



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월16일
(11) 등록번호 10-1317045
(24) 등록일자 2013년10월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2005-7003934
(22) 출원일자(국제) 2003년09월05일
심사청구일자 2006년01월31일
(85) 번역문제출일자 2005년03월07일
(65) 공개번호 10-2005-0057258
(43) 공개일자 2005년06월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2003/027978
(87) 국제공개번호 WO 2004/022718
국제공개일자 2004년03월18일
(30) 우선권주장
제 60/408,719 호 2002년09월06일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
US05545806 A1*
The Journal of Biological Chemistry,
Vol.275(47), pp.36927-36933(2000. 11. 24. 공
개)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
암젠 인코포레이티드
미국 캘리포니아 91320-1789 사우전드 오크스 원
암젠 센터 드라이브 암젠센터
메다릭스, 인코포레이티드
미국 08540 뉴저지주 프린스턴 루트 206 앤드 프
로빈스 라인 로드
(72) 발명자
바르눔 브라이언
미국 캘리포니아 90402 산타모니카 트웰프스 스트
리트 602
베지나 크리스
미국 캘리포니아 91320 뉴버리 파크 사우스 그린
웨이 애비뉴 351
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
황광현

전체 청구항 수 : 총 37 항

심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 **치료학적 인체 항-IL-1R1 모노클로날 항체**

(57) 요약

본 발명은 인터루킨-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)과 상호작용하는 항체에 관해 기술하고 있다. 본 발명은 IL-1R1 에 대한 항체의 약학적 유효량을 투여함으로써 IL-1 매개 질환을 치료하는 방법 및 IL-1R1 에 대한 항체를 사용하여 시료 내에서 IL-1R1 의 양을 검출하는 방법에 관해서도 기술하고 있다.

(72) 발명자

비테 엘리슨

미국 캘리포니아 93012 카마릴로 바바라 드라이브
2242

치안 셰밍

미국 캘리포니아 91320 오크 파크 머틀 코트 596

마틴 프랭크

미국 캘리포니아 91320 뉴버리 파크 편힐 코트 865

후앙 하이천

미국 캘리포니아 94539 프리몬트 수에노 웨이 2425

엘리엇 게리

미국 캘리포니아 91362 사우전드 오크스 초서 플레
이스 2458

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

다음을 포함하는, 인터루킨-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)과 특이적으로 결합하는 분리된 인체 항체

(a) SEQ ID NO : 10 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나

또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는 중쇄, 및

SEQ ID NO : 12 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나

또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 경쇄 ;

(b) SEQ ID NO : 14 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나
 합 단편을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는 중쇄, 및

또는 이의 항원-결

SEQ ID NO : 12 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나
 합 단편을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 경쇄 ; 또는

또는 이의 항원-결

(c) SEQ ID NO : 16 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나
 합 단편을 포함하는 중쇄 가변 영역을 갖는 중쇄, 및

또는 이의 항원-결

SEQ ID NO : 18 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나

또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 경쇄 가변 영역을 갖는 경쇄.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 중쇄는 SEQ ID NO : 10 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 경쇄는 SEQ ID NO : 12 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함함을 특징으로 하는 항체.

청구항 7

삭제

청구항 8

제 5 항에 있어서, 중쇄는 SEQ ID NO : 14 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 경쇄는 SEQ ID NO : 12 에 기재되어 있

는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함함을 특징으로 하는 항체.

청구항 9

삭제

청구항 10

제 5 항에 있어서, 중쇄는 SEQ ID NO : 16 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하고, 경쇄는 SEQ ID NO : 18 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함함을 특징으로 하는 항체.

청구항 11

삭제

청구항 12

다음을 포함하는, 인터루킨-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)과 특이적으로 결합하는 분리된 인체 항체

(a) SEQ ID NO : 38 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나

또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 경쇄 ; 및

(b) SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 22, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26,

SEQ ID NO : 28 또는 SEQ ID NO : 30 에 기재되어 있는 아미노산

서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는

중쇄.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 중쇄는 SEQ ID NO : 20 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고, 경쇄는 SEQ ID NO : 38 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함함을 특징으로 하는 항체.

청구항 14

삭제

청구항 15

제 12 항에 있어서, 중쇄는 SEQ ID NO : 22 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고, 경쇄는 SEQ ID NO : 38 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함함을 특징으로 하는 항체.

청구항 16

삭제

청구항 17

제 12 항에 있어서, 중쇄는 SEQ ID NO : 24 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고, 경쇄는 SEQ ID NO : 38 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함함을 특징으로 하는 항체.

청구항 18

삭제

청구항 19

제 12 항에 있어서, 중쇄는 SEQ ID NO : 26 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고, 경쇄는 SEQ ID NO : 38 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함함을 특징으로 하는 항체.

청구항 20

삭제

청구항 21

제 12 항에 있어서, 중쇄는 SEQ ID NO : 28 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고, 경쇄는 SEQ ID NO : 38 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함함을 특징으로 하는 항체.

청구항 22

삭제

청구항 23

제 12 항에 있어서, 중쇄는 SEQ ID NO : 30 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고, 경쇄는 SEQ ID NO : 38 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함함을 특징으로 하는 항체.

청구항 24

삭제

청구항 25

다음을 포함하는, 인터루킨-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)과 특이적으로 결합하는 분리된 인체 항체

(a) SEQ ID NO : 40 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나

또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 경쇄 ; 및

(b) SEQ ID NO : 32, SEQ ID NO : 34 또는 SEQ ID NO : 36 에 기재되어

있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을

포함하는 중쇄.

청구항 26

제 25 항에 있어서, 중쇄는 SEQ ID NO : 32 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고, 경쇄는 SEQ ID NO : 40 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함함을 특징으로 하는 항체.

청구항 27

삭제

청구항 28

제 25 항에 있어서, 중쇄는 SEQ ID NO : 34 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고, 경쇄는 SEQ ID NO : 40 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함함을 특징으로 하는 항체.

청구항 29

삭제

청구항 30

제 25 항에 있어서, 중쇄는 SEQ ID NO : 36 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하고, 경쇄는 SEQ ID NO : 40 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함함을 특징으로 하는 항체.

청구항 31

삭제

청구항 32

제 5 항, 제 12 항 또는 제 25 항에 있어서, 중쇄 및 경쇄는 단쇄의 항체를 형성하기 위해 가요성 (flexible) 링커에 의해 연결됨을 특징으로 하는 항체.

청구항 33

제 32 항에 있어서, 단쇄 Fv 항체임을 특징으로 하는 항체.

청구항 34

제 5 항, 제 12 항 또는 제 25 항에 있어서, Fab 임을 특징으로 하는 항체.

청구항 35

제 5 항, 제 12 항 또는 제 25 항에 있어서, Fab' 임을 특징으로 하는 항체.

청구항 36

제 5 항, 제 12 항 또는 제 25 항에 있어서, (Fab')₂ 임을 특징으로 하는 항체.

청구항 37

제 5 항, 제 12 항 또는 제 25 항에 있어서, 항체는 완전 인체 항체임을 특징으로 하는 항체.

