분야에 확립되어 있다. 예를 들어:Ladner 등의 미국 특허 제5,223,409호; 제5,403,484호; 및 제5,571,698호; Dower 등의 미국 특허 제5,427,908호 및 제5,580,717호; McCafferty 등의 미국 특허 제5,969,108호 및 제6,172,197호; 및 Griffiths 등의 미국 특허 제5,885,793호; 제6,521,404호; 제6,544,731호; 제6,555,313호; 제6,582,915호 및 제6,593,081호 참조.
- <331> 본 발명의 인간 단일클론성 항체들은 또한 인간 면역 세포가 재구성되어 인간 항체 반응이 면역화시 발생될 수 있는 SCID 마우스를 사용하여 제조될 수 있다. 그러한 마우스는, 예를 들어, Wilson 등의 미국 특허 제5,476,996호 및 제5,698,767호에 설명되어 있다.
- <332> 본 발명에 따른 항체들은 또한 LEX System™ 및 Plantibodies™ [Biolex, Inc., Pittsboro, NC] 방법에 의해 제조될 수 있는데 여기서 본 발명의 항체는 유전자이식 식물에서 제조된다. 최근 발행된 미국 특허 제6,852,319호, "유전자이식 식물 발현된 항체의 사용 방법"을 참조. 상기 LEX System™은 작은 녹색 수성 식물체, 개구리밥과 (*Lemnaceae*)의 천연 특성을 유전자 조작 및 단백질 회수 방법과 접목시켜 발생 및 생성 기술을 개발하였고, 이는 관련된 정밀한 적용에 의존하여, 기존의 세포 배양 및 유전자이식 발현 시스템을 넘어서는 장점을 제공할 수 있다. 미국 특허 제6,040,498호, 제목 "유전 조작된 좀개구리밥" 및 PCT 특허 출원 공개번호 제WO 99/07210호(형질전환 및 선택 방법, 유전자이식성 식물 재생성 방법, 성장과 회수 방법, 다중 유전자와 벡터, 및 형질전환된 조직과 식물의 사용을 개시한다); PCT 특허 출원 공개번호 제WO 02/10414호, "좀개구리밥에서 생물학적으로 활성인 폴리펩티드류의 발현" (발현 방법 및 조성물, 회수 방법 및 조성물, 발현을 향상 방법, 및 분비 유도 방법을 개시한다); PCT 특허 출원 공개번호 제WO 02/097029호, "고출력 스크리닝 플레이트 및 방법"; PCT 특허 출원 공개번호 제WO 02/097433호, "고출력 스크리닝에서의 좀개구리밥 용도"; 및 미국 특허 제6,680,200호, "세포 웰 플레이트를 조명하는 LED 배열 및 이를 취급하는 자동화된 랙 시스템" 참조. 식물에서 인간 및 다른 항체를 발현하기 위한 Plantibodies™ 방법은 미국 특허 제6,417,429호; 제5,202,422호; 제5,639,947호; 제5,959,177호; 및 제6,417,429호에 개시되어 있다. 이러한 특허 및 특허 출원서 각각은 본 명세서에서 전체적으로 참조문헌으로 기재된다.

인간 Ig 마우스의 면역화

- <333> 인간 Ig 마우스를 사용하여 본 발명의 인간 항체를 생성할 때, 그러한 마우스는 본 발명의 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 항체들; (본 발명의 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 항체들, 본 발명의 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 항체들)을 발현하는 세포주, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 항원의 정제되거나 농축된 제조물, 및/또는 재조합 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 또는 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 융합 단백질

로 면역화시킬 수 있고, 이는 Lonberg 등 *Nature* 368(6474):856-859 (1994); Fishwild 등 *Nature Biotechnology* 14:845-851 (1996); 및 PCT 공개번호 WO 98/24884 및 WO 01/14424에 설명되어 있다. 대표적으로, 상기 마우스는 첫 면역시 6-16 주령이다. 예를 들어, 항원의 정제되거나 재조합 제조물 (5-50 μ g)을 사용하여 인간 Ig 마우스를 복강내로 투여한다.

<335> BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 대한 완전히 인간 단일클론성 항체들을 생성하는 상세 과정이 하기 실시예 1에 기술되어 있다. 다양한 항원들과의 축적된 실험에 따르면, 유전자이식 마우스는, 항원을 포함하는 프로인트 완전 항원보강제(complete Freund's adjuvant)로 복강내 (IP)로 처음 면역화시킨 후, 항원을 함유한 프로인트 불완전 항원보강제(incomplete Freund's adjuvant)로 2 주마다 총 6 번까지 IP 면역화시키면, 반응하는 것으로 나타난다. 그러나, 프로인트와 다른 항원보강제도 효과적이라는 것이 발견되었다. 또한, 어주반트 부재시 온전 세포가 높은 항원성이라는 것도 발견되었다. 면역반응은, 혈장 샘플을 예를 들어, 안화후방 혈액(retroorbital bleed)으로 얻으면서, 면역화 과정에 걸쳐서 모니터될 수 있다. 혈장을 ELISA로 스크린할 수 있고 및 인간 면역글로불린의 충분한 역가를 가진 마우스를 융합에 사용할 수 있다(실시예 1에 설명된 바와 같이). 희생 및 비장 제거 3일 전에 마우스를 항원으로 정맥내 증폭시킨다. 각 면역화에 대하여 2-3 개 융합이 수행되는 것이 필요한 것으로 예상된다. 각 항원에 6 내지 24 마리 마우스를 면역화시킨다. 통상, HCo7 및 HCo12 세포주 둘 다가 사용된다. HCo7 및 HCo12 마우스 세포주의 생성은 미국 특허 제 5,770,429 호 및 PCT 공개번호 WO 01/09187의 실시예 2에 각각 설명되어 있다. 또한, HCo7 및 HCo12 트랜스유전자 둘 다를 두 개의 상이한 인간 중쇄 트랜스유전자 (HCo7/HCo12)를 가진 단일 마우스내로 같이 배양할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, KM mouse[®] 세포주를 사용할 수 있고 이는 PCT 공개번호 제WO 02/43478호에 설명되어 있다.

본 발명의 인간 단일클론성 항체들을 생성하는 하이브리도마의 형성

<337> 본 발명의 인간 단일클론성 항체를 생성하는 하이브리도마를 발생시키기 위해, 면역화된 마우스로부터 얻은 비장세포 및/또는 임파절 세포를 분리하고 적절한 무한증식 세포주, 예를 들어, 마우스 골수종 세포주에 융합시킬 수 있다. 결과로 생성된 하이브리도마를 항원-특이성 항체들의 생성에 대하여 스크린할 수 있다. 예를 들어, 면역화된 마우스로부터 얻은 비장 임파구세포들의 단일 세포 혼탁액을 50% PEG를 사용하여, P3X63-Ag8.653을 분비하지 않는 마우스 골수종 세포(ATCC, CRL 1580)의 6분의 1의 수에 융합시킬 수 있다. 대안적으로, 전기장에 근거한 전기융합 방법, 예를 들어, 사이토펄스(Cyto Pulse) 대형 챔버 세포 융합 전기천공기(Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD)를 사용하여 면역화된 마우스의 비장 임파구의 단일세포 혼탁액을 융합시킬 수 있다. 세포를 평평한 바닥 마이크로타이터 플레이트에 약 2×10^5 로 분주한 후, L-글루타민과 소듐 피루베이트(Mediatech, Inc., Herndon, VA) 및 20% 우태아혈청(Hyclone, Logan, UT), 18% P388DI 조건 배양액, 5% Origen 하이브리도마 클로닝 인자(BioVeris, Gaithersburg, VA), 4 mM L-글루타민, 5mM HEPES, 0.055 mM β -메르캅토에탄올, 50 유닛/ml 폐니실린, 50 mg/ml 스트렙토마이신 및 1X 하이포크산틴-아미노프테린-티민(HAT) 배양액(Sigma; HAT는 융합 24 시간 후에 첨가)를 포함하는 DMEM 고 글루코즈 배양액에 일주일 배양하였다. 일주일 후, HAT가 사용된 배양액에서 배양된 세포를 HT로 치환하였다. 다음, 개별 웰에서 인간 단일클론성 IgM 및 IgG 항체들에 대하여 ELISA로 스크린하였다. 하이브리도마 성장은 통상 10-14 일 수에 관찰될 수 있다. 항체를 분비하는 하이브리도마를 재 분주하고, 다시 스크린하고, 및 인간 IgG에 대하여 여전히 양성이면, 단일클론성 항체들을 제한 회석법으로 적어도 두 번 서브클론할 수 있다. 다음 안정된 서브클론들을 시험관 내에서 배양하여 특성화용 조직 배양액에서 소량의 항체를 생성할 수 있다.

<338> 인간 단일클론성 항체들을 정제하기 위해, 분비된 하이브리도마를 단일클론성 항체 정제용 2 리터 스피너-플라스크에서 배양할 수 있다. 단백질 A-세파로즈(Pharmacia, Piscataway, N.J.)를 사용한 친화 크로마토그래피 전에 상청액을 여과하고 농축할 수 있다. 용출된 IgG를 젤 전기영동과 고성능 액체 크로마토그래피로 점검하여 순도를 확실하게 할 수 있다. 완충액을 PBS로 치환할 수 있고 농도는 1.43 흡광계수를 사용하는 OD280으로 결정될 수 있다. 상기 단일클론성 항체들을 분주하고 -80°C에 보관할 수 있다.

본 발명의 단일클론성 항체를 생성하는 트랜스펙토마의 발생

<340> 본 발명의 항체들은 또한, 예를 들어, 당해 분야에 공지된 바와 같이, 재조합 DNA 기술의 조합과 유전자 형질감염 방법을 사용하여 숙주 세포 트랜스펙토마로 생성될 수 있다(예, Morrison Science 229:1202 (1985)).

<341> 예를 들어, 상기 항체 또는 이의 항체 단편을 발현하기 위해, 일부 또는 전장 경쇄 및 중쇄를 암호화하는 DNA는 표준 문자 생물학 기술(예, PCR 증폭 또는 관심의 항체를 발현하는 하이브리도마를 사용하는 cDNA 클로닝)로써 수득할 수 있고 이러한 DNA들을 벨현 벡터들에 삽입하여 그 유전자가 전사 및 번역 조절 서열에 작동적으로 연

결되게 할 수 있다. 이러한 맥락에서, 용어 "작동적으로 연결된"은 항체 유전자가 벡터로 결찰되어 벡터내의 전사 및 번역 조절 서열들이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 그의 의도된 기능을 행하도록 하는 것을 의미한다. 발현 벡터 및 발현 조절 서열들은 사용되는 발현 숙주 세포에 사용할 수 있도록 선택된다. 항체 경쇄 유전자 및 항체 중쇄 유전자는 별개의 벡터로 삽입될 수 있거나, 더욱 대표적으로는 양쪽 유전자들이 동일한 발현 벡터로 삽입된다. 상기 항체 유전자는 발현 벡터에 표준 방법으로써 (예, 항체 유전자 단편 및 벡터 상의 상보 제한 위치의 결찰 또는 제한 위치가 없는 경우 블런트 말단 결찰) 삽입될 수 있다.

<342> 본 명세서에서 설명된 항체들의 경쇄 및 중쇄 가변 영역들은, 이들을 소망의 이소타입의 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 이미 암호화하고 있는 발현 벡터 내로 삽입하여, 상기 벡터 내에서 V_H 분절이 C_H 분절(들)과 작동적으로 연결되고 벡터내에서 V_L 분절이 C_L 분절과 작동적으로 연결되게 하여, 임의의 항체 이소타입의 전장 항체 유전자를 생성할 수 있다. 추가적으로, 또는 대안적으로, 상기 재조합 발현 벡터는 숙주세포로부터 상기 항체 사슬의 분비를 용이하게 하는 신호 펩티드를 암호화할 수 있다. 상기 항체 사슬 유전자를 벡터로 클론하여 신호 펩티드가 인-프레임으로 항체 사슬 유전자의 아미노산 말단에 연결되게 할 수 있다. 상기 신호 펩티드는 면역글로불린 신호 펩티드 또는 이종성 신호 펩티드(즉 비-면역글로불린 단백질로부터 유래된 신호 펩티드)일 수 있다.

<343> 상기 항체 사슬 유전자에 더하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 항체 사슬 유전자의 발현을 조절하는 조절 서열들을 지닌다. 용어 "조절 서열"은 항체 사슬 유전자의 전사 또는 번역을 조절하는 프로모터, 인핸서 및 다른 발현 조절 요소(예, 폴리아데닐화 신호)를 포함하는 것으로 의도된다. 그러한 조절 서열들은, 예를 들어, Goeddel(Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))에 설명되어 있다. 조절 서열들의 선택을 포함하는 발현 벡터의 구성은 형질전환될 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 요소에 달려있다는 것은 당해 분야의 숙련자에게 이해될 것이다. 포유 숙주 세포 발현에 대한 바람직한 조절 서열은 포유동물 세포에서 높은 수준의 단백질 발현을 계도하는 바이러스성 요소, 예를 들어, 사이토메갈로바이러스(CMV), 시미언 바이러스 40(SV40), 아데노바이러스, 폴리요마로부터 유래된 프로모터 및/또는 인핸서(예, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터(major late promoter (AdML P))를 포함한다. 대안적으로, 비바이러스성 조절 서열들, 예를 들어, 유비퀴틴 프로모터 또는 b-글로빈 프로모터를 사용할 수 있다. 또한, SV40초기 프로모터로부터 유래된 서열들 및 인간 T 세포 백혈병 바이러스 타입 1의 긴 말단 반복체를 포함하는 SRα 프로모터 시스템과 같이 조절 요소들은 상이한 소스로부터 얻어진 서열들로 구성될 수 있다(Takebe 등, *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472 (1988)).

<344> 항체 사슬 유전자 및 조절 서열들에 더하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 추가 서열, 예를 들어, 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열(예, 복제 개시점) 및 선택 마커 유전자는 같은 서열들을 포함할 수 있다. 상기 선택 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선택을 용이하게 한다(예를 들어, Axel 등의 미국 특허 제 4,399,216호, 제4,634,665호 및 제5,179,017호 참조). 예를 들어, 대표적으로, 선택 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포 상에, G418, 하이그로마이신 또는 메토트렉세이트와 같은 약물에 대한 저항성을 부여하는 것이다. 바람직한 선택 마커 유전자는 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR) 유전자(메토트렉세이트 선택/증폭으로 dhfr-숙주 세포에서 사용) 및 네오(neo) 유전자(G418 선택용으로)를 포함한다.

<345> 경쇄 및 중쇄를 발현하기 위해, 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 발현 벡터(들)을 표준 기술로써 숙주 세포로 형질감염시킨다. 용어 "형질감염"의 다양한 유형은 외부 DNA를 원핵 또는 진핵 숙주 세포로 도입하는 데 공통적으로 사용되는 기술, 예를 들어, 전기천공, 칼슘-포스페이트 침전, DEAE-덱스트란 형질감염 등을 내포하는 것으로 의도된다. 비록 본 발명의 항체들을 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 발현하는 것이 이론적으로 가능하다고 할지라도, 원핵 세포 및 가장 대표적으로는 포유 동물 숙주 세포에서 항체를 발현시키는 것이 가장 바람직하고 이는 그러한 진핵 세포 및 특히 포유동물 세포가 원핵 세포보다, 적절히 폴드되고 면역적으로 활성인 항체를 더 잘 모으고 분비하기 때문이다. 항체 유전자의 원핵성 발현은 활성 항체를 높은 효율로 생산하는 것에 비효율적이라는 것이 보고되었다(Boss 및 Wood, *Immunology Today* 6:12-13 (1985)).

<346> 본 발명의 재조합 항체들을 발현하기 위한 바람직한 포유동물 숙주 세포는 차이니스 햄스터 난자 세포(CHO 세포) (Urlaub 및 Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77:4216-4220 (1980)에서 설명된 dhfr- CHO 세포를 포함, Kaufman 및 Sharp *Mol. Biol.* 159:601-621 (1982)에서 설명된 바와 같이, DHFR 선택 마커와 같이 사용), NSO 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포를 포함한다. 특히, NSO 골수종 세포와 같이 사용하기 위해, 다른 바람직한 발현 시스템은 제WO 87/04462호, 제WO 89/01036호 및 EP 제338,841호에 개시된 GS 유전자 발현 시스템이다. 항체 유전자를 암호화하는 재조합 발현 벡터가 포유동물 숙주 세포로 도입될 때, 상기 항체들은 숙주 세포

에서 항체가 발현하기에, 더 대표적으로는 항체가 숙주세포가 배양되는 배양액으로 분비되기에 충분한 시간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 생산될 수 있다. 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양액으로부터 항체를 회수할 수 있다.

<347>

항원에 결합하는 항체의 특성화

<348>

본 발명의 항체들은, 예를 들어, 유세포 측정방법으로, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 대한 결합에 대하여 분석될 수 있다. 간략하게는, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 발현 세포를 조직 배양 플라스크 및 준비된 단일 세포 혼탁액으로부터 수집한다. BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 발현 세포 혼탁액을 일차 항체로 직접적으로 또는 1% 파라포름알데하이드를 함유한 PBS로 투과가 허용되거나 허용되지 않고 고정한 후, 염색한다. 약 백만개의 세포를 0.5% BSA 및 일차 항체 50~200 μ g/ml을 포함하는 PBS에 재현탁시키고 30 분간 얼음상에서 배양한다. 0.1% BSA, 0.01% NaN₃를 함유하는 PBS로 세포를 두 번 세척하고, 1:100 희석된 FITC-접합 염소-항-인간 IgG(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)의 100 μ l에 재현탁하고 추가 30 분간 얼음에 배양한다. 세포를 다시 두번 세척하고, 세척 완충액 0.5 ml에 재현탁시키고, FACSCalibur 세포계수기(Becton-Dickinson, San Jose, CA) 상에서 형광 염색으로 분석한다.

<349>

대안적으로, 본 발명의 항체들을 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 결합하는 것에 대하여 표준 ELISA를 사용하여 분석할 수 있다. 간략히 설명하면, 마이크로타이터 플레이트를 정제된 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2를 0.25 μ g/ml 함유한 PBS로 코팅하고 다음 5% 우혈청 알부민을 함유한 PBS로 차단한다. 항체 희석물(예, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 면역화 마우스로부터 얻은 혈장 희석물)을 각 웰에 첨가하고 1-2 시간 37°C에서 배양한다. 플레이트를 PBS/Tween으로 세척한 다음, 알카라인 포스파타제에 접합된 이차 시약(예, 인간 항체들의 경우, 염소-항-인간 IgG Fc-특이성 다중클론성 시약)과 함께 1 시간 동안 37°C에서 배양한다. 세척후, 플레이트를 pNPP 기질(1 mg/ml)로 발색시키고 405-650의 OD에서 분석하였다. 대표적으로는 최고의 역가를 나타낸 마우스를 융합에 사용한다.

<350>

전술한 바와 같이, ELISA 분석을 또한 사용하여 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 면역원과 양성적인 반응성을 보이는 하이브리도마에 대해 스크리닝할 수 있다. BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 높은 반응성으로 결합하는 하이브리도마를 서브클론하고 더 특성화한다. 부모 세포의 반응성을 보유하고 있는(ELISA에 의해서), 하이브리도마의 클론을 선택하여 5-10 개 바이알 세포 은행을 -140°C에서 저장하게 하고 항체를 정제 한다.

<351>

항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들을 정제하기 위해, 선택된 하이브리도마를 단일클론성 항체 정제용 2 리터들이 스피너-플라스크에서 배양할 수 있다. 상등액을 여과하고 농축한 후 단백질 A-세파로즈(Pharmacia, Piscataway, NJ)로 친화 크로마토그래피한다. 용출된 IgG를 젤 전기영동 및 고성능 액체 크로마토그래피로 분석하여 순도를 확실하게 한다. 완충액을 PBS로 대체할 수 있고, 농도는 1.43 흡광계수를 사용하는 OD₂₈₀에 의해 결정될 수 있다. 단일클론성 항체들을 분주하고 -80°C에서 보관한다.

<352>

선택된 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 단일클론성 항체들이 유일한 에피토프에 결합하는지를 결정하기 위해, 시판되는 시약(Pierce, Rockford, IL)을 사용하여 각 항체를 비오티닐화 시킬 수 있다. 표지되지 않는 단일클론성 항체들 및 비오티닐화된 단일클론성 항체들을 사용한 경쟁 연구를 전술한 바와 같이, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 코팅-ELISA 플레이트에서 실시할 수 있다. 비오티닐화된 mAb 결합은 스트렙-아비딘-알카라인 포스파타제 탐침자로 검출될 수 있다. 대안적으로, 방사능 항체를 사용하여 경쟁 연구를 실시할 수 있고, 미표지 경쟁 항체들은 하기 실시예에서 더 설명되는 바와 같이, 스캐차드(Scatchard) 분석으로 검출될 수 있다.

<353>

정제된 항체들의 이소타입을 결정하기 위해, 특정 이소타입의 항체들에 특이적인 시약을 사용하여 이소타입 ELISA를 수행할 수 있다. 예를 들어, 인간 단일클론성 항체의 이소타입을 결정하기 위해, 마이크로타이터 플레이트의 웰을 1 μ g/ml의 항-인간 면역글로불린으로 밤새 4°C에서 코팅할 수 있다. 1% BSA로 차단한 후, 플레이트를 시험 단일클론성 항체들 또는 정제된 이소타입 대조군의 1 μ g/ml 이하로 주변 온도에서 1 내지 2 시간 반응시킨다. 다음, 웰을 인간 IgG1 또는 인간 IgM-특이성 알카라인 포스파타제-접합 탐침자로 반응시킬 수 있다. 플레이트를 발색시키고 전술한 바와 같이 분석한다.

<354>

웨스턴 블랏팅으로, 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 인간 IgG들을 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 항원과의 반응성에 대하여 더 분석할 수 있다. 간략하게, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2를 준비하고 소듐 도데실 살레이트 폴리아크릴아마이드 젤

전기영동시킨다. 전기영동 후, 분리된 항원들을 니트로셀룰로오스 막에 옮기고, 10% 태아 소혈청으로 차단하고 시험될 단일클론성 항체들로 탐침한다. 인간 IgG 결합은 항-인간 IgG 알카라인 포스파타제를 사용하여 검출하고 BCIP/NBT 기질 타블렛으로 발색하였다(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

<355>

면역접합체

<356>

다른 관점에서, 본 발명은 세포독소, 약물(예, 면역억제제) 또는 방사능독소와 같은 치료적 분체에 접합된 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들, 또는 이의 단편을 특징으로 한다. 본원에서 그러한 접합체들을 "면역접합체"로 지칭한다. 하나 이상의 세포독소를 포함하는 면역접합체는 "면역독소"로 지칭한다. 세포독소 또는 세포독성 제제는 세포에 해로운(예, 죽이는) 임의의 제제를 포함한다. 그 예는 택솔, 사이토칼라신(cytocalasin) B, 그라미시딘 D, 에티듐 브로마이드, 에머틴, 마이토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빙크리스틴, 빙블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-디하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드류, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 퓨로마이신 및 이의 유사체나 동족체를 포함한다. 치료제는 또한, 예를 들어, 항대사체(예, 메토트렉세이트, 6-메르캅토퓨린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루로우라실 데카르바진), 알킬화제(예, 메크로레타민, 티오테파, 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴(BSNU) 및 로무스틴(CCNU), 시클로토스파미드, 부설판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 마이토마이신 C 및 시스-디클로로디아민 플라티넘 (II) (DDP) 시스플라틴), 안트라시클린(예, 다우노루비신(이전 다우노마이신) 및 독소루비신), 항생제(예, 닥티노마이신(이전, 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신 및 안트라마이신 (AMC)) 및 항-유사분열 제제(예, 빙크리스틴 및 빙블라스틴)을 포함한다.

<357>

본 발명의 특정 관점에서, 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들, 또는 이의 단편을 포함하고 치료적 분체와 접합된 면역 접합체가 제공되며, 여기서 상기 치료적 접합체는 울트라-포텐트 치료제(Ultra-potent Therapeutic, UPT™; Medarex, Inc., Milpitas, CA)인 것으로, 미국 특허 제6,1003,236호 및 제6,638,509호에서 설명되어 있고 [독소 접합체를 설명하고 있고, 여기서 독소(예, 빙블라스틴, 리신, 디프테리아 독소, 아브린, 빙블라스틴 하이드라자이드, 메토트렉세이트 하이드라자이드, 안트라시클린, 인듐과 이트륨의 킬레이트, 금속 킬레이트, 및 안트라시클린)는 폴리에틸렌 글리콜과 디펩티드를 포함하는 절단될 수 있는 스페이서를 통해, 항체 또는 이의 단편 상과 같은 잔기에 결합되어 있다]; 미국 특허 제6,989,452호 및 미국 특허 출원번호 제10/160,972호, 제10/161,234호, 제11/133,970호, 제11/134,685호, 제11/134,826호, 제11/224,580호, 및 제11/398,854호에 설명되어 있다[세포독성 제제, 이황화 전구약물, 웨პ티딜 전구약물, 및 화학적 링크와 같은 링크를 설명한다].

<358>

본 발명의 항체에 접합될 수 있는 치료적 세포독소의 다른 바람직한 예는 듀오카르마이신, 칼리케아미신, 메이탄신 및 오리스타틴 및 이의 유도체를 포함한다. 칼리케아미신 항체 접합체의 예는 상업적으로 이용가능하다(Mylotarg®; American Home Products).

<359>

당해 분야에 이용가능한 링커 기술을 사용하여 세포독소를 본 발명의 항체에 접합할 수 있다. 항체에 세포독소를 접합하는데 사용된 링커 유형의 예는, 하이드라존, 티오에테르, 에스테르, 이황화물 및 웨პ티드-함유 링커를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 리소좀 구획 내에서 저 pH에 의해 절단되거나, 카텝신(예, 카텝신 B, C, D)과 같이 종양 조직에서 선호적으로 발현되는 프로테아제와 같은 프로테아제에 절단되기 쉬운 링커를 선택할 수 있다.

<360>

세포독소의 예는, 예를 들어, 미국 특허 제6,989,452호, 제7,087,600호, 및 제7,129,261호, 및 PCT 출원번호 제PCT/US02/17210호, 제PCT/US2005/017804호, 제PCT/US06/37793호, 제PCT/US06/060050호, 제PCT/US2006/060711호, 제W0/2006/110476호, 및 미국 출원번호 제60/891,028호에 설명되어 있고, 이 모든 것은 전체로서 본 명세서에 참조문헌으로 기입된다. 치료제를 항체에 접합시키는 세포 독소, 링커 및 방법들에 대한 더 상세한 논의는, 하기 문헌, Saito, G. 등 (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. 등 (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. 및 Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. 및 Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264을 참조.

<361>

본 발명의 항체들은 또한 방사능 동소체에 접합되어 세포독성 방사능약물을 생성할 수 있고, 또한 이를 방사능 면역접합체로 지칭한다. 진단적으로 또는 치료적으로 사용하기 위한 항체들에 접합될 수 있는 방사능 동소체의 예는, 요오드¹³¹, 요오드¹²⁵, 인듐¹¹¹, 이트륨⁹⁰ 및 류테튬¹⁷⁷을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 방사능 면역접합체를 제조하는 방법은 당해 분야에 확립되어 있다. 방사능 면역접합체의 예는 시판되며, Zevalin™(Biogen ®

IDEK), Bexxar™(Glaxo-SmithKline) 및 ®(Corixa Pharmaceuticals)을 포함하여, 유사 방법을 사용하여 본 발명의 항체들에 대한 방사능 면역접합체를 제조할 수 있다.

<362> 본 발명의 항체 접합체를 사용하여 주어진 생물학적 반응을 변경할 수 있고, 약물 분체는 전통적인 화학 요법 제제에 한정되는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 상기 약물 분체는 소망의 생물학적 활성을 지닌 단백질 또는 폴리펩티드일 수 있다. 그러한 단백질들은, 예를 들어, 효소적으로 활성인 독소 또는 이의 활성 단편, 예를 들어, 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소 또는 디프테리아 독소; 단백질, 예를 들어, 종양괴사인자 또는 인터페론-γ; 또는 생물학적 반응 변환제, 예를 들어, 림포카인, 인터루킨-1("IL-1"), 인터루킨-2("IL-2"), 인터루킨-6("IL-6", 과립구 대식세포 콜로리 자극 인자("GM-CSF"), 과립구 콜로니 자극 인자("G-CSF") 또는 다른 성장 인자를 포함할 수 있다.

<363> 그러한 치료적 분체를 항체들에 접합하는 기술은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들어, Arnon 등, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy pp. 243-56 (Reisfeld 등, eds., Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 등, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery pp. 623-53 (2nd Ed., Robinson 등, eds., Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological 및 Clinical Applications, pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, pp. 303-16 (Academic Press 1985); 및 Thorpe 등, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982)을 참조할 수 있다.

이중특이성 분자

<365> 다른 관점에서, 본 발명은 본 발명의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들 또는 이의 단편들을 포함하는 이중 특이성 분자를 특징으로 한다. 그러한 항체 또는 이의 항원-결합부는 다른 기능성 분자, 예를 들어, 다른 웨პ티드 또는 단백질(예, 다른 항체 또는 수용체에 대한 리간드)로 유도되거나 연결되어 적어도 두 개 상이한 결합 위치 또는 타겟 분자에 결합하는 이중특이성 분자를 생성할 수 있다. 본 발명의 항체는 사실상 하나 이상의 다른 기능성 분자에 유도되거나 연결되어 두 개 이상의 상이한 결합 위치 및/또는 타겟 분자들에 결합하는 다중특이성 분자를 생성하고, 그러한 다중특이성 분자들은 또한, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "이중특이성 분자"에 내포된다. 본 발명의 이중특이성 분자를 생성하기 위해, 본 발명의 항체를 다른 항체, 항체 단편, 웨პ티드 또는 결합 의태체와 같은 하나 이상의 다른 결합 분자에 기능적으로 연결시켜 (예를 들어, 화학적 커플링, 유전적 융합, 비공유적 연합 또는 기타 등등), 이중특이성 분자가 생긴다.

<366> 따라서, 본 발명은 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 대한 적어도 하나의 제 1 결합 특이성 및 제 2 타겟 에피토프에 대한 제 2 결합 특이성을 포함하는 이중특이성 분자를 포함한다. 본 발명의 특정 구체예에서, 상기 제 2 타겟 에피토프는 Fc 수용체, 예를 들어, 인간 Fc γ RI (CD64) 또는 인간 Fc α 수용체 (CD89)이다. 따라서, 본 발명은 Fc γ R 또는 Fc α R 발현 작용 세포(예, 단핵구, 대식세포 또는 다형핵 세포 (PMN)) 및 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2를 발현하는 타겟 세포 둘 다에 결합할 수 있는 이중특이성 분자를 포함한다. 이러한 이중특이성 분자들은 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 발현 세포들을 작용세포에 타겟시키고 및 Fc 수용체-매개 작용세포 활성, 예를 들어, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 발현세포의 대식작용, 항체 의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 사이토카인 분비 또는 슈퍼옥사이드 음이온의 발생을 개시시킨다.

<367> 이중특이성 분자가 다중특이성인 본 발명의 일 구체예에서, 상기 분자는 항-Fc 결합 특이성 및 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 결합 특이성에 더하여 제 3의 결합 특이성을 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 상기 제 3 결합 특이성은 항-증진 인자 (EF) 부, 예를 들어, 세포독성 활성에 연루된 표면 단백질에 결합하는 분자이고 따라서 타겟 세포에 대하여 면역 반응을 증가시킨다. 상기 "항-증진 인자 부분"은 주어진 분자, 예를 들어 항원 또는 수용체에 결합하는 항체, 기능적 항체 단편 또는 리간드일 수 있고 따라서 Fc 수용체 또는 타겟 세포 항원에 대한 결합 결정자의 작용을 향상시키는 결과를 낳는다. 상기 "항-증진 인자 부분"은 Fc 수용체 또는 타겟 세포 항원과 결합할 수 있다. 대안적으로, 상기 항-증진 인자 부분은 제 1 및 제 2 결합 특이성들이 결합하는 실체와 상이한 실체에 결합할 수 있다. 예를 들어, 항-증진 인자 부분은 세포독성 T-세포와 결합할 수 있다 (예를 들어, CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 또는, 타겟 세포에 대하여

면역 반응을 증진시키는 결과를 가져오는 다른 면역 세포를 통해서).

<368> 일 구체예에서, 본 발명의 이중특이성 분자는 결합 특이성으로서, 적어도 하나의 항체 또는 이의 항체 단편을 포함하고, 예를 들어, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, dAb, 또는 단일 사슬 Fv를 포함한다. 상기 항체는 또한 경쇄 또는 중쇄 이량체 또는 이의 임의의 최소 단편일 수 있고, 예를 들어 Fv 또는 단일 사슬 작제물일 수 있고, 이는 Ladner 등의 미국 특허 제 4,946,778 호에 개시되어 있고, 이의 내용은 참조문헌에 명백히 기입된다.

<369> 다른 구체예에서, Fc γ 수용체에 대한 결합 특이성이 단일클론성 항체에 의해 제공되며, 이의 결합은 인간 면역 글로불린 G(IgG)에 의해 차단되지 않는다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "IgG 수용체"는 염색체 1 상에 위치한 8 개 γ-사슬 유전자들 중의 임의의 것을 지칭한다. 이러한 유전자들은 총 12 개 경막 또는 용해성 수용체 이소유형을 암호화하고 있고 이들은 세 가지 Fc γ 수용체 군으로 나뉜다: Fc γ RI(CD64), Fc γ RII(CD32) 및 Fc γ RIII(CD16). 바람직한 일 구체예에서, Fc γ 수용체는 인간 고친화성 Fc γ RI이다. 인간 Fc γ RI은 72 kDa 분자이고, 단량체성 IgG에 높은 친화도를 나타낸다($10^8 - 10^9 M^{-1}$).

