



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년07월09일
(11) 등록번호 10-1413785
(24) 등록일자 2014년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 19/08 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-7019725
(22) 출원일자(국제) 2007년01월12일
심사청구일자 2012년01월12일
(85) 번역문제출일자 2008년08월12일
(65) 공개번호 10-2008-0085908
(43) 공개일자 2008년09월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2007/000777
(87) 국제공개번호 WO 2007/084344
국제공개일자 2007년07월26일
(30) 우선권주장
60/759,216 2006년01월13일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US20050084494 A1
전체 청구항 수 : 총 53 항

(73) 특허권자
노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35
(72) 발명자
설록, 제닌
미국 02459 메사추세츠주 뉴턴 글렌 로드 20
쿵, 펙
미국 02171 메사추세츠주 퀸시 # 712 웨스트 스윈
턴 스트리트 115
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
위혜숙, 양영준

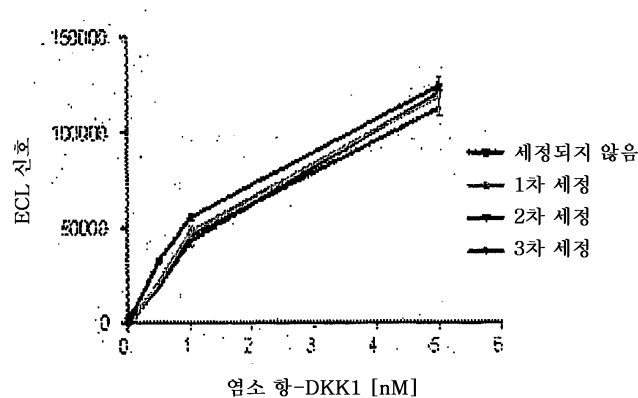
심사관 : 임혜준

(54) 발명의 명칭 D I C K K O P F-1 및/또는 -4의 항체에 대한 조성물 및 사용 방법

(57) 요약

단백질 표적 Dickkopf (DKK1)에 결합하는 항체 및 단편이 제공되고, 표적 세포, 특히 골용해성 상태와 관련된 세포를 치료하기 위한 사용 방법 및 키트가 또한 제공된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

피쉬맨, 마크

미국 02459 메사추세츠주 뉴턴 센터 켄우드 에비뉴
43

에텐버그, 세스

미국 02176 메사추세츠주 멜로즈 클린턴 로드 54

발드로프, 미하엘

독일 81375 뮌헨 슈이트베크 2아

동조, 마리엘

프랑스 에프-67100 스트라스부르 뤼 드 탄 4

울링거, 스테파니

독일 90469-뉘른베르크 거스바일러스트라쎄 22아

특허청구의 범위

청구항 1

DKK1 폴리펩티드 (서열 1) 및/또는 DKK4 폴리펩티드 (서열 122) 내의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원 결합 영역을 포함하며, DKK1 또는 DKK4, 또는 양쪽 모두 내의 1개 이상의 에피토프에 결합하는 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, DKK1 또는 DKK4에 대한 결합이 Wnt-신호전달 전사의 길항작용; 전기화학발광-기반 결합 분석; 효소-결합 면역흡착 분석법 결합; FMT; SET; SPR; 오스테오칼신 (OCN) 혈청 농도; 오스테오포테제틴 (OPG) 혈청 농도; 프로콜라겐 유형 1 질소성 프로펩티드 (P1NP) 혈청 농도, ALP 생산; 탑플래시(TopFlash) 또는 골용해 완화로부터 선택된 1가지 이상의 분석법에서 결정되는 것인 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편.

청구항 3

서열 2-20 및 서열 40-72 및 이의 보존성 또는 인간-조작(humaneered) 변이체의 군으로부터 선택된 단리된 아미노산 서열.

청구항 4

제3항에 있어서, 아미노산 서열이

- a) H-CDR3 영역을 포함하는 항원 결합 영역을 각각 포함하는, 서열 2-20, 65-72의 군;
- b) H-CDR2 영역을 각각 포함하는 서열 2-20, 57-64의 군;
- c) 컨센서스(consensus) H-CDR2 영역을 각각 포함하는, 서열 GISGSGSYTYADSVKF를 포함하는 서열 40, 서열 GISYGGNTYYADSVKF를 포함하는 서열 41 및 서열 GISYGGSTYYADSVKF를 포함하는 서열 42의 군;
- d) H-CDR1 영역을 각각 포함하는 서열 2-5, 8-11, 20, 49-56의 군;
- e) 컨센서스 H-CDR1 영역을 각각 포함하는, 아미노산 서열 GFTFSSYGMT를 갖는 서열 43, 아미노산 서열 GFTFNSYGMT를 갖는 서열 44, 아미노산 서열 GFTFSNYGMT를 갖는 서열 45, 아미노산 서열 GFTFSSYWMT를 갖는 서열 46, 아미노산 서열 GFTFSSYAMTF를 갖는 서열 47, 및 아미노산 서열 GFTFSSYGMS를 갖는 서열 48의 군; 또는
- f) 서열 21-39 및 73-88; 및

이의 보존성 또는 인간-조작 변이체로부터 선택된, 단리된 아미노산 서열.

청구항 5

제4항에 있어서, 서열 21-39의 군으로부터 선택된 아미노산 서열이 각각 L-CDR3 영역을 포함하고, 서열 21-39, 73-80의 군으로부터 선택된 아미노산 서열이 각각 L-CDR1 영역을 포함하고, 서열 21-39, 81-88의 군으로부터 선택된 아미노산 서열이 각각 L-CDR2 영역을 포함하고, 서열 21-39의 군으로부터 선택된 아미노산 서열이 각각 경쇄의 가변 영역을 포함하는, 단리된 아미노산 서열.

청구항 6

서열 97-103의 군으로부터 선택된 단리된 뉴클레오티드 서열.

청구항 7

- a) 서열 97-100 각각은 항원 결합 경쇄를 코딩하고;
- b) 서열 101-103 각각은 항원 결합 중쇄를 코딩하는,

제6항의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단리된 아미노산 서열, 및 이러한 아미노산 서열의 보존성 또는 인간-조작 변이체.

청구항 8

제6항에 있어서, 발현 및/또는 임상 사용을 위해 추가로 최적화된 단리된 뉴클레오티드 서열.

청구항 9

서열 104-110의 군으로부터 선택된 단리된 뉴클레오티드 서열.

청구항 10

a) 서열 104-107 각각은 항원 결합 경쇄를 코딩하고;

b) 서열 108-110 각각은 항원 결합 중쇄를 코딩하는,

제9항의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단리된 아미노산 서열, 및 이러한 아미노산 서열의 보존성 또는 인간-조작 변이체.

청구항 11

제9항에 있어서, 발현 및/또는 임상 사용을 위해 최적화된 단리된 뉴클레오티드 서열.

청구항 12

a) 서열 111-114 각각은 항원 결합 경쇄를 코딩하고,

b) 서열 115-117 각각은 항원 결합 중쇄를 코딩하는,

서열 111-117 및 이의 보존성 또는 인간-조작 변이체의 군으로부터 선택된 단리된 아미노산 서열.

청구항 13

제12항에 있어서, 발현 및/또는 임상 사용을 위해 최적화된 단리된 아미노산 서열.

청구항 14

서열 120-121의 군으로부터 선택된 단리된 뉴클레오티드 서열.

청구항 15

a) 서열 120은 경쇄의 항원 결합 가변 영역을 코딩하고;

b) 서열 121은 중쇄의 항원 결합 가변 영역을 코딩하는,

제14항의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단리된 아미노산 서열, 및 이러한 아미노산 서열의 보존성 또는 인간-조작 변이체.

청구항 16

제14항에 있어서, 발현 및/또는 임상 사용을 위해 최적화된 단리된 뉴클레오티드 서열.

청구항 17

서열 120의 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 경쇄의 가변 영역, 및 서열 121의 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 중쇄의 가변 영역을 포함하는, 단리된 항원 결합 영역.

청구항 18

서열 118-119 및 이의 보존성 또는 인간-조작 변이체의 군으로부터 선택된 단리된 아미노산 서열.

청구항 19

제18항에 있어서, 서열 118이 경쇄의 항원 결합 가변 영역을 나타내는, 단리된 아미노산 서열.

청구항 20

제18항에 있어서, 서열 119가 중쇄의 항원 결합 가변 영역을 나타내는, 단리된 아미노산 서열.

청구항 21

제18항에 있어서, 발현 및/또는 임상 사용을 위해 최적화된 단리된 아미노산 서열.

청구항 22

서열 2-121에 나타난 영역으로부터 선택된 1개 이상의 CDR 영역과의 동일성이 95% 이상인, 단리된 아미노산 서열.

청구항 23

표 11A 및 11B에 제시된 바와 같은 CDR 영역의 컨센서스 서열을 갖는, 단리된 아미노산 서열.

청구항 24

제1항에 있어서, IgM 및 IgG으로부터 선택된 스캐폴드를 포함하고, 이때 IgG는 IgG1, IgG2, 및 IgG3 또는 IgG4로부터 선택되는 것인 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편.

청구항 25

제24항에 있어서, IgM 또는 IgG가 폴리클로날 또는 모노클로날로부터 선택되는 것인 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편.

청구항 26

DKK1의 에피토프에 특이적인 항원 결합 영역을 포함하며, DKK1 또는 DKK4에 결합하여, DKK1-관련 질환 또는 DKK4-관련 질환의 발달을 방지하거나 완화하는, 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편.

청구항 27

제26항에 따른 항체 또는 이의 기능성 단편의 단리된 항원 결합 영역.

청구항 28

표적 DKK1 또는 DKK4 또는 양쪽 모두의 에피토프에 특이적인 항원 결합 영역을 포함하고, 이때 에피토프가 표적 DKK1 또는 DKK4의 CYS2 도메인의 6개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는, 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편.

청구항 29

제1항, 제2항, 제24항 내지 제26항 및 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 전체 면역글로불린 또는 이의 Fab 단편 또는 scFv 항체 단편, 중쇄 항체, 및 비-면역글로불린 스캐폴드 상의 이의 항원 결합 영역으로부터 선택되는, 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편.

청구항 30

제29항에 있어서, 에피토프가 입체형태적 에피토프인 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편.

청구항 31

1가지 이상의 제29항에 따른 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편, 및 이에 대한 제약상 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 32

제29항에 따른 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편을 코딩하는 유전자가 담지된 트랜스제닉(transgenic) 동물.

청구항 33

제31항에 있어서, DKK1 또는 DKK4의 존재와 관련된 장애 또는 용태의 치료를 위한 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 장애 또는 용태가 골용해성 병변 - 특히 골수종, 특히 다발성 골수종과, 또는 골, 유방, 결장, 펠라닌세포, 간세포, 상피, 식도, 뇌, 폐, 전립선 또는 췌장의 암 또는 이의 전이와 관련된 골용해성 병변; 이식과 관련된 골 손실로부터 선택되거나; 또는 골육종, 전립선 암, 간세포성 암종 (HCC), 다발성 골수종이 포함되는 골수종, 당뇨병, 비만, 근육 소모, 알츠하이머 질환, 골다공증, 골감소증, 류머티스, 결장염 및/또는 원치 않는 모발 손실인 조성물.

청구항 35

제33항에 있어서, 제2 치료제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 36

제33항에 있어서, 조메타(Zometa)인 화학요법제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 37

제35항에 있어서, 제2 치료제가 항암제; 항대사제, 항당뇨병제, 항골다공증제; 항생제; 항염증제; 성장 인자; 및 사이토카인으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 38

서열 2-20, 및 서열 2-20에 나타난 CDR 영역과 CDR 영역에서의 서열 동일성이 95% 이상인 서열로 구성된 군으로부터 선택된 중쇄인 제1 아미노산 서열; 및 서열 21-39, 및 서열 21-39에 나타난 CDR 영역과 CDR 영역에서의 서열 동일성이 95% 이상인 서열로 구성된 군으로부터 선택된 경쇄인 제2 아미노산 서열을 포함하는 단리된 항체.

청구항 39

제1항, 제2항, 제24항 내지 제26항 및 제28항 중 어느 한 항에 따른 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편인 제1 성분을 포함하는 면역접합체.

청구항 40

제1항, 제2항, 제24항 내지 제26항 및 제28항 중 어느 한 항에 따른 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편을 포함하는 키트.

청구항 41

제40항에 있어서, 제약상 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 포함하는 키트.

청구항 42

제40항에 있어서, 항체가 단위 용량으로 존재하는 키트.

청구항 43

제40항에 있어서, 대상에게 투여하는 것에서 사용하기 위한 사용설명서를 추가로 포함하는 키트.

청구항 44

중화성 항-DKK1/4 항체를 포함하는 조성물.

청구항 45

제44항에 있어서, 항체가 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1.0 nM, 500 pM 또는 100 pM 미만의 K_{on} 으로 DKK1에 결합하고; DKK1에 대한 오프(off)-속도가 10^{-2} /초, 10^{-3} /초, 10^{-4} /초 또는 10^{-5} /초 미만인 조성물.

청구항 46

제44항에 있어서, DKK2 또는 DKK3과 비교하여 DKK1 또는 DKK4에 대한 항체의 친화력이 10^2 - 10^6 배 더 높은 조성물.

물.

청구항 47

제44항에 있어서, 항체가 DKK1 또는 DKK4에의 결합에 대해 중화성 항-DKK1/4와 경쟁하는 것인 조성물.

청구항 48

서열 118의 폴리펩티드 서열 및 서열 119의 폴리펩티드 서열, 또는 이의 보존성 또는 인간-조작 변형물을 적어도 포함하는, 중화성 항-DKK1/DKK4 항체인 질환 치료용의 조성물.

청구항 49

(a) 중화성 항-DKK1/4 조성물; 및

(b) 1가지 이상의 제약상 활성인 작용제

를 포함하는 약제들의 조합물로 포유동물, 특히 인간에서 증식성 질환 또는 암과 같은 질환을 예방 또는 치료하기 위한 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 제약상 활성인 작용제가 하기로부터 선택되는, 중화성 항-DKK1/4 조성물 또는 이의 유도체 이외의 임의의 제약상 활성인 작용제를 특히 의미하는 것인 조성물:

- i. 아로마타제 억제제;
- ii. 항-에스트로겐제, 항-안드로겐제 또는 고나도렐린 작용제;
- iii. 토포이소머라제 I 억제제 또는 토포이소머라제 II 억제제;
- iv. 미세관 활성제, 알킬화제, 항-신생물성 항-대사물질 또는 플라틴 화합물;
- v. 단백질 또는 지질 키나제 활성 또는 단백질 또는 지질 포스파타제 활성을 표적으로 하는/감소시키는 화합물, 추가적인 항-혈관형성 화합물 또는 세포 분화 프로세스를 유도하는 화합물;
- vi. 모노클로날 항체;
- vii. 시클로옥시게나제 억제제, 비스포스포네이트, 헤파라나제 억제제, 생물학적 응답 변형제;
- viii. Ras 발암성 이소형(isoform)의 억제제;
- ix. 텔로머라제 억제제;
- x. 프로테아제 억제제, 매트릭스 금속단백질분해효소 억제제, 메티오닌 아미노펩티다제 억제제, 또는 프로테아솜 억제제;
- xi. 혈액 악성종양의 치료에 사용되는 작용제 또는 Flt-3의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물;
- xii. HSP90 억제제;
- xiii. 항증식성 항체;
- xiv. 히스톤 디아세틸라제 (HDAC) 억제제;
- xv. 세린/트레오닌 mTOR 키나제의 활성/기능을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물;
- xvi. 소마토스타틴 수용체 길항제;
- xvii. 항-백혈병 화합물;
- xviii. 종양 세포를 손상시키는 접근법;
- xix. EDG 결합제;
- xx. 리보뉴클레오타이드 환원효소 억제제;

- xxi. S-아데노실메티오닌 디카르복실라제 억제제;
- xxii. VEGF 또는 VEGFR의 모노클로날 항체;
- xxiii. 광역학 치료법;
- xxiv. 혈관억제성 스테로이드;
- xxv. 코르티코스테로이드를 함유하는 이식물;
- xxvi. AT1 수용체 길항제; 및
- xxvii. ACE 억제제.

청구항 51

10^{-8} 이하의 친화력 (KD)으로 DKK-1에 결합하고, 임의의 제1항의 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편과 경쟁하는 항체.

청구항 52

제51항에 있어서, DKK2 또는 DKK3에 검출가능하게 결합하지 않는 항체.

청구항 53

제52항에 있어서, 항체가 DKK1 또는 DKK4에 10^{-3} 이상의 KD로 결합하는 항체.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 골 밀도, 대사, 당뇨병, 암 등의 DKK-관련 이상을 치료하기 위한, Dickkopf-1 ("DKK1"), Dickkopf-4 ("DKK4"), 또는 양쪽 모두의 항체에 대한 조성물 및 사용 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] Wnt 신호전달 경로는 배아 발생 및 신생물성 프로세스의 제어에 관여한다. 세포의 Wnt 단백질은, 특히 골모세포, 파골세포 및 지방세포의 성장, 분화 및 조절을 비롯한 다수의 세포 유형의 성장 및 분화를 담당한다.

[0003] 다수의 암이 골 조직과 관련되고, 골모세포성 병변 예컨대 전립선암에서 발견되는 것들, 또는 골 용해성 병변 예컨대 폐암, 유방암 및 다발성 골수종에서 발견되는 것들을 초래할 수 있다 (예를 들어, [Tian et al., 2003 New England J. Med. 349:2483-2494]).

[0004] Wnt 유전자 패밀리의 구성원들은 다양한 발생 과정에 필요한 분비형 당단백질을 코딩한다 ([Fedi et al., 1999 J. Bio. Chem. 274:19465-19472]). Wnt 패밀리의 구성원 단백질은 골모세포의 성장 및 분화에 중요한 신호전달 경로를 개시시키고, 이는 골 침착을 야기한다. 골 형성에 더하여, 골 흡수는 파골세포로 공지된 세포에 의해 수행되는 진행 중인 정상적인 프로세스이다. 반면에, 핵 인자- κ 와 B리간드의 수용체 활성화제 (RANKL)는 파골세포성 골 흡수의 최종 매개인자이고, 여기서 이는 폐경후 골다공증의 발병기전에서, 뿐만 아니라 류머티스 관절염, 전이성 암, 다발성 골수종, 아로마타제 억제제 치료법 및 안드로겐 박탈 치료법과 관련된 골 손실에서 주요한 역할을 한다 (예를 들어, [Lewiecki (2006) Expert Opin Biol Ther. 6: 1041-50] 참조). 골모세포에 의해 발현되는 오스테오프로테제린 (OPG)은 RANKL을 억제함으로써, 파골세포 활성화 및 형성을 감소시킨다. 동화성 골 형성과 분해성 골 흡수 간의 균형이 정상적인 골 밀도를 조절하고, 어느 한쪽에서의 증가는 각각 증가된 골 밀도 또는 증가된 골 손실에 이른다.

[0005] Wnt는 다른 세포 표면 단백질에 결합하여 이를 통해 작용하고, Wnt 신호전달은 신생물성 프로세스에 기여할 수 있다. 또한, 유전자 변형은 단백질 β -카테닌을 수반하는 선종성 결장 폴립증으로 공지된 세포성 단백질 복합체에 영향을 미칠 수 있고, 이러한 복합체는 인간 결장 암, 흑색종 및 간세포성 암종과 같은 질환이 있는 환자의 세포에서 관찰되었으며, 이는 Wnt 신호전달 경로의 이상이 상기 암 및 가능한 기타 인간 암의 발달에 관련있음을 나타낸다 ([Fedi et al., 1999 J. Bio. Chem. 274:19465-19472]).

- [0006] Wnt 신호전달을 억제하는 2가지 이상의 단백질 패밀리, 즉 분비형의 프리즐드(frizzled)-관련 패밀리 및 Dickkopf (DKK) 패밀리가 존재한다. 현재 DKK 패밀리에 4가지의 패밀리 구성원, 즉 DKK1 (인간 DNA 접속 번호 NM-012242; PRT 접속 번호 094907), DKK2 (인간 접속 번호 NM_014421; PRT 접속 번호 NP_055236), DKK3 (인간 접속 번호 NM_015881; PRT 접속 번호 AAQ88744), 및 DKK4 (인간 접속 번호 NM_014420; PRT 접속 번호 NP_055235)이 있다.
- [0007] Dickkopf-1 (DKK1)은 Wnt/ β -카테닌 신호전달 경로의 분비형 억제제이다. 예를 들어, 미국 특허 출원 2005-0079173 (Niehrs); 미국 특허 출원 2004-0234515 (McCarthy) 참조. DKK1은 Wnt-유도 축 증폭을 억제하는 능력을 갖고, 유전자 분석 결과는 DKK1이 상류에서 Wnt 신호전달을 억제하는 작용을 한다는 것을 보여준다. DKK1은 상승된 수준의 DKK1에의 노출 후 닭 및 마우스 배아에서의 골 구조의 손실에 대한 효과에 의해 증명되는 바와 같이 골격 발달에서 또한 중요하다 ([Tian et al., 2003 New England J. Med. 349:2483-2494]). 상승된 DKK1 혈청 수준은 전립선 암과 관련되었고, 다발성 골수종이 있는 환자의 골수 혈장 및 말초혈에서의 상승된 DKK1 및 RANKL 수준은 국소적인 골 병변의 존재와 관련된다. 예를 들어, [Tian 2003, OMIM 접속 번호 605189] 참조. DKK1은 지방형성, 연골형성, 위장 상피 증식의 증식, 류머티스와 관련된 골 손실, 및 모낭 플라코드(placode) 형성의 개시에서 또한 역할을 한다. OMIM 접속 번호 605189.
- [0008] Dickkopf-4 (DKK4)는 덜 특성화되어 있지만, 마찬가지로 Wnt 경로의 분비형 억제제이다. DKK4는 알츠하이머 질환이 있는 환자의 플라크에서 침착되는 것으로 나타났고, 근육에서 발현된다. Wnt는 근육 발달에서의 역할이 알려져 있지 않고, 따라서 DKK4가 근육 발달에서 억제성 역할을 하는 것으로 본원에서 가정된다.
- [0009] Wnt 신호전달에 대한 DKK1 및/또는 DKK4 매개 길항작용을 방해하거나 중화하는 작용제를 포함하여, 암 및 골 밀도 이상을 치료하기 위한 조성물 및 방법이 요구된다.
- [0010] **발명의 개요**
- [0011] 본원에서의 본 발명의 실시양태는 DKK1 및/또는 DKK4 폴리펩티드 또는 이의 단편에 선택적으로 결합하여 이를 중화하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 DKK1/4 중화 항체이다. 다양한 실시양태에서, DKK1/4 중화 항체의 항원 결합 부분은 DKK2 또는 DKK3에 결합하지 않는다.
- [0012] 한 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 면역글로불린-유사 스캐폴드(scaffold), 예컨대 인간, 인간화, 인간-조작(humaneered), 상어 또는 낙타류(camelid) 스캐폴드로부터 예를 들어 선택되는 프레임워크 내에 정렬되고/되거나, 추가적으로 재조합, 키메라 또는 CDR-그래프트(grafted) 항체일 수 있다. 예를 들어, 인간 항-뮤린(murine) 항체 응답을 최소화하도록 디자인된 기술 (Kalobios의 인간-조작(humaneering) 기술 또는 PDL의 인간화 기술)이 본 발명에서 구현된다. 또한, DKK1 또는 DKK4에 특이적인 항원 결합 부분은 애드넥틴(adnectin), 피브리노겐, 안키린(ankyrin)-유래 반복부 등의 유형의 프레임워크가 포함되는 비-면역글로불린-유사 스캐폴드 내에 또한 있을 수 있고, 예를 들어, 상기 프레임워크 내에 정렬될 수 있다.
- [0013] 특정 실시양태에서, Dkk1 항체는 표적 단백질 DKK1에 특이적인 항원 결합 영역이 있는 것을 특징으로 하고, 항체 또는 기능성 단편은 DKK1 또는 이의 단편에 결합한다. 관련된 실시양태에서, DKK4 항체는 표적 단백질 DKK4에 특이적인 항원 결합 영역이 있는 것을 특징으로 하고, 항체 또는 기능성 단편은 DKK4 또는 이의 단편에 결합한다. 관련된 실시양태에서, DKK4 항체는 표적 단백질 DKK4에 특이적인 항원 결합 영역이 있는 것을 특징으로 하고, 항체 또는 기능성 단편은 DKK4 또는 이의 단편에 결합한다. 바람직한 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 DKK1 및 DKK4 폴리펩티드에 결합하지만, DKK2 또는 DKK3 폴리펩티드에는 결합하지 않는다.
- [0014] 또다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 부분은 모노클로날(monoclonal)이다. 또다른 실시양태에서, 항원 결합 부분은 폴리클로날(polyclonal)이다. 다양한 실시양태에서, DKK1 항체, 또는 이의 항원 결합 부분은 DKK1 또는 DKK4 폴리펩티드의 30개의 인접 아미노산으로 구성된 펩티드에 결합한다.
- [0015] 관련된 실시양태에서, DKK1 또는 DKK4에 대한 결합은 적어도 하기의 분석법들 중 하나에 의해 결정된다: Wnt-신호전달 전사의 DKK1 또는 DKK4 길항작용의 억제; 표면 플라즈몬 공명 친화력 결정, 효소-결합 면역흡착 분석법 결합; 전기화학발광-기반 결합 분석; FMT, SET, SPR, ALP, 탑플래시(TopFlash), 오스테오칼신 (OCN), 프로콜라겐 유형 1 질소성 프로펩티드 (P1NP) 및 오스테오포테제린 (OPG)과 같은 생체마커의 혈청 농도, 및 세포 표면 수용체(들) 예컨대 프리즐드(Frizzled) (Fz), LRP (LRP5/6) 또는 크레멘(Kremen) (Krm)에 대한 결합. 특정 실시양태에서, Dkk1 항체 또는 항원 결합 부분은 하기 특성 중 1가지 이상이 있다: 인간 DKK2 또는 DKK3에 대한 것보다 적어도 10^3 배, 10^4 배 또는 10^5 배 더 큰 DKK1에 대한 선택도; 100 nM, 50 nM, 10 nM, 1.0 nM, 500 pM,

100 pM, 50 pM 또는 10 pM 미만의 K_{on} 으로 DKK1 또는 DKK4에 결합함; 및 DKK1에 대한 오프(off)-속도가 10^{-2} /초, 10^{-3} /초, 10^{-4} /초 또는 10^{-5} /초 미만임.

- [0016] 관련된 실시양태에서, 본 발명의 항체는 LRP5/6에의 결합에 대해 DKK1 및/또는 DKK4와 경쟁한다. 관련된 실시양태에서, 본 발명의 항체는 Krm에의 결합에 대해 DKK1 및/또는 DKK4와 경쟁한다.
- [0017] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 상기 항체 또는 이러한 항체의 기능성 단편 중 임의의 것의 단리된 항원 결합 영역, 및 이의 아미노산 서열을 제공한다. 따라서, 특정 실시양태에서, 본 발명은 서열 2-20 및 서열 40-72 및 이러한 서열의 보존성 또는 인간-조작 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 단리된 아미노산 서열을 제공한다.
- [0018] 또한, 추가적인 특정 실시양태에서, 본 발명은 서열 2-20, 65-72의 아미노산 서열, 및 이러한 서열의 보존성 또는 인간-조작 변이체를 제공하고, 이들은 각각 H-CDR-3인 단리된 항원 결합 영역을 제공한다.
- [0019] 관련된 실시양태에서, 단리된 항원 결합 영역은 서열 2-20, 57-64, 및 이의 보존성 또는 인간-조작 변이체로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 H-CDR2 영역이다. 또다른 관련된 실시양태에서, 단리된 항원 결합 영역은 아미노산 서열 GISGSGSYTYADSVKF의 서열 40, 아미노산 서열 GISYGGNTYYADSVKF의 서열 41, 및 아미노산 서열 GISYGGSTYYADSVKF의 서열 42, 및 이러한 서열들의 아미노산 잔기들의 보존성 또는 인간-조작 변이체의 군으로부터 선택된 서열에 묘사된 컨센서스(consensus) H-CDR2 영역이다.
- [0020] 특정 실시양태에서, 제공된 신규 서열은 서열 2-5, 8-11, 20, 49-56, 및 이들의 보존성 또는 인간-조작 변이체이고, 이들은 H-CDR1 영역인 단리된 항원 결합 영역을 제공한다.
- [0021] 관련된 실시양태에서, 단리된 항원 결합 영역은 아미노산 서열 GFTFSSYGMT (서열 43), GFTFNSYGMT (서열 44), GFTFSNYGMT (서열 45), GFTFSSYWMT (서열 46), GFTFSSYAMT (서열 47), GFTFSSYGMS (서열 48) 및 임의의 이러한 서열의 보존성 또는 인간-조작 변이체로부터 선택된 아미노산 서열 (1문자 아미노산 코드를 사용함)을 갖는 컨센서스 H-CDR1 영역이다.
- [0022] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 L-CDR3 영역이 있는 단리된 항원 결합 영역인 아미노산 서열, 예컨대 서열 21-39, 89-96, 및 이러한 서열들의 보존성 또는 인간-조작 변이체로부터 선택된 아미노산 서열을 제공한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 단리된 항원 결합 영역은 서열 21-39, 73-80, 및 이러한 서열들의 보존성 또는 인간-조작 변이체로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 L-CDR1 영역이다. 또다른 관련된 실시양태에서, 단리된 항원 결합 영역은 서열 21-39, 81-88, 및 이러한 서열들의 보존성 또는 인간-조작 변이체로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 L-CDR2 영역이다.
- [0023] 특정 실시양태에서, 단리된 항원 결합 영역은 서열 21-39, 및 이러한 서열들의 보존성 또는 인간-조작 변이체로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 가변 경쇄이다.
- [0024] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 97-103의 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 제공한다. 관련된 실시양태에서, 각각의 이러한 뉴클레오티드 서열은 아미노산 서열을 코딩하고, 이러한 코딩된 아미노산 서열의 보존성 또는 인간-조작 변이체 또한 본 발명의 범주 내에 속한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 서열 97-100 각각의 뉴클레오티드 서열은 항원 결합 경쇄를 코딩한다. 추가적인 관련된 실시양태에서, 서열 101-103 각각의 뉴클레오티드 서열은 항원 결합 중쇄를 코딩한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 각각의 이러한 뉴클레오티드 서열은 세포에서의 발현을 위해 추가로 최적화된다. 바람직한 세포에는, 예를 들어, 차이니스 햄스터(Chinese hamster) (예를 들어, CHO) 세포, 배콜로마바이러스, 효모, 박테리아, 골수종 세포, 및/또는 호모 사피엔스(*H. sapiens*)가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0025] 바람직하게는, 서열은 발현을 위해, 그리고 생산 및 임상 사용을 위해 최적화된다. 임상 사용을 위해 최적화되는 특성에는, 예를 들어, 반감기, 약동학(PK), 항원성, 이펙터(effector) 기능, FcRn 소거율, 및 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성(CDC) 활성이 포함되는 환자 응답이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0026] 추가적인 실시양태에서, 본 발명은 서열 101-103의 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 중쇄를 갖는 단리된 항원 결합 영역을 제공한다. 관련된 실시양태에서, 본 발명은 서열 97-100의 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 경쇄를 갖는 단리된 항원 결합 영역을 제공한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 본 발명은 서열 97-100의 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 경쇄, 및 서열 101-103의 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 중쇄를 갖는 단리된 항원 결합 영역을 제공한다.

- [0027] 특정 실시양태에서, 본 발명은 서열 104-110의 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 제공한다. 관련된 실시양태에서, 각각의 이러한 뉴클레오티드 서열은 아미노산 서열을 코딩하고, 이러한 아미노산 서열의 보존성 또는 인간-조작 변이체 또한 본 발명의 범주 내에 속한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 서열 104-107 각각의 클레오티드 서열은 항원 결합 경쇄를 코딩한다. 추가적인 관련된 실시양태에서, 서열 108-110 각각의 뉴클레오티드 서열은 항원 결합 중쇄를 코딩한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 각각의 이러한 뉴클레오티드 서열은 발현 및/또는 임상 사용을 위해 최적화된다.
- [0028] 추가적인 실시양태에서, 본 발명은 서열 108-110의 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 중쇄를 갖는 단리된 항원 결합 영역을 제공한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 본 발명은 서열 104-107의 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 경쇄를 갖는 단리된 항원 결합 영역을 제공한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 본 발명은 서열 104-107의 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 경쇄, 및 서열 108-110의 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 중쇄를 갖는 단리된 항원 결합 영역을 제공한다.
- [0029] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 111-117의 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 제공하고, 이러한 서열들의 보존성 변이체를 제공한다. 관련된 실시양태에서, 서열 111-114 각각은 항원 결합 경쇄를 묘사한다. 또다른 실시양태에서, 서열 115-117 각각은 항원 결합 중쇄를 묘사한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 아미노산 서열은 발현 및/또는 임상 사용을 위해 최적화된다.
- [0030] 추가적인 실시양태에서, 본 발명은 서열 115-117의 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 묘사된 중쇄를 갖는 단리된 항원 결합 영역을 제공하고, 이러한 서열의 보존성 변이체를 제공한다. 관련된 실시양태에서, 본 발명은 서열 111-114의 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 묘사된 경쇄를 갖는 단리된 항원 결합 영역을 제공하고, 이러한 서열의 보존성 변이체를 제공한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 본 발명은 서열 115-117의 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 묘사된 중쇄 및 서열 111-114의 군으로부터 선택된 아미노산 서열에 묘사된 경쇄를 갖는 단리된 항원 결합 영역을 제공하고, 이러한 서열의 보존성 변이체를 제공한다.
- [0031] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 120-121의 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열, 및/또는 각각의 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 경쇄 또는 중쇄의 가변 영역을 갖는 단리된 항원 결합 영역을 제공한다. 관련된 실시양태에서, 각각의 이러한 뉴클레오티드 서열은 아미노산 서열을 코딩하고, 이러한 아미노산 서열의 보존성 또는 인간-조작 변이체 또한 본 발명의 범주 내에 속한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 서열 120의 뉴클레오티드 서열은 항원 결합 경쇄를 코딩한다. 추가적인 관련된 실시양태에서, 서열 121의 뉴클레오티드 서열은 항원 결합 중쇄를 코딩한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 각각의 이러한 뉴클레오티드 서열은 발현 및/또는 임상 사용을 위해 추가로 최적화된다.
- [0032] 특정 실시양태에서, 본 발명은 서열 118-119 및 이러한 서열의 보존성 또는 인간-조작 변이체의 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 제공한다. 관련된 실시양태에서, 서열 118은 경쇄의 항원 결합 가변 영역을 묘사한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 서열 119는 중쇄의 항원 결합 가변 영역을 묘사한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 아미노산 서열은 발현 및/또는 임상 사용을 위해 최적화된다.
- [0033] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 2-39에 묘사된 CDR 영역과의 동일성이 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99 %인 아미노산 서열을 제공한다. 관련된 실시양태에서, 본 발명은 서열 111-120에 묘사된 서열과의 동일성이 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99 %인 아미노산 서열을 제공한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 본 발명은 서열 97-110 및 120-121에 묘사된 서열과의 동일성이 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99 %인 뉴클레오티드 서열을 제공한다.
- [0034] 특정 실시양태에서, 임의의 상기 단리된 항체는 IgG이다. 관련된 실시양태에서, 임의의 상기 단리된 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 또다른 실시양태에서, 항체는 IgE, IgM, IgD 또는 IgA이다. 관련된 실시양태에서, 본 발명은 모노클로날 또는 폴리클로날 항체 조성물로부터 선택된다. 추가적인 실시양태에서, 항체는 키메라 항체, 인간화 항체, 인간-조작 항체, 재조합 항체 등이다. 또다른 실시양태에서, 본 발명은 DKK1의 에피토프에 특이적인 항원 결합 영역이 있는, 단리된 인간 또는 인간화 항체 또는 이의 기능성 단편을 제공하고, 이러한 항체 또는 기능성 단편은 DKK1 또는 DKK4에 결합하거나, 또는 다르게는 세포 표면 수용체 (예를 들어, LRP5/6, 크레멘, 프리즐드와 같은 수용체)에 대한 DKK1 또는 DKK4의 결합을 차단한다. 특정 실시양태에서, 항체 또는 이의 단편은 골용해성 병변의 발달을 방지하거나, 치료하거나, 완화시킨다. 또다른 실시양태에서, 본 발명의 항-DKK 조성물은 DKK1-또는 DKK4-관련 암 또는 질환을 방지하거나, 치료하거나, 완화시킨다.

- [0035] 관련된 실시양태에서, 본 발명은 표적 DKK1 또는 DKK4의 에피토프에 특이적인 항원 결합 영역이 있는, 단리된 인간 또는 인간화 항체 또는 이의 기능성 단편을 제공하고, 이러한 에피토프는 DKK1 및/또는 DKK4의 CYS1-링커-CYS2 도메인을 포함하는 폴리펩티드 단편으로부터의 6개 이상의 아미노산 잔기를 함유한다. 관련된 실시양태에서, 에피토프는 입체형태적 에피토프이다. 바람직한 실시양태에서, 에피토프는 CYS2 도메인 내에 존재한다. 특정 실시양태에서, 에피토프는 변형된 아미노산 잔기를 포함한다. 관련된 실시양태에서, 에피토프는 1개 이상의 글리코실화 아미노산 잔기를 포함한다.
- [0036] 기능성 단편은 Fv 및 Fab 단편 (단일쇄 버전 예컨대 scFv 포함), 뿐만 아니라 비-면역글로불린 스캐폴드에 연결된 것들 및 중쇄 항체 예컨대 낙타류 및 상어 항체 및 나노바디(nanobody)를 포함하는 항체의 기타 항원 결합 영역을 포함한다. 관련된 실시양태에서, 상기 기술된 바와 같은 단리된 항체는 IgG이다. 또다른 관련된 실시양태에서, 상기 기술된 바와 같은 단리된 항체는 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4이다. 또다른 실시양태에서, 항체는 IgE, IgM 또는 IgA이다. 관련된 실시양태에서, 본 발명은 폴리클로날 항체 조성물이다.
- [0037] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 1가지 이상의 임의의 상기 항체 또는 기능성 단편 또는 보존성 변이체, 및 이의 제약상 허용가능한 담체 또는 부형제가 있는 제약 조성물을 제공한다.
- [0038] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 임의의 상기 항체 또는 이의 기능성 단편을 코딩하는 유전자가 담지된 트랜스제닉(transgenic) 동물을 제공한다.
- [0039] 특정 실시양태에서, 본 발명은 DKK1 또는 DKK4 발현과 관련된 장애 또는 용태를 치료하는 방법을 제공한다. 본원에서 사용된 "DKK1-관련 질환" 또는 "DKK4-관련 질환"에는 골용해성 병변 - 특히 골수종, 특히 다발성 골수종과, 또는 골, 유방, 결장, 멜라닌세포, 간세포, 상피, 식도, 뇌, 폐, 전립선 또는 췌장의 암 또는 이의 전이와 관련된 골용해성 병변; 이식과 관련된 골 손실이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 추가적인 질환 또는 장애에는, 예를 들어, 골육종, 전립선 암, 간세포성 암종 (HCC), 다발성 골수종이 포함되는 골수종, 당뇨병, 비만, 근육 소모, 알츠하이머 질환, 골다공증, 골감소증, 류머티스, 결장염 및/또는 원치 않는 모발 손실이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 이러한 방법은 이를 필요로 하는 대상에게 유효량의 임의의 상기 제약 조성물을 투여하는 것을 수반한다.
- [0040] 관련된 실시양태에서, 치료될 장애 또는 용태는 골 밀도 이상이다. 또다른 관련된 실시양태에서, 치료될 골 밀도 이상은 대상에서의 골용해성 병변의 존재이다.
- [0041] 또다른 실시양태에서, 치료될 장애 또는 용태는 골다공증성 용태, 예컨대 암과 관련된 골용해성 병변이다. 관련된 실시양태에서, 치료될 암은 골수종, 예컨대 다발성 골수종, 또는 골, 유방, 결장, 멜라닌세포, 간세포, 상피, 식도, 뇌, 폐, 전립선 또는 췌장의 암 또는 이의 전이이다. 또다른 실시양태에서, 골다공증성 용태는 골다공증 또는 골감소증 또는 골육종이다.
- [0042] 특정 실시양태에서, 임의의 상기 방법은 화학요법제를 투여하는 것을 임의로 포함한다. 관련된 실시양태에서, 화학요법제는 항암제이다. 또다른 관련된 실시양태에서, 화학요법제는 항골다공증제이다.
- [0043] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 임의의 상기 항체 또는 이의 기능성 단편으로 DKK1 또는 DKK4와 표적 세포의 상호작용을 차단하는 것을 수반하는, 표적 세포를 치료하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 표적 세포는 DKK1 또는 DKK4에 결합하는 수용체를 지닌다. 한 실시양태에서, 표적 세포는 골모세포이고, 이때 본 발명의 중화성 항-DKK1/4 조성물로의 치료는 증식을 증강시키고 골 형성을 자극할 것이다. 한 실시양태에서, 표적 세포는 근육 세포이고, 이때 치료는 근육 소모에 반대 작용을 할 것이다.
- [0044] 관련된 실시양태에서, 이러한 방법은 표적 세포가 있는 환자를 화학요법제 또는 방사선으로 치료하는 것을 추가로 수반한다. 관련된 실시양태에서, 투여 또는 접촉에 이어서, 임의의 상기 방법은 골용해성 병변의 발달의 완화 또는 지연을 관찰하는 것을 추가로 수반한다.
- [0045] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 혈청 내의 DKK1 또는 DKK4를 확인하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은 DKK1 또는 DKK4를 검출가능한 표지를 추가로 갖는 임의의 상기 항체 또는 항체 단편으로 검출하는 것을 수반한다. 표지는 방사성, 형광성, 자기성, 상자성 또는 화학발광성이다.
- [0046] 또다른 실시양태에서, 임의의 상기 인간 또는 인간화 항체 또는 항체 단편은 합성 항체 또는 단편이다.
- [0047] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 임의의 상기 항체 또는 이러한 항체의 기능성 단편 및 추가적인 치료제의 제약 조성물을 제공한다. 추가적인 치료제는 항암제; 항골다공증제; 항생제; 항대사제; 항당뇨병제; 항염증제; 항혈

관형성제; 성장 인자; 및 사이토카인으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0048] 추가로 본 발명은

[0049] (a) 본 발명의 DKK1/4 중화제; 및

[0050] (b) 1가지 이상의 제약상 활성인 작용제

[0051] 를 포함하고, 이때 제약상 활성인 작용제 중 1개 이상이 항암 치료제인 약제의 조합물로 포유동물, 특히 인간에서 증식성 질환 또는 암과 같은 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0052] 추가로 본 발명은

[0053] (a) DKK1/4 중화 항체;

[0054] (b) 제약상 활성인 작용제; 및

[0055] (c) 제약상 허용가능한 담체

[0056] 를 포함하고, 이때 제약상 활성인 작용제 중 1개 이상이 항암 치료제인 제약 조성물에 관한 것이다.

[0057] 추가로 본 발명은

[0058] (a) DKK1/4 중화 항체의 제약 제형; 및

[0059] (b) 동시, 동반, 분리 또는 순차적 사용을 위한 제약상 활성인 작용제의 제약 제형

[0060] 을 포함하고, 이때 제약상 활성인 작용제 중 1개 이상이 항암 치료제인 시판 패키지 또는 제품에 관한 것이다.

[0061] 특정 실시양태에서, 본 발명은 서열 2-20, 및 서열 2-20의 CDR 영역과 CDR 영역에서의 서열 동일성이 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99%인 서열로부터 선택된 중쇄인 제1 아미노산 서열; 및 서열 21-39, 및 서열 21-39에 제시된 CDR 영역과 CDR 영역에서의 서열 동일성이 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99%인 서열로부터 선택된 경쇄인 제2 아미노산 서열을 갖는 항체를 제공한다.

[0062] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 상기 기술된 바와 같은 항체 또는 단편인 제1 성분 및 제2 아미노산 서열의 제2 성분로 제조된 면역접합체를 제공한다. 예를 들어, 면역접합체는 세포독소이거나, 또는 면역접합체는 DKK1 또는 DKK4와 상이한 표적에 대한 결합 특이성이 있는 결합 단백질 또는 항체이다. 예를 들어, DKK1 또는 DKK4와 상이한 결합 특이성의 표적은 암 세포의 표면 상의 종양 항원 또는 종양-관련 단백질이다.

[0063] 특정 실시양태에서, 본 발명은 이중특이적 항체인 임의의 상기 항체를 제공한다.

[0064] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 임의의 상기 항체 또는 항체 단편이 있는 키트를 제공한다. 일부 실시양태에서, 키트는 이의 제약상 허용가능한 담체 또는 부형제를 추가로 함유한다. 또다른 관련된 실시양태에서, 키트 내의 임의의 상기 항체는 단위 용량으로 존재한다. 또다른 실시양태에서, 키트는 ELISA 진단 키트이다. 관련된 실시양태에서, 키트는 임의의 상기 항체를 대상에게 투여하는 것에서 사용하기 위한 사용설명서를 포함한다.

발명의 상세한 설명

[0079] 본 발명은 DKK1 또는 DKK4에 특이적으로 결합하고 DKK1 또는 DKK4의 기능적 성질을 억제하는 단리된 DKK1/4 항체, 특히 인간 항체에 관한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 이러한 DKK1/4 항체는 DKK2 또는 DKK3에 특이적으로 결합하지 않는다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 특정 중쇄 및 경쇄 서열로부터 유래되고/되거나, 특정 아미노산 서열을 포함하는 CDR 영역과 같은 특정한 구조적 특색을 포함한다. 본 발명은 단리된 항체, 이 같은 항체의 제조 방법, 이 같은 항체를 포함하는 면역접합체 및 이중특이적 분자, 및 본 발명의 항체, 면역접합체 또는 이중특이적 분자를 함유하는 제약 조성물을 제공한다. 또한 본 발명은 이러한 항체를 사용하여 DKK1 또는 DKK4와 관련된 장애 또는 용태를 억제하는 방법에 관한 것이다. 구현되는 질환 및 장애에는 골용해성 병변 - 특히 골수종, 특히 다발성 골수종과, 또는 골, 유방, 결장, 멜라닌세포, 간세포, 상피, 식도, 뇌, 폐, 전립선 또는 췌장의 암 또는 이의 전이와 관련된 골용해성 병변; 이식과 관련된 골 손실이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 추가적인 질환 또는 장애에는, 예를 들어, 골육종, 전립선 암, 간세포성 암종 (HCC), 다발성 골수종이 포함되는 골수종, 당뇨병, 비만, 근육 소모, 알츠하이머 질환, 골다공증, 골감소증, 류머티스, 결장염 및/또는 원치 않는 모발 손실이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.

[0080] 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있기 위해, 특정 용어들이 먼저 정의된다. 추가적인 정의가 상세한 설명 전반

에 걸쳐 기재된다.

- [0081] 용어 "면역 응답"은 침습성 병원체, 병원체로 감염된 세포 또는 조직, 암성 세포, 또는 자가면역 또는 병리학적인 감염의 경우 정상 인간 세포 또는 조직에 대한 선택적 손상, 이들의 파괴, 또는 인체로부터의 이들의 제거가 초래되는, 예를 들어, 림프구, 항원 제시 세포, 포식 세포, 과립구, 및 상피 세포 또는 간에 의해 생산된 가용성 거대분자 (항체, 사이토카인, 및 보체 포함)의 작용을 지칭한다.
- [0082] "신호 전달 경로"는 세포의 한 부분으로부터 세포의 또다른 부분으로의 신호 전파에서 역할을 하는 다양한 신호 전달 분자들 간의 생화학적 관계를 지칭한다. 본원에서 사용된 구절 "세포 표면 수용체"에는, 예를 들어, 신호를 받을 수 있고 이같은 신호를 세포의 형질막을 가로질러 전파할 수 있는 분자 및 분자의 복합체가 포함된다. 본 발명의 "세포 표면 수용체"의 예는 DKK1 또는 DKK4 단백질 분자가 결합하는 수용체이다. 이같은 세포 표면 수용체에는 프리즐드 (Fz), LRP (LRP5 및 LRP6), 및 크레텐 (Krm)이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0083] 본원에서 사용된 용어 "항체"는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간화 항체, 단일쇄 항체, 및 이의 단편 예컨대 F_{ab} , $F_{(ab')_2}$, F_v , 및 어버이 항체의 항원 결합 기능이 유지된 기타 단편을 지칭한다. 따라서, 항체는 면역글로불린 또는 당단백질, 또는 이의 단편 또는 일부분, 또는 변형된 면역글로불린-유사 프레임워크 내에 포함된 항원 결합 부분을 포함하는 구축물, 또는 비-면역글로불린-유사 프레임워크 또는 스캐폴드를 포함하는 구축물 내에 포함된 항원 결합 부분을 지칭할 수 있다.
- [0084] 본원에서 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 균질한 항체 집단이 있는 항체 조성물을 지칭한다. 이 용어는 항체의 중 또는 공급원과 관련하여 제한되지 않거나, 또는 항체가 제조된 방식에 의해 제한되도록 의도되지 않는다. 이 용어는 전체 면역글로불린, 뿐만 아니라 단편 예컨대 F_{ab} , $F_{(ab')_2}$, F_v , 및 항체의 항원 결합 기능이 유지된 기타 물질을 포함한다. 임의의 포유류 종의 모노클로날 항체가 본 발명에서 사용될 수 있다. 그러나, 실제로, 필요한 하이브리드 세포주 또는 하이브리도마를 제조하여 모노클로날 항체를 생산하는데 사용하기 위한 래트 또는 뮤린(murine) 세포주의 유용성으로 인해 항체는 전형적으로 래트 또는 뮤린 기원의 항체일 것이다.
- [0085] 본원에서 사용된 용어 "폴리클로날 항체"는 비균질성 항체 집단이 있는 항체 조성물을 지칭한다. 폴리클로날 항체는 면역화된 동물 또는 선택된 동물로부터의 풀링(pooling)된 혈청으로부터 종종 유래된다.
- [0086] 본원에서 사용된 구절 "단일쇄 항체"는 결합 항체의 결합 도메인 (중쇄 및 경쇄 모두)를 결정하고, 결합 기능의 보존을 허용하는 연결 모이어티(moiety)를 공급함으로써 제조된 항체를 지칭한다. 본질적으로, 이는 항원에 결합하는데 필요한 가변 도메인의 일부분만이 있는, 근복적으로 축약된 항체를 형성한다. 단일쇄 항체의 결정 및 구축이 미국 특허 번호 4,946,778 (Ladner 등)에 기술되어 있다.
- [0087] "천연 발생 항체"는 디설피드 결합에 의해 상호연결된 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 당단백질이다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 V_H 로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 CH1, CH2 및 CH3의 3개의 도메인으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 V_L 로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 C_L 의 1개의 도메인으로 구성된다. V_H 및 V_L 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 명명된 더욱 보존된 영역이 산재된, 상보성 결정 영역 (CDR)으로 명명된 초가변성 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L 은 아미노 말단에서 카르복시 말단으로 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 정렬된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포 (예를 들어, 이펙터(effector) 세포) 및 전통적인 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)이 포함되는 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다.
- [0088] 본원에서 사용된 용어 항체의 "항원 결합 부분" (또는 간단히 "항원 부분")은 표적에 결합하는 단백질 서열, 예를 들어, 1개 이상의 CDR을 지칭한다. 이는, 예를 들어, 전장 항체, 항체의 1개 이상의 단편, 및/또는 항원 (예를 들어, DKK1)에 특이적으로 결합하는 능력이 유지된 비-면역글로불린-관련 스캐폴드 상의 CDR을 포함한다. 항체의 항원 결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있다. 용어 항체의 "항원 결합 부분"에 포함되는 결합 단편의 예로는 V_L , V_H , C_L 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab 단편; 힌지(hinge) 영역에서 디설피드 결합에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab)_2$ 단편; V_H 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편; 항체의 1개의 팔의 V_L 및 V_H 도메인으로 구성된 F_v 단편; V_H 도메인으로 구성된 dAb 단편 ([Ward et al., 1989 Nature 341:544-546]); 및 단리된 상보성 결정 영역 (CDR)이 포함된다.

- [0089] 본원에서 사용된 "항원" 또는 "에피토프"는 항체, 항체 단편, 또는 이들의 다가물의 항원 결합 부분에 의해 특이적으로 인식되는 표적 단백질 상의 폴리펩티드 서열을 상호교환가능하게 지칭한다. 항원 또는 에피토프는 표적 서열 내에서 인접성일 수 있거나 또는 비-인접성일 수 있는 6개 이상의 아미노산을 포함한다. 입체형태적 에피토프는 비-인접성 잔기들을 포함할 수 있고, 천연적으로 또는 합성에 의해 변형된 아미노산 잔기를 임의로 함유할 수 있다. 잔기에 대한 변형에는 인산화, 글리코실화, PEG화, 유비퀴틴화, 푸라닐화 등이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0090] 또한, Fv 단편의 2개의 도메인 V_L 및 V_H 이 별도의 유전자에 의해 코딩되지만, 재조합 방법을 사용하여, 이들이 V_L 및 V_H 영역이 쌍을 이뤄 1가 분자를 형성한 단일 단백질 사슬 (단일쇄 Fv (scFv)로 공지됨; 예를 들어, [Bird et al., 1988 Science 242:423-426]; 및 [Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883] 참조)로 만들어지도록 할 수 있는 합성 링커에 의해 이들을 연결시킬 수 있다. 이같은 단일쇄 항체 또한 용어 항체의 "항원 결합 부분"에 포함되도록 의도된다. 이러한 항체 단편은 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 사용하여 수득되고, 단편들이 무손상 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다.
- [0091] 본원에 기술된 보존성 변이체는 임의의 확인된 아미노산 서열 내의 아미노산 잔기, 특히 단백질 공학 분야의 당업자에게 주지된 보존성 변화를 포함한다.
- [0092] 본원에서 사용된 "단리된 항체"는 항원 특이성이 상이한 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 지칭한다 (예를 들어, DKK1에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 DKK1 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). 그러나, DKK1에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 기타 항원, 예컨대 다른 종으로부터의 DKK1 분자, 또는 다른 패밀리 구성원 예컨대 DKK4 또는 관련된 파라로그(paralog)에 대한 교차-반응성이 있을 수 있다. 또한, 단리된 항체는 다른 세포성 물질 및/또는 화합물이 실질적으로 없을 수 있다.
- [0093] 본원에서 사용된 용어 "인간 항체"는 프레임워크 및 CDR 영역 모두가 인간 기원의 서열로부터 유래된 가변 영역이 있는 항체를 포함하도록 의도된다. 또한, 항체가 불변 영역을 함유한다면, 불변 영역 또한 인간 서열, 예를 들어, 인간 생식계열 서열, 또는 인간 생식계열 서열의 돌연변이된 버전으로부터 유래된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관 내에서의 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에서 사용된 용어 "인간 항체"는 또다른 포유류 종, 예컨대 마우스의 생식계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그래프트된 항체를 포함하도록 의도되지 않는다.
- [0094] 용어 "인간 모노클로날 항체"는 프레임워크 및 CDR 영역 모두가 인간 서열로부터 유래된 가변 영역이 있는, 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 인간 모노클로날 항체는 무한증식 세포에 융합된 인간 중쇄 트랜스젠(transgene) 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 계놈을 갖는 트랜스제닉 비-인간 동물, 예를 들어, 트랜스제닉 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생산된다.
- [0095] 본원에서 사용된 용어 "인간화 항체"는 면역글로불린의 프레임워크 영역의 적어도 일부분이 인간 면역글로불린 서열로부터 유래되는 것을 의미한다. "인간화" 항체 예컨대 또다른 종, 특히 포유류 종, 예를 들어, 마우스의 생식계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그래프트된 항체. 기술의 예로는 PDL의 인간화 기술이 포함된다.
- [0096] 본원에서 사용된 용어 "인간-조작 항체"는 동일한 에피토프에 결합하지만 서열이 상이한 항체를 지칭한다. 기술의 예로는 항원 결합 영역의 서열이 보존성 아미노산 치환으로 인한 것이기보다는 예를 들어 돌연변이에 의해 유래된, Kalobios의 인간-조작 기술에 의해 생산된 인간-조작 항체가 포함된다.
- [0097] 본원에서 사용된 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 인간 항체, 예컨대 인간 면역글로불린 유전자에 대해 트랜스제닉 또는 트랜스크로모조말(transchromosomal)인 동물 (예를 들어, 마우스) 또는 이로부터 제조된 하이브리도마로부터 단리된 항체, 인간 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예를 들어, 이입세포(transfectoma)로부터 단리된 항체, 재조합, 조합형 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 및 모든 인간 면역글로불린 유전자 또는 이의 일부분의 다른 DNA 서열로의 스플라이싱(splicing)을 수반하는 임의의 기타 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체를 포함한다. 이같은 재조합 인간 항체의 가변 영역은 프레임워크 및 CDR 영역이 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된다. 그러나, 특정 실시양태에서, 이같은 재조합 인간 항체에 시험관내 돌연변이유발 (또는, 인간 Ig 서열에 대해 트랜스제닉인 동물이 사용되는 경우, 생체내 체세포 돌연변이유발)이 적용될 수 있고, 따라서 재조합 항체의 V_H 및

V_L 영역의 아미노산 서열은 인간 생식계열 V_H 및 V_L 서열로부터 유래되고 이와 관련되지만 생체내에서 인간 항체 생식계열 레퍼토리 내에 천연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0098] 본원에서 사용된 "이소타입"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 제공되는 항체 클래스 (예를 들어, IgA, IgD, IgM, IgE, IgG 예컨대 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)를 지칭한다.