청구항 38

제 5 항, 제 12 항 또는 제 25 항에 있어서, 항체는 IL-1 이 수용체에 결합하는 것을 저해함을 특징으로 하는 항체.

청구항 39

삭제

청구항 40

제 38 항의 항체의 치료학적 유효량 및 약학적으로 용인가능한 담체를 포함하는, 다음 중에서 선택한 IL-1 매개 질환을 치료하기 위한 약학적 조성물

상기 IL-1 매개 질환은 급성 췌장염 ; 근위축성측색경화증(ALS) ; 알츠하이머병 ; AIDS-유도 약액질을 포함하는 약액질/식욕부진 ; 천식 ; 죽상동맥경화증 ; 자가면역 맥관염 ; 만성 피로 증후군 ; 클로스트리듐-관련 설사를 포함하는 클로스트리듐 관련 질환 ; 울혈성 심부전, 관상 재발협착증, 심근경색, 심근 기능부전 및 관상동맥 바이패스 이식편을 포함하는 관상 증상 및 징후 ; 암, 다발성골수종 및 골수성 백혈병 및 이외의 다른 백혈병 뿐만 아니라 종양 전이 ; 당뇨병 ; 자궁내막증 ; 열병 ; 섬유근통 ; 사구체신염 ; 대숙주성이식편병/이식 거부반응 ; 출혈성숙 ; 통각과민 ; 염증성 장질환 ; 골관절염, 건선성 관절염 및 류마티스성 관절염을 포함하는 관절의 염증성 증상 ; 염증성 안질환 ; 대뇌 국소빈혈을 포함하는 국소빈혈 ; 카와사키병 ; 학습 장애 ; 폐질환 ; 다발성경화증 ; 근증 ; 신경독성 ; 골다공증 ; 암-관련 동통을 포함하는 동통 ; 파킨슨병 ; 치주치근막질환 ; 조기분만 ; 건선 ; 재관류손상 ; 폐혈증성숙 ; 방사선 치료에 의한 부작용 ; 측두하악관절질환 ; 수면 장애 ; 포도막염 ; 및 좌상, 염좌, 연골 손상,

외상, 정형외과 수술, 감염 또는 이외의 질환 진행으로 인한 염증성 증상 중에서 선택한 것이다.

청구항 41

삭제

청구항 42

SEQ ID NO : 10, SEQ ID NO : 14 및 SEQ ID NO : 16 중 어느 하나에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 가변 영역, 및 불변 영역을 포함하는 중쇄.

청구항 43

SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 22, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26, SEQ ID NO : 28, SEQ ID NO : 30, SEQ ID NO : 32, SEQ ID NO : 34 및 SEQ ID NO : 36 중 어느 하나에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 중쇄.

청구항 44

SEQ ID NO : 12 또는 SEQ ID NO : 18 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 가변 영역, 및 불변 영역을 포함하는 경쇄.

청구항 45

SEQ ID NO : 38 또는 SEQ ID NO : 40 에 기재되어 있는 아미노산 서열로 이루어지거나 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 경쇄.

청구항 46

다음을 포함하는 분리된 인체 항체

(a) 인체 중쇄 외곽구조 영역, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62 또는 SEQ ID NO: 63 의 아미노산 서열로 이루어진 인체 중쇄 CDR1 영

역, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65 또는 SEQ ID NO: 66 의 아미노산 서열로 이루어진 인체 중쇄 CDR2 영역, 및 SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 또는 SEQ ID NO: 69 의 아미노산 서열로 이루어진 인체 중쇄 CDR3 영역; 및

(b) 인체 경쇄 외곽구조 영역, SEQ ID NO: 70 또는 SEQ ID NO: 71 의 아미노산 서열로 이루어진 인체 경쇄 CDR1 영역, SEQ ID NO: 72 또는 SEQ ID NO: 73 의 아미노산 서열로 이루어진 인체 경쇄 CDR2 영역, 및 SEQ ID NO: 74 또는 SEQ ID NO: 75 의 아미노산 서열로 이루어진 인체 경쇄 CDR3 영역

여기에서, 항체는 인터루킨-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)과 특이적으로 결합한다.

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

제 5 항, 제 12 항 또는 제 25 항에 있어서, IgG2 항체임을 특징으로 하는 항체.

청구항 58

제 5 항, 제 12 항 또는 제 25 항에 있어서, SEQ ID NO : 76 의 폴리펩티드와 특이적으로 결합함을 특징으로 하는 항체.

청구항 59

제 5 항, 제 12 항 또는 제 25 항에 있어서, IL-1R1 의 아미노산 서열 YSV 를 포함하는 에피토프 4 와 특이적으로 결합함을 특징으로 하는 항체.

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

인터루킨-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)과 특이적으로 결합하는 인체 모노클로날 항체의 일부를 형성하는, SEQ ID NO : 61, SEQ ID NO : 62 또는 SEQ ID NO : 63 의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 도메인 CDR1.

청구항 63

인터루킨-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)과 특이적으로 결합하는 인체 모노클로날 항체의 일부를 형성하는, SEQ ID NO : 64, SEQ ID NO : 65 또는 SEQ ID NO : 66 의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 도메인 CDR2.

청구항 64

인터루킨-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)과 특이적으로 결합하는 인체 모노클로날 항체의 일부를 형성하는, SEQ ID NO : 67, SEQ ID NO : 68 또는 SEQ ID NO : 69 의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄 가변 도메인 CDR3.

청구항 65

인터루킨-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)과 특이적으로 결합하는 인체 모노클로날 항체의 일부를 형성하는, SEQ ID NO : 70 또는 SEQ ID NO : 71 의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 도메인 CDR1.

청구항 66

인터루킨-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)과 특이적으로 결합하는 인체 모노클로날 항체의 일부를 형성하는, SEQ ID NO : 72 또는 SEQ ID NO : 73 의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 도메인 CDR2.

청구항 67

인터루킨-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)과 특이적으로 결합하는 인체 모노클로날 항체의 일부를 형성하는, SEQ ID NO : 74 또는 SEQ ID NO : 75 의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄 가변 도메인 CDR3.

명세서

[0001] 본 출원은 2002 년 9 월 6 일자로 제출된 미국 가출원 일련 번호 제 60/408,719 호를 우선권으로 주장하고 있으며, 이 출원서의 공개된 내용을 본원에서 참고문헌으로 인용하였다.

기술분야

[0002] 본 발명은 인터루킨-1 수용체 제 1 형(IL-1R1) 단백질과 결합하는 항체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 IL-1 매개 질환(예를 들어, 류마티스성 관절염, 골관절염 및 그밖의 다른 염증성 증상)을 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공한다.

배경기술

[0003] 항체 발생(Antibody Development)

[0004] 염증은 기계적 손상, 감염 또는 항원 자극으로 인한 손상에 대한 신체의 반응이다. 염증 반응은 종종 병리학적으로 나타난다. 상기 증상은, 염증이 지나치게 악화되었거나, 부적절하게 자극되거나, 또는 유해 제제(injurious agent)가 제거된 후에도, 염증이 지속될 때 상기 증상들이 유발된다.