<370> 특정 항-Fc γ 단일클론성 항체들의 생성 및 특성화는 Fanger 등의 PCT 공개번호 WO 88/00052 및 미국 특허 제 4,954,617호에 기술되어 있고, 이의 교시는 본 명세서에 참조문헌에 기입된다. 이러한 항체들은 수용체의 Fc γ의 결합 위치와 구별되는 위치에서 Fc γ RI, Fc γ RII 또는 Fc γ RIII의 에피토프와 결합하고, 따라서, 이의 결합은 IgG의 생리적 수준에 의해서 실질적으로 차단되지 않는다. 본 발명에 유용한 특이성 항-Fc γ RI 항체들은 mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 및 mAb 197이다. mAb 32를 생산하는 하이브리도마는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American type Culture Collection)으로부터 ATCC 수탁번호 HB9469로 이용가능하다. 다른 구체예에서, 상기 항-Fc γ 수용체 항체는 단일클론성 항체 22의 인간화 형태이다 (H22). H22 항체의 생성과 특성화는 Graziano 등 *J. Immunol.* 155 (10):4996-5002 (1995) 및 Tempest 등의 PCT 공개번호 제WO 94/10332호에 기술되어 있다. H22 항체 생성 세포주는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션에 HA022CL1의 기탁하에 기탁되었고 및 수탁번호 CRL 11177을 가진다.

<371> 다른 구체예에서, Fc 수용체에 대한 결합특이성이 인간 IgA 수용체, 예를 들어, Fc-알파 수용체(Fc α RI (CD89))에 결합하는 항체에 의해 제공되며, 이의 결합은 일반적으로 인간 면역글로불린 A(IgA)에 의해 차단되지 않는다. 용어 "IgA 수용체"는 염색체 19 상에 위치한 하나의 α-유전자(Fc α RI)의 유전자 산물을 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 유전자는 55 내지 110 kDa의 수 개의 교호적으로 스플라이스된 경막 이소형태를 암호화하는 것으로 알려져 있다. Fc α RI(CD89)은 단핵구/대식세포, 호산구 및 호중구 과립세포 상에 구조적으로 발현되나, 비작용(non-effector) 세포군에는 아니다. Fc α RI은 IgA1 및 IgA2를 다에 대하여 중간정도의 친화도($\approx 5 \times 10^7 M^{-1}$)를 가지며, 이는 G-CSF 또는 GM-CSF과 같은 사이토카인류에 노출시 증가된다(Morton 등, *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440 (1996)). A3, A59, A62 및 A77로서 동정된, IgA 리간드 결합 도메인 외부의 Fc α RI와 결합하는, 4 개 Fc α RI-특이성 단일클론성 항체가 설명된다(Monteiro 등, *J. Immunol.* 148:1764 (1992)).

<372> Fc α RI 및 Fc γ RI는 본 발명의 이중특이성 분자에 사용하기에 바람직한 개시 수용체이고 이는 이들이 (1) 면역 작용세포, 예를 들어, 단핵구, PMN, 대식세포 및 수지상 세포 상에서 일차적으로 발현되고; (2) 높은 수준(예, 세포당 5,000-100,000)으로 발현되며; (3) 세포독성 활성의 매개자이고(예, ADCC, 대식작용); 및 (4) 이들에 타겟된 자체-항원을 포함한 항원의 항원 제시를 향상하는 데 매개하기 때문이다.

<373> 본 발명의 이중특이성 분자는 당해 분야에 공지된 방법을 사용하여, 구성적 결합 특이성, 예를 들어, 항-FcR 및 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMP1A, 항-BMP1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 결합 특이성들을 접합함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 이중특이성 분자의 각 결합특이성은 분리적으로 생성될 수 있고, 서로 접합될 수 있다. 상기 결합 특이성들이 단백질 또는 펩티드인 경우, 다양한 커플링 또는 교차결합 제제를 공유결합성 접합에 사용할 수 있다. 교차결합 제제의 예는 단백질 A, 카보디이미드, N-석신이미딜-S-아세틸-티오아세테이트(SATA), 5,5'-디티오비스(2-니트로벤조산)(DTNB), o-페닐렌디말레이이미드(oPDM), N-석신이미딜-3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(SPDP) 및 설포설신이미딜 4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트(sulfo-SMCC)를 포함한다 (예, Karpovsky 등 *J. Exp. Med.* 160:1686 (1984); Liu 등 *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82:8648 (1985) 참조). 다른 방법들은 Paulus, *Behring Ins. Mitt. No.* 78:118-132 (1985); Brennan 등 *Science* 229:81-83 (1985) 및 Glennie 등 *J. Immunol.* 139:2367-2375 (1987)에 설명된 것을 포함한다. 바람직한 접합 제제는 SATA 및 sulfo-SMCC이고 둘 다 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)에서 시판한다.

<374> 결합 특이성들이 항체인 경우, 이들은 두 개 중쇄의 C-말단 헌지 부위의 설피드릴 결합을 통해 접합될 수 있다. 특히 바람직한 구체예에서, 접합 전에, 헌지 부위를 개질하여 홀수의 설피드릴 잔기, 대표적으로는 하나를 포함하게 한다.

<375> 대안적으로, 양 쪽 결합 특이성들이 동일 벡터에 암호화되어 있고, 동일한 숙주 세포에서 발현되고 회합된다. 이러한 방법은 상기 이중특이성 분자가 mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ 또는 리간드 x Fab 융합 단백질인 경우 특히 유용하다. 본 발명의 이중특이성 분자는 하나의 단일 사슬 항체와 결합 결정자를 포함하는 단일 사슬 분자 또는 두 개 결합 결정자를 포함하는 단일 사슬 이중특이성 분자일 수 있다. 이중특이성 분자는 적어도 두 개 단일 사슬 분자를 포함할 수 있다. 이중특이성 분자를 제조하는 방법은, 예를 들어, 미국 특허 번호 제 5,260,203호; 제5,455,030호; 제4,881,175호; 제5,132,405호; 제5,091,513호; 제5,476,786호; 제5,013,653호; 제5,258,498호; 및 제5,482,858호에 설명되어 있고, 이들 각각은 본 명세서에 참조문헌으로 기재된다.

<376> 이중특이성 분자가 이의 특이성 타겟에 결합하는 것은, 예를 들어, 효소연관 면역흡착법(ELISA), 방사능면역분석(RIA), FACS 분석, 생체분석(예, 성장 저해) 또는 웨스턴 븍릿 분석으로 확인될 수 있다. 이러한 분석법의 각각은 일반적으로, 관심의 복합체에 특이성인 표지된 시약(예, 항체)를 사용함으로써, 특정 관심의 단백질-항원 복합체의 존재를 검출하고 있다. 예를 들어, FcR-항체 복합체는 항체-FcR 복합체를 인식하고 특이적으로 결합하는 효소-연계 항체 또는 항체 단편을 사용하여 검출될 수 있다. 대안으로, 상기 복합체는 다양한 면역분석법 중 임의의 것을 사용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 상기 항체는 방사능으로 표지되고 방사능면역분석(RIA)에서 사용될 수 있다(예를 들어, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986 참조, 이는 본 명세서에 참조문헌으로 기재됨). 방사능 동위원소는 γ 계수기 또는 신틸레이션 카운터와 같은 수단을 사용하여 또는 자가방사기록법(autoradiography)으로 검출될 수 있다.

항체 단편 및 항체 의태체

<378> 본 발명은 전통적인 항체에 한정되지 않고 및 항체 단편 및 항체 의태체를 사용하여 실행될 수 있다. 후술하는 바와 같이, 다양한 항체 단편 및 항체 의태 기술이 개발되었고 업계에 널리 공지되어 있다. 도메인 항체, 나노바디 및 유니바디와 같은 이러한 많은 기술들이 통상적인 항체 구조의 단편 또는 다른 변형물을 이용하며, 또한 통상적인 항체 결합을 닮지만, 구별되는 기작으로부터 발생되고 이를 통해 기능하는 결합 구조를 사용하는 어피바디, 디에이알핀, 안티칼린, 아비머, 및 베르사바디와 같은 대안적 기술도 있다.

<379> 도메인 항체들(dAbs)은 항체들의 가장 작은 기능적 결합 유닛으로서, 인간 항체의 중쇄(VH) 또는 경쇄(VL) 가변 영역에 상응한다. 도메인 항체들은 약 13 kDa의 분자량을 가진다. 도만티스 리미트드(Domantis Limited)는 전체 인간 VH 및 VL dAb들의 일련의 크고 높은 기능적 라이브러리(각 라이브러리당 백억개 이상의 상이한 서열)를 개발하였고, 이러한 라이브러리를 사용하여 치료적 타겟에 특이한 dAb를 선택한다. 많은 통상적인 항체들과는 달리, 도메인 항체들은 박테리아, 효모, 및 포유동물 세포 시스템에서 잘 발현된다. 도메인 항체들 및 이의 제조방법에 대한 상세점은 미국 특허 번호 제6,291,158호; 제6,582,915호; 제6,593,081호; 제6,172,197호; 제6,696,245호; 미국 출원 일련번호 제2004/0110941호; 유럽 특허 출원번호 제1433846호 및 유럽 특허 제0368684호 및 제0616640호; 제W005/035572호, 제W004/101790호, 제W004/081026호, 제W004/058821호, 제W004/003019호 및 제W003/002609호를 참조할 수 있고, 이들 각각은 전체적으로 본 명세서에서 참조문헌으로 기입된다.

<380> 나노바디들은 천연적으로 발생하는 중쇄 항체의 유일한 구조적 및 기능적 특성을 포함하는 항체-유도 치료 단백질이다. 이를 중쇄 항체들은 단일 가변 도메인(VHH) 및 두 개의 불변 도메인(CH2 및 CH3)을 포함한다. 중요한 것은, 클론되고 분리된 VHH 도메인은 원래 중쇄 항체의 전체 항원-결합 능을 보유하고 있는 완벽하게 안정된 폴리펩ти드이다. 나노바디들은 인간 항체들의 VH 도메인과 높은 상동성을 가지며 활성의 임의의 손실 없이 더 인간화될 수 있다. 중요한 것은 나노바디가 낮은 면역원성 능을 가지며, 이는 나노바디가 주된 화합물로 사용된 영장류 실험에서 확인되었다.

<381> 나노바디들은 통상적인 항체들의 장점과 작은 분자 약물의 중요한 특징을 조합하고 있다. 통상적인 항체들과 같이, 나노바디들은 높은 타겟 특이성, 이들 타겟에 대한 높은 특이성 및 낮은 내재적 독성을 보인다. 그러나, 작은 분자 약물과 같이, 이들은 효소를 저해하며 수용체 틈에 용이하게 접근할 수 있다. 또한, 나노바디들은 매우 안정하고, 주사와 다른 방식으로 투여될 수 있고(예, 제WO 04/041867호 참조, 본 명세서에 참조문헌으로 기입) 제조하기 쉽다. 나노바디의 다른 특징은 그들의 작은 크기의 결과로서, 공통적이지 않거나 숨겨진 에피토프를

인식하고, 그들의 유일한 삼차원적, 약물 포맷 유연성으로 인하여 높은 친화도 및 선택성으로 단백질 타겟의 빈 공간 또는 활성 부위에 결합하며, 약물 전달의 수명, 용이성과 속도를 맞추는 것을 포함한다.

<382> 나노바디들은 단일 유전자에 의해 암호화되며 거의 모든 원핵 및 진핵 숙주, 예를 들어, *E. coli* (예, 미국 특허 번호US 제6,765,087호 참조, 이는 본 명세서에서 참조문헌으로 기입된다), 곰팡이(molds) (예, 아스파질러스 또는 트리코데마) 및 효소 (예, 사카로마이세스, 클루이베로마이세스, 한세눌라 또는 피키아) (미국 특허 번호 제6,838,254호 참조, 이는 본 명세서에서 참조문헌으로 기입된다)에서 효과적으로 생성된다. 제조 공정은 증감될 수 있고 수 킬로그램 양의 나노바디들을 생산하였다. 나노바디들이 통상적인 항체에 비하여, 뛰어난 안정성을 나타내므로, 이들은 긴 보관 수명, 즉시 사용되는 용액으로서 배합될 수 있다.

<383> 나노클론 방법 (예, 제WO 06/079372호 참조, 이는 본 명세서에서 참조문헌으로 기입된다)은 B-세포의 자동화된 고출력 선택에 기초하여, 바람직한 타겟에 대하여 나노바디를 생성하는 독점적 방법으로서 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다.

<384> 유니바디들은 또 다른 항체 단편 기술이지만, 이러한 것은 IgG4 항체들의 헌지 부위를 제거하는 것에 기초한다. 헌지 부위를 삭제하면 통상적인 IgG4 항체들의 크기에 본질적으로 절반인 분자가 생성되고, IgG4 항체들의 이가 결합 부위보다는 일가 결합 부위를 가진다. IgG4 항체들이 비활성적이고 따라서 면역계와 상호작용하지 않으며, 이는 면역 반응을 원치 않는 질병 치료에 장점일 수 있고, 및 이러한 장점은 유니바디에 있음이 또한 공지되어 있다. 예를 들어, 유니바디들은 그들이 결합된 세포를 저해하거나 침묵시키게, 그러나 죽이지는 않게 가능할 수 있다. 또한, 암세포에 결합하는 유니바디는 중식하도록 이들을 자극하지 않는다. 더구나, 유니바디들은 통상적 IgG4 항체의 크기의 반 정도이기 때문에, 더 큰 고형암에 걸쳐 잠재적으로 유리한 효능으로 더 좋은 분포를 나타낼 수 있다. 유니바디들은 온전한 IgG4 항체들과 유사한 속도로 신체에서 제거되며 온전한 항체들과 유사한 항원 친화도로 결합할 수 있다. 유니바디들의 상세점은 PCT 공개번호 제WO2007/059782호를 참조할 수 있고, 이는 본 명세서에서 참조문헌으로 기입된다.

<385> 어피바디 분자들은 58-아미노산 잔기 단백질 도메인에 기초한 새로운 형태의 친화성 단백질을 나타내며, 스타필로코커스의 단백질 A의 IgG-결합 도메인들 중 하나로부터 유래된 것이다. 이러한 세 개 나선 둑음 도메인은 조합성 파지미드 라이브러리 제작용 골격으로 사용될 수 있고, 이로부터, 파지 디스플레이 기술을 사용하여, 소정의 분자를 타겟하는 어피바디 변이들을 선택할 수 있다 (Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain, Nat Biotechnol 1997;15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, Eur J Biochem 2002;269:2647-55.). 어피바디 분자의 간단하고, 견고한 구조는 이들의 저분자량 (6 kDa)과 조합되어 이들을 다양한 적용에, 예를 들어, 검출 시약에 적절하게 하고 (Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, 등, Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*, J Immunol Methods 2002;261:199-211) 수용체 상호작용을 저해한다 (Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, Protein Eng 2003;16:691-7). 어피바디 및 이의 제조 방법의 상세점은 미국 특허 번호 제5831012호를 참조할 수 있고, 이는 본 명세서에서 참조문헌으로 기입되어 있다.

<386> 표지된 어피바디들은 또한 다량의 이소유형들을 결정하기 위한 적용물을 영상화하는 데 유용하다.

<387> 디에이알핀(DARPin, Designed Ankyrin Repeat Proteins)은 항체 의태 DRP (Designed Repeat Protein) 기술의 한 예이고 이는 비-항체 폴리펩티드의 결합 능력을 이용하기 위해 개발되었다. 안키린 또는 류신이 많은 반복 단백질과 같은 반복 단백질은 편재되어 있는 결합 분자이고, 이는 항체와는 달리, 세포 내 및 세포외적으로 발생한다. 이들의 유일한 모듈식 건축구조는 반복되는 구조적 단위체 (반복체)를 특징으로 하고, 이것들은 함께 쌓여져서 가변성 및 모듈식의 타겟-결합 표면을 나타내는 연장된 반복체 도메인을 형성한다. 이러한 모듈성에 근거하여, 고도로 다양화된 결합 특이성을 가지는 폴리펩티드들의 조합적 라이브러리들을 생성할 수 있다. 이러한 전략은 가변적인 표면 잔기 및 이들이 무작위적으로 반복체 도메인으로 회합되는 것을 나타내는 자가-양립성 반복체들의 콘센서스 구성을 포함한다.

<388> 디에이알핀은 고효율로 박테리아성 발현 시스템에서 생산될 수 있고, 알려진 가장 안정한 단백질에 속한다. 인간 수용체, 사이토카인, 키나아제, 인간 프로테아제, 바이러스 및 막 단백질을 위시한 광범위한 타겟 단백질에 대한 매우 특이적이고, 고친화도 디에이알핀들을 선택하였다. 단단위 나노를 내지 피코를 범위의 친화도를 가지는 디에이알핀들을 얻을 수 있다.

- <389> 디에이알핀들은 ELISA, 샌드위치 ELISA, 유세포 측정분석 (FACS), 면역조직화학 (IHC), 칩 응용, 친화도 정제 또는 웨스턴 블랏팅을 포함하여, 광범위하게 적용해왔다. 디에이알핀들은 또한, 예를 들어, 녹색 형광 단백질 (GFP)에 융합된 세포내 마커 단백질로서 세포내 분획에서 매우 활성이라는 것이 증명되었다. 디에이알핀들은 또한 pM 범위 내에 있는 IC50로 바이러스 입장을 저해하는 데 사용된다. 디에이알핀들은 단백질-단백질 상호작용을 차단하는 데 이상적일 뿐 아니라, 효소를 저해하는 데에도 이상적이다. 프로테아제, 키나아제 및 운반자가 가장 일반적으로 알로스테릭 저해 방식으로 성공적으로 저해되었다. 종양 상에 매우 빠르고 특이적으로 농축되는 것과 매우 양호한 종양 대 혈액 비율로 인하여, 디에이알핀은 생체내 진단 또는 치료 방법에 매우 적절하다.
- <390> 디에이알핀 및 다른 DRP 기술에 관하여 추가의 정보는 미국 특허 출원 공개번호 제2004/0132028호 및 국제 특허 출원 공개번호 제W0 02/20565호를 참조할 수 있고, 둘 다 본 명세서에서 참조문헌으로 기입된다.
- <391> 안티칼린은 추가적인 항체 의태 기술이나, 이 경우, 결합 특이성은, 인간 조직 및 체액에서 자연적으로 및 풍부하게 발현되는 저분자량 단백질 군인, 리포칼린으로부터 유래된다. 리포칼린은 생체 내에서 생리적 수송 및 화학적으로 민감하거나 불용성 화합물의 저장과 관련된 일단의 기능들을 수행하기 위해 발전되었다. 리포칼린은 단백질의 하나의 말단에서 네 개 루프를 지지하는 고도로 보존된 β -배럴을 포함하는 견고하고 고유한 구조를 가진다. 이러한 루프들은 결합 포켓의 입구를 형성하고, 분자의 이러한 부분에서의 형태적 차이는 개별 리포칼린 간의 결합 특이성 다변화를 설명한다.
- <392> 보존된 β -시트 골격에 의해 지지되는 초가변성 루프의 전체 구조는 면역글로불린의 흔적이지만, 리포칼린은 크기에서 항체들과 상당히 상이하며, 단일 면역글로불린 도메인보다 약간 더 큰 160-180 아미노산들의 단일 폴리펩ти드 사슬로 구성된다.
- <393> 리포칼린을 클론하고 이들의 루프를 조작하여 안티칼린을 생성한다. 구조적으로 다양한 안티칼린들의 라이브러리를 생성하였고 안티칼린 디스플레이의 결합 기능의 선택 및 스크리닝을 가능하게 하며, 용해성 단백질을 발현하고 생성하여 원핵 또는 진핵 시스템에서 더 분석할 수 있다. 연구에 따르면, 실질적으로 임의의 인간 타겟 단백질에 특이적인 안티칼린을 개발할 수 있고 분리할 수 있으며, 나노몰 또는 그 이상의 범위의 결합 친화도를 얻을 수 있다는 것이 성공적으로 밝혀졌다.
- <394> 안티칼린은 또한, 소위 듀오칼린으로 불리는, 이중 타겟팅 단백질로서 형성될 수 있다. 듀오칼린은 표준 제조방법으로 용이하게 제조되는 하나의 단량체성 단백질에서 두 개의 분리된 치료적 타겟에 결합하며, 그의 두개 결합 도메인의 구조적 방향과는 관계없이 타겟 특이성 및 친화도를 유지한다.
- <395> 단일 분자를 통하여 다중 타겟들을 조정하는 것은 특히 단일 원인 인자 이상을 포함하는 것으로 알려진 질병에 유리하다. 더욱이, 듀오칼린과 같은 이중 또는 다중 결합 형식은 질병에서 세포 표면 분자를 타겟팅하는데, 신호 유도 경로 상에 작용효과(agonistic effect)를 매개하는 데 또는 세포 표면 수용체들을 결합하고 클러스터링하는 것을 통해 향상된 내부화 효과를 유도하는 데 있어서 상당한 능력을 가진다. 더구나, 듀오칼린의 높은 고유 안정성은 단량체성 안티칼린과 비견되며, 듀오칼린에게 유연한 배합 및 전달 능력을 제공하게 된다.
- <396> 안티칼린에 대한 추가 정보는 미국 특허 번호 제7,250,297호 및 국제 특허 출원 공개번호 제W0 99/16873호에서 발견되며, 이 둘은 본 명세서에서 참조문헌으로 기입된다.
- <397> 본 발명의 맥락에 유용한 또 다른 항체 의태 기술은 아비머이다. 아비머는 시험관내 엑손 셔플링 및 파지 디스플레이에 의해 인간 세포외 수용체 도메인의 거대 군으로부터 유도되었고, 결합 및 저해 특성을 가진 다중도메인 단백질을 생성한다. 다중 독립적 결합 도메인들을 연결하면, 결합활성(avidity)을 생성하고 통상적인 단일-에피토프 결합 단백질에 비하여 향상된 친화도 및 특이성을 생성하게 된다. 다른 잠재적 장점은 대장균 (*Escherichia coli*) 내에서 다중타겟-특이성 분자를 간단하고 효율적으로 생성하고, 프로테아제에 향상된 열안정성 및 저항성을 가지게 한다. 나노몰 이하의 친화도를 가지는 아비머는 다양한 타겟에 대하여 수득되었다.
- <398> 아비머에 대한 추가 정보는 미국 특허 출원번호 제2006/0286603호, 제2006/0234299호, 제2006/0223114호, 제2006/0177831호, 제2006/0008844호, 제2005/0221384호, 제2005/0164301호, 제2005/0089932호, 제2005/0053973호, 제2005/0048512호, 제2004/0175756호에서 발견되며, 이 모두는 본 명세서에 참조문헌으로 기입된다.
- <399> 베르사바디들은(Versabodies) 본 발명에 사용될 수 있는 다른 항체 의태 기술이다. 베르사바디는 >15% 시스테인 함량을 가지는 3-5 kDa의 작은 단백질이고, 높은 이황화물 밀도 골격을 형성하여, 통상적인 단백질이 가지는 소수성 코어를 대신한다. 소수성 코어를 포함하는 많은 수의 소수성 아미노산을 작은 수의 이황화물로 대체하면, 더 작고, 더 강한 친수성 (덜 회합되고 비-특이성 결합)이고, 프로테아제와 열에 더 저항성이 있으며, 더 낮은

밀도의 T-세포 에피토프를 가지는 단백질을 생성하게 되는데 이는, MHC 발현에 대부분 기여하는 잔기가 소수성이기 때문이다. 이러한 네가지 특성 모두는 면역원성에 영향을 끼치는 것이 공지되어 있고, 이들은 같이, 면역원성을 크게 저하시키게 하는 것으로 예상된다.

<400> 베르사바디 대한 영감은 거머리, 뱀, 거미, 전갈, 달팽이, 및 말미잘에 의해 생성되는, 예상되지 못한 낮은 면역원성을 보이는 것으로 알려진 천연적 주입성 생약학물로부터 온 것이다. 모양에 의해서 및 크기를 스크리닝함으로써, 선택된 천연 단백질 군으로 시작하여, 소수성, 단백질 가수분해성 항원 가공 및 에피토프 밀도를 천연적 주입성 단백질에 대한 평균보다 훨씬 낮은 수준으로 최소화하였다.

<401> 베르사바디의 구조가 주어지면, 이러한 항체 의태물들은 다가, 다중 특이성, 다양한 수명 기작, 조직 타겟팅 모듈 및 항체 Fc 부위의 부재를 포함하는 다양한 형식을 제공한다. 더구나, 베르사바디들은 *E. coli*에서 고효율로 제조되며, 이들의 친수성 및 작은 크기 때문에, 베르사바디는 고도로 용해성이고 고 농도로 배합될 수 있다. 베르사바디는 뛰어나게 열에 안정성이고(이들은 끓일 수도 있다) 보관 수명이 길다.

<402> 베르사바디에 대한 추가 정보는 미국 특허 출원 번호 제2007/0191272호에서 발견되며, 본 명세서에서 참조문헌으로 기입된다.

<403> 상기에서 제공된 항체 단편 및 항체 의태 기술의 상세한 설명은 본 명세서의 맥락에서 사용될 수 있는 모든 기술에 포함된 목록인 것으로 의도되지 않는다. 예를 들어, 그리고 비제한적인 방식으로, 다양한 추가 기술이 본 발명의 맥락에서 사용할 수 있는 데, 이는 대안적 폴리펩티드-근거 기술, 예를 들어, 상보적 결정 부위의 융합은, Qui 등, *Nature Biotechnology*, 25(8) 921-929 (2007)에 설명되어 있고 이는 본 명세서에 참조문헌으로 기입되며, 핵산-근거 기술, 예를 들어, RNA 어답터 기술은 미국 특허번호 제5,789,157호, 제5,864,026호, 제5,712,375호, 제5,763,566호, 제6,013,443호, 제6,376,474호, 제6,613,526호, 제6,114,120호, 제6,261,774호, 및 제6,387,620호에 기술되어 있고, 이들 모두 본 명세서에 참조문헌으로 기입된다.

약학적 조성물

<405> 다른 관점에서, 본 발명은 조성물, 예를 들어, 본 발명의 단일클론성 항체들 또는 이의 항원-결합부(들) 중 하나 또는 조합물을 함유하고, 약학적 허용 담체와 함께 배합된 약학적 조성물을 제공한다. 그러한 조성물들은 본 발명의 항체들 또는 면역접합체 또는 이중특이성 분자들의 하나 또는 조합물(예, 두 개 이상의 상이한)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물은 타겟 항원 상의 상이한 에피토프에 결합하는 또는 상보적 활성을 가지는 항체들(또는 면역접합체 또는 이중특이체)의 조합을 포함할 수 있다.

<406> 본 발명의 약학적 조성물은 또한 조합 요법, 즉 다른 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 조합 요법은 본 발명의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체가 적어도 하나의 다른 항-염증성 또는 면역억제제, 골질환 또는 암에 대하여 효능을 가지는 하나 이상의 다른 항체, 및/또는 하나 이상의 화학요법 제제와 조합된 것을 포함할 수 있다. 다양한 공-요법적 방법은 본 발명의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체의 감소된 투약량이 치료적 부작용 감소를 낳는 장점을 가져오게 된다는 것을 알수 있다.

<407> 다른 구체예에서, 본 명세서에서 개시된 치료적 항체들은, 예를 들어, 항-CTLA-4 항체(MDX-010로 지정된 항체에 의해 예증되는)와 조합하는 것 같이, 면역억제 경로를 억제하는 하나 이상의 항체와 조합적으로 사용될 수 있다. CTLA-4 단백질은, 바이러스 또는 박테리아와 같은 외부 물질을 인식할 때, 그 감염에 대하여 싸우도록 면역 반응을 개시하는 특정 임파구 상에서 발견된다. CTLA-4 단백질은 바이러스 또는 박테리아에 대하여 싸우는 면역 세포의 수를 감소시킴으로 면역반응을 중지하도록 도운다. 그러나 면역반응이 빠 및/또는 종양 세포에 대하여 개시될 때, 면역반응을 중지하지 않는 것이 이로우나, 그 대신에 사용할 수 있는 많은 임파구를 유지시킨다. 따라서, MDX-010과 같은 항-CTLA-4 항체는 CTLA-4를 차단하고 면역 활성을 유지시키기 위하여 본 발명의 하나 이상의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체와 조합하여 사용하는 것이 유리하다.

<408> 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "약학적 허용 담체"는 생리적으로 양립할 수 있는, 임의의 및 모든 용매, 분산매, 코팅물, 항박테리아성 및 항균성 제제, 등장액 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 대표적으로, 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구적, 척추 또는 표피 투여(예, 주사 또는 주입으로)에 적합하다. 투여 경로에 의존하여, 활성 화합물, 즉, 항체, 면역접합체 또는 이중특이성 분자는 산의 작용 및 화합물을 불활성화 시키는 다른 자연적 조건으로부터 화합물을 보호하는 물질로 코팅할 수 있다.

<409> 본 발명의 약학적 화합물은 하나 이상의 약학적 허용염을 포함할 수 있다. "약학적 허용염"은 부모 화합물의 바

람직한 생물학적 활성을 유지하고 바람직하지 않은 독소학적 효과를 부여하지 않는 염을 지칭한다(예, Berge 등, *J. Pharm. Sci.* 66:1-19 (1977) 참조). 그러한 염의 예는 산 부가 염 및 염기 부가 염을 포함한다. 산 부가 염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아인산 등과 같은 비독성 무기산으로부터 유도된 것은 물론, 지방족 모노 및 디카르복실 산, 페닐-치환된 알카노 산, 하이드록시 알카노 산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 술폰 산 등과 같은 비독성 유기산으로부터 유도된 것을 포함한다. 염기 부가 염은, 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등과 같은 알카리 토금속으로부터 유도된 것은 물론 N,N'-디벤질에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등과 같은 비독성 유기 아민류로부터 유도된 것을 포함한다.

<410> 본 발명의 약학적 조성물은 또한 약학적 허용 항산화제를 포함할 수 있다. 약학적 허용 항산화제의 예는: (1) 아스코브 산, 시스테인 염산염, 소듐 비설페이트, 소듐 메타비설페이트, 소듐 설파이트 등과 같은 수용성 항산화제; (2) 아스코빌 팔미테이트, 부틸레이티드 하이드록시아니솔(BHA), 부틸레이티드 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등과 같은 지용성 항산화제; 및 (3) 시트르 산, 에틸렌디아민 테트라아세트 산(EDTA), 소르비톨, 타르타르 산, 인산 등과 같은 금속 칼레이트화제를 포함한다.

<411> 본 발명의 약학적 조성물에 사용될 수 있는 적절한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올류(글리콜, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은) 및 이의 적절한 혼합물, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 및 에틸 올레이트와 같은 주사가능한 유기 에스테르류를 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용함으로써, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지함으로써 및 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다.

<412> 이러한 조성물은 보존제, 습윤제, 유화제 및 분산제와 같은 보조제를 또한 포함할 수 있다. 미생물 존재의 예방은 전술한 살균 공정 및, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브 산 등과 같은 다양한 항박테리아 및 항진균성 제제 주입으로 확립할 수 있다. 당, 염화나트륨 등과 같은 등장제제를 조성물에 포함하는 것이 또한 바람직하다. 이에 더하여, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제를 포함하여 주사 약학제형의 흡수를 연장할 수 있다.

<413> 약학적 허용 담체는 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사용액이나 분산액의 임시 제조물용 멸균 분말을 포함한다. 약학적 활성 물질용으로 그러한 매체 및 제제를 사용하는 것은 당해 분야에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매체 또는 제제가 활성 화합물과 양립할 수 없는 경우를 제외하고는, 본 발명의 약학적 조성물에 이를 사용하는 것이 포함된다. 보조적인 활성 화합물 또한 조성물에 포함될 수 있다.

<414> 치료적 조성물은 일반적으로 제조 및 보관 환경하에서 반드시 멸균적이고 안정적이어야 한다. 상기 조성물을 용액, 미소유화액, 리포좀 또는 고 약물 농도에 적합한 다른 규칙적인 구조로서 배합할 수 있다. 담체는, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이의 적절한 혼합물을 포함하는 용매나 분산매일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질을 사용함으로써, 분산액의 경우 필요한 입자 크기를 유지함으로써 및 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 많은 경우에 있어서, 등장제제, 예를 들어, 당, 폴리알코올류, 예를 들어, 만니톨, 소르비톨이나 염화나트륨을 조성물에 포함하는 것이 또한 바람직하다. 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제를 포함하여 주사 약학제형의 흡수를 연장할 수 있다.

<415> 멸균된 주사가능한 용액은, 활성 화합물을 적절한 용매에 요구되는 양으로, 필요한 경우, 상기 설명된 성분 중 하나 또는 조합물과 같이 배합하고, 멸균 마이크로정제하여 제조될 수 있다. 일반적으로 분산액은 상기 활성 화합물을, 염기성 분산매 및 상기 설명된 것의 필요한 다른 성분을 포함하는 멸균 용액(vehicle)에 배합하여 제조된다. 멸균된 주사용 용액을 제조하기 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조(lyophilization)이고 이는 활성 성분에 더하여 이의 이전에 멸균-여과된 용액으로부터 임의의 바람직한 추가 성분의 분말을 산출한다.

<416> 담체 물질과 조합하여 단일 투약 형태를 생성하는 활성 성분의 양은 처리될 대상체 및 투여의 특정 방식에 따라 변할 것이다. 단일 투약 형태를 제조하기 위해 담체 물질과 조합할 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 나타내는 조성물의 양이다. 일반적으로, 100 퍼센트 중에, 이러한 양은 활성 성분의 약 0.01 % 내지 약 99%, 대표적으로는 약 0.1% 내지 약 70%, 더 대표적으로는 활성 성분의 약 1% 내지 약 30%가 약학 허용 담체와 조합되어 있다.