[0099] 구절 "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"는 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"와 상호교환가능하게 본원에서 사용된다. 본원에서 사용된 "인간 DKK1에 특이적으로 결합하는" 항체는 5×10^{-9} M 이하, 2×10^{-9} M 이하, 또는 1×10^{-10} M 이하의 K_D 로 인간 DKK1에 결합하는 항체를 지칭하도록 의도된다. "인간 DKK1 이외의 항원에 교차-반응하는" 항체는 0.5×10^{-8} M 이하, 5×10^{-9} M 이하, 또는 2×10^{-9} M 이하의 K_D 로 이러한 항원에 결합하는 항체를 지칭하도록 의도된다. "특정 항원과 교차-반응하지 않는" 항체는 1.5×10^{-8} M 이상의 K_D 또는 5×10^{-8} M 또는 1×10^{-7} M 이상의 K_D 로 이러한 항원에 결합하는 항체를 지칭하도록 의도된다. 특정 실시양태에서, 항원과 교차-반응하지 않는 이같은 항체는 표준 결합 분석법에서 이러한 단백질에 대해 본질적으로 검출가능하지 않은 결합을 나타낸다.

[0100] 본원에서 사용된, LRP, Fz 또는 Krm과 같은 "세포 표면 수용체에 대한 DKK1의 결합을 억제하는" 항체는 수용체에 대한 DKK1 결합을 1 nM 이하, 0.75 nM 이하, 0.5 nM 이하, 또는 0.25 nM 이하의 K_D 로 억제하는 항체를 지칭한다.

[0101] 본원에서 사용된 "골용해"는 골 밀도에서의 감소를 지칭하고, 이는 감소된 골모세포 활성, 증가된 파골세포 활성이 예를 들어 포함되는 다양한 작용 메커니즘에 의한 것일 수 있다. 따라서 골용해는 골 무기질 밀도에 총칭적으로 영향을 미치는 메커니즘을 포함한다. 본원에서 사용된, "골용해성 활성을 억제하는" 항체는 골 형성을 증가시킴으로써 또는 골 흡수를 차단함으로써 골 밀도의 손실을 억제하는 항체를 지칭한다.

[0102] 본원에서 사용된 용어 " K_{assoc} " 또는 " K_a "는 특정 항체-항원 상호작용의 회합 속도를 지칭하도록 의도되는 한편, 본원에서 사용된 용어 " K_{dis} " 또는 " K_d "는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 속도를 지칭하도록 의도된다. 본원에서 사용된 용어 " K_D "는 K_d 대 K_a 의 비율 (즉, K_d/K_a)로부터 수득되고 몰 농도 (M)로 표현되는 해리 상수를 지칭하도록 의도된다. 항체에 대한 K_D 값은 당업계에 잘 확립된 방법을 사용하여 결정할 수 있다. 항체의 K_D 를 결정하는 방법은 표면 플라즈몬 공명을 사용하는 것, FMAT, 또는 바이오센서 시스템 예컨대 Biacore® 시스템을 사용하는 것에 의한 것이다.

[0103] 본원에서 사용된 용어 "친화력"은 단일 항원성 부위에서의 항체와 항원 간의 상호작용의 강도를 지칭한다. 각각의 항원성 부위 내에서, 항체 "팔"의 가변 영역이 다수의 부위에서 항원과 약한 비-공유결합력을 통해 상호작용한다; 상호작용이 많을수록, 친화력이 강해진다.

[0104] 본원에서 사용된 용어 "결합력"은 항체-항원 복합체의 전체적인 안정성 또는 강도의 정보제공성 측정치이다. 이는 3가지 주요 인자에 의해 제어된다: 항체 에피토프 친화력; 항원 및 항체 모두의 결합가(valence); 및 상호작용 부분의 구조적인 정렬. 궁극적으로, 이러한 인자들이 항체의 특이성, 즉, 특정 항체가 정확한 항원 에피토프에 결합하는 가능성을 정의한다.

[0105] 결합력이 높은 단백질을 얻기 위해, 이량체성 접합체 (FACS 마커에 커플링된 JWJ-1의 2개 분자)가 구축되어, FACS에 의해 더욱 쉽게 검출되는 저친화력 상호작용 (예컨대 생식계열 항체와의 상호작용)이 만들어질 수 있다. 또한, 항원 결합의 결합력을 증가시키는 또다른 수단은 DKK1 또는 DKK4 항체의 본원에 기술된 피브로넥틴 구축물 중 임의의 것의 이량체 또는 다량체를 생성시키는 것을 수반한다. 이같은 다량체는, 예를 들어, 천연 C→N-말단 결합을 모방함으로써 또는 불변 영역들을 통해 함께 홀딩되는 항체 이량체를 모방함으로써, 개별적인 모듈들 간의 공유 결합을 통해 생성될 수 있다. Fc/Fc 계면 내로 조작된 결합은 공유 결합 또는 비-공유 결합일 수 있다. 또한, Fc 이외의 이량체화 또는 다량체화 파트너가 DKK1 또는 DKK4 하이브리드에서 사용되어 이같은 더욱 고차원의 구조물이 생성될 수 있다.

[0106] 본원에서 사용된 용어 "교차-반응성"은 또다른 항원 상의 에피토프에 대한 항체 또는 항체 집단 결합을 지칭한다. 이는 항체의 낮은 결합력 또는 특이성에 의해 또는 동일한 또는 매우 유사한 에피토프가 있는 여러 별개의 항원들에 의해 야기될 수 있다. 관련된 항원 군에 대한 일반적인 결합을 원하는 경우 또는 진화에서 항원 에피

토프 서열이 고도로 보존되지 않았을 때 중-교차 표지를 시도하는 경우 교차 반응성이 때때로 바람직하다.

- [0107] 본원에서 사용된, IgG 항체에 대한 용어 "고친화력" 또는 "높은 특이성"은 표적 항원에 대한 K_D 가 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 또는 10^{-10} M 이하인 항체를 지칭한다. 그러나, "고친화력" 결합은 다른 항체 이소타입에 대해 다를 수 있다. 예를 들어, IgM 이소타입에 대한 "고친화력" 결합은 K_D 가 10^{-7} M 이하, 또는 10^{-8} M 이하인 항체를 지칭한다.
- [0108] 본원에서 사용된 용어 "대상"은 임의의 인간 또는 비-인간 동물을 포함한다. 용어 "비-인간 동물"은 모든 척추 동물, 예를 들어, 포유동물 및 비-포유동물, 예컨대 비-인간 영장류, 양, 개, 고양이, 말, 소, 닭, 양서류, 파충류 등을 포함한다.
- [0109] 본원에서 사용된 용어, "최적화된"은 뉴클레오타이드 서열이 생산 세포 또는 생물에서 선호되는 코돈을 사용하는 아미노산 서열로 변형되었고/되었거나 뉴클레오타이드 서열이 잠재적인 스플라이스 도너 또는 스플라이스 어셉터 부위가 제거되도록 변형되었음을 의미한다. 최적화된 코돈 표는 광범위한 종에 대해 당업계에 주지되어 있다. 스플라이스 도너 및 어셉터에 대한 서열 또한 당업계에 공지되어 있고, 잠재적인 스플라이스 부위는, 예를 들어, 전사물 또는 발현 데이터의 분석에 의해 확인될 수 있다. 생산 세포에는 원핵생물 세포, 예를 들어, 배큘로바이러스 또는 박테리아 (대장균)과 같은 원핵생물 세포, 또는 진핵생물 세포, 예를 들어, 효모 (예를 들어, 피키아(Pichia)), 차이나이즈 햄스터 난소 세포 (CHO), 골수종 세포 또는 인간 세포가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 최적화된 뉴클레오타이드 서열은 "어버이" 서열로 또한 공지된 출발 뉴클레오타이드 서열에 의해 원래 코딩되는 아미노산 서열 및 잔기 수를 완전히 또는 가능한 한 많이 유지하도록 조작된다. 본원에서의 최적화된 서열은 생산 세포에서 선호되는 코돈을 갖도록 조작되었지만, 다른 진핵생물 및 원핵생물 세포에서의 이러한 서열의 최적화된 발현이 또한 본원에서 구현된다. 최적화된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열은 최적화된 것으로 임의로 지칭된다.
- [0110] 관련된 실시양태에서, 본 발명의 중화성 항-DKK1/4 조성물의 폴리펩티드 서열, 및 이를 코딩하는 뉴클레오타이드는 생산 및 임상 사용을 위해 바람직하게 최적화된다. 임상 사용을 위해 최적화될 수 있는 특성에는, 예를 들어, 반감기, 약동학 (PK), 항원성, 이펙터 기능, FcRn 소거율, 및 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성 (CDC) 활성이 포함되는 환자 응답이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0111] 본원에서 사용된 "DKK1-관련 질환" 또는 "DKK4-관련 질환"에는 골용해성 병변 - 특히 골수종, 특히 다발성 골수종과, 또는 골, 유방, 결장, 멜라닌세포, 간세포, 상피, 식도, 뇌, 폐, 전립선 또는 체장의 암 또는 이의 전이와 관련된 골용해성 병변; 이식과 관련된 골 손실이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 추가적인 질환 또는 장애에는, 예를 들어, 골육종, 전립선 암, 간세포성 암종 (HCC), 다발성 골수종이 포함되는 골수종, 당뇨병, 비만, 근육 소모, 알츠하이머 질환, 골다공증, 골감소증, 류머티스, 결장염 및/또는 원치 않는 모발 손실이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0112] 본원에서 사용된 "치료"는 장애의 발달을 방지하거나 이의 병리학을 변경시키려는 의도로 수행되는 개입이다. 따라서, "치료"는 치유적인 치료, 및 예방적 또는 방지성 수단 모두를 지칭한다. 치료를 필요로 하는 대상에는 이미 장애가 있는 대상뿐만 아니라 장애를 방지하려는 대상이 또한 포함된다. 종양 (예를 들어, 암) 치료에서, 치료제는 종양 세포의 병리학을 직접적으로 감소시킬 수 있거나, 또는 종양 세포가 다른 치료제에 의한 치료, 예를 들어, 방사선 및/또는 화학요법에 더욱 감수성하도록 할 수 있다. 암의 "병리학"에는 환자의 안녕을 손상시키는 모든 현상이 포함된다. 여기에는 비정상적인 또는 제어할 수 없는 세포 성장, 전이, 이웃 세포의 정상적인 기능의 방해, 비정상적인 수준의 사이토카인 또는 기타 분비성 산물의 방출, 염증성 또는 면역학적 응답의 억제 또는 악화 등이 비제한적으로 포함된다.
- [0113] 질환, 예컨대 골용해의 임상, 생화학적, 방사선학적 또는 주관적인 증상을 앓고 있는 환자의 치료는 이같은 증상의 일부 또는 전체를 경감시키는 것 또는 질환에 대한 소질을 감소시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0114] 일반적으로, 본 발명의 중화성 항-DKK1/4 조성물은 DKK1 또는 DKK4 또는 양쪽 모두와 관련된 Wnt-관련 질환을 방지하거나, 치료하거나 완화시키지만, DKK2, DKK3 또는 Wnt 경로의 기타 조절인자와 관련된 질환에 대해서는 그렇지 않다.
- [0115] 본 발명의 다양한 양상이 하기의 하위 섹션에서 더욱 상세하게 기술된다.
- [0116] Wnt 경로는 골모세포로의 중간엽 줄기 세포 (MSC) 분화의 주요 조절인자이다. 또한 이는 활성 골모세포에 대한

중요한 생존 인자이다. Dickkopf-1 (DKK1)은 성인의 골에서 우세하게 발현되는 Wnt 경로 길항제이고, 골용해성 병변이 있는 골수종 환자에서 상향조절된다. 중화성 항-DKK1/4 항체는 골모세포성 활성을 증가시키면서 동시에 파골세포성 활성을 감소시키는 것을 통해 작용하는, 진정한 동화성인 작용제이다. 반면에, 동화성 작용제로 판매되는 현재의 약물 예컨대 PTH는 실제로는 골모세포 및 골모세포 모두와 관련된 마커를 증가시킨다.

- [0117] DKK1에의 결합에 대해 선택된 폴리클로날 및 모노클로날 항체가 본 발명에서 제공된다. 바람직한 항체는 인간 DKK1에 대한 친화력이 10 pM 미만이다. 일부 실시양태에서, 항-DKK1 항체는 DKK4와 교차반응하지만 (Kd~300 pM), DKK2와는 교차반응하지 않는다 (친화력 분석 진행 중).
- [0118] 항-DKK1 또는 항-DKK4 항체에 대한 바람직한 에피토프는 LRP6 및 크레멘 결합 모두를 담당하는 것으로 공지된 Cys-2 도메인 (아미노산 189-263) 내에 지도로 작성된다. 한 실시양태에서, 에피토프는 DKK1 또는 DKK4 폴리펩티드의 Cys-2 도메인으로부터의 6개 이상, 30개 이하의 아미노산 잔기를 포함한다. 특정 실시양태에서, 에피토프는 6개 이상의 인접 아미노산의 신장물을 포함한다. 또다른 실시양태에서, 바람직한 결합 부위는 비-선형이고, 즉 비-인접성 아미노산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 결합은 N-글리코실화에 의존적이다. Cys-2 도메인 내의 잔기 256에서, 오직 1개의 N-글리코실화 부위만이 예상된다.
- [0119] 본 발명에서, 중화성 항-DKK1 항체는 ELISA 및 세포 표면 결합 분석법 모두에서 DKK1과 LRP6의 상호작용을 차단한다. 예상대로, 이는 시험관 내에서 1 nM 미만의 EC50으로 DKK1의 Wnt 억제성 활성을 효과적으로 중화한다.
- [0120] 골모세포 분화의 시험관내 모델에서, 마우스 10T1/2 세포가 골모세포 활성화에 대한 마커인 알칼리성 포스파타제 (AP)의 분비를 자극하도록 Wnt3A로 처리된다. DKK1은 이러한 모델에서 AP 생산을 차단하고, 본 발명의 항체는 이러한 억제를 완전하게 반전시킨다.
- [0121] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 20-200 μ g/마우스의 용량에 걸쳐 마우스에서 35-96시간의 용량 의존적 최종 반감기와 함께, 마우스에서 용량 선형 약동학 (AUC)을 나타낸다.
- [0122] 골용해성 전립선 종양 전이의 경골내 모델을 사용하면, 본 발명의 항체는 종양-유도 피질 골 손상을 억제한다. 종양 이식물 및 가짜 이식물 모두가 골에 대한 기계적인 손상을 야기하고, 이는 나중에 리모델링되는 직골에서의 초기 증가를 초래하여, 겔보기 골 부피에서의 감소를 야기한다는 관찰에 의해 이러한 모델에서 해면 골에 대한 효과가 혼동된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 종양이 이식된 경골 및 가짜가 이식된 경골 모두에서 직골의 생산을 증가시키고, 리모델링에 동반되는 골 부피에서의 감소를 억제한다.
- [0123] 관련된 실시양태에서, 골 마커 (오스테오칼신, sRANKL, OPG, AP, TRAP)에서의 변화가 골-관련 질환에 대한 본 발명의 항체의 임상 효과를 설명하고, 제약상 효과적인 수준의 본원에서 제공되는 바와 같은 중화성 항-DKK1 항체로의 치료의 임상 결과를 예측하기 위해 사용된다. Krm은 LRP와 대략 동일한 영역에서 DKK에 결합한다. LRP와의 DKK 상호작용을 통한 Wnt 신호 억제에 Krm이 필요하다. Krm-DKK-LRP는 Wnt 경로 활성감소를 위해 내재화되기 위해 복합체를 형성하였다.
- [0124] 본 발명의 중화성 항-DKK1/4 조성물은 바람직하게는 DKK1 또는 DKK4에 결합하여, 이들과 LRP 및/또는 Krm의 상호작용을 차단함으로써, Wnt 신호전달 경로에 대한 DKK1 또는 DKK4 효과를 중화한다. Wnt 경로 재활성화는 DKK1 및/또는 DKK4가 제한되는 경우에만 발생한다.
- [0125] ELISA, 웨스턴 블롯(western blot) 및 RIA를 예를 들어 포함하여, 다양한 종의 DKK1에 대한 항체의 결합 능력을 평가하기 위한 표준 분석법들이 당업계에 공지되어 있다. 적절한 분석법이 실시예에 상세하게 기술되어 있다. 당업계에 공지된 표준 분석법에 의해, 예컨대 Biacore 분석, BioVeris SET 분석법, FMAT, 화학발광, 및/또는 SPR 분석법 - 신호 억제 또는 방출 분석법에 의해 항체의 결합 키네틱 (예를 들어, 결합 친화력)을 또한 평가할 수 있다. DKK1의 기능성 성질에 대한 항체의 효과를 평가하기 위한 분석법이 실시예에서 더욱 상세하게 기술된다.
- [0126] 따라서, 당업계에 공지되고 본원에 기술된 방법론에 따라 결정되는 바와 같이 이러한 DKK1 기능성 성질들 (예를 들어, 생화학적, 면역화학적, 세포성, 생리학적 또는 기타 생물학적 활성 등) 중 1가지 이상을 "억제"하는 항체는 항체의 부재 시 (예를 들어, 또는 관련되지 않은 특이성의 대조군 항체가 존재하는 경우)에 나타나는 것과 관련된 특정 활성에서의 통계학적으로 유의한 감소에 관련되는 것으로 이해될 것이다. DKK1 활성을 억제하는 항체는 측정된 파라미터의 적어도 10%, 적어도 50%, 80% 또는 90%만큼의 이같은 통계학적으로 유의한 감소를 초래하고, 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 DKK1 기능성 활성을 95%, 98% 또는 99% 초과로 억제할 수 있다.

[0127] Dickkopf 패밀리 구성원

[0128] 적합한 골 대사는 골모세포, 파골세포 및 주변의 기질 간의 상호연결 및 조절성 경로의 복잡성 웹을 수반한다. 이러한 조절성 메커니즘에서의 불균형이 골용해성 용태 예컨대 골다공증, 종양에 의해 유도된 골용해성 병변, 신장 및 간 이식에 의해 유도된 골 손실, 및 항-호르몬 화학요법에 의해 유도된 골 손실에서 수반된다. 이러한 용태들은 골 통증, 골절, 척추 압박, 및 운동성 감소가 포함되는 중증 증상들이 있을 수 있다. 허가되었거나 현재 임상 평가 중인 대부분의 치료법들은 파골세포 기능을 억제함으로써 주로 작용한다. 예를 들어, 비스포스포네이트 예컨대 졸레드론산 (Zometa)은 현재의 진료 표준이고, 파골세포 기능 및 생존을 억제함으로써 작용한다. 비스포스포네이트가 일반적으로 효과적이지만, 일부 환자는 신장 독성 또는 골괴사로 인해 사용을 중단하거나 강건하게 응답하지 않는다 ([Markowitz 2003]; [Ruggiero 2004]). 또한, RANKL 및 M-CSF 중화성 항체와 같이 파골세포 발달을 표적으로 하거나 카텡신(Cathepsin) K 억제제와 같이 골세포 기능을 표적으로 하는 여러 시험용 약물들이 있다.

[0129] 골모세포 활성의 자극은 골용해성 질환을 치료하기 위한 신규 메커니즘을 제공한다. Wnt 경로는 골모세포 분화 및 활성에서 주요한 역할을 하고, 특히 Dickkopf (DKK) 패밀리의 길항제들이 시험관내에서 이러한 프로세스의 주요 조절인자로 확인되었다 (개관을 위해 [Krishnan 2006] 참조). 시험관 내에서, Wnt는 필수적인 골모세포 생존 및 분화 인자이다. Wnt 경로의 역할에 대한 임상적인 확인이 Wnt 공동-수용체인 LRP5의 돌연변이에 의해 제공된다. LRP5에서의 불활성화 돌연변이로 골다공증-가성신경교종 증후군 (OPPG)이 초래되는 한편 ([Ai 2005]), 활성화 돌연변이로는 높은 골 질량이 초래된다 ([Boyden 2002]). 이러한 활성화 돌연변이는 세포의 도메인에서 발견되고, Dickkopf (DKK) 패밀리의 Wnt 길항제에 대한 결합을 손상시키는 것으로 증명되었다.

[0130] DKK1은 골 병변이 있는 환자로부터의 골수종 세포에서 과발현되지만 정상 형질 세포 또는 골 병변이 없는 환자로부터의 형질 세포에는 없는 것으로 보고되었다 ([Tian 2004]; [Politou 2006]). 골수종 세포에 의한 DKK1의 이같은 과발현은 골모세포 분화를 차단하고 따라서 골 흡수를 촉진함으로써 골모세포와 파골세포 간의 정상적인 균형을 뒤엎을 수 있다. 또한, 골수종에 대해 사용되는 일부 항-종양 치료법, 예컨대 텍사메타손은 DKK1을 상향조절시키는 것으로 보고되었다 ([Ohnaka 2004]). 따라서, 항-DKK1 중화 항체는 골용해성 병변에서 Wnt 경로의 재활성화를 허용하여야 하는 한편, DKK1 수준이 비교적 낮거나 기타 길항제가 우세한 기타 조직에서 Wnt 신호전달에 영향을 미치지 않아야 한다. 성인에서, DKK1은 골에서만 고도로 발현되는 것으로 보고되었고 ([Li 2006]), 이는 성인에서의 골 대사를 조절하는 것에서의 DKK1에 대한 진행 중인 역할을 시사한다.

[0131] 유방 조직에서 Wnt1을 과발현하는 트랜스제닉 마우스에서 유방 암종이 발달되고 ([Tsukamoto 1988]), 인간 결장 직장암의 ~90%는 Wnt 경로의 2개의 세포질 성분인 APC 또는 β -카테닌 중 하나에서의 돌연변이가 있다 ([Morin 1997]; [Rowan 2000]). 이러한 유형의 증거는 Wnt 경로의 활성화가 증가된 종양 개시 또는 진행에 대한 위험 인자일 수 있다는 우려를 상승시킨다. 또한, DKK가 결장직장 종양 및 흑색종에서 하향 조절되고, 이는 잠재적인 종양 억제성 역할을 시사한다.

[0132] 본 발명의 DKK 폴리펩티드는 DKK1 (서열 1) 및 DKK4 (서열 124), 뿐만 아니라 DKK2 (서열 122) 및 DKK3 (서열 123)을 포함한다. DKK 패밀리 구성원은 표 A - DKK1 패밀리 구성원 파일업(pileup)에 제시된 바와 같이 2개의 CYS 도메인 (CYS1 및 CYS2)을 갖는다. DKK 단백질은 산 N-말단 신호 펩티드, 분기성 링커 영역에 의해 분리된 시스테인 잔기들의 클러스터를 함유하는 2개의 CYS 도메인, 및 잠재적인 C-말단 N-글리코실화 부위를 함유한다. DKK4 내의 CYS2 도메인은 형질막에서 WNT/DKK 상호작용을 용이하게 할 수 있는 지질-결합 기능을 갖는다. OMIM 접속 번호 605417.

표 A

DKK1 패밀리 구성원 파일업				
hDKK1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
hDKK2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
hDKK3	MQRLGATLLC	LLLAADVPTA	PAPAPTATSA	PVKPGPALSY PQEATLNEM
hDKK4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
51				100
hDKK1	~~~~~M	MALGAAGATR	VFVAMVAAAL	GGHPLLGVSA TLNSVLNSNA
hDKK2	~~~~~M	AALMRSDSS	CCLLLAAVLMVESQ IGSSRAKLNS
hDKK3	FREVEELMED	TOHKLRSVE	EMEAEAAAK	ASSEVNLANL PPSYHNETNT
hDKK4	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
101				150
hDKK1	IKNLPPPLGG	AAGHPGSAVS	AAPGILYPG	..GNKYQTID NYQPYPCAED
hDKK2	IKS...SLGG	ET..PGQAA	RSAG.MYQGL	AFGGSKKGKN LGQAYPCSSD
hDKK3	DTKVGNNTH	VHREIHKITN	NQTGMVFSE	TVITSVGDEE GRRSHECTID
hDKK4	~~~~~MVAA	VLLGLSWLCS	PLGALVDFN	NIRSSADLHG ARKGSQCLSD
151	CYS1			200
hDKK1	EECGTDEYCA	SPTRGGDAGV	QICLACRKRR	KRCMRHAMCC PGNYCKNGIC
hDKK2	KECEVGRYCH	SPHQGSSA..	..CMVCRKK	KRCHRDGMCC PSTRCNNGIC
hDKK3	EDCGPSMYCQFASFO	YTCQPCRQOR	MLCTRDSECC GDQLCVWGHG
hDKK4	TDNTRKFCL	QPRD....EK	PFCATCRGLR	RRCQORDAMCC PGTLCVNDVC
201				250
hDKK1	VSSDQN..HF	RGEI...EET	ITESFGNDH	STLD.GYSRR TTLSSKMYHT
hDKK2	IVTES...IL	TFHIPALDGT	RHRDRNHGHV	SNHDLGWQNL GRPHTKMSHI
hDKK3	TKMA.....T
hDKK4	TMEDATPIL	ERQLDEQDGT	.HAEGTTGH.	.PVQENQPKR KPSIKKSQGR
251	CYS2			300

CYS 1

CYS 2

hDKK1	KGQEGSV	CLR	SSDCASGLCC	A..RHFWSKI	CKPVLKEGOV	CTKHRRK...
hDKK2	KGHEGDP	CLR	SSDCIEGFCC	A..RHFWTKI	CKPVLHQEV	CTKQKK...
hDKK3	RGSNGT	ICDN	QRDCQFGLCC	AFQRGLLFPV	CTPLPVEGEL	CHDPASRLD
hDKK4	KGQEGES	CLR	TFDCGFLCC	A..RHFWTKI	CKPVLLEGQV	CSRRGHK...
301						350
hDKK1	...G.SHGLE IFORCYCGEG LSCRIQKDH QASNSSRLHT					CQRH~~~~~
hDKK2	...G.SHGLE IFORCDCAKG LSCVKNKD.A TYSSKARLHV					CQKI~~~~~
hDKK3	LITWELEPDG ALDRCPCASG LLC..... QPHSHSLVYV					CKPTFVGSRD
hDKK4	...DTAQAFE IFORCDGPG LLCRSOLTSN R..QHARLV					CQKIEKL~~~
351						400
hDKK1	~~~~~					~~~~~
hDKK2	~~~~~					~~~~~
hDKK3	QDGEILLPRE	VPDEYEVGSF	MEEVRQELD	LESLTEEMA	LGEPAAAAAA	
hDKK4	~~~~~					~~~~~
401						
hDKK1	~~~~~					(서열 1)
hDKK2	~~~~~					(서열 122)
hDKK3	LLGGEEI					(서열 123)
hDKK4	~~~~~					(서열 124)

DKK1 및 DKK4에 대한 항체

바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 인간 DKK 단백질에 특이적이다.

DKK1 또는 DKK4 중화 항체는 종양 촉진에 연관된 Wnt 경로 변형과 별개이다. Wnt 경로는 DKK1이 유일한 대상인 세포외 리간드, 수용체 및 길항제의 복합적인 네트워크에 의해 조절된다. 성인에서의 DKK1의 제한된 발현, 및 다른 Wnt 길항제와의 이의 기능적 중복성으로 인해, 중화성 DKK1 항체는 Wnt 신호전달의 광범위한 활성화 또는 따라서 종양형성을 야기할 것 같지 않다. 이는 2가지 관찰에 의해 추가로 지지된다: 먼저, LRP5 돌연변이의 활성화 (DKK 결합 억제)는 높은 골 질량 표현형을 유도하지만, 명백한 암 위험 증가가 없는 한편 ([Moon 2004]), DKK1 이중접합성 null 또는 더블리지(Doubleridge) 마우스에서는 DKK1 수준이 감소되었고, 높은 골 질량 표현형이었지만, 종양 형성의 속도 증가가 보고되지 않았다 ([MacDonald 2004]).

항-DKK1는 신생(de novo) 종양형성의 위험을 증가시키지 않으면서 골수종-유도 골용해성 질환에 양성으로 영향을 미쳐야 한다. 이같은 항체가 항-종양 화학요법 및 가능하게는 과골세포 기능을 억제하는 항-골 흡수 약물과 조합되어 사용될 것으로 예상된다.

폴리클로날 항체

본 발명의 항체는 폴리클로날 항체, 특히 인간 폴리클로날 항체일 수 있다. 폴리클로날 항체는 면역화된 동물

또는 선별된 인간으로부터의 폴링된 혈청으로부터 유래된다.

[0141] 모노클로날 항체

[0142] 본 발명의 항체는 바람직하게는 인간 모노클로날 항체, 예컨대 실시예 1-8에서 예를 들어 단리되고 구조적으로 특성화된 항체이다. 항체의 특정 V_H 아미노산 서열이, 예를 들어, 서열 2-20에서 제시된다. 항체의 특정 V_L 아미노산 서열이, 예를 들어, 서열 21-39에서 제시된다.

[0143] 항체의 V_H 아미노산 서열은, 예를 들어, 서열 119에 제시된 서열과 같이, 포유류 세포에서의 발현에 대해 최적화될 수 있다. 항체의 V_L 아미노산 서열은, 예를 들어, 서열 118에 제시된 서열과 같이, 포유류 세포에서의 발현에 대해 최적화될 수 있다. 마찬가지로, 서열들은, 최적화될 특성에 대해 어떠한 발현 시스템이 선호되는지에 따라, 예를 들어, 효모, 박테리아, 햄스터 및 기타 세포에서의 발현에 대해 최적화될 수 있다. 기타 본 발명의 항체의 아미노산 서열은 돌연변이되었지만, CDR 영역에서 상기 기술된 서열에 묘사된 CDR 영역과의 동일성이 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99%이다.

[0144] 또한, 전장 경쇄 어버이 뉴클레오티드 서열이 서열 97-100에 제시된다. 전장 중쇄 어버이 뉴클레오티드 서열이 서열 101-103에 제시된다. 포유류 세포에서의 발현에 대해 최적화된 전장 경쇄 뉴클레오티드 서열이 서열 104-107에 제시된다. 포유류 세포에서의 발현에 대해 최적화된 전장 중쇄 뉴클레오티드 서열이 서열 108-110에 제시된다. 최적화된 경쇄 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 전장 경쇄 아미노산 서열이 서열 111-114에 제시된다. 최적화된 중쇄 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 전장 중쇄 아미노산 서열이 서열 115-117에 제시된다. 기타 본 발명의 항체는 돌연변이되었지만 상기 기술된 서열과의 동일성이 적어도 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98 또는 99%인 아미노산 또는 핵산을 포함한다.

[0145] 각각의 이러한 항체들이 DKK1에 결합할 수 있기 때문에, V_H , V_L , 전장 경쇄, 및 전장 중쇄 서열 (뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열)이 "혼합 및 매칭(matching)"되어 또다른 본 발명의 항-DKK1 결합 분자가 생성될 수 있다. 이같은 "혼합 및 매칭"된 항체의 DKK1 결합을 상기 및 실시예에 기술된 결합 분석법 (예를 들어, ELISA)을 사용하여 테스트할 수 있다. 이러한 사실들이 혼합 및 매칭되는 경우, 특정 V_H/V_L 쌍으로부터의 V_H 서열이 구조적으로 유사한 V_H 서열로 대체되어야 한다. 유사하게, 특정 전장 중쇄/전장 경쇄 쌍으로부터의 전장 중쇄 서열이 구조적으로 유사한 전장 중쇄 서열로 대체되어야 한다. 유사하게, 특정 V_H/V_L 쌍으로부터의 V_L 서열이 구조적으로 유사한 V_L 서열로 대체되어야 한다. 유사하게, 특정 전장 중쇄/전장 경쇄 쌍으로부터의 전장 경쇄 서열이 구조적으로 유사한 전장 경쇄 서열로 대체되어야 한다. 본 발명의 항체의 V_H , V_L , 전장 경쇄, 및 전장 중쇄 서열은 혼합 및 매칭에 대해 특히 수정가능한데, 이러한 항체들이 동일한 생식계열 서열로부터 유래된 V_H , V_L , 전장 경쇄, 및 전장 중쇄 서열을 사용하고, 따라서 구조적 유사성을 나타내기 때문이다.

[0146] 따라서, 한 양상에서, 본 발명은 서열 2-20 및 119으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역; 및 서열 21-39 및 118으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역이 있고, 이때 항체가 DKK1을 특이적으로 인식하는, 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0147] 중쇄 및 경쇄 조합의 예로는 하기의 것들이 포함된다: 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역 및 서열 21의 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역; 또는 서열 3을 포함하는 V_H 영역 및 서열 22를 포함하는 V_L 영역; 또는 서열 4를 포함하는 V_H 영역 및 서열 23을 포함하는 V_L 영역; 또는 서열 5를 포함하는 V_H 영역 및 서열 24를 포함하는 V_L 영역; 또는 서열 6을 포함하는 V_H 영역 및 서열 25를 포함하는 V_L 영역; 또는 서열 7을 포함하는 V_H 영역 및 서열 28을 포함하는 V_L 영역; 또는 서열 8을 포함하는 V_H 영역 및 서열 29를 포함하는 V_L 영역; 또는 서열 9를 포함하는 V_H 영역 및 서열 30을 포함하는 V_L 영역; 또는 서열 10을 포함하는 V_H 영역 및 서열 31을 포함하는 V_L 영역; 또는 서열 11을 포함하는 V_H 영역 및 서열 32를 포함하는 V_L 영역; 또는 서열 12를 포함하는 V_H 영역 및 서열 33을 포함하는 V_L 영역; 또는 서열 119를 포함하는 V_H 영역 및 서열 118을 포함하는 V_L 영역.

[0148] 또다른 양상에서, 본 발명은 서열 115-117로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 전장 중쇄; 및 서열 111-114로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 전장 경쇄가 있는, 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다.

- [0149] 따라서, 전장 중쇄 및 전장 경쇄 조합의 예는 각각 하기를 포함한다: 서열 115와 서열 111; 또는 서열 116과 서열 112; 또는 서열 117과 서열 113; 또는 서열 117과 서열 114.
- [0150] 또다른 양상에서, 본 발명은 서열 101-103으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 전장 중쇄; 및 서열 97-100으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 전장 경쇄를 포함하는, 단리된 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0151] 따라서, 조합될 수 있는, 각각 전장 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 뉴클레오티드의 예는 하기를 포함한다: 서열 101 및 97; 또는 서열 102 및 98; 또는 서열 103 및 99; 또는 서열 103 및 100.
- [0152] 또다른 양상에서, 본 발명은 서열 108-110으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 전장 중쇄; 및 서열 104-107로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 전장 경쇄가 있는, 세포에서의 발현에 대해 최적화된 단리된 모노클로날 항체 또는 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0153] 또다른 양상에서, 본 발명은 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 또는 이의 조합물을 포함하는 항체를 제공한다. 항체의 V_H CDR1의 아미노산 서열이 서열 2-5, 8-11, 20, 및 49-56에 제시된다. 항체의 V_H CDR2의 아미노산 서열이 서열 2-20 및 57-64에 제시된다. 항체의 V_H CDR3의 아미노산 서열이 서열 2-20 및 65-72에 제시된다. 항체의 V_L CDR1의 아미노산 서열이 서열 21-39 및 73-80에 제시된다. 항체의 V_L CDR2의 아미노산 서열이 서열 21-39 및 81-88에 제시된다. 항체의 V_L CDR3의 아미노산 서열이 서열 21-39 및 89-96에 제시된다. CDR 영역은 캐벗(Kabat) 시스템을 사용하여 서술된다 ([Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242]).
- [0154] 각각의 이러한 항체들이 DKK1에 결합할 수 있고, 항원-결합 특이성이 주로 CDR1, 2 및 3 영역에 의해 제공된다고 가정하면, 비록 기타 본 발명의 항-DKK1 결합 분자를 생성하기 위해 각각의 항체가 V_H CDR1, 2 및 3 및 V_L CDR1, 2 및 3을 함유하여야 하지만, V_H CDR1, 2 및 3 서열 및 V_L CDR1, 2 및 3 서열이 "혼합 및 매칭"될 수 있다 (즉, 상이한 항체들로부터의 CDR들이 혼합 및 매칭될 수 있다). 이같은 "혼합 및 매칭"된 항체의 DKK1 결합을 상기 및 실시예에 기술된 결합 분석법 (예를 들어, ELISA)을 사용하여 테스트할 수 있다. V_H CDR 서열들이 혼합 및 매칭되는 경우, 특정 V_H 서열로부터의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열이 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체되어야 한다. 마찬가지로, V_L CDR 서열들이 혼합 및 매칭되는 경우, 특정 V_L 서열로부터의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열이 구조적으로 유사한 CDR 서열(들)로 대체되어야 한다. 또한, 특정 V_H 또는 V_L 서열로부터의 CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 서열이 특정하게 또는 무작위로 돌연변이되어, 친화력 또는 결합 특성에 대해 테스트될 수 있는 항체가 생성될 수 있다. 1개 이상의 V_H 및/또는 V_L CDR 영역 서열을 본 발명의 모노클로날 항체에 대해 본원에서 제시된 CDR 서열로부터의 구조적으로 유사한 서열로 치환함으로써 신규 V_H 및 V_L 서열이 생성될 수 있다는 것이 당업자에게 쉽게 명백할 것이다.
- [0155] 한 단리된 모노클로날 항체, 또는 이의 항원 결합 부분은 서열 2-5, 8-11, 20 및 49-56으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역 CDR1; 서열 2-20 및 57-64로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역 CDR2; 서열 2-20 및 65-72로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역 CDR3; 서열 21-39 및 73-80으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역 CDR1; 서열 21-39 및 81-88로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역 CDR2; 서열 21-39 및 89-96으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역 CDR3을 포함하고, 이때 항체는 DKK1에 특이적으로 결합한다.
- [0156] 특정 실시양태에서, 항체는 서열 2를 포함하는 V_H 영역 CDR1; 서열 6을 포함하는 V_H 영역 CDR2; 서열 7을 포함하는 V_H 영역 CDR3; 서열 21을 포함하는 V_L 영역 CDR1; 서열 22를 포함하는 V_L 영역 CDR2; 및 서열 23을 포함하는 V_L 영역 CDR3으로 구성된다.
- [0157] 또다른 실시양태에서, 항체는 서열 3을 포함하는 V_H 영역 CDR1; 서열 12를 포함하는 V_H 영역 CDR2; 서열 13을

포함하는 V_H 영역 CDR3; 서열 24를 포함하는 V_L 영역 CDR1; 서열 25를 포함하는 V_L 영역 CDR2; 및 서열 26을 포함하는 V_L 영역 CDR3으로 구성된다.

[0158] 또다른 실시양태에서, 항체는 서열 4를 포함하는 V_H 영역 CDR1; 서열 14를 포함하는 V_H 영역 CDR2; 서열 15를 포함하는 V_H 영역 CDR3; 서열 27을 포함하는 V_L 영역 CDR1; 서열 28을 포함하는 V_L 영역 CDR2; 및 서열 29를 포함하는 V_L 영역 CDR3으로 구성된다.

[0159] 또다른 실시양태에서, 항체는 서열 5를 포함하는 V_H 영역 CDR1; 서열 16을 포함하는 V_H 영역 CDR2; 서열 17을 포함하는 V_H 영역 CDR3; 서열 30을 포함하는 V_L 영역 CDR1; 서열 31을 포함하는 V_L 영역 CDR2; 및 서열 32를 포함하는 V_L 영역 CDR3으로 구성된다.

[0160] 특정 실시양태에서, 항체는 서열 8을 포함하는 V_H 영역 CDR1; 서열 18을 포함하는 V_H 영역 CDR2; 서열 19를 포함하는 V_H 영역 CDR3; 서열 33을 포함하는 V_L 영역 CDR1; 서열 34를 포함하는 V_L 영역 CDR2; 및 서열 35를 포함하는 V_L 영역 CDR3으로 구성된다.

[0161] 또다른 실시양태에서, 항체는 서열 9를 포함하는 V_H 영역 CDR1; 서열 10을 포함하는 V_H 영역 CDR2; 서열 11을 포함하는 V_H 영역 CDR3; 서열 36을 포함하는 V_L 영역 CDR1; 서열 37을 포함하는 V_L 영역 CDR2; 및 서열 38을 포함하는 V_L 영역 CDR3으로 구성된다.

[0162] 본원에서 사용된 인간 항체는 항체의 가변 영역 또는 전장 사슬이 인간 생식계열 면역글로불린 유전자를 사용하는 시스템으로부터 획득되는 경우 특정 생식계열 서열의 "산물"이거나 이로부터 "유래된" 중쇄 또는 V_L 영역 또는 전장 중쇄 또는 경쇄를 포함한다. 이같은 시스템은 인간 면역글로불린 유전자를 보유하는 트랜스제닉 마우스를 당해 항원으로 면역화시키고 파지 상에 디스플레이된 인간 면역글로불린 유전자를 당해 항원으로 스크리닝하는 것을 포함한다. 인간 생식계열 면역글로불린 서열의 "산물"이거나 이로부터 "유래된" 인간 항체는 인간 항체의 아미노산 서열을 인간 생식계열 면역글로불린의 아미노산 서열과 비교하고, 인간 항체의 서열과 서열 면에서 가장 밀접한 (즉, % 동일성이 가장 큰) 인간 생식계열 면역글로불린 서열을 선별함으로써 그 자체로 확인될 수 있다. 특정 인간 생식계열 면역글로불린 서열의 "산물"이거나 이로부터 "유래된" 인간 항체는, 예를 들어, 천연 발생 체세포 돌연변이 또는 의도적인 부위-지정 돌연변이의 도입으로 인해, 생식계열 서열과 비교하여 아미노산 차이를 함유할 수 있다. 그러나, 선별된 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열에 대해 아미노산이 90% 이상 동일하고, 다른 종의 생식계열 면역글로불린 아미노산 서열 (예를 들어, 뮤린 생식계열 서열)과 비교했을 때 인간 항체를 인간으로 확인되도록 하는 아미노산 잔기를 함유한다. 특정 사례들에서, 인간 항체는 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열에 대해 아미노산 서열이 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 적어도 95%, 또는 심지어 적어도 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일하다. 전형적으로, 특정 인간 생식계열 서열로부터 유래된 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과 최대 10개의 아미노산 차이를 나타낼 것이다. 특정 사례에서, 인간 항체는 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과 최대 5개 이하, 또는 심지어 최대 4개, 3개, 2개, 또는 1개의 아미노산 차이를 나타낼 수 있다.

[0163] 상동성 항체

[0164] 또다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 본원에 기술된 항체의 아미노산 및 뉴클레오타이드 서열과 상동성인, 전장 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열; 전장 중쇄 및 경쇄 뉴클레오타이드 서열, 가변 영역 중쇄 및 경쇄 뉴클레오타이드 서열, 또는 가변 영역 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열을 갖고, 이때 항체는 본 발명의 중화성 항-DKK1/4 조성물의 원하는 기능성 성질을 유지한다.

[0165] 예를 들어, 본 발명은 서열 2-20 및 119로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 80% 이상 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 V_H 영역, 및 서열 21-39 및 118로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 80% 이상 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 V_L 영역을 포함하고, 이때 항체가 DKK1 및/또는 DKK4에 특이적으로 결합하고, 항체가 LRP6, Fz 및/또는 Krm에 대한 DKK1 단백질의 결합을 중화하는 성질, 또는 항체가 LRP, Pz 및/또는 Krm에 대한 DKK4 단백질의 결합을 중화하는 성질 중 1가지 이상의 기능성 성질을 항체가 나타내는, 단리된 모노클로날 항체, 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다.

- [0166] 추가적인 예에서, 본 발명은 서열 115-117로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 80% 이상 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 전장 중쇄, 및 서열 111-114로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 80% 이상 상동성인 아미노산 서열을 포함하는 전장 경쇄를 포함하고; 항체가 DKK1에 특이적으로 결합하고, 항체가 DKK1 수용체에 대한 DKK1 단백질의 결합을 억제하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 골용해를 방지 또는 완화하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 골용해성 병변을 방지 또는 완화하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 암을 방지 또는 완화하는 성질 중 1가지 이상의 기능성 성질을 항체가 나타내는, 단리된 모노클로날 항체, 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0167] 또다른 예에서, 본 발명은 서열 101-103으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 80% 이상 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 전장 중쇄, 및 서열 97-100으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 80% 이상 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 전장 경쇄를 포함하고; 항체가 DKK1에 특이적으로 결합하고, 항체가 DKK1 수용체에 대한 DKK1 단백질의 결합을 억제하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 골용해를 방지 또는 완화하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 골용해성 병변을 방지 또는 완화하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 암을 방지 또는 완화하는 성질 중 1가지 이상의 기능성 성질을 항체가 나타내는, 단리된 모노클로날 항체, 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0168] 또다른 예에서, 본 발명은 서열 108-110으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 80% 이상 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 전장 중쇄, 및 서열 104-107로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 80% 이상 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 전장 경쇄를 포함하고; 항체가 DKK1에 특이적으로 결합하고, 항체가 DKK1 수용체에 대한 DKK1 단백질의 결합을 억제하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 골용해를 방지 또는 완화하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 골용해성 병변을 방지 또는 완화하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 암을 방지 또는 완화하는 성질 중 1가지 이상의 기능성 성질을 항체가 나타내는, 세포에서의 발현에 대해 최적화된 단리된 모노클로날 항체, 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0169] 또다른 예에서, 본 발명은 V_H 영역 및 V_L 영역을 포함하고, 이때 전장 중쇄는 서열 121로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 80% 이상 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 전장 경쇄는 서열 120으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 80% 이상 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 항체가 DKK1에 특이적으로 결합하고, 항체가 DKK1 수용체에 대한 DKK1 단백질의 결합을 억제하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 골용해를 방지 또는 완화하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 골용해성 병변을 방지 또는 완화하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 암을 방지 또는 완화하는 성질 중 1가지 이상의 기능성 성질을 항체가 나타내는, 세포에서의 발현에 대해 최적화된 단리된 모노클로날 항체, 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다.
- [0170] 다양한 실시양태에서, 항체는 상기 논의된 기능성 성질들 중 1가지 이상, 2가지 이상, 또는 3가지를 나타낼 수 있다. 항체는, 예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체일 수 있다.
- [0171] 본원에서 사용된, 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 뉴클레오타이드 서열 간의 % 상동성은 2개의 서열 간의 % 동일성과 동등하다. 2개의 서열 간의 % 동일성은 2개의 서열의 최적의 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭의 갯수, 및 각각의 갭의 길이를 고려하여, 서열들에 의해 공유된 동일한 위치의 갯수의 함수이다 (즉, % 상동성 = 동일한 위치의 # / 전체 위치의 # $\times 100$). 서열들의 비교 및 2개의 서열 간의 % 동일성의 결정은 하기의 비제한적 예에 기술된 바와 같은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다.
- [0172] 2개의 아미노산 서열 간의 % 동일성은 PAM120 웨이트(weight) 잔기 표, 갭 길이 페널티 12 및 갭 페널티 4를 사용하여, ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 내로 혼입된 E. Meyers 및 W. Miller ([Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988])의 알고리즘을 사용하여 결정할 수 있다. 또한, 2개의 아미노산 서열 간의 % 동일성을 블라섬 (Blossom) 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 및 갭 웨이트 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4 및 길이 웨이트 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6을 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지 (<http://www.gcg.com>에서 입수가능) 내의 GAP 프로그램 내로 혼입된 Needleman 및 Wunsch ([J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970])의 알고리즘을 사용하여 결정할 수 있다.
- [0173] 추가적으로 또는 별법적으로, 본 발명의 단백질 서열은, 예를 들어, 관련 서열을 확인하기 위해 공공 데이터베이스에 대한 탐색을 수행하기 위한 "질의 서열"로 추가적으로 사용될 수 있다. 이같은 탐색은 [Altschul, et al., 1990 J. Mol. Biol. 215:403-10]의 XBLAST 프로그램 (버전 2.0)을 사용하여 수행할 수 있다. XBLAST 프

로그그램, 점수 = 50, 단어 길이 = 3로 BLAST 단백질 탐색을 수행하여, 본 발명의 항체 분자에 대해 상동성인 아미노산 서열을 수득할 수 있다. 비교 목적으로 갭이 있는 정렬을 수득하기 위해, Gapped BLAST가 [Altschul et al., 1997 Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402]에 기술된 바와 같이 이용될 수 있다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 사용할 때, 각각의 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트(default) 파라미터를 사용할 수 있다. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 참조.

[0174] 보존성 변형이 있는 항체

[0175] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열로 구성된 V_H 영역 및 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열로 구성된 V_L 영역이 있고, 이때 이러한 CDR 서열들 중 1가지 이상은 본원에 기술된 항체를 기초로 하는 특정 아미노산 서열 또는 이의 보존성 변형을 갖고, 항체는 본 발명의 중화성 항-DKK1/4 조성물의 원하는 기능성 성질을 유지한다. 따라서, 본 발명은 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열로 구성된 V_H 영역 및 CDR1, CDR2, 및 CDR3 서열로 구성된 V_L 영역으로 구성되고, 이때 CDR1의 V_H 영역은 서열 2-5, 8-11, 20, 49-56의 아미노산 서열, 및 이의 보존성 변형물로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성된 서열이고; CDR2의 V_H 영역은 서열 2-20, 57-64의 아미노산 서열, 및 이의 보존성 변형물로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성된 서열이고; CDR3의 V_H 영역은 서열 2-20, 65-72의 아미노산 서열, 및 이의 보존성 변형물로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성된 서열이고; CDR1의 V_L 영역은 서열 21-39, 73-80의 아미노산 서열, 및 이의 보존성 변형물로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성된 서열; CDR2의 V_L 영역은 서열 21-39, 81-88의 아미노산 서열, 및 이의 보존성 변형물로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성된 서열이고; CDR3의 V_L 영역은 서열 21-39, 89-96의 아미노산 서열, 및 이의 보존성 변형물로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열로 구성된 서열이고; 항체가 DKK1에 특이적으로 결합하고; 항체가 DKK1 수용체에 대한 DKK1 단백질의 결합을 억제하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 골용해를 방지 또는 완화하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 골용해성 병변을 방지 또는 완화하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 암을 방지 또는 완화하는 성질 중 1가지 이상의 기능성 성질을 항체가 나타내는, 단리된 모노클로날 항체, 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0176] 다양한 실시양태에서, 항체는 상기 논의된 기능성 성질들 중 1가지 이상, 2가지 이상, 또는 3가지 이상을 나타낼 수 있다. 이같은 항체는, 예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체일 수 있다.

[0177] 또다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 전장 중쇄 서열 및 전장 경쇄 서열이 있고, 이때 이러한 서열들 중 1가지 이상은 본원에 기술된 항체를 기초로 하는 특정 아미노산 서열 또는 이의 보존성 변형을 갖고, 항체는 본 발명의 중화성 항-DKK1/4 조성물의 원하는 기능성 성질을 유지한다. 따라서, 본 발명은 서열 115-117, 및 이의 보존성 변형물의 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 전장 중쇄, 및 서열 111-114, 및 이의 보존성 변형물의 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 전장 경쇄로 구성되고, 이때 항체가 DKK1에 특이적으로 결합하고; 항체가 DKK1 수용체에 대한 DKK1 단백질의 결합을 억제하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 골용해를 방지 또는 완화하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 골용해성 병변을 방지 또는 완화하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 암을 방지 또는 완화하는 성질 중 1가지 이상의 기능성 성질을 항체가 나타내는, 단리된 모노클로날 항체, 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0178] 다양한 실시양태에서, 항체는 상기 논의된 기능성 성질들 중 1가지 이상, 2가지 이상, 또는 3가지 이상을 나타낼 수 있다. 이같은 항체는, 예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체일 수 있다.

[0179] 또다른 실시양태에서, 세포에서의 발현에 대해 최적화된 본 발명의 항체는 V_H 영역 서열 및 V_L 영역 서열이 있고, 이때 이러한 서열들 중 1가지 이상은 본원에 기술된 항체를 기초로 하는 특정 아미노산 서열 또는 이의 보존성 변형을 갖고, 항체는 본 발명의 중화성 항-DKK1/4 조성물의 원하는 기능성 성질을 유지한다. 따라서, 본 발명은 서열 119, 및 이의 보존성 변형물의 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 V_H 영역, 및 서열 118, 및 이의 보존성 변형물의 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 V_L 영역으로 구성되고; 항체가 DKK1에 특이적으로 결합하고; 항체가 DKK1 수용체에 대한 DKK1 단백질의 결합을 억제하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 골용해를 방지 또는 완화하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 골용해성 병변을 방지 또는 완화하는 성질 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 암을 방지 또는 완화하는 성질 중 1가지 이상의 기능성 성질을 항체가 나타내는, 단리된 모노클로날 항체, 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다.