[0005] 염증 반응은, 특히 시토키류에 의해 매개된다. 현재까지 발견된 가장 효력있는 염증성 시토키류 중 하나는 인터루킨-1(IL-1)이다. IL-1 신호전달(signaling)의 증가는 여러 질환과 관련된 지속성 염증을 야기하며, IL-1 은 많은 질환 및 의학 증상에서 주요 매개자인 것으로 생각된다. 이러한 시토키는 대식세포/단핵세포 계통의 세포에 의해 1 차적으로 생성되고(배타적이지는 않음) IL-1 알파(IL-1 α)와 IL-1 베타(IL-1 β)의 2 가지 형태로 생성될 것이다.

[0006] IL-1 은 2 가지의 트랜스멤브레인 단백질인 IL-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)과 IL-1 수용체 보조 단백질(IL-1 receptor accessory protein, IL-1RAcP)로 구성된 이질이량체(heterodimeric) 수용체 복합체와 상호작용함으로써 세포 반응을 자극한다. IL-1 은 처음에 IL-1R1 과 결합하고 ; 그리고나서 IL-1RAcP 는 이러한 복합체에 보충되며(Greenfeder 등의 1995, J. Biol. Chem. 270:13757-13765 ; Yoon

및 Dinarello, 1998, J. Immunology 160:3170-3179 ; Cullinan 등의 1998, J. Immunology 161:5614-5620 참조), 신호전달(signal transduction)에 의해 세포 반응이 유도된다.

- [0007] 세포-기저 결합 연구는, 리간드 오프-속도(off-rate)를 늦춤으로써 IL-1RAcP 가 IL-1R 신호전달 복합체를 안정시킴을 의미한다(Wesche 등의 1998, FEBS Letters 429:303-306 참조). IL-1 과 IL-1R 의 상호작용이 완전하게 특성을 나타내는 반면에, IL-1RAcP 와 리간드-결합 수용체의 상호작용은 불완전하게 규정되어 있다. IL-1RAcP 는 IL-1 또는 IL-1R1 단독에 대해서는 현저한 친화력을 갖지 못하지만, 복합체에 대해서는 높은 친화력을 갖기 때문에, IL-1RAcP 에 대한 신규한 결합 부위는 IL-1/IL-1R 결합에 의해 형성되며, 이 결합 부위는 IL-1 잔기로부터 기인한 것이다(Ettorre 등의 1997, Eur. Cytokine Netw. 8:161-171 참조). 다른 분자인 IL-1 수용체 길항물질(IL-1ra)은 수용체 결합에 관하여 IL-1 α 및 IL-1 β 와 경쟁하지만 IL-1RAcP 을 보충하지는 못하며, 결과적으로 사용중이지만 비-신호전달 수용체가 된다. IL-1 활성도는 리간드와 결합하는 유인 수용체(decoy receptor)인 IL-1R 제 II 형에 의해 부가적으로 평형화되지만 절두된 세포내 도메인 때문에 신호전달에 관여하지 못한다. IL-1ra 및 IL-1R 제 II 형은 IL-1 매개 염증성 질환의 피해 및 지속기간을 감소시키는 역할을 한다(Wesche 등의 1998, FEBS Letters 429:303-306 ; Dripps 등의 1991, J. Biol. Chem. 266:10331-10336 ; Dripps 등의 1991, J. Biol. Chem. 266:20331-20335 참조).
- [0008] 인터루킨-1 저해제는 IL-1 에 대한 세포 수용체의 활성화를 특이적으로 예방할 수 있는 모든 단백질로부터 생성되며, 이는 다수의 메카니즘에 의한 것이다. 상기 메카니즘은 IL-1 생성의 하향-조절, 유리 IL-1 결합, IL-1R 과 IL-1 의 결합 저해, IL-1R-IL-1RAcP 복합체 형성 저해 또는 수용체 결합 후에 IL-1 신호전달 조절 저해를 포함한다. IL-1 저해제군은 다음을 포함한다 :
- [0009] · IL-1ra 와 같은 인터루킨-1 수용체 길항물질(하기에 기재되어 있음) ;
- [0010] · 항-IL-1R 모노클로날 항체(예를 들어, 공개된 유럽 특허 출원 번호 제 EP 623674 호에 기재되어 있으며, 이 내용을 본원에서 참고문헌으로 인용하였음) ;
- [0011] · 가용성 IL-1 수용체와 같은 IL-1 결합 단백질(예를 들어, 미국 특허 번호 제 5,492,888 호 ; 제 5,488,032 호 ; 제 5,464,937 호 ; 제 5,319,071 호 ; 및 제 5,180,812 호에 기재되어 있으며, 이 내용은 본원에서 참고문헌으로 인용하였음) ;
- [0012] · 항-IL-1 모노클로날 항체(예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 제 WO 9501997 호, 제 WO 9402627 호, 제 WO 9006371 호, 미국 특허 번호 제 4,935,343 호, 제 EP 364778 호, 제 EP 267611 호 및 제 EP 220063 호에 기재되어 있으며, 이 내용은 본원에서 참고문헌으로 인용되었음) ;
- [0013] · IL-1 수용체 보조 단백질 및 거기에 결합하는 항체(예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 제 WO 96/23067 호 및 제 WO 99/37773 호에 기재되어 있으며, 이 내용은 본원에서 참고문헌으로 인용되었음) ;
- [0014] · 인터루킨-1 β 전환 효소(ICE) 또는 카스페이즈(caspase) I 의 저해제(예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 제 WO 99/46248 호, 제 WO 99/47545 호 및 제 WO 99/47154 호에 기재되어 있으며, 이 내용은 본원에서 참고문헌으로 인용되었음), 이 저해제는 IL-1 β 생성 및 분비를 저해하기 위해 사용될 수 있다 ;