<417> 투약 섭생은 최적의 바람직한 반응 (예, 치료 반응)을 제공하도록 조절된다. 예를 들어, 단일 볼러스가 투여될

수 있고, 수 개 분리된 투약물이 여러 번 투여될 수 있고 또는 투여량은 치료 상태의 긴급성에 의해 지시되는 바와 같이, 비례적으로 감소되거나 증가될 수 있다. 투여의 용이함 및 투여의 일관성을 위해 비경구 조성물을 투약 단위 형태로 배합하는 것이 특히 유리하다. 투약 단위 형태는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 치료될 대상체에 단일성 투약물로서 적절한 물리적으로 분리된 단위체를 지칭하고, 각 단위체는 요구되는 약학적 담체와 연합하여 요구되는 치료 효과를 생성하는 데 계산된 활성 화합물의 소정의 양을 포함한다. 본 발명의 투약 단위 형태에 대한 명세는 (a) 활성 화합물의 독특한 특성 및 이루어지는 특정 치료효과 및 (b) 개인에게서 민감성의 치료를 위해 이러한 활성 화합물을 조제하는 당해 분야에 고유한 제한에 의해 지시되고 및 직접적으로 의존한다.

<418> 항체의 투여의 경우, 투여량은 숙주 체중 kg 당 약 0.0001 내지 100 mg/kg, 더 통상적으로는 0.01 내지 25 mg/kg의 범위이다. 예를 들어, 투여량은 0.3 mg/kg 체중, 1 mg/kg 체중, 3 mg/kg 체중, 5 mg/kg 체중 또는 10 mg/kg 체중이거나 1-10 mg/kg의 범위에 있다. 더 높은 투여량, 예를 들어, 15 mg/kg 체중, 20 mg/kg 체중 또는 25 mg/kg 체중이 필요한 대로 사용될 수 있다. 예증적인 치료 섭생은 일 주에 한번, 이 주에 한번, 삼 주에 한번, 사 주에 한번, 한 달에 한 번, 세 달에 한번, 또는 삼 내지 육 개월에 한 번 투여일 수 있다. 본 발명의 항체에 대한 특정 투여 섭생은 1 mg/kg 체중 또는 3 mg/kg 체중 정맥 내 투여를 포함하고, 상기 항체는 하기 투여 스케줄 중 하나를 이용한다: (i) 4 주마다 6 번 투여 후, 3 달 마다 투여; (ii) 3 주마다; (iii) 3 mg/kg 체중 한 번 투여 후, 매 3 주 마다 1 mg/kg 체중 투여.

<419> 특정 방법에서, 상이한 결합 특이성을 가지는 본 발명의 두 개 이상의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 단일클론성 항체들을 동시에 투여하며, 이 경우, 투여되는 각 항체의 투여량은 지시된 범위에 속한다. 항체는 통상적으로 여러 번 투여된다. 단일 투여 간의 간격은, 예를 들어, 주간, 월간, 삼개월 또는 연간일 수 있다. 간격은 또한, 환자에서 타겟 항원에 대한 항체의 혈중 농도를 측정하여 지시되는 바대로, 불규칙할 수 있다. 특정의 방법에서, 투여량은 약 1-1000 µg/ml의 혈장 항체 농도, 및 특정의 방법에서는 약 25-300 µg/ml의 농도를 얻도록 조절한다.

<420> 다른 방법에서, 본 발명의 하나 이상의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 단일클론성 항체를, 예를 들어, 항-CTLA-4 및/또는 항-PD-1과 같이 구별되는 결합 특이성을 가지는 항체와 동시에 투여하며, 이 경우, 투여되는 각 항체의 투여량은 지시된 범위 내에 있다.

<421> 대안적으로, 항체는 지속 방출(sustained release) 배합물로서 투여될 수 있고, 이 경우, 투여 횟수가 줄어든다. 투여량 및 횟수는 환자에서 항체의 수명에 의존하여 변한다. 일반적으로, 인간 항체들은 가장 긴 수명을 보이며, 인간화된 항체들, 키메릭 항체들 및 비인간 항체들이 그 뒤를 따른다. 투여량 및 투여 횟수는 치료가 예방적인지 또는 치료적인지에 따라 변할 수 있다. 예방적 적용에서는, 상대적으로 적은 투여량이 긴 시간에 걸쳐서 상대적으로 적은 횟수로 투여된다. 특정 환자는 그들 수명의 남은 기간 동안 치료를 계속 받는다. 치료적 적용에서, 질병의 진행이 감소되거나 종결될 때까지 및 통상, 환자가 질병의 증상의 부분적으로 또는 완전한 개선을 보일 때까지 상대적으로 잦은 횟수로 상대적으로 높은 투여량이 때때로 요구된다. 그 후, 환자는 예방적 섭생 방식으로 투여될 수 있다.

<422> 본 발명의 약학적 조성물에서 활성 성분의 실제 투약 수준은, 특정 환자에 대하여, 환자에게 독성이 없이, 바람직한 치료 반응을 얻는 데 효과적인 활성성분의 양, 조성 및 투여 방식을 얻도록, 변화시킬 수 있다. 선택된 투약 수준은 사용된 본 발명의 특정 조성물의 활성, 이의 에스테르, 염이나 아미드, 투여 경로, 투여 시간, 사용된 특정 화합물의 배출 속도, 치료 기간, 사용된 특정 조성물과 조합하여 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료될 환자의 나이, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강과 이전 의료 기록, 및 의료 분야에 공지된 다른 요인들을 포함하는 다양한 약물동력학 요인들에 의존한다.

<423> 본 발명의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체의 "치료적으로 유효한 투여량"은 일반적으로 질병 증상의 격한 상태를 감소시키고, 무증상질병 기간의 빈도 및 기간을 증가시키고 또는 질병 고통으로 인한 장애나 불능을 방지하는 결과를 낳는다. 예를 들어, 골질환 또는 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 세포와 연관된 암 또는 종양의 치료의 경우, "치료적 유효 투여량"은 대표적으로 세포 성장을 또는 종양 성장을, 미치료 대상체에 비하여, 적어도 약 20%, 더 대표적으로는, 적어도 약 40%, 더욱 대표적으로는 적어도 약 60% 및 더더욱 대표적으로는 적어도 약 80% 만큼 저해한다. 종양 성장을 저해하는 화합물의 능력은 인간 종양에서 효능을 예시하는 동물 모델 시스템에서 평가될 수 있다. 대안적으로, 이러한 조성물의 특성은 세포 성장을 저해하는 화합물의 능력을 조사함으로써 평가될 수 있고, 그러한 저해는, 숙련된 실험자에 공지된 방법으로 시험관 내에서 측정될 수 있다. 치료 화합물의 치료적 유효량은 대상체에서 종양 크기를 감

소시키거나 다르게는 증상을 개선시킨다. 당해 분야의 통상적인 숙련자는 대상체의 크기, 대상체 증상의 정도, 및 선택된 투여의 특정 조성물이나 경로와 같은 요인에 근거하여 그러한 양을 결정할 수 있을 것이다.

<424> 본 발명의 조성물을 당해 분야에 공지된 하나 이상의 다양한 방법을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여할 수 있다. 숙련자에 의해 이해되는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 의존하여 변한다. 본 발명의 항체에 대한 바람직한 투여 경로는, 정맥내, 근육내, 피부내, 복강내, 피하, 척추 또는 다른 비경구 투여, 예를 들어, 주사 또는 주입에 의한 투여를 포함한다. 용어 "비경구 투여"는, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 장관 및 국소 투여외의 투여 방식, 통상적으로는 주사에 의한 방식을 의미하며, 정맥내, 근육내, 동맥내, 수막강내, 관절낭내(intracapsular), 안와내(intraorbital), 심장내, 피부내, 복강내, 경기관(transtracheal), 피하, 표피하(subcuticular), 관절내, 피막하(subcapsular), 지주막하(subarachnoid), 척수내, 경막외(epidural) 및 흉골내(intrasternal) 주사 및 주입을 포함하고 이에 한정되지 않는다.

<425> 대안적으로, 본 발명의 항체는 국소, 표피 또는 점막 투여경로와 같은, 비경구 경로, 예를 들어, 비강내, 경구적으로, 질내로, 직장내로, 설하내로 또는 국소적으로 투여될 수 있다.

<426> 활성 화합물을 조절된 분비 배합물과 같이, 이식물, 경피 패치 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는, 빠른 분비에 대하여 화합물을 보호하는 담체와 같이 제조될 수 있다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드류, 폴리글리콜 산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르류 및 폴리락트 산과 같이, 생체분해성, 생체양립성 중합체를 사용할 수 있다. 그러한 배합물의 제조 방법은 특허되어 있거나 일반적으로 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems* (J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978) 참조.

<427> 치료 조성물은 당해 분야에 공지된 의료 장치로 투여될 수 있다. 예를 들어, 바람직한 구체예에서, 본 발명의 치료 조성물은 미국 특허 번호 제5,399,163호; 제5,383,851호; 제5,312,335호; 제5,064,413호; 제4,941,880호; 제4,790,824호; 또는 제4,596,556호에 개시된 장치와 같이 바늘없는 피하 주사 장치로 투여될 수 있다. 본 발명에 유효한 공지된 이식물 및 모듈의 예는 하기를 포함한다: 미국 특허 번호 제4,487,603호, 이는 조절된 속도로 약물을 분배하는, 이식될 수 있는 마이크로-주입 펌프를 개시한다; 미국 특허 번호 제4,486,194호, 이는 피부를 통해 약물을 투여하는 치료 장치를 개시한다; 미국 특허 번호 제4,447,233호, 이는 정밀한 주입 속도로 약물을 전달하는 약물 주입 펌프를 개시한다; 미국 특허 번호 제4,447,224호, 이는 연속적인 약물 전당용, 가변성 흐름 이식성 주입 장치를 개시한다; 미국 특허 번호 제4,439,196호, 이는 다중-챔버 구획을 가지는 삼투압성 약물 전달 시스템을 개시한다; 및 미국 특허 번호 제4,475,196호, 이는 삼투압성 약물 전달 시스템을 개시한다. 이러한 특허들은 본 명세서에서 참조문헌으로 기입된다. 많은 다른 그러한 이식물, 전달 시스템 및 모듈은 당해 분야의 숙련자에게 공지되어 있다.

<428> 특정 구체예의 경우, 본 발명의 인간 단일클론성 항체들을 배합하여 생체 내에서 적절히 분포되게 할 수 있다. 예를 들어, 혈액-뇌 장벽(BBB)은 많은 고도의 친수성 화합물을 배제시킨다. 본 발명의 치료 화합물이 BBB 넘어서는 것을 확고히 하기 위해 (필요시), 상기 화합물을, 예를 들어, 리포좀 내에 배합될 수 있다. 리포좀 제조 방법에 대해서는 예를 들어, 미국 특허 번호 제4,522,811호; 제5,374,548호; 및 제5,399,331호를 참조할 수 있다. 리포좀들은 선택적으로 특정 세포 또는 기관으로 운반되는 하나 이상의 분체를 가지며, 따라서 타겟된 약물 전달을 향상시킬 수 있다(예를 들어, Ranade, *J. Clin. Pharmacol.* 29:685 (1989) 참조). 타겟 분체들의 예는 폴레이트 또는 비오틴(예를 들어, Low 등의 미국 특허 번호 제5,416,016호 참조); 만노시드류(Umezawa 등, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038 (1988)); 항체들(Bloeman 등 *FEBS Lett.* 357:140 (1995); Owais 등 *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180 (1995)); 계면활성제 단백질 A 수용체(Briscoe 등 *Am. J. Physiol.* 1233:134 (1995)); Schreier 등 *J. Biol. Chem.* 269:9090 (1994)); 또한, Keinanen 및 Laukkonen *FEBS Lett.* 346:123 (1994); Killion 및 Fidler *Immunomethods* 4:273 (1994)를 포함한다.

본 발명의 용도 및 방법

<429> 본 발명의 항체, 특히 인간 항체, 항체 조성물 및 방법은 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 매개 질환의 진단 및 치료를 위시한, 수 많은 시험관 내 및 생체내 진단과 치료 유용성을 가진다. 예를 들어, 이러한 분자들을 배양중인 세포에, 시험관 내 또는 생체 외, 또는 인간 대상체, 즉 생체 내로 투여하여, 다양한 질환을 치료, 예방 및 진단할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 인간 및 비-인간 동물을 포함하는 것으로 의도된다. 용어 "비-인간 동물"은 모든 척추동물들, 예를 들어, 포유동물 및 비포유동물, 예를 들어, 비-인간 영장류, 양, 개, 고양이, 소, 말, 닭, 양서류 및 과충류를 포함한다. 바람직한 대상체는 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 활성에 의해 매개되는 질환을 가진 인간 환자이다. 상기

방법은 특히 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 발현이나 기능에 의해 매개되는 질환을 가진 인간 환자를 치료하는 데 적합하다. BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 대한 항체를 다른 제제와 함께 투여할 때, 이 들은 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다.

<431> 본 발명의 항체가 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 대하여 특이적 결합시, 본 발명의 항체를 사용하여 세포 및 조직에 의한 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 발현을 특이적으로 검출할 수 있고, 또한, 면역친화성 정제를 통해 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2를 정제할 수 있다.

<432> 전술한 바와 같이, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2는 염증, 비정상적인 골형성과 골화를 수반하는 다양한 질환과 연관되어 있다. 이러한 질환들은, 척추 염증, 심각한 통증 및 기능적 장애를 함께 특징으로 하는 척추관절염(Spa) 질환을 포함한다. SpA 질환은, 예를 들어, 강직성 척추염, 전선성 척추관절염, 반응성 척추관절염, 염증성 대장질환과 연관된 척추관절염, 및 미분화된 척추관절염을 포함한다. 특히, 본 발명의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들은 강직성 척추염 (AS), 다른 척추관절증, 및 관련 염증성 류마티스성 질병으로, 전형적으로 염증성 허리 통증이 특징이며, 일반적으로 천장골염 및 골부착부염에 의해 야기되는 질환들을 치료하는 데 효과적일 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 명세서에서 개시된 단일클론성 항체들을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 전술한 질병을 치료하는 방법을 포함한다.

<433> 많은 AS 환자들을 치료하는 현재의 일반적 방법은 TNF α 차단을 포함한다. TNF α 차단 요법은, 질환 병리에 기여하는 만성 염증을 주로 감소시킴으로써 질환의 증상을 감소시키는 데 효과적이라는 것이 밝혀졌다. 그러나, TNF α 차단제를 오랫동안 사용한 후 일어나는 부정적 결과들이 있다. 이러한 것들은, 예를 들어, 결핵, 알레르기 반응, 및 빈혈과 같은 혈액 질환 야기가 증가되는 것을 포함한다. 또한, TNF α 차단은 울혈성 심부전을 가진 사람들에게는 금기이다.

<434> TNF α 차단 처치와 관련된 난점을 극복하기 위해, 본 발명의 항체들을 TNF α 차단과 병행 사용하여 AS를 치료할 수 있다. 하나 이상의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들과 TNF α 차단제와의 조합은 질환 진행의 치료 또는 예방을 가져오는 두 요법 간의 상승효과를 낳는다는 점에서 유리하다. 실제로, 본 발명의 항체와 조합하여 사용하면, TNF α 차단의 양이나 빈도를 줄일 수 있다. 이러한 병행 요법은 오랫동안 TNF α 차단제 사용에 따른 음성적 결과들을 감소시킨다. 일단 연골내 원기(anlagen)가 유도되면, 이소성 골형성을 억제할 때 염증 제거가 효과적이지 않다는 것이 보고되었다(Kaplan 등, *J. of Bone and Joint Surgery* 2007 89:347-357). 따라서, 하나 이상의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들과 예를 들어, TNF 차단제와 같은 완화제의 조합은 AS 질환 진행을 치료하거나 예방하는 데 및 이의 증상을 개선하는 데 효과적이라는 것이 증명될 수 있다.

<435> 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들은 추가로 진행성 골화성 섭유이형성증(FOP) (Kan 등, *Am. J. Path.* 165(4):1107-15 (2004)), 진행성 골이형성증(POH), 척수손상, 근육내 혈종을 야기하는 둔기 외상, 정형외과 수술, 전선성 관절염, 골관절염, 강직성 척추염, 혈청반응음성 관절증, 골격 골형성과다증, 이경화증, 등자골 강직증, 골암, 전립선암 및 뼈돌출증, 죽상경화증, 판막성 심장 질환, 및 수술 후 재골격유착을 포함하는 비정상적인 골형성 또는 골화를 동반한 다른 질환 및 의학적 상태를 치료하는 데 사용될 수 있다.

<436> 이소적 골형성을 포함하는 의학적 상태는 때때로 또한 정상적인 뼈에서 골 손실 또는 골분해를 포함한다. 따라서 본 발명은 하나 이상의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들을, 비스포스포네이트, PTH 저해체, RANKL의 직접 및 간접 저해체, 및 다른 골분해 인자의 저해체, 예를 들어, MCSF(제WO 2005/068503호 참조, 이의 내용은 본 명세서에서 참조문헌으로 기입된다)를 포함하지만 이에 한정되지 않는 골흡수의 저해체와 조합하여 이소적 골형성 환자를 치료하는 것을 포함한다.

<437> BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2는 또한, 골암, 전립선암, 폐암, 흑색종 및 다른 혈액암 및 유방암을 포함하는 다양한 인간 암에서 발현된다. 하나 이상의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체를 단독으로 사용하여 암성 종양의 성장이나 전이를 저해할 수 있다. 대안적으로, 하나 이상의 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체를 다른 면역원 제제, 표준 암 치료물 또는 다른 항체들과 본 명세서에서 설명한 바와 같이 연합하여 사용할 수 있다.

<438> 본 발명의 항체를 사용하여 그 성장이나 전이가 저해될 수 있는 바람직한 암은 대표적으로 면역요법에 반응적인 암을 포함한다. 치료에 바람직한 암의 비제한적 예는 유방암(예, 유방 세포 암), 난소암(예, 난소세포암), 뇌종

양, 만성 또는 급성 백혈병, 예를 들어, 급성 골수 백혈병, 만성 골수 백혈병, 급성 림프모세포성 백혈병, 만성 림프구 백혈병, 림프종(예, 호킨스 및 비호킨스 림프종, 림프구성 림프종, 중추신경계 원발 림프종, T-cell 림프종) 및 비지절골(nasopharangeal) 암종을 포함한다. 본 발명의 방법을 사용하여 치료할 수 있는 다른 암의 예는 흑색종(예, 전이성 악성 흑색종), 전립선암, 결장암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 눈 악성 흑색종, 자궁암, 직장암, 항문부 암, 위암, 신장암, 고환암, 자궁암, 난관암, 자궁내막암, 자궁경부암, 질암, 외음부암, 식도암, 소장암, 내분비계 암, 갑상선암, 부갑상선암, 유선암, 연부조직 육종, 요도암, 음경암, 소아 고형암, 방광암, 신장 또는 요관암, 유방 골반암, 중추신경계(CNS) 종양, 종양의 혈관신생, 척수 축 종양, 뇌 줄기 신경교종, 뇌하수체 선종, 카포시 육종, 표피암, 편평 세포암, 석면에 의해 유도되는 것을 포함하는 환경적으로 유도된 암, 예를 들어, 중피종, 및 상기 암들의 조합을 포함한다.

<439> 또한, 다양한 종양 세포 상에 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2의 발현이 나타나면, 본 발명의 인간 항체, 항체 조성을 및 방법을 사용하여 종양생성적 질환, 예를 들어, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2를 발현하는 종양 세포의 존재를 특징으로 하는 질환, 예를 들어, 유방암(예, 유방세포암), 난소암(예, 난소세포암), 교모세포종, 뇌종양, 비지절골(nasopharangeal) 암, 비호킨스 림프종(NHL), 급성 림프성 백혈병(ALL), 만성 림프성 백혈병(CLL), 버킷씨 림프종, 미분화 대세포 림프종(ALCL), 다발성 골수종, 피부 T-세포 림프종, 결절성 소절제된 세포 림프종(nodular small cleaved-cell lymphomas), 림프구성 림파종, 말초 T-세포 림프종, 레너씨 림프종(Lennert's lymphomas), 면역모세포 림프종, T-세포 백혈병/림프종(ATLL), 성인 T-세포 백혈병(T-ALL), 중심모세포성/중심모세포성(centroblastic/centrocytic) (cb/cc) 여포성 림프종 암, B 세포계열의 미만성 대세포 림프종(diffuse large cell lymphomas of B lineage), 혈관면역모세포성 림프선종-유사 T-세포 림프종(angioimmunoblastic lymphadenopathy (AILD)-like T cell lymphoma), HIV-연관된 체강 기반 림프종(HIV associated body cavity based lymphomas), 태생기암(embryonal carcinomas), 비인두의 미분화 암(undifferentiated carcinomas of the rhino-pharynx) (예, 슈민케 종양(Schmincke's tumor)), 캐슬만씨 병(Castleman's disease), 카포시 육종, 다발성 골수종, 발덴스트롬씨 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia) 및 다른 B-세포 림프종을 포함하는 질환을 가진 대상체를 치료할 수 있다.

<440> 따라서, 일 구체예에서, 본 발명은, 대상체에 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체 또는 이의 항원-결합부를 치료적으로 유효한 양으로 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 세포의 성장을 저해하는 방법을 제공한다. 대표적으로, 상기 항체는 인간 항체이다. 추가로 또는 대안적으로, 상기 항체는 키메릭 또는 인간화된 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체일 수 있다.

<441> 일 구체예에서, 본 발명의 상기 항체들(예, 인간 단일클론성 항체들, 다중특이성 및 이중특이성 분자 및 조성을)을 사용하여 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2의 수준 또는 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2를 그 막 표면 상에 포함하는 세포의 수준을 검출할 수 있고, 이러한 수준은 특정 질환 증상과 연계될 수 있다. 대안적으로, 상기 항체들을 사용하여 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 기능을 저해 또는 차단할 수 있고, 이는 차례로 특정 질환 증상의 예방이나 개선과 연계되며, 따라서 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2가 상기 질병의 매개자로서 작용한다. 이것은 실험 샘플 및 대조군 샘플을 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체와, 이 항체 및 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2간의 복합체의 형성을 허용하는 조건하에서 접촉시킴으로써 이뤄질 수 있다. 상기 항체 및 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 간에 형성된 임의의 복합체를 검출하고 실험 샘플과 대조군에서 비교한다.

<442> 다른 구체예에서, 본 발명의 상기 항체(예, 인간 항체, 인간화된 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자 및 조성을) 먼저 시험 관 내에서 치료 또는 진단 용도와 관련된 결합 활성에 대하여 시험할 수 있다. 예를 들어, 하기 실시예에서 설명된 유세포 측정 분석으로 본 발명의 조성을 분석할 수 있다.

<443> 본 발명의 항체(예, 인간 항체, 인간화된 항체들, 다중특이성 및 이중특이성 분자, 면역접합체 및 조성을)는 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 관련 질환의 요법 및 진단에 부가적인 유용성이 있다. 예를 들어, 상기 인간 단일클론성 항체, 다중특이성 또는 이중특이성 분자 및 면역접합체를 사용하여 생체 내 또는 시험관 내에서 하기 생물학적 활성 중 하나 이상을 이끌어 낼 수 있다: BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2를 발현하는 세포의 성장 저해 및/또는 살해; 인간 작용 세포의 존재 하에서, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2를 발현하는 세포의 대식작용 또는 ADCC를 매개하는 것; 또는 BMP2 및/또는 BMP4가 BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 결합하는 것을 차단하는 것.

- <444> 본 발명의 항체 조성물(예, 인간 단일클론성 항체, 인간화된 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자 및 면역접합체)의 적절한 생체 내 및 시험관 내 투여 경로는 당해 분야에 공지되어 있고, 통상의 기술을 가진자가 선택할 수 있다. 예를 들어, 상기 항체 조성물을 주사로 투여할 수 있다(예, 정맥내 또는 피하내). 상기 분자의 적절한 투여량은 대상체의 나이와 체중, 및 항체 조성물의 농도 및/또는 배합에 의존할 것이다.
- <445> 전술한 바와 같이, 본 발명의 인간 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들은 하나 이상의 다른 치료제제, 예를 들어, 세포독성 제제, 방사성독성 제제 또는 면역억제제와 공투여될 수 있다. 상기 항체는 상기 제제에 연결될 수 있거나(면역복합체로서) 또는 상기 제제와 별도로 투여될 수 있다. 후자의 경우(별도 투여), 상기 항체는 상기 제제 투여 전, 후 또는 동시에 투여할 수 있거나, 다른 공지된 요법, 예를 들어, 항암 요법, 예를 들어 방사선 요법과 공투여될 수 있다. 그러한 치료제들은, 특히, 항-종양 제제, 예를 들어, 독소루비신(아드리아마이신), 시스플라틴, 블레오마이신 살페이트, 카르무스틴, 클로람부실 및 시클로포스파미드 하이드록시우레아를 포함하며, 이들은 그 자체로, 환자에 독성이거나 약독성(subtoxic)인 수준에서만 효과적이다. 시스플라틴은 사주에 한번씩 100 mg/kg 투여량으로 정맥내 투여되며 아드리아마이신은 21일마다 한번씩 60-75 mg 투여량으로 정맥내 투여된다. 본 발명의 인간 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 화학요법제를 공투여하면, 인간 종양 세포에 세포독성 효과를 나타내는 상이한 가작을 통해 작동하는 두 개의 항암제를 제공하게 된다. 그러한 공투여는, 약물에 대한 저항성의 발달로 인한 또는 종양세포가 상기 항체에 반응적이지 않게 할 수 있는, 종양 세포의 항원성에서의 변화로 인한 문제점을 해결할 수 있다.
- <446> 타겟-특이성 작용 세포, 예를 들어, 본 발명의 조성물(예, 인간 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자)에 연결된 작용세포(effector cell)들을 또한 치료제로서 사용할 수 있다. 타겟팅용 작용 세포는 대식세포, 호중구, 또는 단핵구와 같은 인간 백혈구일 수 있다. 다른 세포들은 호산구, 중성 살해 세포 및 다른 IgG- 또는 IgA-수용체 함유 세포를 포함한다. 필요시, 작용 세포들은 처리될 대상체로부터 얻을 수 있다. 타겟-특이성 작용 세포들을 생리적 허용 용액에서 세포 혼탁액으로서 투여할 수 있다. 투여되는 세포의 수는 약 10^8 - 10^9 이나, 치료 목적에 따라 변할 수 있다. 일반적으로, 그 양은 타겟 세포, 예를 들어, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2를 발현하는 종양세포에서 국소화되고 그리고 예를 들어, 대식 작용에 의해 세포 살해를 수행하기에 충분할 정도이다. 투여 경로는 또한 변할 수 있다.
- <447> 타겟-특이성 작용 세포를 사용한 요법은 타겟된 세포를 제거하는 다른 기술과 연계하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조성물(예, 인간 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자)을 사용한 항-종양 요법 및/또는 이러한 조성물로 무장한 작용 세포를 화학요법과 연계하여 사용할 수 있다. 추가로, 조합 면역요법을 사용하여 두 개의 구별되는 세포독성 작용 세포군을 종양 세포 격퇴에 향하게 할 수 있다. 예를 들어, 항-Fc-감마 RI 또는 항-CD3에 연결된 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들을 IgG- 또는 IgA-수용체 특이성 결합 제제와 연계하여 사용할 수 있다.
- <448> 본 발명의 이중특이성 및 다중특이성 분자를 사용하여 또한, 예를 들어, 세포 표면 상에 있는 수용체에 모자를 씌우고 제거함으로써와 같이, 작용 세포 상의 Fc γ R 또는 Fc γ R 수준을 조절할 수 있다. 항-Fc 수용체들의 혼합물을 또한 이 목적에 사용할 수 있다.
- <449> 보체와 결합하는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgM의 부분과 같이, 보체 결합 위치를 가지는, 본 발명의 조성물(예, 인간, 인간화된 또는 키메릭 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자 및 면역접합체)을 또한 보체 존재 하에서 사용할 수 있다. 일 구체예에서, 타겟 세포를 포함하는 일 군의 세포를 본 발명의 결합제 및 적절한 작용 세포로 생체 외 처리에, 보체 또는 보체 함유 혈청을 첨가하는 것이 보충될 수 있다. 본 발명의 결합제로 코팅된 타겟 세포의 대식 작용은 보체 단백질의 결합으로 향상될 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물(예, 인간 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자)로 코팅된 타겟 세포는 또한 보체에 의해 용해될 수 있다. 다른 구체예에서, 본 발명의 조성물은 보체를 활성화시키지 않는다.
- <450> 본 발명의 조성물(예, 인간, 인간화된, 또는 키메릭 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자 및 면역접합체)은 또한 보체와 함께 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 범위 내에서, 인간 항체들, 인간화된 항체들, 다중특이성 또는 이중특이성 분자 및 혈청이나 보체를 포함하는 조성물들은 본 발명의 범위내에 있다. 이러한 조성물들은 보체가 인간 항체, 다중특이성 또는 이중특이성 분자들 바로 가까이에 위치한다는 점에서 유리하다. 대안적으로, 본 발명의 인간 항체들, 다중특이성 또는 이중특이성 분자 및 보체나 혈청은 따로 투여될 수 있다.
- <451> 본 발명의 항체 조성물(예, 인간 항체들, 이중특이성 또는 다중특이성 분자 또는 면역접합체) 및 이의 용도에

대한 설명서를 포함하는 키트 또한 본 발명의 범위에 속한다. 상기 키트는 하나 이상의 추가적인 시약, 예를 들어, 면역억제제, 세포독성제 또는 방사능독성제, 또는 본 발명의 하나 이상의 추가 인간 항체(예, 상기 제 1 인간 항체와는 구별되는, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 항원의 에피토프에 결합하는 상보성 활성을 가지는 인간 항체)를 더 포함할 수 있다.

<452> 따라서, 본 발명의 항체 조성물로 처리된 환자는 다른 치료제, 예를 들어, 상기 인간 항체들의 치료 효과를 향상시키거나 증폭하는 세포독성 또는 방사능독성 제제로 추가로(본 발명의 인간 항체 투여 전에, 동시에, 또는 그 후에) 투여될 수 있다.

<453> 다른 구체예에서, 상기 대상체는 Fc γ 또는 Fc γ 수용체의 발현 또는 활성을 변경하는, 예를 들어, 향상시키거나 저해하는 제제로, 예를 들어, 사이토카인으로 대상체를 처리함으로써 추가로 치료될 수 있다. 다중특이성 분자로 치료 중 투여될 수 있는 바람직한 사이토카인은 과립구 콜로니-자극 인자(G-CSF), 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(GM-CSF), 인터페론-γ (IFN-γ) 및 종양괴사인자(TNF)를 포함한다.

<454> 또한 본 발명의 조성물(예, 인간 항체, 인간화된 항체, 다중특이성 및 이중특이성 분자)을 사용하여 Fc γ R 또는 하나 이상의 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2를 발현하는 세포를 타겟, 예를 들어, 그러한 세포를 표지할 수 있다. 그러한 용도로, 상기 결합체는 검출될 수 있는 문자와 연결될 수 있다. 따라서, 본 발명은 Fc 수용체들, 예를 들어, Fc γ R 및/또는 하나 이상의 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2를 발현하는 세포를 생체 외 또는 시험관 내에서 국소화 시키는 방법을 제공한다. 상기 검출될 수 있는 표지는, 예를 들어, 방사능 동위원소, 형광 화합물, 효소 또는 효소 보조인자(co-factor)일 수 있다.

<455> 특정 구체예에서, 본 발명은 샘플 내에서 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 항원의 존재를 검출하는 또는 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 항원의 양을 측정하는 방법을 제공하며, 샘플 및 대조군 샘플을, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 특이적으로 결합하는 인간 단일클론성 항체 또는 이의 항원 결합부로, 상기 항원이나 이의 결합부와 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 간에 복합체를 형성하도록 허용하는 조건 하에서 접촉시키는 것을 포함한다. 그 다음, 복합체의 형성을 검출하고, 여기서, 샘플과 대조군 샘플 사이의 복합체 형성 차이는 샘플에서의 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 항원 존재를 나타낸다.

<456> 다른 구체예에서, 본 발명의 면역접합체를 사용하여 화합물(예, 치료제, 표지체, 세포독소, 방사능독소, 면역억제제, 등)을 상기 항체에 연결시킴으로써, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 세포 표면 수용체를 가지는 세포로 상기 화합물을 타겟할 수 있다. 예를 들어, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 항체를, 미국 특허 번호 제6,989,452호, 미국 특허 출원 번호 제10/160,972호, 제10/161,234호, 제11/134,826호, 제11/134,685호, 및 미국 임시 특허 (Provisional Patent) 출원번호. 제60/720,499호에 설명된 바와 같이, UPT에, 및/또는 미국 특허 번호제6,281,354호 및 제6,548,530호, 미국 특허 공개번호 제20030050331호, 제20030064984호, 제20030073852호 및 제20040087497호에 설명된 또는 제WO 03/022806호에 기술된 독소 화합물 중 어느 하나에 접합될 수 있고, 이들은 본 명세서에 참조문헌으로 기입된다. 따라서, 본 발명은 또한 BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2를 발현하는 세포를 생체 외 또는 생체 내에서 국소화 시키는 방법을 제공한다(예를 들어, 방사능 동위원소, 형광 화합물, 효소 또는 효소 보조인자와 같은 검출할 수 있는 표지를 사용하여). 대안적으로, 상기 면역접합체를 사용하여, 세포독소 또는 방사능독소를 BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 타겟시킴으로써 BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 세포 표면 수용체를 가지는 세포를 살해할 수 있다.

<457> 본 발명은 하기 실시예에 의해 더욱 설명될 것이고 이는 본 발명을 더욱 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 명세서에서 인용된 모든 도면 및 모든 참조물, 특히, 공개된 특허 출원서는 참조문헌으로 당 명세서에 기입됨을 명백히 하는 바이다.

실시예

<473>

실시예 1

BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및 BMPR2 대한 인간 단일클론성 항체들의 생성

<475> 본 실시예는 인간 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및 BMPR2에 특이적으로 결합하는 인간 단일클론성 항체들의 생성에 대한 방법을 개시한다.