- [0180] 다양한 실시양태에서, 항체는 상기 논의된 기능성 성질들 중 1가지 이상, 2가지 이상, 또는 3가지 이상을 나타낼 수 있다. 이같은 항체는, 예를 들어, 인간 항체, 인간화 항체 또는 키메라 항체일 수 있다.
- [0181] 본원에서 사용된 용어 "보존성 서열 변형"은 아미노산 서열을 함유하는 항체의 결합 특성에 현저하게 영향을 미치지거나 이를 변경시키지 않는 아미노산 변형을 지칭하도록 의도된다. 이같은 보존성 변형은 아미노산 치환, 부가 및 결실을 포함한다. 변형은 당업계에 공지된 표준 기술, 예컨대 부위-지정 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발에 의해 본 발명의 항체 내로 도입될 수 있다.
- [0182] 보존성 아미노산 치환은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기들의 패밀리에는 당업계에 정의되어 있다. 이러한 패밀리에는 염기성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 전하를 띠지 않는 극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 타이로신, 시스테인, 트립토판), 비극성 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌), 베타-분지형 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄를 갖는 아미노산 (예를 들어, 타이로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)이 포함된다. 따라서, 본 발명의 항체의 CDR 영역 내의 1개 이상의 아미노산 잔기가 동일한 측쇄 패밀리로부터의 다른 아미노산 잔기로 대체될 수 있고, 변경된 항체를 유지된 기능에 대해 본원에 기술된 기능성 분석을 사용하여 테스트할 수 있다.
- [0183] 본 발명의 중화성 항-DKK1/4 조성물과 동일한 에피토프에 결합하는 항체
- [0184] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 제공된 다양한 본 발명의 중화성 항-DKK1/4 조성물과 동일한 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다. 이같은 추가적인 항체는 표준 DKK1 결합 분석법에서 본 발명의 다른 항체와 교차-경쟁하는 능력 (예를 들어, 통계적으로 유의한 방식으로 본 발명의 다른 항체의 결합을 경쟁적으로 억제하는 능력)을 기초로 확인될 수 있다. 인간 DKK1에 대한 본 발명의 항체의 결합을 억제하는 테스트 항체의 능력은 테스트 항체가 인간 DKK1에의 결합에 대해 이러한 항체와 경쟁할 수 있다는 것을 증명한다; 이같은 항체는, 비-제한적인 가설에 따르면, 자신이 경쟁하는 항체와 동일하거나 관련된 (예를 들어, 구조적으로 유사하거나 공간적으로 인접한), 인간 DKK1 상의 에피토프에 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체와 동일한 인간 DKK1 상의 에피토프에 결합하는 항체는 인간 모노클로날 항체이다. 이같은 인간 모노클로날 항체는 실시예에 기술된 바와 같이 제조 및 단리될 수 있다.
- [0185] 낙타류 및 기타 중쇄 항체
- [0186] 신세계 구성원 예컨대 라마 종 (라마 파코스(*Lama paccos*), 라마 글라마(*Lama glama*) 및 라마 비쿠그나(*Lama vicugna*))이 포함되는 낙타 및 단봉 낙타 (카멜루스 박트리아누스(*Camelus bactrianus*) 및 칼레루스 드로마데리우스(*Calculus dromaderius*)) 과의 구성원으로부터 수득된 항체 단백질이 크기, 구조적 복잡성 및 인간 대상에 대한 항원성과 관련하여 특성화되었다. 천연에서 발견된 이러한 과의 동물로부터의 특정 IgG 항체에는 경쇄가 없고, 따라서 다른 동물들로부터의 항체에 대한, 2개의 중쇄 및 2개의 경쇄가 있는 전형적인 4쇄 4성분 구조와 구조적으로 상이하다. PCT/EP93/02214 (WO 94/04678 (1994년 3월 3일 공개)) 참조.
- [0187] V_H로 확인된 소형 단일 가변 도메인인 낙타류 항체를 유전자 조작에 의해 수득하여, 표적에 대한 친화력이 높은 소형 단백질을 산출할 수 있고, "낙타류 나노바디"로 공지된 저분자량 항체-유래 단백질이 초래된다. 미국 특허 번호 5,759,808 (1998년 6월 2일 허여) 참조; 또한 [Stijlemans, B. et al., 2004 J Biol Chem 279: 1256-1261]; [Dumoulin, M. et al., 2003 Nature 424: 783-788]; [Pleschberger, M. et al. 2003 Bioconjugate Chem 14: 440-448]; [Cortez-Retamozo, V. et al. 2002 Int J Cancer 89: 456-62]; 및 [Lauwereys, M. et al. 1998 EMBO J 17: 3512-3520]를 또한 참조. 낙타류 항체 및 항체 단편의 조작된 라이브러리가, 예를 들어, Ablynx (Ghent, Belgium)으로부터 시판된다. 비-인간 기원의 다른 항체와 같이, 낙타류 항체의 아미노산 서열이 인간 서열과 더욱 근접하게 유사한 서열을 수득하기 위해 재조합에 의해 변경될 수 있고, 즉, 나노바디가 "인간화"될 수 있다. 따라서, 인간에 대한 낙타류 항체의 천연적인 낮은 항원성이 추가로 감소될 수 있다.
- [0188] 낙타류 나노바디의 분자량은 인간 IgG 분자의 약 1/10이고, 단백질의 물리적인 직경은 수 나노미터에 불과하다. 작은 크기의 한 결과는 더 큰 항체 단백질에는 기능적으로 보이지 않는 항원성 부위에 결합하는 낙타류 나노바디의 능력이고, 즉, 낙타류 나노바디는 전통적인 면역학적 기술을 사용하여 다른 방식으로는 애매한 항원을 검출하는 시약으로서, 그리고 가능한 치료제로서 유용하다. 따라서, 작은 크기의 또다른 결과는 표적 단백질의 가늘게 패인 또는 좁은 틈 내의 특정 부위에 결합한 결과로서 낙타류 나노바디가 표적 단백질을 억제할 수 있고, 따라서 전통적인 항체보다 전통적인 저분자량 약물의 기능과 더욱 근접하게 유사한 능력으로 작용할 수

있다.

[0189] 저분자량 및 조밀한(compact) 크기로 낙타류 나노바디가 더욱 열안정적이고, 극단적인 pH 및 단백질분해성 소화에 안정적이며, 불량하게 항원성 있게 된다. 또다른 결과는 낙타류 나노바디가 순환계로부터 조직 내로 쉽게 이동하고, 심지어 혈-뇌 장벽을 가로질러, 신경 조직에 영향을 미치는 장애를 치료할 수 있다는 것이다. 나노바디는 혈-뇌 장벽을 가로지르는 약물 수송을 또한 추가로 용이하게 할 수 있다. 미국 특허 출원 20040161738 (2004년 8월 19일 공개) 참조. 인간에 대한 낮은 항원성과 조합된 이러한 특색들은 커다란 치료적 잠재력을 가리킨다. 또한, 이러한 분자들은 원핵생물 세포 예컨대 대장균에서 충분히 발현될 수 있고, 박테리오파지와 의 융합 단백질로 발현되며, 기능성이다.

[0190] 따라서, 본 발명의 한 양상은 DKK1에 대한 친화력이 높은 낙타류 항체 또는 나노바디이다. 본원의 특정 실시양태에서, 낙타류 항체 또는 나노바디는 낙타류 동물에서 천연적으로 생산되고, 즉, 기타 항체에 대해 본원에 기술된 기술을 사용하여 DKK1 또는 이의 펩티드 단편으로의 면역화 후에 낙타류로부터 생산된다. 별법적으로, 중화성 항-DKK1/4 낙타류 나노바디가 조작되고, 즉, 본원의 실시예에 기술된 바와 같이 표적으로서의 DKK1 및/또는 DKK4로의 패닝(panning) 절차를 사용하여 적합하게 돌연변이유발된 낙타류 나노바디 단백질들을 디스플레이 하는 파지의 라이브러리로부터 예를 들어 선별함으로써 생산된다. 조작된 나노바디들은 수용 대상에서의 반감기가 45분 내지 2주이도록 유전자 조작에 의해 추가로 주문제작될 수 있다.

[0191] 낙타류 항체에 더하여, 중쇄 항체가 상어 및 복어의 특정 종이 예를 들어 포함되지만 이에 한정되지 않는 다른 동물에서 천연적으로 발생한다 (예를 들어, PCT 공개 공보 WO 03/014161 참조). 이같은 중쇄 항체로부터 유래된 가변 도메인이 본 발명에서 사용될 수 있지만, 낙타류-유래 중쇄 항체 및/또는 이의 가변 도메인 서열의 사용이 최적화, 인간화, 인간-조작 등을 위해 및/또는 인간에서의 임상 사용을 위해 선호된다.

[0192] 조작 및 변형된 항체

[0193] 본원에서 제시된 V_H 및/또는 V_L 서열 중 1가지 이상을 갖는 항체를 변형된 항체를 조작하기 위한 출발 재료로 사용하여 본 발명의 항체를 추가로 제조할 수 있고, 이러한 변형된 항체는 출발 항체로부터 변경된 성질을 가질 수 있다. 가변 영역들 중 하나 또는 양쪽 모두 (즉, V_H 및/또는 V_L) 내, 예를 들어 1개 이상의 CDR 영역 내 및/또는 1개 이상의 프레임워크 영역 내의 1개 이상의 잔기를 변형시킴으로써 항체를 조작할 수 있다. 추가적으로 또는 별법적으로, 예를 들어 항체의 이펙터 기능(들)을 변경시키기 위해, 불변 영역(들) 내의 잔기를 변형시킴으로써 항체를 조작할 수 있다.

[0194] 수행될 수 있는 한가지 유형의 가변 영역 조작은 CDR 그래프팅이다. 항체는 주로 6개의 중쇄 및 경쇄 상보성 결정 영역 (CDR) 내에 위치한 아미노산 잔기를 통해 표적 항원과 상호작용한다. 이러한 이유로, CDR 내의 아미노산 서열은 CDR 외부의 서열보다 개별적인 항체들 간에 다양하다. CDR 서열이 대부분의 항체-항원 상호작용을 담당하기 때문에, 상이한 성질을 갖는 상이한 항체로부터의 프레임워크 서열 상에 그래프팅된 특정 천연 발생 항체로부터의 CDR 서열을 포함하는 발현 벡터를 구축함으로써 특정 천연 발생 항체의 성질을 모방하는 재조합 항체를 발현시킬 수 있다 (예를 들어, [Riechmann, L. et al., 1998 Nature 332:323-327]; [Jones, P. et al., 1986 Nature 321:522-525]; [Queen, C. et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033]; 미국 특허 번호 5,225,539 (Winter), 및 미국 특허 번호 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 (Queen 등) 참조).

[0195] 따라서, 본 발명의 또다른 실시양태는 각각 서열 2-5, 8-11, 20, 49-56으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 CDR1 서열; 서열 2-20 및 57-64로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 CDR2 서열; 서열 2-20 및 65-72로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 CDR3 서열을 포함하는 V_H 영역; 및 각각 서열 21-39 및 73-80으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 CDR1 서열; 서열 21-39 및 81-88로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 CDR2 서열; 및 서열 21-39 및 89-96으로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열의 CDR3 서열을 포함하는 V_L 영역을 포함하는, 단리된 모노클로날 항체, 또는 이의 항원 결합 부분에 관한 것이다. 따라서, 이같은 항체는 모노클로날 항체의 V_H 및 V_L CDR 서열을 함유하지만, 이러한 항체들로부터의 상이한 프레임워크 서열을 함유할 수 있다.

[0196] 이같은 프레임워크 서열은 생식계열 항체 유전자 서열을 포함하는 공개된 참고문헌 또는 공공 DNA 데이터베이스로부터 수득할 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 V_L 영역 유전자에 대한 생식계열 DNA 서열을 "VBase" 인간 생식계열 서열 데이터베이스 (www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase에서 인터넷 상에서 입수가 가능), 뿐만 아니라

[Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242]; [Tomlinson, I. M., et al., 1992 J. fol. Biol. 227:776-798]; 및 [Cox, J. P. L. et al., 1994 Eur. J Immunol. 24:827-836]에서 발견할 수 있고, 이들 각각의 내용은 거명에 의해 본원에 명백하게 포함된다.

[0197] 본 발명의 항체에서 사용하기 위한 프레임워크 서열의 예는 선별된 본 발명의 항체에 의해 사용된 프레임워크 서열과 구조적으로 유사한 것들, 예를 들어, 본 발명의 모노클로날 항체에 의해 사용된 컨센서스 서열 및/또는 프레임워크 서열이다. V_H CDR1, 2 및 3 서열, 및 V_L CDR1, 2 및 3 서열이 프레임워크 서열이 유래된 생식계열 면역글로불린 유전자에서 발견된 것과 동일한 서열을 갖는 프레임워크 영역 상에 그래프트될 수 있거나, 또는 CDR 서열이 생식계열 서열과 비교하여 1개 이상의 돌연변이를 함유하는 프레임워크 영역 상에 그래프트될 수 있다. 예를 들어, 특정 예에서, 항체의 항원 결합 능력을 유지시키거나 증강시키기 위해 프레임워크 영역 내의 잔기를 돌연변이시키는 것이 이롭다는 것이 발견되었다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 및 6,180,370 (Queen 등) 참조).

[0198] 또다른 유형의 가변 영역 변형은 "친화력 돌연변이"로 공지된, V_H 및/또는 V_L CDR1, CDR2 및/또는 CDR3 영역 내의 아미노산 잔기를 돌연변이시켜 이에 의해 당해 항체의 1가지 이상의 결합 성질 (예를 들어, 친화력)을 개선시키는 것이다. 부위-지정 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발을 수행하여 돌연변이(들)을 도입할 수 있고, 항체 결합 또는 또다른 흥미로운 기능성 성질에 대한 효과를 본원에 기술되고 실시예에서 제공된 시험관 내 또는 생체내 분석법에서 평가할 수 있다. 보존성 변형 (상기 논의된 바와 같음)이 도입될 수 있다. 돌연변이는 아미노산 치환, 부가 또는 결실일 수 있다. 또한, 전형적으로 CDR 영역 내의 최대 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 잔기가 변경된다.

[0199] 따라서, 또다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 2-5, 8-11, 20, 49-56 또는 서열 2-5, 8-11, 20, 49-56과 비교하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가가 있는 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 V_H CDR1 영역; 서열 2-20 및 57-64, 또는 서열 2-20 및 57-64와 비교하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가가 있는 아미노산 서열의 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 V_H CDR2 영역; 서열 2-20 및 65-72, 또는 서열 2-20 및 65-72와 비교하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가가 있는 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 V_H CDR3 영역을 갖는 V_H 영역; 서열 21-39 및 73-80, 또는 서열 21-39 및 73-80과 비교하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가가 있는 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 V_L CDR1 영역; 서열 21-39 및 81-88, 또는 서열 21-39 및 81-88과 비교하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가가 있는 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 V_L CDR2 영역; 및 서열 21-39 및 89-96, 또는 서열 21-39 및 89-96과 비교하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 치환, 결실 또는 부가가 있는 아미노산 서열로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 V_L CDR3 영역으로 구성된, 단리된 중화성 항-DKK1/4 조성물, 또는 이의 항원 결합 부분을 제공한다.

[0200] 본 발명의 조작된 항체는 예를 들어 항체 성질을 개선시키기 위해 V_H 및/또는 V_L 내의 프레임워크 잔기에 변형이 이루어진 것들을 포함한다. 전형적으로, 이같은 프레임워크 변형은 항체의 면역원성을 감소시키기 위해 이루어진다. 예를 들어, 한가지 접근법은 1개 이상의 프레임워크 잔기를 상응하는 생식계열 서열로 "역행 돌연변이"시키는 것이다. 더욱 구체적으로, 체세포 돌연변이가 진행된 항체는 항체가 유래된 생식계열 서열과 상이한 프레임워크 잔기를 함유할 수 있다. 이같은 잔기는 항체 프레임워크 서열을 항체가 유래된 생식계열 서열과 비교함으로써 확인할 수 있다. 프레임워크 영역 서열을 이의 생식계열 구성으로 되돌리기 위해, 예를 들어, 부위-지정 돌연변이유발 또는 PCR-매개 돌연변이유발에 의해, 체세포 돌연변이를 생식계열 서열로 "역행 돌연변이"시킬 수 있다. 이같은 "역행 돌연변이"된 항체 또한 본 발명에 포함되도록 의도된다.

[0201] 또다른 유형의 프레임워크 변형은 T 세포-에피토프를 제거함으로써 항체의 잠재적인 면역원성을 감소시키기 위해 프레임워크 영역 내, 또는 심지어 1개 이상의 CDR 영역 내의 1개 이상의 잔기를 돌연변이시키는 것을 수반한다. 이러한 접근법은 "면역제거(deimmunization)"로 또한 지칭되고, 미국 특허 공보 번호 20030153043 (Carr 등)에 추가로 상세하게 기술되어 있다.

[0202] 프레임워크 또는 CDR 영역 내에 이루어진 변형에 더하여 또는 이에 대해 별법적으로, 전형적으로 항체의 1가지 이상의 기능성 성질, 예컨대 혈청 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합, 및/또는 항원-의존성 세포형 세포독성을

변경시키기 위해, 본 발명의 항체는 Fc 영역 내의 변형을 포함하도록 조작될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는, 또다시 항체의 1가지 이상의 기능적 성질을 변경시키기 위해, 화학적으로 변형될 수 있거나 (예를 들어, 1개 이상의 화학적 모이어티가 항체가 부착될 수 있음), 또는 이의 글리코실화가 변경되도록 변형될 수 있다. 각각의 이러한 실시양태들이 하기에 추가로 상세하게 기술된다. Fc 영역 내의 잔기의 번호매김은 캐벗의 EU 인덱스의 번호매김이다.

- [0203] 한 실시양태에서, 힌지 영역 내의 시스테인 잔기의 수가 변경되도록, 예를 들어, 증가되거나 감소되도록 CH1의 힌지 영역이 변형된다. 이러한 접근법은 미국 특허 번호 5,677,425 (Bodmer 등)에 추가로 기술되어 있다. CH1의 힌지 영역 내의 시스테인 잔기의 수는, 예를 들어, 경쇄 및 중쇄의 어셈블리를 용이하게 하기 위해 또는 항체의 안정성을 증가시키거나 감소시키기 위해 변경된다.
- [0204] 또다른 실시양태에서, 항체의 생물학적 반감기를 감소시키기 위해 항체의 Fc 힌지 영역이 돌연변이된다. 더욱 구체적으로, 천연 Fc-힌지 도메인 스태필로코실(Staphylococyl) 단백질 A (SpA) 결합에 비교하여 손상된 SpA 결합을 갖도록 Fc-힌지 단편의 1개 이상의 아미노산 돌연변이가 CH2-CH3 도메인 계면 영역 내로 도입된다. 이러한 접근법은 미국 특허 번호 6,165,745 (Ward 등)에 추가로 상세하게 기술되어 있다.
- [0205] 또다른 실시양태에서, 생물학적 반감기가 증가되도록 항체가 변형된다. 다양한 접근법들이 가능하다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,277,375 (Ward)에 기술된 바와 같이, T252L, T254S, T256F 중 1개 이상의 돌연변이가 도입될 수 있다. 별법적으로, 생물학적 반감기를 증가시키기 위해, 미국 특허 번호 5,869,046 및 6,121,022 (Presta 등)에 기술된 바와 같이, IgG의 Fc 영역의 CH2 도메인의 2개의 루프로부터 취해진 샬비지(salvage) 수용체 결합 에피토프를 함유하도록 항체가 CH1 또는 CL 영역 내에서 변경될 수 있다.
- [0206] 또다른 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 잔기를 상이한 아미노산 잔기로 대체함으로써 Fc 영역이 변경되어, 항체의 이펙터 기능이 변경된다. 예를 들어, 항체가 이펙터 리간드에 대한 친화력은 변경되지만 어버이 항체의 항원-결합 능력은 유지하도록 1개 이상의 아미노산이 상이한 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 이펙터 리간드에 대한 친화력이 변경되는 이펙터 리간드는, 예를 들어, Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분일 수 있다. 이러한 접근법은 미국 특허 번호 5,624,821 및 5,648,260 (모두 Winter 등)에 추가로 상세하게 기술되어 있다.
- [0207] 또다른 실시양태에서, 항체의 C1q 결합이 변경되고/되거나 보체 의존성 세포독성 (CDC)이 감소 또는 폐지되도록 아미노산 잔기들로부터 선별된 1개 이상의 아미노산이 상이한 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 이러한 접근법은 미국 특허 번호 6,194,551 (Idusogie 등)에 추가로 상세하게 기술되어 있다.
- [0208] 또다른 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 잔기가 변경되어 이에 의해 보체를 고정하는 항체의 능력이 변경된다. 이러한 접근법은 PCT 공보 WO 94/29351 (Bodmer 등)에 추가로 상세하게 기술되어 있다.
- [0209] 또다른 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산을 변형시킴으로써 항체 의존성 세포형 세포독성 (ADCC)를 매개하는 항체의 능력을 증가시키고/시키거나 Fc γ 수용체에 대한 항체의 친화력을 증가시키기 위해 Fc 영역이 변형된다. 이러한 접근법은 PCT 공보 WO 00/42072 (Presta)에 추가로 기술되어 있다. 또한, Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII 및 FcRn에 대한 인간 IgG1 상의 결합 부위가 지도로 작성되었고, 결합이 개선된 변이체가 기술되어 있다 ([Shields, R.L. et al., 2001 J. Biol. Chem. 276:6591-6604] 참조).
- [0210] 또다른 실시양태에서, 항체의 글리코실화가 변형된다. 예를 들어, 탈글리코실화 항체가 제조될 수 있다 (즉, 항체에 글리코실화가 없다). 글리코실화는, 예를 들어, "항원"에 대한 항체의 친화력을 증가시키기 위해 변경될 수 있다. 이같은 탄수화물 변형은, 예를 들어, 항체 서열 내의 1개 이상의 글리코실화 부위를 변형시킴으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 1개 이상의 가변 영역 프레임워크 글리코실화 부위의 제거가 초래되는 1개 이상의 아미노산 치환이 이루어져, 이에 의해 이러한 부위에서의 글리코실화가 제거될 수 있다. 이같은 탈글리코실화는 항원에 대한 항체의 친화력을 증가시킬 수 있다. 이같은 접근법은 미국 특허 번호 5,714,350 및 6,350,861 (Co 등)에 추가로 상세하게 기술되어 있다.
- [0211] 추가적으로 또는 별법적으로, 글리코실화 유형이 변경된 항체, 예컨대 푸코실 잔기의 수가 감소된 저-푸코실화 (hypofucosylated) 항체 또는 양분성(bisecting) GlcNAc 구조가 증가된 항체가 제조될 수 있다. 이같은 변경된 글리코실화 패턴은 항체의 ADCC 능력을 증가시키는 것으로 증명되었다. 이같은 탄수화물 변형은, 예를 들어, 변경된 글리코실화 장치가 있는 숙주 세포에서 항체를 발현시킴으로써 달성될 수 있다. 변경된 글리코실화 장치가 있는 세포는 당업계에 기술되어 있고, 본 발명의 재조합 항체를 발현시켜 이에 의해 글리코실화가 변경된 항체를 생산하기 위한 숙주 세포로 사용될 수 있다. 예를 들어, 푸코실 트랜스페라제를 코딩하는 FUT8 유전자가 기능적으로 파괴되어, 이같은 세포주에서 발현된 항체가 저-푸코실화를 나타내는 세포주가 EP 1,176,195

(Hang 등)에 기술되어 있다. PCT 공보 WO 03/035835 (Presta)에는 푸코스를 Asn(297)-연결 탄수화물에 부착시키는 능력이 감소되어, 또한 이러한 숙주 세포에서 발현된 항체의 저-푸코실화가 초래되는 변이체 CHO 세포주인 Lec13 세포가 기술되어 있다 ([Shields, R.L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740]를 또한 참조). PCT 공보 WO 99/54342 (Umana 등)에는 당단백질-변형 글리코실 트랜스페라제 (예를 들어, 베타(1,4)-N 아세틸글루코사미닐트랜스페라제 III (GnTIII))를 발현하도록 조작되어, 이러한 조작된 세포주에서 발현된 항체가 항체의 증가된 ADCC 활성이 초래되는 증가된 양분성 GlcNAc 구조를 나타내는 세포주가 기술되어 있다 ([Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180]를 또한 참조).

[0212] 본 발명에 의해 구현되는 본원에서의 항체의 또다른 변형은 PEG화이다. 예를 들어, 항체의 생물학적 (예를 들어, 혈청) 반감기를 증가시키기 위해, 항체가 PEG화될 수 있다. 항체를 PEG화시키기 위해, 전형적으로 항체 또는 이의 단편 단편을 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 예컨대 PEG의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체와 1개 이상의 PEG기가 항체 또는 항체 단편에 부착되는 조건 하에 반응시킨다. PEG화는 반응성 PEG 분자 (또는 유사한 반응성 수용성 중합체)와의 아실화 반응 또는 알킬화 반응에 의해 수행될 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "폴리에틸렌 글리콜"은 다른 단백질을 유도체화시키기 위해 사용된 임의 형태의 PEG, 예컨대 모노 (C1-C10) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드를 포함하도록 의도된다. 특정 실시양태에서, PEG화되는 항체는 탈글리코실화 항체이다. 단백질을 PEG화시키는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 본 발명의 항체에 적용될 수 있다. 예를 들어, EP 0 154 316 (Nishimura 등) 및 EP 0 401 384 (Ishikawa 등) 참조.

[0213] 비-면역글로불린 스캐폴드

[0214] 생성된 폴리펩티드가 표적 단백질에 대해 특이적인 1개 이상의 결합 영역을 포함하는 한 광범위한 항체/면역글로불린 프레임워크 또는 스캐폴드가 사용될 수 있다. 이같은 프레임워크 또는 스캐폴드는 5개의 주요 이디오타입(idiotype)의 인간 면역글로불린, 또는 이의 단편 (예컨대 본원의 다른 곳에 개시된 것들)을 포함하고, 다른 동물 종의 면역글로불린 (바람직하게는 인간화된 양상을 가짐)을 포함한다. 단일 중쇄 항체 예컨대 낙타류 및/또는 상어에서 확인된 것들이 이와 관련하여 특히 흥미롭다. 신규 프레임워크, 스캐폴드 및 단편이 당업자에 의해 계속 발견 및 개발되고 있다.

[0215] 한 양상에서, 본 발명은 본 발명의 CDR이 그래프트될 수 있는 비-면역글로불린 스캐폴드를 사용하여 비-면역글로불린을 기초로 하는 항체를 생성시키는 것에 관한 것이다. 공지된 또는 미래의 비-면역글로불린 프레임워크 및 스캐폴드가, 서열 1 또는 서열 122의 표적 단백질에 특이적인 결합 영역을 포함하는 한, 사용될 수 있다. 이같은 화합물들은 본원에서 "표적-특이적 결합 영역을 포함하는 폴리펩티드"로 공지된다. 공지된 비-면역글로불린 프레임워크 또는 스캐폴드에는 애드넥틴(Adnectin) (피브로넥틴) (Compound Therapeutics, Inc. (Waltham, MA)), 안키린(ankyrin) (Molecular Partners AG (Zurich, Switzerland)), 도메인 항체 (Domantis, Ltd (Cambridge, MA) 및 Ablynx nv (Zwijnaarde, Belgium)), 리포칼린(lipocalin) (안티칼린(Anticalin)) (Pieris Proteolab AG (Freising, Germany)), 소형 모듈 면역-제약 (Trubion Pharmaceuticals Inc. (Seattle, WA)), 맥시바디(maxybody) (Avidia, Inc. (Mountain View, CA)), 단백질 A (Affibody AG (Sweden)) 및 어필린(affilin) (감마-크리스탈린 또는 유비퀴틴) (Scil Proteins GmbH (Halle, Germany))가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.

[0216] (i) 애드넥틴 - Compound Therapeutics

[0217] 애드넥틴 스캐폴드는 피브로넥틴 유형 III 도메인 (예를 들어, 피브로넥틴 유형 III의 10번째 모듈 (10 Fn3 도메인))을 기초로 한다. 피브로넥틴 유형 III 도메인은 단백질의 코어(core)를 형성하도록 서로에 대해 패킹된 2개의 베타 시트 사이에 분포된 7개 또는 8개의 베타 가닥이 있고, 추가로 베타 가닥들을 서로 연결하고 용매-노출된 루프 (CDR과 유사)를 추가로 함유한다. 베타 시트 샌드위치의 각각의 가장자리에 3개 이상의 이같은 루프가 있고, 이때 가장자리는 베타 가닥의 방향에 직각인 단백질의 경계이다. (미국 6,818,418).

[0218] 전체적인 폴드(fold)는 낙타 및 라마 IgG 내의 전체 항원 인식 단위를 포함하는, 중쇄의 가변 영역인 가장 작은 기능성 항체 단편의 것과 밀접하게 관련되지만, 이러한 피브로넥틴을 기초로 하는 스캐폴드는 면역글로불린이 아니다. 이러한 구조로 인해, 비-면역글로불린 항체는 항체의 것과 본성 및 친화력이 유사한 항원 결합 성질을 모방한다. 이러한 스캐폴드는 생체 내에서의 항체의 친화력 돌연변이의 프로세스와 유사한 시험관 내에서의 루프 무작위화 및 셔플링(shuffling) 전략에서 사용될 수 있다. 이러한 피브로넥틴을 기초로 하는 분자는 표준 클로닝 기술을 사용하여 분자의 루프 영역이 본 발명의 CDR로 대체될 수 있는 스캐폴드로 사용될 수 있다.

[0219] (ii) 안키린 - Molecular Partners

[0220] 이 기술은 안키린에서 유래된 반복 모듈이 있는 단백질을 상이한 표적들에 대한 결합에 사용될 수 있는 가변 영역을 지니기 위해 스캐폴드로 사용하는 것을 기초로 한다. 안키린 반복 모듈은 2개의 역평행 α -나선 및 β -회전으로 구성된 아미노산 33개의 폴리펩티드이다. 가변 영역의 결합은 리보솜 디스플레이를 사용함으로써 대부분 최적화된다.

[0221] (iii) 맥시바디/아비머(Abimer) -Avidia

[0222] 아비머는 천연 A-도메인 함유 단백질 예컨대 LRP-1로부터 유래된다. 이러한 도메인은 본래 단백질-단백질 상호작용에 대해 사용되고, 인간에서, 250개를 초과하는 단백질이 A-도메인을 구조적으로 기초로 한다. 아비머는 아미노산 링커를 통해 연결된 다수의 상이한 "A-도메인" 단량체들 (2-10개)로 구성된다. 20040175756; 20050053973; 20050048512; 및 20060008844에 예를 들어 기술된 방법을 사용하여 표적 항원에 결합할 수 있는 아비머가 생성될 수 있다.

[0223] (vi) 단백질 A - Affibody

[0224] 어피바디(Affibody)® 친화력 리간드는 단백질 A의 IgG-결합 도메인들 중 하나의 스캐폴드를 기초로 하는 나선 3개의 다발로 구성된 작고 간단한 단백질이다. 단백질 A는 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 박테리아로부터의 표면 단백질이다. 이러한 스캐폴드 도메인은 58개의 아미노산으로 구성되고, 이중 13개가 무작위화되어 다수의 리간드 변이체가 있는 어피바디® 라이브러리가 생성된다 (예를 들어, 미국 5,831,012 참조). 어피바디® 분자는 항체를 모방하고, 150 kDa인 항체의 분자량과 비교하여 이의 분자량은 6 kDa이다. 작은 크기에도 불구하고, 어피바디® 분자의 결합 부위는 항체의 것과 유사하다.

[0225] (v) 안티칼린 - Pieris

[0226] 안티칼린®은 Pieris ProteoLab AG 회사에 의해 개발된 제품이다. 이는 화학적으로 민감하거나 불용성인 화합물의 생리화학적 수송 또는 보관에 일반적으로 수반되는 작고 강건한(robust) 단백질의 광범위한 군인 리포칼린으로부터 유래된다. 여러 천연 리포칼린이 인간 조직 또는 체액에서 발생한다.

[0227] 단백질 구조는 추가변성 루프가 경직성 프레임워크의 상부에 있으면서, 면역글로불린을 연상시킨다. 그러나, 항체 또는 이의 재조합 단편과 대조적으로, 리포칼린은 아미노산 잔기 160개 내지 180개의 단일 폴리펩티드 사슬로 구성되어, 단일 면역글로불린 도메인보다 약간 더 크다.

[0228] 결합 주머니를 이루는, 루프 4개의 셋트는 두드러진 구조적 유연성을 나타내고, 다양한 측쇄를 허용한다. 따라서, 상이한 형상의 규정된 표적 분자들을 높은 친화력 및 특이성으로 인식하기 위하여 독점적인 프로세스에서 결합 부위가 재형될 수 있다.

[0229] 리포칼린 패밀리의 한 단백질인, Pieris Brassicae의 빌린(bilin)-결합 단백질 (BBP)이 루프 4개의 셋트를 돌연 변이유발시킴으로써 안티칼린을 개발하는데 사용되었다. "안티칼린"이 기술된 특허 출원의 한 예는 PCT WO 199916873이다.

[0230] (vi) 애플린 -Scil Proteins

[0231] 애플린™ 분자는 단백질 및 소형 분자에 대한 특이적 친화력을 위해 디자인된 소형 비-면역글로불린 단백질이다. 신규 애플린™ 분자가 상이한 인간-유래 스캐폴드 단백질을 각각 기초로 하는 2개의 라이브러리로부터 매우 신속하게 선별될 수 있다.

[0232] 애플린™ 분자는 면역글로불린 단백질에 대해 어떠한 구조적 상동성도 나타내지 않는다. Scil Proteins는 하나는 인간의 구조적 눈 렌즈 단백질인 감마 크리스탈린이고 다른 하나는 "유비퀴틴" 수퍼패밀리 단백질인 2개의 애플린™ 스캐폴드를 사용한다. 양쪽 모두의 인간 스캐폴드는 매우 작고, 높은 온도 안정성을 나타내며, pH 변화 및 변성제에 대해 거의 저항성이다. 이러한 높은 안정성은 주로 단백질의 확장된 베타 시트 구조로 인한 것이다. 감마 크리스탈린 유래 단백질의 예가 W0200104144에 기술되어 있고, "유비퀴틴-유사" 단백질의 예가 W02004106368에 기술되어 있다.

[0233] 항체의 조작 방법

[0234] 상기 논의된 바와 같이, 본원에서 제시된 V_H 및 V_L 서열 또는 전장 중쇄 및 경쇄 서열을 갖는 항-DKK1 항체를 전장 중쇄 및/또는 경쇄 서열, V_H 및/또는 V_L 서열, 또는 이에 부착된 불변 영역(들)을 변형시킴으로써 새로운 항-

DKK1/4 항체를 생성시키는데 사용할 수 있다. 따라서, 본 발명의 또다른 양상에서, 본 발명의 항-DKK1 항체의 구조적 특색을 사용하여, 본 발명의 항체의 1가지 이상의 기능성 성질, 예컨대 인간 DKK1 또는 DKK4 또는 양쪽 모두에 결합하는 것 및 또한 DKK1 또는 DKK4 또는 양쪽 모두를 억제하는 것이 유지된 구조적으로 관련된 항-DKK1/4 항체가 생성된다.

[0235] 예를 들어, 상기 논의된 바와 같이, 본 발명의 항체의 1개 이상의 CDR 영역, 또는 이의 돌연변이가 재조합에 의해 공지된 프레임워크 영역 및/또는 또다른 CDR에 조합되어 추가적인, 재조합적으로 조작된 본 발명의 항-DKK1 항체가 생성될 수 있다. 또다른 유형의 변형에는 이전의 섹션에서 기술된 것들이 포함된다. 조작 방법에 대한 출발 재료는 본원에서 제공된 V_H 및/또는 V_L 서열들 중 1개 이상, 또는 1개 이상의 이의 CDR 영역이다. 조작된 항체를 생성시키기 위해, 본원에서 제공된 V_H 및/또는 V_L 서열들 중 1개 이상, 또는 1개 이상의 이의 CDR 영역을 갖는 항체를 실제로 제조할 필요는 없다 (즉, 단백질을 발현시킬 필요는 없다). 그보다는, 서열(들) 내에 함유된 정보가 원래의 서열(들)로부터 유래된 "제2세대" 서열(들)을 생성시키기 위한 출발 재료로 사용된 후, "제2세대" 서열(들)이 제조되어 단백질로 발현된다.

[0236] 따라서, 또다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 2-5, 8-11, 20, 49-56으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR1 서열, 서열 2-20 및 57-64로 구성된 군으로부터 선택된 CDR2 서열 및/또는 서열 2-20 및 65-72로 구성된 군으로부터 선택된 CDR3 서열을 갖는 V_H 영역 항체 서열, 및 서열 21-39 및 73-80으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR1 서열, 서열 21-39 및 81-88로 구성된 군으로부터 선택된 CDR2 서열 및/또는 서열 21-39 및 89-96으로 구성된 군으로부터 선택된 CDR3 서열을 갖는 V_L 영역 항체 서열로 구성된 항-DKK1 항체를 제조하고; V_H 영역 항체 서열 및/또는 V_L 영역 항체 서열 내의 1개 이상의 아미노산 잔기를 변경시켜 1가지 이상의 변경된 항체 서열을 생성시키고; 변경된 항체 서열을 단백질로 발현시키는 방법을 제공한다.

[0237] 따라서, 또다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 115-117의 군으로부터 선택된 서열을 갖는 전장 중쇄 항체 서열 및 서열 111-114의 군으로부터 선택된 서열을 갖는 전장 경쇄 항체 서열로 구성된 항-DKK1 항체를 제조하고: 전장 중쇄 항체 서열 및/또는 전장 경쇄 항체 서열 내의 1개 이상의 아미노산 잔기를 변경시켜 1가지 이상의 변경된 항체 서열을 생성시키고; 변경된 항체 서열을 단백질로 발현시키는 방법을 제공한다.

[0238] 또다른 실시양태에서, 본 발명은 서열 119의 군으로부터 선택된 서열을 갖는 V_H 영역 항체 서열 및 서열 118의 군으로부터 선택된 서열을 갖는 V_L 영역 항체 서열로 구성된, 포유류 발현에 최적화된 중화성 항-DKK1/4 조성물을 제조하고; V_H 영역 항체 서열 및/또는 V_L 영역 항체 서열 내의 1개 이상의 아미노산 잔기를 변경시켜 1가지 이상의 변경된 항체 서열을 생성시키고; 변경된 항체 서열을 단백질로 발현시키는 방법을 제공한다.

[0239] 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 변경된 항체 서열을 제조하고 발현시킬 수 있다. 변경된 항체 서열(들)에 의해 코딩되는 항체는 본원에 기술된 중화성 항-DKK1/4 조성물의 기능성 성질들 중 1가지, 일부 또는 전체를 유지하는 것이고, 상기 기능성 성질에는 인간 DKK1에 특이적으로 결합하는 것이 포함되지만 이에 한정되지 않고; 항체는 DKK1 수용체에 대한 DKK1 단백질의 결합을 억제하는 성질, 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 골용해를 방지 또는 완화하는 성질, 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제함으로써 골용해성 병변을 방지 또는 완화하는 성질, 또는 항체가 DKK1 수용체 결합을 억제하여 암을 방지 또는 완화하는 성질 중 1가지 이상의 기능성 성질을 나타낸다.

[0240] 변경된 항체는 상기 논의된 기능성 성질들 중 1가지 이상, 2가지 이상 또는 3가지 이상을 나타낼 수 있다.

[0241] 변경된 항체의 기능성 성질을 당업계에서 입수가능하고/하거나 본원에 기술된 표준 분석법, 예컨대 실시예에 기재된 것들 (예를 들어, ELISA)을 사용하여 평가할 수 있다.

[0242] 본 발명의 항체를 조작하는 방법의 특정 실시양태에서, 돌연변이가 항-DKK1 항체 코딩 서열의 전체 또는 일부를 따라서 무작위로 또는 선택적으로 도입될 수 있고, 생성된 변형된 항-DKK1 항체를 결합 활성 및/또는 본원에 기술된 바와 같은 기타 기능성 성질에 대해 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, PCT 공보 WO 02/092780 (Short)에는 포화 돌연변이유발, 합성 결합 어셈블리, 또는 이의 조합을 사용하여 항체 돌연변이를 생성시키고 스크리닝하는 방법이 기술되어 있다. 별법적으로, PCT 공보 WO 03/074679 (Lazar 등)에는 컴퓨터 스크리닝 방법을 사용하여 항체의 생리화학적 성질을 최적화하는 방법이 기술되어 있다.

[0243] 항체의 Fc 불변 영역은 혈청 반감기 및 이펙터 기능, 즉, 항체 의존성 세포 세포독성 (ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성 (CDC) 활성을 결정하는데 결정적이다. Fc 단편의 특정 돌연변이체를 조작하여, 이펙터 기능 및/또는

혈청 반감기를 변경시킬 수 있다 (예를 들어, Xencor의 기술 참조; 또한, 예를 들어, W02004029207 참조).

- [0244] 항체의 이펙터 기능 및 혈청 반감기를 변경시키는 한 방법은 항체 단편의 가변 영역을 적합한 이펙터 기능이 있는 Fc 단편과 그래프트시키는 것이다. IgG1 또는 IgG4 이소타입이 세포 사멸 활성을 위해 선택될 수 있는 한편, IgG2 이소타입은 침묵 또는 중화성 항체 (세포 사멸 활성이 없음)를 위해 사용될 수 있다.
- [0245] 항체의 가변 영역과 혈청 단백질 예컨대 HSA 또는 이같은 혈청 단백질에 결합하는 단백질의 키메라 융합물을 제조함으로써 혈청 반감기가 긴 침묵 항체를 획득할 수 있다.
- [0246] 항체의 글리코실화 패턴을 조정함으로써 이펙터 기능이 또한 변경될 수 있다. Glycart (예를 들어, US6,602,684), Biowa (예를 들어, US6,946,292) 및 Genentech (예를 들어, W003/035835)는 포유류 세포주를 조작하여 이펙터 기능이 증가되었거나 감소된 항체를 생산하였다. 특히, 푸코실화되지 않은 항체는 ADCC 활성이 증가되었을 것이다. Glycofi 또한 특정 당형태의 항체를 생산할 수 있는 효모 세포주를 개발하였다.
- [0247] 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자
- [0248] 본 발명의 또다른 양상은 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 분자에 관한 것이다. 전장 경쇄 어버이 뉴클레오타이드 서열의 예가 서열 97-100에 제시된다. 전장 중쇄 어버이 뉴클레오타이드 서열의 예가 서열 101-103에 제시된다. 세포에서의 발현에 대해 최적화된 전장 경쇄 뉴클레오타이드 서열의 예가 서열 104-107에서 제시된다. 세포에서의 발현에 대해 최적화된 전장 중쇄 뉴클레오타이드 서열의 예가 서열 108-110에서 제시된다.
- [0249] 핵산은 전체 세포 내에 또는 세포 용해물 내에 존재할 수 있거나, 또는 부분적으로 정제되었거나 실질적으로 정제된 형태의 핵산일 수 있다. 핵산은 알칼리성/SDS 처리, CsCl 밴딩(banding), 컬럼 크로마토그래피, 아가로스 젤 전기영동 및 당업계에 주지된 기타 기술이 포함되는 표준 기술에 의해 다른 세포 성분 또는 다른 오염물, 예를 들어, 다른 세포 핵산 또는 단백질로부터 정제된 경우 "단리"되거나 "실질적으로 순수한 것으로 간주"된다. [F. Ausubel, et al., ed. 1987 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York] 참조. 본 발명의 핵산은, 예를 들어, DNA 또는 RNA일 수 있고, 인트론 서열을 함유하거나 함유하지 않을 수 있다. 한 실시양태에서, 핵산은 cDNA 분자이다. 핵산은 벡터 예컨대 파지 디스플레이 이 벡터 내에, 또는 재조합 플라스미드 벡터 내에 존재할 수 있다.
- [0250] 본 발명의 핵산을 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 획득할 수 있다. 하이브리도마 (예를 들어, 하기에 추가로 기술되는 인간 면역글로불린 유전자를 보유하는 트랜스제닉 마우스로부터 제조된 하이브리도마)에 의해 발현되는 항체에 대해, 하이브리도마에 의해 제조된 항체의 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 cDNA를 표준 PCR 증폭 또는 cDNA 클로닝 기술에 의해 획득할 수 있다. 면역글로불린 유전자 라이브러리로부터 획득된 항체에 대해 (예를 들어, 파지 디스플레이 기술을 사용), 항체를 코딩하는 핵산을 라이브러리의 구성원인 다양한 파지 클론으로부터 회수할 수 있다.
- [0251] 일단 V_H 및 V_L 절편을 코딩하는 DNA 단편이 획득되면, 예를 들어 가변 영역 유전자를 전장 항체 사슬 유전자, Fab 단편 유전자 또는 scFv 유전자로 전환시키기 위해, 이러한 DNA 단편들을 표준 재조합 DNA 기술에 의해 추가로 조작할 수 있다. 이러한 조작에서, V_L - 또는 V_H -코딩 DNA 단편이 또다른 DNA 분자, 또는 또다른 단백질, 예컨대 항체 불변 영역 또는 가요성 링커를 코딩하는 단편에 작동가능하게 연결된다. 이러한 문맥에서 사용된 용어 "작동가능하게 연결"은 2개의 DNA 단편이 기능성 방식으로, 예를 들어, 2개의 DNA 단편에 의해 코딩되는 아미노산 서열이 인-프레임(in-frame)으로 유지되도록, 또는 단백질이 원하는 프로모터의 제어 하에 발현되도록 연결되는 것을 의미하도록 의도된다.
- [0252] V_H -코딩 DNA를 중쇄 불변 영역 (CH1, CH2 및 CH3)을 코딩하는 또다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결시킴으로써 V_H 영역을 코딩하는 단리된 DNA가 전장 중쇄 유전자로 전환될 수 있다. 인간 중쇄 불변 영역 유전자의 서열은 당업계에 공지되어 있고 (예를 들어, [Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참조), 이러한 영역을 포함하는 DNA 단편을 표준 PCR 증폭에 의해 획득할 수 있다. 중쇄 불변 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM 또는 IgD 불변 영역일 수 있다. Fab 단편 중쇄 유전자에 대해, V_H -코딩 DNA가 중쇄 CH1 불변 영역만을 코딩하는 또다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결될 수 있다.
- [0253] V_L -코딩 DNA를 경쇄 불변 영역, CL을 코딩하는 또다른 DNA 분자에 작동가능하게 연결시킴으로써 V_L 영역을 코딩하는 단리된 DNA가 전장 경쇄 유전자 (뿐만 아니라 Fab 경쇄 유전자)로 전환될 수 있다. 인간 경쇄 불변 영역

유전자의 서열은 당업계에 공지되어 있고 (예를 들어, [Kabat, E. A., et al., 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242] 참조), 이러한 영역을 포함하는 DNA 단편을 표준 PCR 증폭에 의해 획득할 수 있다. 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 불변 영역일 수 있다.

[0254] scFv 유전자를 생성시키기 위해, V_L 및 V_H 영역이 가요성 링커에 의해 연결되면서 V_H 및 V_L 서열이 인접성 단일쇄 단백질로서 발현될 수 있도록, V_H - 및 V_L -코딩 DNA 단편이 가요성 링커를 코딩하는, 예를 들어, 아미노산 서열 (Gly₄-Ser)₃을 코딩하는 또다른 단편에 작동가능하게 연결된다 (예를 들어, [Bird et al., 1988 Science 242:423-426]; [Huston et al., 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883]; [McCafferty et al., 1990 Nature 348:552-554] 참조).

[0255] 본 발명의 모노클로날 항체의 생산

[0256] 통상적인 모노클로날 항체 방법, 예를 들어, [Kohler and Milstein, 1975 Nature 256:495]의 표준 체세포 혼성화 기술이 포함되는 다양한 기술에 의해 모노클로날 항체 (mAb)가 생산될 수 있다. 모노클로날 항체를 생산하기 위한 다수의 기술은, 예를 들어, B 림프구의 바이러스성 또는 발암성 형질전환을 사용할 수 있다.

[0257] 하이브리도마를 제조하기 위한 동물 시스템은 뮤린 시스템이다. 마우스에서의 하이브리도마 생산은 잘 확립된 절차이다. 융합을 위한 면역화된 비장세포의 단리를 위한 면역화 프로토콜 및 기술은 당업계에 공지되어 있다. 융합 파트너 (예를 들어, 뮤린 골수종 세포) 및 융합 절차 또한 공지되어 있다.

[0258] 본 발명의 키메라 또는 인간화 항체는 상기 기술된 바와 같이 제조된 뮤린 모노클로날 항체를 기초로 제조될 수 있다. 중쇄 및 경쇄 면역글로불린을 코딩하는 DNA를 당해 뮤린 하이브리도마로부터 획득하여, 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 비-뮤린 (예를 들어, 인간) 면역글로불린 서열을 함유하도록 조작할 수 있다. 예를 들어, 키메라 항체를 생성시키기 위해, 당업계에 공지된 방법을 사용하여 뮤린 가변 영역을 인간 불변 영역에 연결시킬 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 (Cabilly 등) 참조). 인간화된 항체를 생성시키기 위해, 뮤린 CDR 영역을 당업계에 공지된 방법을 사용하여 인간 프레임워크 내로 삽입할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5225539 (Winter), 및 미국 특허 번호 5530101; 5585089; 5693762 및 6180370 (Queen 등) 참조.

[0259] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 인간 모노클로날 항체이다. DKK1에 대해 지시된 이같은 인간 모노클로날 항체는 마우스 시스템보다는 인간 면역계의 일부를 보유하는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모소믹 (transchromosomal) 마우스를 사용하여 생성될 수 있다. 이러한 트랜스제닉 및 트랜스크로모소믹 마우스는 각각 HuMAb 마우스 및 KM 마우스로 본원에서 지칭되는 마우스를 포함하고, "인간 Ig 마우스"로 본원에서 총괄적으로 지칭된다.

[0260] HuMAb 마우스® (Medarex, Inc.)는 내인성 μ 및 K 사슬 유전자좌를 불활성화시키는 표적화된 돌연변이와 함께, 재정렬되지 않은 인간 중쇄 (μ 및 γ) 및 κ 경쇄 면역글로불린 서열을 코딩하는 인간 면역글로불린 유전자 미니유전자좌(minilocus)를 함유한다 (예를 들어, [Lonberg, et al., 1994 Nature 368(6474): 856-859] 참조). 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는 K의 감소된 발현을 나타내고, 면역화에 응답하여, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스진에 클래스 전환 및 체세포 돌연변이가 진행되어 고친화력 인간 IgG κ 모노클로날이 생성된다 ([Lonberg, N. et al., 1994 상기 문헌]; [Lonberg, N., 1994 Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101]; [Lonberg, N. and Huszar, D., 1995 Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93], 및 [Harding, F. and Lonberg, N., 1995 Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546]에서 재검토됨). HuMAb 마우스의 제조 및 사용, 및 이같은 마우스가 보유하는 계능 변형이 [Taylor, L. et al., 1992 Nucleic Acids Research 20:6287-6295]; [Chen, J. et al., 1993 International Immunology 5:647-656]; [Tuailon et al., 1993 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:3720-3724]; [Choi et al., 1993 Nature Genetics 4: 117-123]; [Chen, J. et al., 1993 EMBO J. 12: 821-830]; [Tuailon et al., 1994 J. Immunol. 152:2912-2920]; [Taylor, L. et al., 1994 International Immunology 579-591]; 및 [Fishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14: 845-851]에 추가로 기술되어 있고, 이들 모두의 내용은 전체적으로 거명에 의해 본원에 명백하게 포함된다. 또한, 미국 특허 번호 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; 및 5,770,429 (모두 Lonberg & Kay); 미국 특허 번호 5,545,807 (Surani 등); PCT 공보 번호 WO 92103918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 및 WO 99/45962 (모두 Lonberg & Kay); 및 PCT 공보 번호 WO 01/14424 (Korman 등) 참조.

[0261] 또다른 실시양태에서, 트랜스진 또는 트랜스크로모솜 상에 인간 면역글로불린 서열을 보유하는 마우스 예컨대

인간 중쇄 트랜스진 및 인간 경쇄 트랜스크로모솜을 보유하는 마우스를 사용하여 본 발명의 인간 항체가 상승될 수 있다. 본원에서 "KM 마우스"로 지칭되는 이같은 마우스는 PCT 공보 WO 02/43478 (Ishida 등)에 상세하게 기술되어 있다.

[0262] 또한, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 별법적인 트랜스제닉 동물 시스템이 당업계에서 이용가능하고, 본 발명의 항-DKK1 항체를 상승시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 제노마우스(Xenomouse) (Abgenix, Inc.)로 지칭되는 시스템이 사용될 수 있다. 이같은 마우스는, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 및 6,162,963 (Kucherlapati 등)에 기술되어 있다.

[0263] 또한, 인간 면역글로불린 유전자를 발현하는 별법적인 트랜스크로모솜 동물 시스템이 당업계에서 이용가능하고, 본 발명의 항-DKK1 항체를 상승시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, "TC 마우스"로 지칭되는, 인간 중쇄 트랜스크로모솜 및 인간 경쇄 트랜스크로모솜 모두를 보유하는 마우스를 사용할 수 있다; 이같은 마우스는 [Tomizuka et al., 2000 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727]에 기술되어 있다. 또한, 인간 중쇄 및 경쇄 트랜스크로모솜을 보유하는 소가 당업계에 기술되어 있고 ([Kuroiwa et al., 2002 Nature Biotechnology 20:889-894]), 본 발명의 항-DKK1 항체를 상승시키는데 사용될 수 있다.

[0264] 인간 면역글로불린 유전자의 라이브러리를 스크리닝하기 위한 파지 디스플레이 방법을 사용하여 본 발명의 인간 모노클로날 항체를 또한 제조할 수 있다. 인간 항체를 단리하기 위한 이같은 파지 디스플레이 방법은 당업계에 확립되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,223,409, 5,403,484 및 5,571,698 (Ladner 등); 미국 특허 번호 5,427,908 및 5,580,717 (Dower 등); 미국 특허 번호 5,969,108 및 6,172,197 (McCafferty 등); 및 미국 특허 번호 5,885,793, 6,521,404, 6,544,731, 6,555,313, 6,582,915 및 6,593,081 (Griffiths 등) 참조.

[0265] 면역화 시 인간 항체 응답이 생성될 수 있도록 인간 면역 세포가 내부로 재구성된 SCID 마우스를 사용하여 본 발명의 인간 모노클로날 항체를 또한 제조할 수 있다. 이같은 마우스는, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,476,996 및 5,698,767 (Wilson 등)에 기술되어 있다.

[0266] 인간 항체 라이브러리 스크린을 사용하여 본 발명의 항체를 확인할 수 있다. 스크리닝 기술의 선택에는, 예를 들어 파지 디스플레이 (Morphosys), 라이브러리의 유형 (예를 들어, HuCal 라이브러리 (Morphosys)), 친화력 포화 기술 및 추가적인 코돈 최적화 서열이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.

[0267] DKK1에 대한 인간 모노클로날 항체의 생성

[0268] 대장균, 배콜로바이러스 또는 HEK-EBNA 세포로부터 유래된 정제된 재조합 인간 DKK1, 또는 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH: keyhole limpet hemocyanin)에 접합된 정제된 재조합 인간 DKK1가 항원으로 사용된다.

[0269] DKK1에 대한 완전히 인간형인 모노클로날 항체가 HuMab 트랜스제닉 마우스의 HCo7, HCo12 및 HCo17 균주 및 트랜스제닉 트랜스크로모솜 마우스의 KM 균주를 사용하여 제조되고, 이들 각각은 인간 항체 유전자를 발현한다. 각각의 이러한 마우스 균주에서, 내인성 마우스 카파 경쇄 유전자가 [Chen et al., 1993 EMBO J. 12:811-820]에 기술된 바와 같이 동종접합에 의해 파괴될 수 있고, 내인성 마우스 중쇄 유전자가 PCT 공보 WO 01109187의 실시예 1에 기술된 바와 같이 동종접합에 의해 파괴될 수 있다. 각각의 이러한 마우스 균주는 [Fishwild et al., 1996 Nature Biotechnology 14:845-851]에 기술된 바와 같이 인간 카파 경쇄 트랜스진, KCo5를 보유한다. HCo7 균주는 미국 특허 번호 5,545,806; 5,625,825; 및 5,545,807에 기술된 바와 같이 HCo7 인간 중쇄 트랜스진을 보유한다. HCo12 균주는 PCT 공보 WO 01/09187의 실시예 2에 기술된 바와 같이 HCo12 인간 중쇄 트랜스진을 보유한다. HCo17 균주는 HCo17 인간 중쇄 트랜스진을 보유한다. KNM 균주는 PCT 공보 WO 02/43478에 기술된 바와 같이 SC20 트랜스크로모솜을 함유한다.

[0270] DKK1에 대한 완전히 인간형인 모노클로날 항체를 생성시키기 위해, HuMab 마우스 및 KM 마우스를 항원으로서의 대장균으로부터 유래된 정제된 재조합 DKK1 또는 DKK1-KLH 접합체로 면역화시킨다. HuMab 마우스에 대한 일반적인 면역화 계획이 [Lonberg, N. et al., 1994 Nature 368(6474):856-859]; [Fishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14:845-851] 및 PCT 공보 WO 98/24884에 기술되어 있다. 마우스는 항원의 1차 주입 시 6-16주령이다. DKK1 항원의 정제된 재조합 제제 (5-50 μ g) (예를 들어, DKK1을 발현하는 형질감염된 대장균 세포로부터 정제됨)를 사용하여 HuMab 마우스 및 KM 마우스를 복강내 주사, 피하 (Sc) 주사 또는 발바닥 주사에 의해 면역화시킨다.

[0271] 트랜스제닉 마우스를 정맥내 주사 (IP), 피하 주사 (Sc) 또는 발바닥 (FP)에 의해 완전 프로인트(Freund) 보강제 또는 리비(Ribi) 보강제 내의 항원으로 2회 면역화시킨 후, 불완전 프로인트 또는 리비 보강제 내의 항원으로 3-21일 IP, Sc 또는 FP 면역화시킨다 (총 11회 이하의 면역화). 면역 응답을 안와후방 출혈에 의해 모니터

링한다. 혈장을 ELISA에 의해 스크리닝하고, 항-DKK1 인간 면역글로불린의 역가가 충분한 마우스를 융합에 사용한다. 마우스를 희생시켜 지라를 제거하기 3일 및 2일 전에 항원을 정맥내 추가접종(boosting)한다. 전형적으로, 각각의 항원에 대해 10-35회의 융합이 수행된다. 수십 마리의 마우스가 각각의 항원에 대해 면역화된다. HCo7, HCo12, HCo17 및 KM 마우스 군주의 총 82마리의 마우스가 DKK1으로 면역화된다.