- [0015] · 인터루킨-1 β 프로테아제 저해제 ; 및
- [0016] · IL-1 의 생체내 합성 또는 세포외 방출을 차단하는 그밖의 다른 화합물 및 단백질.
- [0017] 전형적인 IL-1 저해제는 다음의 참고문헌에 기재되어 있다 : 미국 특허 번호 제 5,747,444 호 ; 제 5,359,032 호 ; 제 5,608,035 호 ; 제 5,843,905 호 ; 제 5,359,032 호 ; 제 5,866,576 호 ; 제 5,869,660 호 ; 제 5,869,315 호 ; 제 5,872,095 호 ; 제 5,955,480 호 ; 및 제 5,965,564 호 ; 국제 특허 출원 공개 번호 제 WO 98/21957 호, 제 WO 96/09323 호, 제 WO 91/17184 호, 제 WO 96/40907 호, 제 WO 98/32733 호, 제 WO 98/42325 호, 제 WO 98/44940 호, 제 WO 98/47892 호, 제 WO 98/56377 호, 제 WO 99/03837 호, 제 WO 99/06426 호, 제 WO 99/06042 호, 제 WO 91/17249 호, 제 WO 98/32733 호, 제 WO 98/17661 호, 제 WO 97/08174 호, 제 WO 95/34326 호, 제 WO 99/36426 호 및 제 WO 99/36415 호 ; 유럽 특허 출원 공개 번호 제 EP 534978 호 및 제 EP 89479 호 ; 및 프랑스 특허 출원 번호 제 FR 2762514 호. 상기 언급한 모든 참고문헌의 내용은 본원에서 참고문헌으로 인용되었다.
- [0018] 인터루킨-1 수용체 길항물질(IL-1ra)은 인터루킨-1 의 천연 저해제로서 작용하는 인체 단백질이며, IL-1 α 및 IL-1 β 를 포함하는 IL-1 군의 멤버이다. 바람직한 수용체 길항물질(IL-1ra 와 이의 변이체 및 유도체 포함) 뿐만 아니라 이의 제조방법 및 사용방법이 다음의 문헌에 기재되어 있으며, 이들 문헌의 내용이 본원에서 참고문헌으로 인용되었다 : 미국 특허 번호 제 5,075,222 호 ; 국제 특허 출원 공개 번호 제 WO 91/08285 호 ; 제 WO 91/17184 호 ; 제 WO 92/16221 호 ; 제 WO 93/21946 호 ; 제 WO 94/06457 호 ; 제 WO 94/21275 호 ; 제 WO 94/21235 호 ; 제 DE 4219626 호 ; 제 WO 94/20517 호 ; 제 WO 96/22793 호 ; 제 WO 97/28828 호 ; 및 제 WO 99/36541 호 ; 오스트리아 특허 출원 번호 제 AU 9173636 호 ; 및 프랑스 특허 출원 번호 제 FR 2706772 호. 단백질은 IL-1 수용체 길항물질의 글리코실화된 형태 뿐만 아니라 비-글리코실화된 형태를 포함한다.
- [0019] 명확하게, IL-1ra 와 이의 변이체의 3 가지 유용한 형태는 미국 특허 번호 제 5,075,222 호("222 특허")에 기재되어 있다. IL-1ra α 는 pH 7.6 인 트리스 완충용액에 용해된 약 52 mM NaCl 에서 모노 Q FPLC 컬럼으로부터 용출되고, 대략 4.8 의 등전점을 가지며 22-23 kD 분자량을 갖는 특성이 있다. IL-1ra β 는 48 mM NaCl 에서 모노 Q 컬럼으로부터 용출되고, 22-23 kD 의 분자량을 갖는 단백질이라는 특성을 갖는다. IL-1ra α 와 IL-1ra β 둘다는 글리코실화되었다. IL-1rax 는 48 mM NaCl 에서 모노 Q 컬럼으로부터 용출되고, 20 kD 의 분자량을 갖는 단백질이며, 비-글리코실화된 특성을 갖는다. "222 특허" 에는 또한 저해제를 코딩하는데 책임이 있는 유전자를 분리하는 방법, 적절한 벡터와 세포 유형에서 유전자를 클로닝하는 방법 및 저해제를 생성하기 위해 유전자를 발현시키는 방법에 관해서 기재되어 있다. 효과적이지만, IL-1ra 는 상대적으로 짧은 반감기를 가지고 있다. 현재 사용중인 IL-1ra 는 하루에 한 번 투여되고 있다. 따라서 본 분야는 상당히 반감기가 긴 IL-1 수용체의 길항물질로부터 이익을 얻고 있다.
- [0020] IL-1 이 IL-1 수용체에 결합되는 것을 저해함으로써 IL-1 신호전달을 차단하는 것은 IL-1 매개 질환을 치료하기 위한 효과적인 치료 접근법이다. 본 분야에서는 IL-1 매개 질환의 영향을 개선시킬 수 있는 IL-1 신호전달 경로의 임상학적으로 효과적인 저해제가 필요하고, 이 저해제는 인체 환자에게 수송하기에 적절하다. IL-1 신호전달을 차단하는 인체 항체는 특히 이러한 필요성을 이행하는데 장점이 있으며 현행의 치료보다 더 긴 반감기를 제공한다.

[0021] **발명의 요약**

[0022] 본 발명은 인터루킨-1 수용체 제 I 형(IL-1R1)에 결합하는 모노클로날 항체를 제공한다. 바

람직하게, 항체는 IL-1R1 에 결합하는 IL-1 β 및 IL-1 α 와 경쟁함으로써 IL-1 신호전달을 저해한다.

본 발명은 또한 본 발명의 모노클로날 항체를 생산하고, 가장 바람직하게, 상기 항체를 세포배양 배지내로 분비하는 하이브리도마 세포주를 제공한다. 본 발명의 항체는 인체 세포에서 IL-1 신호전달을 성공적으로 차단하며 이로인해 IL-1 매개 질환을 앓고 있는 환자를 치료하는데 유용하다.

본 발명은 또한 항체 Fc 영역의 서열 및 다음 중에서 선택한 하나 또는 그 이상의 서열을 포함하는 융합 단백질을 제공한다 : SEQ ID NO : 10, SEQ ID NO : 12, SEQ IN NO : 14, SEQ ID NO : 16, SEQ ID NO : 18, SEQ IN NO : 20, SEQ ID NO : 22, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26, SEQ ID NO : 28, SEQ ID NO : 30, SEQ ID NO : 32, SEQ ID NO : 34, SEQ ID NO : 36, SEQ ID NO : 38 및 SEQ ID NO : 40.

이러한 분자는 예를 들어, 본원에서 참고문헌으로 인용되어 있는 제 WO 00/24782 호에 기재되어 있는 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 이러한 분자는 예를 들어, 포유동물 세포(예를 들어, 차이나이즈 햄스터 난소 세포) 또는 박테리아 세포(예를 들어, E. coli 세포)에서 발현될 수 있다.

[0023] 특정 양상에서, 본 발명은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체, 바람직하게는 모노클로날 항체, 가장 바람직하게는 인체 항체를 제공하며, 여기에서 중쇄는 SEQ ID NO : 2, SEQ ID NO : 6 및 SEQ ID NO : 8 중 어느 하나에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편(immunologically functional immunoglobulin fragment)을 포함한다.

[0024] 본 발명은 또한 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체, 바람직하게는 모노클로날 항체, 가장 바람직하게는 인체 항체를 제공하며, 여기에서 경쇄는 SEQ ID NO : 4 에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원 결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함한다.