<476>

항원

<477> 마우스를 재조합 인간 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2로 면역화시킨다. 특히, 마우스를 상업적으로 시판되는 재조합 인간 BMP2 또는 BMP4로 면역화시켰다. 인간 재조합 BMP-2는 R&D Systems, Inc. (Catalog No. 355-BM/CF, Lot.- MSA10605H) 또는 Medtronic, Inc(Lot.- M115006AAJ)로부터 입수하였다. 인간 재조합 BMP4는 R&D Systems, Inc (Catalog No. 31-BP/CF, Lots BEM186051 및 BEM316071 및.- MSA10605H)로부터 입수하였다. 상기 동결건조된 항원들을 제조사 지침에 따라 재구성하고 -20°C에서 보관하였다.

유전자이식 HuMAb Mouse[®] 및 KM Mouse[®]

<478> 인간 항체 유전자를 발현하는 HuMAb 유전자이식 마우스 또는 KM 유전자이식 마우스의 HCo7, HCo12 및 HCo17 종을 사용하여 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및 BMPR2에 대한 완전 인간 단일클론성 항체들을 제조하였다. 이러한 마우스 종에서, 내인성 마우스 카파 경쇄 유전자는 Chen 등 (1993) *EMBO J.* 12:811-820에 설명된 바와 같이 동종접합적으로 분열되었고 내인성 마우스 중쇄 유전자는 PCT 공개번호 제WO 01/09187호의 실시예 1에 설명된 바와 같이 동종접합적으로 분열되어 있다. 또한, 이러한 마우스 종은 Fishwild 등 *Nature Biotechnology* 14:845-851 (1996)에 설명된 바와 같이, 인간 카파 경쇄 트랜스유전자, KCo5, 및 PCT 공개번호 제WO 01/09187호의 실시예 2에 설명된 바와 같이, 인간 중쇄 트랜스유전자, HCo7, HCo12 또는 HCo17를 지니고 있다.

<480> BMP-2 및 BMP-4에 대한 완전 인간 단일클론성 항체들은, 각각 인간 항체 유전자를 발현하는, 유전자이식 HuMAb Mouse[®]의 HCo20:02{M/K} (Balb) F1 및 HCo27:04{M/K} 종 및 유전자이식성 트랜스염색체성 마우스의 KM 종을 사용하여 제조될 수 있다. The HCo20:02{M/K} (Balb) F1 및 HCo27:04{M/K} 마우스는 제WO 2005/058815호에 설명된 바와 같이 제조되며, 이는 본 명세서에 참조문헌으로 기입된다. 상기 KM 종은 제WO 02/43478호에 설명된 바와 같이 제조되며, 이는 본 명세서에 참조문헌으로 기입된다.

HuMAb Mouse[®] 및 KM Mouse[®] 면역화

<482> 인간 BMP2 및 BMP4에 대한 완전 인간 단일클론성 항체들을 생성하기 위해, HuMAb Mouse[®] 및 KM Mouse[®]의 마우스를 인간 재조합 BMP2 또는 BMP4으로 면역화시켰다. HuMAb Mouse[®]에 대한 총체적인 면역화 전략은 Lonberg, N. 등 (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. 등 (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 및 PCT 공개번호 제WO 98/24884호에 설명되어 있다. 상기 마우스는 항원의 첫번째 주입시 6-16 주령이었다. 재조합 BMP2 또는 BMP4의 정제된 제조물 (10-15 μ g)을 사용하여 HuMAb mouse[®] 및 KM mouse[®]를 각각 면역화시켰다.

<483> 유전자이식 마우스를 리비 보강제 (Ribi adjuvant)에 유화시킨 항원으로, 복강내 및 피하내 또는 빌바닥을 통해서, 일주일에 한번 12 번까지 면역화하였다. B 세포 융합에 대하여 선택된 마우스를 비장적출 3일 전 및 하루전에 한번 더, 항원으로 정맥내 및 복강내로 면역화시켰다. 면역 반응을 안와후방 혈액으로 모니터하였다. 혈장을 ELISA로 분석하고 (후술하는 바와 같이) 및 충분한 역가의 항-BMP2 및 BMP4 인간 면역글로불린을 가진 마우스를 융합에 사용하였다. 마우스를 희생 및 비장 제거 3 일 및 1 일 전에 정맥내로 증폭시켰다. 융합을 4 번 실시하고 총 33 마리 마우스를 면역화하였다.

항-BMP2, 항-BMP4, Anti-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및 항-BMPR2 항체를 생산하는 HuMAb Mouse[®] 또는 KM Mouse[®]의 선택

<485> BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 결합하는 항체들을 생산하는 HuMAb MouseTM 또는 KM MouseTM를 선택하기 위해, 면역화된 마우스로부터 얻은 혈청을, Fishwild 등 (1996), 상기 문헌에 설명된 바와 같이, 마이크로타이터 플레이트에 흡착된 정제된 항원을 사용하여 ELISA로 스크린하였다.

<486> 특히, 마이크로타이터 플레이트를 정제된 재조합 BMP2 또는 BMP4 1-2 μ g/ml로 함유하는 PBS로 50 μ l/웰의 농도로 코팅하고, 밤새 실온에서 처리하며, PBS/Tween(0.05%)으로 네 번 세척한 후, 0.5% 우혈청 알부민(BSA)으로 보충된 PBS/Tween(0.05%) 200 μ l/웰의 농도로 차단하였다. BMP2 또는 BMP4 면역화 마우스로부터 얻은 혈장 희석물을 각 웰에 첨가하고 주위 온도에서 1-2 시간 항온처리하였다. 플레이트를 PBS/Tween(0.05%)으로 세척한 후 고추냉이 폐록시다아제(HRP)가 접합된 염소-항-인간 IgG Fc 특이성 다중클론성 항체로 실온에서 1 시간 처리하였다. 세척 후, 플레이트를 ABTS 기질(Moss, Inc. Cat. No. ABTS-1000)로 발색시키고 OD 415-495에서 분광분석기로 측정하였다.

<487> 항원-특이성 항체의 최고 역가를 나타내는 마우스를 융합에 사용하였다. 융합은 후술하는 바와 같이 실시하고, 하이브리도마 상등액을 ELISA로써, 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 활성에 대하여 조사하였다. 마이크로타이터 플레이트에 흡착된 항원에 결합하는 항원들은, 예를 들어, CHO 세포에서 융합단백질로서 발현될 수 있으나, 그 부모 CHO 세포에서는 아니다. 상기 항체들은 재조합 인간 항원을 발현하는 세포주에는 결합하지만, 각각의 항원을 발현하지 않는 대조군 세포주에는 결합하지 않는다는 것에 대하여 유세포 측정분석으로 확인된다. 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및 항-BMPR2 항체들의 결합은 예를 들어, 항원-발현 CHO 세포를 상기 항체 또는 관심의 항체와 20 μ g/ml의 농도에서 배양함으로써 평가될 수 있다. 세포를 세척하고 결합은 항-인간 IgG Ab에 접합된 FITC와 같은 표지로 검출된다. FACSscan 유세포 측정분석기 (Becton Dickinson, San Jose, CA)를 사용하여 유세포 측정분석을 수행한다.

BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및 BMPR2에 대한 인간 단일클론성

항체를 생산하는 하이브리도마의 생성

<489> BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및 BMPR2에 대한 인간 단일클론성 항체들을 생산하는 하이브리도마는, 예를 들어, 후술하는 과정을 이용하여 생성된다. 특히, BMP2로 면역화된 HuLab mouse[®] 또는 KM mouse[®]로부터 분리된 마우스 비장세포들을, 사이토펄스 (Cyto Pulse) 대형 챔버 세포 융합 전기천공기(Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD)를 사용하는 전기장에 근거한 전기 융합법으로 융합하였다. 그 다음, 생성된 하이브리도마를 항체 포획 ELISA 분석법을 사용하여 항원-특이성 항체의 생성에 대하여 분석하였다. 사이토펄스 (Cyto Pulse) 대형 챔버 세포 융합 전기천공기(Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD)를 사용하는 전기장에 근거한 전기 융합법을 이용하여, 면역화된 마우스로부터 얻은 비장 임파구의 단일 세포 혼탁액을 Ag8.653 비분비 마우스 골수종 세포 (ATCC, CRL 1580)와 융합시켰다. 세포를 편평 바닥 마이크로타이터 플레이트 상에 약 1x10⁴ 세포/웰로 분주한 후, 10 mM HEPES, 0.055 mM 2-메르캅토에탄올, 및 1x HAT (Sigma, CRL P-7185)로 보충된 DMEM (Mediatech, CRL 10013, 고 글루코즈, L-글루타민 및 소듐 피루베이트 함량) 내에서 10% 우태아 혈청, 388D1 (ATCC, CRL TIB-63) 조절된 매체, 3-5% 하이브리도마 클로닝 인자 (Bioveris, Inc.)를 함유하는 선택된 배양액에서 2 주간 배양하였다. 1-2 주 후, 세포를 HAT가 HT로 치환된 배양액에서 배양하였다. 그 다음, 개별 웰을 인간 항-BMP2 또는 BMP4 단일클론성 IgG 항체에 대하여 ELISA (전술한 바와 같이)로 스크린하였다. 일단 광범위한 하이브리도마 성장이 발생한 후 (10-14 일), 통상 10-14 일 후에, 배양액을 항체 생성에 대하여 모니터하였다. 항체 분비 하이브리도마를 더 큰 배양 용기에서 배양하고 항원 특이성 항체의 생산에 대하여 다시 점검하였다. 선택된 콜로니들을 냉동보존하고 제한 회석으로 한번 또는 두번 클론하였다. 그 후, 안정된 서브클론들을 냉동보존하고 시험판내에서 증대시켜 추가 특성화에 충분한 항체 양을 생성하였다.

<491> 상기 BMP2-면역화 마우스로부터, 인간 항-BMP2/4 항체를 생성하는 총 495개 하이브리도마 콜로니들을 얻었다. 35 개 콜로니들을 선택하여 클로닝시키고 후속 분석을 위해 증대시켰다. 상기 35 개 콜로니 중에 6H4, 11F2, 12E3, 1F6, 10F6, 16b7, 7D6, 8B3, 33F7, 및 15F3 하이브리도마 세포주가 있다.

실시예 2

인간 단일클론성 항체의 구조적 특성화

<494> 본 실시예는 BMP2 및 BMP4에 특이적으로 결합하는 인간 단일클론성 항체들의 구조적 특성을 개시한다. 특히, 항-BMP2/4 단일클론성 항체들 6H4, 11F2, 12E3, 1F6, 10F6, 16b7, 7D6, 8B3, 33F7, 및 15F3의 구조가 본 실시예에서 개시된다.

<495> 실시예 1의 방법에 의해 유도된 단일 클론성 항체들의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 cDNA 서열들을, 표준 PCR 방법으로, 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 하이브리도마로부터 각각 얻고, 표준 DNA 시퀀싱 방법으로 서열 결정하였다.

<496> 표준 PCR 방법으로 6H4, 11F2 및 12E3 단일클론성 항체들의 중쇄 및 경쇄 가변 영역들을 암호화하는 cDNA 서열들을 6H4, 11F2 및 12E3 하이브리도마로부터 각각 얻고, 표준 DNA 시퀀싱 방법으로 서열 결정하였다.

<497> 6H4의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열은 도 1A에 도시되어 있고, 서열번호 31 및 37로 각각 주어진다. 6H4의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들은 도 1B에 도시되어 있고, 서열번호 34 및 40으로 각각 주어진다.

<498> 상기 6H4 중쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식세포계열 면역글로불린 중쇄 서열들과 비교하면, 상기 6H4

중쇄가 인간 생식세포계열 V_H 4-34 (서열번호 51)로부터 유래된 V_H 분절, 인간 생식세포계열 3-10(서열번호 52)로부터 유래된 D 분절, 및 인간 생식세포계열 JH1(서열번호 53)로부터 유래된 J_H 분절을 이용한다는 것을 알 수 있다. 6H4 V_H 서열을 생식세포계열 V_H 4-34 서열로 정렬한 것이 도 4에 도시되어 있다. CDR 부위 결정의 카밧 시스템을 사용하여 6H4 V_H 서열을 더 분석하여, 도 1A 및 4, 및 서열번호 13, 16 및 19에 각각 나타난 바와 같이, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CD3 부위를 나타내었다.

<499> 상기 6H4 경쇄 면역글로불린 서열을 공지된 인간 생식세포계열 면역글로불린 경쇄 서열들과 비교하면, 상기 6H4 경쇄가 인간 생식세포계열 V_K L6(서열번호 54)으로부터 유래된 V_L 분절 및 인간 생식세포계열 JK2 (서열번호 5 5)로부터 유래된 JK 분절을 이용한다는 것을 알 수 있다. 6H4 V_K 서열을 생식세포계열 V_K L6 서열로 정렬한 것이 도 7에 도시되어 있다. CDR 부위 결정의 카밧 시스템을 사용하여 6H4 V_L 서열을 더 분석하여 도 1B 및 7, 및 서열번호 22, 25, 및 28에 각각 나타난 바와 같이, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CD3 부위를 나타내었다.

<500> 11F2의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 2A에 도시되어 있고 서열번호 32 및 38로 각각 주어진다. 11F2의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 2B에 도시되어 있고 서열번호 35 및 41로 각각 주어진다.

<501> 상기 11F2 중쇄 면역글로불린 서열과 공지된 인간 생식세포계열 면역글로불린 중쇄 서열들을 비교하면, 상기 6H4 중쇄가 인간 생식세포계열 V_H 4-59(서열번호 43)로부터 유래된 V_H 분절, 인간 생식세포계열 2-2(서열번호 45)로부터 유래된 D 분절, 및 인간 생식세포계열 JH5b(서열번호 46)로부터 유래된 J_H 분절을 이용한다는 것을 알 수 있다. 상기 11F2 V_H 서열과 상기 생식세포계열 V_H 4-59 서열을 정렬한 것이 도 5에 도시되어 있다. CDR 부위 결정의 카밧 시스템을 사용하여 상기 11F2 V_H 서열을 더 분석하여, 도 2A 및 5, 및 서열번호 14, 17 및 20에 각각 나타난 바와 같이, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CD3 부위를 나타내었다.

<502> 상기 11F2 경쇄 면역글로불린 서열과 공지된 인간 생식세포계열 면역글로불린 경쇄 서열들을 비교하면, 상기 11F2 경쇄가 인간 생식세포계열 V_K A27(서열번호 48)로부터 유래된 V_L 분절, 및 인간 생식세포계열 JK4(서열번호 50)로부터 유래된 JK 분절을 이용한다는 것을 알 수 있다. 상기 11F2 V_K 서열과 상기 생식세포계열 V_K A27 서열을 정렬한 것이 도 8에 도시되어 있다. CDR 부위 결정의 카밧 시스템을 사용하여 상기 11F2 V_L 서열을 더 분석하여, 도 2B 및 8, 및 서열번호 23, 26, 및 29에 각각 나타난 바와 같이, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CD3 부위를 나타내었다.

<503> 12E3의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 3A에 도시되어 있고 및 서열번호 33 및 39로 각각 주어진다. 12E3의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열들이 도 3B에 도시되어 있고 서열번호 36 및 42로 각각 주어진다.

<504> 상기 12E3 중쇄 면역글로불린 서열과 공지된 인간 생식세포계열 면역글로불린 중쇄 서열들을 비교하면, 상기 12E3 중쇄가 인간 생식세포계열 V_H 3-33(서열번호 44)으로부터 유래된 V_H 분절, 및 인간 생식세포계열 JH6b(서열 번호 47)로부터 유래된 J_H 분절을 이용한다는 것을 알 수 있다. 상기 12E3 V_H 서열과 상기 생식세포계열 V_H 4-33 서열을 정렬한 것이 도 6에 도시되어 있다. CDR 부위 결정의 카밧 시스템을 사용하여 상기 12E3 V_L 서열을 더 분석하여, 도 3A 및 6, 및 서열번호 15, 18 및 21에서 각각 나타난 바와 같이, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CD3 부위를 나타내었다.

<505> 상기 12E3 경쇄 면역글로불린 서열과 공지된 인간 생식세포계열 면역글로불린 경쇄 서열들을 비교하면, 상기 12E3 경쇄가, 인간 생식세포계열 V_K L15(서열번호 49)로부터 유래된 V_L 분절, 및 인간 생식세포계열 JK4(서열 번호 50)로부터 유래된 J_K 분절을 이용한다는 것을 알 수 있다. 상기 12E3 V_K 서열을 상기 생식세포계열 V_K L15 서열과 정렬한 것이 도 9에 도시되어 있다. CDR 부위 결정의 카밧 시스템을 사용하여 상기 12E3 V_L 서열을 더 분석하여, 도 3B 및 9, 및 서열번호 24, 27, 및 30에서 각각 나타난 바와 같이, 경쇄 CDR1, CDR2 및 CD3 부위를 나타내었다.

<506> 표준 PCR 기술을 사용하여, 상기 10F6, 10H6 및 16b7 단일클론성 항체들의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 cDNA 서열들을 상기 10F6, 10H6 및 16b7 하이브리도마들로부터 각각 얻었고, 표준 DNA 시퀀싱 방법을 사용하여 서열 확인

하였다. 상기 10F6 및 10H6 단일클론성 항체들의 중쇄는 인간 생식세포계열 V_H 3-33(서열번호 44), D_H 6-13, 및 J_H JH4b 유전자(서열번호 88)를 이용한다. 상기 10F6 및 10H6 단일클론성 항체들의 경쇄는 인간 생식세포계열 V_K L15 및 J_K JK4 유전자를 사용한다. 상기 16B7 단일클론성 항체의 중쇄는 인간 생식세포계열 V_H 3-33, D_H 6-13, 및 J_H JH2(서열번호 89) 유전자를 이용한다. 상기 16B7 단일클론성 항체의 경쇄는 인간 생식세포계열 V_K L15 및 J_K JK4 유전자를 이용한다.

<507> 표준 PCR 기술을 사용하여, 상기 1F6 단일클론성 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 cDNA 서열을 상기 1F6 하이브리도마로부터 얻었고, 표준 DNA 시퀀싱 기술을 사용하여 서열 확인하였다. 상기 1F6 단일클론성 항체의 중쇄는 인간 생식세포계열 V_H 4-59, D_H 2-2, 및 J_H JH5b 유전자를 이용한다. 상기 1F6 단일클론성 항체의 경쇄는 인간 생식세포계열 V_K A27 및 J_K JK4 유전자를 이용한다.

<508> 표준 PCR 기술을 사용하여 상기 7D6, 8B3, 33F7, 및 15F3 단일클론성 항체들의 상기 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 암호화하는 cDNA 서열들을 상기 7D6, 8B3, 33F7, 및 15F3 하이브리도마들로부터 각각 얻었고, 표준 DNA 시퀀싱 기술을 사용하여 서열 확인하였다. 이러한 단일클론성 항체들의 중쇄는 인간 생식세포계열 V_H 1-69(서열번호 91) 및 J_H JH3b 유전자(서열번호 90)를 이용한다. 이러한 단일클론성 항체들의 경쇄는 인간 생식세포계열 V_K A27 및 J_K JK2 유전자를 이용한다.

실시예 3

항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, Anti-BMPR1B, 항-ACTR1, 및 항-BMPR2 단일클론성 항체의 결합특이성의 특성화

<511> 본 실시예는 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들이 면역정제된 항원에 결합하는 것에 대하여 ELISA 및 웨스턴 블랏 분석법으로 또는 조직에서 BMP2/4에 결합하는 것을 면역조직화학법으로 비교하여 항원 결합 특이성을 조사하는 방법을 개시한다.

<512> 재조합 His-표지된 및 myc-표지된 항원을 플레이트 상에 밤새 코팅시킨 후, 실시예 1에서 개시된 방법으로 제조한 인간 단일클론성 항체들에 대한 결합을 조사한다. 표준 ELISA 방법을 수행하였다. 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 인간 단일클론성 항체들을 1 μ g/ml의 농도로 첨가하고 1:2 계열 회석시 적정하였다. 고추냉이 폐록시다아제(HRP)가 접합된 염소-항-인간 IgG(Fc 또는 카파 사슬-특이성) 다중클론성 항체를 이차 항체로 사용한다.

<513> B7H4-Ig 작제물로 형질전환된 293T 세포의 상등액으로부터 단백질 A를 사용하는 크로마토그래피로써 재조합 B7H4-Ig를 정제한다. ELISA 플레이트를 상기 인간 항체로 코팅한 후, 정제된 단백질을 첨가하고 그 후 토끼 항-B7H4 항혈청으로 검출한다. 펜타(Penta)-B7H4-C9 작제물로 형질전환된 293T 세포의 상등액으로부터, 2A7 친화컬럼을 사용하는 크로마토그래피로써, C-9 표지를 가진 재조합 펜타(Penta)-B7H4 단백질을 정제한다. ELISA 플레이트를 항-마우스 Fc로 코팅한 후, 단일클론성 항-C9(0.6 μ g/ml)로 처리하고, 그 후 지시된 바와 같이, 펜타-B7H4로 적정하고, 상기 인간 단일클론성 항체를 1 μ g/ml에서 처리한다. 항-마우스 Fc로 코팅한 후, M-항-C9(0.6 μ g/ml)로 처리하고, 그 다음 펜타-BMP2, 펜타-BMP4, 펜타-BMPR1A, 펜타-BMPR1B, 펜타-ACTR1, 및/또는 펜타-BMPR2로 적정하고, 인간 단일클론성 항체들로 1 μ g/ml에서 처리한다.

<514> 웨스턴 블랏 분석법을 사용하여, 항-BMP2/4 항체들을 환원성 및 비환원성 조건하에서 BMP2에 결합하는 것에 대하여 분석하였다. 재조합 인간 BMP2 단백질(Medtronic) 0.5 μ g을 환원제를 함유하거나 함유하지 않는 샘플 완충액(Cell Signaling, Cat# SB7722)에 직접적으로 회석시켰다. 샘플을 100°C로 3 분간 가열하여 단백질을 변성시킨 후, 전기영동과 웨스턴 블랏팅을 실시하였다. 막 결합 단백질을 시험 항체 0.5 μ g/ml로 탐침한 후, 알카라인 포스파타제가 접합된 Fab2 염소 항-인간 IgG(Jackson ImmunoResearch Labs, cat #109-056-09)로 검출하고 BCIP/NBT(Pierce, cat #34042)로 염색하였다. 결과는 시험된 모든 단일클론성 항체들이 BMP2 동종이량체에 해당하는 약 36 kDa에서 비환원된 밴드를 인식한다는 것을 나타낸다. 추가로, 특정 단일클론성 항체들(예를 들어, 8B3)은 환원 조건하에서 BMP2를 인식하였다. BMP 단량체에 상당하는 약 17-18 kDa의 두 개 밴드가 드러났다.

<515> 면역조직화학의 경우, 2,000 μ m 마우스 조직 코어를 사용한다(IMGENEX Histo-Array; Imgenex Corp., San Diego, CA). 30 분간 건조 후, 절편들을 아세톤으로 고정하고(실온에서 10 분간) 및 5 분간 풍干한다. 슬라이드들을 PBS로 세척한 다음 10% 정상 염소 혈청을 포함하는 PBS로 20 분간 예비 배양하고, 후속적으로 10% 정상 염소 혈청을 함유하는 PBS에서 10 mg/ml FITC화된 항체로 실온에서 30 분간 배양한다. 다음, 슬라이드를 PBS로 세 번

세척하고 마우스 항-FITC(10 μ g/ml DAKO)로 30 분간 실온에서 배양한다. 다시 슬라이드를 PBS로 세척하고 염소 항-마우스 HRP 접합체(DAKO)로 30분간 실온에서 배양한다. 슬라이드를 PBS로 다시 세 번 세척한다. 디아미노벤지딘(Sigma)을 기질로 사용하여, 갈색으로 염색되게 한다. 증류수로 세척한 후, 슬라이드를 헤마톡실린으로 1분간 대항-염색한다. 후속적으로, 슬라이드를 흐르는 증류수로 10초간 세척하고 글리세르겔(glycergel) (DAKO)에 놓는다.

<516> 비오틴에 접합된 수용체 웨티드를 사용하여 상기 일단의 항-BMP2/4 단일클론성 항체들에 의해 인식되는 에피토프를 결정하고, 스트렙타비딘 칩(SA chip, BIACore)으로 포획하여 BIACore로 분석한다. 상기 칩 전반에 걸쳐 상기 항체들을 40 ug/ml에서 유동시킨다. 상기 8B3 및 7D6 항체들은 BMP2 타입 2 수용체에 결합하는 BMP2 에피토프(ISMLYLDENEKVLK) (서열번호 92)에 결합한다. 12E3, 11F2 및 16B7 항체들은 혼화물을 결합하는 BMP2 에피토프(QAKHKQRKRLKSSCKRH) (서열번호 93)에 결합한다. 또한, 항-BMP2/4 인간 단일클론성 항체 33F7(서열번호 63 및 71)은 BMP2/4 및 혼화물 간의 상호작용을 차단하였다. 이것은 BMP2/4의 기능을 차단한다.

실시예 4

<518> 연골 세포주의 표면상에서 발현되는 각자의 항원에 결합하는 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체의 특성화

<519> 본 실시예는 CHO-항원 형질감염체 및 세포 표면상에 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2를 발현하는 연골세포에 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들이 결합하는 것을 분석하기 위한 유세포 측정 방법을 개시한다.

<520> BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2로 형질감염된 CHO 세포주는 물론 연골세포주 ATDC5(RIKEN Biosource, RCB0565) 또는 섬유아세포주 MC3T3(ATCC 기탁 번호 CRL-2595, CRL-2596, CRL-2594 및 CRL-2593)을 항체 결합에 대하여 시험하였다. 세포들을 세척하고 및 결합은 FITC-표지된 항-인간 IgG Ab로 검출하였다. FACScan 유세포 계수기(Becton Dickinson, San Jose, CA)를 사용하여 유세포 측정 분석을 수행하였다.

실시예 5

<522> 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 단일클론성 항체의 결합 친화도의 분석

<523> 본 실시예는 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2에 특이성 결합 친화도에 대하여 단일클론성 항체들을 시험하는 방법을 개시한다.

<524> 일 방법에 있어서, 표준 기술로, HEK 세포를 전장 BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2으로 형질감염시키고, 10% 우태아혈청(FBS)을 함유하는 RPMI에서 배양한다. 세포를 트립신화하고, Tris 기반 결합 완충액(24mM Tris pH 7.2, 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 2mM 글루코오스, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0.1% BSA)으로 한번 세척하며, 결합완충액에서 2x10⁶ 세포/ml로 조절한다. 밀리포어 플레이트(MAFB NOB)를 1% 탈지 우유 가루를 함유한 물로 코팅하고 4°C에서 밤새 보관하였다. 상기 플레이트를 결합 완충액 0.2 ml로 세 번 세척한다. 완충액 단독 50 마이크로리터를 최대 결합 웰에 첨가한다(총 결합). 완충액 단독 25 마이크로리터를 대조 웰에 첨가한다(비-특이성 결합). 다양한 농도의 ¹²⁵I-항체를 모든 웰에 25 μ l부피로 첨가한다. 다양한 농도의 미표지된 항체를 100 배 과량으로 대조군 웰에 25 μ l 부피로 첨가하고, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 형질감염된 CHO 세포 (2 X 10⁶ 세포/ml) 함유 결합 완충액 25 μ l를 모든 웰에 첨가한다. 플레이트를 진탕기 상에서 200 RPM으로 2 시간 동안 4°C에서 배양한다. 배양 후, 상기 밀리포어 플레이트를 0.2 ml 차가운 세척 완충액 (24mM Tris pH 7.2, 500mM NaCl, 2.7mM KCl, 2mM 글루코오스, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0.1% BSA.)으로 세 번 세척한다. 필터를 제거하고 감마 계수기로 계수한다. Prism 소프트웨어 (San Diego, CA)와 같이 단일 장소 결합 변수를 사용하여 평형 결합의 평가를 수행한다. 데이터를 S 상 투약 반응(PRIZM™을 사용하는 비선형 회귀법으로 분석하고, EC50을 산출하며, 이는 EC50 및 95% CI에 대하여 항체들의 순위를 매기는 데 사용한다.

<525> 다른 방법에 있어서, Biacore 분석법 (Biacore AB, Uppsala, Sweden)을 사용하여 항-BMP2/4 단일클론성 항체들 친화도 및 결합 역학에 대하여 분석하였다. 표준 아민 커플링 화학 및 Biacore가 제공하는 키트를 사용하여, 인간 Fc 항체가 일차 아민을 통해 CM5 칩 (카르복시 메틸 렉스트란이 코팅된 칩)에 공유결합으로 연결된 칩 상에 상기 항-BMP-2/4 항체들을 포획시켰다. 결합은 BMP2 또는 BMP4를 함유하는 HBS-EP 완충액 (pH 7.4)을 10 nM 농도에서 25 μ l/min 유동속도로 유동시킴으로써 측정되었다. 항원-항체 결합 역학이 2 분간 나타나고 해리 역학이 8 분간 나타났다. 결합 및 해리 곡선은 BIAevaluation 소프트웨어 (Biacore, AB)를 사용하여 1:1 량무어 결합

모델에 맞췄다. 결정된 Kd, k_{on} 및 k_{off} 값은 표 1에 제시된다.

표 1

BMP-2&4 mAbs의 결합 친화도.

BMP-2				BMP-4			
mAb	K _d (nM)	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)	mAb	K _d (nM)	k _{on} (1/Ms)	k _{off} (1/s)
1F6	0.02	4.65×10^6	8.49×10^{-5}	1F6	0.0003	4.97×10^6	1.27×10^{-6}
11F2	0.01	2.83×10^6	3.09×10^{-5}	11F2	0.0007	4.53×10^4	3.04×10^{-8}
16B7	0.08	3.70×10^6	2.82×10^{-4}	16B7	0.02	2.86×10^6	6.12×10^{-5}
12E3	0.02	3.39×10^6	8.26×10^{-5}	12E3	0.28	1.75×10^6	4.82×10^{-4}
10F6	0.19	2.04×10^6	3.85×10^{-4}	10F6	0.75	2.61×10^6	1.97×10^{-3}
6H4	0.10	1.42×10^7	1.98×10^{-4}	6H4	0.30	2.00×10^6	4.97×10^{-4}
7D6	0.28	4.00×10^6	1.14×10^{-3}	7D6	0.42	2.84×10^6	1.20×10^{-3}
8B3	0.19	3.02×10^6	5.82×10^{-4}	8B3	0.18	4.69×10^6	8.27×10^{-4}
15F3	0.03	7.96×10^6	2.70×10^{-4}	15F3	0.18	3.14×10^6	5.60×10^{-4}
33F7	0.12	5.71×10^6	6.54×10^{-4}	33F7	0.38	3.65×10^6	1.40×10^{-3}

<527>

<528>

실시예 6

<529>

항-BMP2/4 단일클론성 항체와 일단의 BMP들과의 교차 반응성.

<530>

BMP-3, 5, 6, 7 및 8b는 물론 GDF-5 및 7과의 결합 친화도를 Biacore 분석법으로 측정함으로써, 항-BMP2/4 단일클론성 항체의 BMP 군에 대한 교차 반응성을 분석하였다. 표준 아민 커플링 화학과 Biacore에 의해 제공되는 키트를 사용하여, BMP들을 GDF들을 일차 아민을 통해 CM5 칩(카르복시 메틸 엑스트란 코팅 칩)에 공유결합적으로 연결하였다. 상기 항체들을 HBS-EP 완충액(pH7.4)에서 20 ug/ml 농도로 20 μ l/min 유동속도에서 유동시킴으로써 결합을 측정하였다. 항원-항체 결합 역학이 4 분간 나타났고, 해리 역학이 6 분간 나타났다. BIAevaluation 소프트웨어 (Biacore, AB)를 사용하여 결합 및 해리 곡선을 1:1 램무어 결합 모델로 맞췄다. 결정된 Kd 값은 표 2에 제시된다.

표 2

일단의 BMP 족 구성원에 대한 BMP-2&4 인간 단일클론성 항체들의 교차반응성.

	BMP2	BMP4	BMP5	BMP6	BMP7	BMP8b	BMP3	GDF5	GDF7
1F6	0.7	1.0	124	85800	71.7	no	no	17.7	8.8
11F2	0.6	0.4	26.3	77.0	20.0	no	104	16.3	3.5
16B7	0.5	0.5	18.1	30.0	8.9	no	no	80.0	2.8
12E3	1.4	2.2	132	no	106	no	no	no	no
10F6	17.5	76	20.1	103	18.8	195	no	no	no
6H4	3.7	104	5.9	40.3	1.1	159	246	0.8	1.1
7D6	4.6	7.7	no	no	no	no	no	493	1810
8B3	4.7	11.2	no	no	155	no	no	90.8	57.5
15F3	4.6	12.0	289	no	79900	no	no	64.8	57.7
33F7	4.3	271	no	no	579.0	no	no	no	no

<532>

<533>

실시예 7:

<534>

BMP 수용체 탑 I & II 차단

<535>

타입-I 및 타입 II BMP 수용체(R&D systems, Minneapolis, MN)에 대한 BMP4 결합을 차단하는 상기 항-BMP2/4 단일클론성 항체들의 능력을 Biacore를 사용하여 결정하였다.