[0272] DKK1에 결합하는 항체를 생산하는 HuMab 또는 KM 마우스를 선별하기 위해, 면역화된 동물로부터의 혈청을 [Fishwild, D. et al., 1996]에 기술된 바와 같이 ELISA에 의해 테스트할 수 있다. 간략하게, 미량역가 플레이트를 PBS 중 1-2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 대장균으로부터의 정제된 재조합 DKK1으로 50 μl /웰로 코팅하고, 4°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션한 후, 200 μl /웰의 PBS/트윈(Tween) 내의 5% 닭 혈청 (0.05%)으로 차단한다. DKK1으로 면역화된 마우스로부터의 혈장의 희석물을 각각의 웰에 첨가하고, 1-2 시간 동안 주위 온도에서 인큐베이션한다. 플레이트를 PBS/트윈으로 세정한 후, 양고추냉이 과산화효소 (HRP)에 접합된 염소-항-인간 IgG Fc 폴리클로날 항체와 함께 1시간 동안 실온에서 인큐베이션한다. 세정 후, 플레이트를 ABTS 기질 (Sigma, A-1888, 0.22 mg/ml)로 현상하고, 분광광도계로 OD 415-495에서 분석한다. 가장 높은 역가의 항-DKK1 항체가 현상된 마우스를 융합에 사용한다. 융합이 수행되고, 하이브리도마 상청액을 항-DKK1 활성에 대해 ELISA에 의해 테스트한다.

[0273] HuMab 마우스 및 KM 마우스로부터 단리된 마우스 비장세포를 표준 프로토콜을 기초로 PEG와 함께 마우스 골수종 세포주에 융합시킨다. 그후 생성된 하이브리도마를 항원-특이적 항체의 생산에 대해 스크리닝한다. 면역화된 마우스로부터의 지라 림프구의 단일 세포 현탁액이 50% PEG (Sigma)와 함께 SP2/0 비-분비성 마우스 골수종 세포 (ATCC, CRL 1581)의 수의 1/4에 융합된다. 세포를 약 1×10^5 개/웰로 편평바닥 미량역가 플레이트에 플레이트링한 후, 약 2주 동안 10% 소 태아 혈청, 10% P388D 1 (ATCC, CRL TIB-63) 컨디셔닝 배지, DMEM (Mediatech, CRL 10013, 고(高) 글루코스, L-글루타민 및 피루브산나트륨이 있음) 내의 3-5% 오리젠(Origen) (IGEN) + 5 mM HEPES, 0.055 mM 2-메르캅토에탄올, 50 mg/ml 젠타마이신 및 $1 \times$ HAT (Sigma, CRL P-7185)를 함유하는 선별 배지에서 인큐베이션한다. 1-2주 후, 세포를 HAT가 HT로 교체된 배지에서 배양한다. 그후, 개별적인 웰들을 ELISA에 의해 인간 항-DKK1 모노클로날 IgG 항체에 대해 스크리닝한다. 일단 광범위한 하이브리도마 성장이 발생하면, 일반적으로 10-14일 후에 배지를 모니터링한다. 항체를 분비하는 하이브리도마를 다시 플레이트링하고, 다시 스크리닝하고, 인간 IgG에 대해 여전히 양성이면, 항-DKK1 모노클로날 항체를 한계 희석에 의해 2회 이상 서브클로닝한다. 그후, 안정적인 서브클론을 시험관 내에서 배양하여, 추가적인 특성화를 위한 조직 배양 배지 내의 소량의 항체를 생성시킨다.

[0274] 인간 Ig 마우스의 면역화

[0275] 인간 Ig 마우스가 본 발명의 인간 항체를 상승시키기 위해 사용되는 경우, [Lonberg, N. et al., 1994 Nature 368(6474):856-859]; [Fishwild, D. et al., 1996 Nature Biotechnology 14:845-851]; 및 PCT 공보 WO 98124884 및 WO 01/14424에 기술된 바와 같이, 이같은 마우스가 DKK1 항원 및/또는 재조합 DKK1, 또는 DKK1 융합 단백질의 정제된 또는 강화된 제제로 면역화될 수 있다. 마우스는 1차 주입 시 6-16주령일 수 있다. 예를 들어, DKK1 항원의 정제된 또는 재조합 제제 (5-50 μg)가 인간 Ig 마우스를 복강내 주사에 의해 면역화시키는 데 사용될 수 있다.

[0276] DKK1에 대한 완전히 인간형인 모노클로날 항체를 생성시키기 위한 상세한 절차는 상기 기술되어 있다. 다양한 항원으로서의 누적 실험은 먼저 완전 프로인트 보강제 내의 항원으로 복강내 (IP) 면역화된 후, 격주로 불완전 프로인트 보강제 내의 항원으로 IP 면역화 (총 6회 이하)되었을 때, 트랜스제닉 마우스가 응답한다는 것을 나타냈다. 그러나, 프로인트 이외의 보강제 또한 효과적인 것으로 발견된다. 또한, 보강제의 부재 하의 전체 세포가 고도로 면역원성인 것으로 발견된다. 혈장 샘플을 안와후방 출혈에 의해 수득하면서 면역 응답을 면역화 프로토콜의 과정에 걸쳐 모니터링할 수 있다. 혈장을 ELISA에 의해 스크리닝할 수 있고, 항-DKK1 인간 면역글로불린의 역가가 충분한 마우스가 융합에 사용될 수 있다. 마우스를 희생시켜 지라를 제거하기 3일 전에 항원을 정맥내 추가접종할 수 있다. 각각의 면역화에 대해 2-3회 융합이 수행될 필요가 있을 수 있는 것으로 예상된다. 6 내지 24마리의 마우스가 전형적으로 각각의 항원에 대해 면역화된다. 일반적으로, HCo7 및 HCo12 군주 모두 사용된다. 또한, HCo7 및 HCo12 트랜스진 양쪽 모두가 2개의 상이한 인간 중쇄 트랜스진 (HCo7/HCo12)을 갖는 단일 마우스 내로 함께 브리딩(breeding)될 수 있다.

[0277] 인간 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마의 생성

[0278] 본 발명의 인간 모노클로날 항체를 생산하는 하이브리도마를 생성시키기 위해, 면역화된 마우스로부터의 비장세포 및/또는 림프절 세포를 단리하여, 적합한 무한증식 세포주, 예컨대 마우스 골수종 세포주에 융합시킬 수 있다. 생성된 하이브리도마를 항원-특이적 항체의 생산에 대해 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, 면역화된 마우스

스로부터의 지라 림프구의 단일 세포 현탁액 50% PEG와 함께 P3X63-Ag8.653 비-분비성 마우스 골수종 세포(ATCC, CRL 1580)의 수의 1/6에 융합된다. 세포를 약 2×145 로 편평바닥 미량역가 플레이트에 플레이트팅한 후, 약 2주 동안 20% 소 태아 혈청, 18% "653" 컨디셔닝 배지, 5% 오리젠 (IGEN), 4 mM L-글루타민, 1 mM 피루브산나트륨, 5 mM HEPES, 0.055 mM 2-메르캅토에탄올, 50 유닛/ml 페니실린, 50 mg/ml 스트렙토마이신, 50 mg/ml 젠타마이신 및 $1 \times$ HAT (Sigma; HAT은 융합 24시간 후에 첨가된다)를 함유하는 선별 배지에서 인큐베이션한다. 약 2주 후, 세포를 HAT가 HT로 교체된 배지에서 배양할 수 있다. 그후, 개별적인 웰들을 ELISA에 의해 인간 모노클로날 IgM 및 IgG 항체에 대해 스크리닝할 수 있다. 일단 광범위한 하이브리도마 성장이 발생하면, 일반적으로 10-14일 후에 배지를 관찰할 수 있다. 항체를 분비하는 하이브리도마를 다시 플레이트팅하고, 다시 스크리닝하고, 인간 IgG에 대해 여전히 양성이면, 모노클로날 항체를 한계 희석에 의해 2회 이상 서브클로닝할 수 있다. 그후, 안정적인 서브클론을 시험관 내에서 배양하여, 특성화를 위한 조직 배양 배지 내의 소량의 항체를 생성시킬 수 있다

[0279] 인간 모노클로날 항체를 정제하기 위해, 선별된 하이브리도마를 모노클로날 항체 정제를 위한 2ℓ 스피너 플라스크에서 성장시킬 수 있다. 상청액을 여과 및 농축한 후, 단백질 A-세파로스 (Pharmacia, Piscataway, N. J.)로의 친화성 크로마토그래피에 적용할 수 있다. 용출된 IgG를 젤 전기영동 및 고성능 액체 크로마토그래피에 의해 점검하여, 순도를 확실하게 할 수 있다. 완충제 용액을 PBS 내로 교환할 수 있고, 농축을 1.43의 흡광계수를 사용하여 OD₂₈₀에 의해 결정할 수 있다. 모노클로날 항체를 분취하여 -80℃에서 보관할 수 있다.

[0280] 모노클로날 항체를 생산하는 이입세포의 생성

[0281] 당업계에 주지된 바와 같이 재조합 DNA 기술 및 유전자 형질전환 방법의 조합을 예를 들어 사용하여 숙주 세포 이입세포에서 본 발명의 항체를 또한 생산할 수 있다 (예를 들어, [Morrison, S. (1985) Science 229:1202]).

[0282] 예를 들어, 항체, 또는 이의 항체 단편을 발현시키기 위해, 부분적인 또는 전장 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 DNA를 표준 분자 생물학 (예를 들어, 당해 항체를 발현하는 하이브리도마를 이용하는 cDNA 클로닝 또는 PCR 증폭)에 의해 수득할 수 있고, 이러한 DNA를 유전자가 전사 및 번역 제어 서열에 작동가능하게 연결되도록 발현 벡터 내로 삽입할 수 있다. 이러한 문맥에서, 용어 "작동가능하게 연결된"은 벡터 내의 전사 및 번역 제어 서열이 항체 유전자의 전사 및 번역을 조절하는 이의 의도된 기능을 수행하도록 항체 유전자가 벡터 내로 결합되는 것을 의미하도록 의도된다. 발현 벡터 및 발현 제어 서열은 사용된 발현 숙주 세포와 혼화성하도록 선택된다. 항체 경쇄 유전자 및 항체 중쇄 유전자가 별도의 벡터 내로 삽입될 수 있거나, 또는, 더욱 전형적으로는, 양쪽 유전자가 동일한 발현 벡터 내로 삽입된다. 표준 방법 (예를 들어, 항체 유전자 단편 및 벡터 상의 상보성 제한 부위의 절찰, 또는 제한 부위가 존재하지 않는 경우 평활(blunt) 말단 절찰)에 의해 항체 유전자가 발현 벡터 내로 삽입된다. 본원에 기술된 항체의 경쇄 및 V_H 영역이 이들을 원하는 이소타입의 중쇄 불변 및 경쇄 불변 영역을 이미 코딩하는 발현 벡터 내로 V_H 절편이 벡터 내의 CH 절편(들)에 작동가능하게 연결되고 V_L 절편이 벡터 내의 CL 절편에 작동가능하게 연결되도록 삽입함으로써 임의의 항체 이소타입의 전장 항체 유전자를 생성시키는데 사용될 수 있다. 추가적으로 또는 별법적으로, 재조합 발현 벡터는 숙주 세포로부터의 항체 사슬의 분비를 용이하게 하는 신호 펩티드를 코딩할 수 있다. 신호 펩티드가 항체 사슬 유전자의 아미노 말단에 인-프레임으로 연결되도록 항체 사슬 유전자가 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 신호 펩티드는 면역글로불린 신호 펩티드 또는 이중성 신호 펩티드 (즉, 비-면역글로불린 단백질로부터의 신호 펩티드)일 수 있다.

[0283] 항체 사슬 유전자에 더하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서의 항체 사슬 유전자의 발현을 제어하는 조절 서열을 보유한다. 용어 "조절 서열"은 항체 사슬 유전자의 전사 또는 번역을 제어하는, 프로모터, 인핸서(enhancer) 및 기타 발현 제어 요소 (예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 포함하도록 의도된다. 이같은 조절 서열이, 예를 들어, [Goeddel, Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA 1990]에 기술되어 있다. 당업자는 조절 서열의 선택을 포함하는 발현 벡터의 디자인이 형질전환될 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 인자에 좌우될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 포유류 숙주 세포 발현을 위한 조절 서열에는 포유류 세포에서 높은 수준의 단백질 발현을 지시하는 바이러스 요소, 예컨대 사이토메갈로바이러스 (CMV), 원숭이 바이러스 40 (SV40), 아데노바이러스 (예를 들어, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터 (AdMLP)), 및 폴리오마로부터 유래된 프로모터 및/또는 인핸서가 포함된다. 별법적으로, 비-바이러스성 조절 서열, 예컨대 유비퀴틴 프로모터 또는 P-글로빈 프로모터가 사용될 수 있다. 추가로, 조절 서열은 상이한 종으로부터의 서열, 예컨대 SV40 초기 프로모터로부터의 서열 및 인간 T 세포 백혈병 바이러스 유형 1의 장말단 반복을 함유하는 SRa 프로모터 시스템 ([Takebe, Y. et al., 1988 Mol. Cell. Biol. 8:466-472])으로 구성된다.

- [0284] 항체 사슬 유전자 및 조절 서열에 더하여, 본 발명의 재조합 발현 벡터는 추가적인 서열, 예컨대 숙주 세포에서 벡터의 복제를 조절하는 서열 (예를 들어, 복제 기원) 및 선별성 마커 유전자를 보유할 수 있다. 선별성 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포의 선별을 용이하게 한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,399,216, 4,634,665 및 5,179,017 (모두 Axel 등) 참조). 예를 들어, 전형적으로, 선별성 마커 유전자는 벡터가 도입된 숙주 세포 상에 약물, 예컨대 G418, 히그로마이신 또는 메토포렉세이트에 대한 저항성을 부여한다. 선별성 마커 유전자에는 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 유전자 (메토포렉세이트 선별/증폭으로 dhfr- 숙주 세포에서 사용하기 위한 것) 및 neo 유전자 (G418 선별용)가 포함된다.
- [0285] 경쇄 및 중쇄의 발현을 위해, 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 발현 벡터(들)를 표준 기술에 의해 숙주 세포 내로 형질 감염시킨다. 다양한 형태의 용어 "형질감염"은 외인성 DNA를 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포 내로 도입하는 데 통상적으로 사용되는 광범위한 기술, 예를 들어, 전기천공, 인산칼슘 침전, DEAE-텍스트란 형질감염 등을 포함하도록 의도된다. 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에서 본 발명의 항체를 발현시키는 것이 이론적으로 가능하다. 진핵생물 세포, 특히 포유류 숙주 세포에서의 항체의 발현이 논의되는데, 원핵생물 세포보다 이같은 진핵생물 세포, 특히 포유류 세포에서 정확하게 폴딩되고 항원에 결합하는 항체가 더 잘 어셈블리 및 분비될 것 같기 때문이다. 항체 유전자의 원핵생물 발현은 활성 항체의 고수율 생산에 효과적이지 않은 것으로 보고되었다 ([Boss, M. A. and Wood, C. R., 1985 Immunology Today 6:12-13]).
- [0286] 본 발명의 재조합 항체를 발현시키기 위한 포유류 숙주 세포에는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO 세포) (예를 들어, [R.J. Kaufman and P.A. Sharp, 1982 Mol. Biol. 159:601-621]에 기술된 바와 같이, DHFR 선별성 마커와 함께 사용되는 [Urlaub and Chasin, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220]에 기술된 dhfr- CHO 세포 포함), NSO 골수종 세포, COS 세포 및 SP2 세포가 포함된다. 특히, NSO 골수종 세포와 함께 사용하기 위해, 또 다른 발현 시스템은 WO 87/04462, WO 89/01036 및 EP 338,841에 제시된 GS 유전자 발현 시스템이다. 항체 유전자를 코딩하는 재조합 발현 벡터가 포유류 숙주 세포 내로 도입되는 경우, 숙주 세포 내에서의 항체의 발현 또는 숙주 세포가 성장된 배양 배지 내로의 항체의 분비를 허용하는데 충분한 시간 동안 숙주 세포를 배양함으로써 항체가 생산된다. 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 배양 배지로부터 항체를 회수할 수 있다.
- [0287] 제약 조성물
- [0288] 또다른 양상에서, 본 발명은 제약상 허용가능한 담체와 함께 제제화된, 본 발명의 중화성 항-DKK1/4 조성물, 또는 이의 항원 결합 부분(들) 중 1가지 또는 이의 조합물을 함유하는 조성물, 예를 들어, 제약 조성물을 제공한다. 이같은 조성물은 본 발명의 항체, 또는 면역접합체 또는 이중특이적 분자 중 1가지 이상 또는 이의 조합물 (예를 들어, 2가지 이상의 상이한 본 발명의 항체, 또는 면역접합체 또는 이중특이적 분자의 조합물)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 제약 조성물은 표적 항원 상의 상이한 에피토프들에 결합하거나 상보적인 활성을 갖는 항체 (또는 면역접합체 또는 이중특이적 분자)의 조합물을 포함할 수 있다.
- [0289] 본 발명의 제약 조성물은 조합 치료법에서 또한 투여될 수 있고, 즉 다른 작용제와 조합될 수 있다.
- [0290] 예를 들어, 조합 치료법은 1가지 이상의 다른 항-염증 또는 항-골다공증 작용제와 조합된 본 발명의 항-DKK1 항체를 포함할 수 있다. 조합 치료법에서 사용될 수 있는 치료제의 예는 본 발명의 항체의 사용에 대한 섹션에서 하기에 더욱 상세하게 기술된다.
- [0291] 본원에서 사용된 "제약상 허용가능한 담체"에는 생리학적으로 혼화성인 임의의 모든 용매, 분산 매질, 코팅물, 항박테리아 및 항진균 작용제, 등장물 및 흡수 지연제 등이 포함된다. 담체는 정맥내, 근육내, 피하, 비경구, 척수 또는 표피 투여 (예를 들어, 주사 또는 주입에 의한 투여)에 적절하여야 한다. 투여 경로에 따라, 활성 화합물 즉, 항체, 면역접합체 또는 이중특이적 분자는 화합물을 불활성화시킬 수 있는 산 및 기타 천연 조건의 작용으로부터 화합물을 보호하기 위한 재료로 코팅될 수 있다.
- [0292] 본 발명의 제약 화합물에는 1가지 이상의 제약상 허용가능한 염이 포함될 수 있다. "제약상 허용가능한 염"은 어머니 화합물의 생물학적 활성을 유지하고 어떠한 원치 않는 독물학적 효과도 부여하지 않는 염을 지칭한다 (예를 들어, [Berge, S.M., et al., 1977 J. Pharm. Sci. 66:1-19] 참조). 이같은 염의 예로는 산 부가염 및 염기 부가염이 포함된다. 산 부가염에는 비-독성 무기 산, 예컨대 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 인 등, 뿐만 아니라 비-독성 유기 산 예컨대 지방족 모노- 및 디-카르복실산, 페닐-치환 알칸산, 히드록시 알칸산, 방향족 산, 지방족 및 방향족 술폰산 등으로부터 유래된 것들이 포함된다. 염기 부가염에는 알칼리토금속, 예컨대 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등, 뿐만 아니라 비-독성 유기 아민, 예컨대 N,N'-디벤질 에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 에틸렌디아민, 프로카인 등으로부터 유래

된 것들이 포함된다.

- [0293] 본 발명의 제약 조성물은 제약상 허용가능한 항산화제를 포함할 수 있다. 제약상 허용가능한 항산화제의 예로는 수용성 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 히드로클로라이드, 중아황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등; 유용성 항산화제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 금속 킬레이트제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등이 포함된다.
- [0294] 본 발명의 제약 조성물에서 사용될 수 있는 적절한 수성 및 비-수성 담체의 예로는 물, 에탄올, 폴리에틸렌 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적절한 혼합물, 식물성 오일, 예컨대 올리브오일, 및 주사용 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트가 포함된다. 예를 들어, 코팅 재료, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해, 적절한 유동성이 유지될 수 있다.
- [0295] 이러한 조성물들은 보조제 예컨대 방부제, 습윤화제, 유화제 및 분산제를 또한 함유할 수 있다. 미생물 존재의 방지는 멸균 절차 (상기), 및 다양한 항박테리아 및 항진균 작용제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등의 포함 모두에 의해 보증될 수 있다. 등장화제, 예컨대 당, 염화나트륨 등을 조성물 내로 포함시키는 것이 또한 바람직할 수 있다. 또한, 흡수를 지연시키는 작용제 예컨대 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함함으로써 주사용 제약 제형의 장기(長期) 흡수가 이루어질 수 있다.
- [0296] 제약상 허용가능한 담체에는 무균성 수성 용액 또는 분산액, 및 무균성 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 무균성 분말이 포함된다. 제약상 활성인 물질에 대한 이같은 매질 및 작용제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 작용제가 활성 화합물과 비혼화성이 아닌 한, 본 발명의 제약 조성물에서의 이의 사용이 구현된다. 추가적인 활성 화합물이 또한 조성물 내로 혼입될 수 있다.
- [0297] 치료용 조성물은 전형적으로 제작 및 보관 조건 하에 무균성이고 안정적이어야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀션, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적절한 기타 정돈된 구조물로서 제제화될 수 있다. 담체는 물, 에탄올, 폴리에틸렌 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이의 적절한 혼합물을 예를 들어 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 예를 들어, 코팅물 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해, 적절한 유동성이 유지될 수 있다. 다수의 경우에, 등장화제, 예를 들어, 당, 폴리알콜 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 조성물에 포함시킬 수 있다. 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 조성물에 포함시킴으로써 주사용 조성물의 장기(長期) 흡수가 이루어질 수 있다.
- [0298] 무균성 주사용 용액은 원하는 양의 활성 화합물을, 필요하다면 상기 열거된 성분들 중 하나 또는 이의 조합물과 함께, 적절한 용매 내에 혼입시킨 후, 멸균 미세여과함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 활성 화합물을 기본적인 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터의 필요한 기타 성분을 함유하는 무균성 비히클 내로 혼입시킴으로써 분산액이 제조된다. 무균성 주사 용액의 제조를 위한 무균성 분말의 경우, 제조 방법은 이전의 무균성-여과 용액으로부터 활성 성분 + 임의의 추가적인 원하는 성분의 분말이 산출되는 진공 건조 및 동결 건조이다.
- [0299] 단일 투여량을 생산하기 위해 담체 재료와 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료될 대상, 및 특정 투여 방식에 따라 변할 것이다. 단일 투여량을 생산하기 위해 담체 재료와 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 일반적으로 치료 효과를 일으키는 조성물의 양이다. 일반적으로, 100% 중에서, 이러한 양은 제약상 허용가능한 담체와 조합된 약 0.01% 내지 약 99%의 활성 성분, 약 0.1% 내지 약 70%, 또는 약 1% 내지 약 30%의 활성 성분 범위일 것이다.
- [0300] 최적의 원하는 응답 (예를 들어, 치료적 응답)을 제공하도록 투여량 처방계획이 조정된다. 예를 들어, 단일 볼루스가 투여될 수 있거나, 수회의 분할 용량이 경시적으로 투여될 수 있거나, 또는 치료 상황의 요건에 의해 지시되는 바와 같이 용량이 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다. 투여 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여량 단위 형태로 비경구 조성물을 제제화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용된 투여량 단위 형태는 치료될 대상에 대한 단위 투여량으로 적합한 물리적으로 분산된 단위를 지칭한다; 각각의 단위는 필요한 제약 담체와 함께 원하는 치료 효과를 일으키도록 계산된 미리 결정된 양의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 투여량 단위 형태에 대한 상세사항은 활성 화합물의 독특한 특성 및 달성하려는 특정 치료 효과, 및 개체에서의 민감성의 치료를 위해 이같은 활성 화합물을 조제하는 분야에 고유한 제한에 의해 지시되고, 이에 직접적으로 의존적이다.

- [0301] 항체의 투여를 위해, 투여량은 수용자 체중 1 kg 당 약 0.0001 내지 200 mg, 더욱 일반적으로는 0.01 내지 50 mg이다. 예를 들어, 투여량은 체중 1 kg 당 0.3 mg, 체중 1 kg 당 1 mg, 체중 1 kg 당 3 mg, 체중 1 kg 당 5 mg, 또는 체중 1 kg 당 10 mg일 수 있거나, 또는 체중 1 kg 당 1-20 mg의 범위일 수 있다. 대표적인 치료 요법은 1주일에 1번, 2주일에 1번, 3주일에 1번, 4주일에 1번, 1개월에 1번, 3개월에 1번 또는 3개월 내지 6개월에 1번 투여하는 것을 수반한다. 본 발명의 항-DKK1 항체에 대한 투여량 처방계획은 정맥내 투여에 의한 체중 1 kg 당 1 mg 또는 체중 1 kg 당 3 mg을 포함하고, 이때 항체는 6회의 투여량에 대해 4주에 1번에 이어서 3개월에 1번; 3주에 1번; 체중 1 kg 당 3 mg을 1회 투여한 후 체중 1 kg 당 1 mg을 3주에 1번 투여하는 투여 계획 중 하나를 사용하여 제공된다.
- [0302] 일부 방법에서, 결합 특이성이 상이한 2가지 이상의 모노클로날 항체가 동시에 투여되고, 이러한 경우 투여되는 각각의 항체의 투여량은 지시된 범위 내에 속한다. 항체는 일반적으로 여러번 투여된다. 단일 투여량들 간의 간격은, 예를 들어, 1주일, 1개월, 3개월, 또는 1년일 수 있다. 또한, 표적 항원에 대한 항체 또는 일부 바이오마커 예컨대 OCN, OPG 또는 P1NP의 환자 혈액 수준을 측정함으로써 지시되는 바와 같이 간격이 불규칙적일 수 있다. 일부 방법에서, 약 1-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 혈장 항체 농도를 달성하도록 투여량이 조정되고, 일부 경우에는 약 25-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이다.
- [0303] 별법적으로, 항체는 지속 방출형 제형으로 투여될 수 있고, 이러한 경우 덜 빈번한 투여가 요구된다. 투여량 및 빈도는 환자 내에서의 항체의 반감기에 따라 변한다. 일반적으로, 인간 항체가 가장 긴 반감기를 나타내고, 인간화 항체, 키메라 항체, 및 비-인간 항체가 뒤를 잇는다. 투여량 및 투여 빈도는 치료가 예방용 또는 치유용인지 여부에 따라 변할 수 있다. 예방용 용도에서, 비교적 낮은 투여량이 장기간에 걸쳐 비교적 드문 간격으로 투여된다. 일부 환자는 나머지 일생 동안 치료가 계속된다. 치유용 용도에서, 질환의 진행이 감소 또는 종결될 때까지 또는 환자가 질환 증상의 부분적 또는 완전한 완화를 나타낼 때까지 비교적 짧은 간격의 비교적 높은 투여량이 때때로 요구된다. 그후, 환자에게 예방 요법을 투여할 수 있다.
- [0304] 본 발명의 제약 조성물의 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성이지 않으면서, 특정 환자, 조성물, 및 투여 방식에 대한 원하는 치료 응답을 달성하는데 효과적인 활성 성분의 양을 수득하도록 변할 수 있다. 선택된 투여량 수준은 사용된 특정한 본 발명의 조성물, 또는 이의 에스테르, 염 또는 아미드의 활성, 투여 경로, 투여 시간, 사용된 특정 화합물의 배설 속도, 치료 기간, 사용된 특정 화합물과 조합되어 사용된 기타 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료될 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 일반적인 건강 및 이전의 병력, 및 의학 분야에 주지된 유사한 인자가 포함되는 다양한 약동학적 인자에 좌우될 것이다.
- [0305] 본 발명의 항-DKK1 항체의 "치료적으로 효과적인 투여량"은 질환 증상의 중증도에서의 감소, 질환 증상이 없는 기간의 빈도 및 기간에서의 증가, 또는 질환 고통으로 인한 손상 또는 장애의 방지를 초래할 수 있다.
- [0306] 본 발명의 조성물은 당업계에 공지된 다양한 방법들 중 1가지 이상을 사용하는 1가지 이상의 투여 경로에 의해 투여될 수 있다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 변할 것이다. 본 발명의 항체에 대한 투여 경로에는, 예를 들어, 주사 또는 주입에 의한, 정맥내, 근육내, 피내, 복강내, 피하, 척수 또는 기타 비경구 투여 경로가 포함된다. 본원에서 사용된 구절 "비경구 투여"는 일반적으로 주사에 의한, 장 및 국소 투여를 제외한 투여 방식을 의미하고, 정맥내, 근육내, 동맥내, 수막강내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수강내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 비제한적으로 포함한다.
- [0307] 별법적으로, 본 발명의 항체는 비경구 경로가 아닌 경로, 예컨대 국소, 표피 또는 점막 투여 경로, 예를 들어, 비내, 경구, 질내, 직장내, 설하 또는 국소 투여에 의해 투여될 수 있다.
- [0308] 이식물, 경피 패치 및 마이크로캡슐화 전달 시스템이 포함되는 제어 방출 제형과 같이, 급속한 방출에 대해 화합물을 보호하는 담체와 함께 활성 화합물을 제조할 수 있다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 다가무수물(polyanhydride), 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 이같은 제형의 제조를 위한 다수의 방법이 특허를 받았고, 당업자에게 일반적으로 공지되어 있다. 예를 들어, [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978] 참조.
- [0309] 당업계에 공지된 의료 장치로 치료용 조성물을 투여할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 본 발명의 치료용 조성물이 무침 피하 주사 장치, 예컨대 미국 특허 번호 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824 또는 4,596,556에 제시된 장치로 투여될 수 있다. 본 발명에서 유용한 주지된 이식물 및

모들의 예로는 의약을 제어된 속도로 투약하기 위한 이식성 마이크로-주입 펌프가 제시된 미국 특허 번호 4,487,603; 피부를 통해 의약을 투여하기 위한 치료용 장치가 제시된 미국 특허 번호 4,486,194; 정확한 주입 속도로 의약을 전달하기 위한 의약 주입 펌프가 제시된 미국 특허 번호 4,447,233; 연속적인 약물 전달을 위한 가변성 유동 이식성 주입 기구가 제시된 미국 특허 번호 4,447,224; 다중-챔버 구획이 있는 삼투압 약물 전달 시스템이 제시된 미국 특허 번호 4,439,196; 및 삼투압 약물 전달 시스템이 제시된 미국 특허 번호 4,475,196이 포함된다. 이러한 특허들은 거명에 의해 본원에 포함된다. 다수의 또다른 이같은 이식물, 전달 시스템, 및 모듈이 당업자에게 공지되어 있다.

[0310] 특정 실시양태에서, 생체 내에서의 적절한 분포를 확실히 하도록 본 발명의 인간 모노클로날 항체가 제제화될 수 있다. 예를 들어, 혈액-뇌 장벽 (BBB)은 다수의 고도로 친수성인 화합물들을 배제한다. 본 발명의 치료용 화합물이 BBB를 가로지르는 것을 확실히 하기 위해 (원하는 경우), 예를 들어, 리포솜 내에 이를 제제화할 수 있다. 리포솜의 제작 방법에 대해, 예를 들어, 미국 특허 4,522,811; 5,374,548; 및 5,399,331 참조. 리포솜은 특정 세포 또는 기관 내로 선택적으로 수송되는 1가지 이상의 모이어티를 포함할 수 있고, 따라서 표적화된 약물 전달을 증강시킨다 (예를 들어, [V.V. Ranade, 1989 J. Cline Pharmacol. 29:685] 참조). 대표적인 표적화 모이어티에는 폴레이트 또는 비오틴 (예를 들어, 미국 특허 5,416,016 (Low 등) 참조); 만노시드 ([Umezawa et al., 1988 Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038]); 항체 ([P.G. Bloeman et al., 1995 FEBS Lett. 357:140]; [M. Owais et al., 1995 Antimicrob. Agents Chemother. 39:180]); 계면활성제 단백질 A 수용체 ([Briscoe et al., 1995 Am. J. Physiol. 1233:134]); p120 ([Schreier et al., 1994 J. Biol. Chem. 269:9090])이 포함된다; [K. Keinänen; M.L. Laukkanen, 1994 FEBS Lett. 346:123]; [J.J. Killian; I.J. Fidler, 1994 Immunomethods 4:273]을 또한 참조.

[0311] 조합물

[0312] 또한 본 발명은

[0313] (a) 중화성 항-DKK1/4 조성물; 및

[0314] (b) 1가지 이상의 제약상 활성인 작용제

[0315] 를 포함하는 약제들의 조합물로 포유동물, 특히 인간에서 증식성 질환 또는 질환들, 예컨대 암을 예방하거나 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0316] 추가로 본 발명은

[0317] (a) 중화성 항-DKK1/4 조성물;

[0318] (b) 제약상 활성인 작용제; 및

[0319] (c) 제약상 허용가능한 담체

[0320] 를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

[0321] 추가로 본 발명은

[0322] (a) 중화성 항-DKK1/4 조성물의 제약 제형; 및

[0323] (b) 동시, 동반, 분리 또는 순차적 사용을 위한 제약상 활성인 작용제의 제약 제형

[0324] 을 포함하는 시판 패키지 또는 제품에 관한 것이다.

[0325] 제약상 활성인 작용제

[0326] 용어 "제약상 활성인 작용제"는 작용 메커니즘이 상이한 다수의 제약상 활성인 작용제들을 포함하는 광범위한 용어이다. 이들 중 일부와 DKK1/4 중화성 항체/조성물의 조합으로 암 치료법에서의 개선이 초래될 수 있다. 일반적으로, 제약상 활성인 작용제는 작용 메커니즘에 따라 분류된다. 다수의 이용가능한 작용제들은 다양한 종양의 발달 경로의 항-대사산물이거나, 또는 종양 세포의 DNA와 반응한다. 토포이소머라제 I 및 토포이소머라제 II와 같은 효소를 억제하거나, 또는 항유사분열제인 작용제가 또한 존재한다.

[0327] 용어 "제약상 활성인 작용제"는 중화성 항-DKK1/4 조성물 또는 이의 유도체 이외의 임의의 제약상 활성인 작용제를 특히 의미한다. 여기에는 하기의 것들이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다:

[0328] i. 아로마타제 억제제;

- [0329] ii. 항-에스트로겐제, 항-안드로겐제 또는 고나도렐린 작동제;
- [0330] iii. 토포이소머라제 I 억제제 또는 토포이소머라제 II 억제제;
- [0331] iv. 미세관 활성화제, 알킬화제, 항-신생물성 항-대사물질 또는 플라틴 화합물;
- [0332] v. 단백질 또는 지질 키나제 활성화 또는 단백질 또는 지질 포스포타제 활성을 표적으로 하는/감소시키는 화합물, 추가적인 항-혈관형성 화합물 또는 세포 분화 프로세스를 유도하는 화합물;
- [0333] vi. 모노클로날 항체;
- [0334] vii. 시클로옥시게나제 억제제, 비스포스포네이트, 헤파라나제 억제제, 생물학적 응답 변형제;
- [0335] viii. Ras 발암성 이소형(isoform)의 억제제;
- [0336] ix. 텔로머라제 억제제;
- [0337] x. 프로테아제 억제제, 매트릭스 금속단백질분해효소 억제제, 메티오닌 아미노펩티다제 억제제, 또는 프로테아솜 억제제;
- [0338] xi. 혈액 악성종양의 치료에 사용되는 작용제 또는 Flt-3의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물;
- [0339] xii. HSP90 억제제;
- [0340] xiii. 항증식성 항체;
- [0341] xiv. 히스톤 디아세틸라제 (HDAC) 억제제;
- [0342] xv. 세린/트레오닌 mTOR 키나제의 활성화/기능을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물;
- [0343] xvi. 소마토스타틴 수용체 길항제;
- [0344] xvii. 항-백혈병 화합물;
- [0345] xviii. 종양 세포를 손상시키는 접근법;
- [0346] xix. EDG 결합제;
- [0347] xx. 리보뉴클레오티드 환원효소 억제제;
- [0348] xxi. S-아데노실메티오닌 디카복실라제 억제제;
- [0349] xxii. VEGF 또는 VEGFR의 모노클로날 항체;
- [0350] xxiii. 광역학 치료법;
- [0351] xxiv. 혈관억제성 스테로이드;
- [0352] xxv. 코르티코스테로이드를 함유하는 이식물;
- [0353] xxvi. AT1 수용체 길항제; 및
- [0354] xxvii. ACE 억제제.
- [0355] 본원에서 사용된 용어 "아로마타제 억제제"는 에스트로겐 생산, 즉, 기질인 안드로스텐디온 및 테스토스테론이 각각 에스트론 및 에스트라디올로 전환되는 것을 억제하는 화합물에 관한 것이다. 이 용어는 스테로이드, 특히 아타메스탄, 엑세메스탄 및 포르메스탄; 및 특히 비-스테로이드, 특히 아미노글루테티미드, 로글레티미드, 피리도글루테티미드, 트릴로스탄, 테스토락톤, 케토코나졸, 보로졸, 파드로졸, 아나스트로졸 및 레트로졸을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 엑세메스탄은 AROMASIN으로; 포르메스탄은 LENTARON으로; 파드로졸은 AFEMA로; 아나스트로졸은 ARIMIDEX로; 레트로졸은 FEMARA 또는 FEMAR로; 아미노글루테티미드는 ORIMETEN으로 시판된다. 아로마타제 억제제인 제약상 활성인 작용제를 포함하는 본 발명의 조합물은 호르몬 수용체 양성 종양, 예를 들어, 유방 종양의 치료에 특히 유용하다.
- [0356] 본원에서 사용된 용어 "항에스트로겐제"는 에스트로겐 수용체 수준에서 에스트로겐의 효과를 길항하는 화합물에 관한 것이다. 이 용어는 타목시펜, 퓌베스트란트, 랄록시펜 및 랄록시펜 히드로클로라이드가 포함되지만, 이에

한정되지 않는다. 타목시펜은 시판되는 형태, 예를 들어, NOLVADEX로 투여될 수 있고; 탈록시펜 히드로클로라이드는 EVISTA로 투여될 수 있다. 폴베스트란트는 미국 특허 번호 4,659,516에 개시된 바와 같이 제제화될 수 있고, FASLODEX로 시판된다. 항에스트로겐제인 제약상 활성인 작용제를 포함하는 본 발명의 조합물은 에스트로겐 수용체 양성 종양, 예를 들어, 유방 종양의 치료에 특히 유용하다.

[0357] 본원에서 사용된 용어 "항안드로겐제"는 안드로겐성 호르몬의 생물학적 효과를 억제할 수 있는 임의의 물질에 관한 것이고, 미국 특허 번호 4,636,505에 개시된 바와 같이 예를 들어 제제화될 수 있는 비칼루타미드 (CASODEX)를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

[0358] 본원에서 사용된 용어 "고나도렐린 작동제"는 아바렐릭스, 고세렐린 및 고세렐린 아세테이트를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 고세렐린은 미국 특허 번호 4,100,274에 개시되어 있고, ZOLADEX로 시판된다. 아바렐릭스는, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,843,901에 개시된 바와 같이 제제화될 수 있다.

[0359] 본원에서 사용된 용어 "토포이소머라제 I 억제제"는 토포테칸, 지마테칸, 이리노테칸, 캄프토테신 및 이의 유사체인 9-니트로캄프토테신 및 거대분자형 캄프토테신 접합체 PNU-166148 (WO 99/17804의 화합물 A1)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 이리노테칸은 시판되는 형태, 예를 들어, 상표명 CAMPTOSAR 하에 시판되는 형태로 예를 들어 투여될 수 있다. 토포테칸은 시판되는 형태, 예를 들어, 상표명 HYCAMTIN 하에 시판되는 형태로 예를 들어 투여될 수 있다.

[0360] 본원에서 사용된 용어 "토포이소머라제 II 억제제"는 안트라사이클린, 예컨대 독소루비신 (리포솜형 제형, 예를 들어, CAELYX 포함), 다우노루비신 (리포솜형 제형, 예를 들어, DAUNOSOME 포함), 에피루비신, 이다루비신 및 네모루비신; 안트라퀴논계인 미톡산트론 및 로숙산트론; 및 포도필로톡신계인 에토포시드 및 테니포시드를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 에토포시드는 ETOPOPHOS로; 테니포시드는 VM 26-BRISTOL로; 독소루비신은 ADRIBLASTIN 또는 ADRIAMYCIN으로; 에피루비신은 FARMORUBICIN으로; 이다루비신은 ZAVEDOS로; 미톡산트론은 NOVANTRON으로 시판된다.

[0361] 본원에서 사용된 용어 "미세관 활성화제"는 미세관 안정화제, 미세관 불안정화제 및 마이크로튜불린 중합 억제제에 관한 것으로, 탁산, 예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀; 빈카 알칼로이드, 예를 들어, 빈블라스틴, 특히 빈블라스틴 술페이트; 빈크리스틴, 특히 빈크리스틴 술페이트 및 비노렐빈; 디스코테르몰리드; 콜히친 및 에포틸론 및 이의 유도체, 예를 들어, 에포틸론 B 또는 이의 유도체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 파클리탁셀은 TAXOL로; 도세탁셀은 TAXOTERE로; 빈블라스틴 술페이트는 VINBLASTIN R.P로; 빈크리스틴 술페이트는 FARMISTIN으로 시판된다. 일반적인 형태의 파클리탁셀, 뿐만 아니라 다양한 투약 형태의 파클리탁셀이 또한 포함된다. 일반적인 형태의 파클리탁셀에는 베타술솔 히드로클로라이드가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 다양한 투약 형태의 파클리탁셀에는 ABRAXANE로 시판되는 알부민 나노입자 파클리탁셀; ONXOL, CYTOTAX가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다. 디스코테르몰리드는, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,010,099에 개시된 바와 같이 수득될 수 있다. 미국 특허 번호 6,194,181, WO 98/10121, WO 98/25929, WO 98/08849, WO 99/43653, WO 98/22461 및 WO 00/31247에 개시된 에포틸론 유도체가 또한 포함된다. 에포틸론 A 및/또는 B가 특히 바람직하다.

[0362] 본원에서 사용된 용어 "알킬화제"는 시클로포스파미드, 이포스파미드, 펠팔란 및 니트로소우레아 (BCNU 또는 Gliadel), 또는 테모졸라미드 (TEMODAR)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 시클로포스파미드는 시판되는 형태, 예를 들어, 상표명 CYCLOSTIN 하에 시판되는 형태로 예를 들어 투여될 수 있고; 이포스파미드는 HOLOXAN으로 투여될 수 있다.

[0363] 용어 "항-신생물성 항-대사물질"은 5-플루오로우라실 (5-FU); 카페시타빈; 젬시타빈; DNA 탈메틸화제, 예컨대 5-아자사이티딘 및 데시타빈; 메토크세이트; 에다트렉세이트; 및 페메트렉세드와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 엽산 길항제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 카페시타빈은 시판되는 형태, 예를 들어, 상표명 XELODA 하에 시판되는 형태로 예를 들어 투여될 수 있고; 젬시타빈은 GEMZAR로 투여될 수 있다.

[0364] 본원에서 사용된 용어 "플라틴 화합물"은 카르보플라틴, 시스플라틴, 시스플라티늄, 옥살리플라틴, 사트라플라틴 및 백금 작용제 예컨대 ZD0473을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 카르보플라틴은 시판되는 형태, 예를 들어, CARBOPLAT로 예를 들어 투여될 수 있고; 옥살리플라틴은 ELOXATIN으로 투여될 수 있다.

[0365] 본원에서 사용된 용어 "단백질 또는 지질 키나제 활성화; 또는 단백질 또는 지질 포스파타제 활성을 표적으로 하는/감소시키는 화합물; 또는 추가적인 항-혈관형성 화합물"은 단백질 티로신 키나제 및/또는 세린 및/또는 트레오닌 키나제 억제제 또는 지질 키나제 억제제, 예를 들어, 하기의 것들을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다:

- [0366] i) 혈관 내피성장 인자-수용체 (VEGF)의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 예컨대 VEGF의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 특히 VEGF 수용체를 억제하는 화합물, 예컨대 이에 한정되지는 않지만 7H-피롤로[2,3-d]피리미딘 유도체 (AEE788); BAY 43-9006; WO 00/09495에 개시된 이솔쿨린 화합물 예컨대 (4-tert-부틸-페닐)-94-피리딘-4-일메틸-이소퀴놀린-1-일)-아민 (AAL881); 및
- [0367] ii) 혈소판-유래 성장 인자-수용체 (PDGFR)의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 예컨대 PDGFR의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 특히 PDGF 수용체를 억제하는 화합물, 예를 들어, N-페닐-2-피리미딘-아민 유도체, 예를 들어, 이매티닙, SU101, SU6668 및 GFB-111;
- [0368] iii) 섬유모세포 성장 인자-수용체 (FGFR)의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물;
- [0369] iv) 인슐린-유사 성장 인자 수용체 1 (IGF-1R)의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 예컨대 IGF-1R의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 특히 IGF-1R 수용체를 억제하는 화합물. 이러한 화합물에는 WO 02/092599에 개시된 화합물 및 이의 유도체 예컨대 4-아미노-5-페닐-7-시클로부틸-피롤로[2,3-d]피리미딘 유도체 (AEW541)가 포함되지만 이에 한정되지 않는다;
- [0370] v) Trk 수용체 티로신 키나제 패밀리의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물;
- [0371] vi) Axl 수용체 티로신 키나제 패밀리의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물;
- [0372] vii) c-Met 수용체의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물;
- [0373] viii) Ret 수용체 티로신 키나제의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물;
- [0374] ix) Kit/SCFR 수용체 티로신 키나제의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물;
- [0375] x) C-kit 수용체 티로신 키나제 (PDGFR 패밀리의 일부분)의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 예컨대 c-Kit 수용체 티로신 키나제 패밀리의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 특히 c-Kit 수용체를 억제하는 화합물, 예를 들어, 이매티닙;
- [0376] xi) Abl 패밀리의 구성원 및 이의 유전자-융합 생성물, 예를 들어, BCR-Abl 키나제의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 예컨대 c-Abl 패밀리의 구성원 및 이의 유전자 융합 생성물의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 예를 들어, N-페닐-2-피리미딘-아민 유도체, 예를 들어, 이매티닙, PD180970, AG957, NSC 680410 또는 PD173955 (ParkeDavis); BMS354825
- [0377] xii) 단백질 키나제 C (PKC) 및 세린/트레오닌 키나제의 Raf 패밀리의 구성원, MEK, SRC, JAK, FAK, PDK 및 Ras/MAPK 패밀리의 구성원, 또는 PI(3) 키나제 패밀리의 구성원, 및/또는 사이클린-의존성 키나제 패밀리의 구성원의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 특히 미국 특허 번호 5,093,330에 개시된 스타우로스포린 유도체, 예를 들어, 미도스타우린; 추가적인 화합물의 예로는, 예를 들어, UCN-01; 사핀골; BAY 43-9006; 브리오스타틴(Bryostatins) 1; 페리포신(Perifosine); 일모포신(Ilmofofosine); RO 318220 및 RO 320432; GO 6976; 아이시스(Isis) 3521; LY333531/LY379196; 이소치놀린 화합물, 예컨대 WO 00/09495에 개시된 것들; FTI; PD184352 또는 QAN697, P13K 억제제가 포함된다;
- [0378] xiii) 단백질-티로신 키나제의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 예컨대 이매티닙 메실레이트 (GLEEVEC); 티르포스틴 또는 피리미딜아미노벤조아미드 및 이의 유도체 (AMN 107). 티르포스틴은 바람직하게는 저분자량 (Mr <1500) 화합물, 또는 이의 제약상 허용가능한 염, 특히 벤질리덴말로니트릴 클래스 또는 S 아릴벤젠말로니트릴 또는 이중기질 퀴놀린 클래스의 화합물로부터 선택된 화합물, 더욱 특히 티르포스틴 A23/RG-50810, AG 99, 티르포스틴 AG 213, 티르포스틴 AG 1748, 티르포스틴 AG 490, 티르포스틴 B44, 티르포스틴 B44 (+) 거울상이성질체, 티르포스틴 AG 555, AG 494, 티르포스틴 AG 556; AG957 및 아다포스틴 (4-{[(2,5-디히드록시페닐)메틸]아미노}-벤조산 아다만틸 에스테르, NSC 680410, 아다포스틴)으로 구성된 군으로부터 선택된 임의의 화합물이다;
- [0379] xiv) 수용체 티로신 키나제의 표피 성장 인자 패밀리의 (동종 또는 이종이량체로서의 EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4)의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 예컨대 표피 성장 인자 수용체 패밀리의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 특히 EGF 수용체 티로신 키나제 패밀리의 구성원, 예를 들어, EGF 수용체, ErbB2, ErbB3 및 ErbB4를 억제하거나 또는 EGF 또는 EGF-관련 리간드에 결합하는 화합물, 단백질 또는 항체, 특히 WO 97/02266 (예를 들어, 실시예 39의 화합물), 또는 EP 0 564 409, WO 99/03854, EP 0520722, EP 0 566 226, EP 0 787 722, EP 0 837 063, 미국 특허 번호 5,747,498, WO 98/10767, WO 97/30034,

WO 97/49688, WO 97/38983 및 특히 WO 96/30347 (예를 들어, CP 358774로 공지된 화합물), WO 96/33980 (예를 들어, 화합물 ZD 1839); 및 WO 95/03283 (예를 들어, 화합물 ZM105180)에 일반적으로 및 구체적으로 개시된 화합물, 단백질 또는 모노클로날 항체, 예를 들어, 트라스투주맙 (HERCEPTIN®), 세툽시맙, 아이레사(Iressa), OSI-774, CI 1033, EKB-569, GW-2016, E1.1, E2.4, E2.5, E6.2, E6.4, E2.11, E6.3 또는 E7.6.3, 및 7H-피롤로-[2,3-d]피리미딘 유도체 (WO 03/013541에 개시됨), 에를로티닙 및 제피티닙 (에를로티닙은 시판되는 형태, 예를 들어 TARCEVA로 투여될 수 있고, 제피티닙은 IRESSA로 투여될 수 있다), ABX-EGFR을 포함하는 표피 성장 인자 수용체에 대한 인간 모노클로날 항체; 및

- [0380] xv) 세린/트레오닌 mTOR 키나제의 활성/기능을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 특히 mTOR 키나제 패밀리의 구성원을 표적으로 하는/억제하는 화합물, 단백질 또는 항체, 예를 들어, RAD, RAD001, CCI-779, ABT578, SAR543, 라파마이신 및 그의 유도체/유사체, AP23573 및 AP23841 (Ariad), 에베롤리무스 (CERTICAN) 및 시롤리무스. CERTICAN (에베롤리무스, RAD)은 T-세포 및 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 연구 중인 신규 증식 신호 억제제이다.
- [0381] 항체를 언급할 때, 이는 무손상 모노클로날 항체, 나노바디, 폴리클로날 항체, 2개 이상의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체, 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 포함하려는 것이다.
- [0382] 본원에서 사용된 구절 "단백질 또는 지질 포스파타제의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물"은 포스파타제 1, 포스파타제 2A, PTEN 또는 CDC25의 억제제, 예를 들어, 오카다산(okadaic acid) 또는 그의 유도체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0383] 본원에서 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 베바시주맙, 세툽시맙, 트라스투주맙, 이브리투모맙 티옥세탄, 데노수맙, 항-CD40, 항-GM-CSF, 및 토시투모맙 및 요오드 1131을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 베바시주맙은 시판되는 형태로, 예를 들어 AVASTIN으로; 세툽시맙은 ERBITUX로; 트라스투주맙은 HERCEPTIN으로; 리툽시맙은 MABTHERA로; 이브리투모맙 티옥세탄은 ZEVULIN으로; 항-RANKL은 데노수맙 (AMG 162)으로, 항-CD40은 HCD122 (미국 특허 출원 2002-0106371)으로, 토시투모맙 및 요오드 1131은 BEXXAR로 투여될 수 있다.
- [0384] 구절 "추가적인 항-혈관형성 화합물"은 단백질 또는 지질 키나제 억제제와 예를 들어 관련되지 않은 또다른 활성 메커니즘이 있는 화합물, 예를 들어, 탈리도미드 (THALOMID) 및 TNP-470을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0385] 본원에서 사용된 구절 "세포 분화 프로세스를 유도하는 화합물"은 레티노산, α -, γ - 또는 δ -토코페롤 또는 α -, γ - 또는 δ -토코트리엔올을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0386] 본원에서 사용된 용어 "시클로옥시게나제 억제제"는, 예를 들어, Cox-2 억제제, 5-알킬 치환 2-아릴아미노페닐 아세트산 및 유도체, 예컨대 셀레콕싯 (CELEBREX), 로페콕싯 (VIOXX), 에토리콕싯, 발데콕싯 또는 5-알킬-2-아릴아미노페닐아세트산, 예를 들어, 5-메틸-2-(2'-클로로-6'-플루오로아닐리노)페닐 아세트산, 루미라콕싯을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0387] 본원에서 사용된 용어 "비스포스포네이트"는 에트리돈산, 클로드론산, 틸루드론산, 파미드론산, 알렌드론산, 이반드론산, 리세드론산 및 졸레드론산을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. "에트리돈산"은, 예를 들어, 시판되는 형태로, 예를 들어, DIDRONEL로; "클로드론산"은 BONEFOS로; "틸루드론산"은 SKELID로; "팔미드론산"은 AREDIA로; "알렌드론산"은 FOSAMAX로; "이반드론산"은 BONDRANAT로; "리센드론산"은 ACTONEL로; "졸레드론산"은 ZOMETA로 투여될 수 있다.
- [0388] 본원에서 사용된 용어 "헤파라나제 억제제"는 헤파린 술페이트 분해를 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물을 지칭한다. 이 용어는 PI 88을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0389] 본원에서 사용된 용어 "생물학적 응답 변형제"는 림포카인 또는 인터페론, 예를 들어, 인터페론 γ 를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0390] 본원에서 사용된 용어 "Ras 발암성 이소형의 억제제" (H-Ras, K-Ras 또는 N-Ras의 억제제)는 Ras의 발암성 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물, 예를 들어, 파르네실 트랜스페라제 억제제 (FTI), 예를 들어, L-744832, DK8G557 또는 R115777 (ZARNESTRA)를 지칭한다.
- [0391] 본원에서 사용된 용어 "텔로머라제 억제제"는 텔로머라제의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 텔로머라제의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물은 특히 텔로머라제 수용체를 억제하는 화합물, 예를 들어, 텔로메스타틴이다.