[0025] 특정 양상에서, 본 발명의 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 여기에서 중쇄의 가변 영역은 SEQ ID NO : 10, SEQ ID NO : 14 및 SEQ ID NO : 16 중 어느 하나에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원 결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함한다. 그밖의 다른 양상에서, 경쇄의 가변 영역은 SEQ ID NO : 12 또는 SEQ ID NO : 18 에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함한다. 다른 양상에서, 중쇄는 SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 22, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26, SEQ ID NO : 28, SEQ ID NO : 30, SEQ ID NO : 32, SEQ ID NO : 34 및 SEQ ID NO : 36 중 어느 하나에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함한다. 또다른 양상에서, 경쇄는 SEQ ID NO : 38 또는 SEQ ID NO : 40 에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함한다. 상기 항체쇄(antibody chain)는 IL-1R1 에 특이적으로 결합하는 항체를 제조하는데 유용하며, 결과적으로 형성된 분자가 IL-1R1 및/또는 다른 표적 분자(예를 들어, TNF 또는 TNF 수용체)와 결합하는 양특이성 항체 제조에 또한 유용하다.

[0026] 본 발명은 또한 IL-1R1 과 특이적으로 결합하는 항체를 제공하며, 여기에서 중쇄는 SEQ ID NO : 10 에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하며, 경쇄는 SEQ ID NO : 12 에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0027] 특정 양상에서, 본 발명은 또한 중쇄와 경쇄를 포함하는 항체를 제공하며, 여기에서 중쇄는 SEQ ID NO : 10 에 기재되어 있는 아미노산 서열과 적어도 90 %, 더욱 바람직하게 적어도 95 % 및 가장 바람직하게 약 99 % 동일성을 갖는 서열을 포함하는 제 1 가변 영역을 포함하고, 경쇄는 SEQ ID NO : 12 에 기재되어 있는 아미노산 서열과 적어도 90 %, 더욱 바람직하게 적어도 95 % 및 가장 바람직하게 약 99 % 동일성을 갖는 서열을 포함하는 제 2 가변 영역을 포함하며, 상기 항체는 IL-1R1

과 상호작용한다.

- [0028] 본 발명은 또한 IL-1R1 과 특이적으로 결합하는 항체를 제공하며, 여기에서 중쇄는 SEQ ID NO : 14 에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하며, 경쇄는 SEQ ID NO : 12 에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0029] 특정 양상에서, 본 발명은 또한 중쇄와 경쇄를 포함하는 항체를 제공하며, 여기에서 중쇄는 SEQ ID NO : 14 에 기재되어 있는 아미노산 서열과 적어도 90 %, 더욱 바람직하게 적어도 95 % 및 가장 바람직하게 약 99 % 동일성을 갖는 서열을 포함하는 제 1 가변 영역을 포함하고, 경쇄는 SEQ ID NO : 12 에 기재되어 있는 아미노산 서열과 적어도 90 %, 더욱 바람직하게 적어도 95 % 및 가장 바람직하게 약 99 % 동일성을 갖는 서열을 포함하는 제 2 가변 영역을 포함하며, 상기 항체는 IL-1R1 과 상호작용한다.
- [0030] 본 발명은 또한 IL-1R1 과 특이적으로 결합하는 항체를 제공하며, 여기에서 중쇄는 SEQ ID NO : 16 에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하며, 경쇄는 SEQ ID NO : 18 에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0031] 특정 양상에서, 본 발명은 또한 중쇄와 경쇄를 포함하는 항체를 제공하며, 여기에서 중쇄는 SEQ ID NO : 16 에 기재되어 있는 아미노산 서열과 적어도 90 %, 더욱 바람직하게 적어도 95 % 및 가장 바람직하게 약 99 % 동일성을 갖는 서열을 포함하는 제 1 가변 영역을 포함하고, 경쇄는 SEQ ID NO : 18 에 기재되어 있는 아미노산 서열과 적어도 90 %, 더욱 바람직하게 적어도 95 % 및 가장 바람직하게 약 99 % 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 제 2 가변 영역을 포함하며, 상기 항체는 IL-1R1 과 상호작용한다.
- [0032] 본 발명은 또한 IL-1R1 과 특이적으로 결합하는 항체를 제공하고, 여기에서 중쇄는 SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 22, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26, SEQ ID NO : 28 또는 SEQ ID NO : 30 에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함하며, 경쇄는 SEQ ID NO : 38 에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함한다.
- [0033] 본 발명은 또한 IL-1R1 과 특이적으로 결합하는 항체를 제공하고, 여기에서 중쇄는 SEQ ID NO : 32, SEQ ID NO : 34 또는 SEQ ID NO : 36 에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함하며, 경쇄는 SEQ ID NO : 40 에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함한다.
- [0034] 본 발명은 단쇄 항체, 단쇄 Fv 항체, Fab 항체, Fab' 항체 및 (Fab')₂ 항체와 같이 상기한 모든 것의 실시형태를 제공한다.
- [0035] 특정 양상에서, 본 발명은 SEQ ID NO : 38 또는 SEQ ID NO : 40 에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함하는 경쇄를 제공한

다.

[0036] 또한, 본 발명은 SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 22, SEQ ID NO : 24, SEQ ID NO : 26, SEQ ID NO : 28, SEQ ID NO : 30, SEQ ID NO : 32, SEQ ID NO : 34 및 SEQ ID NO : 36 중 어느 하나에 기재되어 있는 아미노산 서열, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편을 포함하는 중쇄를 제공한다.

[0037] 본 발명은 또한 IL-1R1 과 특이적으로 결합하는 분리된(isolated) 인체 항체에 관한 것이며, 여기에서 항체는 다음의 (a) 와 (b) 를 포함한다 : (a) 인체 중쇄 외곽구조(framework) 영역, 인체 중쇄 CDR1 영역, 인체 중쇄 CDR2 영역 및 인체 중쇄 CDR3 영역 ; 및 (b) 인체 경쇄 외곽구조 영역, 인체 경쇄 CDR1 영역, 인체 경쇄 CDR2 영역 및 인체 경쇄 CDR3 영역. 특정 양상에서, 인체 중쇄 CDR1 영역은 도 10 에 나타나 있는 바와 같이 26F5, 27F2 또는 15C4 의 중쇄 CDR1 영역이며, 인체 경쇄 CDR1 영역은 도 11 에 나타나 있는 바와 같이 26F5, 27F2 또는 15C4 의 경쇄 CDR1 영역이다. 그밖의 다른 양상에서, 인체 중쇄 CDR2 영역은 도 10 에 나타나 있는 바와 같이 26F5, 27F2 또는 15C4 의 중쇄 CDR2 영역이고, 인체 경쇄 CDR2 영역은 도 11 에 나타나 있는 바와 같이 26F5, 27F2 또는 15C4 의 경쇄 CDR2 영역이다. 또다른 양상에서, 인체 중쇄 CDR3 영역은 도 10 에 나타나 있는 바와 같이 26F5, 27F2 또는 15C4 의 중쇄 CDR3 영역이며, 인체 경쇄 CDR3 영역은 도 11 에 나타나 있는 바와 같이 26F5, 27F2 또는 15C4 의 경쇄 CDR3 영역이다.