<536>

표준 아민 커플링 화학 및 Biacore에서 제공하는 키트를 사용하여, 타입-I 및 타입-II BMP 수용체 둘 다 일차 아민을 통해 CM5 칩(카르복시 메틸 엑스트란 코팅 칩)에 공유결합적으로 연결시켰다. 항체-항원 복합체의 혼합물을 상기 부동화된 수용체에 걸쳐서 흘렸다. 항체 농도는 타입 II에 대하여는 400 nM에서부터이고 타입 I에 대하여는 200 nM에서부터 시작하여, 2배 계열 회석되었다. BMP4 농도는 3 및 10 nM 사이였다. 상기 항체들과 BMP-4을 주입 전에 적어도 1 시간 동안 예비-배양하였다. 항체-항원 혼합물을 5 μ l/min 유동속도로 3 분간 주입하였다. 중첩되는 에피토프를 가지는 항체들은 경쟁 탈락할 것이고(항체 농도가 커짐에 따라 반응이 저하됨) 반면에, 구별되는 에피토프들을 가지는 항체들은 상기 항원에 동시에 결합한다(항체 농도가 커짐에 따라 반응이 증가됨). 이러한 분석은 1F6, 11F2, 16B7, 12E3, 10F6, 6H4, 7D6, 8B3, 15F3, 및 33F7 모두 타입 II 수용체로의 BMP 결합을 강한 차단에서 약한 차단까지 범위로 차단할 수 있다는 것을 나타낸다(도 10a). 또한 특정 단일 클론성 항체들은 타입 I 결합을 차단하는 반면 다른 것들은 타입 II 수용체 결합만을 차단했다(도 10b).

<537>

단일클론성 항체들은 혜파린에 대한 BMP2 결합을 차단한다

<538>

혜파린(Sigma)에 대한 BMP-2 결합을 차단하는 항-BMP2/4 단일클론성 항체들의 능력은 AlphaScreen 분석법(Berthold Technologies)으로 결정되었다. 5 nM의 농도에서 비오틴화된 혜파린(Sigma)을 스트렙타비딘 코팅된 공여자 비드(25 ug/ml)로 포획하고 상기 항체들은(5 nM) 단백질 A 코팅 수납자 비드를 사용하여 포획되었다. BMP/2를 20 nM에서 시작하여 2배 계열 회석물로 적정하였다. 상기 항체들이 BMP-2에 대한 혜파린 결합을 차단한다면, 혜파린, BMP2 및 상기 인간 단일클론성 항체들 간에 어떠한 복합체도 형성되지 않을 것이고 아무런 신호도 관찰되지 않을 것이다. 상기 항체들이 BMP2에 대한 혜파린 결합을 차단한다면, 삼중 복합체가 형성되며 신호가 BMP2 농도가 증가됨에 따라 증가될 것이다. 이러한 분석에서, 오직 33F7 단일클론성 항체 만이 BMP2에 대한 혜파린 결합을 차단하였다. 33F7은 혜파린 및 BMP2 둘 다에 결합하고 또한 혜파린과 BMP2 간의 상호작용을 차단한다.

<539>

실시예 8:

<540>

항체 안정성

<541>

항-BMP2/4 단일클론성 항체의 열안정성

<542>

항-BMP2/4 단일클론성 항체들의 열적 안정성을 상기 항체들의 융점을 열량 분석함으로써 결정하였다. 융점 (T_m)의 열량 분석을 자동샘플러 (MicroCal LLC, Northampton, MA, USA)와 결부된 VP-모세관 DSC 차동 스캐닝 마이크로열량계 플랫폼 상에서 수행하였다. 샘플 세포 부피는 0.144 mL였다. 0.25 mg/ml의 농도로 있는 샘플을 30에서 95°C로 1°C/min의 속도로 가열함으로써 항체의 변성 데이터를 얻었다. 상기 항체 샘플은 인산염-완충 생리액 (PBS) pH 7.4에 주어졌다. 상기 동일한 완충액을 참조 세포에서 사용하여 비교용으로 몰 열용량을 수득하였다. 관찰된 열곡선을 기준선 정정하고 표준화된 데이터를 소프트웨어 Origin v7.0을 사용하여 비-2-상태 모델에 기초하여 분석하였다. 표 3에 나타난 바와 같이, 11F2가 가장 안정한 항-BMP2/4 항체이다. 이것은 그 주요 피크에 대해서 최고 T_m 값을 보인다.

표 3

<543> 항-BMP2/4 단일클론성 항체들에 대한 차등 스캐닝 열량계 데이터.

	T_m (대다수)	T_m (소수)	T_m (소수)
11F2	81	71	
6H4	80	71	
15F3	80	72	
12E3	79	74	
1F6	78	71	85
8B3	75	83	
7D6	74	84	
10F6	73	68	

16B7	72	82	
33F7	72	82	

항-BMP2/4 단일클론성 항체들의 화학적 안정성

<544> 상기 항-BMP2/4 단일클론성 항체들의 안정성을 그들의 화학적 변성의 중간점을 형광 분광분석으로 측정함으로써 비교하였다. 화학적 변성의 형광 측정은 Micromax 플레이트 판독기를 갖춘 SPEX 플루오로로그(Fluorolog) 3.22(SPEX, Edison, NJ) 상에서 수행되었다. 16 개 상이한 농도의 구아니디니움 하이드로클로라이드를 함유하는 PBS 완충액에서 20 시간 동안 평형화시킨 항체 샘플 상에서 측정을 수행하였다. 측정은 검고, 낮은 부피이고, 비-결합 표면 384-웰 플레이트(Corning, Acton, MA)에서 이루어졌고 12 μ L의 웰 부피에서 1 μ M의 항체를 요구하였다. 형광을 280 nm에서 여기시키고 방출 스펙트럼을 300 및 400 nm 사이에서 측정하였다. 스캔 속도는 nm 당 1 초였고 슬릿을 5 nm 밴드패스로 설정하였다. PBS를 완충액 블랭크로 사용하였고, 데이터에서 자동으로 산감하였다. GraphPad Prism 소프트웨어를 사용하여, 데이터를 이-상태 변성 모델에 맞추었다. 표 4에 나타난 바와 같이, 15F3이 가장 안정한 항-BMP2/4 단일클론성 항체이다. 이것은 최고 풀림 중간점을 가졌다.

표 4

형광 분광분석으로 결정된 항 BMP-2&4 단일클론성 항체들의 화학적 변성

	풀림 중간점 (M)
15F3	2.70
10F6	2.66
6H4	2.61
8B3	2.53
1F6	2.47
7D6	2.41
16B7	2.38
12E3	양상성(biphasic)

실시예 9

항-BMP2/4 항체들은 BMP 세포 신호전달을 차단한다

<549> BMP2/4 단일클론성 항체들에 의한 세포 신호 전달에 대한 효과는 C2C12세포에서 알카라인 포스파타제 발현을 관찰함으로써 결정되었다. BMP2 및 BMP4의 생체활성을 중화시키는 단일클론성 항체들의 능력을 측정하기 위해, C2C12 세포를 10% 우테아혈청 및 1x pen/strep을 포함하는 DMEM 배지를 포함하는 편평 바닥 96 웰 플레이트에 웰당 8,000 개 세포의 밀도로 분주하였고, 37°에서 CO₂ 존재 하 밤새 배양하였다. 다음날 아침, 상기 배지를 단일클론성 항체들을 함유하는 신선한 배지 100 uL로 대체한 후, 재조합 인간 BMP2 단백질 (Medtronic) 또는 BMP4 단백질 (R&D, Cat# 314-BP/CF)을 1.6 μ g/ml 농도로 함유하는 배지 100 μ L로 대체하였다. 플레이트를 37°에서 CO₂ 존재하 2 일간 배양하였다.

<550> 이일째, 세포 투과 방법을 사용하여, 상기 세포를 알카라인 포스파타제 활성에 대하여 분석하였다. 여기서, 배지를 웰로부터 제거하고 상기 세포를 100 μ L 얼음 냉각된 아세톤/에탄올 용액 (50:50 v/v)으로 고정시켰다. 아세톤/에탄올 용액을 즉시 제거하고, 100 μ L p-니트로페닐 포스페이트 액체 기질 (Sigma, Cat. #N7653)로 대체하였다. 상기 플레이트를 어둠 속에서 3 분간 실온에서 유지하고, 50 μ L 3N NAOH을 각 웰에 첨가함으로써 상기 반응을 중지하였다. 기질 절단는 색깔 반응을 나타내게 되고 이는 세포내에서 알카라인 포스파타제의 양에 비례한다. 플레이트를 SpectraMAX 340 (Molecular Devices) 상에서 405 nm 파장으로 판독하였다. 이러한 조건 하에서 단일클론성 항체에 대한 ND₅₀는 1-5 ug/ml 사이였다.

<551> 도 11에 나타난 바와 같이, BMP2 (도 11a) 및 BMP4 (도 11b)에 의한 알카라인 포스파타제의 발현은 BMP2/4 단일클론성 항체들에 의해 저해된다. 따라서, 본 명세서에서 개시된 항체들은 BMP 단백질을 중성화할 수 있다.

실시예 10

<553>

항-BMP2/4 항체들은 생체 내에서 BMP2 유도 이소성 골형성을 차단한다

<554>

본 실시예는 항-BMP2/4 단일클론성 항체들이 BMP2-유도 이소성 골형성을 차단하는 것을 나타낸다. BMP2는, 콜라겐 젤에 의해 흡수되고 마우스의 뒷다리로 피하로 이식될 때, 이소성 골형성을 유도한다. BMP2는 이식된 부위로 연골세포 전구세포 및 혈관세포를 채용하여 골형성을 개시한다. 3 주 간에 걸쳐, 콜라겐 젤은 성숙한 골로 대체된다(Nakamura, Y. 등, J Bone Miner Res. 2003 Oct;18(10):1854-62). 항-BMP2/4 항체들이 생체내에서 이소성 골형성을 차단할 수 있다는 것을 나타내기 위해, 마우스를 BMP2 주입 콜라겐 젤로 이식한 후 즉시 항-BMP2/4 항체들 또는 무관계 대조군 IgG(BD Pharmingen, cat # A6618M)로 처리하였다.

<555>

흡수할 수 있는 콜라겐 스폰지(Helistat® Bone Graft, Integra Life Sciences cat# 1690-ZZ)에 96 ug/ml BMP2(Medtronic, Infuse Bone graft)를 주입시키고, 각각 0.23 그램 최종 무게의 이식체로 절단하였다. BMP2-주입 콜라겐 스폰지를 36 마리 성인 수컷C57BL6 마우스의 좌측 및 우측 뒷다리에 피하적으로 이식하였다. 이식 수술을 위해, 표준 방식에 따라 마우스를 케타민/자일라진으로 마취하였다. 우측 뒷다리에서, 전기 이발기구를 사용하여 반건성(semitendinous) 근육 위의 피부를 면도하고, 클로르헥사딘과 알코올로 문질렀다. 마우스를 옆으로 눕혔다. 외과용 매스 또는 가위를 사용하여, 장골과 일치되게 피부에서 0.5 cm 절개하였다. 둥통하게 절개하여 피하 이식 포켓을 만들었다. 소독 기술 하에서, 각 이식 샘플(~25 ug BMP2가 주입된 콜라겐 스폰지)을 포켓에 두었다. 상기 샘플 과정을 좌측 뒷다리 상에서 이식 때에 반복하였다. 스테인레스 스틸 상처 클립을 사용하여 상처를 봉합하였다.

<556>

수술 직후, 동물을 6 개 치치 군으로 나누고(표 5) 및 적절한 항체 300 μ l를 1.25 mg/ml의 농도로 각 마우스의 복강에 단일 볼러스 주사로 주입하였다. 그룹 1은 무관한 대조군 IgG로 처리하였다. 그룹 2-6은 BMP2/4 중성화 단일클론성 항체들로 처리하였다(표 5).

<557>

21 일 후, 이식편 및 주변 조직을 적출하고 10% 중성 완충 포르말린에 두었다. 적출된 이식편을 밀도측정 스캐닝(PIXI, GE Lunar, Madison, Wisconsin)하였다. 각 이식체에 대한 골 미네랄 부위(BMA)를 표로 만들었다. 도 12에 나타낸 바와 같이, 5개 단일클론성 항체들 모두는 이식체에서 BMP2-유도 골형성을 예방하는 데 효과적이었다.

표 5

<558>

그룹	이식편 (좌측 및 우측)	mAb	농도 (단일 IP 투여량)	N
1	피하	대조군 IgG	15 mg/Kg	6
2	피하	12 E3	15 mg/Kg	6
3	피하	1F6	15 mg/Kg	6
4	피하	11F2	15 mg/Kg	6
5	피하	10F6	15 mg/Kg	6
6	피하	6H4	15 mg/Kg	6

<559>

실시예 11

<560>

항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 단일클론성 항체들의 내재화

<561>

본 실시예는 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2/4 인간 단일클론성 항체들이 BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2 발현 CHO 세포로 내재화 하는 능력에 대하여 Hum-Zap 내재화 분석법으로 분석하는 방법을 나타낸다. Hum-Zap 분석법은 독소 사포린에 접합된 인간 IgG에 친화도를 가지고 일차 인간 항체가 이차 항체의 결합을 통해서 내재화되는 것에 대하여 시험한다.

<562>

항원-발현 세포를 100μ l 웰에 1.25×10^4 세포/웰로 밤새 심었다. 각자의 항원 특이성 인간 단일클론성 항체들을 상기 웰에 10 pM의 농도로 첨가하였다. 상기 임의의 항원에 대하여 비특이성인 이소타입 대조군 항체를 음성 대조군으로 사용한다. Hum-Zap (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, IT-22-25)을 11 nM의 농도로 첨가하고 플레이트를 72 시간 배양하였다. 그 다음, 플레이트를 1.0μ Ci의 3 H-티미딘으로 24 시간 펄스처리하고, 수확하며 탑 카운트 신틸레이션 계수기(Top Count Scintillation Counter) (Packard Instruments, Meriden, CT)로 판독하였다.

<563>

항원 발현 CHO 세포에서의 사포린 접합체의 내재화 활성을 실시예 1에서 설명한 바와 같이 생성한 인간 단일클

론성 항체들을 사용하여, ~500 pM 내지 1 pM 범위에 걸쳐서 투여량 반응으로 측정된다. CHO 부모 세포주 및 Hu IgG-SAP를 배경 독성 또는 비-특이성 내재화의 수단으로서 음성대조군으로 사용한다.

<564>

실시예 12

<565>

연골세포 주에 대한 독소-접합된 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체의 세포 살해 평가

<566>

본 실시예는 독소에 접합된 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 단일클론성 항체들이 항원 발현 연골세포주를 살해하는 능력에 대하여, 세포 증식 분석으로 분석하는 방법을 개시한다.

<567>

실시예 1의 방법으로 제조된 HuMAb 항체들은, 펩티딜, 하이드라존 또는 이황화 링커를 통해, 독소에 접합될 수 있다. ATDC5 또는 MC3T3 세포와 같은 항원-발현 연골세포 또는 골모세포주를 약 1 내지 3×10^4 세포/웰의 농도로 $100\mu\text{l}$ 웰에 3 시간 심는다. 항체-독소 접합체를 30 nM의 초기 농도로 웰에 첨가하고 1:3 계열 희석으로 적정한다. 항원에 대하여 비특이성인 이소타입 대조군 항체를 음성 대조군으로 사용한다. 플레이트를 69 시간 배양한다. 그 다음 플레이트를 $1.0 \mu\text{Ci}$ 의 ^3H -티민으로 24 시간 펄스처리하고, 수확하며, 탑 카운트 신틸레이션 계수기(Packard Instruments, Meriden, CT) 상에서 판독한다. 세포 살해는 항원-발현 연골 세포로 ^3H -티미딘 합류가 항원-독소 농도 의존적으로 감소되는 것에 의해 보여진다.

<568>

실시예 13

<569>

항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들의 ADCC 활성 평가

<570>

본 실시예는 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 단일클론성 항체들이 작용 세포의 존재 하에서, 항체 의존성 세포성 세포독성(ADCC)을 통해 항원⁺ 세포주를 살해하는 능력에 대하여 형광 세포독성 분석법으로 분석하는 방법을 개시한다.

<571>

인간 작용 세포는 하기와 같이 전혈로부터 제조한다. 표준 피콜-파糗(Ficoll-paque) 분리 방법을 사용하여 인간 말초 혈액 단핵구 세포를 헤파린 처리된 전혈로부터 정제한다. 세포를 10% FBS 및 200 U/ml의 인간 IL-2를 포함하는 RPMI1640 배지에 재현탁시키고 37°C에서 밤새 배양하였다. 다음날, 세포를 수확하고 배양액으로 네 번 세척하며 2×10^7 세포/ml로 재현탁한다. 타겟 항원⁺ 세포를 BATDA 시약(Perkin Elmer, Wellesley, MA)과 1×10^6 타겟 세포/mL 당 $2.5\mu\text{l}$ BATDA에서 20 분간 37°C에서 배양하였다. 상기 타겟 세포를 네 번 세척하고, 원심 분리하여 1×10^5 세포/ml의 최종 부피로 산출하였다.

<572>

하기와 같이 Delfia 형광 방출 분석법을 사용하여, 상기 항원⁺ 세포주를 상기 인간 단일클론성 항체들에 대한 항체-특이성 ADCC에 대하여 조사한다. 각 타겟 세포주(표지된 타겟 세포의 $100\mu\text{l}$)를 $50\mu\text{l}$ 작용세포 및 $50\mu\text{l}$ 항체와 배양한다. 실험내내 1:50의 타겟 대 작용세포 비율을 사용한다. 모든 연구에서, 인간 IgG1 이소타입 대조군을 음성 대조군으로 사용한다. 2000 rpm 펄스 회전 및 37°C에서 한시간 배양 후, 상등액을 모으고, 다시 빠르게 원심분리하고, 및 상등액 $20\mu\text{l}$ 을 편평 바닥 플레이트로 옮기고, 이에, $180\mu\text{l}$ 의 Eu 용액(Perkin Elmer, Wellesley, MA)을 첨가하여 RubyStar 판독기(BMG Labtech)에서 판독한다. % 용해(lysis)는 하기와 같이 계산된다: (샘플 방출 - 자연 방출 * 100) / (최대 방출 - 자연 방출), 여기서, 자연 방출은 오직 타겟 세포만을 포함하는 웰로부터 나온 형광이고, 최대 방출은 타겟세포를 포함하고 2% Triton-X로 처리된 웰로부터 나온 형광이다.

<573>

실시예 14

<574>

네이키드 및 세포독소-접합 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 항체들을 사용한 생체 내 종양 이종이식 모델 치료

<575>

본 실시예는 암종 종양 세포가 이식된 마우스를 독소-접합 항원으로 생체 내 처리하여 상기 항원의 종양 성장에 대한 생체 내 효과를 조사하는 방법을 개시한다.

<576>

표준 실험실 절차에 따라 암종 세포를 시험관 내 증대하였다. 6-8 주령의 수컷 Ncr 아티믹 누드 마우스(Taconic, Hudson, NY)의 우측 옆구리에, 마우스 당 7.5×10^6 세포를 포함하는 0.2 ml PBS/마트리겔(Matrigel) (1:1)을 피하 이식하였다. 이식후 이 주마다, 마우스 무게를 재고 및 전자 캘리퍼를 사용하여 종양을 삼차원적

으로 측정하였다. 종양 부피는 높이 x 너비 x 길이로 계산하였다. 평균 110-270 mm³ 크기의 종양을 가진 마우스를 무작위적으로 처리군으로 나눴다. 당일, 마우스에 PBS 용액(vehicle), 독소-접합 이소타입 대조군 항체, 또는 독소-접합 항-BMP2, 항-BMP4, 항-BMPR1A, 항-BMPR1B, 항-ACTR1, 및/또는 항-BMPR2 HuMAb을 복강 투여한다. 본 발명의 항체들에 접합될 수 있는 독소 화합물의 예는 PCT 출원 공개번호 제WO2005/112919호에 설명되어 있다. 항원-특이성 인간 단일클론성 항체를 받는 마우스를 세 개 상이한 독소 화합물로 실험한다. 마우스는 투여 후, 60일 간 종양 성장에 대하여 모니터한다. 종양이 종양 종말점(2000 mm³)에 다다랐을 때 마우스를 안락사시킨다. 독소에 접합된 적절한 항원-특이성 항체들은 종양 종말점 부피(2000 mm³)에 도달하는 평균 시간을 늘리고 및 종양 성장 진행을 늦춘다. 따라서, 그러한 항체-독소 접합체로 처리하는 것은 종양 성장에 직접적인 생체내 저해효과를 가진다.

<577>

실시예 15

<578>

탈퓨코실화된 인간 단일클론성 항체의 생성

<579>

본 실시예는 퓨코실 잔기가 결여된 인간 단일클론성 항체를 생성하는 방법을 개시한다. 감소된 양의 퓨코실 잔기를 가진 항체들은 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 나타났다. 퓨코실트랜스퍼라아제 유전자 FUT 8이 결여된 CHO 세포주 Ms704-PF(Biowa, Inc., Princeton, NJ)를 항원-특이성 HuMAb의 중쇄 및 경쇄를 발현시키는 벡터로 전기천공한다. 6 mM L-글루타민 및 500 µg/ml G418(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 가지는 Ex-Cell 325-PF CHO 배지(JRH Biosciences, Lenexa, KS)에서 성장시킴으로써 약물-저항성 클론을 선택한다. 클론들을 표준 ELISA 분석법으로, IgG 발현에 대하여 분석한다. 두 개 별개의 클론, B8A6 및 B8C11이 수득되었고, 이들은 1.0 내지 3.8 피코그램/세포/일 범위의 산출율을 가진다.

<580>

실시예 16

<581>

탈퓨코실화된 항체의 ADCC 활성 평가

<582>

본 실시예는 탈퓨코실화된 및 비-탈퓨코실화된 단일클론성 항체들이 작용 세포의 존재하에서 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 통해, BMP2, BMP4, BMPR1A, BMPR1B, ACTR1, 및/또는 BMPR2⁺ 세포를 살해하는 능력에 대하여 형광 세포독성 분석법으로 분석하는 것을 개시한다.

<583>

인간 항원-특이성 단일클론성 항체들을 전술한 바와 같이 탈퓨코실화하였다. 인간 작용 세포를 하기와 같이 전혈로부터 만든다. 표준 피콜-파퀴(Ficoll-paque) 분리 방법을 사용하여 인간 말초 혈액 단핵구 세포를 혼화된 처리된 전혈로부터 정제한다. 세포를 10% FBS(배양액) 및 200 U/ml의 인간 IL-2를 포함하는 RPMI1640 배지에 재현탁시키고 37°C에서 밤새 배양하였다. 다음날, 세포를 수확하여 배양액으로 네 번 세척하고 2 x 10⁷ 세포/ml로 재현탁하였다. 타겟 항원⁺ 세포를 1 x 10⁶ 타겟 세포/mL 당 2.5 µl BATDA를 함유하고 2.5mM 프로베네시드(정량용 배지)로 보충한 배지에서 20 분간 37°C로 BATDA 시약(Perkin Elmer, Wellesley, MA)에서 배양하였다. 상기 타겟 세포를 20mM HEPES와 2.5mM 프로베네시드를 함유한 PBS로 네 번 세척하고, 원심 분리하여 1x10⁵ 세포/ml의 최종 부피로 정량용 배지에서 산출하였다.

<584>

1:100의 타겟 대 작용 세포 비율을 실험 내내 사용한다. 인간 IgG1 이소타입 대조군을 음성 대조군으로서 사용한다. 2100 rpm 펄스 회전 및 37°C에서 한시간 배양 후, 상등액을 모으고, 다시 빠르게 원심분리하며 상등액 20 µl를 편평 바닥 플레이트로 옮기고, 이에, 180 µl의 Eu 용액(Perkin Elmer, Wellesley, MA)을 첨가하고 Fusion Alpha TRF 플레이트 판독기(Perkin Elmer)에서 판독한다. % 용해(lysis)는 하기와 같이 계산된다: (샘플 방출 - 자연 방출 * 100) / (최대 방출 - 자연 방출), 여기서, 자연 방출은 오직 타겟 세포만을 포함하는 웰로부터 나온 형광이고, 최대 방출은 타겟세포를 포함하고 3% 리졸(Lysol)로 처리된 웰로부터 나온 형광이다. 상기 항원⁺ 발현 세포주는 HuMAb 항원-특이성 항체로 항체-매개 세포독성을 나타내고 상기 항원-특이성 항체의 탈퓨코실화 형태와 연합된 증가된 특이성 용해율을 나타낸다. 따라서, 탈퓨코실화된 HuMAb 항체들은 항원-발현 세포에 특이적 세포독성을 증가시킨다.

*

*

*

<585>

본 발명은 본 명세서에 설명된 특정 구체예에 의해 그 범위가 제한되지 않는다. 실제로, 본 명세서에서 설명된 것에 더하여, 본 발명의 다양한 변경이 전술한 설명과 첨부되는 도면으로부터 당해분야의 숙련자에게는 명백하

게 될 것이다. 그러한 변경은 첨부되는 청구범위의 범위 내에 속하는 것으로 의도된다.

<587> 여러 특허, 특히 출원, 공개물, 생성물 설명 및 방법서들이 본 출원서를 통해 인용되며, 이의 내용은 모든 목적에 대하여 그 전체로서 본 명세서에서 참조문헌으로 기입된다.

<588> 서열 목록 요약

서열번호	서열	서열번호	서열
1	BMP2 n.t.	48	VK A27 생식세포계열 a.a.
2	BMP2 a.a.	49	VK L15 생식세포계열 a.a.
3	BMP4 n.t.	50	JK JK4 생식세포계열 a.a.
4	BMP4 a.a.	51	VH 4-34 생식세포계열 a.a.
5	BMPR1A n.t.	52	DH 3-10 생식세포계열 a.a.
6	BMPR1A a.a.	53	JH JH1 생식세포계열 a.a.
7	BMPR1B n.t.	54	VK L6 생식세포계열 a.a.
8	BMPR1B a.a.	55	JK JK2 생식세포계열 a.a.
9	ACTR1 n.t.	56	VH a.a. 10F6
10	ACTR1 a.a.	57	VH a.a. 10H6
11	BMPR2 n.t.	58	VH a.a. 16B7
12	BMPR2 a.a.	59	VH a.a. 1F6
13	VH CDR1 a.a. 6H4	60	VH a.a. 7D6
14	VH CDR1 a.a. 11F2	61	VH a.a. 8B3
15	VH CDR1 a.a. 12E3	62	VH a.a. 15F3
16	VH CDR2 a.a. 6H4	63	VH a.a. 33F7
17	VH CDR2 a.a. 11F2	64	VK a.a. 10F6
18	VH CDR2 a.a. 12E3	65	VK a.a. 10H6
19	VH CDR3 a.a. 6H4	66	VK a.a. 16B7
20	VH CDR3 a.a. 11F2	67	VK a.a. 1F6
21	VH CDR3 a.a. 12E3	68	VK a.a. 7D6
22	VK CDR1 a.a. 6H4	69	VK a.a. 8B3
23	VK CDR1 a.a. 11F2	70	VK a.a. 15F3
24	VK CDR1 a.a. 12E3	71	VK a.a. 33F7
25	VK CDR2 a.a. 6H4	72	VH n.t. 10F6
26	VK CDR2 a.a. 11F2	73	VH n.t. 10H6
27	VK CDR2 a.a. 12E3	74	VH n.t. 16B7
28	VK CDR3 a.a. 6H4	75	VK n.t. 1F6
29	VK CDR3 a.a. 11F2	76	VH n.t. 7D6
30	VK CDR3 a.a. 12E3	77	VH n.t. 8B3
31	VH a.a. 6H4	78	VH n.t. 15F3
32	VH a.a. 11F2	79	VH n.t. 33F7
33	VH a.a. 12E3	80	VK n.t. 10F6
34	VK a.a. 6H4	81	VK n.t. 10H6
35	VK a.a. 11F2	82	VK n.t. 16B7
36	VK a.a. 12E3	83	VK n.t. 1F6
37	VH n.t. 6H4	84	VK n.t. 7D6
38	VH n.t. 11F2	85	VK n.t. 8B3
39	VH n.t. 12E3	86	VK n.t. 15F3
40	VK n.t. 6H4	87	VK n.t. 33F7
41	VK n.t. 11F2	88	JH JH4b 생식세포계열 a.a.
42	VK n.t. 12E3	89	JH JH2 생식세포계열 a.a.
43	VH 4-59 생식세포계열 a.a.	90	JH JH3b 생식세포계열 a.a.
44	VH 3-33 생식세포계열 a.a.	91	VH 1-69 생식세포계열 a.a.
45	DH 2-2 생식세포계열 a.a.	92	BMP2 에피토프
46	JH JH5b 생식세포계열 a.a.	93	BMP2 에피토프
47	JH JH6b 생식세포계열 a.a.		

도면의 간단한 설명

- <458> 도 1a는 6H4 인간 단일클론성 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 37)과 아미노산 서열(서열번호 31)를 나타낸다. CDR1(서열번호 13), CDR2(서열번호 16) 및 CDR3(서열번호 19) 영역들은 윤곽으로 나타내어져 있고 및 V, D 및 J 생식세포계열(germline) 유도분 (derivation)들이 표시되어 있다.
- <459> 도 1b는 6H4 인간 단일클론성 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 40)과 아미노산 서열(서열번호 34)을 나타낸다. CDR1(서열번호 22), CDR2(서열번호 25) 및 CDR3(서열번호 28) 영역들은 윤곽으로 나타내어져 있고, V 및 J 생식세포계열 유도분들이 표시되어 있다.
- <460> 도 2a는 11F2 인간 단일클론성 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 38)과 아미노산 서열(서열번호 32)을 나타낸다. CDR1(서열번호 14), CDR2(서열번호 17) 및 CDR3(서열번호 20) 영역들은 윤곽으로 나타내어져 있고, V 및 J 생식세포계열 유도분들이 표시되어 있다.
- <461> 도 2b는 11F2 인간 단일클론성 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 41)과 아미노산 서열(서열번호 35)을 나타낸다. CDR1(서열번호 23), CDR2(서열번호 26) 및 CDR3(서열번호 29) 영역들은 윤곽으로 나타내어져 있고 V 및 J 생식세포계열 유도분들이 표시되어 있다.
- <462> 도 3a는 12E3 인간 단일클론성 항체의 중쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 39)과 아미노산 서열(서열번호 33)을 나타낸다. CDR1(서열번호 15), CDR2(서열번호 18) 및 CDR3(서열번호 21) 영역들은 윤곽으로 나타내어져 있고, V 및 J 생식세포계열 유도분들이 표시되어 있다.
- <463> 도 3b는 12E3 인간 단일클론성 항체의 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열(서열번호 42)과 아미노산 서열(서열번호 36)을 나타낸다. CDR1(서열번호 24), CDR2(서열번호 27) 및 CDR3(서열번호 30) 영역들은 윤곽으로 나타내어져 있고, V 및 J 생식세포계열 유도분들이 표시되어 있다.
- <464> 도 4는 6H4의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 31)을 인간 생식세포계열 V_H 4-34 아미노산 서열(서열번호 51), V와 J 영역사이에 위치한 인간 생식세포계열 D_H 3-10 아미노산 서열(서열번호 52), 및 인간 생식세포계열 J_H JH1 아미노산 서열(서열번호 53)과 정렬시킨 것을 나타낸다.
- <465> 도 5는 11F2의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 32)을 인간 생식세포계열 V_H 4-59 아미노산 서열(서열번호 43), V와 J 영역사이에 위치한 인간 생식세포계열 D_H 2-2 아미노산 서열(서열번호 45), 및 인간 생식세포계열 J_H JH5b 아미노산 서열 (서열번호 46)과 정렬시킨 것을 나타낸다.
- <466> 도 6은 12E3의 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 33)을 인간 생식세포계열 V_H 3-33 아미노산 서열(서열번호 44) 및 인간 생식세포계열 J_H JH6b 아미노산 서열(서열번호 47)과 정렬시킨 것을 나타낸다.
- <467> 도 7은 6H4의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 34)을 인간 생식세포계열 V_K L6 아미노산 서열(서열번호 54) 및 인간 생식세포계열 J_K JK2 아미노산 서열(서열번호 55)과 정렬시킨 것을 나타낸다.
- <468> 도 8은 11F2의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 35)을 인간 생식세포계열 V_K A27 아미노산 서열(서열번호 48) 및 인간 생식세포계열 J_K JK4 아미노산 서열(서열번호 50)과 정렬시킨 것을 나타낸다.
- <469> 도 9는 12E3의 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열(서열번호 36)을 인간 생식세포계열 V_K L15 아미노산 서열(서열번호 49) 및 인간 생식세포계열 J_K JK4 아미노산 서열(서열번호 50)과 정렬시킨 것을 나타낸다.
- <470> 도 10은 Biacore 분석법으로 분석된, 타입-II(도 10a) 및 타입-I(도 10b) BMP 수용체에 결합하는 BMP4 결합을 차단하는 항-BMP2/4 단일클론성 항체들을 나타낸다.
- <471> 도 11은 항-BMP2/4 항체들에 의한 BMP2 및 BMP4 신호전달 저해를 나타낸다. C2C12 세포를 재조합 인간 BMP2(도 11a) 또는 BMP4(도 11b) 및 상이한 농도의 5 개 상이한 중화 항-BMP2/4 단일클론성 항체들 또는 IgG1 대조군 mAb와 배양하였다. 세포를 고정하고, 용해하고 알카라인 포스파타제 활성에 대하여 분석하였다.
- <472> 도 12는 골 형성이 본 발명의 항-BMP2 단일클론성 항체들에 의해 유의하게 감소되는 것을 밀도측정 스캐닝으로

나타낸다.