- [0392] 본원에서 사용된 용어 "매트릭스 금속단백질분해효소 억제제" 또는 (MMP 억제제)는 콜라겐 펩티도모방성 및 비-펩티도모방성 억제제; 테트라사이클린 유도체, 예를 들어, 히드록시메이트 펩티도모방성 억제제 바티마스탯; 및 이의 경구적으로 생체이용가능한 유사체인 마리마스탯 (BB-2516), 프리노마스탯 (AG3340), 메타스탯 (NSC 683551) BMS 279251, BAY 12-9566, TAA211, MMI270B 또는 AAJ996을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0393] 본원에서 사용된 용어 "메티오닌 아미노펩티다제 억제제"는 메티오닌 아미노펩티다제의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 메티오닌 아미노펩티다제의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물은, 예를 들어, 벤가미드 또는 이의 유도체이다.
- [0394] 본원에서 사용된 용어 "프로테아솜 억제제"는 프로테아솜의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물을 포함한다. 프로테아솜의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물은 PS-341; MLN 341, 보르테조미드 또는 벨케이드를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0395] 본원에서 사용된 구절 "혈액 악성종양의 치료에 사용되는 작용제"는 FMS-유사 티로신 키나제 억제제, 예를 들어, FMS-유사 티로신 키나제 수용체 (Flt-3R)의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물; 인터페론, 1-b-D-아라비노푸란실사이토신 (ara-c) 및 비술판; 및 ALK 억제제, 예를 들어, 역형성 림프종 키나제를 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0396] 본원에서 사용된 구절 "Flt-3의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물"은 Flt-3을 억제하는 화합물, 단백질 또는 항체, 예를 들어, N-벤조일-스타우로스포린, 미도스타우린, 스타우로스포린 유도체, SU11248 및 MLN518을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0397] 본원에서 사용된 용어 "HSP90 억제제"는 HSP90의 내인성 ATP분해효소 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물; 유비퀴틴 프로테아솜 경로를 통해 HSP90 클라이언트 단백질을 분해하거나, 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. HSP90의 내인성 ATP분해효소 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물은 특히 HSP90의 ATP분해효소 활성을 억제하는 화합물, 단백질 또는 항체, 예를 들어, 17-알릴아미노, 17-데메톡시겔다나마이신 (17AAG), 겔다나마이신 유도체; 기타 겔다나마이신-관련 화합물; 라디시콜 및 HDAC 억제제이다.
- [0398] 본원에서 사용된 용어 "항증식성 항체"는 트라스투주맵 (HERCEPTIN), 트라스투주맵-DM1, 에를로티닙 (TARCEVA), 베바시주맵 (AVASTIN), 리툽시맵 (RITUXAN), PRO64553 (항-CD40) 및 2C4 항체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 항체는, 예를 들어, 무손상 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 2개 이상의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체, 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 항체 단편을 의미한다.
- [0399] 본원에서 사용된 용어 "HDAC 억제제"는 히스톤 디아세틸라제를 억제하고 항-증식성 활성을 소유하는 화합물에 관한 것이다. 이는 WO 02/22577에 개시된 화합물, 특히 N-히드록시-3-[4-[[[2-(2-히드록시에틸)[2-(1H-인돌-3-일)에틸]-아미노]페닐]-2E-2-프로페나미드, 및 N-히드록시-3-[4-[[[2-(2-메틸-1H-인돌-3-일)-에틸]-아미노]페닐]-2E-2-프로페나미드 및 이의 제약상 허용가능한 염 (LBH589)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 이는 추가적으로 특히 수베로일아닐리드 히드록삼산 (SAHA); [4-(2-아미노-페닐카르바모일)-벤질]-카르바산 피리딘-3-일메틸 에스테르 및 이의 유도체; 부티르산, 피록사미드, 트리코스타틴 A, 옥삼플라틴, 아피시딘, 데프시캡티드; 데푸데신 및 트라폭신을 포함한다.
- [0400] 본원에서 사용된 구절 "세린/트레오닌 mTOR 키나제의 활성/기능을 표적으로 하거나 감소시키거나 억제하는 화합물"은 mTOR 키나제 패밀리의 구성원을 표적으로 하는/억제하는 화합물, 단백질 또는 항체, 예를 들어, RAD, RAD001, CCI-779, ABT578, SAR543, 라파마이신 및 이의 유도체/유사체, AP23573 및 AP23841 (Ariad), 에베롤리무스 (CERTICAN) 및 시롤리무스 (RAPAMUNE), CCI-779 및 ABT578을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. CERTICAN (에베롤리무스, RAD)은 T-세포 및 혈관 평활근 세포의 증식을 억제하는 연구 중인 신규 증식 신호 억제제이다.
- [0401] 본원에서 사용된 용어 "소마토스타틴 수용체 길항제"는 소마토스타틴 수용체를 표적으로 하거나, 치료하거나 억제하는 작용제, 예컨대 옥트레오리드 및 SOM230을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0402] 본원에서 사용된 용어 "항-백혈병 화합물"은 피리미딘 유사체인 Ara-C를 포함하지만, 이에 한정되지 않고, 이는 데옥시사이티딘의 2'-α-히드록시 리보스 (아라비노시드) 유도체이다. 하이포잔틴의 퓨린 유사체인 6-메르캅토퓨린 (6-MP) 및 플루다라빈 포스페이트가 또한 포함된다.
- [0403] 구절 "종양 세포를 손상시키는 접근법"은 이온화 방사선과 같은 접근법을 지칭한다. 상기 및 하기에서 언급된

용어 "이온화 방사선"은 전자기선, 예컨대 X-선 및 감마선; 또는 입자, 예컨대 알파, 베타 및 감마 입자로 발생하는 이온화 방사선을 의미한다. 이온화 방사선은 방사선 치료법으로 제공되지만, 이에 한정되지 않고, 당업계에 주지되어 있다. [Hellman, Cancer, 4th Edition, Vol. 1, Devita et al., Eds., pp. 248-275 (1993)] 참조.

- [0404] 본원에서 사용된 용어 "EDG 결합제"는 림프구 재순환을 조절하는 면역억제제의 부류, 예컨대 FTY720을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0405] 본원에서 사용된 용어 "리보뉴클레오티드 환원효소 억제제"는 플루다라빈 및/또는 ara-C가 포함되지만 이에 한정되지 않는 피리미딘 또는 퓨린 뉴클레오시드 유사체; 6-티오구아닌; 5-FU; 클라드리빈; 6-메르캅토피린 (특히 ALL에 대한 ara-C와 조합됨); 및/또는 펜토스타틴을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 리보뉴클레오티드 환원효소 억제제는 특히 히드록시우레아 또는 2-히드록시-1H-이소인돌-1,3-디온 유도체, 예컨대 PL-1, PL-2, PL-3, PL-4, PL-5, PL-6, PL-7 또는 PL-8이다. [Nandy et al., Acta Oncologica, Vol. 33, No. 8, pp. 953-961 (1994)] 참조.
- [0406] 본원에서 사용된 용어 "S-아데노실메티오닌 디카복실라제 억제제"는 미국 특허 번호 5,461,076에 개시된 화합물을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0407] 본원에서 사용된 구절 "VEGF 또는 VEGFR의 모노클로날 항체"는 WO 98/35958에 개시된 화합물, 예를 들어, 1-(4-클로로아닐리노)-4-(4-피리딜메틸)프탈라진 또는 이의 제약상 허용가능한 염, 예를 들어, 숙시네이트, 또는 WO 00/09495, WO 00/27820, WO 00/59509, WO 98/11223, WO 00/27819 및 EP 0 769 947에 개시된 화합물; [Prewett et al., Cancer Res, Vol. 59, pp. 5209-5218 (1999)]; [Yuan et al., Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 93, pp. 14765-14770 (1996)]; [Zhu et al., Cancer Res, Vol. 58, pp. 3209-3214 (1998)]; 및 [Mordenti et al., Toxicol Pathol, Vol. 27, No. 1, pp. 14-21 (1999)], WO 00/37502 및 WO 94/10202에 기술된 것들; [O'Reilly et al., Cell, Vol. 79, pp. 315-328 (1994)]에 기술된 ANGIOSTATIN; [O'Reilly et al., Cell, Vol. 88, pp. 277-285 (1997)]에 기술된 ENDOSTATIN; 안트라닐산 아미드; ZD4190; ZD6474; SU5416; SU6668; 베바시주맵; 또는 항-VEGF 항체 또는 항-VEGF 수용체 항체, 예를 들어, rhuMAb 및 RHUFab; VEGF 앵타머, 예를 들어, 마쿠곤(Macugon); FLT-4 억제제; FLT-3 억제제; VEGFR-2 IgG1 항체; 안지오자임(Angiozyme) (RPI 4610); 및 아바스탄(Avastan)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0408] 본원에서 사용된 용어 "광역학 치료법"은 암을 치료 또는 예방하는 광감작제로 공지된 특정 화학물질을 사용하는 치료법을 지칭한다. 광역학 치료법의 예로는, 예를 들어, VISUDYNE 및 포르피머 소듐과 같은 작용제로의 치료가 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0409] 본원에서 사용된 용어 "혈관억제성 스테로이드"는 혈관형성을 차단하거나 억제하는 작용제, 예를 들어, 아네코르타브, 트리암시놀론, 히드로코르티손, 11- α -에피히드로코르티솔, 코르텍솔론, 17 α -히드록시프로게스테론, 코르티코스테론, 테스옥시코르티코스테론, 테스토스테론, 에스트론 및 텍사메타손을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0410] 본원에서 사용된 구절 "코르티코스테로이드를 함유하는 이식물"은 예를 들어 플루오시놀론 및 텍사메타손과 같은 작용제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0411] 본원에서 사용된 용어 "AT1 수용체 길항제"는 DIOVAN과 같은 작용제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0412] 본원에서 사용된 용어 "ACE 억제제"는 CIBACEN, 베나제프릴, 에나제프릴 (LOTENSIN), 카프로프릴, 에날라프릴, 포시노프릴, 리시노프릴, 모엑시프릴, 퀴나프릴, 라미프릴, 페린도프릴 및 트란돌라프릴을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0413] 기타 제약상 활성인 작용제에는 식물 알칼로이드, 호르몬성 작용제 및 길항제, 생물학적 응답 변형제, 바람직하게는 림포카인 또는 인터페론, 안티센스(antisense) 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 유도체; 또는 작용 메커니즘이 다른 또는 알려지지 않는 각종 작용제 또는 작용제들이 포함되지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0414] 특허 출원 또는 과학 간행물의 인용이 제공된 각각의 경우 (특히 개별적인 화합물 청구항 및 실시예의 최종 생성물과 관련하여), 최종 생성물, 제약 제제 및 청구항의 대상은 이로써 이러한 간행물에 대한 거명에 의해 본 출원에 포함된다. 또한 상응하는 입체이성질체, 뿐만 아니라 상응하는 결정 변형물, 예를 들어, 용매화물 및 다형체 (문헌 내에 개시됨)이 포함된다. 본원에 개시된 조합물에서 활성 성분으로 사용되는 화합물들은 각각 인용된 문헌에 기술된 바와 같이 제조 및 투여될 수 있다.

- [0415] 코드 번호, 일반명 또는 상표명에 의해 확인되는 활성제의 구조는 표준 개론인 <The Merck Index>의 현행판으로부터 또는 데이터베이스, 예를 들어, <Patents International>, 예를 들어, <IMS World Publications>, 또는 상기 및 하기 언급된 간행물로부터 취해질 수 있다. 이의 상응하는 내용이 이로써 거명에 의해 포함된다.
- [0416] 성분 (a) 및 (b)에 대한 언급은 임의의 활성 물질의 제약상 허용가능한 염을 또한 포함한다는 것이 이해될 것이다. 성분 (a) 및/또는 (b)에 포함된 활성 물질에, 예를 들어, 1개 이상의 염기성 중심이 있는 경우, 이는 산 부가염을 형성할 수 있다. 원한다면, 추가적인 염기성 중심이 존재하는 상응하는 산 부가염이 형성될 수 있다. 산 기, 예를 들어 COOH가 있는 활성 물질은 염기와 염을 형성할 수 있다. 성분 (a) 및/또는 (b)에 포함된 활성 물질 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 또한 수화물의 형태로 사용될 수 있거나, 결정화에 사용된 또다른 용매를 포함할 수 있다.
- [0417] 따라서, 첫번째 양상에서, 본 발명은 제약상 유효량의
- [0418] (a) 중화성 항-DKK1/4 조성물; 및
- [0419] (b) 제약상 활성인 작용제
- [0420] 의 조합물로 동시에 또는 순차적으로 환자를 치료하는 것을 포함하는, 포유동물, 바람직하게는 인간 환자에서 증식성 질환 또는 지속적인 혈관형성에 의해 촉발되는 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0421] 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 하기를 포함하는 제약 제제를 제공한다:
- [0422] (a) 중화성 항-DKK1/4 조성물; 및
- [0423] (b) 아로마타제 억제제; 항에스트로겐제; 항안드로겐제; 고나도렐린 작동제; 토포이소머라제 I 억제제; 토포이소머라제 II 억제제; 미세관 활성제; 알킬화제; 항신생물성 항-대사물질; 플라틴 화합물; 단백질 또는 지질 키나제 활성 또는 단백질 또는 지질 포스파타제 활성을 표적으로 하는/감소시키는 화합물, 항-혈관형성 화합물; 세포 분화 프로세스를 유도하는 화합물; 모노클로날 항체; 시클로옥시게나제 억제제; 비스포스포네이트; 헤파라나제 억제제; 생물학적 응답 변형제; Ras 발암성 이소형의 억제제; 텔로머라제 억제제; 프로테아제 억제제, 매트릭스 금속단백질분해효소 억제제, 메티오닌 아미노펩티다제 억제제; 프로테아솜 억제제; Flt-3의 활성을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 작용제; HSP90 억제제; 항증식성 항체; HDAC 억제제; 세린/트레오닌 mTOR 키나제의 활성/기능을 표적으로 하거나, 감소시키거나 억제하는 화합물; 소마토스타틴 수용체 길항제; 항-백혈병 화합물; 중앙 세포를 손상시키는 접근법; EDG 결합제; 리보뉴클레오티드 환원효소 억제제; S-아데노실메티오닌 디카르복실라제 억제제; VEGF 또는 VEGFR의 모노클로날 항체; 광역학 치료법; 혈관억제성 스테로이드; 코르티코스테로이드를 함유하는 이식물; AT1 수용체 길항제; 및 ACE 억제제로 구성된 군으로부터 선택된 1가지 이상의 제약상 활성인 작용제.
- [0424] 임의의 성분 (a) 및 (b)의 조합물, 이러한 2개의 성분을 투여하는 것을 포함하는 온혈 동물의 치료 방법, 동시, 분리 또는 순차적 사용을 위한 이러한 2개의 성분을 포함하는 제약 조성물, 증식성 질환의 진행 지연 또는 치료를 위한 또는 이러한 목적을 위한 제약 제제의 제조를 위한 조합물의 용도, 또는 이같은 성분 (a) 및 (b)의 조합물을 포함하는 시판품 (모두 상기 언급 또는 정의된 바와 같음)이 하기에서 본 발명의 조합으로 또한 지칭될 것이다 (이러한 용어가 각각의 이러한 실시양태들을 지칭하고, 따라서 적합한 경우 이러한 실시양태들이 이러한 용어를 대체할 수 있도록).
- [0425] 동시 투여는, 예를 들어, 2가지 이상의 활성 성분이 있는 하나의 고정된 조합물의 형태로, 또는 독립적으로 제제화된 2가지 이상의 활성 성분을 동시 투여함으로써 일어날 수 있다. 순차적 사용 (투여)은, 바람직하게는 독립적으로 투여되는 단일 화합물보다 조합물이 더 많은 효율을 나타내도록 (특히 상승작용을 나타냄), 한 시점에 조합물의 하나 (또는 그 이상의) 성분을 투여하고, 상이한 시점에서 또다른 성분을 투여하는 것, 즉 만성적으로 엇갈리는 방식으로의 투여를 의미하는 것이 바람직하다. 분리 사용 (투여)은 조합물의 성분들을 상이한 시점에서 서로 독립적으로 투여하는 것을 의미하는 것이 바람직하고, 바람직하게는 성분 (a) 및 (b)가 측정가능한 혈액 수준의 양쪽 성분의 중복이 중복 방식으로 (동시에) 존재하지 않도록 투여되는 것을 의미한다.
- [0426] 바람직하게는 조합 성분-약물들이 치료 효능에 대한 상호 효과가 발견될 수 없도록 큰 시간 간격으로 독립적으로 사용되는 경우 발견되는 효과를 증가하는 합동 치료 효과 (상승작용성 효과가 특히 바람직하다)를 조합 성분-약물들이 나타내도록, 순차적, 분리 및 동시 투여 중 2가지 이상의 조합이 또한 가능하다.
- [0427] 본원에 사용된 용어 "진행 지연"은 치료될 질환의 최초 징후 또는 재발의 전-단계 또는 초기 단계의 환자에게 조합물을 투여하는 것을 의미하고, 이때 이러한 환자에서, 예를 들어, 상응하는 질환의 전(pre)-형태가 진단되

거나, 또는 이러한 환자는 예를 들어 의학적 치료 중인 상태이거나 상응하는 질환이 발달될 것 같은 사고로부터 초래된 상태이다.

[0428] "합동으로 치료적으로 활성인" 또는 "합동 치료 효과"는 치료될 온혈 동물, 특히 인간에서, (바람직하게는 상승 작용적인) 상호작용 (합동 치료 효과)을 화합물들이 바람직하게 여전히 나타내도록 하는 시간 간격으로 화합물들이 분리되어 (만성적으로 엇갈린 방식, 특히 순서-특이적 방식으로) 제공될 수 있다는 것을 의미한다.

[0429] 바람직하게는, "제약상 효과적인"은 증식성 질환의 진행에 대해 치료적으로, 또는 더욱 넓은 의미로는 또한 예방적으로 효과적인 양에 관한 것이다.

[0430] 본원에서 사용된 용어 "시판 패키지" 또는 "제품"은 상기 정의된 바와 같은 성분 (a) 및 (b)가 독립적으로, 또는 구별가능한 양의 성분 (a) 및 (b)가 있는 여러 고정된 조합물을 사용함으로써, 즉 동시에 또는 상이한 시점에 투여될 수 있다는 점에서 "부품 키트"를 특히 정의한다. 또한, 이러한 용어는 증식성 질환의 진행 지연 또는 치료에서의 동시, 순차적 (만성적으로 엇갈림, 시간-특이적 순서, 우선적) 또는 (덜 바람직하게) 분리 사용에 대한 사용설명서와 함께, 활성 성분으로서 성분 (a) 및 (b)를 포함하는 (특히 이들이 조합된) 시판 패키지를 포함한다. 그러면, 부품 키트의 부품들이 동시에 또는 연대순으로 엇갈려서, 즉 부품 키트의 임의의 부품에 대해 동일한 또는 상이한 시간 간격으로 상이한 시점에 예를 들어 투여될 수 있다. 매우 바람직하게는, 시간 간격이 부품들의 조합 사용에서의 치료된 질환에 대한 효과가 조합 파트너 (a) 및 (b) 중 어느 하나만을 사용함으로써 수득되는 효과보다 크도록 선택된다 (표준 방법에 따라 결정할 수 있음). 예를 들어, 치료될 환자 하위 집단의 요구 또는 단일 환자의 요구에 대처하기 위해, 조합 제제에서 투여될 조합 파트너 (a) 대 조합 파트너 (b)의 총량의 비율이 변할 수 있고, 이때 상이한 요구는 특정 질환, 환자의 연령, 성별, 체중 등으로 인한 것일 수 있다. 바람직하게는, 1가지 이상의 이로온 효과, 예를 들어, 조합 파트너 (a) 및 (b)의 효과의 상호 증강, 특히 부가적인 효과를 초과하는 효과가 존재하고, 따라서 조합 없이 개별적인 약물로만 치료하는 경우에 허용될 수 있는 것보다 각각 더 낮은 용량의 각각의 조합된 약물로 이러한 효과가 달성될 수 있어, 추가적인 유리한 효과, 예를 들어, 더 적은 부작용 또는 조합 파트너 (성분) (a) 및 (b) 중 하나 또는 양쪽 모두의 비-효과적인 투여량에서의 조합된 치료 효과, 매우 바람직하게는 조합 파트너 (a) 및 (b)의 강한 상승작용을 일으킨다.

[0431] 성분 (a) 및 (b)의 조합물을 사용하는 경우 및 시판 패키지를 사용하는 경우 모두에서, 동시, 순차적 및 분리 사용의 임의의 조합이 또한 가능하고, 이는 성분 (a) 및 (b)가 한 시점에 동시에 투여된 후, 이후의 시점에 수용체에서의 독성이 낮은 1가지 성분만이 만성적으로 투여되고, 예를 들어, 3-4주를 초과하여 매일 투약되고, 이어서 더 이후의 시점 (최적의 항-종양 효과를 위한 후속의 약물 조합 치료 과정에서)에 나머지 성분 또는 양쪽 성분의 조합물이 투여되는 것 등을 의미한다.

[0432] 본 발명의 조합은 다른 치료법, 예를 들어, 외과 기술, 온열요법 및/또는 방사선 요법과 조합되어 또한 적용될 수 있다.

[0433] 본 발명에 따른 제약 조성물은 통상적인 방식으로 제조될 수 있고, 치료적 유효량의 VEGF 억제제 및 1가지 이상의 제약상 활성인 작용제를 단독으로 또는 1가지 이상의 제약상 허용가능한 담체, 특히 장 또는 비경구 용도에 적절한 것들과 조합하여 포함하는, 인간이 포함되는 포유류에 대한 장 투여, 예컨대 경구 또는 직장 투여, 및 비경구 투여에 적절한 것이다.

[0434] 제약 조성물은 약 0.00002 내지 약 100%, 특히, 예를 들어, 즉시 사용하기 위한 주입 희석물의 경우, 0.0001 내지 0.02%, 또는, 예를 들어, 주사 또는 주입 농축물 또는 특히 비경구 제형의 경우, 약 0.1 % 내지 약 95%, 바람직하게는 약 1% 내지 약 90%, 더욱 바람직하게는 약 20% 내지 약 60%의 활성 성분 (각각의 경우에 중량/중량)을 포함한다. 본 발명에 따른 제약 조성물은, 예를 들어, 단위 용량 형태, 예컨대 앰플, 바이알, 당의정, 정제, 주입 백 또는 캡슐의 형태일 수 있다.

[0435] 본 발명의 제형에서 사용된 각각의 조합 파트너의 유효 투여량은 사용된 특정 화합물 또는 제약 조성물, 투여 방식, 치료될 용태, 및 치료될 용태의 중증도에 따라 변할 수 있다. 통상적인 기술의 의사, 임상의 또는 수의 학자는 용태의 진행을 방지하거나, 치료하거나 억제하는데 필요한 각각의 활성 성분의 유효량을 쉽게 결정할 수 있다.

[0436] 티르포스틴, 특히 아다포스틴은 온혈 동물, 특히 인간에게, 바람직하게는 약 1-6000 mg/일, 더욱 바람직하게는 25-5000 mg/일, 가장 바람직하게는 50-4000 mg/일의 투여량으로 투여된다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 화합물은 하루에 1 내지 5회, 특히 1-4회 바람직하게 투여된다.

[0437] 장 또는 비경구 투여를 위한 조합 치료법용 제약 제제는, 예를 들어, 단위 투여량 형태의 제제, 예컨대 당-코팅

정제, 캡슐 또는 좌약, 및 또한 앰플이다. 달리 언급되지 않는 한, 이러한 제형들은 통상적인 수단에 의해, 예를 들어, 통상적인 혼합, 과립화, 당-코팅, 용해 또는 동결건조 공정에 의해 제조된다. 필요한 유효량이 다수의 투여량 단위의 투여에 의해 도달될 수 있기 때문에, 각각의 투여량 형태의 개별적인 용량 내에 함유된 조합 파트너의 단위 함량이 그 자체로 유효량을 구성할 필요는 없다는 것이 이해될 것이다. 당업자는 조합 성분의 적합한 제약상 유효량을 결정하는 능력이 있다.

[0438] 바람직하게는, 화합물 또는 이의 제약상 허용가능한 염은 정제, 캡슐, 또는 시럽 형태의 경구 제약 제형으로; 또는 적합한 경우 비경구 주사로 투여된다.

[0439] 경구 투여용 조성물의 제조에서, 임의의 제약상 허용가능한 매질 예컨대 물, 글리콜, 오일, 알콜, 풍미제, 방부제, 착색제가 사용될 수 있다. 제약상 허용가능한 담체에는 전분, 당, 미세결정질 셀룰로스, 희석제, 과립화제, 윤활제, 결합제, 붕해제가 포함된다.

[0440] 활성 성분의 용액, 및 또한 현탁액, 및 특히 등장성 수성 용액 또는 현탁액이 활성 성분의 비경구 투여용으로 유용하고, 예를 들어, 활성 성분을 단독으로 또는 제약상 허용가능한 담체, 예를 들어, 만니톨과 함께 포함하는 동결건조된 조성물의 경우, 이같은 용액 또는 현탁액이 사용전에 제조될 수 있다. 제약 조성물은 멸균될 수 있고/있거나 부형제, 예를 들어, 방부제, 안정화제, 습윤화 및/또는 유화제, 가용화제, 삼투압 조절용 염 및/또는 완충제를 포함할 수 있고, 그 자체로 공지된 방식으로, 예를 들어, 통상적인 용해 또는 동결건조 공정에 의해 제조된다. 용액 또는 현탁액은 증점 물질, 예컨대 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐피롤리돈 또는 젤라틴을 포함할 수 있다. 오일 내의 현탁액은 주사 목적에 통상적인 식물성, 합성 또는 반합성 오일을 오일 성분으로서 포함한다.

[0441] 등장화제는 당업자에게 공지된 것들 중 임의의 것, 예를 들어 만니톨, 텍스트로스, 글루코스 및 염화나트륨으로부터 선택될 수 있다. 주입 제형이 수성 매질로 희석될 수 있다. 희석제로서 사용된 수성 매질의 양은 주입 용액 내의 활성 성분의 원하는 농도에 따라 선택된다. 주입 용액은 정맥내 투여되는 제형에서 통상적으로 사용되는 기타 부형제 예컨대 항산화제를 함유할 수 있다.

[0442] 또한 본 발명은 "조합 제제"에 관한 것이고, 이는 본원에서 사용될 때 상기 정의된 바와 같은 조합 파트너 (a) 및 (b)가 독립적으로, 또는 구별가능한 양의 조합 파트너 (a) 및 (b)가 있는 여러 고정된 조합물을 사용함으로써, 즉 동시에 또는 상이한 시점에 투약될 수 있다는 점에서 "부품 키트"를 특히 정의한다. 그러면, 부품 키트의 부품들이 동시에 또는 연대순으로 엮갈려서, 즉 부품 키트의 임의의 부품에 대해 동일한 또는 상이한 시간 간격으로 상이한 시점에 예를 들어 투여될 수 있다. 예를 들어, 치료될 환자 하위 집단의 요구 또는 환자가 경험하는 임의의 부작용의 중증도를 기초로 하는 단일 환자의 요구에 대처하기 위해, 조합 제제에서 투여될 조합 파트너 (a) 대 조합 파트너 (b)의 총량의 비율이 변할 수 있다.

[0443] 본 발명의 용도 및 방법

[0444] 본 발명의 항체 (및 면역접합체 및 이중특이적 분자)는 시험관내 및 생체내 진단 및 치료 유용성을 갖는다. 예를 들어, 이러한 분자들은 다양한 장애를 치료하거나, 예방하거나 진단하기 위해 배양물 (예를 들어 시험관내 또는 생체내) 또는 대상 (예를 들어, 생체내) 내의 세포에 투여될 수 있다. 본원에서 사용된 용어 "대상"은 인간 및 비-인간 동물을 포함하도록 의도된다. 비-인간 동물에는 모든 척추동물, 예를 들어, 포유동물 및 비-포유동물, 예컨대 비-인간 영장류, 양, 개, 고양이, 소, 말; 닭, 양서류, 및 파충류가 포함된다. 이 방법은 DKK1 발현과 관련된 장애가 있는 인간 환자를 치료하는데 특히 적절하다. DKK1에 대한 항체가 또다른 작용제와 함께 투여되는 경우, 이들은 임의의 순서로 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0445] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 (및 면역접합체 및 이중특이적 분자)는 DKK1의 수준, 또는 DKK1을 함유하는 세포의 수준을 검출하는데 사용될 수 있다. 이는, 예를 들어, 항-DKK1 항체와 샘플 (예컨대 시험관내 샘플) 및 대조군 샘플을 항체와 DKK1 간의 복합체가 형성되도록 하는 조건 하에 접촉시킴으로써 달성될 수 있다. 항체와 DKK1 간에 형성된 임의의 복합체를 검출하고, 샘플 및 대조군에서 비교한다. 비제한적인 예로서, 당업계에 주지되어 있는 표준 검출 방법, 예를 들어, ELISA, MALDI 및 유세포측정 분석법을 본 발명의 조성물을 사용하여 수행할 수 있다.

[0446] 따라서, 한 양상에서, 본 발명은 DKK1에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체, 또는 이의 항원 결합 부분과 샘플 및 대조군 샘플을 항체 또는 이의 일부분과 DKK1 간의 복합체가 형성되도록 하는 조건 하에 접촉시키는 것을 포함하는, 샘플 내의 DKK1 (예를 들어, 인간 DKK1 항원)의 존재를 검출하거나, DKK1의 양을 측정하는 방법을 추가로 제공한다. 그후, 복합체의 형성을 검출하고, 이때 샘플과 대조군 샘플 간의 복합체 형성에서의 차이는 샘플

플 내의 DKK1의 존재를 가리킨다.

[0447] 본 발명의 조성물 (예를 들어, 항체, 인간 항체, 면역접합체 및 이중특이적 분자) 및 사용설명서로 구성된 키트 또한 본 발명의 범주 내이다. 키트는 1가지 이상의 추가적인 시약, 또는 1가지 이상의 추가적인 본 발명의 항체 (예를 들어, 제1항체와 별개의 표적 항원 상의 에피토프에 결합하는 상보적인 활성이 있는 항체)를 추가로 함유할 수 있다. 키트는 키트 내용물의 의도된 용도를 가리키는 표지를 전형적으로 포함한다. 표지라는 용어는 임의의 문서, 또는 키트 상에 또는 키트와 함께 공급되거나, 다른 방식으로 키트에 동반되는 기록물을 포함한다.

[0448] 충분히 기술된 본 발명이 하기의 실시예 및 청구항에서 추가로 설명되며, 이는 예시적인 것이고 추가적인 제한인 것으로 의도되지 않는다. 당업자는 본원에 기술된 특정 절차들에 대한 수많은 등가물을 인식하거나 또는 단지 일상적인 실험을 사용하여 이를 확인할 수 있을 것이다. 이같은 등가물은 본 발명 및 청구항의 범주 내이다. 본 출원의 전반에 걸쳐 인용된, 허여된 특허 및 공개된 특허 출원을 포함하는 모든 참고문헌의 내용은 거명에 의해 본원에 포함된다.

실시예

[0449] **실시예 1: HuCAL GOLD® 라이브러리로부터의 인간 DKK1-특이적 항체의 생성**

[0450] 시판되는 파지 디스플레이 라이브러리인 MorphoSys HuCAL GOLD® 라이브러리를 항체 변이체 단백질의 공급원으로 사용하여 결합 친화력이 높은 항체를 선별함으로써 인간 DKK1 단백질에 대한 치료용 항체가 생성되었다. HuCAL GOLD®은 Fab 라이브러리이고 ([Knappik et al., 2000 J. Mol. Biol. 296:57-86]; [Krebs et al., 2001 J Immunol. Methods 254:67-84]; [Rauchenberger et al., 2003 J Biol Chem. 278(40):38194-38205]), 여기서 모든 6개의 CDR들이 적합한 돌연변이에 의해 다양화되어 있고, Fab 단편들을 파지 표면에 연결시키기 위해 CysDisplay™ 기술이 사용된다 (WO 01/05950 Loehning 2001).

[0451] 일반적인 절차: 파지미드 구제, 파지 증폭, 및 정제

[0452] HuCAL GOLD® 라이브러리가 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 클로람페니콜 및 1% 글루코스를 함유하는 표준 강화 박테리아 배지 (2 \times YT) (2 \times YT-CG)에서 증폭되었다. 0.5의 OD_{600nm}에서 세포를 VCSM13 헬퍼 파지로 감염시킨 후 (세포 및 파지의 혼합물을 30분 동안 37°C에서 진탕하지 않으면서 인큐베이션), 세포를 원심분리하고 (4120 g; 5분; 4°C), 2 \times YT / 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 클로람페니콜 / 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 카나마이신 / 0.25 mM IPTG에 재현탁시키고, 하룻밤 동안 22°C에서 성장시켰다. 이러한 기간 말기에, 세포를 원심분리에 의해 제거하고, 파지를 상청액으로부터 2회 PEG-침전시키고, PBS/20% 글리세롤에 재현탁시키고, -80°C에서 보관하였다.

[0453] 2회의 패닝(panning) 라운드 간의 파지 증폭을 하기와 같이 수행하였다: 파지로 감염된 중간-로그 단계의 대장균 균주 TG1 세포를 DKK1 단백질로의 선별 후에 용출시키고, 1%의 글루코스 및 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 클로람페니콜이 보충된 LB-한천 (LB-CG 플레이트) 상에 플레이팅하였다. 하룻밤 동안 플레이트를 30°C에서 인큐베이션한 후, 박테리아 콜로니를 한천 표면으로부터 긁어 내고, 2 \times YT-CG 브로스에 접종하는데 사용하여, 0.5의 OD_{600nm}를 수득한 후, VCSM 13 헬퍼 파지를 첨가하여, 상기 기술된 바와 같은 생산성 감염을 수득하였다.

[0454] Strep-Tactin 자기 비드를 사용하는 용액 패닝을 위한 예비 실험

[0455] Strep-태그(tag) II는 [Voss and Skerra, 1997 Protein Eng. 10:975-982]에 따르면 Strep-Tactin 매트릭스에 대한 친화력이 낮은 것으로 보고되었고 ($K_D \sim 1 \mu\text{M}$), 따라서, Strep-Tactin이 코팅된 MagStrep 비드를 항체 선별 동안 항원의 포획에 사용하는 것의 적절성을 평가하기 위해, 그리고 패닝 동안 항원 손실을 막기 위해, 예비 실험을 수행하였다.

[0456] 이러한 목적을 위해, 8 mg의 MagStrep 비드를 46 μg 의 His-Strep-태그가 부착된 DKK1과 함께 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하고, 샘플을 4개의 예비-차단된 에펜도르프 튜브 내로 분할하였다. 1개의 튜브는 양성 대조군으로 작용하였고 (세정하지 않음), 나머지 3개의 샘플은 HuCAL GOLD® 매뉴얼 패닝 섹션에 따라 상이한 강도로 세정하였다. MagStrep 비드 (Strep-Tactin이 코팅된 자기 비드; IBA (Goettingen, Germany)로부터 수득됨)에 대한 His-Strep-태그가 부착된 DKK1의 결합의 검출을 BioVeris에서 염소 항-DKK1 항체 및 루비덤-표지 항-염소 검출 항체를 사용하여 수행하였다.

[0457] 본원의 도 1에서 제시된 바와 같이, 세정되지 않은 비드를 상이한 HuCAL® 강도로 세정된 비드들과 비교했을 때 Strep-Tactin이 코팅된 비드로부터의 His-Strep-태그가 부착된 DKK1의 현저한 손실이 검출가능하지 않았다. 따

라서, His-Strep-태그가 부착된 DKK1이 Strep-Tactin이 코팅된 자기 비드 (MagStrep 비드)로의 용액 패닝에서 사용하기에 적절한 것으로 생각되었다.

[0458] 라이브러리로부터의 DKK1-특이적 항체의 패닝에 의한 선별

[0459] 인간 DKK1을 인식하는 항체의 선별을 위해, 2가지 패닝 전략이 적용되었다.

[0460] 요약하면, HuCAL GOLD® 파지-항체를 V_H 마스터 유전자의 상이한 조합을 포함하는 4개의 풀(pool)로 분할하였다 (풀 1은 $V_H1/5 \lambda \kappa$ 를 함유하였고; 풀 2는 $V_H3 \lambda \kappa$ 를 함유하였고; 풀 3은 $V_H2/4/6 \lambda \kappa$ 를 함유하였고; 풀 4는 $V_H1-6 \lambda \kappa$ 를 함유하였다). 이러한 풀들에 StrepTactin 자기 비드 (Mega Strep 비드; IBA) 상에 포획된 His-Strep-태그가 부착된 DKK1 상에서의 2회 라운드의 용액 패닝을 개별적으로 적용하고, 3차 선별 라운드에 대해서만, StrepTactin 자기 비드 상에 포획된 His-Strep-태그가 부착된 DKK1, 또는 비오틴화 항-APP 항체가 있는 스트렙타비딘 비드 (Dynabeads® M-280 스트렙타비딘; Dynal)에 의해 포획된 APP-태그가 부착된 인간 DKK1 단백질 상에서 수행하였다.

[0461] 상세하게, StrepTactin 자기 비드에 커플링된 His-Strep-태그가 부착된 DKK1을 사용하는 용액 패닝을 위해, 하기의 프로토콜을 적용하였다: PBS로 1:1 희석된 1.5 ml $2 \times$ ChemiBLOCKER로 하룻밤 동안 4°C에서 처리함으로써 예비-차단된 튜브를 제조하였다 (1.5 ml 에펜도르프 튜브). 예비-차단된 비드를 하기와 같은 처리에 의해 제조하였다: 580 μ l (28 mg 비드) StrepTactin 자기 비드를 580 μ l PBS로 1회 세정하고, 580 μ l $1 \times$ ChemiBLOCKER (1배 부피의 $1 \times$ PBS에 희석됨)에 재현탁시켰다. 비드의 차단을 예비-차단된 튜브에서 하룻밤 동안 4°C에서 수행하였다.

[0462] 각각의 패닝 조건에 대해 500 μ l의 최종 부피로 PBS에 희석된 파지 입자를 500 μ l $2 \times$ ChemiBLOCKER/0.1% 트윈과 혼합하고, 회전 바퀴 상에서 실온에서 1시간 동안 유지시켰다. StrepTactin 또는 비드-결합 파지의 제거를 위한 파지 입자의 예비 흡착을 2회 수행하였다: 160 μ l의 차단된 StrepTactin 자기 비드 (4 mg)를 차단된 파지 입자에 첨가하고, 30분 동안 실온에서 회전 바퀴 상에서 인큐베이션하였다. 자기 장치 (Dynal MPC-E)에 의한 비드의 분리 후, 파지 상청액 (~1.1 ml)을 신선한, 차단된 반응 튜브로 옮기고, 30분 동안 160 μ l의 차단된 비드를 사용하여 예비-흡착을 반복하였다. 그후, His-Strep-태그가 부착된 DKK1 (400 nM 또는 100 nM)을 신선한, 차단된 1.5 ml 반응 튜브 내의 차단된 파지 입자에 첨가하고, 혼합물을 60분 동안 실온에서 회전 바퀴 상에서 인큐베이션하였다.

[0463] 파지-항원 복합체를 각각 400 nM 또는 100 nM 파지 패닝 풀에 첨가된 320 μ l 또는 160 μ l의 차단된 StrepTactin 자기 비드를 사용하여 포획한 후, 20분 동안 실온에서 회전 바퀴 상에서 인큐베이션하였다. StrepTactin 자기 비드에 결합된 파지 입자를 자기 입자 분리기로 다시 수집하였다.

[0464] 그후, 비드를 PBS/0.05% 트윈 (PBST)으로 7회 세정한 후, PBS만으로 다시 3회 세정하였다. 10분 동안 각각의 튜브에 10 mM 트리스-HCl (pH 8.0) 내의 200 μ l 20 mM DTT를 첨가함으로써 StrepTactin 자기 비드로부터 파지 입자를 용출시켰었다. 용출액을 수집하고, 비드를 200 μ l PBS로 1회 세정한 후, PBS 용출액을 DTT 용출액에 첨가하였다. 이러한 용출액 샘플을 사용하여, 0.6-0.8의 OD_{600nm} 로 성장된 대장균 TG-1 배양물 14 ml을 감염시켰다.

[0465] 감염 및 이어지는 10분 동안의 5000 rpm에서의 원심분리 후, 각각의 박테리아 펠렛을 500 μ l $2 \times$ YT 배지에 재현탁시키고, $2 \times$ YT-CG 한천 플레이트 상에 플레이팅하고, 하룻밤 동안 30°C에서 인큐베이션하였다. 다음날 아침, 생성된 콜로니를 플레이트로부터 긁어 내고, 상기 기술된 바와 같은 구제 및 증폭에 의해 파지를 제조하였다.

[0466] His-Strep-태그가 부착된 DKK1 상에서의 2차 라운드의 용액 패닝은 감소되는 양의 항원 (50 nM, 및 10 nM)을 사용하고 세정 절차의 엄격성이 적절하게 변경된 것을 제외하고는 1차 라운드의 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0467] 2가지 상이한 패닝 전략이 3차 선별 라운드에 적용되었다: 2차 패닝 라운드로부터의 증폭된 파지 산출물을 분할하고, 2가지 상이한 패닝 조건에 적용하였다. 파지 산출물의 첫번째 절반은 상기 기술된 바와 같이 StrepTactin 비드 상에 포획된, His-Strep-태그가 부착된 인간 DKK1 상에서의 표준 패닝 전략에 사용하였다 (항원 양은 각각 10 nM 또는 1 nM였다).

[0468] 3차 선별 라운드에 대한 두번째 패닝 변종은 APP-태그가 부착된 인간 DKK1 상에서 수행되었다. 최종 농도 50 nM 또는 10 nM의 APP-태그가 부착된 DKK1 단백질을 예비-세정된 2차 라운드 파지 입자 1 ml와 혼합하고, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 회전 바퀴 상에서 인큐베이션하였다. 이와 병행하여, 8 mg의 예비-차단된 Dynabeads

M-280 스트렙타비딘 (Dynal)을 40 μ g의 비오틴화 마우스 항-APP 항체와 함께 30분 동안 실온에서 회전 바퀴 상에서 인큐베이션한 후, PBST로 2회 세정하였다. APP-태그가 부착된 DKK1에 결합된 파지-항체로 구성된 예비-형성된 복합체를 항-APP가 코팅된 M-280 스트렙타비딘 자기 비드에 의해 30분 동안 실온에서 포획하였다. 파지 용출 및 증폭은 상기 기술된 바와 같이 수행하였다.

[0469] 가용성 Fab 단편의 서브클로닝 및 발현

[0470] 가용성 Fab의 신속하고 효율적인 발현을 용이하게 하기 위해, 선별된 HuCAL GOLD® 파지미드의 Fab-코딩 삽입물을 발현 벡터 pMORPH®X9_Fab_FH 내로 서브클로닝하였다. 이러한 목적을 위해, 선별된 클론의 플라스미드 DNA를 제한 효소 엔도뉴클레아제 *Xba*I 및 *Eco*RI으로 소화시킴으로써, Fab-코딩 삽입물 (ompA-VLCL 및 phoA-Fd)을 절단하였다. 그 후, 이러한 삽입물을 *Xba*I/*Eco*RI으로 소화된 발현 벡터 pMORPH®X9_Fab_FH 내로 클로닝하였다.

[0471] Fab 단백질이 이러한 벡터로부터 발현되었고, 결과적으로 검출 및 정제 모두를 위한 2개의 C-말단 태그 (각각 FLAG™ 및 6×His)를 보유하였다.

[0472] 대장균에서의 HuCAL GOLD® Fab 항체의 미세발현

[0473] 상기에서 수득된 각각의 클론에 의해 코딩된 단백질을 충분한 양으로 수득하기 위해, 선별된 Fab를 pMORPH®X9_Fab_FH 발현 벡터 내로 서브클로닝한 후 클로람페니콜-저항성 단일 박테리아 콜로니를 선별하였다. 각각의 이러한 콜로니들을 각각의 웰이 100 μ l 2×YT-CG 배지/웰을 함유하는 무균성 96웰 미량역가 플레이트의 웰에 접종하는데 사용하였고, 박테리아를 하룻밤 동안 37℃에서 성장시켰다. 각각의 대장균 TG-1 배양물의 샘플 (5 μ l)을 웰 당 34 μ g/ml 클로람페니콜 및 0.1% 글루코스가 보충된 100 μ l 2×YT 배지가 미리 충전된 신선한, 무균성 96웰 미량역가 플레이트로 옮겼다. 약 0.5의 OD_{600nm}로 배양물이 약간 혼탁해질 때까지 (~2-4시간), 미량역가 플레이트를 마이크로플레이트 진탕기 상에서 400 rpm으로 진탕하면서 30℃에서 인큐베이션하였다.

[0474] 이러한 플레이트의 포맷에서의 발현을 위해, 34 μ g/ml 클로람페니콜 및 3 mM IPTG (이소프로필-β-D-티오갈락토 피라노시드)가 보충된 20 μ l 2×YT 배지를 웰마다 첨가하고 (최종 농도 0.5 mM IPTG), 미량역가 플레이트를 기체-투과성 테이프로 밀봉하고, 400 rpm으로 진탕하면서 하룻밤 동안 30℃에서 인큐베이션하였다.

[0475] 전체 세포 용해물의 생성 (BEL 추출물)

[0476] 발현 플레이트의 각각의 웰에, 2.5 mg/ml 라이소자임을 함유하는 40 μ l BEL 완충제 (2×BBS/EDTA: 24.7 g/l 봉산, 18.7 g NaCl/l, 1.49 g EDTA/l, pH 8.0)를 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 22℃에서 미량역가 플레이트 진탕기 (400 rpm) 상에서 인큐베이션하였다. BEL 추출물을 FMAT에 의한 결합 분석에 사용하였다 (실시예 2 참조).

[0477] 대장균에서의 μ g 양의 HuCAL GOLD® Fab 항체의 발현 및 정제

[0478] 대장균 TG1 F-세포에서의 pMORPH®X9_Fab_FH에 의해 코딩되는 Fab 단편의 발현을 50 ml 플라스틱 튜브에서 수행하였다. 이러한 목적을 위해, 단일 클론이 접종된 예비-배양물을 2×YT-CG 배지에서 하룻밤 동안 30℃에서 성장시켰다. 다음날 아침, 각각의 예비-배양물 50 μ l를 사용하여 무균성 50 ml 플라스틱 튜브 내의 34 μ g/ml 클로람페니콜, 1 mM IPTG, 및 0.1% 글루코스가 보충된 2×YT 배지 25 ml에 접종하고, 하룻밤 동안 30℃에서 인큐베이션하였다. 대장균 세포를 수확하고, 세포 펠렛을 냉동시키고, 최종적으로 Bug Buster (Novagen)로 파괴시켰다. Fab 단편을 Ni-NTA 아가로스 (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 분리하였다.

[0479] 대장균에서의 mg 양의 HuCAL GOLD® Fab 항체의 발현 및 정제

[0480] TG1 F-세포에서의 pMORPH®X9_Fab_FH에 의해 코딩되는 Fab 단편의 발현을 34 μ g/ml 클로람페니콜이 보충된 2×YT 배지 750 ml를 사용하여 진탕 플라스크 배양물에서 수행하였다. OD_{600nm}가 0.5에 도달할 때까지 배양물을 30℃에서 진탕시켰다. 0.75 mM IPTG를 첨가하여 발현을 유도한 후, 20시간 동안 30℃에서 인큐베이션하였다. 라이소자임을 사용하여 세포를 파괴하고, Fab 단편을 Ni-NTA 크로마토그래피 (Qiagen, Hilden, Germany)에 의해 분리하였다. 단백질 농도를 UV-분광광도법에 의해 결정하였다 ([Krebs et al., 2001]).

[0481] 실시예 2: DKK1-특이적 HuCAL® 항체의 확인

[0482] 상기 언급된 패닝 전략에 의해 선별된 개별적인 대장균 클론의 BEL 추출물을 형광측정 미세부피 분석 기술 (Fluorometric Microvolume Assay Technology) (FMAT™, 8200 Cellular Detection System analyzer, Applied Biosystems (Foster City, Calif.))에 의해 분석하여, DKK1-특이적 Fab를 코딩하는 클론을 확인하였다. FMAT

TM 8100 HTS 시스템은 살아 있는 세포 또는 비드로의 혼합-및-판독, 비-방사성 분석의 검출을 자동화하는 형광 매크로-공초점, 고처리량 스크리닝 기기이다 ([Miraglia, J. Biomol. Screening (1999), 4(4) 193-204]).

[0483] 박테리아 용해물로부터의 DKK1-결합 Fab의 검출을 위한 형광측정 미세부피 분석 기술을 기반으로 하는 결합 분석 (FMAT)

[0484] 대장균 용해물 (BEL 추출물)로부터 DKK1-결합 Fab 항체를 검출하기 위해, FMAT 8200 세포 검출 시스템 (Applied Biosystems)으로 결합을 분석하였다. His-Strep-태그가 부착된 DKK1을 M-450 에폭시 비드 (Dynal)에 커플링시키기 위해, 300 μ l M-450 에폭시 비드 (1.2×10^8 개의 비드)의 샘플을 반응 튜브로 옮기고, 자기 입자 분리기로 포획하였다. 상층액을 제거하고, 비드를 1 ml의 100 mM 인산나트륨 완충제 (pH 7.4)에서 4회 세정하였다. 항원 코팅을 위해, 60 μ g의 His-Strep-태그가 부착된 DKK1를 150 μ l의 100 mM 인산나트륨 완충제 (pH 7.4) 내의 비드 현탁액에 첨가하였다. 항원-비드 현탁액을 16시간 동안 실온에서 회전 바퀴 상에서 인큐베이션하였다. 그후, 코팅된 비드를 PBS로 3회 세정하고, 최종 부피 250 μ l로 PBS에 재현탁시켰다.

[0485] 각각의 384웰 플레이트에 대해, 3% BSA, 0.005% 트윈-20, 4 μ l DKK1-코팅 비드 (1.9×10^6 개의 비드) 및 4 μ l Cy5TM 검출 항체를 함유하는 20 ml PBS의 혼합물을 제조하였다. 웰 당 45 μ l의 이러한 용액의 샘플을 384웰 FMAT 흑색/투명 바닥 플레이트 (Applied Biosystems) 내로 분배하였다. Fab-함유 BEL 추출물 (5 μ l)을 각 웰에 첨가하였다. FMAT 플레이트를 실온에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 다음날 아침, 플레이트를 8200 세포 검출 시스템 (Applied Biosystems)에서 분석하였다.

[0486] 양성 클론을 수득하고, FMAT에서 양성의 특정 신호가 산출된 클론의 중쇄 및 경쇄 서열을 분석하였다. 인간 DKK1에 대해 충분한 강한 결합을 나타낸 57개의 독특한 (비-중복성) 항-DKK1 클론이 확인되었다. 이러한 클론들을 발현시키고, 정제하여, 친화력에 대해, 그리고 기능성 분석에서 테스트하였다.

[0487] 표면 플라즈몬 공명을 사용하는 나노몰 친화력의 결정

[0488] 이러한 클론들을 사용하여, 표준 EDC-NHS 아민 커플링 화학을 사용하여 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.5) 내의 제조합 인간 DKK1, 마우스 DKK1 (R&D system), 또는 사이노몰구스 DKK1으로 ~400 RU의 밀도로 코팅된 CM5 칩 (Biacore, Sweden) 상에서 키네틱 SPR 분석을 수행하였다. 필적하는 양의 인간 혈청 알부민 (HSA)이 기준 유동 세포 상에 고정되었다. PBS (136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na2HPO4, 1.76 mM KH2PO4 pH 7.4)를 러닝 (running) 완충제로 사용하였다. Fab 제제를 20 μ l/분의 유속으로 일련의 16-500 nM의 농도로 적용하였다. 회합 단계를 60초로 설정하였고, 해리 단계를 120초로 설정하였다. 이러한 방법에 의해 결정된 각각의 인간, 마우스, 및 사이노몰구스 DKK1에 대한 친화력 (nM 단위)이 본원의 표 1에서 제시된다.

표 1

각각의 인간, 마우스 및 사이노몰구스에 대한 선별된 Fab의 친화력

항체	KD [nM] 인간 DKK1	KD [nM] 마우스 DKK1*	KD [nM] 사이노몰구스 DKK1*
MOR04470	3.2 \pm 2.0	3.6	1.7
MOR04516	2.6 \pm 0.7	2.4	1.9
MOR04454	3.2 \pm 0.4	6	2.7
MOR04456	7.9 \pm 0.9	11.6	8.1
MOR04461	7.6 \pm 3.3	12.8	7.3
MOR04455	1.6 \pm 0.3	n.d.	1.5

*1회 측정
n.d.: 결정되지 않음

[0489]

[0490] 실시예 3: DKK1의 Wnt 길항 활성을 억제하는 항-인간 DKK1 Fab 후보물질의 확인

[0491] HuCAL GOLD® 라이브러리로부터 선별된, 생성된 57개의 상이한 DKK1-특이적 항체를 사용하여 정제된 항체를 수득한 후, 이를 인간 DKK1의 Wnt 길항 활성을 억제하는 잠재력에 대해 테스트하였다. 이들 중, 도 2 및 4에 제시된 바와 같이, 17개의 항체 후보물질이 기능적으로 활성이었다.

[0492] 루시페라제 리포터 유전자 분석을 사용하여 각각의 HuCAL® Fab의 기능적 활성을 점검하였다. 12개의 TCF/Lef 결합 부위가 루시페라제 리포터 유전자의 상류에서 클로닝되어, 루시페라제 유전자가 TCF/Lef-응답성하도록 하였다. 정규 Wnt 단백질은 베타-카테닌의 안정화에 이르기으로써, TCF/Lef의 전사를 활성화시키고 루시페라제 단백질을 생산하였다. DKK1 단백질의 첨가는 Wnt 활성을 차단하고, 따라서 루시페라제 유전자의 전사를 또한 차단하였다. 결과적으로, 각각의 세포에 의해 생산된 루시페라제 수준이 선별된 Fab의 DKK1 작용을 차단하는 잠

재력과 상호관련될 것으로 예상되었다.

[0493] 안정적인 TCF/Lef-응답성 리포터 세포주 HEK293T/17-12xSTF

[0494] 안정적인 인간 배아 신장 세포 리포터 세포주 HEK293T/17-12xSTF를 사용하여 생물학적 분석을 수행하였다. 10 % FCS (PAN 또는 BioWhittaker) 및 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 푸로마이신 (BD Biosciences)을 함유하는 DMEM 고(高) 글루코스 배지 (Invitrogen)에서 90% 전면성장에 도달할 때까지 세포를 배양하였다. 그후, 세포를 트립신으로 처리하고, 계수하고, 푸로마이신이 없는 배양 배지에서 4×10^5 개의 세포/ ml 로 희석하였다. 이어서, 세포를 백색의 편평 바닥 96웰 플레이트 (Corning; 100 μl 세포 현탁액/웰) 내로 과중하고, 37°C 및 5% CO_2 에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 다음날, 분석 배지를 제조하였다: 500 ng/ ml DKK1-APP를 Wnt3a 컨디셔닝 배지 (CM) 내로 첨가하였다. 항-DKK1 HuCAL® Fab (최종 농도 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 양성 대조군으로 사용된 염소 항-인간 DKK1 항체 (R&D Systems) (최종 농도 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 CM에서 희석하였다.

[0495] 부착된 세포를 파괴시키지 않으면서 분석 플레이트의 각각의 웰로부터 60 μl 부피의 배지를 제거하고, CM 내에 희석된 테스트 항체 또는 대조군 60 μl 로 대체하였다. 세포를 추가로 24시간 동안 인큐베이션하고, 100 μl Bright-Glo 루시페라제 시약을 각각의 웰에 첨가하였다. 5분 인큐베이션 후, 발광계 (GenioPro, Tecan)에서 발광을 판독하였다. 57개의 Fab 중 20개로 수득된 결과가 본원의 도 2에서 제시된다. 루시페라제 발현 정도가 항원이 존재하는 정도의 척도이다.

[0496] 실시예 4: 결합 친화력의 정량적 분석: DKK1의 Wnt-길항 활성을 억제하는 항-인간 DKK1 Fab 후보물질의 결정

[0497] 친화력 결정

[0498] 항-DKK1 항체를 추가적으로 특성화하기 위해, 인간, 사이노몰구스, 및 마우스 DKK1에 대한 친화력을 결정하였다. 재조합 DKK1 단백질을 CM5 Biacore 칩 상에 고정시키고, Fab들을 상이한 농도의 이동상에 적용하였다. 1가 친화력의 신뢰할 수 있는 결정을 위해, 크기 배제 크로마토그래피에서 $\geq 90\%$ 단량체성 분획을 나타낸 Fab 배치(batch)만이 Biacore 측정에 사용되었다.

[0499] 인간, 마우스, 및 사이노몰구스 DKK1에 대한 요약된 친화력 데이터가 표 2에서 제시된다. 모든 17개의 테스트된 Fab는 인간 DKK1에 대한 친화력이 100 nM 미만인 것으로 발견되었다. 또한, 클론들 중 9개는 친화력이 10 nM 미만인 항체를 생산하였다. 모든 테스트된 사례들에서, 사이노몰구스 및 마우스 DKK1에 대한 친화력은 인간 DKK1에 대한 것들과 거의 동일하였다.

표 2

인간, 마우스 및 사이노몰구스에 대한 선별된 Fab의 친화력 데이터

항체	KD [nM] 인간 DKK1	KD [nM] 마우스 DKK1*	KD [nM] 사이노몰구스 DKK1*
MOR04480	1.0 \pm 0.0	2	n.d.
MOR04455	1.6 \pm 0.3	n.d.	1.5
MOR04516	2.6 \pm 0.7	2.4	1.9
MOR04470	3.2 \pm 2.0	3.6	1.7
MOR04454	3.2 \pm 0.4	6	2.7
MOR04483	5.5 \pm 0.7	n.d.	n.d.
MOR04466	6.5 \pm 2.1	n.d.	n.d.
MOR04461	7.6 \pm 3.3	12.8	7.3
MOR04456	7.9 \pm 0.9	11.6	8.1
MOR04462	16.5 \pm 2.1	n.d.	n.d.
MOR04447	22*	n.d.	n.d.
MOR04469	36 \pm 0.0	n.d.	n.d.
MOR04482	36 \pm 5.7	n.d.	n.d.
MOR04468	41.5 \pm 21.9	n.d.	n.d.
MOR04476	44*	n.d.	n.d.
MOR04481	65*	n.d.	n.d.
MOR04503	93*	n.d.	n.d.