[0038] 또한, 본 발명은 인체 중쇄 CDR1 영역, 인체 중쇄 CDR2 영역 및/또는 인체 중쇄 CDR3 영역을 포함하는, 인터루킨-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)과 특이적으로 결합하는 분리된 인체 항체를 제공하며, 상기 인체 중쇄 CDR1 은 SEQ ID NO : 61, SEQ ID NO : 62 또는 SEQ ID NO : 63 의 아미노산 서열을 가지며 ; 상기 인체 중쇄 CDR2 는 SEQ ID NO : 64, SEQ ID NO : 65 또는 SEQ ID NO : 66 의 아미노산 서열을 가지며 ; 및/또는 상기 인체 중쇄 CDR3 은 SEQ ID NO : 67, SEQ ID NO : 68 또는 SEQ ID NO : 69 의 아미노산 서열을 갖는다.

[0039] 또한, 본 발명은 인체 경쇄 CDR1 영역, 인체 중쇄 CDR2 영역 및/또는 인체 중쇄 CDR3 영역을 포함하는, 인터루킨-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)과 특이적으로 결합하는 분리된 인체 항체를 제공하며, 여기에서 상기 인체 경쇄 CDR1 은 SEQ ID NO : 70 또는 SEQ ID NO : 71 의 아미노산 서열을 가지며 ; 상기 인체 중쇄 CDR2 는 SEQ ID NO : 72 또는 SEQ ID NO : 73 의 아미노산 서열을 가지며 ; 및/또는 상기 인체 중쇄 CDR3 은 SEQ ID NO : 74 또는 SEQ ID NO : 75 의 아미노산 서열을 갖는다.

[0040] 특정 실시형태에서, 본 발명의 항체는 IL-1R1 의 세 번째 도메인에 결합하며, 이는 도 17 에 나타나 있다. 바람직하게, 본 발명의 항체에 대한 에피토프는 아미노산 서열 YSV 로 구성되어 있고, 본원에서는 에피토프 4 로 언급하며 도 24 에 나타나 있다. 본 발명은 또한 에피토프 4 와 결합할 수 있는 융합 단백질과 그밖의 다른 분자[상기 언급한 항체들과 함께, 본원에서는 총괄적으로 "특이적 결합 파트너(specific binding partners)" 로 명명함]에 관한 것이며, 예를 들어 참고문헌으로 인용되어 있는 제 WO 00/24782 호에 기재되어 있는 방법을 사용하여 제조할 것이다. 상기 분자는 예를 들어, 포유동물 세포(예를 들어, 차이니스 햄스터 난소 세포) 또는 박테리아 세포(예를 들어 E. coli 세포)에서 발현될 수 있다.

[0041] 더욱이, 본 발명은 선택한 항원의 에피토프를 맵핑(mapping)하기 위한 방법을 제공한다. 한 양상에서, 상기 방법은 다음 단계를 포함한다 : (a) 집합의 융합 단백질(a set of fusion proteins)을 생성하는 단계[여기에서, 각각의 융합 단백질은 (i) 아비딘과 (ii) 항원의 단편을 포함함] ;

(b) 항

원에 대한 하나 또는 그 이상의 특이적 결합 파트너와 결합하는 상기 집합의 융합 단백질을 스크리닝하는 단계 ;

(c) 비오틴을 포함하는 배지 상에서 융합 단백질을 분리하는 단계(이에 의해 아비딘은 비오틴과 결합함) ; 및

(d) 특이적 결합 파트너(들)에 대한 항원의 결합 부위를 결정하기 위해 특이적 결합 파트너(들)에 의해 결합된 융합 단백질을 분석하는 단계.

특정 양상에서, 특이적 결합 파트너는 항체이다.

[0042] 다른 실시형태에서, 본 발명은 다수의 본 발명의 모노클로날 항체, 또는 이의 항원-결합 단편이나 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편의 약학적 유효량을, 이를 필요로 하는 개인에게 투여하는 단계를 포함하는, IL-1 매개 질환, 증상 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0043] 본 발명은 또한 본 발명의 모노클로날 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 생물학적 시료를 접촉시키는 단계를 포함하여, 상기 시료 내에서 IL-1R1 농도를 검출하는 방법을 제공한다. 본 발명의 항-IL-1R 항체는 IL-1R 을 검출하고 정량하기 위해 경쟁적 결합 검정(competitive binding assay), 직접 및 간접 샌드위치 검정, 면역침강 검정 및 효소-연결 면역흡수측정검사(ELISA)와 같은 모든 공지된 검정 방법에서 사용될 것이다(Sola 의 1987, Monoclonal Antibodies : A Manual of Techniques, pp. 147-158, CRC Press, Inc. 참조). 항체는 사용되는 검정 방법에 적절한 친화도를 갖는 IL-1R 과 결합할 수 있다.

[0044] 본 발명의 바람직한 특이적 실시형태는 하기의 바람직한 특정 실시형태와 청구범위에서 좀더 상세하게 기재되어 있는 내용으로부터 명백해질 것이다.

발명의 상세한 설명

[0073] 본원에 사용한 표제는 단지 구성상의 목적을 위함이지 기재되어 있는 주요 물질로 한정하려는 것이 아니다. 본 출원에 기재되어 있는 모든 참고문헌은 모든 목적으로 본원에 참고문헌으로 명확히 인용된다.

[0074] 정의

[0075] 자연 발생적이거나 실험적으로 유도된 질환 또는 의학적 증상이 체액이나 조직 내의 IL-1 의 수준을 증가시키는데 관련되거나 또는 인체로부터 수득한 세포나 조직이 배양시 IL-1 의 수준을 증가시키는 경우에, 질환 또는 의학적 증상은 "인터루킨-1(IL-1) 매개 질환" 으로 간주된다. IL-1 의 증가된 수준은 예를 들어, 일반적으로 특정 세포나 조직에서 측정되는 초과 수준을 포함하며, 또는 일반적으로 IL-1 을 발현하지 않는 세포나 조직에서 검출가능한 IL-1 의 수준이다. 많은 경우에서, IL-1 매개 질환은 또한 다음의 부가적인 두 증상으로 인지될 수 있다 : (1) IL-1 을 투여하거나 IL-1 의 발현을 상향조절하여 동물에서 실험적으로 모방할 수 있는 질환 또는 의학적 증상에 관련된 병적 소견 ; 및 (2) IL-1 의 작용을 저해하는 제제로 처리하여 저해하거나 중지시킬 수 있는 질환 또는 의학적 증상을 나타내는 실험적 동물 모델에서 유도된 병. 대부분의 IL-1 매개 질환에서, 상기 세 종류의 증상 중 적어도 둘이 적합하며, 다수의 IL-1 매개 질환에서는 세 증상 모두가 적합하다.