도면

도면1a

```

Q V H L Q Q W G A G L L K P S E T L
1 CAG GTG CAC CTA CAG CAG TGG GGC GCA GGA CTG TTG AAG CCT TCG GAG ACC ACC CTG

-----  

S L T C A V Y G G S F S G Y Y W S W
55 TCC CTC ACC TGC GCT GTC TAT GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC TGG AGC TGG

-----  

I R Q P P G K G L E W I G E I N H S
109 ATC CGC CAG CCC CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG ATT GGG GAA ATC AAT CAT AGT

-----  

CDR2  

G S T N Y N P S L K S R V T I S V D
163 GGA AGC ACC AAC TAC AAC CCG TCC CTC AAG ACT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC

T S K N Q F S L K L S S V T A A D T
217 ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG AGC TCT GTG ACC GCC GCG GAC ACG

-----  

CDR3  

A V Y Y C A R E Y Y Y G S E S E Y F
271 GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG TAT TAT GGT TCG GAG AGT GAA TAC TTC

-----  

Q H W G Q G T L V T V S S
325 CAG CAC TGG GGC CAG GGC ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

```

도면1b

```

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R
1 GAA ATT GTG TTG ACA CAG TCT CCA GCC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA

-----  

CDR1  

A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y
55 GCC ACC CTC TCC TGC AGC GGG AGT CAG ACT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG TAC

-----  

CDR2  

Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R
109 CAA CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GAT GCA TCC AAC AGG

-----  

CDR3  

A T G I P A R F S G S G S G T D F T
163 GCC ACT GGC ATC CCA GCC AGG TTC ACT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACT

-----  

L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q
217 CTC ACC ATC AGC AGC CTA GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTT TAT TAC TGT CAG CAG

-----  

CDR3  

R S N W P H T F G Q G T K L E I K
271 CGT AGC AAC TGG CCT CAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

```

도면2a

Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L
 1 CAG GTG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC ACC CTG
CDR1
 S L T C T V S G D S I R S Y Y W S W
 55 TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GAC TCC ATC AGG AGT TAC TAC TGG AGC TGG
CDR2
 I R Q P P G K G L E W I G Y I Y Y R
 109 ATC CGG CAG CCC CCA GGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGA TAT ATC TAT TAC AGA
CDR2
 G S T H Y N P S L K S R V T I S V D
 153 GGG AGC ACC CAC TAC AAC CCC TCC CTC AAG AGT CGA GTC ACC ATA TCA GTA GAC
 T S K N Q F S L K M S S V T A A D T
 217 ACG TCC AAG AAT CAG TTC TCC CTG AAG ATG AGC TCT GTG ACC GCT GCG GAC ACG
CDR3
 A V Y Y C A R I C S S I S C W G W F
 271 GCC GTG TAT TAC TGT GCG AGG ATT TGT AGT AGT ATC AGC TGT TGG GGC TGG TTC
CDR3
 D P W G Q G T L V T V S S
 325 GAC CCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

도면2b

R I V L T Q S P G T L S L S P G E R
 1 GAA ATT GTG TTG ACG CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA
CDR1
 A T L S C R A S Q S V S S S S Y L A N
 55 GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC TAC TTA GCC TGG
CDR2
 Y Q Q X P G Q A P R L L I Y G A S S
 109 TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT GCT GCA TCC AGC
CDR2
 R A T G I P D R F S G S G S G T D P
 163 AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG AGC GAC TTC
CDR3
 T L T I S R L E P B D F A V Y Y C Q
 217 ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG
CDR3
 Q Y G S S P L T F G G G T K V E I K
 271 CAG TAT GGT AGC TCA CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

도면3a

Q V Q L V B S G G G V V Q P G R S L
 1 CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG
 CDR1

R L S C A A S G F T F S S Y G M H W
 55 AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGT TAT CGC ATG CAC TGG
 CDR2

V R Q A P G K G L E N V A V I W D D
 109 GTC CGC CAG GCT CCA GCC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG GAT GAT
 CDR2

G R K K Y Y A D S V K G R F T I S R
 163 GGA AGA AAG AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTT ACC ATC TCC AGA
 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
 217 GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCC GAG GAC
 CDR3

T A V Y Y C A R E P A G V W G M D V
 271 ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAG CCG GCG GGG GTT TGG GGT ATG GAC GTC
 W G Q G T T V T V S S
 325 TGG GGC CAA GCC ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

도면3b

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
 1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GCA GAC AGA
 CDR1

V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
 55 GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT
 CDR2

Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
 109 CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG
 CDR2

Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
 163 CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT
 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
 217 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG
 CDR3

Y N S Y P L T F G G G T K V E I K
 271 TAT AAT AGT TAC CCG CTC ACT TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA

도면4

**4-34 생식세포 계열
6H4 VH**

4-34 생식세포 계열 6H4 VH	Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S - - H - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 4-34 생식세포 계열 6H4 VH	L T C A V Y G G S F S G Y Y W S W I R - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 4-34 생식세포 계열 6H4 VH	Q P P G K G L E W I G E I N H S G S T - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 4-34 생식세포 계열 6H4 VH	N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 4-34 생식세포 계열 JH1 생식세포 계열 6H4 VH	Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - JH1 생식세포 계열 6H4 VH	A R - <i>CDR3</i> E Y F Q H W G Q G - - E Y Y Y G S E S - - - - - - - - - JH1 생식세포 계열 6H4 VH	T L V T V S S - - - - - - - - -
--------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------

도면5

**4-59 생식세포 계열
11F2 VH**

Q V Q L Q E S G P G L V K P S E T L	-
-------------------------------------	---

**4-59 생식세포 계열
11F2 VH**

S L T C T V S G G S I S S Y Y W S W	<i>CDR1</i>
- - - - - D - - R - - - - -	

**4-59 생식세포 계열
11F2 VH**

I R Q P P G K G L E W I G Y I Y Y S	<i>CDR2</i>
- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - R	

**4-59 생식세포 계열
11F2 VH**

G S T N Y N P S L K S R V T I S V D	
- - - H - - - - - - - - - - - - - - - - -	

**4-59 생식세포 계열
11F2 VH**

T S K N Q F S L K L S S V T A A D T	
- - - - - M - - - - - - - - - - - - - - -	

**4-59 생식세포 계열
JH5b 생식세포 계열
11F2 VH**

A V Y Y C A R	<i>CDR3</i>
- - - - - I C S S I S C W G - -	W F

**JH5b 생식세포 계열
11F2 VH**

D P W G Q G T L V T V S S	
- - - - - - - - - - - - - - - - -	

도면6

**3-33 생식세포 계열
12E3 VH**

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y G M H W	
- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	

**3-33 생식세포 계열
12E3 VH**

V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y A D S V K G R F T I S R	<i>CDR2</i>
- - - - - - - - - - - - - - - D - - R K - - - - -	

**3-33 생식세포 계열
JH6b 생식세포 계열
12E3 VH**

D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	<i>CDR3</i>
- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - E P A G V W - - - -	G M D V

**JH6b 생식세포 계열
12E3 VH**

W G Q G T T V T V S S	
- - - - - - - - - - - - - - -	

도면7

L6 생식세포 계열 6H4 VK	E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S
L6 생식세포 계열 6H4 VK	Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F
L6 생식세포 계열 6H4 VK	S G S G S G T D F T L T I S S L E P E D F A V Y Y C Q Q R S N
L6 생식세포 계열 JK2 생식세포 계열 6H4 VK	W P T F G Q G T K L E I K

도면8

A27	생식세포 계열	E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
11F2	VK	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
A27	생식세포 계열	<u>CDR1</u>
11F2	VK	A T L S C <u>R A S Q S V S S S Y L A W</u>
A27	생식세포 계열	<u>CDR2</u>
11F2	VK	Y Q Q K P G Q <u>A P R L L I Y G A S S</u>
A27	생식세포 계열	<u>CDR3</u>
11F2	VK	R A T G I P D R F S G S G S G T D F
A27	생식세포 계열	T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
11F2	VK	- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
A27	생식세포 계열	<u>CDR3</u>
JK4	생식세포 계열	Q Y G S S P
11F2	VK	L T F G G G T K V E I K

도면9

L15 생식세포 계열
12E3 VK

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	<u>CDR1</u>
- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	

L15 생식세포 계열
12E3 VK

W L A W Y Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F	<u>CDR2</u>
- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	

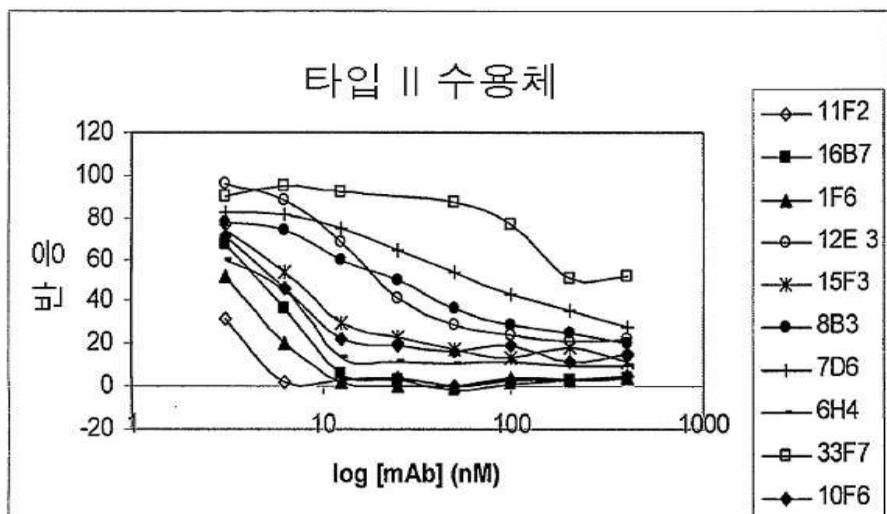
L15 생식세포 계열
12E3 VK

S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S	<u>CDR3</u>
- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	

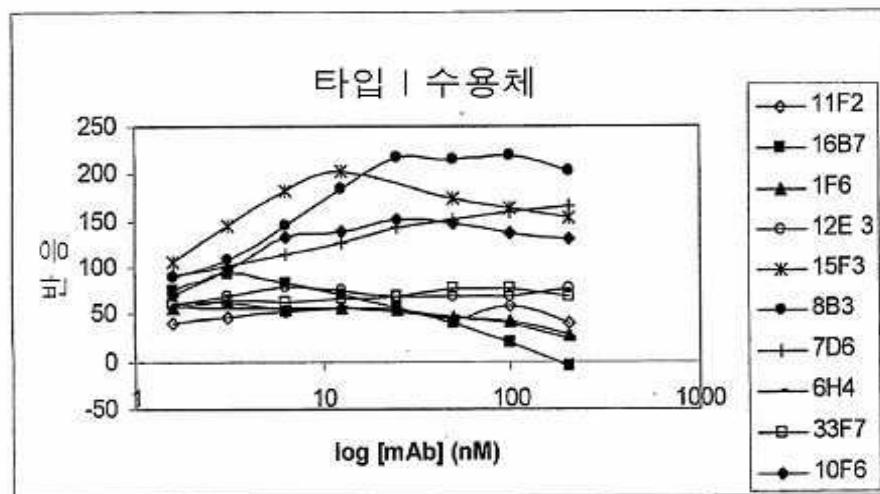
L15 생식세포 계열
JK4 생식세포 계열
12E3 VK

Y P	<u>Y P</u>
L T F G G G T K V E I K	L T F G G G T K V E I K
- - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	

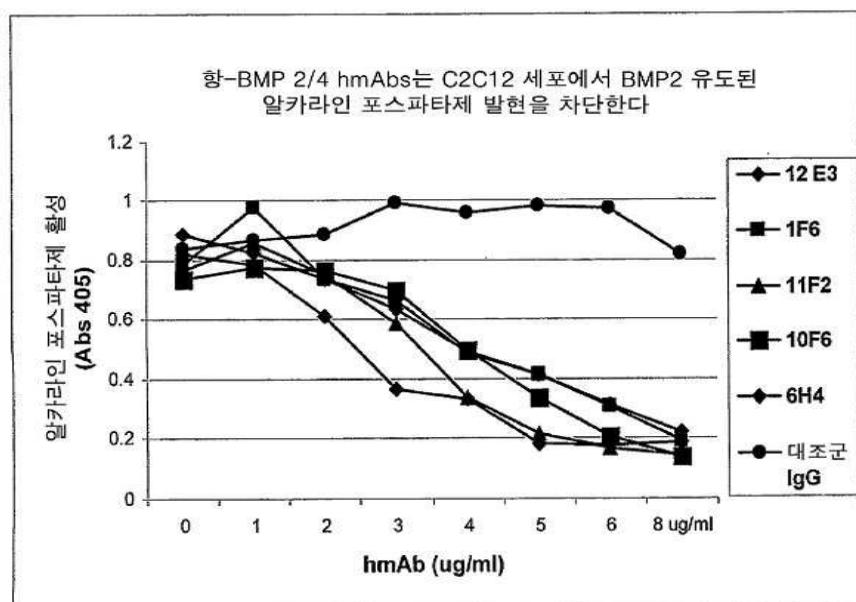
도면10a



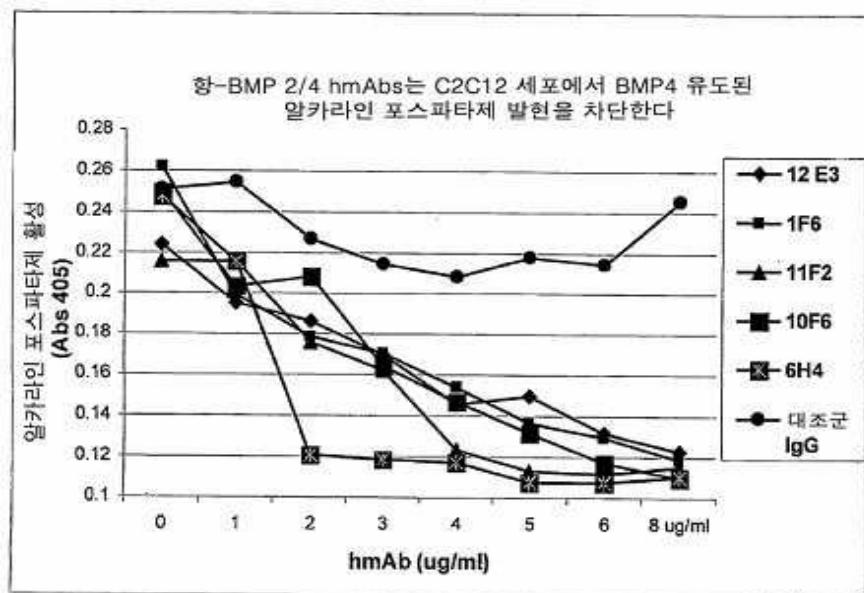
도면10b



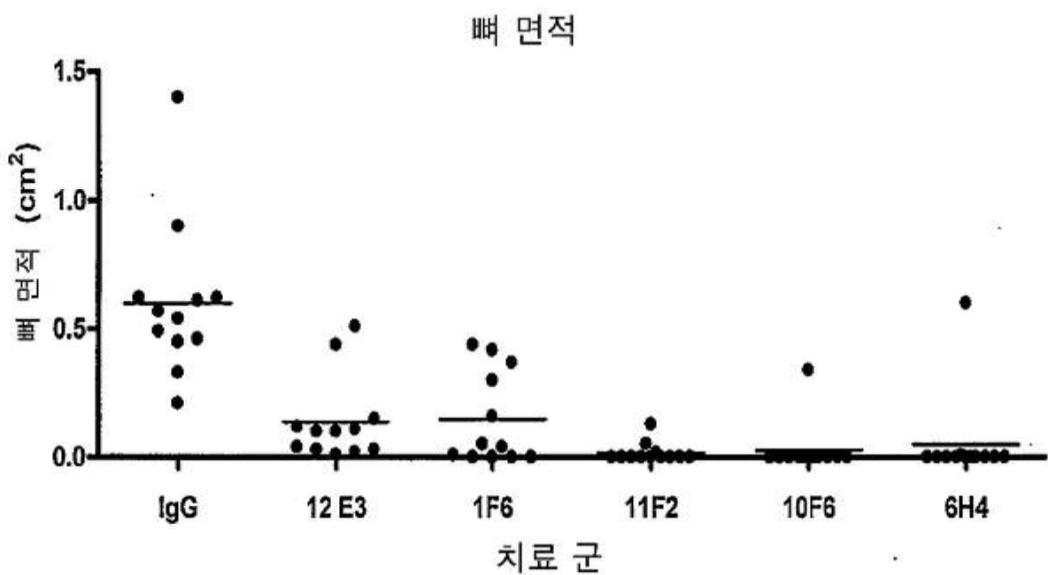
도면11a



도면11b



도면12



서 열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MEDAREX, INC.

ZIMMERMAN, DEBORAH

SELBY, MARK

SRINIVASAN, MOHAN

BELL, ALASDAIR

SINGH, SUJATA

THEOLIS JR., RICHARD

LEBLANC, HEIDI N.

EMORY, KYRA D.

<120> ANTIBODIES TO BONE MORPHOGENIC PROTEINS AND RECEPTORS THEREFOR
AND METHODS FOR THEIR USE

<130> 077375.0492

<150> US 60/824,596

<151> 2006-09-05

<160> 93

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 3140

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ccacaaaaggg cacttggccc cagggctagg agagcgaggg gagagcacag ccaccgcct 60

cggcggcccg ggactcggct cgactcgccg gagaatgcgc ccgaggacga cggggcgcca 120

gagccgcgtt gcttcaact ggcgagcgcg aatgggggtg cactggagta aggtagtg 180

atgcgggggg gcaactcgcc tggcaccgag atgcgcgcg tgcccttccc tggacccggc 240

atggctgcccg cgagccatgg gccgcggcgg agctagcgcg gagcgcggcga ccctcgacc 300

ccgagtcccg gagccggccc cgcgccggc cacgcgtccc tcggcgctg gttctaagg 360

aggacgacag caccagttc tcctttctcc ttcccttcc ctgccccgca ctcctcccc 420

tgctcgctgt ttttgtgtgt cagcacttgg ctggggactt cttgaacttg cagggagaat 480

aacttgcgca ccccactttg cgccggtgcc tttgccccag cggagcctgc ttgcgcatt 540

ccgagcccca ccgccttcc actcctcgcc cttgcggac actgagacgc tgttccagc 600

gtgaaaagag agactgcgcg gccggcaccc gggagaagga ggaggcaaag aaaaggaacg 660
 gacattcgtt ccttcgcaca ggtccttga ccagagttt tccatgtgga cgctcttca 720
 atggacgtgt ccccgctgc ttcttagacg gactgcggc tcctaaaggt cgaccatggt 780
 ggccgggacc cgctgtcttc tagcgttgct gcttccccag gtccctctgg gcggcgccg 840
 tggcctcggtt ccggagctgg gcccaggaa gttcgcggcg gcgtcgctgg gcccggcc 900
 atcccagccc tctgacgagg tcctgagcga gttcaggttg cggctgctca gcatgttgg 960
 cctgaaacag agacccaccc ccagcaggaa cgccgtggc ccccccata tgctagacct 1020
 gtatgcagg cactcaggc agccgggctc acccgccccca gaccaccggc tggagaggc 1080
 agccagccga gccaacactg tgcgcaagtt ccaccatgaa gaatcttgg aagaactacc 1140
 agaaacgagt gggaaaacaa cccggagatt cttcttaat ttaagttcta tccccacgga 1200
 ggagtttatac acctcagcag agcttcaggt ttccgagaa cagatgcaag atgccttagg 1260
 aaacaatagc agttccatc accgaattaa tatttatgaa atcataaaac ctgcaacagc 1320
 caactcgaaa ttccccgtga ccagactttt ggacaccagg ttggtaatc agaatgcaag 1380
 cagggtggaa agtttgatg tcaccccccgc tgtgaigcgg tggactgcac agggacacgc 1440
 caaccatgga ttctgtgtgg aagtggccca cttggaggaa aaacaagggt tctccaagag 1500
 acatgtttagg ataaggcaggc cttgcacca agatgaacac agctggtcac agataaggcc 1560
 attgcttagta actttggcc atgatggaaa agggcatcct ctccacaaaa gagaaaaacg 1620
 tcaagccaaa cacaacacgc ggaaacgcct taagtccagc tgaagagac acccttgc 1680
 cgtggacttc agtgacgtgg ggtggatga ctggattgtg gctccccgg ggtatcacgc 1740
 ctttactgc cacggagaat gccctttcc tctggctgtat catctgaact ccactaatca 1800

tgccattgtt cagacgttgg tcaactctgt taactctaag attcctaagg catgctgtgt 1860
 cccgacagaa ctcaatgtt ttcgtatgtt gtaccgtttttt gagaatgaaa aggttgttattt 1920
 aaagaactat caggacatgg ttgtggaggg ttgtgggtgt cgctagtaca gcaaaattaa 1980
 atacataaat atatatatat atatatattt tagaaaaaag aaaaaaacaa acaaacaaaa 2040
 aaaccccacc ccagttgaca cttaatattt tcccaatgaa gactttattt atggaatgga 2100
 atggaaaaaa aaacagctat ttgtaaaata tatttatatc tacgaaaaga agttggaaaa 2160
 acaaataattt taatcagaga attattcattt aaagatttaa aatgtatattt gttgtacattt 2220
 ttatatgggt tcaacccag cacatgaagt ataatggtca gattttttt gtattttttt 2280
 actattataa ccactttta gaaaaaaat agctaattt gatttatatg taatcaaaag 2340
 aagtagatcggtttt tttgtacata atttccaaa aattgttagtt gtttcagttt gtgtgtatTTT 2400
 aagatgaaaa gtctacatgg aaggttactc tggcaaagtg cttagcacgt ttgcTTTTT 2460
 gcagtgtac ttttgagttc acaagttcaaa gtccagaaaaaaaatggtaatccactc 2520
 tgctgactttt caagattttt atattttca attctcagga atgttgacca gtgattgtcc 2580
 aatccatgag aatttacatc cttatttaggtt ggaatattt gataagaacc agacattgtt 2640
 gatctattat agaaaactctc ctcctgcccc ttaatttaca gaaagaataa agcaggatcc 2700
 atagaaataa tttagaaaaac gatgaacctg caggaaagtg aatgtatggttt tggtttttt 2760
 ctttcctaaa tttagttagtcc cttcaaaagggtt gctgtatctgg ccaaaatgtt caataaaacg 2820
 taagattttt tcattatttga tattgtggtc atatataattt aaaatttgata tctcggtggcc 2880
 ctcatcaagg gttggaaattt tatttggttt ttaccttac ctcatctgag agctctttat 2940

tctccaaaga acccagttt ctaactttt gcccaacacg cagcaaaatt atgcacatcg 3000

tgtttctgc ccaccctctg ttctctgacc tatcagctg ctttcttc caaggttgt 3060

tgttgaaca cattctcca aatgttaaac ctattcaga taataaatat caaatctctg 3120

gcatttcatt ctataaagtc 3140

<210> 2

<211> 392

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Val Ala Gly Thr Arg Cys Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Gln Val

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

Leu Leu Gly Gly Ala Ala Gly Leu Val Pro Glu Leu Gly Arg Arg Lys	20	25	30
-----------------------------------------------------------------	----	----	----

Phe Ala Ala Ala Ser Ser Gly Arg Pro Ser Ser Gln Pro Ser Asp Glu	35	40	45
-----------------------------------------------------------------	----	----	----

Val Leu Ser Glu Phe Glu Leu Arg Leu Leu Ser Met Phe Gly Leu Lys	50	55	60
-----------------------------------------------------------------	----	----	----

Gln Arg Pro Thr Pro Ser Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Tyr Met Leu	65	70	75	80
-----------------------------------------------------------------	----	----	----	----

Asp Leu Tyr Arg Arg His Ser Gly Gln Pro Gly Ser Pro Ala Pro Asp	85	90	95
-----------------------------------------------------------------	----	----	----

His Arg Leu Glu Arg Ala Ala Ser Arg Ala Asn Thr Val Arg Ser Phe	100	105	110
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

His His Glu Glu Ser Leu Glu Glu Leu Pro Glu Thr Ser Gly Lys Thr	115	120	125
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Thr Arg Arg Phe Phe Asn Leu Ser Ser Ile Pro Thr Glu Glu Phe
 130 135 140

Ile Thr Ser Ala Glu Leu Gln Val Phe Arg Glu Gln Met Gln Asp Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Asn Asn Ser Ser Phe His His Arg Ile Asn Ile Tyr Glu Ile
 165 170 175

Ile Lys Pro Ala Thr Ala Asn Ser Lys Phe Pro Val Thr Arg Leu Leu
 180 185 190

Asp Thr Arg Leu Val Asn Gln Asn Ala Ser Arg Trp Glu Ser Phe Asp
 195 200 205

Val Thr Pro Ala Val Met Arg Trp Thr Ala Gln Gly His Ala Asn His
 210 215 220

Gly Phe Val Val Glu Val Ala His Leu Glu Glu Lys Gln Gly Val Ser
 225 230 235 240

Lys Arg His Val Arg Ile Ser Arg Ser Leu His Gln Asp Glu His Ser
 245 250 255

Trp Ser Gln Ile Arg Pro Leu Leu Val Thr Phe Gly His Asp Gly Lys
 260 265 270

Gly His Pro Leu His Lys Arg Glu Lys Arg Gln Ala Lys His Lys Gln
 275 280 285

Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg His Pro Leu Tyr Val Asp
 290 295 300

Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr
 305 310 315 320

His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His
 325 330 335

Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val
 340 345 350

Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala
 355 360 365

Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu Lys Val Val Leu Lys Asn
 370 375 380

Tyr Gln Asp Met Val Val Glu Gly
 385 390

<210> 3
<211> 1779
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 3
gaagagaatg gcggggaaag gagtggttgt gtggttaaa aaataaggga agccgaggcg 60

agagagacgc agacgcagag gtcgagcgcg ggccgaaagc tggcacgt tttctcgact 120

ccggggagcc attccgtgt gccatcccgaa gcaacgcact gctgcagctt ccctgagcct 180

ttccagcaag ttgttcaag attggctgtc aagaatcatg gactgttatt atatgcctt 240

ttttctgtca agacaccatg attcctggta accgaatgct gatggtcgtt ttattatgcc 300

aagtccctgct aggaggcgcg agccatgeta gtttgatacc tgagacgggg aagaaaaaaag 360

tgcgcgagat tcagggccac gcccggaggac gccgctcagg gcagagccat gagctcctgc 420

gggacttcga ggcgacactt ctgcagatgt ttgggctgct cgcggccccg cagccttagca 480

agagtgccgt cattccggac tacatgcggg atcttaccg gcttcagtc gggaggagg 540
 aggaagagca gatccacagc actggcttg agtatacctga gcgcgggccc agccgggcca 600
 acaccgtgag gagttccac cacgaagaac atctggagaa catccaggg accagtgaaa 660
 actctgctt tcgttcctc ttaacctca gcagcatccc tgagaacgag gcgatctct 720
 ctgcagagct tcggcttcc cgggagcagg tggaccaggg ccctgattgg gaaaggggct 780
 tccaccgtat aaacatttat gaggttatga agccccagc agaagtggtg cctggcacc 840
 tcatcacacg actactggac acgagactgg tccaccacaa tgtgacacgg tggaaactt 900
 ttgatgtgag ccctgcggc cttcgctgga cccggagaa gcagccaaac tatggctag 960
 ccattgaggt gactcaccc catcagactc ggacccacca gggccagcat gttaggatta 1020
 gccgatcggt acctaaggaa gttggaaatt gggccagct ccggccctc ctggcacct 1080
 ttggccatga tggccgggc catgccttga cccgacgccc gaggccaaag cgtagcccta 1140
 agcatcactc acagcgggccc aggaagaaga ataagaactg ccggcgccac tcgctctatg 1200
 tggacttcag cgatgtggc tggaaatgact ggattgtggc cccaccaggc taccaggct 1260
 tctactgcca tggggactgc cccttccac tggctgacca cctcaactca accaaccatg 1320
 ccatgtgca gaccctggc aattctgtca attccagttt cccaaagcc ttgtgtgtgc 1380
 ccactgaact gaggccatc tccatgctgt acctggatga gtatgataag gtggactgaa 1440
 aaaattatca ggagatggta gtagagggat gtgggtgccg ctgagatcag gcagtcctt 1500
 aggatagaca gatatacaca ccacacacac acaccacata caccacacac acacgttccc 1560

atccactcac ccacacacta cacagactgc ttccttatag ctggactttt atttaaaaaa 1620

aaaaaaaaaa aaatggaaaa aatccctaaa cattcacctt gaccttattt atgactttac 1680

gtgcaatgt tttgaccata ttgatcatat attttgacaa aatatattta taactacgt 1740

ttaaaagaaa aaaataaaat gagtcattat tttaaggt 1779

<210> 4
<211> 408
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4
Met Ile Pro Gly Asn Arg Met Leu Met Val Val Leu Leu Cys Gln Val

1 5 10 15

Leu Leu Gly Gly Ala Ser His Ala Ser Leu Ile Pro Glu Thr Gly Lys
20 25 30

Lys Lys Val Ala Glu Ile Gln Gly His Ala Gly Gly Arg Arg Ser Gly
 35 40 45

Gln Ser His Glu Leu Leu Arg Asp Phe Glu Ala Thr Leu Leu Gln Met
 50 55 60

Phe Gly Leu Arg Arg Arg Pro Gln Pro Ser Lys Ser Ala Val Ile Pro
65 70 75 80

Asp Tyr Met Arg Asp Leu Tyr Arg Leu Gln Ser Gly Glu Glu Glu Glu
85 90 95

Glu Gln Ile His Ser Thr Gly Leu Glu Tyr Pro Glu Arg Pro Ala Ser
 100 105 110

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

115

120

125

Ile Pro Gly Thr Ser Glu Asn Ser Ala Phe Arg Phe Leu Phe Asn Leu
 130 135 140

Ser Ser Ile Pro Glu Asn Glu Ala Ile Ser Ser Ala Glu Leu Arg Leu
 145 150 155 160

Phe Arg Glu Gln Val Asp Gln Gly Pro Asp Trp Glu Arg Gly Phe His
 165 170 175

Arg Ile Asn Ile Tyr Glu Val Met Lys Pro Pro Ala Glu Val Val Pro
 180 185 190

Gly His Leu Ile Thr Arg Leu Leu Asp Thr Arg Leu Val His His Asn
 195 200 205

Val Thr Arg Trp Glu Thr Phe Asp Val Ser Pro Ala Val Leu Arg Trp
 210 215 220

Thr Arg Glu Lys Gln Pro Asn Tyr Gly Leu Ala Ile Glu Val Thr His
 225 230 235 240

Leu His Gln Thr Arg Thr His Gln Gly Gln His Val Arg Ile Ser Arg
 245 250 255

Ser Leu Pro Gln Gly Ser Gly Asn Trp Ala Gln Leu Arg Pro Leu Leu
 260 265 270

Val Thr Phe Gly His Asp Gly Arg Gly His Ala Leu Thr Arg Arg Arg
 275 280 285

Arg Ala Lys Arg Ser Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys
 290 295 300

Asn Lys Asn Cys Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Gly Trp Asn Asp Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr			
325	330	335	

Cys His Gly Asp Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr			
340	345	350	

Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile			
355	360	365	

Pro Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu			
370	375	380	

Tyr Leu Asp Glu Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met			
385	390	395	400