*1회 측정

n.d.: 결정되지 않음

[0500]

[0501] EC50 결정

[0502] DKK1에 대한 친화력이 가장 높은 항체들의 클론에 대한 50% 억제를 위한 유효 농도를 나타내는 데이터가 본원의 표 3에서 제시된다. 이 데이터는 유효 농도 EC₅₀이 39-95 nM 범위이고, 중앙값은 58 내지 83 nM 사이임을

나타냈다.

표 3

선별된 Fab의 50% 억제에 위한 유효 농도

항체	루시페라제 리포트 분석 EC ₅₀ [nM]
MOR04470	58
MOR04516	42
MOR04454	83
MOR04456	95
MOR04461	57
MOR04455	39

실시예 5: LCDR3 및 HCDR2 카세트의 평행 교환에 의한 선별된 항-DKK1 Fab의 친화력 성숙

어버이 Fab 단편의 풀을 위해 DKK1에 대한 본원에 기술된 항체의 친화력을 최적화하기 위해, 각각의 어버이 Fab의 경쇄의 LCDR3, 프레임워크 4 및 불변 영역 (405 bp)을 *BpiI* 및 *SphI*를 사용하여 제거하고, 프레임워크 4 및 불변 도메인과 함께 다양화된 LCDR3의 레퍼토리로 대체하였다. 바인더 풀 벡터 0.5 µg의 샘플을 3배 물 과량의 다양화된 LCDR3를 보유하는 삽입물 단편과 결합시켰다.

유사한 접근법으로, HCDR2를 *XhoI* 및 *BssHII* 부위를 사용하여 다양화시켰고, 연결 프레임워크 영역은 불변으로 유지시켰다. 클로닝 효율을 증가시키기 위해, 다양화된 HCDR2 카세트의 삽입 전에 어버이 HCDR2를 590 bp 스테퍼(stuffer) 서열로 대체하였다.

11개의 상이한 라이브러리의 결합 혼합물을 4 ml 대장균 TOP10 F' 세포 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 내로 전기천공시켜, 2×10^7 내지 2×10^8 개의 독립적인 콜로니들이 산출되었다. 라이브러리의 증폭을 기존에 기술된 바와 같이 수행하였다 ([Rauchenberger et al., 2003 J Biol Chem. 278(40):38.194-38205]). 품질 제어를 위해, 라이브러리 당 여러개의 클론을 무작위로 골라서, 프라이머 CFR84 (VL) 및 OCAL_Seq_Hp (VH)를 사용하여 서열분석하였다 (SequiServe, Vaterstetten, Germany).

친화력 성숙에 대한 후보물질의 선별

하기의 성질을 갖는 것으로 특성화된 것에 의해 6개의 선별된 돌연변이 후보물질 ("어버이 Fab")을 선별하였다: 사이노물구스 및 마우스 DKK1에 대한 상당한 교차-반응성과 함께 10 nM 미만의 인간 DKK1에 대한 친화력, 100 nM 미만의 EC₅₀, 및 양호함 내지 중등도의 대장균에서의 Fab 발현 수준, 및 Fab 정제 후 응집 결여.

친화력 측정 과정 동안, MOR04480이 고도의 회석에서 매우 불안정하다는 것이 명백해졌다. 이러한 이유로, 모든 테스트된 Fab들 중 가장 높은 친화력 (1 nM) 및 최상의 EC₅₀ (7 nM)에도 불구하고 MOR04480은 성숙 후보물질의 목록에서 제거되었다. MOR04483은 인간 DKK1에 대한 친화력이 5.5 nM으로 높았지만, 마우스 DKK1에 교차반응성인 것으로 나타났고, MOR04453은 정제 후 높은 비율의 Fab 응집물을 함유하였다. 따라서, 이러한 2개의 항체를 성숙에서 또한 배제하였다.

모든 입수가능한 데이터의 주의깊은 평가 후, 6개의 성숙 후보물질 (MOR04454, MOR04455, MOR04456, MOR04461, MOR04470, 및 MOR04516)을 선별하였다. 이러한 후보물질들의 성질이 본원의 표 4에서 열거된다.

표 4

선별된 Fab의 성질

항체	KD [nM] 인간 DKK1	KD [nM] 마우스 DKK1*	KD [nM] 사이노물구스 DKK1*	EC ₅₀ [nM]	교차반응성 (마우스)	Fab 발현 [mg/l]	크기 배제 크로마토그래피
MOR04470	3.2 ± 2.0	3.6	1.7	58	++	32.8	#
MOR04516	2.6 ± 0.7	2.4	1.9	42	++	1.5	#
MOR04454	3.2 ± 0.4	6	2.7	83	++	17.8	#
MOR04456	7.9 ± 0.9	11.6	8.1	95	++	10.7	#
MOR04461	7.6 ± 3.3	12.8	7.3	57	++	12	#
MOR04455	1.6 ± 0.3	n.d.	1.5	39	++	9	#

*1회 측정
n.d.: 결정되지 않음
단량체성 부분 > 90%

친화력 성숙을 위한 선별된 Fab 라이브러리의 생성

[0514] 항-DKK1 항체의 친화력 및 억제 활성이 증가된 클론을 수득하기 위해, 이전의 실시예에서 제시된 선별된 Fab 클론 MOR04454, MOR04455, MOR04456, MOR04461, MOR04470, 및 MOR4516에 추가적인 라운드의 다양화 및 선별 (친화력 성숙으로 공지된 공정)을 적용하였다.

[0515] 이러한 목적을 위해, 트리뉴클레오타이드 돌연변이유발에 의해 미리 구축된 상응하는 LCDR3 및 HCDR2 성숙 카세트를 사용하여 CDR 영역을 다양화시켰다 ([Virnekas et al., 1994 Nucleic Acids Res. 22:5600-5607]; [Nagy et al., 2002 Nature Medicine 8:801-807]). 본원의 표 5는 어버이 클론 MOR04454, MOR04455, MOR04456, MOR061, MOR04470 및 MOR4516에 대한 LCDR3 서열을 나타낸다.

표 5

선별된 Fab에 대한 LCDR3 서열

항체	VL	LCDR3 서열	서열 번호
MOR04454	K1	LQYYGMPP	21
MOR04455	K1	QQYDSIPM	22
MOR04456	K3	QQYGDEPI	23
MOR04470	L2	QSYASGNTKV	25
MOR04461	L2	STWDMTVDF	24
MOR04516	L1	ASFDMGSPNV	26

[0516]

[0517] 본원의 표 6은 어버이 클론 MOR04454, MOR04455, MOR04456, MOR061, MOR04470 및 MOR4516에 대한 HCDR2 서열을 나타낸다.

표 6

선별된 Fab에 대한 HCDR2 서열

항체	VH	HCDR2 서열	서열 번호
MOR04454	H3	DGSHMDKPPGYVFAF	2
MOR04455	H3	HYMDH	3
MOR04456	H3	TIYMDY	4
MOR04461	H3	MGIDL DY	5
MOR04470	H3	HGIDFDH	6
MOR04516	H5	GIPFRMRGFDY	7

[0518]

[0519] 발현 벡터 pMORPH®X9_Fab_FH로부터의 Fab 단편을 파지미드 벡터 pMORPH®25 내로 서브클로닝하였다 (미국 특허 번호 6,753,136 참조). 이러한 벡터는 시스테인 잔기에 N-말단 융합된 파지 단백질 pIII, 뿐만 아니라 C-말단 시스테인을 Fd 항체 사슬에 제공하고, 따라서 파지 표면 상에서의 각각의 Fab 단편의 디스플레이를 허용한다. 어버이 Fab의 친화력 및 효능 모두를 최적화하기 위해 2가지 상이한 전략이 병렬로 적용되었다.

[0520] 6개의 어버이 클론 중 5개의 LCDR3가 개별적인 경쇄 CDR3 서열의 레퍼토리로 대체된 5개의 파지 항체 Fab 라이브러리가 생성되었다. MOR04454의 LCDR3 성숙은 수행되지 않았는데, 이는 이러한 클론에 추가적인 *BpiI* 제한 부위가 CDR 영역들 중 하나 내에 있고, *BpiI* 제한 효소가 라이브러리 클로닝 절차에 사용되기 때문이다.

[0521] 이와 병행하여, 각각의 어버이 클론의 HCDR2 영역이 개별적인 중쇄 CDR2 서열의 레퍼토리로 대체되었다. 각각의 어버이 Fab를 절단하고, 590 bp 스테퍼로 대체하였다. 이러한 DNA 스테퍼는 이중 소화된 벡터 밴드로부터 단일 소화된 벡터 밴드의 분리를 용이하게 하고, 성숙 패닝 동안 고친화력 어버이 Fab의 배경값을 감소시킨다. 후속 단계에서, 스테퍼를 각각의 어버이 클론의 Fab-코딩 플라스미드로부터 절단하고, 고도로 다양화된 HCDR2 성숙 카세트에 대체하였다.

[0522] 2×10^7 개의 구성원을 초과하는 대형 친화력 성숙 라이브러리가 표준 클로닝 절차에 의해 생성되었고, 다양화된 클론들을 전기-수용성 대장균 TOP10 F' 세포 (Invitrogen) 내로 형질전환시켰다. Fab를 제시하는 파지들을 상기 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조하였다.

[0523] 후속 선별 공정을 용이하게 하기 위해 4개의 성숙 풀들 구축하였다: 풀 1a는 MOR04470, 및 MOR04516 LCDR3 라이브러리로 구성되었고; 풀 1b는 MOR04470, 및 MOR04516 HCDR2 라이브러리로 구성되었으며; 풀 2a는 MOR04454, MOR04455, MOR04456, 및 MOR04461 LCDR3 라이브러리로 구성되었으며; 풀 2b는 MOR04454, MOR04455, MOR04456, 및 MOR04461 HCDR2 라이브러리로 구성되었다.

[0524] 각각의 풀에 대해, 감소되는 양의 His-Strep-태그가 부착된 DKK1 및 Strep-Tactin 비드에 의한 파지-항원 포획을 사용하여 용액에서 패닝을 수행하였다. 이와 병행하여, 각각의 풀을 감소되는 양의 비오틴화 DKK1을 사용하

는 패닝에 적용하였고, 이는 뉴트라비딘(Neutravadin)이 코팅된 플레이트 상에 포획된다. 패닝 엄격성을 증가시키고, 개선된 오프(off) 속도에 대해 선별하기 위해, 정제된 어버이 Fab, 뿐만 아니라 표지되지 않은 항원과 경쟁을 장기 인큐베이션 기간 동안 수행하였다.

[0525] 패닝 직후, 강화된 파지미드 풀을 pMORPH®X9_FH 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다. 약 2300개의 단일 클론을 채집하고, Fab를 IPTG로 유도하였다.

[0526] 성숙 패닝 전략

[0527] 4개의 항체 풀을 사용하는 패닝 절차를 His-Strep-태그가 부착된 DKK1 및 His-Strep-태그가 부착된 비오틴화 DKK1으로 용액에서 각각 2회 또는 3회 라운드 수행하였다. 각각의 패닝 전략에 대해, 정제된 어버이 Fab 단백질 또는 표지되지 않은 APP-태그가 부착된 DKK1과의 경쟁, 뿐만 아니라 낮은 항원 농도 및 광범위한 세정을 사용하여 엄격성을 증가시켰다.

[0528] 표지되지 않은 His-Strep-태그가 부착된 DKK1에 대한 용액 패닝을 주로 실시예 1에 기술된 표준 프로토콜에 따라 2회의 선별 라운드에 걸쳐 수행하였다. 이러한 절차에 대한 예외는 감소된 양의 항원 (5 nM에서 1 nM로 감소), 경쟁물질과 함께 또는 경쟁물질 없이 높은 엄격성의 세정 절차, 및 항원과 함께 항체-파지의 장기간의 인큐베이션 기간을 적용하는 것이었다.

[0529] 비오틴화 DKK1을 사용하는 1차 선별 라운드를 위해, 뉴트라비딘 플레이트의 웰을 300 μ l PBS로 2회 세정하였다. 웰을 PBS (차단 완충제) 내에 1:1 희석된 2 \times ChemiBLOCKER (Chemicon, Temecula, CA)로 차단하였다. 선별 전에, HuCAL GOLD® 파지를 0.1% 트윈-20을 함유하는 1배 부피의 차단 완충제로 30분 동안 실온에서 또한 차단하였다. 차단된 파지 제제를 뉴트라비딘이 코팅된 플레이트의 웰로 100 μ l 분취량으로 30분 동안 실온에서 옮겼다. 이러한 예비-흡착 단계를 1회 반복하였다. 차단 및 예비-세정된 파지 제제를 5 nM 비오틴화 DKK1과 함께 2시간 동안 22°C에서 회전 바퀴 상에서 인큐베이션하였다. 어버이 Fab 또는 APP-DKK1을 첨가하거나 경쟁물질을 첨가하지 않았고, 샘플을 하룻밤 동안 4°C에서 회전 바퀴 상에서 인큐베이션하였다.

[0530] 항원-파지 복합체를 뉴트라비딘 플레이트의 웰에서 20분 동안 실온에서 포획하였다. 광범위한 세정 단계 후, 10 mM 트리스 pH 8.0 내의 20 mM DTT 200 μ l/웰을 10분 동안 실온에서 첨가함으로써, 결합된 파지 입자를 용출시켰다. 용출액을 제거하여, 0.6-0.8의 OD_{600nm}로 성장된 대장균 TG1 세포 14 ml에 첨가하였다. 웰을 200 μ l PBS로 1회 헹군 후, 이러한 용액을 또한 대장균 TG1 세포에 첨가하였다. 45분 동안 37°C에서 진탕하지 않으면서 대장균이 파지로 감염되도록 하였다. 10분 동안 5000 rpm에서 원심분리한 후, 박테리아 펠렛을 각각 500 μ l의 2 \times YT 배지에 재현탁시키고, 2 \times YT-CG 한천 플레이트 상에 플레이트팅하고, 하룻밤 동안 30°C에서 인큐베이션하였다. 플레이트의 표면으로부터 긁어내어 콜로니들을 수확하고, 상기 기술된 바와 같이 파지 입자를 구제하여 증폭시켰다.

[0531] 2차 및 3차 선별 라운드는 1차 선별 라운드에 대해 상기 기술된 바와 같이 수행하였고, 단 세정 조건이 더욱 엄격하였고, 항원 농도는 각각 1 및 0.1 nM였다.

[0532] DKK1 결합 Fab의 전기화학발광 (BioVeris)을 기초로 하는 결합 분석

[0533] 대장균 용해물 (BEL 추출물) 내의 친화력이 개선된, DKK1-특이적 항체 단편을 검출하기 위해, BioVeris M-384 SERIES® Workstation (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK)을 사용하였다. 이 분석법은 96웰 폴리프로필렌 미량역가 플레이트에서 0.5% BSA 및 0.02% 트윈-20이 보충된 PBS를 분석 완충제로 하여 수행되었다. 비오틴화 인간 DKK1을 M-280 스트렙타비딘 상자성 비드 (Dyna1) 상에 공급업자의 사용설명서에 따라 고정하였다. 비드 모액의 1:25 희석물을 웰마다 첨가하였다. 희석된 BEL 추출물의 100 μ l 샘플 및 비드를 하룻밤 동안 실온에서 진탕기 상에서 인큐베이션하였다. 검출을 위해, 공급업자 (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK)의 사용설명서에 따라 BV-태그™으로 표지된 항-인간 (Fab)'2 (Dianova)가 사용되었다.

[0534] 약 2300개의 무작위로 채집된 클론의 셋트를 상기 기술된 방법에 의해 분석하였다. 가장 높은 값을 제공한 160개 클론의 하위집단을 용액 평형 적정에서의 추가적인 분석을 위해 선택하였다.

[0535] 용액 평형 적정 (SET)을 사용하는 피코몰 친화력의 결정

[0536] K_D를 결정하기 위해, Fab의 단량체 분획 (분석용 SEC에 의해 90% 이상의 단량체 함량으로 분석됨; Superdex75, Amersham Pharmacia)을 사용하였다. 전기화학발광 (ECL)을 기초로 하는 용액에서의 친화력 결정 및 데이터 평가는 [Haenel et al., 2005]에 기술된 바와 같이 기본적으로 수행하였다. 일정한 양의 Fab를 용액 내의 상이한

농도 (일련의 3" 희석)의 인간 DKK1 (4 nM 출발 농도)로 평형화시켰다. 상자성 비드 (M-280 Streptavidin, Dynal)에 커플링된 비오틴화 인간 DKK1, 및 BV-태그™ (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK)이 표지된 항-인간 (Fab)'2 (Dianova)를 첨가하고, 혼합물을 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 결합되지 않은 Fab의 농도를 M-SERIES® 384 분석기 (BioVeris Europe)를 사용하여 ECL 검출에 의해 정량하였다.

[0537] 이러한 목적을 위해, 160개의 단일 클론을 선별하고 Ni-NTA 아가로스에 의해 μg 규모로 정제하였다. BioVeris에서의 4-포인트 용액 평형 적정 (SET)에 의해 예비 친화력을 결정하였다. 이러한 데이터로부터, 친화력을 나타내는 20개의 클론을 선별하였다. 이러한 Fab들을 mg 규모로 정제하였다. 크기 배제 크로마토그래피에서 검출된 Fab의 부분적인 응집으로 인해, MOR04950은 친화력 결정 및 추가적인 평가에서 배제하였다. 8-포인트 SET 측정 및 인간, 마우스, 및 사이노몰구스 DKK1을 사용하여 각각의 Fab 클론의 2개의 독립적인 배치로부터 최종 친화력을 결정하였다.

[0538] 마우스 및 사이노몰구스 DKK1에 대한 친화력 결정은 마우스 DKK1 (R&D Systems) 및 사이노몰구스 DKK1을 인간 DKK1 대신 용액 내에서 분석물로 사용하여 본질적으로 상기 기술된 바와 같이 수행하였다. 유리 Fab의 검출을 위해, 상자성 비드에 커플링된 비오틴화 인간 DKK1을 사용하였다. [Haenel et al., 2005 Anal Biochem 339.1:182-184]에 따라 친화력을 계산하였다.

[0539] 상기 기술된 분석 조건을 사용하여, 친화력이 최적화된 항-DKK1 Fab의 친화력을 용액에서 결정하였다. MOR04910 및 MOR04946에 대해 친화력을 결정하였고, K_D 는 인간 DKK1에 대해 30 pM 미만이고, 마우스 및 사이노몰구스 DKK1에 대해 36 내지 42 pM이었다. 추가적인 7개의 항체가 모든 3가지 항원에 대해 100 pM 미만의 친화력을 나타냈다. 클론 MOR04950은 비오틴화 DKK1에 대한 결합을 나타내지 않았다. 친화력이 본원의 표 7에 요약된다.

표 7

Fab의 친화력

	친화력 [pM]: 용액 평형 적정*		
항체	인간 DKK1	사이노몰구스 DKK1	마우스 DKK1
MOR04913	38 ± 8	51 ± 10	44 ± 48
MOR04946	25 ± 9	36 ± 9	41 ± 15
MOR04907	114 ± 7	170 ± 35	167 ± 68
MOR04945	69 ± 18	80 ± 31	74 ± 21
MOR04914	94 ± 5	140 ± 3	200 ± 261
MOR04920	53 ± 37	50 ± 20	40 ± 30
MOR04954	110 ± 54	112 ± 25	36 ± 4
MOR04952	100 ± 12	58 ± 17	71 ± 34
MOR04948	57 ± 8	67 ± 17	65 ± 25
MOR04910	24 ± 3	37 ± 11	42 ± 38
MOR04921	배치에 따른 변동이 높음		
MOR04947	32 ± 19	58 ± 35	30 ± 17
MOR04951	136 ± 120	62 ± 2	132 ± 90
MOR04918	110-690	236 ± 23	550-3144
MOR04919	64 #	132 #	111 #
MOR04949	30 ± 23	55 ± 35	65 ± 36
MOR04922	90 #	70 #	50 #
MOR04911	140 #	190 #	650 #
MOR04950	결합 없음		

*: 2가지 상이한 Fab 배치로부터 2회 이상의 독립적인 측정이 수행됨

#: 오직 1회의 측정

[0540]

[0541] 실시예 6: 친화력이 최적화된 항-인간 DKK1 Fab의 특성화

[0542] 효소 결합 면역흡착 분석법 (ELISA) 기술

[0543] 50% 인간 혈청 (HS)의 존재 하의 성숙된 Fab의 결합 특이성을 결정하였다. TBS 내의 비오틴화된 인간 재조합 DKK1을 뉴트라비딘 미량역가 플레이트 상에 2시간 동안 실온에서 코팅하였고, 이때 DKK1의 농도는 웰 당 8 ng 내지 웰 당 125 ng였다. 항원의 코팅 후, 웰을 1% BSA가 보충된 TBS/0.05% 트윈 (TBS-T)으로 1시간 동안 실온에서 차단하였다. 상기 기술된 정제된 Fab를 TBS/4% BSA 또는 TBS/50% HS에 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 최종 농도로 희석하고, 코팅 및 차단된 웰에 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 검출을 위해, 항-FLAG 알칼리성 포스파타제 (AP)-접합 항체 (TBST에서 1:5000 희석) 및 형광원성 기질인 AttoPhos (Roche)가 사용되었

다. 각각의 인큐베이션 후, 미량역가 플레이트의 웰을 TBST로 5회 세정하였고, 단 최종 인큐베이션 단계 후에는 웰이 3회 세정되었을 때 표지된 2차 항체가 첨가되었다.

[0544] TECAN Spectrafluor 플레이트 판독기에서 형광을 측정하였다. 대표적인 결합 곡선이 본원의 도 3에서 제시된다. 표 8은 4% BSA 내에서의 결합 활성과 비교하여 50% 인간 혈청의 존재 하의 최적화된 항-DKK1 Fab의 결합 활성을 요약하고, 이는 83% 내지 100% 범위였다. 중앙값이 93%인 것으로 발견되었고, 따라서 항-DKK1 Fab는 인간 혈청의 존재 하에 표적에 충분히 결합하는 것으로 발견되었다.

표 8

Fab의 결합 활성

항체	50% 인간 혈청 대 4% BSA에서의 결합 활성 (%)
MOR04945	89 ± 6
MOR04910	84 ± 4
MOR04946	93 ± 2
MOR04913	89 ± 9
MOR04920	90 ± 7
MOR04948	100 ± 15
MOR04952	100 ± 5
MOR04921	93*
MOR04914	83*
MOR04907	> 83*
MOR04954	> 83*
MOR04937	95*

*1회 측정

[0545]

[0546] U2OS 세포주를 사용하는 인간 혈청의 존재 하의 루시페라제 리포터 세포 분석법

[0547] 최적화된 항-DKK1 Fab의 결합 특이성을 추가로 결정하기 위해, 루시페라제 리포터 세포 분석법을 15% 인간 혈청의 존재 하에 골육종 세포주 U2OS를 사용하여 반복하였다. U2OS 세포 (ATCC 번호 HTB-96)를 공급자의 프로토콜 (ATCC, Manassas, VA, USA)에 따라 성장시켰다. 세포를 트립신처리하고, 배양 배지 (맥코이(McCoy) 5a/10% FCS)에 2×10^5 개의 세포/ml의 농도로 희석하였다. 각각의 2×10^4 개의 세포에 대해, 0.075 μ g pTA-LUC-12xSuperTopFlash 및 0.004 μ g phRL-SV40의 혼합물인 용액을 제조하였다. 이들을 9.8 μ l OPTI-MEM의 최종 부피로 혼합하였다. 그후, 0.2 μ l FuGENE 6 형질감염 시약 (Roche, Mannheim, Germany)을 첨가하였다. 이러한 형질감염 혼합물을 간략하게 인큐베이션한 후, 이전에 제조된 세포와 혼합하였다. 이어서, 세포를 100 μ l/웰로 백색 편평바닥 96웰 세포 배양 접시에 파종하고, 37°C 및 5% CO₂에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 다음날, 75 μ l 배지를 분석 플레이트의 각각의 웰로부터 제거하고, 10 μ l의 HuCAL® Fab 항체 희석물 (무혈청 배양 배지에 10 내지 0.01 μ g/ml로 희석됨), 15 μ l의 70% FCS 또는 인간 혈청으로 대체하고, 50 μ l의 Wnt3a 컨디셔닝 배지 (600 ng/ml DKK1-APP 함유)를 각각의 웰에 첨가하였다.

[0548] 음성 대조군에 대해, 무혈청 배지를 항체 희석물 대신 첨가하였다. 최대 루시페라제 신호를 수득하기 위해, 항체 희석물 대신 10 μ l의 무혈청 배지를 함유하는 대조군, 및 DKK1-APP가 없는 50 μ l Wnt3a CM을 첨가하였다. 24시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션한 후, 발광을 Dual-Glo 루시페라제 분석 시스템 (Promega, Madison, WI, USA)으로 제조업자의 사용설명서에 따라 측정하였다.

[0549] 표 9는 15% 인간 혈청의 존재 하의 최적화된 항-DKK1 Fab의 억제 활성을 나타낸다 (15% FCS에서의 억제 활성과 비교됨). 데이터는 혈청의 존재 하에 수득된 활성이 26% 내지 90% 범위이고, 중앙값이 70-74%임을 나타낸다. 이러한 데이터는 인간 혈청의 존재 하에 기능하는 항-DKK1 Fab의 클론이 수득되었음을 나타낸다.

표 9

Fab의 억제 활성

항체	크레멘이 없는 루시페라제 리포터 분석법; 15% 인간 혈청에서의 활성 (%)
MOR04945	74%
MOR04910	90%
MOR04946	60%
MOR04913	88%
MOR04920	75%
MOR04948	70%
MOR04952	60%
MOR04921	26%
MOR04914	80%
MOR04907	54%
MOR04954	55%
MOR04937	84%

[0550]

[0551]

루시페라제 리포터 세포 분석법에 의한 친화력이 최적화된 항-DKK1 Fab의 EC₅₀ 결정

[0552]

친화력이 개선된 Fab의 표준 Wnt3a-의존성 TCF/LEF luc 리포터 분석법에서의 테스트에서 루시페라제 발현의 억제를 획득하기 위해 10 nM DKK1이 사용되었다. 분석법의 감도가 너무 낮기 때문에, 이러한 방법에 의해 EC₅₀ 값이 생성될 수 없는 것으로 보였다. 이는 본원의 도 4에 제시된 바와 같이 매우 가파른 억제 곡선 및 테스트된 모든 Fab에 대한 유사한 EC₅₀ 값에 의해 지시된다.

[0553]

TCF/LEF luc 리포터 분석법의 개선된 버전이 개발되었다. DKK1은 크레멘-1 및 -2 막횡단 단백질에 결합하고, 이러한 상호작용은 Wnt 신호전달의 강력한 상승작용성 억제에 이른다 ([Mao et al. 2002 Nature: 417: 664-67]). 따라서, 크레멘 cDNA를 TCF/LEF luc 리포터 분석법과 함께 공동-형질감염시켰다. 생성된 Wnt3a-의존성 리포터 분석법은 크레멘 공동-수용체 단백질의 공동-발현에 의해 매개되는, DKK1에 대한 고도로 개선된 감도를 나타냈다. 이러한 분석법에서, 0.33 nM DKK1이 Wnt 신호전달의 충분한 억제를 유도하는데 충분하였다. 0.33 nM DKK1을 사용하여 Fab 적정 (10가지 농도)을 반복하였고, S자 모양의 억제 곡선 (본원의 도 5)이 산출되었으며, 이로부터 EC₅₀ 값을 계산할 수 있었다.

[0554]

친화력이 최적화된 항-DKK1 Fab를 이으로써 상기 기술된 바와 같이 EC₅₀에 관하여 분석하였다. 본원의 표 10에 제시된 바와 같이, 이러한 방법에 의해 획득된 EC₅₀ 값은 0.2 nM 내지 5.6 nM 범위였다.

표 10

Fab의 EC₅₀

항체	크레멘이 있는 TCF/ LEF luc 분석: EC ₅₀ [nM]
MOR04913	0.5
MOR04946	0.2
MOR04907	0.9
MOR04945	0.5
MOR04914	1.1
MOR04920	1.8
MOR04954	1.3
MOR04952	0.6
MOR04948	0.5
MOR04910	0.3
MOR04921	0.7
MOR04947	1.7
MOR04951	2.2
MOR04919	2.7
MOR04949	5.3
MOR04922	2
MOR04911	5.6

[0555]

[0556]

친화력이 최적화된 Fab의 서열 분석

[0557]

모두 20개의 Fab의 중쇄 및 V_L 영역 (V_H 및 V_L)의 뉴클레오타이드 서열을 결정하였다. 상보성 결정 영역 (CDR)의 아미노산 서열이 본원의 표 11A 및 표 11B에 열거된다.

표 11A

중쇄 CDR의 아미노산 서열

항체	VH	HCDR1	서열 번호	HCDR2	서열 번호	HCDR3	서열 번호
P MOR04455	VH3	GFTFSSYGMS	3	WVSGISGSGSYTYADSVKG	3	HYMDH	3
I MOR04918	VH3	GFTFSSYGMS	49	WVSGISERGVIFYADSVKG	57	HYMDH	65
P MOR04456	VH3	GFTFNNGMT	4	WVSGISGSGSYTYADSVKG	4	TIYMDY	4
2 MOR04907	VH3	GFTFNNGMT	8	WVSGISGSGSYTYADSVKG	8	TIYMDY	8
3 MOR04946	VH3	GFTFNNGMT	10	WVSGISGSGSYTYADSVKG	10	TIYMDY	10
4 MOR04949	VH3	GFTFNNGMT	50	WVSGISGSGSYTYADSVKG	58	TIYMDY	66
5 MOR04913	VH3	GFTFNNGMT	9	WVSGISGSGSYTYADSVKG	9	TIYMDY	9
P MOR04461	VH3	GFTFSSYWMS	5	WVSGISYSGSNTHYADSVKG	5	MGIDL DY	5
6 MOR04911	VH3	GFTFSSYWMS	51	WVSDIEHKRRAGGATSYAASVKG	59	MGIDL DY	67
7 MOR04922	VH3	GFTFSSYWMS	52	WVSMIEHKTRGGTTDYAAPVKG	60	MGIDL DY	68
8 MOR04910	VH3	GFTFSSYWMS	11	WVSGISYSGSNTHYADSVKG	11	MGIDL DY	11
9 MOR04948	VH3	GFTFSSYWMS	13	WVSGISYSGSNTHYADSVKG	13	MGIDL DY	13
10 MOR04919	VH3	GFTFSSYWMS	53	WVSGISYSGSNTHYADSVKG	61	MGIDL DY	69
11 MOR04921	VH3	GFTFSSYWMS	12	WVSGISYSGSNTHYADSVKG	12	MGIDL DY	12
P MOR04470	VH3	GFTFSSYWMS	6	WVSVISSDSSSTYYADSVKG	6	HGIDFDH	6
12 MOR04914	VH3	GFTFSSYWMS	14	WVSVISSDSSSTYYADSVKG	14	HGIDFDH	14
13 MOR04945	VH3	GFTFSSYWMS	16	WVSVISSDSSSTYYADSVKG	16	HGIDFDH	16
14 MOR04951	VH3	GFTFSSYWMS	54	WVSVISSDSSSTYYADSVKG	62	HGIDFDH	70
15 MOR04952	VH3	GFTFSSYWMS	55	WVSVISSDSSSTYYADSVKG	63	HGIDFDH	71
16 MOR04950	VH3	GFTFSSYWMS	56	WVSVIEHKSFGSATFYAASVKG	64	HGIDFDH	72
17 MOR04954	VH3	GFTFSSYWMS	18	WVSVIEHKDKGGTTYAASVKG	18	HGIDFDH	18
18 MOR04920	VH3	GFTFSSYWMS	15	WVSSIEHKDAGYTTWYAAGVKG	15	HGIDFDH	15
P MOR04516	VH5	GYSFTNYYIG	7	WMGIHYPTDSYTNYSFSGQ	7	GIPFRMRGFDY	7
19 MOR04947	VH5	GYSFTNYYIG	19	WMGIHYPTSYTYISFSGQ	19	GIPFRMRGFDY	19

[0558]

표 11B

경쇄 CDR의 아미노산 서열

MOR 항체 번호	V _L	HCDR1	서열 번호	HCDR2	서열 번호	HCDR3	서열 번호	주
P 04455	K1	RASQDISNYLH	22	LLIYGASNLQS	22	QQYDSIPM	22	
I 04918	K1	RASQDISNYLH	73	LLIYGASNLQS	81	QQYDSIPM	89	
P 04456	K3	RASQNLFSPLYA	23	LLIYGASNRAT	23	QQYGDEPI	23	
2 04907	K3	RASQNLFSPLYA	27	LLIYGASNRAT	27	QQYLSLPT	27	
3 04946	K3	RASQNLFSPLYA	29	LLIYGASNRAT	29	QQYLTPL	29	
4 04949	K3	RASQNLFSPLYA	74	LLIYGASNRAT	82	QQYLFPL	90	
5 04913	K3	RASQNLFSPLYA	28	LLIYGASNRAT	28	QQYMTLPL	28	FW4 돌연변이
P 04461	L2	TGTSSDVGGFNYYVS	24	LMIHDGSRNPS	24	STWDMTVDF	24	
6 04911	L2	TGTSSDVGGFNYYVS	75	LMIHDGSRNPS	83	STWDMTVDF	91	
7 04922	L2	TGTSSDVGGFNYYVS	76	LMIHDGSRNPS	84	STWDMTVDF	92	
8 04910	L2	TGTSSDVGGFNYYVS	30	LMIHDGSRNPS	30	QSWDVSPITA	30	
9 04948	L2	TGTSSDVGGFNYYVS	32	LMIHDGSRNPS	32	QWDSLSFF	32	
10 04919	L2	TGTSSDVGGFNYYVS	77	LMIHDGSRNPS	85	QSWGVGPGGF	93	
11 04921	L2	TGTSSDVGGFNYYVS	31	LMIHDGSRNPS	31	QWATSPSS	31	
P 04470	L2	TGTSSDLGGYNYVS	25	LMIYDVNNRPS	25	QSYASGNTKV	25	
12 04914	L2	TGTSSDLGGYNYVS	33	LMIYDVNNRPS	33	QSYTYTPISP	33	
13 04945	L2	TGTSSDLGGYNYVS	35	LMIYDVNNRPS	35	QTYDQIKLSA	35	
14 04951	L2	TGTSSDLGGYNYVS	78	LMIYDVNNRPS	86	QSYDPFLDVV	94	
15 04952	L2	TGTSSDLGGYNYVS	79	LMIYDVNNRPS	87	QSYDPTDSV	95	
16 04950	L2	TGTSSDLGGYNYVS	80	LMIYDVNNRPS	88	QSYASGNTKV	96	
17 04954	L2	TGTSSDLGGYNYVS	37	LMIYDVNNRPS	37	QSYASGNTKV	37	
18 04920	L2	TGTSSDLGGYNYVS	34	LMIYDVNNRPS	34	QSYASGNTKV	34	HCDR2 점 돌연변이
P 04516	L1	SGSSSNIGSFPVN	26	LLIGNNSNRPS	26	ASFDMGSPNV	26	잠재적인 N-글리코실 부위
19 04947	L1	SGSSSNIGSFPVN	38	LLIGNNSNRPS	38	ASFDMGSPNV	38	잠재적인 N-글리코실 부위
컨센서스 1		RASQxxxxYx	131	LLIYGASNxxx	132	QQYxxxPx	133	
컨센서스 2		TGTSSDVGGFNYYVS	134	LMIXDxxNRPS	135	xxWDxxxxx	136	

[0559]

[0560]

서열 분석은 6개의 어버이 (P) Fab 중 5개에서 친화력이 개선된 후계자가 산출되었음을 나타냈다. MOR04461 및 MOR04470은 HCDR2, 뿐만 아니라 LCDR3에서 최적화될 수 있었다. MOR04454에서는 최적화된 후계자가 수득되지 않았다. 또한, 표 11B에서 다양한 CDR에 대해 컨센서스 1 및 컨센서스2 서열에서 제시된 바와 같이, 공통점

이 없는 어버이 항체들 간에 높은 상동성이 나타났다. 당업자에게 주지된 방법을 사용하여 표 10A에 제시된 어버이 서열에 대해 유사한 컨센서스 서열이 제공될 수 있다.

[0561] 또한, MOR04920은 HCDR2 영역 내에 돌연변이 ([Honegger and Pluckthun, 2001 J Mol Biol 309.3:657-670]에 공개된 번호매김 계획에 따라 위치 73에서 Ser 잔기가 Gly로)가 있고 따라서 HuCAL® 디자인으로부터 벗어나는 것으로 결정되었다.

[0562] MOR04913은 카파 경쇄의 프레임워크 4 내에 점 돌연변이가 있는 것으로 나타났다 (위치 148에서 Lys이 Asn으로 교환됨). 이러한 위치는 항체의 결합 성질에 대한 효과가 없는 것으로 예상되기 때문에, IgG 전환 동안 생식계열/HuCAL® 조성물로 돌연변이가 복귀되어, 항체 MOR05145가 산출되었다.

[0563] MOR04947은 LCDR2 내에 잠재적인 글리코실화 부위가 있다. MOR04947은 오직 여벌 후보물질 중 하나로만 선별되었기 때문에 이러한 부위는 제거되지 않았다.

[0564] 실시예 7: HuCAL® 면역글로불린의 생산

[0565] IgG 포맷으로의 전환

[0566] 전장 면역글로불린 (Ig)을 발현시키기 위해, 중쇄 (VH) 및 경쇄 (VL)의 가변 도메인 단편을 pMORPH®X9_FH Fab 발현 벡터로부터 인간 IgG1 및 인간 IgG4에 대한 pMORPH®_h-Ig 또는 pMORPH®2_h-Ig 벡터 시리즈 내로 서브클로닝하였다. 인간 IgG2에 대해 별법적인 벡터를 사용할 수 있다. 제한 효소 *EcoRI*, *MfeI*, 및 *BlnI*를 사용하여 VH 도메인 단편을 pMORPH®_h-IgG1 및 pMORPH®_h-IgG4 내로 서브클로닝하였다. 제한 효소 *MfeI* 및 *BlnI*를 pMORPH®2_h-IgG1f 및 pMORPH®2_h-IgG4 내로의 VH 도메인 단편의 서브클로닝에 사용하였다. pMORPH®2_h-IgG1f 및 pMORPH®2_h-IgG4 내로의 VL 도메인 단편의 서브클로닝은 *EcoRV* 및 *BsiWI* 부위를 사용하여 수행하였고, pMORPH®_h-Igλ 및 pMORPH®2_h-Igλ2 내로의 서브클로닝은 *EcoRV* 및 *HpaI*을 사용하여 수행하였다.

[0567] 인간 IgG의 일시적인 발현 및 정제

[0568] HEK293 세포를 등몰량의 IgG 중쇄 및 경쇄 발현 벡터로 형질감염시켰다. 형질감염 후 제4일 또는 제5일에, 세포 배양 상청액을 수확하였다. 상청액의 pH를 8.0으로 조절하고, 멸균 여과시킨 후, 용액을 표준 단백질 A 컬럼 크로마토그래피 (Poros 20A, PE Biosystems)에 적용하였다.

[0569] 어버이 Fab의 IgG 포맷으로의 전환

[0570] 친화력 성숙의 시작과 병행하여, MOR04454, MOR04456, 및 MOR04470을 pMORPH®_h-IgG1 및 pMORPH®_h-IgG4 발현 벡터 내로 클로닝하였다. IgG2 발현 벡터의 생성을 위해 별법적인 구축물이 사용될 수 있다. HEK293 세포의 일시적인 형질감염에 의해 작은 규모의 발현을 수행하였고, 전장 면역글로불린을 세포 배양 상청액으로부터 정제하였다.

[0571] 데이터는 크기 배제 크로마토그래피에 의해 항체가 단량체성 형태라는 것을 나타냈다. Wnt3a-의존성 리포터 분석법에서의 테스트로 단백질이 기능성이라는 것이 입증되었다.

[0572] 실시예 8: 발현에 최적화된 유전자의 아미노산 서열 및 뉴클레오타이드 서열

[0573] 포유류 발현을 증가시키기 위해, 본원에서의 Fab의 중쇄 및 경쇄에 세포에서의 발현을 위한 코돈 사용법의 최적화를 위해 변화를 도입하였다. 여러 음성적으로 시스(cis)-작용하는 모티프가 포유류에서의 발현을 감소시키는 것으로 공지되어 있다. 본원에서의 최적화 프로세스는 발현에 음성적으로 영향을 미치는 음성 시스-작용 부위 (예컨대 스플라이스 부위 또는 폴리(A) 신호)를 제거하였다. 본원에서의 최적화 프로세스는 추가로 GC 함량을 증강시켜, mRNA 반감기를 연장시켰다.

[0574] 파지 디스플레이로의 선별에 의해 본원에서 단리된, Fab 클론 MOR04945 (전장 경쇄 어버이 뉴클레오타이드 서열은 서열 98이고, 전장 중쇄 어버이 뉴클레오타이드 서열은 서열 102임)를 사용하여 가변 경쇄 및 중쇄 영역을 최적화시켰다. 그후, 이러한 클론 및 기타 클론의 전체 경쇄 및 중쇄 각각을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 이러한 절차를 사용하여 각각 최적화시켰다.

[0575] MOR04945의 VH 및 VL 사슬에 대한 최적화 공정

[0576] 포유류 세포에서의 발현을 위해 VL 및 VH 사슬 각각의 뉴클레오타이드 서열 및 아미노산 서열을 최적화시키기 위해, 포유류 유전자의 코돈 편향으로 코돈 사용법을 개조하였다. 또한, GC 함량이 매우 높거나 (> 80%) 또는

매우 낮은 (< 30%) 영역을 감소시키거나, 가능한 경우 제거하였다. 별법적으로, 박테리아, 효모 또는 배컬로 바이러스에서의 발현을 위한 최적화는 이들 각각의 유전자에 대해 편향 코돈 사용법을 개조하는 것을 수반할 것이다.

[0577] 포유류 발현을 위한 최적화 프로세스 동안, 하기의 시스-작용 서열 모티프가 회피되었다: 내부 TATA-박스, chi-부위 및 리보솜 진입 부위, AT-풍부 또는 GC-풍부 서열 신장물, RNA 불안정 모티프 (ARE) 서열 요소, 억제성 RNA 서열 요소 (INS), cAMP 응답성 (CRS) 서열 요소, 반복 서열 및 RNA 2차 구조물, 스플라이스 도너 및 어셉터 부위 (잠재 부위 포함), 및 분지점. 지시되는 경우를 제외하고는, MluI 및 HindIII 부위의 도입이 V_L 사슬의 뉴클레오티드 서열을 최적화하는 프로세스에서 회피된다. 지시되는 경우를 제외하고는, MlyI 및 BstEI 부위의 도입이 V_H 사슬의 뉴클레오티드 서열을 최적화하는 프로세스에서 회피된다.

[0578] 발현에 대해 최적화된 MOR04945의 V_H 및 V_L 사슬의 아미노산 서열

[0579] 상기 기술된 클론 MOR04945의 V_H 및 V_L 사슬에 대한 생성된 최적화된 아미노산 서열에 대해 포유류 세포에서의 더 높고 더욱 안정적인 발현 속도를 가능하게 하기 위해 코돈 사용법이 포유류의 것으로 개조된다. 실시예 5 참조.

[0580] 하기의 표 12A는 발현에 대해 최적화된 가변 경계의 센스 및 안티-센스 (AS) 뉴클레오티드 서열 (서열 120) 및 생성된 가변 경계 아미노산 (AA로 명시됨) 서열 (서열 118)을 나타낸다.

표 12A

발현에 대해 최적화된 V_H 사슬의 뉴클레오티드 센스 및 안티센스 서열, 및 아미노산 서열

	<i>MluI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>BstNI</i>	
1	ACGCGTTGCGATATCGCCCTGACCCAGCCCGCCAGCGTGTCCGGCAGCCCTGGCCAGAGC (센스)			
	TGCGCAACGCTATAGCGGGACTGGGTCGGGCGGTTCGCACAGGCCGTCCGGACCGGTCTCG (AS)			
	T_R_C_D_I_A_L_T_Q_P_A_S_V_S_G_S_P_G_Q_S (AA)			
61	<i>PvuII</i>	<i>BstNI</i>	<i>BstNI</i>	
	ATCACCATCAGCTGTACCGGCACAGCAGCGACCTGGGCGGOTACAACTACGTGTCTCTGG (센스)			
	TAGTGGTAGTCGACATGGCCGTGGTCGTCGCTGGACCCCGCATGTTGATGCACAGGACC (AS)			
	I_T_I_S_C_T_G_T_S_S_D_L_G_G_Y_N_Y_V_S_W (AA)			
121	TATCAGCAGCACCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGATGATCTACGACGTGAACAACAGACCT (센스)			
	ATAGTCGTCGTTGGGGCCGTTCCGGGGGTTCCGACTACTAGATGCTGCACTTGTGTCTGGA (AS)			
	Y_Q_Q_H_P_G_K_A_P_K_L_M_I_Y_D_V_N_N_R_P (AA)			
181	<i>HinfI</i>			
	AGCGCGCTGTCCAACAGATTGAGCGGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATC (센스)			
	TCGCCGCAAGTTTGTCTAAGTCGCCGTCGTTCTCGCCGTTGTGGCGGTCGGACTGGTAG (AS)			
	S_G_V_S_N_R_F_S_G_S_K_S_G_N_T_A_S_L_T_I (AA)			
241	<i>PstI</i>			
	TCTGGCCTGCAGGCTGAGGACGAGGCCGACTACTACTGCCAGACCTACGACCAGATCAAG (센스)			
	AGACCGGACGTCCGACTCCTGCTCCGGCTGATGATGACGGTCTGGATGCTGGTCTAGTTC (AS)			
	S_G_L_Q_A_E_D_E_A_D_Y_Y_C_Q_T_Y_D_Q_I_K (AA)			
301	<i>HindIII</i>			
	CTGTCCGCGTGTGTGGCGGCGAACAAGCTT (센스) (서열 120)			
	GACAGCGGCACAAACCGCCGCTTGTTCGAA (AS)			
	L_S_A_V_F_G_G_G_T_K_L (AA) (서열 118)			

[0581]

[0582] 하기의 표 12B는 발현에 대해 최적화된 센스 및 안티-센스 가변 중쇄 뉴클레오티드 서열 (서열 121) 및 생성된 가변 중쇄 아미노산 (AA로 명시됨) 서열 (서열 119)을 나타낸다.

표 12B

발현에 대해 최적화된 V_H 사슬의 뉴클레오타이드 센스 및 안티센스 서열, 및 아미노산 서열

	<i>MlyI</i> <i>HinfI</i>	<i>BstNI</i> <i>PvuII</i>	
1	GAGTCCATTGGGAGTGCAGGCCAGGTGCAGCTGGTGGAGAGCGGCGGAGGACTGGTGCA (센스)		
	CTCAGGTAACCTCAGCTCCGGGTCCACGTCGACACCTCTCGCCGCTCCTGACCACGT (AS)		
	G V Q A Q V Q L V E S G G G L V Q (AA)		
61	<i>BstNI</i>		
	GCCTGGCGGCAGCCTGAGACTGAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTACCTTCAGCAGCTACTG (센스)		
	CGGACCGCGCTCGGACTCTGACTCGACACGGCGGTGCGCGAAGTGAAGTCGTGATGAC (AS)		
	P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y W (AA)		
121	<i>BstNI</i> <i>BstNI</i> <i>BclI</i>		
	GATGAGCTGGGTGAGGCAGGCCCTGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGTCCGTGATCAGCAG (센스)		
	CTACTCGACCCACTCCGTCCGGGGACCGTTCGGGACCTCACCCACAGGCACTAGTCGTC (AS)		
	M S W V R Q A P G K G L E W V S V I S S (AA)		
181			
	CGATAGCAGCAGCACCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGA (센스)		
	GCTATCGTCGTCGTGGATGATGCGGCTATCGCACTTCCCGGCCAAGTGGTAGTCGGCCCT (AS)		
	D S S S T Y Y A D S V K G R F T I S R D (AA)		
241	<i>PstI</i> <i>BspMI</i>		
	CAACAGCAAGAACCCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCCGT (센스)		
	GTTGTGCTTCTTGTGGGACATGGACGTCTACTTGTCTGCGACTCTCGGCTCCTGTGGCGGCA (AS)		
	N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V (AA)		
301	<i>BstNI</i> <i>BstNI</i> <i>BstEII</i>		
	GTACTACTGTGCCAGGCACGGCATCGACTTCGACCACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTCAC (센스)		
	CATGATGACACGGTCCGTGCCGTAGCTGAAGCTGGTGACCCCGGTCCCGTGGGACCACTG (AS)		
	Y Y C A R H G I D F D H W G Q G T L V T (AA)		
361	C (센스) (서열 121)		
	G (AS)		
	(AA) (서열 119)		

[0583]

[0584]

예비- 및 추후-최적화 차트가 각각의 어버이 서열 및 최적화된 유전자 각각에 대한 서열 코돈의 백분율을 제공할 수 있고, V_H 및 V_L 사슬을 코딩하는 개별적인 뉴클레오타이드 서열들의 품질 클래스가 분석된다. 본원에서 사용된 품질 값은 원하는 발현 시스템에서 소정의 아미노산에 대해 사용된 가장 빈번한 코돈을 100으로 설정하고, 나머지 코돈을 사용 빈도에 따라 축척화되는 것을 의미한다 ([Sharp, P.M., Li, W.H., Nucleic Acids Res. 15 (3), 1987]).

[0585]

또한, 코돈 개조 지수 (CAI)는 뉴클레오타이드 서열의 코돈이 표적 생물의 코돈 사용 선호도와 얼마나 잘 조화를 이루는지를 기술하는 숫자이다. CAI의 최대값은 1.0으로 설정되고, 따라서 0.9를 초과하는 CAI는 높은 발현을 가능하게 하는 것으로 간주된다. 최적화 전의 V_L 사슬에 대한 CAI는 0.73인 것으로 발견되었고, 최적화 후, CAI는 0.95인 것으로 결정되었다. 유사하게, 최적화 전의 V_H 사슬에 대한 CAI는 0.74인 것으로 발견되었고, 최적화 후에는 0.98인 것으로 결정되었다. 최적화된 구축물에서, V_L 사슬 내의 GC 함량이 MOR04945의 어버이 서열에 대한 51%에서 MOR04945로부터 유래된 최적화된 서열에 대한 62%로 증가하였다. 도 9A 및 9B에 제시된 바와 같이, V_H 사슬 내의 GC 함량은 MOR04945의 어버이 서열에 대한 54%에서 MOR04945의 최적화된 유도체에 대한 64%로 증가하였다.

[0586]

MOR04910, MOR04945, MOR04946 및 MOR05145의 전장 경쇄 및 중쇄의 발현에 대한 최적화

[0587]

MOR04910 (서열 97), MOR04945 (서열 98), MOR04946 (서열 99), 및 MOR05145 (서열 100)의 경쇄의 어버이 전장 뉴클레오타이드 서열 및 MOR04910 (서열 101), MOR04945 (서열 102), MOR04946 (서열 103), 및 MOR05145 (서열 103)의 중쇄의 어버이 전장 뉴클레오타이드 서열 각각에 최적화 프로세스를 적용하였다.

[0588]

최적화 프로세스를 사용하여, 어버이 클론 번호와 관련된 하기의 경쇄 뉴클레오타이드 서열 각각을 구축하였다: 클론 MOR04910에 대해, 최적화된 뉴클레오타이드 서열은 서열 104이고; 클론 MOR04945에 대해, 최적화된 뉴클레오타이드 서열은 서열 105이고; 클론 MOR04946에 대해, 최적화된 뉴클레오타이드 서열은 서열 106이며; 클론 MOR05145

에 대해, 최적화된 뉴클레오티드 서열은 서열 107이다. 또한, 최적화 프로세스를 사용하여, 어버이 클론 번호와 관련된 하기의 중쇄 뉴클레오티드 서열 각각을 구축하였다: 클론 MOR04910에 대해, 최적화된 뉴클레오티드 서열은 서열 108이고; 클론 MOR04945에 대해, 최적화된 뉴클레오티드 서열은 서열 109이고; 클론 MOR04946에 대해, 최적화된 뉴클레오티드 서열은 서열 110이며; 클론 MOR05145에 대해, 최적화된 뉴클레오티드 서열은 서열 110이다.

[0589] 최적화된 경쇄 뉴클레오티드 서열은 하기의 최적화된 경쇄 아미노산 서열과 관련된다; 클론 MOR04910에 대해, 최적화된 아미노산 서열은 서열 111이고; 클론 MOR04945에 대해, 최적화된 아미노산 서열은 서열 112이고; 클론 MOR04946에 대해, 최적화된 아미노산 서열은 서열 113이고; 클론 MOR05145에 대해, 최적화된 아미노산 서열은 서열 114이다. 최적화된 중쇄 뉴클레오티드 서열은 하기의 최적화된 중쇄 아미노산 서열과 관련된다: 클론 MOR04910에 대해, 최적화된 아미노산 서열은 서열 115이고; 클론 MOR04945에 대해, 최적화된 아미노산 서열은 서열 116이고; 클론 MOR04946에 대해, 최적화된 아미노산 서열은 서열 117이고; 클론 MOR05145에 대해, 최적화된 아미노산 서열은 서열 117이다.

[0590] 구현된 전장 경쇄 및 중쇄 서열의 뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열의 목록이 표 13A 및 표 13B에서 제공된다. 표 13A는 최적화된 뉴클레오티드 서열 및 이에 의해 코딩되는 폴리펩티드를 제공한다. 이러한 뉴클레오티드 서열들은 포유류 발현 시스템에서 인식되는 잠복성 스플라이스 부위를 제거하도록 최적화된다. 표 13B는 표 13A에 열거된 클론들에 대한 어버이 뉴클레오티드 서열을 제공한다.