[0076] 급성 및 만성 IL-1-매개 질환의 비-포괄적인 예는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다 : 급성

췌장염 ; 근위축성측색경화증(ALS) ; 알츠하이머병 ; AIDS-유도 악액질을 포함하는 악액질/식욕부진 ; 천식 및 이외의 다른 폐질환 ; 죽상동맥경화증 ; 자가면역 맥관염 ; 만성 피로 증후군 ; 클로스트리듐-관련 설사를 포함하는 클로스트리듐 관련 질환 ; 울혈성 심부전, 관상 재발협착증, 심근경색, 심근 기능부전(예를 들어, 폐혈증 관련 심근 기능부전) 및 관상동맥 바이패스 이식편을 포함하는 관상 증상 및 징후 ; 다발성골수종 및 골수성 백혈병(예를 들어, AML 또는 CML)과 이외의 다른 백혈병과 같은 암, 뿐만 아니라 종양 전이 ; 당뇨병(예를 들어, 인슐린-의존성 당뇨병) ; 자궁내막증 ; 열병 ; 섬유근통 ; 사구체신염 ; 대수주성이식편병/이식 거부반응 ; 출혈성속 ; 통각과민 ; 염증성 장질환 ; 골관절염, 건선성 관절염 및 류마티스성 관절염을 포함하는 관절의 염증성 증상 ; 예를 들어, 각막 이식에 관련된 염증성 안질환 ; 대뇌 국소빈혈(예를 들어, 신경병성을 일으킬 수 있는 외상, 간질, 출혈 또는 발작으로 인한 뇌손상)을 포함하는 국소빈혈 ; 카와사키병 ; 학습 장애 ; 폐질환(예를 들어, ARDS) ; 다발성경화증 ; 근증(예를 들어, 특히 폐혈증에서 나타나는 근육 단백질 대사) ; 신경독성(예를 들어, HIV 로 유도된 신경독성) ; 골다공증 ; 압-관련 동통을 포함하는 동통 ; 파킨슨병 ; 치주치근막질환 ; 조기분만 ; 건선 ; 재관류손상 ; 폐혈증성속 ; 방사선 치료에 의한 부작용 ; 측두하악관절질환 ; 수면 장애 ; 포도막염 ; 또는 좌상, 염좌, 연골 손상, 외상, 정형외과 수술, 감염 또는 이외의 질환 진행으로 인한 염증성 증상. 이러한 급성 및 만성 IL-1 매개 질환, 뿐만 아니라 이외의 다른 IL-1-매개 증상 및 질환을 치료하기 위한 본 발명의 방법을 하기에 기재하였다.

[0077] 통상적인 기술로 재조합 DNA 를 제조하고, 올리고뉴클레오티드를 합성하며, 조직 배양 및 형질전환 (예를 들어, 일렉트로포레이션, 트랜스펙션 및 리포펙션)을 수행할 수 있다. 효소학적 반응 및 정제 기술은 제조업자의 설명서에 따라 수행하거나 또는 본 분야에서 통상적으로 수행되거나 본원에 기재되어 있는 바와 같이 수행할 수 있다. 하기의 기술 및 방법은 일반적으로 본 분야에 널리 공지되어 있는 통상적인 방법에 따라 수행되거나 또는 본 명세서에 기재되고 논의된 일반적이고 좀 더 특정한 참고문헌에 기재되어 있는 바와 같이 수행할 수 있다. 예를 들어, 모든 목적으로 본원에 참고문헌으로 인용하고 있는 Sambrook 등의 2001, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 를 참조하라. 특별한 의미를 부여하고자 하는 경우를 제외하고는, 본원에 기재되어 있는 분석 화학, 합성 유기 화학 및 의약품 화학과 약학적 화학의 실험적 방법 및 기술과 함께 사용되는 학술 용어는 본 분야에 널리 공지된 것이며 일반적으로 사용된다. 표준 기술은 화학적 합성, 화학적 분석, 약학적 제조, 제형화 및 수송, 및 환자를 치료하기 위해 사용할 수 있다.

[0078] 다른 식으로 정의되는 경우를 제외하고는, 본 명세서에 사용된 바와 같은 하기의 용어는 하기의 의미로 이해된다 :

[0079] 용어 "분리된 폴리뉴클레오티드" 는 (1) 자연 상태에서는 표제 폴리뉴클레오티드와 결합하는 다른 폴리뉴클레오티드의 전체 또는 일부분과 공유적 또는 비공유적으로 결합하지 않는 표제 뉴클레오티드, (2) 자연 상태에서는 결합하지 않는 분자와 결합하는 표제 폴리뉴클레오티드, 또는 (3) 모든 다른 폴리뉴클레오티드와 결합하는 자연 발생적이지 않은 표제 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 이러한 분리된 폴리뉴클레오티드는 합성 기원의 게놈 DNA, cDNA, mRNA 또는 다른 RNA, 또는 이들의 모든 조합물일 수 있다.

[0080] 본원에 사용된 용어 "분리된 단백질" 은 (1) 일반적으로 표제 단백질과 함께 발견되는 적어도 몇몇의 다른 단백질이 유리된 표제 단백질, (2) 동일한 원, 예를 들어, 동일한 종의 다른 단백질이 실질적으로 유리된 표제 단백질, (3) 상이한 종의 세포에서 발현되는 표제 단백질, (4) 자연 상태에서는 결합하는 적어도 약 50 % 의 폴리뉴클레오티드, 지질, 탄수화물 또는 다른 물질로부터 분리된 표제 단백질, (5) 자연 상태에서는 "분리된 단백질" 과 결합하는 단백질의 부분과 공유적 상호작용 또는 비공유적 상호작용에 의해 결합되지 않는 표제 단백질, (6) 자연 상태에서는 결합하지 않는 폴리뉴클레오티드와 공유적 또는 비공유적 상호작용으로 실시가능하게 결합되는 표제 단백질, 또는

(7) 자연 발생적이지 않은 표제 단백질을 의미한다. 합성 기원의 게놈 DNA, cDNA, mRNA 또는 다른 RNA, 또는 이들의 조합물은 상기와 같은 분리된 단백질을 코드한다. 바람직하게, 분리된 단백질은 이의 치료학적 용도, 진단적 용도, 예방 용도, 연구적 용도 또는 이외의 다른 용도에 위배되는 자연 환경에서 발견되는 단백질이나 폴리펩티드 또는 이외의 다른 오염 물질이 실질적으로 유리된 것이다.

[0081] 용어 "폴리펩티드" 또는 "단백질" 은 아미노산의 하나 또는 그 이상의 사슬을 의미하며, 각각의 사슬은 펩티드 결합으로 공유 결합하는 아미노산을 포함하고, 여기에서 상기 폴리펩티드 또는 단백질은 천연 단백질 즉, 자연 발생적인 세포 및 특히 비-재조합 세포, 또는 유전적으로 조작된 세포나 재조합 세포에 의해 생성되는 단백질의 서열을 갖는, 펩티드 결합으로 비-공유적 및/또는 공유적으로 결합되는 대다수의 사슬을 포함할 수 있으며, 천연 단백질의 아미노산 서열을 갖는 분자 또는 천연 서열의 하나 또는 그 이상의 아미노산이 결실, 부가 및/또는 치환된 분자를 포함할 수 있다. 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질" 은 특히 항-IL1-R1 항체, 또는 항-ILR-1R1 항체의 하나 또는 그 이상의 아미노산이 결실, 부가 및/또는 치환된 서열을 포함한다. 따라서, "폴리펩티드" 또는 "단백질" 은 하나("단량체") 또는 다수("다량체")의 아미노산 사슬을 포함할 수 있다.