Val Val Glu Gly Cys Gly Cys Arg			
405			

<210> 5
<211> 3631
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5			
gcggccgctg cagagattgg aatccgcctg ccgggttgg cgaaggagaa gggaggaggc	60		

aggagcgagg agggaggagg gccaaggcg ggcaggaagg cttaggctcg gcgcgtccgt	120		
------------------------------------------------------------------	-----	--	--

ccgcgcgcgg cgaagatcgc acggccgat cgagggcga ccgggtcggt gcccacccg	180		
----------------------------------------------------------------	-----	--	--

gcccaaggcg aaggccgatt cgggccccac ttgcgcgg cggtcgccg cgccacccg	240		
---------------------------------------------------------------	-----	--	--

ctccgcgcgg agggctggag gatgcgttcc ctgggtcg gacttatgaa aatatgcac	300		
----------------------------------------------------------------	-----	--	--

agttaatac tgtcttgaa ttcatgagat ggaagcatag gtcaaagctg tttggagaaa	360		
-----------------------------------------------------------------	-----	--	--

atcagaagta cagtttatac tagccacatc ttggaggagt cgtaagaaag cagtggagt 420
 tgaagtcatt gtcaagtgc tgcgatctt tacaagaaaa tctcaactgaa tgatagtc 480
 ttaaatttgtt gaagtagcaa gaccaattat taaagggtgac agtacacagg aaacattaca 540
 attgaacaat gcctcagcta tacatttaca tcagattatt gggagcctat ttgttcatca 600
 tttctcggt tcaaggacag aatctggata gtatgctca tggactggg atgaaatcag 660
 actccgacca gaaaaagtca gaaaatggag taaccttagc accagaggat acctgcctt 720
 ttttaaagtgc tattgctca gggcactgtc cagatgtgc tattaataac acatgcataa 780
 ctaatggaca ttgcttgcc atcatagaag aagatgacca gggagaaacc acattagctt 840
 cagggtgtat gaaatatgaa ggatctgatt ttcagtgc aaagttctca aaagcccagc 900
 tacgccggac aatagaatgt tgtcgacca atttatgtaa ccagtatttgc caacccacac 960
 tgccccctgt tgtcataggt cggttttg atggcagcat tcgatggctg gtttgc 1020
 tttctatggc tgtctgcata attgctatga tcatcttc cagctgc ttttacaac 1080
 attatigcaa gagcatctca agcagacgtc gttacaatcg tgatggaa caggtatgaa 1140
 catttattcc agttggagaa tcactaaaag accttattga ccagtacaaatgttgc 1200
 gtgggtctgg actacctta ttgggtcagc gaactattgc caaacagatt cagatggcc 1260
 ggcaagttgg taaaggccga tatggagaag tatggatggg caaatggcgt ggcggaaaag 1320
 tggcggtgaa agtattctt accactgaag aagccagctg gttcgagaa acagaaatct 1380
 accaaactgt gctaattgcgc catgaaaaca tactggttt catagccgc gacattaaag 1440
 gtacagggttc ctggactcag ctctatttga ttactgatta ccatgaaaat ggatctct 1500
 atgacttcct gaaatgtgct acactggaca ccagagccct gcttaatttgc ttattcag 1560

ctgcctgtgg tctgtccac ctgcacacag aaatttatgg cacccaagga aagcccggaa 1620
 ttgctcatcg agacctaaag agcaaaaaca tcctcatcaa gaaaaatggg agttgctgca 1680
 ttgctgacct gggcttgct gttaaattca acagtgacac aatgaagtt gatgtgccct 1740
 tgaataccag ggtgggcacc aaacgctaca tggctccgaa agtgcggac gaaaggctga 1800
 acaaaaacca ctccagccc tacatcatgg ctgacatcta cagcttcggc ctaatcattt 1860
 gggagatggc tcgtcggtgt atcacaggag ggatcggtggaa agaataccaa ttgcattt 1920
 acaacatggt accgagtgtat ccgtcatacg aagatatgctg tgaggttggttgtcaaac 1980
 gtttgcggcc aattgtgtct aatcggtggaa acagtgtatgaa atgtctacga gcagtttga 2040
 agctaattgtc agaatgctgg gcccacaatc cagcctccag actcacagca ttgagaatta 2100
 agaagacgct tgccaagatgt gttgaatccc aagatgtaaa aatctgtatgg ttaaaccatc 2160
 gggaggagaaa ctcttagactg caagaactgt ttttaccat ggcatgggtg gaatttagagt 2220
 ggaataagga tggtaacttg gttctcagac tctttttca ctacgtgttc acaggctgct 2280
 aatattaaac cttcagttac tcttattagg atacaagctg ggaacttcta aacacttcat 2340
 tctttatata tggacagctt tattttaaat gtggtttttg atgcctttt ttaagtgggt 2400
 ttttatgaac tgcataaga cttcaatcct gattagtgtc tccagtcagg ctctgggtac 2460
 tgaattgcct gttcataaaa cggtgcttc tgtgaaagcc ttaagaagat aaatgagcgc 2520
 agcagagatg gagaataga cttgcctt tacctgagac attcagttcg tttgtattct 2580
 acctttgtaa aacagcctat agatgtatgtat gtgtttggaa tactgcttat tttatgtatgt 2640
 tttgcctgtgt gtccttagtg atgtgtgtgt gtctccatgc acatgcacgc cgggattcct 2700

ctgctgccat ttgaattaga agaaaataat ttatatgcat gcacaggaag atattgggtt 2760
 ccggtggttt tggcttaa aaatgcaata tctgaccaag attcgccaat ctcataacaag 2820
 ccatttactt tgcaagttag atagctccc caccagctt attttaac atgaaagctg 2880
 atgccaaggc caaaagaagt taaagcatc tgaaatttg gactgtttc cttcaaccac 2940
 cattttttt gtggttatta ttttgtcac ggaaagcatc ctctccaaag ttggagctc 3000
 tattgccatg aaccatgctt acaaagaaag cacttcttat tgaagtgaaat tcctgcattt 3060
 gatagcaatg taagtgccta taaccatgtt ctatattctt tattctcagt aactttaaa 3120
 aggaaagttt ttatatttt gtgtataatg tgcttattt gcaaattcacc cactcctta 3180
 caaccatact ttatataatgt acatacattt atactgtaga aaccagctca tgtgtacctc 3240
 atatccccatc cttaaagagaa gaaatgttat aaagttagaaac taaatataaa ttttcagaat 3300
 taatgcattt aaagtaatat atcaaattca ggactttgtt aacttcaggt aaaaacttca 3360
 ttaggtaat atcatctcaa tttttcaaa tgaaaggatt ctctaatttag aaatttataat 3420
 gtcagagctg ttataaattt atcaactgtc aaatatgttc tggacagctt aatcatttga 3480
 gatttttgggt ttttgattt ctattccctt acttggaaag acaatggaaa atcaggcaga 3540
 aatatttagt atctagtcag tatctgtac tacactgtat aactgttctt caataaaatg 3600
 gttcatattt tatagaaaaa aaaaaaaaaa a 3631

<210> 6
 <211> 532
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Met Pro Gln Leu Tyr Ile Tyr Ile Arg Leu Leu Gly Ala Tyr Leu Phe

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

Ile Ile Ser Arg Val Gln Gly Gln Asn Leu Asp Ser Met Leu His Gly
 20 25 30

Thr Gly Met Lys Ser Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ser Glu Asn Gly Val
 35 40 45

Thr Leu Ala Pro Glu Asp Thr Leu Pro Phe Leu Lys Cys Tyr Cys Ser
 50 55 60

Gly His Cys Pro Asp Asp Ala Ile Asn Asn Thr Cys Ile Thr Asn Gly
 65 70 75 80

His Cys Phe Ala Ile Ile Glu Glu Asp Asp Gln Gly Glu Thr Thr Leu
 85 90 95

Ala Ser Gly Cys Met Lys Tyr Glu Gly Ser Asp Phe Gln Cys Lys Asp
 100 105 110

Ser Pro Lys Ala Gln Leu Arg Arg Thr Ile Glu Cys Cys Arg Thr Asn
 115 120 125

Leu Cys Asn Gln Tyr Leu Gln Pro Thr Leu Pro Pro Val Val Ile Gly
 130 135 140

Pro Phe Phe Asp Gly Ser Ile Arg Trp Leu Val Leu Leu Ile Ser Met
 145 150 155 160

Ala Val Cys Ile Ile Ala Met Ile Ile Phe Ser Ser Cys Phe Cys Tyr
 165 170 175

Lys His Tyr Cys Lys Ser Ile Ser Ser Arg Arg Arg Tyr Asn Arg Asp
 180 185 190

Leu Glu Gln Asp Glu Ala Phe Ile Pro Val Gly Glu Ser Leu Lys Asp

195

200

205

Leu Ile Asp Gln Ser Gln Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu Pro Leu
 210 215 220

Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Arg Gln Val
 225 230 235 240

Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg Gly Glu
 245 250 255

Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Glu Ala Ser Trp Phe
 260 265 270

Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His Glu Asn Ile
 275 280 285

Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly Ser Trp Thr Gln
 290 295 300

Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly Ser Leu Tyr Asp Phe
 305 310 315 320

Leu Lys Cys Ala Thr Leu Asp Thr Arg Ala Leu Leu Lys Leu Ala Tyr
 325 330 335

Ser Ala Ala Cys Gly Leu Cys His Leu His Thr Glu Ile Tyr Gly Thr
 340 345 350

Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys Asn Ile
 355 360 365

Leu Ile Lys Lys Asn Gly Ser Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly Leu Ala
 370 375 380

Val Lys Phe Asn Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Val Pro Leu Asn Thr

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Asp Glu Ser			
405	410	415	

Leu Asn Lys Asn His Phe Gln Pro Tyr Ile Met Ala Asp Ile Tyr Ser			
420	425	430	

Phe Gly Leu Ile Ile Trp Glu Met Ala Arg Arg Cys Ile Thr Gly Gly			
435	440	445	

Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Tyr Asn Met Val Pro Ser Asp			
450	455	460	

Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Val Val Cys Val Lys Arg Leu Arg			
465	470	475	480

Pro Ile Val Ser Asn Arg Trp Asn Ser Asp Glu Cys Leu Arg Ala Val			
485	490	495	

Leu Lys Leu Met Ser Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser Arg Leu			
500	505	510	

Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Val Glu Ser Gln			
515	520	525	

Asp Val Lys Ile			
530			

<210> 7
<211> 2032
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 7 cgcggggcgc ggagtccgccc gggcctcgcc ggacgcgggc agtgcggaga ccgcggcgct	60
-------------------------------------------------------------------------------	----

gagggacgcgg gagccgggag cgcacgcgcg gggtgaggat cagcctactc tttcttagat 120
 gtgaaaggaa aggaagatca tttcatgcct tggtgataaa ggttcagact tctgctgatt 180
 cataaccatt tggctctgag ctatgacaag agagggaaaca aaaagttaaa cttacaagcc 240
 tgccataagt gagaagcaaa cttccttgc acatgcctt tgcaagtgc aggaaaatta 300
 aatgtggca ccaagaaaga ggatggtag agtacagccc ccacccccc tccaaaggtc 360
 ttgcgttgta aatgccacca ccattgtcca gaagactcag tcaacaatat ttgcagcaca 420
 gacggatatt gttcacgat gatagaagag gatgactctg ggttgcctgt ggtcacttct 480
 ggttgcctag gactagaagg ctcagattt cagtgccgg acactcccat tcctcatcaa 540
 agaagatcaa ttgaatgctg cacagaaagg aacgaatgta ataaagacct acaccctaca 600
 ctgcctccat tgaaaaacag agatttgtt gatggaccta tacaccacag ggcttactt 660
 atatctgtga ctgtctgttag ttgccttgc gtccttatca tattatttt ttacttccgg 720
 tataaaagac aagaaaccag acctcgatac agcattgggt tagaacagga tgaaacttac 780
 attcctcctg gagaatccct gagagactta attgaggcgt ctcagagctc aggaagtgg 840
 tcaggcctcc ctctgttgtt ccaaaggact atagctaagc agattcagat ggtgaaacag 900
 attggaaaag gtcgctatgg ggaagttgg atggaaagt ggcgtggcga aaaggtagct 960
 gtgaaagtgt tttcaccac agaggaagcc agctggttca gagagacaga aatatatcag 1020
 acagtgttga tgaggcatga aaacatttg ggttcattt ctgcagatataa caaaggaca 1080
 gggtcctgga cccagttgtat ctaatcaca gactatcatg aaaatggtc ccttatgat 1140
 tatctgaagt ccaccaccct agacgctaaa tcaatgctga agttgccta ctctctgtc 1200

agtgccat gtcattaca cacagaaatc tttactc aaggcaacc agcaattgc 1260
 catcgagatc tgaaaagtaa aaacattctg gtgaagaaaa atgaaacttg ctgtattgct 1320
 gacctggccc tggctgttaa atttatttagt gatacaaatg aagttgacat accacctaac 1380
 actcgagttg gcaccaaacg cttatgcct ccagaagtgt tggacgagag cttgaacaga 1440
 aatcaactcc agtcttacat catggctgac atgtatagtt ttggccatc ccttggag 1500
 gttgcttagga gatgtgtatc aggaggtata gtggaagaat accagcttc ttatcatgac 1560
 ctagtgccca gtgacccttc ttatgaggac atgagggaga ttgtgtgcat caagaagtt 1620
 cgccctcat tc当地aaaccg gtggagcagt gatgagtgtc taaggcagat gggaaaactc 1680
 atgacagaat gctggctca caatcctgca tcaaggctga cagccctgcg ggttaagaaa 1740
 acacttgcca aatgtcaga gtcccaggac attaaactct gataggagag gaaaagtaag 1800
 catctctgca gaaagccaaac aggtactctt ctgtttgtgg gcagagcaaa agacatcaa 1860
 taagcatcca cagtacaagc cttgaacatc gtcctgctc ccagtgggtt cagacccac 1920
 ctttcaggga ggcacctggg caaagacaga gaagctccca gaaggagaga ttgatccgt 1980
 tctgtttgtta ggcggagaaa ccgttggta acttgtcaa gatatgtgc at 2032

<210> 8
 <211> 502
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met	Leu	Leu	Arg	Ser	Ala	Gly	Lys	Leu	Asn	Val	Gly	Thr	Lys	Lys	Glu
1															
	5							10							

Asp Gly Glu Ser Thr Ala Pro Thr Pro Arg Pro Lys Val Leu Arg Cys
 20 25 30

Lys Cys His His Cys Pro Glu Asp Ser Val Asn Asn Ile Cys Ser
 35 40 45

Thr Asp Gly Tyr Cys Phe Thr Met Ile Glu Glu Asp Asp Ser Gly Leu
 50 55 60

Pro Val Val Thr Ser Gly Cys Leu Gly Leu Glu Gly Ser Asp Phe Gln
 65 70 75 80

Cys Arg Asp Thr Pro Ile Pro His Gln Arg Arg Ser Ile Glu Cys Cys
 85 90 95

Thr Glu Arg Asn Glu Cys Asn Lys Asp Leu His Pro Thr Leu Pro Pro
 100 105 110

Leu Lys Asn Arg Asp Phe Val Asp Gly Pro Ile His His Arg Ala Leu
 115 120 125

Leu Ile Ser Val Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Val Leu Ile Ile Leu
 130 135 140

Phe Cys Tyr Phe Arg Tyr Lys Arg Gln Glu Thr Arg Pro Arg Tyr Ser
 145 150 155 160

Ile Gly Leu Glu Gln Asp Glu Thr Tyr Ile Pro Pro Gly Glu Ser Leu
 165 170 175

Arg Asp Leu Ile Glu Gln Ser Gln Ser Ser Gly Ser Gly Ser Gly Leu
 180 185 190

Pro Leu Leu Val Gln Arg Thr Ile Ala Lys Gln Ile Gln Met Val Lys

195

200

205

Gln Ile Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Met Gly Lys Trp Arg
 210 215 220

Gly Glu Lys Val Ala Val Lys Val Phe Phe Thr Thr Glu Glu Ala Ser
 225 230 235 240

Trp Phe Arg Glu Thr Glu Ile Tyr Gln Thr Val Leu Met Arg His Glu
 245 250 255

Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ala Asp Ile Lys Gly Thr Gly Ser Trp
 260 265 270

Thr Gln Leu Tyr Leu Ile Thr Asp Tyr His Glu Asn Gly Ser Leu Tyr
 275 280 285

Asp Tyr Leu Lys Ser Thr Thr Leu Asp Ala Lys Ser Met Leu Lys Leu
 290 295 300

Ala Tyr Ser Ser Val Ser Gly Leu Cys His Leu His Thr Glu Ile Phe
 305 310 315 320

Ser Thr Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp Leu Lys Ser Lys
 325 330 335

Asn Ile Leu Val Lys Lys Asn Gly Thr Cys Cys Ile Ala Asp Leu Gly
 340 345 350

Leu Ala Val Lys Phe Ile Ser Asp Thr Asn Glu Val Asp Ile Pro Pro
 355 360 365

Asn Thr Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Pro Pro Glu Val Leu Asp
 370 375 380

Glu Ser Leu Asn Arg Asn His Phe Gln Ser Tyr Ile Met Ala Asp Met

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Tyr Ser Phe Gly Leu Ile Leu Trp Glu Val Ala Arg Arg Cys Val Ser			
405	410	415	

Gly Gly Ile Val Glu Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr His Asp Leu Val Pro			
420	425	430	

Ser Asp Pro Ser Tyr Glu Asp Met Arg Glu Ile Val Cys Ile Lys Lys			
435	440	445	

Leu Arg Pro Ser Phe Pro Asn Arg Trp Ser Ser Asp Glu Cys Leu Arg			
450	455	460	

Gln Met Gly Lys Leu Met Thr Glu Cys Trp Ala His Asn Pro Ala Ser			
465	470	475	480

Arg Leu Thr Ala Leu Arg Val Lys Lys Thr Leu Ala Lys Met Ser Glu			
485	490	495	

Ser Gln Asp Ile Lys Leu			
500			

<210> 9

<211> 3062

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gaagagatgt gggctctgg ggccgcttggaa ttcatgtttact tccgtcggtt tcttagactgg 60

ctcggctctg tccagtttgtt gccagatagt ctcccacccc ctccccaccc ctcctttccc 120

ctggagattt gaacgctgct tgcattggag aaaagctact tagagaagaa aacgttccac 180

tttagtaacag aagaaaagtc ttggtaaaaa agttgtcatg aatttgctt ttggagagag 240

gcagcaagcc tggaggattt gtaaggctca cactgccaaa gtgagagctg ctggagaact 300

cataatccca ggaacgcctc ttctactctc cgagtacccc agtgaccaga gtgagagaag 360
 ctctgaacga gggcacgcgg cttgaaggac tgtggcaga tgtgaccaag agcctgcatt 420
 aagtgtaca atggtagatg gagtgatgtat tcttcctgtt cttatcatga ttgctctccc 480
 ctccccagt atggaagatg agaagccaa ggtcaacccc aaactctaca tgtgtgtgt 540
 tgaaggtctc tcctgcggta atgaggacca ctgtgaaggc cagcagtgtcttttccctact 600
 gagcatcaac gatggcttcc acgtctacca gaaaggctgc ttccaggtttt atgagcaggg 660
 aaagatgacc tgtaagaccc cgccgtcccc tggcaagct gtggagtgt gccaaaggga 720
 ctgggttaac aggaacatca cggccagct gcccactaaa ggaaatctt tccctggAAC 780
 acagaatttc cactggagg ttggcctcat tattctctt gtgtgttcg cagttatgtct 840
 ttttagcctgc ctgctggag ttgctctccg aaaatttaaa aggcgcaacc aagaacgcct 900
 caatccccga gacgtggagt atggcactat cgaaggcgtc atcaccacca atgtggaga 960
 cagcacttta gcagatttat tggatcattt gtgtacatca ggaagtggct ctggcttcc 1020
 ttttciggtt caaagaacag tggctcgcca gattacactg tggagtgtgt tcggaaagg 1080
 caggtatggt gaggtgtgaa gggcagctg gcaagggaa aatgttgccg tgaagatctt 1140
 ctcccccgtt gatgagaagt catggtttag ggaaacggaa ttgtacaaca ctgtgtgtct 1200
 gaggcatgaa aatatcttag gttcattgc ttcagacatg acatcaagac actccagttac 1260
 ccagctgtgg ttaattacac attatcatga aatggatcg ttgtacgact atcttcagct 1320
 tactactctg gatacagttt gctgccttcg aatagtgtgt tccatagcta gtggcttgc 1380
 acatttgacatagat ttggacacca agggaaacca gccattgccc atcgagat 1440
 aaagagcaaa aatattctgg ttaagaagaa tggacagtgt tgcatacgat atttggccct 1500

ggcagtcatg cattccaga gcaccaatca gcttgatgtg gggacaatac cccgtgtggg 1560
 caccaagcgc tacatggccc cgaaagtctt agatgaacc atccagggtgg atttttcga 1620
 ttcttataaa agggtcgata tttggcctt tggacttgtt ttgtggaaag tggccaggcg 1680
 gatggtgagc aatggtatag tggaggatta caagccaccc ttctacgatg tggtccaa 1740
 tgacccaagt tttaagata tgaggaaggt agtctgtgtg gatcaacaaa ggccaaacat 1800
 acccaacaga tggttcttag acccgacatt aacctctcg gccaagctaa tgaagaatg 1860
 ctggtatcaa aatccatccg caagactcac agcactgcgt atcaaaaaga ctttgaccaa 1920
 aattgataat tccctcgaca aattgaaaac tgactgttg catttcata gtgtcaagaa 1980
 ggaagatttgc acgttgtgtt cattgtccag ctgggaccta atgctggct gactgggtgt 2040
 cagaatggaa tccatctgtc tccctccccaaatggctgtt ttgacaaggc agacgtcgta 2100
 cccagccatg tttggggag acatcaaaac caccctaaacc tcgctcgatg actgtgaact 2160
 gggcatttca cgaactgttc acactgcaga gactaatgtt ggacagacac ttttgcaag 2220
 gttagggactg gaggaacaca gagaatcct aaaagagatc tggcattaa gtcagtggct 2280
 ttgcatacgatc ttccacaagtc tcctagacac tccccacggg aaactcaagg aggtgggtgaa 2340
 ttttaatca gcaatattgc ctgtgtttt ctttttattt gcactaggaa ttctttgcatt 2400
 tccttacttgc cactgttact cttatatttta aagacccaaat ttgccaaat gttggctcg 2460
 tactccactg gtctgtctt ggataatagg aattcaattt ggcaaaacaa aatgtatgt 2520
 cagactttgc tgcattttac acatgtgtgt atgttacaa tgcgtccgaa cattaggaat 2580
 tggttataca caactttgca aatttttat tacttgtca ctttagtagtt tttacaaaac 2640

tgctttgtgc atatgttaaa gcttattttt atgtggcctt atgatttt tacagaaaatg 2700
 ttttaacac tatactctaa aatggacatt ttcttttatt atcagttaaa atcacattt 2760
 aagtgctca catttgtatg tgttagact gtaactttt ttcatgtat atgcagaacg 2820
 tatttagcca ttacccacgt gacaccacgg aatatattac tgatttagaa gcaaagattt 2880
 cagtagaatt ttagtcctga acgctacggg gaaaatgcat ttcttcaga attatccatt 2940
 acgtgcattt aaactctgcc agaaaaaaat aactatttg tttaatcta cttttgat 3000
 ttagtagtta ttgtataaa ttaataaac tgtttcaag taaaaaaaaaaaaaaa 3060
 aa 3062

<210> 10
 <211> 509
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 Met Val Asp Gly Val Met Ile Leu Pro Val Leu Ile Met Ile Ala Leu

1 5 10 15

Pro Ser Pro Ser Met Glu Asp Glu Lys Pro Lys Val Asn Pro Lys Leu
 20 25 30

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

Glu Gly Gln Gln Cys Phe Ser Ser Leu Ser Ile Asn Asp Gly Phe His
 50 55 60

Val Tyr Gln Lys Gly Cys Phe Gln Val Tyr Glu Gln Gly Lys Met Thr
 65 70 75 80

Cys Lys Thr Pro Pro Ser Pro Gly Gln Ala Val Glu Cys Cys Gln Gly

85

90

95

Asp Trp Cys Asn Arg Asn Ile Thr Ala Gln Leu Pro Thr Lys Gly Lys
 100 105 110

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

Leu Ser Val Val Phe Ala Val Cys Leu Leu Ala Cys Leu Leu Gly Val
 130 135 140

Ala Leu Arg Lys Phe Lys Arg Arg Asn Gln Glu Arg Leu Asn Pro Arg
 145 150 155 160

Asp Val Glu Tyr Gly Thr Ile Glu Gly Leu Ile Thr Thr Asn Val Gly
 165 170 175

Asp Ser Thr Leu Ala Asp Leu Leu Asp His Ser Cys Thr Ser Gly Ser
 180 185 190

Gly Ser Gly Leu Pro Phe Leu Val Gln Arg Thr Val Ala Arg Gln Ile
 195 200 205

Thr Leu Leu Glu Cys Val Gly Lys Gly Arg Tyr Gly Glu Val Trp Arg
 210 215 220

Gly Ser Trp Gln Gly Glu Asn Val Ala Val Lys Ile Phe Ser Ser Arg
 225 230 235 240

Asp Glu Lys Ser Trp Phe Arg Glu Thr Glu Leu Tyr Asn Thr Val Met
 245 250 255

Leu Arg His Glu Asn Ile Leu Gly Phe Ile Ala Ser Asp Met Thr Ser
 260 265 270

Arg His Ser Ser Thr Gln Leu Trp Leu Ile Thr His Tyr His Glu Met

275

280

285

Gly Ser Leu Tyr Asp Tyr Leu Gln Leu Thr Thr Leu Asp Thr Val Ser
 290 295 300

Cys Leu Arg Ile Val Leu Ser Ile Ala Ser Gly Leu Ala His Leu His
 305 310 315 320

Ile Glu Ile Phe Gly Thr Gln Gly Lys Pro Ala Ile Ala His Arg Asp
 325 330 335

Leu Lys Ser Lys Asn Ile Leu Val Lys Lys Asn Gly Gln Cys Cys Ile
 340 345 350

Ala Asp Leu Gly Leu Ala Val Met His Ser Gln Ser Thr Asn Gln Leu
 355 360 365

Asp Val Gly Asn Asn Pro Arg Val Gly Thr Lys Arg Tyr Met Ala Pro
 370 375 380

Glu Val Leu Asp Glu Thr Ile Gln Val Asp Cys Phe Asp Ser Tyr Lys
 385 390 395 400

Arg Val Asp Ile Trp Ala Phe Gly Leu Val Leu Trp Glu Val Ala Arg
 405 410 415

Arg Met Val Ser Asn Gly Ile Val Glu Asp Tyr Lys Pro Pro Phe Tyr
 420 425 430

Asp Val Val Pro Asn Asp Pro Ser Phe Glu Asp Met Arg Lys Val Val
 435 440 445

Cys Val Asp Gln Gln Arg Pro Asn Ile Pro Asn Arg Trp Phe Ser Asp
 450 455 460

Pro Thr Leu Thr Ser Leu Ala Lys Leu Met Lys Glu Cys Trp Tyr Gln

465	470	475	480
-----	-----	-----	-----

Asn Pro Ser Ala Arg Leu Thr Ala Leu Arg Ile Lys Lys Thr Leu Thr			
485	490	495	

Lys Ile Asp Asn Ser Leu Asp Lys Leu Lys Thr Asp Cys			
500	505		

<210> 11

<211> 11449

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

gcgaaactta aggaatcctg cttcccgga gccgcggcg atgcgactag ggctgccggg 60

cgccgcccgc cccgtccgg cttcgcttt cccggcagtc ggaaactagt tctgaccctc 120

ccccccgac cccggatcga atccccgccc tccgcaccct ggatatgtt tctccagac 180

ctggatattt ttttgatatac gtgaaactac gaggaaata atttggggta ttttttttg 240

gctccctgct ttccccacag acatgcctc cgtttggagg gccgcggcac cccgtccgag 300

gcgaaggaac ccccccagcc gcgaggaga gaaatgaagg gaatttctgc agcggcatga 360

aagctctgca gctaggtct ctcatcagcc atttgtcctt tcaaactgta ttgtgatacg 420

ggcaggatca gtccacggga gagaagacga gcctccggc tgttctccg ccggctact 480

tcccatattt ctttctttg ccctcctgat tcttgctgg cccagggatg acttcctcg 540

tgcagcggcc ctggcgggtg ccctggctac catggaccat cctgctggc agcactgcgg 600

ctgcttcgca gaatcaagaa cgcttatgtg cgtttaaga tccgtatcag caagacattg 660

ggataggtga gagtagaatc tctcatgaaa atggacaat attatgctcg aaaggtagca 720

cctgctatgg ccittggag aaatcaaag gggacataaa tcttgaaaa caaggatgtt 780

ggtctcacat tggagatccc caagagtgc actatgaaga atgtgttagta actaccactc 840
 ctccctcaat tcagaatgga acataccgtt tctgtgttg tagcacagat ttatgtaaatg 900
 tcaactttac tgagaatttt ccacccctcg acacaacacc actcagtcca cctcattcat 960
 ttaaccgaga tgagacaata atcattgctt tggcatcagt ctctgtatta gctgtttga 1020
 tagttgcctt atgcttgga tacagaatgt tgacaggaga ccgtaaaca ggtttcaca 1080
 gtatgaacat gatggaggca gcagcatcg aaccctctt tcatcttagat aatctgaaac 1140
 tgttggagct gattggccga ggtcgatatg gagcagtata taaaggctcc ttggatgagc 1200
 gtccagttgc tgtaaaagtg tttcccttg caaaccgtca gaattttatc aacgaaaaga 1260
 acatttacag agtgccttg atggaacatg acaacattgc ccgtttata gttggagatg 1320
 agagagtac tgcagatgga cgcatgaa atttgcgtt gatggagatc tatccaaatg 1380
 gatctttagt caagtattta agtctccaca caagtgcgtt ggtaagctt tgcgttttg 1440
 ctcattctgt tactagagga ctggcttac ttcacacaga attaccacga ggagatcatt 1500
 ataaacctgc aatttccat cgagattaa acagcagaaa tgccttagt aaaaatgatg 1560
 gaacctgtgt tattagtgac ttggactgt ccatgaggct gactggaaat agactggc 1620
 gcccaggggaa ggaagataat gcagccataa gcgagggtgg cactatcaga tatatggcac 1680
 cagaagtgc agaaggagct gtgaacttga gggactgtga atcagcttg aaacaagtag 1740
 acatgtatgc tctggacta atctattggg agatatttat gagatgtaca gacctttcc 1800
 cagggaaatc cgtaccagag taccagatgg ctttcagac agaggttggaa aaccatccca 1860
 cttttggatc tatgcaggtt ctcgtgtcta gggaaaaaca gagacccaag ttcccagaag 1920

cctggaaaga aaatgcctg gcagtgggt cactcaagga gacaatcgaa gactgttggg 1980
accaggatgc agaggctcg cttactgcac agtgtgctga ggaaaggatg gctgaactta 2040
tgatgatttggaaagaaac aaatctgtga gcccaacagt caatccaatg tctactgcta 2100
tgccagaatga acgcaacctg tcacataata ggcgtgtgcc aaaaattggc ccttatccag 2160
attattcttc ctccctatac attgaagact ctatccatca tactgacagc atcgtgaaga 2220
atatttcctc tgaggattct atgtccagca caccttgac tatagggaa aaaaaccgaa 2280
attcaattaa ctatgaacga cagcaaggcac aagctgaat cccagccct gaaacaatg 2340
tcaccagcct ctccaccaac acaacaacca caaacaccac aggactcactg ccaagtactg 2400
gcatgactac tatactgag atgccatacc cagatgaaac aaatctgcat accacaaatg 2460
ttgcacagtc aattggcca acccctgtct gcttacagct gacagaagaa gacttggaaa 2520
ccaacaagct agacccaaaa gaagttgata agaacctcaa ggaaagctct gatgagaatc 2580
tcatggagca ctctttaaa cagtttagtg gcccagaccc actgagcagt actagttcta 2640
gcttgcttta cccactcata aaacttgcag tagaagcaac tggacagcag gacttcacac 2700
agactgcaaa tggccaagca tggggattc ctgtatgttgcctactcactgatc 2760
tcccccaagca gcagaacctt cccaaagagac ctactagttt gccttgaac accaaaaatt 2820
caacaaaaga gccccggcta aaatttggca gcaaggacaa atcaaacttg aaacaagtgc 2880
aaactggagt tgccaagatg aatacaatca atgcagcaga acctcatgtg gtgacagtc 2940
ccatgaatgg tggcggcaggatg agaaaccaca gtgttaactc ccatgctgcc acaacccaaat 3000
atgccaatgg gacagtacta tctggccaaa caaccaacat agtgacacat agggcccaag 3060
aatgttgca gaatcagttt attgggtgagg acacccggct gaatattaat tccagtcctg 3120

atgagcatga gccttactg agacgagagc aacaagctgg ccatgatgaa ggtttctgg 3180
 atcgcttgtt ggacaggagg gaacggccac tagaagggtgg ccgaactaat tccaataaca 3240
 acaacagcaa tccatgttca gaacaagatg ttctgcaca gggtgttcca agcacagcag 3300
 cagatcctgg gccatcaaag cccagaagag cacagaggcc taattctctg gatcttcag 3360
 ccacaaatgt cctggatggc agcagtatac agataggtga gtcaacacaa gatggcaa 3420
 caggatcagg tgaaaagatc aagaaacgtg tgaaaactcc ctattctt aagcggtggc 3480
 gcccctccac ctgggtcatc tccactgaat cgctggactg tgaagtcaac aataatggca 3540
 gtaacagggc agttcattcc aaatccagca ctgctgtta cttgcagaa ggaggcactg 3600
 ctacaaccat ggtgtctaaa gatataggaa tgaactgtct gtgaaatgtt ttcaagccta 3660
 tggagtgaaa ttatTTTt catcattaa acatgcagaa gatgttaaa aataaaaaaa 3720
 aaactgctt atccctctgt cagcaccccc tcccacccct gcaacaaaga cttgctttaa 3780
 atagattca gctatgcaga aaaattttagc ttatgcttcc atatTTTaa atttgtttt 3840
 ttaagTTTg cactttgtt tagtctcgct aaagttatat ttgtctgtta tgaccacaga 3900
 gtttatatgtg tgtgtatcaa aagtggctc aaaatTTT ttaagaaaa aaagcaaaaa 3960
 caatgtattt ctgataatca gtttggacca gtttcttaag gtcattaaaa cagaagcaaa 4020
 ttaagacagg ttgactgca gtgggtctg gtatccatgt ttatTTCTG ggcacaagct 4080
 agTTTTATG ttgatacggtt cctgaacata ttatcttggt ggacatctt tctttgtgt 4140
 ttgtttgaa tggcaatag ttataggcc acaaataagc ttcttgtaa gctcttcc 4200
 taacagggca catattcttca cataatataa acactttct gccccatctc ccatacttt 4260

gaaggcagt tctatgacag tgaatttgc acaggagaag cagctacctg atttctact 4320
 ttctctctcc ttatcatgga gaatacagaa acattgtctg aaaggctct aaagaaggaa 4380
 ctaccaaaac ctgacttgaa atgccatttc ttttaacctt ccaaatccta aatgttcct 4440
 tcaaggcatc ttaataaact tatttgcttc tggtttggg agttcataag agagaataga 4500
 acaaaaataca ggacatcaaa tattagccat ttcccattt atttatTT tctatgtagg 4560
 ttcatgttcc atgttcattt attaagaaa tacatTTta ttggtaagct tatagagcta 4620
 cacttatgga attttaagt aggtaaataa atggtaaga caaaatagtg ttatagcctt 4680
 cattctctga ataggccatc tttgactcat aaaattaccc ttactgttta ttataacttc 4740
 agaagtaatt tatagttctg aacctatagt atctttacc ctgttccaa gcaaagactg 4800
 gtgactttat ctgaaaatga ttcctttcc catgacctaa aacactgtga ggaaaaatca 4860
 ttcaagtggc atgccaagtc cctatgaagg aaggcgtct atcaaacctt ccttttga 4920
 gcaaactgag actaaacttc tctttttca aaattgtgtt atcttccttta atcctatTT 4980
 cataatTTT ccitttgcca gttttcaca ttatcttga tatgtgagca acatttatta 5040
 tttacattag agtatacctt ttagtaataa aatgacttga aatcatatta tttttaaaag 5100
 cccttgcTT ctTCattac ttataatctc ctctaaaaca acctctgcat gttttttta 5160
 aataaagcac ttctgtcaa ataatggact ttttctaaa cagaaattat tttctattaa 5220
 tttgcaact gatgatttca ctTTTTTA ctTTTTTC gattatcaga gtacttagta 5280
 aatgttatAT agtttagttc taagatagtt ccagggatta aaaggttaag aggaaaacac 5340
 aaatcaccaa attctgatt tatgtttta tctcctgaac aatatttct cactcatatt 5400
 cctctatctt atcacttagc taaagacagc ctaaaattcc caatTTCTG tccaaaatat 5460