표 13A

경쇄 (LC) 및 중쇄 (HC) 서열 - 최적화

LC (최적화) 4910 뉴클레오티드	서열 97
GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCCAGGTCAGAGCATTTACCATCTCGTGTACGGGTACTAGCAGCGA	
TGTTGGTGGTTTTAATTATGTGTCTTGGTACCAGCAGCATCCCGGAAGGCGCGAAACTTATGATTCATGATGGTTCTAATC	
GTCCCTCAGGCGTGAACACCGTTTTAGCGGATCCAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACCATTAGCGGCCTGCAAGCGGAA	
GACGAAGCGGATTATTATTGCCAGTCTTGGGATGTTTCTCCTATTACTGCTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGCTTACCGTCCT	
AGGTCAGCCCAAGGCTGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAAACAGGCCACACTGGTGT	
GTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACA	
ACCACACCTCCAAACAAAGCAACAAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCCACAG	
AAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAAAGACAGTGGCCCTACAGAATGTTTCATAG	
LC4910 (BHQ880) 폴리펩티드	서열 111
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGFNYVSWYQQHPGKAPKLMIHGDSNRPSGVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAE	
DEADYYCQSWDVSPITAVFGGKLTIVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET	
TTFSKQSNKNYAASSYLSLTPEQNKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	

[0591]

LC (최적화) 4945 뉴클레오타이드	서열 98
GATATCGCACTGACCCAGCCAGCTTCAGTGAGCGGCTCACCAGGTCAGAGCATTACCATCTCGTGTACGGGTACTAGCAGCGA TCTTGGTGGTTATAATTATGTGCTTGGTACCAGCAGCATCCCGGGAAGGCGCCGAACTTATGATTTATGATGTTAATAATC GTCCCTCAGGCGTGAGCAACCGTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCAACACCGCGAGCCTGACCATTAGCGGCGCTGCAAGCGGAA GACGAAGCGGATTATTATGCCAGACTTATGATCAGATTAAGTTGTCTGCTGTGTTTGGCGGCGGCACGAAGCTTACCGTCCT AGGTCAGCCCAAGGCTGCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAGGCCACACTGGTGT GTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGCCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCGCTCAAGGCGGAGTGGAGACA ACCACACCTTCCAAACAAGCAACAAGTACGCGGCGCAGCAGTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGAAGTCCCACAG AAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAAGAAGCAGTGGCCCTACAGAATGTTCTAG	
LC4945 (BHQ892) 폴리펩티드	서열 112
DIALTPASVSGSPGQSTITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQHPGKAPKLMYDVNNRPSGVSNRFGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYVQTYDQIKLSAVFGGKTLTVLGQPKAAPSVTLFFPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET TTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	
LC (최적화) 4946 뉴클레오타이드	서열 99
GATATCGTGTGACCCAGAGCCCGCGACCCCTGAGCCTGTCTCCGGCGGAACGTGCGACCCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGAA TCTTTTTTCTCCTTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACAGGTCAAGCACCGCGCTCTATTAAATTTATGGTGCTTCTAATCGTG CAACTGGGGTCCCGCGCGCTTTAGCGGCTCTGATCCGGCACGGATTTACCTTGACCATTAGCAGCTGGAACCTGAAGAC TTTGCGGTGTATTATGCCAGCAGTATCTTACTCTTCTTACCTTTGGCCAGGGTACGAAAGTCGAGATCAACGAACTGT GGCTGCACCATCTGTCTTCTTCTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATA ACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACGCCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG	
LC4946 (BHQ898) 폴리펩티드	서열 113
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISISLEPED FAVYYCQYQLTLPFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSYSLSSLTLLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
LC (최적화) 5145 뉴클레오타이드	서열 100
GATATCGTGTGACCCAGAGCCCGCGACCCCTGAGCCTGTCTCCGGCGGAACGTGCGACCCCTGAGCTGCAGAGCGAGCCAGAA TCTTTTTTCTCCTTATCTGGCTTGGTACCAGCAGAAACAGGTCAAGCACCGCGCTCTATTAAATTTATGGTGCTTCTAATCGTG CAACTGGGGTCCCGCGCGCTTTAGCGGCTCTGGATCCGGCACGGATTTACCTTGACCATTAGCAGCTGGAACCTGAAGAC TTTGCGGTGTATTATGCCAGCAGTATATGACTCTTCTCTTACCTTTGGCCAGGTCAGAAAGTCGAGATCAACGAACTGT GGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATA ACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG	
LC5145 (BHQ901) 폴리펩티드	서열 114
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISISLEPED FAVYYCQYMTLPFTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSYSLSSLTLLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	
HC (최적화) 4910 뉴클레오타이드	서열 101
CAGGCACAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGGCGGCGGCTGGTGCAACCGGGCGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTCCGG ATTTACCTTTTCTTCTTATGGATGTCTTGGGTGCGCCAAGCCCTGGGAAGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTTTATT CTGGTAGCAATACCCATTATGCGGATAGCGTGAAGGCCGTTTACCATTTACGTTGATAATCGAAAAACACCTGTATCTG CAATGAACAGCCTGCGTGCGGAAGATACGCGCGGTATTATTGCGCGGTATGGGTATTGATCTTGATTATTGGGGCCAAGG CACCTGGTCACCGTCTCTCAGCCTCCACCAAGGCCCATCGGTCTTCCCTTGSCACCTCTCCAAAGACACCTCTGGGG GCACAGCGGCGCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGGCTGACCAAGC	

[0592]

GGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTT GGGCACCACGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTG ACAAATCTACACATGCCCCACCGTGCCGACACCTGAATCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAAG GACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGTGACGTGGACGGCGTGGAGGTGCAATATGCCAAGACAAGCCGCGGAGGAGCAGTACACAGCAGCTACCGTGTGGTCA CGCTCTTCCCGTCTGACACGAGCTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCC ATCGAGAAAACATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCTGCTGCTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACACTACAAGACCAGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAGCGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAGAGCCTCTC CCTGTCCCCGGGTAAATGA	
HC4910 (BHQ880) 폴리펩티드	서열 115
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSGISYSGSNTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARMGIDLDYWGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCPFCPELLEGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	
HC (최적화) 4945 뉴클레오티드	서열 102
CAGGCACAGGTGCAATTTGGTGAAGCGCGCGCGCTGGTGCAACCGGGCGGCGAGCTCGCTCTGAGCTGCGCGGCTCCGG ATTTACCTTTTCTTCTTATTTGGATGCTCTGGGTCGCGCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGTTATCTCTCTG ATCTAGCTCTACCTATTATGCGGATAGCGTGAAAGCCGTTTACCATTTACAGTGATATTCGAAAAACACCTGTATCTG CAAAATGAACAGCTCGCTGCGGAGATACGCGCGTGTATTTATGCGCGCTCATGTTATGATTTTGTATTTGGGCGCAAGG CACCTTGGTCACGCTCTCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGG GCACAGCGGCTGGGCTGGGTCTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCGCTGACACAGC GGCGTGACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCTGACCGTGCCTCCAGCAGCTT GGGCACCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTG ACAAATCTACACATGCCCCACCGTGCGGACACCTGAATCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAAG GACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTGATGCGTGGTGGGAGCTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACCGCGTGGAGGTGATAATGCCAAGACAAGCCGCGGAGGAGCAGTACACAGCAGCTACCGTGTGGTCA GCGTCTCACCCTCTGACACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCC ATCGAGAAAACATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCATCCCGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCTGCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAGAACAACACTACAAGACACGCTCCCGTGTGATCTCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAGCGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAGAGCCTCTC CCTGTCCCCGGGTAAATGA	
HC4945 (BHQ892) 폴리펩티드	서열 116
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSSYWMSWVRQAPGKGLEWVSVISSSSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARHIGDFHWGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCPFCPELLEGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	
HC (최적화) 4946=5145 뉴클레오티드	서열 103
CAGGTGACGCTGGTGGAGCGCGGAGGAGTGGTGACGCTGGCGGCGAGCTGAGCTGAGCTGTGCGCGGAGCGGCTTAC CTTCAACAACTACGCGATGACCTGGGTGAGGACAGGCCCTGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGTCGGGATCAGCGGAGCGGCA	

[0593]

GCTACACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCAGGTTCAACATCAGCCGGGACAACAGCAAGAACACCTGTACCTGACATG AACAGCTGAGAGCCGAGGACACCGCGGTGACTACTGTGCCGGACCATCTACATGAGTACTGGGGCCAGGGACCCCTGGT CACCGTCTCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCTCTCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGG CCCTGGGCTGCTGCTGACAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACAGCGGCGTGCAC ACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGTGACCGTCCCGCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAATCTC ACACATGCCAACCGTGCCGACGACCTGAATCCTGGGGGACCGTCACTCTTCTTCCCCCAAAACCCAAAGGACACCTC ATGATCTCCGGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCAGCAAGACCTGAGGTCAAGTTCACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCGTGTGGTCAAGCTCTCA CCGCTCTGACACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCGCCCATCGAGAAA ACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGACCTGCTGCTGCTAAAGGCTTCTATCCAGGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCGGAGAACCA ACTACAAGACCAAGCTCCCGTGTGAGCTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAGCGTCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAGAGCCTCTCTCTGTCCTC GGTAAATGA	
HC4946=5145 (BHQ898/901) 폴리펩티드	서열 117
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNHYGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKHTCPFCPELLEGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK	

[0594]

표 13B

정쇄 (LC) 및 중쇄 (HC) 서열 - 아버지

LC (아버지)	4910	뉴클레오타이드	서열 104
GATATCGCCCTGACCCAGCCGCGCAGCGTGTCCGGCAGCCCTGGCCAGAGCATCACCATCAGCTGTACCGGCACCAGCAGCGA TGTGGGCGGCTTCACTACGTGTCTGGTATCAGCAGCACCCTGGCAAGGCCCAAGCTGATGATCCAGCAGCGCAGCAATA GACCCAGCGCGGTGTCAATAGATTAGCGCGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCAGCGGCTGCAGGCTGAG GACGAGGCGGACTACTACTGCCAGAGCTGGGATGTGAGCCCATCACCGCGTGTGGCGGCGGAAGAAAGCTTACCGTCT AGGTGAGCCCAAGGCTGCCCTCGGTCACTCTGTTCGCCCTCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACTGCTGT GTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCGGTGACAGTGGCTTGAAGGCAGATAGCAGCCCGCTCAAGCGGGAGTGAGAGCA ACCAACCCCTCCAAACAAGCAACAAGTACGCGGCGCAGCAGTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCCAAG AAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCCTGGAAAGACAGTGGCCCTACAGAAATGTTCTATAG			
LC (아버지)	4945	뉴클레오타이드	서열 105
GATATCGCCCTGACCCAGCCGCGCAGCGTGTCCGGCAGCCCTGGCCAGAGCATCACCATCAGCTGTACCGGCACCAGCAGCGA CCTGGGCGGCTTCACTACGTGTCTGGTATCAGCAGCACCCTGGCAAGGCCCAAGCTGATGATCTACGAGTGAACAACA GACCTAGCGCGGTGTCAACAGATTAGCGCGCAGCAAGAGCGGCAACACCGCCAGCCTGACCATCTCTGGCTTCGAGGCTGAG GACGAGGCGGACTACTACTGCCAGACTTACGACAGATCAAGCTGTCCGCGTGTGGCGGCGGAACAAGCTTACCGTCT AGGTGAGCCCAAGGCTGCCCTCGGTCACTCTGTTCGCCCTCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACTGCTGT GTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCGGTGACAGTGGCTTGAAGGCAGATAGCAGCCCGCTCAAGCGGGAGTGAGAGCA ACCAACCCCTCCAAACAAGCAACAAGTACGCGGCGCAGCAGTATCTGAGCCTGACGCTGAGCAGTGGAAAGTCCCAAG AAGCTACAGCTGCCAGGTACGCATGAAGGGAGCACCCTGGAAAGACAGTGGCCCTACAGAAATGTTCTATAG			
LC (아버지)	4946	뉴클레오타이드	서열 106
GACATCGTGTGACCCAGAGCCCGCCACCTGAGCCTGAGCCTGGCGAGAGAGCCACCTGTCTTGTAGGGCCAGCCAGAA CCTGTTGAGCCCTTACCTGGCTGTGTATCAGCAGAGCCCGGCCAGGCCCCAGACTGCTGATCTACGGCGCCAGCAACAGAG CCACCGCGGTGCCCGCAGATTACGCGGACGGGCTCCGGCACCGACTTACCTGACCATCAGCAGCCTGGAGCCTGAGGAT			

TTCCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACCTGACCCTGCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAGGTCGAGATCAACGAACTGT GGCTGCACCATCTGTCTTATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATA ACTTCTATCCAGAGAGGCCAAGTACAGTGGAAGTGGATAACGCCCTCCAAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCAGCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTACCCATCAGGCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG			
LC (아버지)	5145	뉴클레오타이드	서열 107
GACATCGTGTGACCCAGAGCCCGCCACCTGAGCCTGAGCCTGGCGAGAGAGCCACCTGTCTTGTAGGGCCAGCCAGAA CCTGTTGAGCCCTTACCTGGCTGTGTATCAGCAGAGCCCGGCCAGGCCCTCAGACTGCTGATCTACGGCGCCAGCAACAGAG CCACCGCGGTGCCCGCAGATTACGCGGACGGGCTCCGGCACCGACTTACCTGACCATCAGCAGCCTGGAGCTGAGGAT TTCCCGTGTACTACTGCCAGCAGTACATGACCCTGCCCTGACCTTCGGCCAGGGCACCAGGTCGAGATCAACGAACTGT GGCTGCACCATCTGTCTTATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATA ACTTCTATCCAGAGAGGCCAAGTACAGTGGAAGTGGATAACGCCCTCCAAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAG CAGGACAGCAAGGACAGCAGCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAGCAGACTACGAGAAACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTACCCATCAGGCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG			
HC (아버지)	4910	뉴클레오타이드	서열 108
CAGGCCAGGTGACGCTGGTGGAGAGCGCGGAGGACTGGTGACGCTGGCGGACGCTGAGACTGAGCTGTCCGCCAGCGG CTTCACTTTCAGCAGCTACTGGATGAGCTGGTGAGGAGGCGCCCTGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCAGCTACA GCGCGAGCAATACCACTACGCCGACAGCGTGAAGGCGAGGTTACCATCAGCCGGGACAAACAGCAAGAACCCCTGTACCTG CAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCGGTACTACTGTGCCCGATGGGCATCGACCTGGATTACTGGGGCCAGGG CACTCTGTGTCACCTCTCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGCGCACCTCTCTCAAGAGCAGCTCTGGGG GCACAGCGGCCCTGGGTGCTGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAATCAGCGGCCCTGACCAAGC GGGTGTCACACCTTCCCGGTGTCTCACTAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTCTGTACCGTGCCTCCAGCAGCTT GGGCAACCCAGACTACATCTGCAAGCTGAATCACAAGCCAGCAACAAGGTGGACAAGAGATTGAGCCCAATCTTGTG ACAAACTCAGCATGCCCCACCGTCCAGCAGCAGCTGAACTCTGGGGGACCGTCACTCTCTCTTCCCGCAAAACCCAG GACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGCCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCA GGGTCTTCACTCTCTGACCAAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTCCAGGCCCTC ATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCTCATCCCGGAGGAGATGAC CAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGC CGGAGAACACTACAAGACCAGGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCAGCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCGGGACGTCTTCTCATGCTCGTGATGAGCTGTGCAACCACTACAGCAGAAAGAGCCTCTC CCTGTCCCGGGTAAATGA			
HC (아버지)	4945	뉴클레오타이드	서열 109
CAGGCCAGGTGACGCTGGTGGAGAGCGCGGAGGACTGGTGACGCTGGCGGACGCTGAGACTGAGCTGTCCGCCAGCGG CTTCACTTTCAGCAGCTACTGGATGAGCTGGTGAGGAGGCGCCCTGGCAAGGGCTGGAGTGGGTGTCCGTGATCAGCAGCG ATAGCAGCAGCACCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGCGCGTTCAACCATCAGCCGGGACAAACAGCAAGAACCCCTGTACCTG CAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACCGCGGTACTACTGTGCCAGGACGCGCATGACTTCAAGCACTGGGGCCAGGG CACCCTGTCTACCTCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGCGCACCTCTCTCAAGAGCACTCTGGGG GCACAGCGGCCCTGGGTGCTGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAATCAGCGGCCCTGACCAAGC GGGTGTCACACCTTCCCGGTGTCTCACTAGTCTCAGGACTTACTCCCTCAGCAGCGTCTGTACCGTGCCTCCAGCAGCTT GGGCAACCCAGACTACATCTGCAAGCTGAATCACAAGCCAGCAACAAGGTGGACAAGAGATTGAGCCCAATCTTGTG ACAAACTCAGCATGCCCCACCGTCCAGCAGCAGCTGAACTCTGGGGGACCGTCACTCTCTCTTCCCGCAAAACCCAG GACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGCCCTGAGGTCAAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGTGGTCA GGGTCTTCACTCTCTGACCAAGGACTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAGGCCCTCCAGGCCCTC ATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCTCATCCCGGAGGAGATGAC			

CAAGAACCAGGTCAGCGCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGC CGGAAGAACATACAAGACCAGCGCTCCCGTGGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAGAGCCTCTC CCTGTCCCCGGTAAATGA		
HC	(어버이)	4946=5145 뉴클레오타이드 서열 110
CAGGTGCAATTGGTGGAAAGCGCGCGCGCTGGTGCACCGGGCGGCGAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCTCCGGATTAC CTTTAATAATTATGGTATGACTTGGGTGCGCAAGCCCTGGGAAGGGTCTCGAGTGGGTGAGCGGTATCTCTGGTCTGGTA GCTATACCTATTATGCGGATAGCGTGAAGGCCGTTTACCATTTACGTGATAATTCGAAAAACACCTGTATCTGCAATG AACAGCCTGCGTGGGGAAGATACGGCCGTGATTATTGCGCGCTACTATTTATATGGATTATTGGGGCCAAGGCACCTGGT CACCGTCTCTCAGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGGCACCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGG CCCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCAC ACCTTGCCTGGTCTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTCTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAGGCCAGCAACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACTC ACACATGCCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCTGGGGGAGCCGTGAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTC ATGATCTTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCACTGTGACGT GGACGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCGTGTGGTCAAGCTCTCA CCGTCTGCAACGAGTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAA ACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCAAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCA GGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCGGAGAACCA ACTACAAGACCAAGCCTCCCGTGGTGGACTCCGAGCGGCTCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAAGCTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGAGAGAGCCTCTCCTGTCCC GGGTAAATGA		

[0597]

[0598]

실시예 9: 생물활성 분석법

[0599]

중화성 항-DKK1/4 항체의 생물학적 활성을 SuperTopflash Krm17로 칭해지는 유전자 변형 세포주 HEK293 T/17 STF_701RES_Krm_(17)을 사용하여 리포터 유전자 분석법에서 측정하였다. 이러한 세포주는 인간 배아 신장 세포 HEK293으로부터 유래되었고, i) 프로모터 TCF가 반딧불이 루시페라제 유전자의 상류에 융합된 리포터 구축물 및 ii) 이러한 세포의 표면 상에서의 Krm의 과발현에 이르는 구축물로 안정적으로 형질감염되었다. 이러한 세포주에서, Wnt 단백질에 대한 노출은 용량-의존적 방식으로 루시페라제의 발현을 자극하였다. Wnt의 존재 하에 고정된 최대 용량의 DKK1에 등급화된 양의 항-DKK1/4 항체를 첨가하는 것은 16시간의 인큐베이션 시간 동안 루시페라제의 발현에서의 증가를 야기하였다. 이러한 기간 말기에, 루시페라제의 양을 세포 용해물 내에서의 이의 효소 활성을 기초로 정량하였다. 루시페라제는 기질 루시페린이 화학발광 생성물인 옥시루시페린으로 전환되는 것을 촉매한다. 그후, 생성된 백열광-유형의 화학발광을 적합한 발광계로 결정하였다.

[0600]

중화성 항-DKK1/4 항체 테스트 샘플의 생물학적 잠재력을 루시페라제 발현을 증가시키는 이의 능력을 표준품의 능력과 비교함으로써 결정하였다. 샘플 및 표준품을 단백질 함량을 기초로 표준화시켰다. 그후, 상대적인 잠재력을 유럽 약전에 따라 평행선 분석법을 사용하여 계산하였다. 최종 결과는 표준품과 비교된 샘플의 상대적인 잠재력 (% 단위)로 표현된다.

[0601]

실시예 10: 관련된 생물학적 표적에 대한 시험관내 활성

[0602]

낮은 나노몰 범위에서 친화력이 있고 세포 분석법에서 강력한 활성이 있는 선도 Fab를 선별하였다. DKK1에 대한 생리학적 결합 파트너는 LRP5/6 ($K_d \sim 340$ pM) 및 크레멘 1 및 2 ($K_d \sim 280$ pM)이다 ([Mao 2001]; [Mao 2002]). 이러한 높은 친화력 상호작용 하에, 생리학적 DKK1 상호작용과 더 잘 경쟁하기 위해 친화력을 추가로 개선하는 것이 바람직하다. 선별된 Fab의 친화력 및 생물학적 활성을 증가시키기 위해, 트리뉴클레오타이드 지정 돌연변이 유발을 사용하여 카세트 돌연변이유발에 의해 CDR-L3 및 CDR-H2 영역을 병행으로 최적화시켰다 ([Virnekas 1994]; [Knappik 2000]; [Nagy 2002]).

[0603]

친화력 성숙 후, 친화력이 피코몰로 낮고, DKK1에 의해 억제된 wnt 신호전달을 1 nM 미만의 EC50으로 재활성화시키며, 사이노물구스 원숭이, 마우스, 및 래트 DKK1과 교차반응하는 Fab를 선별하였다. 그후, 이러한 Fab의 가변 영역을 2개의 상이한 인간 IgG1 프레임워크 내로 조작하였다.

[0604]

항-DKK1/4 항체는 인간 DKK1에 대한 친화력이 높고 (2 pM), 결합 키네틱은 이러한 친화력의 항체에 대해 전형적인 것이다. 도 6 참조.

[0605]

도 6. 방법: 선도 후보물질 및 rhDKK1 (재조합 인간 DKK1) (벡치 BTP7757)의 결합 친화력 및 키네틱을 표면 플라즈몬 공명을 사용하여 CM5 (S) 센서 칩 (Cat#BR-1006-68)이 있는 Biacore T100 (Biacore, Uppsala, Sweden) 기기로 측정하였다. 항-인간 IgG1 Fc (Jackson Immuno Research, Cat# 109-006-098)를 각각의 유동 세포 상에 고정된 후, 약 100 RU의 예상 포획으로 선도 후보물질을 포획하였다. 마지막으로, 1개의 반복 농도가 있는 6가지 농도의 DKK1 (0.195 - 6.25 nM 범위)을 칩 상에 러닝하였다. 유동 세포를 240초 동안 DKK1의 결합에 대해

활성화시켰고, 30분 동안 해리가 이어졌다. 표준화된 데이터 (배경이 차감됨)를 BIA 평가 1.0 소프트웨어에서의 키네틱 분석을 사용하여 질량 수송 모델로 1:1 결합으로 피팅하였다. 이러한 실험을 삼중으로 수행하였고, 제시된 데이터는 표준 편차와 함께 이러한 3회 실험의 평균이다.

[0606] 실시예 11: 에피토프 지도작성

[0607] 성숙형 DKK1은 2개의 시스테인 풍부 영역 (Cys-1 및 Cys-2)이 있는 아미노산 266의 단백질이다. Cys-2 도메인은 LRP 및 크레멘 단백질 모두에 결합하는 것을 담당하고, Wnt 신호전달의 억제에 필요충분하다 ([Li 2002]; [Brott 2002]). 면역침전 실험 (도 7A, 7B)는 항-DKK1/4 항체가 Cys-2 도메인에 특이적으로 결합하지만, Cys-1 도메인에는 그렇지 않다는 것을 나타낸다. 항-DKK1/4 항체는 변성된 DKK1과 웨스턴 블롯팅에서 오직 약하게만 활성이었고, 펩티드 지도작성 실험에서 단백질의 길이를 포괄하는 중첩된 아미노산 15개의 펩티드 (JTP) 중 어느 것에도 특이적으로 결합하는 것으로 발견되지 않았으며, 이는 항-DKK1/4 항체가 Cys-2 내의 비-선형 에피토프를 인식하는 것 같다는 것을 시사한다.

[0608] 도 7(A)는 에피토프 지도작성에서 사용하기 위한 전장 및 말단절단형 DKK1의 개략도를 나타낸다. 전장 (FL, 잔기 1-266 함유), 카르복실 말단 말단절단형 (Δ C, 잔기 1-185 함유), 및 아미노 말단 말단절단형 (Δ N, 잔기 1-60 + 잔기 157-266 함유)가 C 말단에서 HA 에피토프와 융합되어, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터의 제어 하에 포유류 발현 벡터 내로 클로닝되었다. 도 7B는 중화성 항-DKK1/4 항체 및 DKK1 단백질의 결합을 묘사한다. 전장, 아미노 말단절단형, 카르복실 말단 말단절단형 DKK1 단백질을 발현하는 일시적으로 형질감염된 Hek293 세포로부터의 컨디셔닝 배지를 항-라이소자임 IgG1 대조군 또는 항-DKK1/4 항체와 함께 2시간 동안 실온에서 인큐베이션하고, 면역복합체를 단백질 G 비드 상에서 회수하고, SDS-PAGE에 의해 해상하고, 옮겨서 항-HA 항체로 블롯팅하였다. 전체 입력물 중 1/10이 대조군으로 로딩되었다.

[0609] 실시예 12: 에피토프 지도작성 - N-글리코실화

[0610] Wnt 신호전달 경로 내의 다수의 단백질을 이들의 세포 활성을 조절하는 번역후 효소에 의해 공유결합으로 변형시켰다. DKK1을 포함하는 DKK 패밀리를 구성원을 N-글리코실화에 의해 변형시켰다 ([Krupnik 1999]). DKK1에는 Cys-2 도메인 내의 아미노산 아미노산 256에 오직 1개의 이론적인 N-연결 글리코실화 부위가 있다. Cys-2 도메인의 고도로 보존된 성질, 및 DKK1의 LRP6에 대한 부위 및 항-DKK1/4 항체의 DKK1에 대한 부위 모두의 잠재적인 결합 부위 하에, 본 발명가들은 항-DKK1/4 항체가 N-글리코실화 형태의 DKK1을 인식하는지 여부를 결정하려 시도하였다. ELISA는 항-DKK1/4 항체가 N-글리코실화 형태의 rhDKK1을 특이적으로 N-연결된, 탈글리코실화된 형태의 rhDKK1보다 훨씬 더 양호하게 인식한다는 것을 나타냈다 (표 14A). 한편, 동일한 단백질이 재조합 단백질의 융합된 에피토프 태그 영역에 대해 지시된 2차 항체 (항-HIS)로는 동등하게 잘 인식되었다. 친화력에서의 이러한 차이를 표면 플라즈몬 공명을 사용하여 정량하였고, 항-DKK1/4 항체의 K_D 가 탈글리코실화된 단백질보다 글리코실화 rhDKK1에 대해 100배 더 높다는 것이 발견되었다. 표 14B 참조.

표 14A

% 결합 - DKK1에 대한 항-DKK1/4 항체 결합의 글리코실화 의존성

항체	WT DKK1	DKK1 (탈글리코실화)
항-HIS 태그	100%	100%
항-DKK1/4	100%	12-18%

표 14B

표면 플라즈몬 공명

단백질	K_A (1/Ms)	K_D (1/s)	K_D (M)
WT DKK1	7.449E+6	2.319E-5	3.113E-12
DKK1 (N-탈글리코실화)	1.424E+6	3.071E-4	2.157E-10

[0612] 야생형 (WT) rhDKK1 (HEK HIS 에피토프 태그가 부착됨; 배치# BTP7757) 및 N-연결 탈글리코실화 (N-탈글리코실화; 효소 PNGase F (Sigma, Cat# E-DEGLY)로 N-연결 탈글리코실화됨) rhDKK1에 대한 항-DKK1/4 항체의 결합을 ELISA에 의해 결정하였다. 간략하게, 높은 결합성의 ELISA (Nunc#442404) 플레이트를 1 μ g/ml WT 또는 N-탈글리코실화 DKK1으로 코팅하였다. N-탈글리코실화 DKK1의 각각의 결합과 비교하여, WT DKK1에 대한 항-DKK1/4 항체 및 항-HIS 항체 모두의 결합 비율이 제시된다. 이러한 실험을 3가지 상이한 농도로 수행하였고 (1가지 대

표적인 농도에 대한 데이터가 제시됨), 모든 농도의 결과가 유사하였다. WT 및 N-탈글리코실화 DKK1 (HEK293 배지# BTP7757) 모두에 대한 항-DKK1/4 항체의 결합 친화력 및 키네틱을 Biacore T100을 사용하여 측정하였다. 일반적으로 항-DKK1/4 항체는 WT DKK1에 대한 것보다 N-탈글리코실화 DKK1에 대한 친화력이 100배 더 낮았다.

[0614] 실시예 13: DKK 패밀리의 구성원의 % 동일성

[0615] 인간 Dickkopf 패밀리는 4개의 파라로그(paralog)로 구성되고 (표 15 참조), 이들 중 3개 (DKK1, 2, & 4)는 LRP6 및 크레멘 단백질에 결합하고, LRP5/6의 내재화를 유도하며, 정규 Wnt 신호전달을 억제한다 ([Mao 2001]; [Mao 2003]). 또한 DKK2는 LRP6 과발현과 상승작용하여 Wnt 신호전달을 증강시키지만, LRP6 및 크레멘의 공동-발현은 이러한 경로의 DKK2 억제를 복구시킨다 ([Mao 2003]). 따라서 DKK2는 세포 상황에 따라 작동제 및 길항제 모두로서 작용할 수 있다. DKK3은 LRP5/6 및 크레멘 상호작용을 담당하는 Cys-2 도메인 내를 포함하여 패밀리의 구성원들 중 가장 약하게 보존되는 것이고, LRP 또는 크레멘에 결합하지 않고 Wnt 신호전달을 차단하지 않기 때문에 다른 DKK 패밀리의 구성원과 상이하다 ([Mao 2001]; [Mao 2003]).

표 15

전체 단백질 및 Cys-2 도메인에서의 DKK 패밀리의 구성원의 % 동일성

	DKK2	DKK3	DKK4
전체 단백질	38.7	15.5	32.5
DKK1	-	13.4	34.6
DKK2	-	-	15.1
DKK3	69.3	23.0	56.6
Cys-2 도메인	-	24.1	54.7
DKK1	-	-	20.8
DKK2	-	-	-
DKK3	-	-	-

[0616] DKK 패밀리의 구성원들 간의 상동성을 아미노산 동일성의 비율을 비교하는 쌍을 이룬 방식의 서열 정렬에 대한 AlignX 알고리즘을 사용하여 평가하였다 (Vector NTI Advanced 9.1.0). 각각 10 및 0.1의 갭 오픈링 및 갭 확장 패널티가 적용되었다. 이러한 평가는 전체 단백질의 비교, 뿐만 아니라 Cys-2 도메인만의 비교를 포함하였다. 상기 표에서 지시된 바와 같이, DKK 1, 2 및 4는 전체 단백질에 걸쳐 30-40% 아미노산 서열 상동성을 공유하였다. Cys-2 도메인만의 비교는 DKK 1 및 2가 이러한 영역 내에서 69% 상동성을 공유하는 한편, DKK4는 DKK1 및 2의 동일한 도메인과 대략 57%를 공유한다는 것을 나타냈다. DKK3은 다른 패밀리의 구성원들에 대해 가장 낮은 수준의 상동성을 나타냈다. 모든 구성원들 간에, Cys-2 도메인 내에서의 상동성이 최고였다.

[0618] 실시예 14: 인간 DKK 패밀리의 구성원에 대한 항-DKK1/4 항체의 친화력

[0619] DKK1에 결합하는 것에 더하여, 항-DKK1/4 항체는 DKK4에 또한 결합한다 (표 16 참조). DKK4에 대한 친화력은 DKK1에 대한 것보다 약 100배 더 적지만, 이는 여전히 나노몰 이하이고, 따라서 생물학적으로 및 임상적으로 적절할 것이다. 중요하게는, DKK1의 Cys-2 도메인 내의 글리코실화에 대해 표적화될 것으로 예측되는 아스파라긴 잔기가 DKK2 또는 DKK4에서 보존되지 않는다. 예비 면역침전 실험은 항-DKK1/4 항체가 DKK2에 특이적으로 결합하지 않는 것을 시사하였다. DKK2에 대한 항-DKK1/4 항체 결합의 결합 친화력은 DKK2의 성공적인 정제 후에 결정될 것이다. DKK3의 별개의 기능 및 결합 성질과 일치하여, 항-DKK1/4 항체는 DKK3에 결합하지 않았다.

표 16

인간 DKK 패밀리의 구성원에 대한 항-DKK1/4 항체의 친화력

DKK 패밀리의 구성원	K_D
DKK1	$2.0 \times 10^{-12} \text{ M } (\pm 0.7)$
DKK2	ND
DKK3	NSB
DKK4	$2.97 \times 10^{-10} \text{ M } (\pm 1.5)$

[0620] 인간 DKK 패밀리의 단백질의 다른 구성원에 대한 항-DKK1/4 항체의 결합 친화력 및 키네틱을 Biacore T100을 사용하여 측정하였다. 이전처럼, 항-DKK1/4 항체에 대한 결합이 유의한 단백질에 대해 실험을 3중으로 수행하였고, 표준 편차와 함께 3회 실험의 평균으로 보고하였다. 가장 덜 상동성인 패밀리의 구성원인 DKK3에서는 배경 수준을 초과하여 검출가능한 결합이 없었고, 따라서 NSB (No Significant binding: 유의한 결합이 없음)으로 간주되

었다. 유사하게, 최근의 데이터는 본 발명의 항-DKK1/4 항체가 또한 DKK2에 유의하게 결합하지 않는다는 것을 시사하였다.

[0622] **실시예 15: 항-DKK1/4 항체가 LRP6에 대한 DKK1 결합을 차단한다**

[0623] DKK1은 이의 Wnt 길항제 활성을 LRP5/6 및 크레멘과의 상호작용을 통해 매개하여, LRP5/6의 내재화를 유도하고, LRP5/6와 프리즐드 수용체의 Wnt-유도 상호작용을 차단한다. 항-DKK1/4 항체는 도 8의 경쟁 ELISA 분석법에서 LRP6에 대한 DKK1 결합을 경쟁적으로 억제하였다.

[0624] HEK293T 세포는 DKK1 결합의 가시화를 허용하는 충분한 수준의 내인성 LRP5 또는 6을 발현하지 않는다. 그러나, 표면 소통 샤페론 단백질인 MESD와 LRP6의 공동-형질감염 시, GFP-태그가 부착된 DKK1이 세포 표면 상에서 검출될 수 있어, DKK1/LRP6 상호작용의 특정 성질을 도해한다. 항-DKK1/4 항체와 동일한 가변 영역을 공유하는 MOR04910가 이러한 상호작용을 특이적으로 차단하였다.

[0625] 직접적으로 LRP6에 대한 DKK1 결합을 억제하는 항-DKK1/4 항체의 능력을 ELISA에 의해 측정하였다. 간략하게, 처리되지 않은 플레이트 (Fisher, Cat# 12565501)를 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 재조합 LRP6 (R&D Systems Cat#1505-LR)으로 코팅하고, 500 ng/ml의 rhDKK1 및 농도 곡선의 항-DKK1/4 항체 또는 hIgG1 (항-라이소자임 MOR3207, ACE10915)을 병상에서 30분 동안 예비인큐베이션한 후, LRP6이 코팅된 플레이트 상에 2시간 동안 놓았다. 플레이트를 세정하고, DKK1 결합 수준을 항-DKK1 항체 (R&D Systems AF 1096)로 검출하였다. 미처리(raw) OD 값 (배경 차감)이 제시된다. 증가하는 농도의 항-DKK1/4 항체는 직접적으로 LRP6에 대한 DKK1 결합을 용량 의존적인 방식으로 억제하였지만, 증가하는 농도의 hIgG1은 LRP6에 대한 DKK1 결합을 차단하지 않았다.

[0626] 세포 표면 상의 DKK1/LRP6 결합을 억제하는 MOR04910의 능력을 형광 현미경검사로 측정하였다. HEK293T 세포를 LRP6 및 MESD를 코딩하는 플라스미드로 일시적으로 형질감염시키거나 거짓 형질감염시켰다. 세포를 DKK1-GFP 컨디셔닝 배지에서 항-라이소자임 Fab 또는 항-DKK1 Fab MOR04910와 함께 1시간 동안 37°C에서 인큐베이션하고, 형광 현미경검사에 의해 시험하였다. GFP 형광은 형질막 상의 과발현된 LRP6에 대한 DKK1-GFP 결합을 반영하였다. 항-DKK1/4 항체는 세포 표면 상에서의 LRP6과의 DKK1 상호작용을 차단하였다.

[0627] **실시예 16: 리포터 분석법 - DKK1에 의해 억제된 TCF/LEF 유전자 전사의 재활성화**

[0628] 정규 Wnt 신호전달은 핵에 대한 베타-카테닌 전위에서 최고에 달하고, 이때 핵에서 베타-카테닌이 TCF/LEF 패밀리의 전사 인자와 회합하여 Wnt-응답성 유전자의 증강이 초래된다. 루시페라제 유전자 전사를 구동시키는 TCF/LEF 응답성 프로모터를 사용하여 리포터 분석법이 확립되어, Wnt 경로 조정의 검출을 용이하게 하였다. DKK1은 이러한 분석법에서 Wnt3A 컨디셔닝 배지 (CM)에 의해 유도된 루시페라제 활성을 효율적으로 차단하였다. 항-DKK1/4 항체는 도 9의 0.16 nM의 겉보기 EC50으로 DKK1에 의해 억제된 Wnt 신호전달을 재활성화시켰다. 이러한 분석법은 완전한 억제를 위해 약 1 nM의 DKK1을 필요로 하고, 항체의 친화력은 2 pM이기 때문에, 이러한 EC50은 항-DKK1/4 항체 경쟁의 절대적인 한계보다는 각각의 단백질의 상대적인 양 및 분석법의 감도를 반영할 것이다.

[0629] SuperTopflash 리포터 및 크레멘으로 안정적으로 형질감염된 293T 세포를 10 ng/ml의 rhDKK1, 50% Wnt3a 컨디셔닝 배지, 및 다양한 양의 항-DKK1/4 항체로 처리하였다. 18시간 후, 루시페라제 활성을 Bright-Glo 루시페라제 분석 키트 (Promega)에 의해 측정하였다.

[0630] **실시예 17: 리포터 분석법 - 전구-골모세포-유사 세포에서의 DKK1에 의해 억제된 알칼리성 포스파타제 분비의 반전**

[0631] 더욱 생리학적으로 관련된 환경에서, 항-DKK1/4 항체가 DKK1 기능을 차단하는지 여부를 결정하기 위해, 다능성 (pluripotent) 마우스 세포주 C3H10T1/2 (10T1/2)의 Wnt-매개 골모세포 분화를 측정하는 시험관내 분석법을 확립하였다 (도 10 참조). 골모세포 분화시, 10T1/2 세포는 알칼리성 포스파타제 (AP)를 분비하고, 이러한 현상은 DKK1에 의해 억제될 수 있다. 항-DKK1/4 항체는 Wnt3A 컨디셔닝 배지의 존재 하에 10T1/2 분화의 DKK1 억제를 차단하였지만, IgG 대조군은 그렇지 않았다.

[0632] Wnt는 다수의 세포 상황에서 증식을 유도하고 세포자멸사를 억제하는 것으로 보고되지 않았고, Wnt 경로의 활성화는, 베타-카테닌 안정화 또는 핵 국소화에 의해 지시되는 바와 같이, 종양 진행과 빈번하게 관련된다. 또한, 일부 암 (예를 들어 결장 악성종양 및 흑색종)에서의 DKK1의 하향조절 ([Gonzalez-Sancho 2005]; [Kuphal 2006])은 일부 연구자들이 DKK1이 일부 암에 대해 종양 억제인자일 수 있다는 것을 시사하도록 하였다. DKK1이 종양 증식 또는 생존에 대한 효과가 있는지 여부를 테스트하기 위해, 종양 세포주를 항-DKK1/4 항체로

처리하고, 성장에서의 변화에 대해 분석하였다. 테스트된 종양 세포주는 항-DKK1/4 항체의 첨가에 의해 유의하게 영향을 받는 것으로 발견되지 않았다.

[0633] 여러 암 세포주의 생존 및 증식에 대한 항-DKK1/4 항체의 효과를 시험관내에서 테스트하였다. 이러한 분석법에 서, 항-DKK1/4 항체 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 종양 세포와 함께 인큐베이션하였고, 3일 후, 세포수와 선형 관계가 있는 대 사적으로 활성인 세포의 척도로서 ATP의 정량 (Promega, Cell Titer Glo Assay®)에 의해 세포수를 평가하였다. 이러한 분석법을 3가지 상이한 혈청 농도에서 수행하였다 (무혈청, 최소 성장, 및 완전 성장). 처리되지 않은 세포 및 hIgG1으로 처리된 세포와 비교하여 유의한 차이가 발견되지 않았다. 세포주 상청액을 ELISA에 의해 DKK1 발현에 대해 분석하였다.

[0634] **실시예 18: DKK1의 종 교차반응성 및 중화**

[0635] 중화성 항-DKK1/4 항체를 인간 DKK1에 대한 높은 친화력 및 중화 능력에 대해서가 아니라, 효능 및 안정성 연구 에 사용될 수 있는 다른 종과의 교차반응성을 기초로 또한 선별하였다. 항-DKK1/4 항체는 마우스, 래트, 및 사 이노물구스 원숭이 (사이노, 마카카 파스시쿠라리스(Macaca fascicularis)) DKK1과 인간 DKK1에 대한 것과 유사 한 친화력으로 교차반응하였다 (표 17 참조). 또한, 항-DKK1/4 항체는 4가지 종 모두의 DKK1-매개 Wnt 억제성 활성을 중화하였고 (표 17), 이는 이러한 종들이 안정성 및 효능 모델 모두에 대해 관련되었음을 시사한다.

표 17

DKK1의 종 교차반응성 및 중화

DKK1 단백질	K_D [pM]	wnt3a 신호전달의 재활성화 (TOPFlash) EC50 (pM)
인간	17	80.6
사이노물구스	7	54.2
마우스	10	60.5
래트	16	255

[0636] 인간, 사이노물구스, 마우스, 및 래트 DKK1에 대한 친화력 결정은 M-384 SERIES® 분석기 (BioVeris, Europe) 를 사용하여 용액 평형 적정 (SET)에 의해 분석하였다. 용액 평형 적정 (SET)에 의한 KD 결정을 위해, IgG 단 백질의 단량체 분획 (분석용 SEC에 의해 90% 이상의 단량체 함량으로 분석됨; Superdex75, Amersham Pharmacia)을 사용하였다. 전기화학발광 (ECL)을 기초로 하는 용액에서의 친화력 결정 및 데이터 평가는 [Haenel et al., 2005]에 기술된 바와 같이 기본적으로 수행하였고, 결합 피트(fit) 모델은 [Piehler et al., 1997]에 따라 변형된 바와 같이 적용되었다. 일정한 양의 MOR4910 IgG를 용액 내의 상이한 농도 (일련의 3n 희 석)의 인간 DKK1 (4 nM 출발 농도)로 평형화시켰다. 상자성 비드 (M-280 Streptavidin, Dynal)에 커플링된 비 오틴화 인간 DKK1, 및 BV-태그™ (BioVeris Europe, Witney, Oxfordshire, UK)이 표지된 염소 항-인간 (Fab)'2 폴리클로날 항체를 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 결합되지 않은 IgG의 농도를 M-384 SERIES ® 분석기 (BioVeris, Europe)를 사용하여 ECL 검출을 통해 정량하였다. 래트, 마우스, 및 사이노물구스 DKK1 에 대한 친화력 결정은 마우스, 래트, 및 사이노물구스 DKK1을 인간 DKK1 대신 용액 내에서 분석물로 사용하여 본질적으로 상기 기술된 바와 같이 수행하였다. 유리 IgG 분자의 검출을 위해, 상자성 비드에 커플링된 비오틴 화 인간 DKK1을 사용하였다. MOR4910 및 항-DKK1/4 항체는 인간 DKK1 (Novartis)을 동등한 EC50으로 중화하였 고, 항-DKK1/4 항체는 원숭이 (Novartis), 마우스 (R&D Systems 1765-DK-010) 및 래트 (Novartis) DKK1을 또한 중화하였다. 인간, 래트, 마우스, 및 사이노물구스 DKK1에 대한 TOPFLASH 리포터 분석법을 인간 DKK1 대신 Wnt 컨디셔닝 배지의 억제제로서 각각의 종의 재조합 DKK1을 사용하여 본질적으로 상기 기술된 바와 같이 수행하였 다 (도 9). 래트 재조합 DKK1은 TOPFLASH 분석법의 유의한 억제를 달성하기 위해 더 높은 농도의 단백질을 필 요로 하였다.

[0638] **실시예 19: PC3M2AC6 이종이식편의 경골내 성장에 대한 항-DKK1/4 항체의 효과**

[0639] 전립선 종양 전이는 골용해성이기 보다는 압도적으로 골모세포성이라는 점에서 골 전이 중에서 독특하다 ([Keller 2001]). 그러나, 주로 골모세포성인 골 전이도 기저를 이루는 골용해 영역이 있고, 빈번하게 골 질량 밀도 (BMD)가 낮다 (특히 환자 안드로겐 제거 요법을 받고 있는 경우) ([Saad 2006]). 최근, DKK1이 스위치로 서 작용함으로써, DKK1의 발현이 혼합형 골모세포성/골용해성 전립선 종양 세포주 (C4-2B)의 골용해성 성질을 증강시킨다는 것이 증명되었다. 또한, DKK1의 shRNA 억제가 주로 골용해성인 전립선 종양 세포주 (PC3)의 골용 해성 활성을 억제하였다 ([Hall 2005]; [Hall 2006]). DKK1 녹다운(knockdown) 또한 종양 이종이식편의 경골

내 성장을 억제하여, 골용해성 활성이 전이성 함요(niche)를 확립하는데 중요할 수 있다고 추측하도록 하였지만, 전립선 전이에서의 DKK1의 이어지는 손실은 종양을 골모세포성 표현형으로 전환시켰다.

[0640] 골용해성 전립선 종양 모델이 [Kim 2003]의 방법으로부터 개조되었다. 루시페라제를 안정적으로 발현하는 골용해성 전립선 종양 세포주 (PC3M)의 변이체 (PC3M2AC6)를 마우스의 경골 내로 주사하였다. 종양의 성장을 루시페라제에 의해 모니터링하는 한편, 골에서의 변화를 마이크로-전산화 단층촬영술 (마이크로-CT) 및 조직학에 의해 모니터링하였다. 종양 성장을 증강시키기보다는, 항-DKK1/4 항체는 종양 성장을 억제하는 경향이 있었다. 임의의 한 연구에서 억제가 현저하지 않았지만, 현재까지 수행된 5/5 연구에서 일관적으로 발생하였으며, 종양 성장에 대한 3회 용량의 항-DKK1/4 항체의 효과를 나타내는 대표적인 연구가 도 11에 제시된다. 억제에 대한 유사한 현저하지 않은 경향이 피하 PC3M2AC6 이종이식편이 있는, 항-DKK1/4 항체로 처리된 마우스에서 발생하였다.

[0641] 이식 후 제5일에 치료를 시작하였다 (20만개의 세포/동물). 항-DKK1/4 항체를 매일 20, 60, 및 200 μg /마우스/일의 용량으로 1주일에 3회로 2주 동안 정맥내 투여하였다. 대조군 IgG를 매일 200 μg /마우스/일로 1주일에 3회로 2주 동안 정맥내 투여하였다. 매일 비히클 대조군 (PBS)을 1주일에 3회로 2주 동안 정맥내 투여하였다. 처리 후에 최종 효율 데이터 및 체중 변화를 계산하였다.

[0642] 이러한 모델을 사용하여, 본 발명가들은 항-DKK1/4 항체가 종양에 의해 유도된 피질골 손상을 억제한다는 것을 발견하였다. 종양 이식편 및 가짜 이식편 모두 골에 대한 기계적 손상을 야기하였고, 이러한 손상으로 추후에 리모델링되어 겔보기 골 부피에서의 감소를 야기하는 직골에서의 초기 증가가 초래되었다는 관찰에 의해 해면골에 대한 효과가 이러한 모델에서 혼란스럽게 되었다. 따라서 전체적인 골 부피/섬유주 부피 (BV/TV) 비율에 대한 새롭게 형성된 직골 및 섬유주의 상대적인 효과가 불명료하였다. 그러나, 항-DKK1/4 항체가 종양 및 가짜가 이식된 경골 모두에서 골 생산을 증가시키고, 리모델링에 수반되는 골 부피에서의 감소를 억제하거나 지연시킨다는 것이 명백하다. 동일한 종양-유도 골용해성 모델을 사용하여, 항-DKK1/4 항체는 조메타와 동등한 항-골용해성 활성을 나타냈다 (도 12 참조). 항-DKK1/4 항체의 골 대사 효과는 20-200 μg /마우스의 범위에서 용량 응답성이었고, 최소로 효과적인 용량은 20 내지 60 μg /마우스였다 (도 13 참조). 이러한 데이터들은 항-DKK1/4 항체에 종양-유도 골용해성 질환에 대한 효과가 확실히 있지만, 이러한 항체가 비-종양 골 질환 예컨대 골다공증 또는 골절 복원을 증강시키는 것에서 또한 효과적일 수 있다는 것을 함께 시사한다.

[0643] **실시예 20: 종양 및 가짜가 이식된 경골 모두에서 항-DKK1/4 항체가 상승된 골 밀도를 유지시킨다**

[0644] 마우스에서 효능의 약역학적 마커를 평가하기 위한 시도에서, 골 대사의 3가지 혈청 마커를 분석하였다: 오스테오칼신 (OC), 오스테오포테제린 (OPG), 및 핵 인자 KB 리간드의 분비형 수용체 활성화제 (sRANKL). 항체의 예상되는 작용 메커니즘으로 인해 더욱 전형적인 파골세포 마커보다는 이러한 골모세포 마커들을 사용하였다. 그러나, 종양이 있는 동물 대 나이브(naive) 동물에서 일관적인 변화가 검출되지 않았다. 마이크로-CT 또는 IHC에서 측정했을 때, 임의의 이러한 마커들과 골 손실의 상관관계가 일관적으로 관찰되지 않았다.

[0645] 치료된 마우스의 경골의 마이크로CT 재건이 도 12A에서 제시된다. 피질 손상을 0 = 손상 없음에서 3 = 중증도의 손상으로 점수를 매겼다. 도 12B. 종양이 이식된 경골에서의 피질 손상을 연구 군에 대하여 맹검인 마이크로CT 분석에 의해 수동으로 점수를 매겼다. 가짜가 이식된 다리 중 어느 것에서도 피질 손상이 관찰되지 않았다.

[0646] 방법: 12주령의 암컷 누드 마우스에게 2×10^5 개의 PC-3M2AC6 세포를 왼쪽 경골에 경골내 이식하고, 가짜를 오른쪽 경골 내에 이식하였다. 이식후 제5일에 치료를 시작하였다. NVP-항-DKK1/4 항체-NX (항-DKK1/4 항체) 및 IgG 대조군을 매일 200 μg /마우스/일의 용량으로 1주일에 3회로 2주 동안 정맥내 투여하였다. 매일 비히클 (PBS) 대조군을 1주일에 3회로 2주 동안 또한 정맥내 투여하였다. 동물들을 종양 이식 후 제7일, 제14일, 제18일에 μ -CT VivaCT40 Scanner (SCANCO, Switzerland)를 사용하여 스캐닝하였다. 해면 골 밀도 (BV/TV)를 방법에 기술된 바와 같이 분석하였다. 별표 (*)는 $p < 0.05$ 에서 동시에 비히클 및 IgG 대조군 (n=12) 모두로부터의 통계적으로 유의한 차이를 가리킨다.

[0647] 도 13에서, 골 질량을 결정하기 위해, 경골의 2차 해면질을 김자(Giemsa) 염색을 기초로 하는 Axiovision 소프트웨어 및 Zeiss 영상화기 Z.I로 영상화하였다. 판독값은 전체 시역(視域) 중 석회화된 골의 백분율을 기초로 하였다. 모든 컬럼은 언급된 마리수의 동물의 평균 및 표준 편차를 나타낸다. PBS IgG, 및 항-DKK1/4 항체로 처리된 군에서, 종양이 있는 동물만 분석하였다. 오른쪽 다리에는 가짜 주사가 없었고, 왼쪽 다리에는 종양이 있었다. 통계량: 던넛(Dunnett) 다중 비교 테스트 일원 ANOVA. PBS 군의 각각의 다리와 비교된 왼쪽 다리 또

는 오른쪽 다리 $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p > 0.05$ n.s.

[0648] 도 14는 항-DKK1/4 항체의 동화성 골 효능이 최소한도의 효과적인 용량이 20 내지 60 μg /마우스 $3\times/\text{주}$ 이면서 용량 의존적임을 나타낸다. 12주령의 암컷 누드 마우스에게 2×10^5 개의 PC-3M2AC6 세포를 왼쪽 경골에 경골내 이식하고, 가짜를 오른쪽 경골 내에 이식하였다. 이식후 제6일에 치료를 시작하였다. NVP-항-DKK1/4 항체-NX (항-DKK1/4 항체)를 매일 20, 60, 및 200 μg /마우스/일의 용량으로 1주일에 3회로 2주 동안 정맥내 투여하였다. 대조군 IgG를 매일 200 μg /마우스/일의 용량으로 1주일에 3회로 2주 동안 정맥내 투여하였다. 매일 비히클 (PBS) 대조군을 1주일에 3회로 2주 동안 정맥내 투여하였다. 동물들을 중앙 이식 후 제7일 및 제20일에 μ -CT VivaCT40 Scanner (SCANCO, Switzerland)를 사용하여 스캐닝하였다. 해면 골 밀도 (BV/TV)를 방법에 기술된 바와 같이 분석하였다. 별표 (*)는 $p < 0.05$ 에서 동시에 비히클, IgG, 천공만 한 경우 및 나이브 동물이 포함 되는 모든 대조군 모두로부터의 통계적으로 유의한 차이를 가리킨다.

[0649] 실시예 21: 바이오마커 상태

[0650] DKK1 바이오마커

[0651] DKK1의 RNA 발현 패턴이 기술되어 있다. [Krupnik (1999)]는 노던 블롯 분석에 의해 태반에서의 발현을 나타냈 고, 심장, 뇌, 폐, 간, 골격근 또는 채장에서는 발현이 검출되지 않았다. [Wirths (2003)]은 간, 신장 및 유방 에서의 RNA 발현의 결여를 나타냈지만, 간모세포종 및 윌름스(Wilms) 종양의 부분집합에서는 RNA 발현이 나타 났다. RNA 원위치 혼성화에 의해 DKK1의 위장관 발현을 시험한 연구자들은 정상 또는 악성 여부와 상관없이 위 및 결장에서 발현이 없음을 나타냈다 ([Byun 2006]).

[0652] 마우스에서의 RNA 발현 분석은 골에서의 높은 DKK1 발현 수준, 태아 및 태반에서의 중등도의 발현, 및 갈색 지 방 조직, 흉선 및 십이지장에서 약한 발현을 나타냈다 ([Li 2006]).

[0653] DKK1 단백질 발현을 현행 연구에서 사용된 것과 동일한 염소 항체를 사용하여 골수종 시험편에서 평가하였다 ([Tian, 2003]). 이러한 논문에서, 낮은 등급의 형태학이 있는 환자의 골수종 세포에서 발현이 나타났다; 5명 의 대조군 대상의 골수 생검 시험편에서 DKK1 단백질 발현이 검출되지 않았다.

[0654] 치료용 항체 항-DKK1/4 항체의 조직 분포 및 종 교차반응성을 일련의 정상 인자 및 원숭이 조직에 대해 이를 스 크리닝함으로써 연구하였다. 전체 조직 절편 및 조직 마이크로어레이 모두 평가하였다. 양성 대조군은 DKK1에 대한 시판 항체를 포함하였고, 이를 동일한 조직 셋트에서 평가하였다.

[0655] DKK1_15 (FITC 접합 항-DKK1/4 항체) 및 DKK 1_8 (FITC 접합 염소 항-DKK1, R&D Systems, # AF 1096, 로트 GBL013101 및 GBL14111).

[0656] 기타 바이오마커

[0657] DKK1의 병태생리학적 역할에 대해 거의 알려져 있지 않기 때문에, 상당한 시도들이 바이오마커 연구에 의해 항-DKK1/4 항체의 생체내 효과에 관한 지식 기반을 구축하는 것 및 어떻게 이것이 발달을 조장하도록 탐구될 수 있 는지에 초점을 맞추었고, 초점을 맞추고 있다. 주요 초점 영역에는 하기의 것들이 포함되었다:

[0658] 1) 파골세포성 및 골모세포성 활성의 순환 마커의 측정에 의해 정상 및 전이성 골 대사에서의 항-DKK1/4 항체의 효과를 이해하는 것.

[0659] 2) 표적 적응증을 확인하고 확장하기 위한 다발성 골수종 및 기타 종양에서의 DKK1의 상대적인 발현 수준.

[0660] 3) 베타-카테닌 활성화를 평가하기 위한 결장, 골수, 폐, 피부 및 유방과 같은 주요 조직에서의 유전자 발현 수 준에서의 효과.

[0661] 예비적인 분자 역학 연구로 다발성 골수종에 걸린 환자에서 증가된 DKK1 혈청 수준이 확인되었고, 이는 이러한 적응증에서의 POC를 지지하였다.

[0662] 기존의 지식을 기초로, 표 18은 항-DKK1/4 항체에 대한, 제안된 잠재적인 바이오마커를 제공한다.