ttgtgattta ctgttatata agcctctca tttgccatgt gctgtatct tacaagttt 5520
 atgttactat acctaccatt tattcagtg gatigctgaa cacagttcg gattcataga 5580
 attaagaata tcctgttagt gcccaggatt tccacgttt gtgttttatt gcccctttc 5640
 tttattcagc cccttaatct atttcagtc ttctggcacg taatttttt cacagttt 5700
 attcttctat taacaaatta ttttatctt tcctagtaca tttcactta gttctttgc 5760
 ccttaaatat ct当地acatg cattttagga tattttttc aaatatttgc aggacaactt 5820
 tgaatcaaaa taaattatgt tccttctcca atttgaagca ttgaggataa atgaccattt 5880
 gaggtctaacc tgatctttc ctgccagaag agttatctt cgttctgctt tatttgtt 5940
 tggccagtt gattgttagt tgtccacat ttttaatat tggaaaaatt atgataaaat 6000
 gctttaaaaa ttaatatgcc agattaaaat aactgaatag ttactatattt cattcaagca 6060
 tggccatata aaataatttc ct当地accag ttttcttag taaactccgt aaaaagttt 6120
 aaaggtggaa agtatataatc attttataa attttaattt gtacatcaga ct当地aaaat 6180
 ctgtaatata caagcaagca aaattatattt aaatgactta attgtatgtt aataactcatc 6240
 tgataataaa tgcttcttaa agttgacatt taactgtat cacaagttt tataatgtt 6300
 aaagtgggtt cctttgaat aaaagatcat tcaactaaaa atattaaaat ttatttcact 6360
 ggatggtaat gtaaccttaa aagcatcata ataggtaaag tctaatatta gttcccttaa 6420
 caaaatccta actgtatacc agaatttagt cactgaaaga acttgattt aattacgttt 6480
 agacaaaaaat gatttaattt gtaattctta aactttctt aatgcataat tggcaaaaaa 6540
 aaaaacccac tggtaaccgt gtaggaagtt acaagaaggc acatactgaa tgctgaagta 6600

tacatatgct atttcttta aacctcagag caaccatatg agcattgtaa ttaatattcc 6660
 cattttacag atgaggaaac tgaagctaag agaagctaag taatatgccc aaggtccaca 6720
 tctagtaaca gacaaagctg ggatttcagt ctatgtctgc ctctctccac atctttca 6780
 tccataccac actgcctaca tgccatatga caggatgtgt aatggctaa cgtttattta 6840
 aaaagttcag gccaggtgca gtggcttatg cctataatcc ccgcacttg ggaggccgag 6900
 ccgggtggat catgaggtca gacgttcaac accagcctgg ccaagatggt gaaaccccgt 6960
 ctctattaaa aatattttt aaaaattaac tgagcgttgt ggtggcgcc ttagtccca 7020
 gctactcagg aggctaaggc aggagaatct cttgaacccg agaggtggag gttgcagtga 7080
 gctgagatcg cggcactgca ctgcagccta ggcgacagag caagactgcc tcaaaaaaaa 7140
 aacataaaaa ttcatcact atactctggc acaatttca tttgtatatg agccaaacca 7200
 cataccttaa tgatttggga agttaggcaa atatgagata tgtagacata tctatgctga 7260
 ttgttgcttg agaaataatt actaattcta gacaaaactc aatcctgtat cttccatcat 7320
 gaatcttaaa atcatttcac ttcactccta acatttctta cattgcagaa ctaatggtaa 7380
 agtaaatttt acggaaaaag ttaagatagc tttggaaaca gagacccccc cctaaattga 7440
 ttccatagca gatttgggg aattaacaaa gaatttcagt ctcatcaatc ctttgaatcc 7500
 atcttcaaaa ctctgcttt taataacttt agaaaattta ctaatctata gaactaattt 7560
 agtaggatat aggaaggata caaggatata atgtccttt tataaaagtt tagtatagtc 7620
 tctttacatg tatccacttg ttccagaaaa tgtgcattgg ttctgaatgt gaaaatattt 7680
 aaagagagaa aggaacactc aagtaagtgt gggcttcagt gggaaattatc aaaaaacatt 7740
 ggcaagtatt ttatTTAA ttatTTCAA atttgacttc tacagccaag tggaatttgt 7800

aggctgttagc ttttacactg aaatttctag tctttgttaag tgccctctga aagtcatata 7860
 aaatggaaaa atattcaat gagctttcc tttttcata ttatggaca tgaatattt 7920
 attggagatc attaactcct agaatttgag attatatttc catacaacat tttataaaagt 7980
 tatgttgaac ttactacctg ttatgtgcag gttattatgt aactattcac agattgcttc 8040
 atatattgct ttatcttccc atctaacttc taaaagttaa aatccggaca cacatgttga 8100
 ttatctagac cagtcattct ggaaatttga acactccac ataaacccca ggagacttt 8160
 tcagaatgca atgttctaa atgtactgtt actggcagtt tactctccag catataaggt 8220
 tgcattttaa cttagatt atgaactgtg caaactttac cccaaactat cttgcattat 8280
 tccctctaa atatattcct tgattaagta aatctggcaa atcactgtt gagctagtt 8340
 cataaaattt gtatcaaga gaaggcttt ctacaagttt ccagattaac ataaagaaaa 8400
 gaggaatca cagggcattt aagtgcacct tccattact ttccttaaat cacctcatag 8460
 ttaggctggg cgccgtggct cacgcctgtat atcccagcac ttggggaggc cgagacggtg 8520
 gatcacgagg tcagggact gagatcatcc tggctaacac gatgaaacct catctctact 8580
 aaaaatacaa ataattagcc aggcattgtg gcacgcgcct gtatcccag ctactcgga 8640
 ggcagagaca ggagaatcgt ttgcacccgg gaggcggagg ttgttgcaat gagccgagat 8700
 cgcccaatg cactccagcc tggctacag agttagactc catctcaaaa aaaaacaaaa 8760
 aaaatcacct catagtttat gtctgactta ctccaaacct cagttatctg attttagtc 8820
 tgtgtcagga aagtttctt catatctatt ctgtctccct cctttgtat tttaatttt 8880
 tttctttac ccagtaggac aaaaaagagc agttggtcat catccccat attcttagtc 8940

ttcagtatgc ttccggcctc tcaatgaaca cttaaatctc aattcttcag acaaaaattgc 9000
 ttaagctt ctccctagtc ctatttat gactttatat ttaagaatat agaattataat 9060
 tttctttat attcaaattc attactccag ttaagtaata gtttgatagt ttgatagaat 9120
 cgagagttaa gatgttcta tttgaaatgt gattcaacca tcagaccacc agcaaatcg 9180
 cacttaattt ttgtgttatac taacatttc tatttgaaat tttatgatt ttatattctc 9240
 attagttata actaaaaagc catgcacaca gaattgtata tcatttgcc attaaaattt 9300
 tttaacatata tgtagcaagg ttagtttat gattgagcca caaccttta catattttt 9360
 gtatgaaata ttaaacacta aatgcaagat taacttcaa aagcaaaccc tacattaatc 9420
 aggtattatc tatggacatt ttgttagacc acctttgaaa tacttattat tttgcaacat 9480
 agactggact atacaacttt catttaactt ttaggtgact gatthaagtt gagtgcat 9540
 atagagaaaa accttagaaat ttatctcatg gcagatacat ttgaaagtac ttcagaagaa 9600
 tttatgttgtt atattaaac taggctcaaa ataaatctat cgtatctta aaagtccat 9660
 tctgttattt ctgtgttgtt tgttagtgtt ctatcaaaca ttgtgaacat acacatttt 9720
 aaaacaactt gaaaccattt taaaatctg ggtaagagag aaggaatctt cagaacaaaa 9780
 tcacatcatt agggtgtcca gtttatgatt gaattttaa gcaattact gtatttgaaa 9840
 ctacaacttgc attgggtttt cagttttaaa aggcaacatg tgggtttat ccattttatt 9900
 tataacctta gatttcagaa acatcttcat gttttagatg cattctacag acatcatgtt 9960
 actaaaaaac tcagggcccc ttccatccct ttgtacactg aaaaaggtaa attgttagca 10020
 agtaagcaat tagatccagt tgaatattt aagtgttgt tgacacatgc attaatgtt 10080
 tcatcttattt tgacttttc acatagatataatcagat ttcattttat ataaaaagtt 10140

gcccaggct gtaattactg aacagaggga atgactcaac taattggcta cattttgcaa 10200

caaatttagg ccittagagt tgaagcactg acttaaaacg acttacatii ctgttcttg 10260

gtcaaatgac catacatgat atgggacaaa ttgtttcatt ttgtttgtt ttaataagg 10320

gaacttggta aagttagttcc tgtcagatag gatttctca agagacaatt taacgtata 10380

aagccttcta aaagtgaact aaatattta taacttagt aatagctgg atgggttga 10440

gaaaataacc tgtatatttc acattgtcaa acagaatttt tctttgaatc agacaagttc 10500

aagctctaaa ttgatgtgct atatacttaa aatcctagga agttatctgt aaccagtctc 10560

ttgtctcagg ctttcacct tgttaccaat cctcgtaagt atgtaaagga aacatatttt 10620

taaagaagct taacagtaag aaaaaattac taaaagatgc aattcaaaga tagtcccag 10680

tttaaacactg aattgcttga cttctgtggc tttttttt ctggccacat ttattttttt 10740

aagcaatttt tgtatgcctt gttatttcat ttccatagag attatattgt atcagtgttt 10800

atgtaagctg gaatcatcct cagtttttg ctgataattt ttcaaataaa gatacatgga 10860

taattgtaaa atacactaac tcttagggtg ttgttagtagc tgaaacatgg agatgcgtag 10920

ctgtcatgct ttttctgaat ggacaggaga aacataagct acggaggatt cacttctgag 10980

gatgctttc cgaaaaaga aaggctagaa aatactcgca cttcctcaga accctttc 11040

ttgttaacgg gtatctttg ttgggtgttt ttgctttac attacagata gactatcata 11100

tatgacttta tgaataattt cagttattt gctttgtat aagctgtctg aagccttgct 11160

atgctgtata agttgtgttt gatggatcg tgtgagata aaataaagca aatcaatttt 11220

cttttgtatt atctatggat gccactatga aagctgacat taagccacta aagagtttc 11280

tatgaataag tgtaagtaaa tgcttgata tatataaaacc taaaataaaaa gattgtattg 11340

atacagagac attggagaag gagatttaa ggcagttct taggttaaa aaggcttgct 11400

gtaaaaatggc gcgttattcc gtttattaaa gatcatatta atgacaata 11449

<210> 12
<211> 1038
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Met Thr Ser Ser Leu Gln Arg Pro Trp Arg Val Pro Trp Leu Pro Trp

1 5 10 15

Thr Ile Leu Leu Val Ser Thr Ala Ala Ala Ser Gln Asn Gln Glu Arg
20 25 30

Leu Cys Ala Phe Lys Asp Pro Tyr Gln Gln Asp Leu Gly Ile Gly Glu
 35 40 45

Ser Arg Ile Ser His Glu Asn Gly Thr Ile Leu Cys Ser Lys Gly Ser
 50 55 60

Thr Cys Tyr Gly Leu Trp Glu Lys Ser Lys Gly Asp Ile Asn Leu Val
65 70 75 80

Lys Gln Gly Cys Trp Ser His Ile Gly Asp Pro Gln Glu Cys His Tyr
 85 90 95

Glu Glu Cys Val Val Thr Thr Thr Pro Pro Ser Ile Gln Asn Gly Thr
 100 105 110

Tyr Arg Phe Cys Cys Cys Ser Thr Asp Leu Cys Asn Val Asn Phe Thr
 115 120 125

Glu Asn Phe Pro Pro Pro Asp Thr Thr Pro Leu Ser Pro Pro His Ser
 130 135 140

Phe Asn Arg Asp Glu Thr Ile Ile Ala Leu Ala Ser Val Ser Val
 145 150 155 160

Leu Ala Val Leu Ile Val Ala Leu Cys Phe Gly Tyr Arg Met Leu Thr
 165 170 175

Gly Asp Arg Lys Gln Gly Leu His Ser Met Asn Met Met Glu Ala Ala
 180 185 190

Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asp Leu Asn Leu Lys Leu Leu Glu Leu
 195 200 205

Ile Gly Arg Gly Arg Tyr Gly Ala Val Tyr Lys Gly Ser Leu Asp Glu
 210 215 220

Arg Pro Val Ala Val Lys Val Phe Ser Phe Ala Asn Arg Gln Asn Phe
 225 230 235 240

Ile Asn Glu Lys Asn Ile Tyr Arg Val Pro Leu Met Glu His Asn
 245 250 255

Ile Ala Arg Phe Ile Val Gly Asp Glu Arg Val Thr Ala Asp Gly Arg
 260 265 270

Met Glu Tyr Leu Leu Val Met Glu Tyr Tyr Pro Asn Gly Ser Leu Cys
 275 280 285

Lys Tyr Leu Ser Leu His Thr Ser Asp Trp Val Ser Ser Cys Arg Leu
 290 295 300

Ala His Ser Val Thr Arg Gly Leu Ala Tyr Leu His Thr Glu Leu Pro

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Arg	Gly	Asp	His
Tyr	Lys	Pro	Ala
Ile	Ser	His	Arg
Asp	Leu	Asn	Ser

325 330 335

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

340 345 350

Gly	Leu	Ser	Met
Arg	Leu	Thr	Gly
Asn	Val	Cys	Leu
Arg	Val	Asp	Gly

355 360 365

Glu	Asp	Asn	Ala
Ala	Ala	Ile	Ser
Glu	Val	Gly	Thr
Ile	Arg	Tyr	Met
Ser	Val	Trp	Ala

370 375 380

Pro	Glu	Val	Leu
Glu	Gly	Ala	Val
Asn	Leu	Arg	Asp
Cys	Glu	Ser	Glu
		Ala	

385 390 395 400

Leu	Lys	Gln	Val
Asp	Met	Tyr	Ala
Leu	Gly	Leu	Ile
Ile	Tyr	Trp	Glu
		Ile	

405 410 415

Phe	Met	Arg	Cys
Thr	Asp	Leu	Phe
Gly	Pro	Glu	Ser
Val	Cys	Val	Pro
		Pro	Glu
		Tyr	

420 425 430

Gln	Met	Ala	Phe
Gln	Thr	Gln	Glu
Asn	Gly	Val	Asp
His	Asn	His	Asp
Pro	Pro	Thr	Phe
Thr	Phe	Glu	

435 440 445

Met	Gln	Val	Leu
Val	Gln	Ser	Arg
Glu	Lys	Gln	Arg
Arg	Arg	Pro	Lys
Phe	Phe	Phe	Pro
Pro	Glu		

450 455 460

Ala	Trp	Lys	Glu
Asn	Ser	Leu	Ala
Arg	Val	Arg	Ser
Ser	Leu	Ser	Leu
Lys	Ile	Glu	Thr
		Asp	Ile

465 470 475 480

Glu	Asp	Cys	Trp
Asp	Gln	Asp	Ala
Glu	Ala	Glu	Ala
Ala	Arg	Leu	Thr
Arg	Leu	Thr	Ala
Ser	Gln	Glu	

485 490 495

Ala Glu Glu Arg Met Ala Glu Leu Met Met Ile Trp Glu Arg Asn Lys

500	505	510
-----	-----	-----

Ser Val Ser Pro Thr Val Asn Pro Met Ser Thr Ala Met Gln Asn Glu	515	520	525
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Arg Asn Leu Ser His Asn Arg Arg Val Pro Lys Ile Gly Pro Tyr Pro	530	535	540
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Asp Tyr Ser Ser Ser Tyr Ile Glu Asp Ser Ile His His Thr Asp	545	550	555	560
-------------------------------------------------------------	-----	-----	-----	-----

Ser Ile Val Lys Asn Ile Ser Ser Glu His Ser Met Ser Ser Thr Pro	565	570	575
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Leu Thr Ile Gly Glu Lys Asn Arg Asn Ser Ile Asn Tyr Glu Arg Gln	580	585	590
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Gln Ala Gln Ala Arg Ile Pro Ser Pro Glu Thr Ser Val Thr Ser Leu	595	600	605
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Ser Thr Asn Thr Thr Thr Asn Thr Thr Gly Leu Thr Pro Ser Thr	610	615	620
-------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Gly Met Thr Thr Ile Ser Glu Met Pro Tyr Pro Asp Glu Thr Asn Leu	625	630	635	640
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----	-----

His Thr Thr Asn Val Ala Gln Ser Ile Gly Pro Thr Pro Val Cys Leu	645	650	655
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Gln Leu Thr Glu Glu Asp Leu Glu Thr Asn Lys Leu Asp Pro Lys Glu	660	665	670
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Val Asp Lys Asn Leu Lys Glu Ser Ser Asp Glu Asn Leu Met Glu His	675	680	685
-----------------------------------------------------------------	-----	-----	-----

Ser Leu Lys Gln Phe Ser Gly Pro Asp Pro Leu Ser Ser Thr Ser Ser
 690 695 700

Ser Leu Leu Tyr Pro Leu Ile Lys Leu Ala Val Glu Ala Thr Gly Gln
 705 710 715 720

Gln Asp Phe Thr Gln Thr Ala Asn Gly Gln Ala Cys Leu Ile Pro Asp
 725 730 735

Val Leu Pro Thr Gln Ile Tyr Pro Leu Pro Lys Gln Gln Asn Leu Pro
 740 745 750

Lys Arg Pro Thr Ser Leu Pro Leu Asn Thr Lys Asn Ser Thr Lys Glu
 755 760 765

Pro Arg Leu Lys Phe Gly Ser Lys His Ser Asn Leu Lys Gln Val
 770 775 780

Glu Thr Gly Val Ala Lys Met Asn Thr Ile Asn Ala Ala Glu Pro His
 785 790 795 800

Val Val Thr Val Thr Met Asn Gly Val Ala Gly Arg Asn His Ser Val
 805 810 815

Asn Ser His Ala Ala Thr Thr Gln Tyr Ala Asn Gly Thr Val Leu Ser
 820 825 830

Gly Gln Thr Thr Asn Ile Val Thr His Arg Ala Gln Glu Met Leu Gln
 835 840 845

Asn Gln Phe Ile Gly Glu Asp Thr Arg Leu Asn Ile Asn Ser Ser Pro
 850 855 860

Asp Glu His Glu Pro Leu Leu Arg Arg Glu Gln Gln Ala Gly His Asp
 865 870 875 880

Glu Gly Val Leu Asp Arg Leu Val Asp Arg Arg Glu Arg Pro Leu Glu

885	890	895
-----	-----	-----

Gly	Gly	Arg	Thr	Asn	Ser	Asn	Asn	Asn	Ser	Asn	Pro	Cys	Ser	Glu
				900								910		

Gln	Asp	Val	Leu	Ala	Gln	Gly	Val	Pro	Ser	Thr	Ala	Ala	Asp	Pro	Gly
					915			920				925			

Pro	Ser	Lys	Pro	Arg	Arg	Ala	Gln	Arg	Pro	Asn	Ser	Leu	Asp	Leu	Ser
						930			935			940			

Ala	Thr	Asn	Val	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Ile	Gln	Ile	Gly	Glu	Ser	Thr
						945			950		955		960		

Gln	Asp	Gly	Lys	Ser	Gly	Ser	Gly	Glu	Lys	Ile	Lys	Lys	Arg	Val	Lys
					965			970			975				

Thr	Pro	Tyr	Ser	Leu	Lys	Arg	Trp	Arg	Pro	Ser	Thr	Trp	Val	Ile	Ser
					980			985			990				

Thr	Glu	Ser	Leu	Asp	Cys	Glu	Val	Asn	Asn	Asn	Gly	Ser	Asn	Arg	Ala
						995			1000			1005			

Val	His	Ser	Lys	Ser	Ser	Thr	Ala	Val	Tyr	Leu	Ala	Glu	Gly	Gly
						1010			1015		1020			

Thr	Ala	Thr	Thr	Met	Val	Ser	Lys	Asp	Ile	Gly	Met	Asn	Cys	Leu
						1025			1030		1035			

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Gly Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 14
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 15
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Ser Tyr Gly Met His

1 5

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

<400> 16
Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17
Tyr Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18
Val Ile Trp Asp Asp Gly Arg Lys Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

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

Gly

<210> 19
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Glu Tyr Tyr Tyr Gly Ser Glu Ser Glu Tyr Phe Gln His

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

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Ile Cys Ser Ser Ile Ser Cys Trp Gly Trp Phe Asp Pro

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

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Glu Pro Ala Gly Val Trp Gly Met Asp Val

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

<210> 22

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

<400> 22
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr

1

5

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1

5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro His Thr

1

5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr

1

5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 31

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95Arg Glu Tyr Tyr Gly Ser Glu Ser Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly
100 105 110Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 32

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Asp Ser Ile Arg Ser Tyr
20 25 30Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45Gly Tyr Ile Tyr Tyr Arg Gly Ser Thr His Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80Lys Met Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95Arg Ile Cys Ser Ser Ile Ser Cys Trp Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly
100 105 110Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

1 5 10 15

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

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

Ala Val Ile Trp Asp Asp Gly Arg Lys Lys Tyr 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 Arg Glu Pro Ala Gly Val Trp Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 34
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

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

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

50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro His
85 90 95

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

<210> 35
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
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 Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 37
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)

<400> 37

cag gtg cac cta cag cag tgg ggc gca gga ctg ttg aag cct tcg gag 48
 Gln Val His Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

acc ctg tcc ctc acc tgc gct tat ggt ggg tcc ttc agt ggt tac 96
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

tac tgg agc tgg atc cgc cag ccc cca ggg aag ggg ctg gag tgg att 144
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

ggg gaa atc aat cat agt gga agc acc aac tac aac ccg tcc ctc aag 192
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

agt cga gtc acc ata tca gta gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg 240
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

aag ctg agc tct gtg acc gcc gcg gac acg gct gtg tat tac tgt gcg 288
 Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

aga gag tat tat tat ggt tcg gag agt gaa tac ttc cag cac tgg ggc 336
 Arg Glu Tyr Tyr Gly Ser Glu Ser Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly
 100 105 110

cag ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca 363
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 38

<211> 363

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(363)

<400> 38

cag	gtg	cag	ctg	cag	gag	tcg	ggc	cca	gga	ctg	gtg	aag	cct	tcg	gag		48
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu		
1	5		10			15											

acc	ctg	tcc	ctc	acc	tgc	act	gtc	tct	ggt	gac	tcc	atc	agg	agt	tac		96
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Asp	Ser	Ile	Arg	Ser	Tyr		
20			25					30									

tac	tgg	agc	tgg	atc	cgg	cag	ccc	cca	ggg	aag	gga	ctg	gag	tgg	att		144
Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile		
35			40						45								

gga	tat	atc	tat	tac	aga	ggg	agc	acc	cac	tac	aac	ccc	tcc	ctc	aag		192
Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Arg	Gly	Ser	Thr	His	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys		
50			55					60									

agt	cga	gtc	acc	ata	tca	gta	gac	acg	tcc	aag	aat	cag	ttc	tcc	ctg		240
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu		
65			70				75			80							

aag	atg	agc	tct	gtg	acc	gct	gcg	gac	acg	gcc	gtg	tat	tac	tgt	gct		288
Lys	Met	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
85			90						95								

agg	att	tgt	agt	atc	agc	tgt	tgg	ggc	tgg	ttc	gac	ccc	tgg	ggc		336	
Arg	Ile	Cys	Ser	Ser	Ile	Ser	Cys	Trp	Gly	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly		
100			105				110										

cag	gga	acc	ctg	gtc	acc	gtc	tcc	tca									363
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
115			120														

<210> 39

<211> 357

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<400> 39

cag	gtg	cag	ctg	gtg	gag	tct	ggg	gga	ggc	gtg	gtc	cag	cct	ggg	agg		48
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg		
1		5		10		15											

tcc	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcg	tct	gga	ttc	acc	ttc	agt	agt	tat		96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr		
20		25		30													

ggc	atg	cac	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggc	aag	ggg	ctg	gag	tgg	gtg		144
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
35		40		45													

gca	gtt	ata	tgg	gat	gat	gga	aga	aag	aaa	tac	tat	gca	gac	tcc	gtg		192
Ala	Val	Ile	Trp	Asp	Asp	Gly	Arg	Lys	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
50		55		60													

aag	ggc	cga	ttt	acc	atc	tcc	aga	gac	aat	tcc	aag	aac	acg	ctg	tat		240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr		
65		70		75		80											

ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aga	gcc	gag	gac	acg	gct	gtg	tat	tac	tgt		288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
85		90		95													

gcg	aga	gag	ccg	gcf	ggg	gtt	tgg	ggt	atg	gac	gtc	tgg	ggc	caa	ggg		336
Ala	Arg	Glu	Pro	Ala	Gly	Val	Trp	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly		
100		105		110													

acc	acg	gtc	acc	gtc	tcc	tca											357
Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
115																	

<210> 40

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 40

gaa	att	gtg	ttg	aca	cag	tct	cca	gcc	acc	ctg	tct	ttg	tct	cca	ggg		48
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	--	----

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

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct cac 288
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro His
 85 90 95

act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa 321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 41
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 41
 gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20	25	30	
tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu 35 40 45			144
atc tat ggt gca tcc agc agg ggc act ggc atc cca gac agg ttc agt Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser 50 55 60			192
ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu 65 70 75 80			240
cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca ccg Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro 85 90 95			288
ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys 100 105			324
<p><210> 42 <211> 321 <212> DNA <213> Homo sapiens</p>			
<p><220> <221> CDS <222> (1)..(321)</p>			
<p><400> 42 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct gta gga Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly 1 5 10 15</p>			48
<p>gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att agc agc tgg Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp 20 25 30</p>			96
<p>tta gcc tgg tat cag cag aaa cca gag aaa gcc cct aag tcc ctg atc Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile 35 40 45</p>			144

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60 192

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80 240

gaa gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tac ccg ctc
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95 288

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa
 Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 321

<210> 43
<211> 97
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

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

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

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

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg

<210> 44
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr 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 Arg

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45
 Gly Tyr Cys Ser Ser Thr Ser Cys Tyr Thr

1 5 10

<210> 46
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10 15

<210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

1 5 10 15

<210> 48
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 49
<211> 95
<212> PRT
<213> Homo sapiens

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile	35	40	45
-----------------------------------------------------------------	----	----	----

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50	55	60
-----------------------------------------------------------------	----	----	----

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	65	70	75	80
-----------------------------------------------------------------	----	----	----	----

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

<210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1

5

10

<210> 51

<211> 97

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

1

5

10

15

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

20

25

30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35

40

45

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

50

55

60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Tyr Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Asn

1 5 10

<210> 53

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Glu Tyr Phe Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10 15

<210> 54

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
85 90 95

<210> 55

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

<400> 55
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1 5 10

<210> 56
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg Gly Ser Ser Asn Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

<210> 57
<211> 118
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 57
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

1 5 10 15

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

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

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Arg Gly Ser Ser Asn Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 58
<211> 118
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20 25 30Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Met
50 55 60Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Asp
65 70 75 80Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95Ala Arg Gly Ser Ser Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
100 105 110Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 59

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

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

1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Pro Pro Leu Lys
 50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ile Cys Ser Ser Thr Ser Cys Trp Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 60
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Lys Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 61
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 61
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Gln Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

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

Met	Glu	Leu	Ser
Ser	Ser	Leu	Arg
85	90		
			Tyr
			Tyr
			Cys
			95

Ala	Arg	Gly	Lys
Asp	Ile	Trp	Gly
100	105		Thr
			Val
			Thr
			Val
			Ser

110			
-----	--	--	--

Ser

<210> 62
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

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

Ser	Val	Lys	Val
Ser	Cys	Lys	Ala
20	25		Ser
			Thr
			Phe
			Ser
			Tyr
			30

Ala	Ile	Ser	Trp
Trp	Val	Arg	Gln
35	40	45	

Gly	Arg	Ile	Ile
Pro	Ile	Leu	Gly
50	55	60	
			Phe

Gln	Gly	Arg	Val
Thr	Leu	Thr	Ala
65	70	75	Asp
			Lys
			Ser
			Thr
			Asn
			Thr
			Ala
			Tyr
			80

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

Ala Arg Gly Lys Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 63
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Arg Leu Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Lys Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

<210> 64
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 64
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 Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 65
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65
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 Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 66

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

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

1 5 10 15

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 67
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 68
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 68
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 69
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 69

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

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

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

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

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

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

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

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

<210> 70

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

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

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

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

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

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

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

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

<210> 71
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

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

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

<210> 72
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 72
 caggtgcaac tggtgaggc tgggggaggc gtggccagc ctggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt cacttccgt agctatggca tacactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggatg atgaaagtca taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa tacgctggat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt gagaggaagc 300

agcaacttgtt atttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 73
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 73
 caggtgcaac tggtgaggc tgggggaggc gtggccagc ctggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt cacttccgt agctatggca tacactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggatg atgaaagtca taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa tacgctggat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgt gagaggaagc 300

agcaactggt atttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 74
<211> 354
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 74
caggtgcagt tggtgagtc tgggggaggc gtggccagc ctggaggtc cctgagactc 60

tcctgtcag cgtctggatt caccttcagt aactatggca tacactgggt ccgcaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggatg atggaagtca taaatactat 180

gcagactcca tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctggat 240

ctacaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagggagc 300

agcagctggt attcgatct ctggggccgt ggcaccctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 75
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 75
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtaagc ctggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggta ctccatcagt agttactact ggagctggat ccggcagccc 120

ccagggagg gactggagtg gattggatat atctattaca gtgggagcac ccgctacaat 180

ccccccctca agagtcgagt caccatatac gtagacacgt ccaagaacca gttccctg 240

aagctgagct ctgtgaccgc tgccggacacg gccgtgtatt actgtgcgag gatttgtagt 300

agtaccagct gtggggctg gttcgacccc tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 76
<211> 338
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 76
caggtccagc tgggcagtc tgggcttag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggc 60

tcctgcaagg cttctggagg cacccatcagc agctatgcta tcagctgggt gcgcacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcatcccta tccttggtat agtaaactac 180

gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggaaag 300

gatatctggg gccaagggac aatggtcacc gtctttc 338

<210> 77
<211> 339
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 77
caggtccagc tgggcagtc tgggcttag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggc 60

tcctgttaagg cttctggagg cacccatcagc agctatgcta tcagctgggt gcgcacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatgggaagg atcatcccta tccttggtat agcacagttac 180

gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggaca aatccacgag cacagctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggaaag 300

gatatctggg gccaagggac aatggtcacc gtctttc 339

<210> 78
<211> 339
<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 78

caggccagc tggcagtc tggtgcagtc gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggc 60

tcctgcaagg ctctggagg cacccatcagc agctatgcata tcagctgggt gcgcacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatggaaagg atcatcccta tccttggtat agcacagttac 180

gcacagaagt tccagggcag agtacgcatt accgcggaca aatccacgaa cacagcctac 240

atggaactga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggaaag 300

gatatctggg gccaaaggac aatggtcacc gtctttca 339

<210> 79

<211> 339

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 79

caggccagc tggcagtc tggtgcagtc gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggc 60

tcctgcaagg ctctggagg cacccatcagc agctatgcata tcactgggt gcgcacaggcc 120

cctggacaag ggcttgagtg gatggaaagg ctcatcccta tccttggtat agcaaactac 180

gcacagaagt tccagggcag agtacgcatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagggaaag 300

gatatctggg gccaaaggac aatggtcacc gtctttca 339

<210> 80

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 80

gacatccaga tgacctagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc	60
atcacttgc gggcgagtca gggattttgc agctggtag cctggatca gcagaaacca	120
gagaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagg ttcaaagtgg ggtccatca	180
aggttcagcg gcagtggatc tggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagattttcaacttattatgtccaaacag tataatagtt accctctcac tttcgccgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 81

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 81

gacatccaga tgacctagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc	60
atcacttgc gggcgagtca gggattttgc agctggtag cctggatca gcagaaacca	120
gagaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagg ttcaaagtgg ggtccatca	180
aggttcagcg gcagtggatc tggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagattttcaacttattatgtccaaacag tataatagtt accctctcac tttcgccgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 82

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 82

gacatccaga tgacctagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgttaggaga cagagtacc	60
-------------------------------------------------------------------	----

atcacttgtc gggcgagtca gggatttgc agctggtag cctggtatca gcagaaacca 120

gagaaaagccc ctaaggccct gatctatgct gcatccagg ttgaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt acccgctcac tttcgccgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 83

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 83

gaaatttgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggcagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgttag cagttatggta gtcaccgct cactttggc 300

ggagggacca aggtggagat caaa 324

<210> 84

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 84

gaaatttgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggcagtc gattgttatac agcaccactact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcg cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtta ttactgtcag cagtatggta gttcacccgtg cactttggc 300

caggggacca agctggagat caaa 324

<210> 85

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 85

gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtcttgtt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcg cagactggag 240

ccagaagatt ttgcagtgtta ttactgtcag cagtatggta gttcacccgtg cactttggc 300

caggggacca agctggagat caaa 324

<210> 86

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 86

gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtcttgtt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc aacaactact tagcctggta ccagcagaaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcattca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcg cagactggag 240

ccagaagatt ttgcagtgtat tactgtcag cagtaggta gtcaccgtg cactttggc 300

caggggacca agctggagat caaa 324

<210> 87

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 87

gaaatttgtt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtttgtt ctccagggga aagagtacc 60

ctctctgca gggcagtc gagtgtagc agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatcaaa ggtgcata gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctggaca gacttcactc tcaccatcgag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgtat tactgtcag cagtaggta gtcaccgtg cactttggc 300

caggggacca agctggagat caaa 324

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

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

1

5

10

15

<210> 89

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

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

1 5 10 15

<210> 90
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90
Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 91
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Thr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg

<210> 92
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92
Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu Lys Val Val Leu Lys

1 5 10 15

<210> 93
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93
Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg

1 5 10 15

His