표 18

DKK 1 및 DKK4 표적에 대한 바이오마커			
카테고리	종양	혈액	대용 조직

약역학 (PD) - 표적 - 하류 작용 메커니즘	N/A	유리 DKK-1 및 항-DKK1/4 항체가 결합된 DKK-1 수준 베타-카테닌의 활성화 NTx, CTx, PINP, 오세테오칼신, RANKL, OPG, PTH, 비타민 D3, 칼시토닌	지방/ 피부
효능	혈청 M 단백질, 소변 전체 M 단백질, b2 마이크로글로빈, LDH	NTx, CTx, PINP, 오세테오칼신, RANKL, OPG, PTH, 칼시토닌 골-ALP, CICP, CTx, NTx 등	
예상 마커 계층화 예비선별	DKK1 발현	DKK-1, CTx, PINP, 오스테오칼신, RANKL, OPG, PTH, 비타민 D3, 칼시토닌 DKK1 혈청 수준	
안정성		면역원성	
약동학		항-DKK1/4 항체	

[0664] 실시예 22: 항-DKK1 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열

[0665] CDR 영역이 표 5, 6, 11A 및 11B에 제시된 항-DKK1 항체의 경쇄 및 중쇄의 가변 영역의 아미노산 서열이 표 19에서 완전하게 제공된다.

표 19

항-DKK1 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열 (서열 2-39)

MOR04454 VH: (서열 2)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGLHWVRQAPGKGLEWVSSISYYGSSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSHMDKPPGYVFAFWGQGTTLTVSS
MOR04454 VL: (서열 21)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIKYNLWYQQKPGKAPKLLIGAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT
ISSLPEDFATYYCLQYYGMPPTFGQGTKVEIKRT
MOR04455 VH: (서열 3)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMVSRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYMDHWGQGTTLTVSS
MOR04455 VL: (서열 22)
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISNYLHWYQQKPGKAPKLLIYGASNLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT

[0666]

ISSLOPEDFAVYYCQOYDSIPMTFGQGTKEIKRT
MOR04456 VH: (서열 4) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNMYGMWVRQAPGKGLWVSGISGSGSYTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGTLLVTVSS
MOR04456 VL: (서열 23) DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFTL TISSELEPEDFATYYCQOYGDPEITFGQGTKEIKRT
MOR04461 VH: (서열 5) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLWVSGISYSGSNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMGIDLDYWGQGTLLVTVSS
MOR04461 VL: (서열 24) DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGFNYSWYQQHPGKAPKLMIHGDSNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCSTWDMTVDVFVGGGTKLTVLGG
MOR04470 VH: (서열 6) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLWVSVISSDSSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGIDFDHWGQGTLLVTVSS
MOR04470 VL: (서열 25) DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVNNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCQSYASGNTKVVFGGGTKLTVLGG
MOR04516 VH: (서열 7) QVQLVQSGAEVKKPESGLKISCKGSGSYFTNYYIGWVRQMPGKGLWEMGIYPTDSYTNYSFQGVITISADK SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGIPFRMRGFDYWGQGTLLVTVSS
MOR04516 VL: (서열 26) DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSNIGSSFNWYQQLPGTAPKLLIGNNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASL AITGLQSEDEADYYCASFDMGSPNVFVGGGTKLTVLGG
MOR04907 VH: (서열 8) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNMYGMWVRQAPGKGLWVSGISGSGSYTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGTLLVTVSS
MOR04907 VL: (서열 27) DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFTL TISSELEPEDFAVYYCQOYLSLPTTFGQGTKEIKRT
MOR04913 VH: (서열 9) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNMYGMWVRQAPGKGLWVSGISGSGSYTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGTLLVTVSS
MOR04913 VL: (서열 28) DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFTL TISSELEPEDFAVYYCQOYMTLPLTFGQGTKEINRT
MOR04946 VH: (서열 10) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNMYGMWVRQAPGKGLWVSGISGSGSYTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGTLLVTVSS
MOR04946 VL: (서열 29) DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFTL TISSELEPEDFAVYYCQOYLTPLTFGQGTKEIKRT
MOR04910 VH: (서열 11) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLWVSGISYSGSNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMGIDLDYWGQGTLLVTVSS
MOR04910 VL: (서열 30) DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGFNYSWYQQHPGKAPKLMIHGDSNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCQSDVSPITAVFGGGTKLTVLGG
MOR04921 VH: (서열 12) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLWVSGISYSGSNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMGIDLDYWGQGTLLVTVSS
MOR04921 VL: (서열 31) DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGFNYSWYQQHPGKAPKLMIHGDSNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCQTWATSPFLSSVFGGGTKLTVLGG
MOR04948 VH: (서열 13.) QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLWVSGISYSGSNTHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMGIDLDYWGQGTLLVTVSS
MOR04948 VL: (서열 32) DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGFNYSWYQQHPGKAPKLMIHGDSNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS LTISGLQAEDEADYYCQTWDSLSFFVFGGGTKLTVLGG

[0667]

MOR04914 VH: (서열 14)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLEWVSVISSDSSSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGIDFDHWGQGTTLTVSS
MOR04914 VL: (서열 33)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVNNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS
LTISGLQAEDEADYYCQSYTYTPTISPVFGGGTKLTVLGQ
MOR04920 VH: (서열 15)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLEWVSVIEHKDAGYTTWYAAGVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGIDFDHWGQGTTLTVSS
MOR04920 VL: (서열 34)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVNNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS
LTISGLQAEDEADYYCQSYASGNTKVVFGGGTKLTVLGQ
MOR04945 VH: (서열 16)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLEWVSVISSDSSSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGIDFDHWGQGTTLTVSS
MOR04945 VL: (서열 35)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVNNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS
LTISGLQAEDEADYYCQTYDQIKLSAVFGGGTKLTVLGQ
MOR04952 VH: (서열 17)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLEWVSVISSDSSSTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGIDFDHWGQGTTLTVSS
MOR04952 VL: (서열 36)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVNNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS
LTISGLQAEDEADYYCQSYDSPTDSVFGGGTKLTVLGQ
MOR04954 VH: (서열 18)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMWVRQAPGKGLEWVSVIEHKDKGGTTYAASVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGIDFDHWGQGTTLTVSS
MOR04954 VL: (서열 37)
DIALTPASVSGSPGQSITISCTGTSSDLGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVNNRPSGVSNRFGSGSKSGNTAS
LTISGLQAEDEADYYCQSYASGNTKVVFGGGTKLTVLGQ
MOR04947 VH: (서열 19)
QVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTNYYIGWVRQMPGKGLEWMMGIIVPGTSYTIYSPSFQGVITISADK
SISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGIPFRMRGFDYWGQGTTLTVSS
MOR04947 VL: (서열 38)
DIVLTQPPSVSGAPQRVTISCSGSSSNIGSSFVNWYQQLPGTAPKLLIGNNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASL
AITGLQSEDEADYYCASFDMGSPNVFGGGTKLTVLGQ
MOR05145 VH: (서열 20)
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNYYGMTWVRQAPGKGLEWVSGISGSGSYTYADSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTIYMDYWGQGTTLTVSS
MOR05145 VL: (서열 39)
DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQNLFSPLYAWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGVPARFSGSGSGTDFTL
TISSLEPEDFAVYCCQYMTLPLTFGGGTKEIKRT

[0668]

[0669]

표 19 내의 가변 영역의 CDR 및 FR 섹션이 하기와 같이 정렬된다: 표 20A에서 중쇄에 대해 (서열 2-20; VH3은 서열 125이고, VH5는 서열 126이다), 표 20B에서 카파 경쇄에 대해 (서열 21, 22, 23, 27, 28 및 29; VK1은 서열 127이고, VK3은 서열 128이다), 표 20C에서 람다 경쇄에 대해 (서열 24, 25, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 및 37; VL2는 서열 129이고 및 VL1은 서열 130이다).

항-DKK1 항체의 중쇄 가변 영역의 아미노산의 정렬 (서열 2-20, 125-126)

VH

VH 서열 DKK1 결함제

[illegible]

20B

항-DKK1 항체의 카파 경쇄 가변 영역의 아미노산의 정렬 (서열 24-25, 30-37, 129-130)

74

VL 카파 서열 DKK1 결합제

[illegible]

20C

항-DKK1 항체의 램다 경쇄 가변 영역의 아미노산의 정렬 (서열)

2

VL 람다 서열 DKK1 결함제

위치

[illegible]

적어도 서열 40-48 및 표 11B에서 컨센서스 CDR 서열이 제공된다. 표준 방법 및 본원에서 제공된 방법을 사용하여 표 20A-20C의 정렬로부터 당업자에 의해 추가적인 컨센서스 CDR 서열이 결정될 수 있다.

등가물

본 발명의 구체적인 실시양태들의 상기 상세한 설명으로부터, 신규 항체 및 이의 면역학적 단편이 기술되었음이 명백하여야 한다. 특정 실시양태들이 본원에서 상세하게 개시되었지만, 이는 설명의 목적으로만 예로서 행해진 것이다. 특히, 본 발명의 취지 및 범주를 벗어나지 않으면서 다양한 치환, 변경, 및 변형이 본 발명에 이루어질 수 있는 것으로 본 발명가들에 의해 구현된다.

도면의 간단한 설명

도 1은 세정되지 않은 비드를 여러 다른 HuCAL® 엄격도로 세정된 비드와 비교했을 때 Strep-Tactin이 코팅된 비드로부터 His-Strep 태그가 부착된 DKK1의 유의한 손실이 없음을 도해하는 그래프이다.

도 2는 실시예 3에서 제공된 바와 같은, 100 μ l Bright-Glo 루시페라제 시약으로의 Wnt 활성 분석의 결과를 도해하는 막대 그래프이다.

도 3은 효소 결합 면역 흡착 분석법 (ELISA)의 그래프이다. TECAN Spectrafluor 플레이트 판독기에서 형광이

측정되었고, 결합 곡선이 제시된다.

[0068] 도 4는 실시예 6에 제공된 바와 같은, 표준 Wnt3a-의존적 TCF/LEF luc 리포터 분석을 도해하는 그래프이다.

[0069] 도 5는 크레멘 공동-수용체 단백질의 공동-발현에 의해 매개된 DKK1에 대한 고도로 개선된 감도를 나타내는 TCF/LEF luc 리포터 분석법의 개선된 버전을 도해하는 그래프이다.

[0070] 도 6A는 DKK1에 대한 항-DKK1/4 항체 결합의 표면 플라즈몬 공명 측정의 그래프식 도해이다. 도 6B는 계산된 결합 친화력 및 키네틱 값의 표이다.

[0071] 도 7A는 에피토프 지도작성에서 사용하기 위한 전장(全長) 및 말단절단형(truncated) DKK1의 개략도이다. 도 7B는 도 7A의 DKK1 단백질 및 단편에 대한 본 발명의 항체의 결합을 묘사한다.

[0072] 도 8은 경쟁 ELISA 분석법에서의 DKK1/4 항체 결합의 그래프식 도해이다.

[0073] 도 9는 Wnt-조절 유전자 전사 하류의 DKK1/4 항체-관련 재활성화의 그래프식 도해이다.

[0074] 도 10은 DKK1에 의해 억제된 ALP 분비의 DKK1/4 항체 반전의 그래프식 도해이다.

[0075] 도 11은 생체내 이중이식편에 대한 DKK1/4 항체 효과의 그래프식 도해이다.

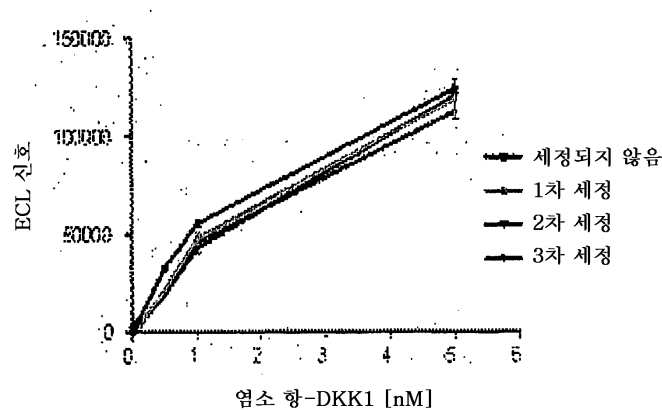
[0076] 도 12는 생체내 골 밀도의 DKK1/4 항체-관련 상승의 그래프식 도해이다.

[0077] 도 13은 조메타(Zometa)의 항-골용해성 효능을 DKK1/4 항체와 비교하는 그래프식 도해이다.

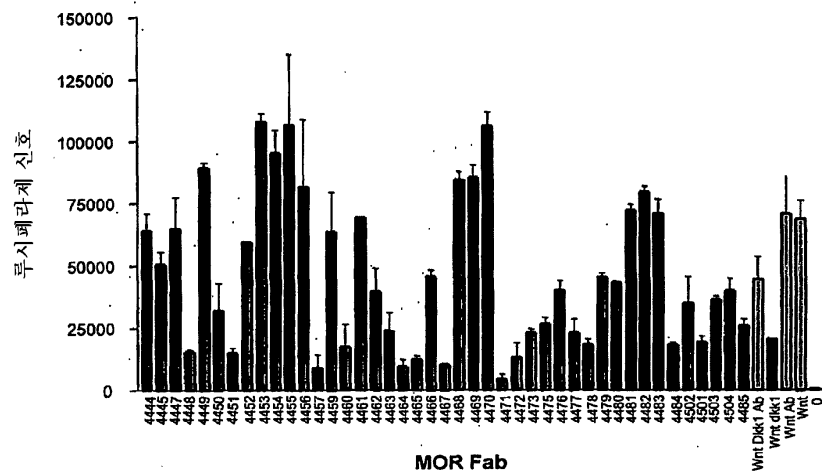
[0078] 도 14는 동화성 골에 대한 DKK1/4 항체의 용량 의존적 효능의 그래프식 도해이다.

도면

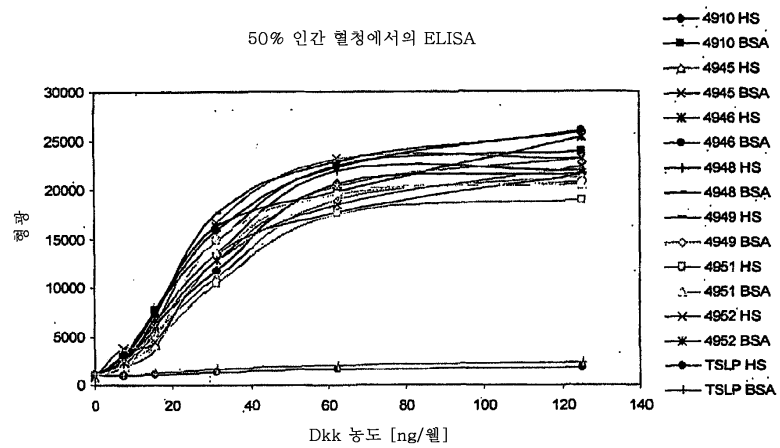
도면1



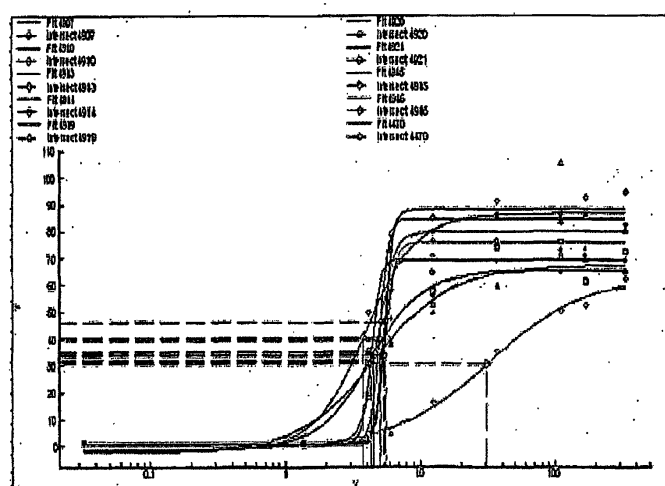
도면2



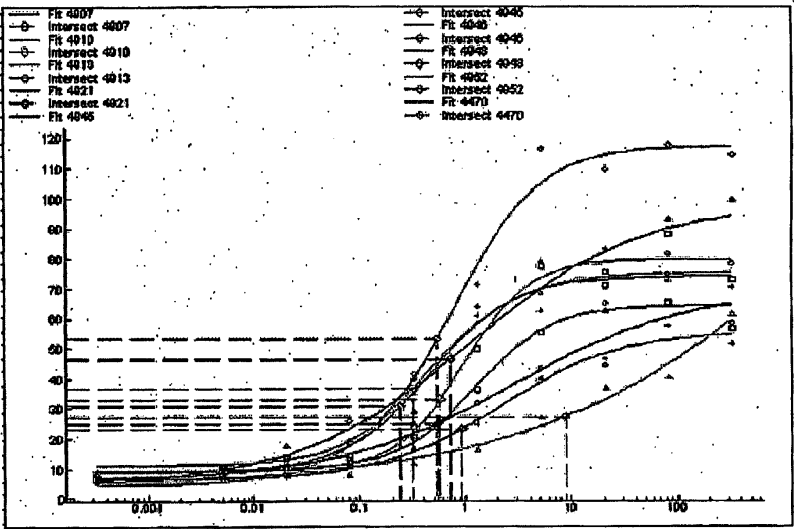
도면3



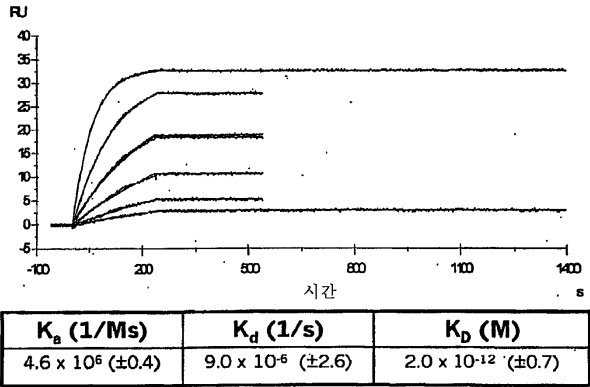
도면4



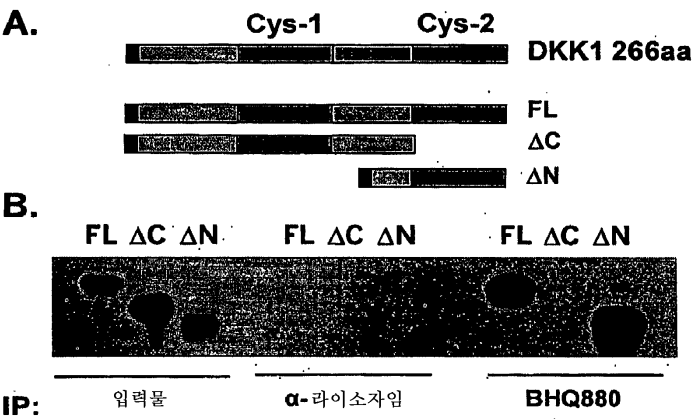
도면5



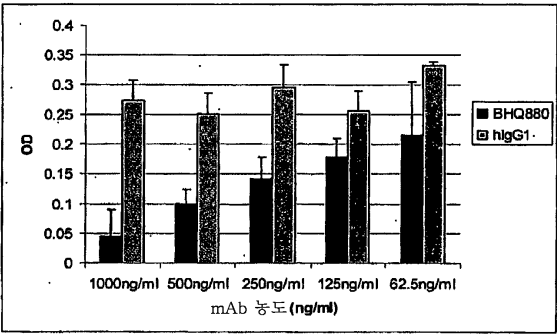
도면6



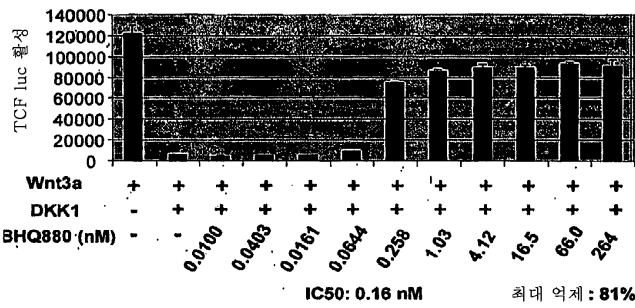
도면7



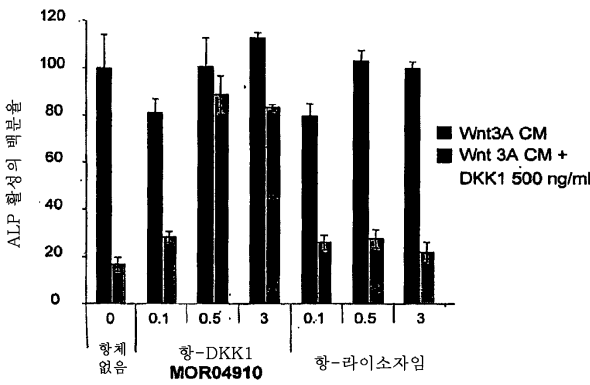
도면8



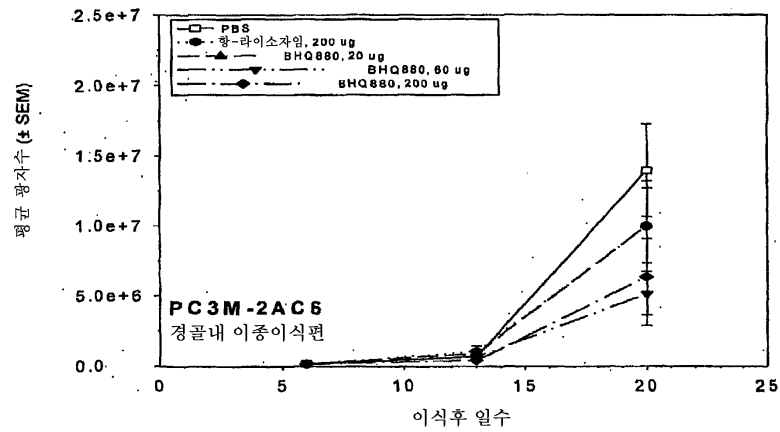
도면9



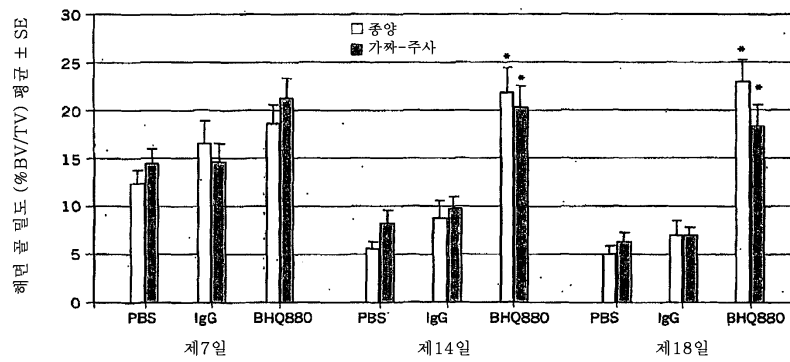
도면10



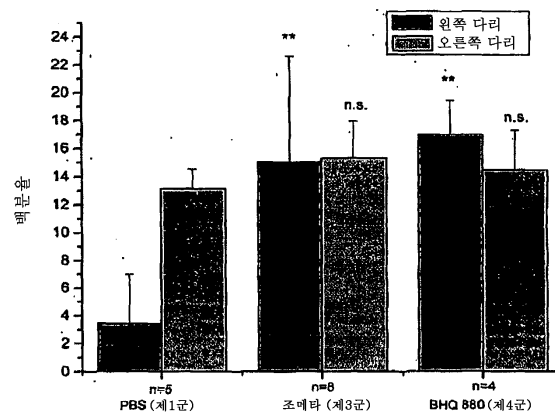
도면11



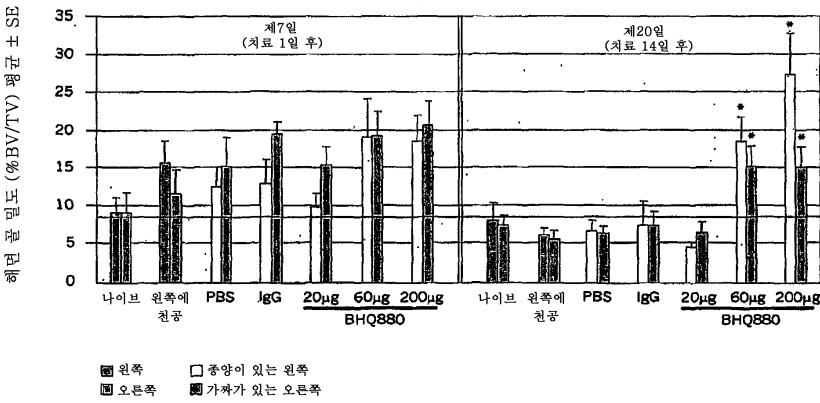
도면12



도면13



도면14



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Novartis AG
- <120> COMPOSITIONS AND METHODS OF USE FOR ANTIBODIES OF DICKKOPF-1
- <130> ON4-34783
- <150> USSN 60/759216
- <151> 2006-01-13
- <160> 136
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 266
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Met Ala Leu Gly Ala Ala Gly Ala Thr Arg Val Phe Val Ala Met
1 5 10 15

Val Ala Ala Ala Leu Gly Gly His Pro Leu Leu Gly Val Ser Ala Thr
20 25 30

Leu Asn Ser Val Leu Asn Ser Asn Ala Ile Lys Asn Leu Pro Pro Pro
35 40 45

Leu Gly Gly Ala Ala Gly His Pro Gly Ser Ala Val Ser Ala Ala Pro
50 55 60

Gly Ile Leu Tyr Pro Gly Gly Asn Lys Tyr Gln Thr Ile Asp Asn Tyr
65 70 75 80

Gln Pro Tyr Pro Cys Ala Glu Asp Glu Glu Cys Gly Thr Asp Glu Tyr
85 90 95

Cys Ala Ser Pro Thr Arg Gly Gly Asp Ala Gly Val Gln Ile Cys Leu
100 105 110

Ala Cys Arg Lys Arg Arg Lys Arg Cys Met Arg His Ala Met Cys Cys
115 120 125

Pro Gly Asn Tyr Cys Lys Asn Gly Ile Cys Val Ser Ser Asp Gln Asn
130 135 140

His Phe Arg Gly Glu Ile Glu Glu Thr Ile Thr Glu Ser Phe Gly Asn
145 150 155 160

Asp His Ser Thr Leu Asp Gly Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Leu Ser Ser
165 170 175

Lys Met Tyr His Thr Lys Gly Gln Glu Gly Ser Val Cys Leu Arg Ser
180 185 190

Ser Asp Cys Ala Ser Gly Leu Cys Cys Ala Arg His Phe Trp Ser Lys
195 200 205

Ile Cys Lys Pro Val Leu Lys Glu Gly Gln Val Cys Thr Lys His Arg

210

215

220

Arg Lys Gly Ser His Gly Leu Glu Ile Phe Gln Arg Cys Tyr Cys Gly
225 230 235 240

Glu Gly Leu Ser Cys Arg Ile Gln Lys Asp His His Gln Ala Ser Asn
245 250 255

Ser Ser Arg Leu His Thr Cys Gln Arg His
260 265

<210> 2

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Tyr Tyr Gly Ser Ser Thr 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 Asp Gly Ser His Met Asp Lys Pro Pro Gly Tyr Val Phe Ala

100 105 110

Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr 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 His Tyr Met Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 4

<211> 115
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr 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 Thr Ile Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115

<210> 5
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

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

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

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His 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 Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

35

40

45

Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr 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 His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Thr Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ile Pro Phe Arg Met Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>	8
<211>	115
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 8

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

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

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

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

100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 115
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr 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 Thr Ile Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 10
<211> 115
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr 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 Thr Ile Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 11

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His 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 Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 12
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His 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 Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 13
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His 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 Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210>	14
<211>	116
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 14

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

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

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

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

100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 15
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

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

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

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

Ser Ser Ile Glu His Lys Asp Ala Gly Tyr Thr Thr Trp Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16

<211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

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

Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr 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 His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 17
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

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

1 5 10 15

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

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

Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr 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 His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 18
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

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

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

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

35

40

45

Ser Val Ile Glu His Lys Asp Lys Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Ile Ile Val Pro Gly Thr Ser Tyr Thr Ile Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

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

65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Ile Pro Phe Arg Met Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210>	20
<211>	115
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

 $\langle 400 \rangle$ 20

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

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

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

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

100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

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 Lys Asn Tyr
20 25 30

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

Gly 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 Leu Gln Tyr Tyr Gly Met Pro Pro
85 90 95

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

<210> 22
<211> 109
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

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 Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

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

Tyr Gly Ala Ser Asn 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 Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Ile Pro Met
85 90 95

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

<210> 23

<211> 110

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Asp 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 Asn Leu Phe Ser Pro
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 Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Thr Trp Asp Met Thr

85

90

95

Val Asp Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 25

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Ser Gly
85 90 95

Asn Thr Lys Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 26
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Ser
 20 25 30

Phe Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Gly Asn Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Met Gly Ser
 85 90 95

Pro Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
 100 105 110

<210> 27
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Asp 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 Asn Leu Phe Ser Pro
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 Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 28
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Asp 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 Asn Leu Phe Ser Pro
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 Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Thr Leu Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Asn Arg Thr
100 105 110

<210> 29
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Asp 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 Asn Leu Phe Ser Pro
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 Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Thr Leu Pro
85 90 95

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

<210> 30
<211> 113
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Val Ser
85 90 95

Pro Ile Thr Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 31

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Pro Leu Ser Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 32
<211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu

35

40

45

Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

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

Ser Phe Phe Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 33

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Thr Tyr Thr

85

90

95

Pro Ile Ser Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 34

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Ser Gly
85 90 95

Asn Thr Lys Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 35
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 35

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

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Asp Gln Ile
 85 90 95

Lys Leu Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 36
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 36

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

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Pro
85 90 95

Thr Asp Ser Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 37

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

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

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Ala Ser Gly
85 90 95

Asn Thr Lys Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln

<210> 38

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Ser
20 25 30

Phe Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Gly Asn Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Phe Asp Met Gly Ser
85 90 95

Pro Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 39
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Asp 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 Asn Leu Phe Ser Pro
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 Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Thr Leu Pro

85

90

95

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

<210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Phe

<210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

Gly Ile Ser Tyr Tyr Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Phe

<210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42

Gly Ile Ser Tyr Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Phe

<210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	Thr
1				5					10

<210> 44
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Ser	Tyr	Gly	Met	Thr
1				5					10

<210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Tyr	Gly	Met	Thr
1				5					10

<210> 46
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Thr
1 5 10

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Thr
1 5 10

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 49
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 50
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Gly Met Thr
1 5 10

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser
1 5 10

<210> 52
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser
1 5 10

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser
1 5 10

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser

1 5 10

<210> 55
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 55

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser
 1 5 10

<210> 56
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 56

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser
 1 5 10

<210> 57
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 57

Trp Val Ser Gly Ile Ser Glu Arg Gly Val Tyr Ile Phe Tyr Ala Asp
 1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
 20

<210> 58
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58

Trp Val Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp
1 5 10 15

Ser Val Lys Gly
20

<210> 59

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Trp Val Ser Asp Ile Glu His Lys Arg Arg Ala Gly Gly Ala Thr Ser
1 5 10 15

Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly
20

<210> 60

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Trp Val Ser Met Ile Glu His Lys Thr Arg Gly Gly Thr Thr Asp Tyr
1 5 10 15

Ala Ala Pro Val Lys Gly
20

<210> 61

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Trp	Val	Ser	Gly	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ser	Asn	Thr	His	Tyr	Ala	Asp
1				5					10					15	

Ser	Val	Lys	Gly
			20

<210> 62

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Trp	Val	Ser	Val	Ile	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp
1				5					10					15	

Ser	Val	Lys	Gly
			20

<210> 63

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Trp	Val	Ser	Val	Ile	Ser	Ser	Asp	Ser	Ser	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp
1				5					10					15	

Ser	Val	Lys	Gly
			20

<210> 64

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Trp Val Ser Val Ile Glu His Lys Ser Phe Gly Ser Ala Thr Phe Tyr
1 5 10 15

Ala Ala Ser Val Lys Gly
20

<210> 65
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 65

His Tyr Met Asp His
1 5

<210> 66
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

Thr Ile Tyr Met Asp Tyr
1 5

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr
1 5

<210> 68
<211> 7
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr
1 5

<210> 69

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr
1 5

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

His Gly Ile Asp Phe Asp His
1 5

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

His Gly Ile Asp Phe Asp His
1 5

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

His Gly Ile Asp Phe Asp His
1 5

<210> 73
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 73

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu His
1 5 10

<210> 74
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 74

Arg Ala Ser Gln Asn Leu Phe Ser Pro Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 75
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 75

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 76
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 76

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Phe	Asn	Tyr	Val	Ser
1				5					10				

<210> 77

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Phe	Asn	Tyr	Val	Ser
1				5					10				

<210> 78

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Leu	Gly	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Val	Ser
1				5					10				

<210> 79

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Leu	Gly	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Val	Ser
1				5					10				

<210> 80

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Leu	Gly	Gly	Tyr	Asn	Tyr	Val	Ser
1				5					10				

<210> 81

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asn	Leu	Gln	Ser
1				5					10	

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr
1				5					10	

<210> 83

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Leu	Met	Ile	His	Asp	Gly	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser
1				5					10	

<210> 84

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Leu Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 85

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Leu Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 86

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 87

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 88

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Gln Gln Tyr Asp Ser Ile Pro Met
1 5

<210> 90

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 90

Gln Gln Tyr Leu Phe Pro Leu
1 5

<210> 91

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 91

Ser Thr Trp Asp Met Thr Val Asp Phe
1 5

<210> 92

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 92

Ser Thr Trp Asp Met Thr Val Asp Phe
1 5

<210> 93

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Gln Ser Trp Gly Val Gly Pro Gly Gly Phe
1 5 10

<210> 94

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Gln Ser Tyr Asp Pro Phe Leu Asp Val Val
1 5 10

<210> 95

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Gln Ser Tyr Asp Ser Pro Thr Asp Ser Val
1 5 10

<210> 96

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Gln Ser Tyr Ala Ser Gly Asn Thr Lys Val
1 5 10

<210> 97

<211> 654

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 97

gatatcgac tgaccagcc agcttcagtg agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60

tcgtgtacgg gtactagcag cgatgttggg ggttttaatt atgtgtcttg gtaccagcag 120

catcccgga aggcgcgaa acttatgatt catgatggtt ctaatcgcc ctcaggcgtg 180

agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgca gcctgacat tagcggcctg 240

caagcggaag acgaagcgga ttattattgc cagtcttggg atgtttctcc tattactgct 300

glgtttggcg gcggcacgaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcggtc 360

actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420

ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480

aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540

agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 600

acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 654

<210> 98

<211> 654

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 98

gatatcgac tgaccagcc agcttcagt agcggctcac caggtcagag cattaccatc 60

tcgtgtacgg gtactagcag cgatcttggg ggttataatt atgtgtcttg gtaccagcag 120

catcccggga aggcgccgaa acttatgatt tatgatgtta ataatcgtcc ctcaggcgtg 180

agcaaccgtt ttagcggatc caaaagcggc aacaccgga gcctgacat tagcggcctg 240

caagcggag acgaagcga ttattattgc cagacttatg atcagattaa gtgtgtctgt 300

gtgtttggcg gcggcacgaa gcttaccgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360

actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420

ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480

aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540

agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtccaca gaagctacag ctgccaggtc 600

acgcatgaag ggagcacctg ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 654

<210> 99
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 99

gatatcgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc 60

ctgagctgca gagcgagcca gaatcttttt tctccttate tggcttggtt ccagcagaaa 120

ccaggtaag caccgcgtct attaatattt ggtgcttcta atcgtgcaac tgggggtccc 180

gcgcgtttta gcggctctgg atccggcacg gattttaccc tgaccattag cagcctggaa 240

cctgaagact ttgcggtgta ttattgccag cagtatctta ctcttctct tacctttggc 300

cagggtacga aagtcgagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttccc 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggttaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacccctg 540

acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtag 648

<210> 100

<211> 648

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 100

gatatcgtgc tgaccagag cccggcgacc ctgagcctgt ctccgggcga acgtgcgacc 60

ctgagctgca gagcgagcca gaatcttttt tctccttate tggcttggta ccagcagaaa 120

ccaggtaag caccgctctt attaatattat ggtgcttcta atcgtgcaac tggggtcccg 180

gcgcgtttta gcggctctgg atccggcacg gatctttacc tgaccattag cagcctggaa 240

cctgaagact ttgcggtgta ttattgccag cagtatatga ctcttctct tacctttggc 300

cagggtacga aagtcgagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggttaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacccctg 540

acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtag 648

<210> 101
 <211> 1347
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 101
 caggcacagg tgcaattggt ggaaagcggc ggcggcctgg tgcaaccggg cggcagcctg 60
 cgtctgagct gcgcggcctc cggatttacc ttttcttctt attggatgtc ttgggtgcgc 120
 caagcccctg ggaagggtct cgagtgggtg agcggatatct cttattctgg tagcaatacc 180
 cattatgcgg atagcgtgaa aggccgtttt accatttcac gtgataattc gaaaaacacc 240
 ctgtatctgc aaatgaacag cctgcgtgcg gaagatacgg ccgtgtatta ttgcgcgcgt 300
 atgggtattg atcttgatta ttggggccaa ggcaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
 accaagggcc catcggctct ccccttgga cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420
 gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480
 tcaggcgcgc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 540
 tactccctca gcagcgtcgt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 600
 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcccaaatct 660
 tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 720
 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgac ccctgaggtc 780
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960

aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
tccgacggct ccttcttctt ctatagcaag ctccacgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacgcagaag 1320
agcctctccc tgtccccggg taaatga 1347

<210> 102
<211> 1347
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 102
caggcacagg tgcaattggt ggaaagcggc ggcgccctgg tgcaaccggg cggcagcctg 60
cgtctgagct gcgcggcctc cggatttacc ttttcttctt attggatgtc ttgggtgcgc 120
caagcccctg ggaagggctc cgagtgggtg agcgttatct cttctgattc tagctctacc 180
tattatgcgg atagcgtgaa aggccgtttt accatttcac gtgataattc gaaaaacacc 240
ctgtatctgc aaatgaacag cctgcgtgcg gaagatacgg ccgtgtatta ttgcgcgcgt 300
catggtattg attttgatca ttggggccaa ggcaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360
accaagggcc catcggctct ccccttgcca ccctctcca agagcacctc tgggggcaca 420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtagcgtg gtcgtggaac 480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tctacagtc ctcaggactc 540
tactccctca gcagcgtcgt gaccgtgccc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 600

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gcccaaatct 660

tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 720

gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 780

acatgcgtgg tggtaggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg 900

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960

aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1020

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga ggagatgacc 1080

agaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catgccgtg 1140

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200

tccgacggct ctttcttct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtcttgc acaaccacta caccgagaag 1320

agcctctccc tgtccccggg taaatga 1347

<210> 103
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 103
 caggtgcagc tggtaggagag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60

agctgtgccg ccagcggttt caccctcaac aactacggca tgacctgggt gaggcaggcc 120

cttggaagg gcctggagtg ggtgtccggc atcagcggca gcggcagcta cacctactac 180

gccgacagcg tgaaggcgag gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac	240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtgt actactgtgc ccggaccatc	300
tacatggact aciggggcca gggcacccctg gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc	360
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg	420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctgaggcgcc	480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgct gtcttacagt cctcaggact ctactcctc	540
agcagcgteg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agcccaaadc ttgtgacaaa	660
actcacacat gcccacctg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc	720
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg	780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900
gtcagcgtec tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag	960
gtctccaaca aagccctccc agcccccac gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccgga aggagatgac caagaaccag	1080
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag	1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200
tcctttcttc ttatatagca gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggtcttg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1320
ctgtccccgg gtaaatga	1338

<210> 104
 <211> 654
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 104
 gatatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg tccggcagcc ctggccagag catcaccatc 60

 agctgtaccg gcaccagcag cgatgtgggc ggcttcaact acgtgtcctg gtatcagcag 120

 caccgccgca aggcccccaa gctgatgata cagcagcga gcaatagacc cagcggcgtg 180

 tccaatagat tcagcggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacat cagcggcctg 240

 caggctgagg acgaggccga ctactactgc cagagctggg atgtgagccc catcaccgcc 300

 gtgtttggcg gcggaacaaa gcttacgctc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360

 actctgttcc cgccctctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420

 ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480

 aaggcgggag tggagacaac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540

 agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 600

 acgcatgaag ggagcaccgt ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 654

<210> 105
 <211> 654
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 105
 gatatcgccc tgaccagcc cgccagcgtg tccggcagcc ctggccagag catcaccatc 60

 agctgtaccg gcaccagcag cgacctgggc ggctacaact acgtgtcctg gtatcagcag 120

caccccgga agggccca gctgatgac tacgacgtga acaacagacc tagcgcgctg 180

tccaacagat tcagggcag caagagcggc aacaccgcca gcctgacat ctctggcctg 240

caggctgagg acgaggccga ctactactgc cagacctacg accagatcaa gctgtccgcc 300

gtgtttggcg gcggaacaaa gcttacgtc ctaggtcagc ccaaggctgc cccctcggtc 360

actctgttcc cgcctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc 420

ataagtgact tctaccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc 480

aaggcgggag tggagacaac cacacctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc 540

agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc 600

acgcatgaag ggagcacctg ggaaaagaca gtggccccta cagaatgttc atag 654

<210> 106

<211> 648

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 106

gacatcgtgc tgaccagag ccccgccacc ctgagcctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgtcttgta gggccagcca gaacctgttc agcccttacc tggcctggtg tcagcagaag 120

cccggccagg cccccagact gctgatctac ggcggccagca acagagccac cggcgtgccc 180

gccagattca gcggcagcgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatcag cagcctggag 240

cctgaggatt tcgccgtgta ctactgccag cagtacctga cctgcccct gaccttcggc 300

cagggcacca aggtcgagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 648

<210> 107

<211> 648

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 107

gacatcgtgc tgacccagag ccccgccacc ctgagcctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgtcttgta gggccagcca gaacctgttc agcccttacc tggcctggta tcagcagaag 120

cccgccagg cccccagact gctgatctac ggccgagca acagagccac cggcgtgccc 180

gccagattca gggcagcgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatcag cagcctggag 240

cctgaggatt tcgccgtgta ctactgccag cagtacatga cctgcctct gaccttcggc 300

cagggcacca aggtcgagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggttaactcc 480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacccctg 540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 648

<210> 108

<211> 1347

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 108

caggcccagg tgcagctggt ggagagcggc ggaggactgg tgcagcctgg cggcagcctg	60
agactgagct gtgccgccag cggcttcacc ttcagcagct actggatgag ctgggtgagg	120
caggcccctg gcaagggcct ggagtgggtg tccggcatca gctacagcgg cagcaatacc	180
cactacgccg acagcgtgaa gggcaggttc accatcagcc gggacaacag caagaacacc	240
ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgcccgg	300
atgggcatcg acctggatta ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc	360
accaagggcc catcggtctt ccccttgga cctcctcca agagcacctc tgggggcaca	420
gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cgtgacggt gtcgtggaac	480
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccgctg tctacagtc ctcaggactc	540
tactcctca gcagcgtcgt gaccgtgcc ttcagcagct tgggcacca gacctacatc	600
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagtga gcccaaatct	660
tgtgacaaaa ctacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	720
gttttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac cctgaggtc	780
acatgcgtgg tggtagcgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttaa ctggtacgtg	840
gacggcgtgg aggtgataa tgccaagaca aagccgctgg aggagcagta caacagcacg	900
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	960
aagtgaagg tctccaaca agccctcca gccccatcg agaaaacct ctccaagcc	1020
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgccc catcccggga ggagatgacc	1080
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atccagcga catcgccgtg	1140
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1200

tccgacggct ccttcttctt ctatagcaag ctacccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260

gggaacgtct tctcatgtct cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cacgcagaag 1320

agcctctccc tgtccccggg taaatga 1347

<210> 109
 <211> 1347
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 109
 caggcccagg tgcagctggt ggagagcggc ggaggactgg tgcagcctgg cggcagcctg 60

agactgagct gtgccgccag cggcttcacc ttcagcagct actggatgag ctgggtgagg 120

caggcccctg gcaagggcct ggagtgggtg tccgtgatca gcagcgatag cagcagcacc 180

tactacgccg atagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacaacag caagaacacc 240

ctgtacctgc agatgaacag cctgagagcc gaggacaccg ccgtgtacta ctgtgccagg 300

cacggcatcg acttcgacca ctggggccag ggaccctgg tcaccgtctc ctcagcctcc 360

accaagggcc catcggtctt ccccttgga cctcctcca agagcacctc tgggggcaca 420

gcggcccttg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 480

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tctacagtc ctcaggactc 540

tactccctca gcagcgtcgt gaccgtgcc tccagcagct tgggcacca gacctacatc 600

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga gcccaaatct 660

tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 720

gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc 780

acatgcgtgg tggtagacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 840
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 900
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 960
 aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 1020
 aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc 1080
 aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggc aaaggcttct atccagcga catgccgtg 1140
 gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1200
 tccgacggct ctttttctct ctatagcaag ctaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1260
 gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cagcagaag 1320
 agcctctccc tgtccccggg taaatga 1347

<210> 110
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 110
 caggtgcaat tggtagaaag cggcggcggc ctggtgcaac cgggcggcag cctgcgtctg 60
 agctgcgcgg cctccgatt tacctttaat aattatggta tgacttgggt gcgccaagcc 120
 cctgggaagg gtctcgagtg ggtgagcggc atctctggtt ctggtagcta tacctattat 180
 gcggatagcg tgaaaggccg ttttaccatt tcacgtgata attcgaaaaa caccctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtactatt 300
 tatatggatt attggggcca aggcaccctg gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc 360
 ccatcggctt tccccctggc accctctctc aagagcacct ctgggggcac agcggccctg 420

ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480

ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccggt gtcctacagt cctcaggact ctactccctc 540

agcagcgctg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600

aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 660

actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 720

ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840

gaggtgcata atccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900

gtcagcgtec tcaccgtcct gcaccaggac tggtgaatg gcaaggagta caagtcaag 960

gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020

ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatccggg aggagatgac caagaaccag 1080

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1140

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200

tccttcttcc tctatagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gacccctctc 1320

ctgtccccgg gtaaatga 1338

<210> 111
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 111

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

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe
20 25 30

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile His Asp Gly Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Trp Asp Val Ser
85 90 95

Pro Ile Thr Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 112
<211> 217
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 112

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

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Asp Gln Ile
85 90 95

Lys Leu Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu

115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe

130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210>	113
<211>	215
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 113

Asp 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 Asn Leu Phe Ser Pro
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 Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser

50

55

60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Thr Leu Pro
85 90 95

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 114

<211> 215

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 114

Asp 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 Asn Leu Phe Ser Pro
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 Asn Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Thr Leu Pro
85 90 95

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val

180 185 190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 115
<211> 446
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 115

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Thr His 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 Met Gly Ile Asp Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

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

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

305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

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

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210>	116
<211>	446
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 116

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

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

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

Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr 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 His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

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

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

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

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr

210

215

220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

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

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

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

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

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

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 117
<211> 445
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 117

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

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

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

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Thr 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 Thr Ile Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

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

305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

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

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

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

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210>	118
<211>	111
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<400> 118

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

Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Leu
20 25 30

Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala
35 40 45

Pro Lys Leu Met Ile Tyr Asp Val Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser
50 55 60

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

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

Asp Gln Ile Lys Leu Ser Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
100 105 110

<210> 119
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 119

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

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
20 25 30

Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
35 40 45

Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Ser Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Gly Ile Asp Phe Asp His Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr
115

<210> 120
<211> 333
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 120
acgcgttgcg atatcgccct gaccagccc gccagcgtgt ccggcagccc tggccagagc 60

atcaccatca gctgtaccgg caccagcagc gacctgggcg gctacaacta cgtgtcctgg 120

tatcagcagc accccggcaa ggcccccaag ctgatgatct acgacgtgaa caacagacct 180

agcggcgtgt ccaacagatt cagcggcagc aagagcggca acaccgccag cctgaccatc 240

tctggcctgc aggctgagga cgaggccgac tactactgcc agacctacga ccagatcaag 300

ctgtccgccg tgtttggcgg cggaacaaag ctt 333

<210> 121
<211> 361
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 121
gagtcattg ggagtgcagg cccaggtgca gctggtggag agcggcggag gactggtgca 60

gcctggcggc agcctgagac tgagctgtgc cgccagcggc ttcaccttca gcagctactg 120

gatgagctgg gtgaggcagg cccttgcaa ggcctggag tgggtgtccg tgatcagcag 180

cgatagcagc agcacctact acgccgatag cgtgaagggc cggttcacca tcagccggga 240

caacagcaag aacaccctgt acctgcagat gaacagcctg agagccgagg acaccgccgt 300

gtactactgt gccaggcacg gcatcgactt cgaccactgg ggccagggca ccctggtcac 360

c 361

<210> 122
 <211> 259
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 122

Met Ala Ala Leu Met Arg Ser Lys Asp Ser Ser Cys Cys Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Ala Ala Val Leu Met Val Glu Ser Ser Gln Ile Gly Ser Ser Arg
 20 25 30

Ala Lys Leu Asn Ser Ile Lys Ser Ser Leu Gly Gly Glu Thr Pro Gly
 35 40 45

Gln Ala Ala Asn Arg Ser Ala Gly Met Tyr Gln Gly Leu Ala Phe Gly
 50 55 60

Gly Ser Lys Lys Gly Lys Asn Leu Gly Gln Ala Tyr Pro Cys Ser Ser
 65 70 75 80

Asp Lys Glu Cys Glu Val Gly Arg Tyr Cys His Ser Pro His Gln Gly
 85 90 95

Ser Ser Ala Cys Met Val Cys Arg Arg Lys Lys Lys Arg Cys His Arg
 100 105 110

Asp Gly Met Cys Cys Pro Ser Thr Arg Cys Asn Asn Gly Ile Cys Ile
115 120 125

Pro Val Thr Glu Ser Ile Leu Thr Pro His Ile Pro Ala Leu Asp Gly
130 135 140

Thr Arg His Arg Asp Arg Asn His Gly His Tyr Ser Asn His Asp Leu
145 150 155 160

Gly Trp Gln Asn Leu Gly Arg Pro His Thr Lys Met Ser His Ile Lys
165 170 175

Gly His Glu Gly Asp Pro Cys Leu Arg Ser Ser Asp Cys Ile Glu Gly
180 185 190

Phe Cys Cys Ala Arg His Phe Trp Thr Lys Ile Cys Lys Pro Val Leu
195 200 205

His Gln Gly Glu Val Cys Thr Lys Gln Arg Lys Lys Gly Ser His Gly
210 215 220

Leu Glu Ile Phe Gln Arg Cys Asp Cys Ala Lys Gly Leu Ser Cys Lys
225 230 235 240

Val Trp Lys Asp Ala Thr Tyr Ser Ser Lys Ala Arg Leu His Val Cys
245 250 255

Gln Lys Ile

<210> 123

<211> 350

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 123

Met Gln Arg Leu Gly Ala Thr Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Ala Ala
1 5 10 15

Val Pro Thr Ala Pro Ala Pro Ala Pro Thr Ala Thr Ser Ala Pro Val
20 25 30

Lys Pro Gly Pro Ala Leu Ser Tyr Pro Gln Glu Glu Ala Thr Leu Asn
35 40 45

Glu Met Phe Arg Glu Val Glu Glu Leu Met Glu Asp Thr Gln His Lys
50 55 60

Leu Arg Ser Ala Val Glu Glu Met Glu Ala Glu Glu Ala Ala Ala Lys
65 70 75 80

Ala Ser Ser Glu Val Asn Leu Ala Asn Leu Pro Pro Ser Tyr His Asn
85 90 95

Glu Thr Asn Thr Asp Thr Lys Val Gly Asn Asn Thr Ile His Val His
100 105 110

Arg Glu Ile His Lys Ile Thr Asn Asn Gln Thr Gly Gln Met Val Phe
115 120 125

Ser Glu Thr Val Ile Thr Ser Val Gly Asp Glu Glu Gly Arg Arg Ser
130 135 140

His Glu Cys Ile Ile Asp Glu Asp Cys Gly Pro Ser Met Tyr Cys Gln
145 150 155 160

Phe Ala Ser Phe Gln Tyr Thr Cys Gln Pro Cys Arg Gly Gln Arg Met
165 170 175

Leu Cys Thr Arg Asp Ser Glu Cys Cys Gly Asp Gln Leu Cys Val Trp
180 185 190

Gly His Cys Thr Lys Met Ala Thr Arg Gly Ser Asn Gly Thr Ile Cys
195 200 205

Asp Asn Gln Arg Asp Cys Gln Pro Gly Leu Cys Cys Ala Phe Gln Arg
210 215 220

Gly Leu Leu Phe Pro Val Cys Thr Pro Leu Pro Val Glu Gly Glu Leu
225 230 235 240

Cys His Asp Pro Ala Ser Arg Leu Leu Asp Leu Ile Thr Trp Glu Leu
245 250 255

Glu Pro Asp Gly Ala Leu Asp Arg Cys Pro Cys Ala Ser Gly Leu Leu
260 265 270

Cys Gln Pro His Ser His Ser Leu Val Tyr Val Cys Lys Pro Thr Phe
275 280 285

Val Gly Ser Arg Asp Gln Asp Gly Glu Ile Leu Leu Pro Arg Glu Val
290 295 300

Pro Asp Glu Tyr Glu Val Gly Ser Phe Met Glu Glu Val Arg Gln Glu
305 310 315 320

Leu Glu Asp Leu Glu Arg Ser Leu Thr Glu Glu Met Ala Leu Gly Glu
325 330 335

Pro Ala Ala Ala Ala Ala Ala Leu Leu Gly Gly Glu Glu Ile
340 345 350

<210> 124
<211> 224
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 124

Met Val Ala Ala Val Leu Leu Gly Leu Ser Trp Leu Cys Ser Pro Leu
1 5 10 15

Gly Ala Leu Val Leu Asp Phe Asn Asn Ile Arg Ser Ser Ala Asp Leu
20 25 30

His Gly Ala Arg Lys Gly Ser Gln Cys Leu Ser Asp Thr Asp Cys Asn
35 40 45

Thr Arg Lys Phe Cys Leu Gln Pro Arg Asp Glu Lys Pro Phe Cys Ala
50 55 60

Thr Cys Arg Gly Leu Arg Arg Arg Cys Gln Arg Asp Ala Met Cys Cys
65 70 75 80

Pro Gly Thr Leu Cys Val Asn Asp Val Cys Thr Thr Met Glu Asp Ala
85 90 95

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

Glu Gly Thr Thr Gly His Pro Val Gln Glu Asn Gln Pro Lys Arg Lys
115 120 125

Pro Ser Ile Lys Lys Ser Gln Gly Arg Lys Gly Gln Glu Gly Glu Ser
130 135 140

Cys Leu Arg Thr Phe Asp Cys Gly Pro Gly Leu Cys Cys Ala Arg His
145 150 155 160

Phe Trp Thr Lys Ile Cys Lys Pro Val Leu Leu Glu Gly Gln Val Cys
165 170 175

Ser Arg Arg Gly His Lys Asp Thr Ala Gln Ala Pro Glu Ile Phe Gln
180 185 190

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

195 200 205

Asn Arg Gln His Ala Arg Leu Arg Val Cys Gln Lys Ile Glu Lys Leu

210 215 220

<210>	125
<211>	127
<212>	PRT
<213>	Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(116)
<223> wherein X may be any amino acid

<400> 125

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

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

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

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr 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 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 126
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (99)..(116)
<223> wherein X may be any amino acid

<400> 126

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
100 105 110

Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 127
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (90)..(97)
<223> wherein X may be any amino acid

<400> 127

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Val Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

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

<210> 128

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (91)..(98)
 <223> wherein X may be any amino acid

<400> 128

Asp 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 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 Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Val Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

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

<210> 129
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (91)..(100)
 <223> wherein X may be any amino acid

<400> 129

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

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

Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 85 90 95

Xaa Xaa Xaa Xaa Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

Gln

<210> 130
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (90)..(99)

<223> wherein X may be any amino acid

<400> 130

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
85 90 95

Xaa Xaa Xaa Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

<210> 131

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(11)

<223> wherein X may be any amino acid

<400> 131

Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Tyr Xaa

1 5 10

<210> 132
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(11)

<400> 132

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 133
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(8)
<223> wherein X may be any amino acid

<400> 133

Gln Gln Tyr Xaa Xaa Xaa Pro Xaa
1 5

<210> 134
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 134

Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Phe Asn Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 135
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(7)
 <223> wherein X may be any amino acid

<400> 135

Leu Met Ile Xaa Asp Xaa Xaa Asn Arg Pro Ser
 1 5 10

<210> 136
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(9)
 <223> wherein X may be any amino acid

<400> 136

Xaa Xaa Trp Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5