[0082] 용어 "폴리펩티드 단편" 은 자연 발생적이거나 재조합적으로 생성한 폴리펩티드의 아미노-말단 결실, 카르복시-말단 결실 및/또는 내부 결실이나 치환을 갖는 단량체이거나 다량체인 폴리펩티드를 의미한다. 특정 실시형태에서, 폴리펩티드 단편은 적어도 5 내지 약 500 개의 아미노산 길이의 아미노산 사슬을 포함한다. 특정 실시형태에서, 단편은 적어도 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 또는 450 개의 아미노산 길이를 갖는다. 특히 유용한 폴리펩티드 단편은 결합 도메인을 포함하는 기능적 도메인을 포함한다. 항-IL1-R1 항체인 경우에, 유용한 단편은 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: CDR 영역, 특히 중쇄 또는 경쇄의 CDR3 영역; 중쇄 또는 경쇄의 가변 도메인; 항체쇄의 일부분 또는 두 개의 CDRs 을 포함하는 이의 가변 영역 등.

[0083] 본원에 사용된 용어 "면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편" 은 적어도 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인을 포함하는 폴리펩티드 단편을 의미한다. 본 발명의 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편은 리간드에 결합할 수 있으며, 리간드와 이의 수용체와의 결합을 방해할 수 있고, 수용체와 리간드와의 결합으로 인한 생물학적 반응을 방해할 수 있거나 또는 이들 모든 작용을 복합적으로 수행할 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 면역학적으로 기능적인 면역글로불린 단편은 IL-1R1 에 특이적으로 결합한다.

[0084] 용어 "자연 발생적인" 및 "천연의" 는 자연적으로 발견되며 사람에게 의해 제조되지 않은 생물학적 물질(분자, 서열, 단백질 복합체, 세포 등)을 의미한다. 예를 들어, 천연원으로부터 분리될 수 있으며 사람에게 의해 의도적으로 변형되지 않은 유기체(바이러스 포함) 내에 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 자연적으로 발생한다. 마찬가지로, 용어 "비-자연 발생적인" 또는 "비-천연의" 는 자연적으로 발견되지 않거나 사람에게 의해 구조적으로 변형되거나 합성되는 물질을 의미한다.

[0085] 용어 "실시가능하게 결합된" 은 적합한 조건 하에서 이들의 고유 기능을 수행할 수 있도록 하는 연관된 성분을 의미한다. 예를 들어, 조절 서열은 조절 서열의 전사 활성화에 적합한 조건 하에서 단백질 코딩 서열을 발현하기 위해 단백질 코딩 서열에 "실시가능하게 결합된다".

[0086] 용어 "조절 서열" 은 조절 서열이 결합되는 코딩 서열의 발현 및 프로세싱에 영향을 미칠 수 있

는 표제 폴리뉴클레오티드 서열을 의미한다. 이러한 조절 서열의 특성은 숙주 유기체에 따라 다르다. 특정 실시형태에서, 원핵생물의 조절 서열은 프로모터, 리보솜 결합 부위 및 전사 종결 서열을 포함한다. 다른 특정 실시형태에서, 진핵생물의 조절 서열은 전사 인자에 대한 하나 또는 다수의 인지 부위를 포함하는 프로모터, 전사 인핸서 서열 및 전사 종결 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, "조절 서열"은 선도 서열 및/또는 융합 파트너 서열을 포함한다.

[0087] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 길이가 적어도 10 개의 염기로 이루어진 단일-가닥 또는 이중-가닥 핵산 중합체를 의미한다. 특정 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레오티드류는 리보뉴클레오티드나 데옥시리보뉴클레오티드 또는 어느 한 유형의 뉴클레오티드의 변형된 형태이다. 상기 변형물은 브로모우리딘 및 이노신 유도체와 같은 염기 변형물, 2',3'-디데옥시리보스와 같은 리보스 변형물 및 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포로디셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포로아닐라드에이트 및 포스포로아미드에이트와 같은 인터뉴클레오티드 결합 변형물을 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 및 이중 가닥 형태의 DNA 를 포함한다.

[0088] 용어 "올리고뉴클레오티드"는 200 개의 염기 또는 그 이상의 길이를 포함하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 바람직한 실시형태에서, 올리고뉴클레오티드는 10 내지 60 개의 염기 길이를 갖는다. 더 바람직한 실시형태에서, 올리고뉴클레오티드는 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20 내지 40 개의 염기 길이를 갖는다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, 돌연변이 유전자를 구성하는 데 사용하는 단일 가닥 또는 이중 가닥이다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 셸스 또는 안티셸스 올리고뉴클레오티드이다.

[0089] 용어 "자연 발생적인 뉴클레오티드"는 데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드를 포함한다. 용어 "변형된 뉴클레오티드"는 변형되거나 치환된 당기 또는 변형되거나 치환된 염기를 갖는 뉴클레오티드를 포함한다. 용어 "올리고뉴클레오티드 결합"은 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포로셀레노에이트, 포스포로아닐로티오에이트, 포스포로아닐라드에이트, 포스포로아미드에이트 등과 같은 결합을 포함한다. 예를 들어, 모든 목적으로 본원에 인용문헌으로 인용하고 있는 LaPlanche 등의(1986), Nucl. Acids Res. 14:9081 ; Stec 등의(1984), J. Am. Chem. Soc. 106:6077 ; Stein 등의(1988), Nucl. Acids Res. 16:3209 ; Zon 등의(1991), Anti-Cancer Drug Design 6:539 ; Zon 등의(1991), Oligonucleotides and Analogues : A Practical Approach, pp. 87-108(F. Eckstein, ed.), Oxford University Press, Oxford England ; Stec 등의 미국 특허 번호 제 5,151,510 호 ; Uhlmann 및 Peyman(1990), Chemical Reviews 90:543 을 참조하라. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 검출 검정을 위해 방사선 표지, 형광성 표지, 헵탄 또는 항원성 표지를 포함하는 표지를 포함한다.

[0090] 용어 "벡터"는 숙주세포로 코딩 정보를 전달하는데 사용되는 모든 분자(예를 들어, 핵산, 플라스미드 또는 바이러스)를 의미한다.

[0091] 용어 "발현 벡터" 또는 "발현 구조물"은 숙주세포를 형질전환시키는데 적합하고 핵산 서열에 작동적으로 결합되는 하나 또는 그 이상의 이중성 코딩 영역의 발현을 지시 및/또는 조절하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 의미한다. 발현 구조물은 인트론이 존재하는 경우에, 발현 구조물에 실시가능하게 결합된 코딩 영역의 전사, 번역 및 RNA 스플라이싱에 영향을 미치거나 이를 조절하는 서열을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0092] 용어 "숙주세포"는 핵산 서열로 형질전환되었거나 또는 형질전환될 수 있어서 이로 인해 목적으로

하는 선택된 유전자를 발현시킬 수 있는 세포를 의미한다. 상기 용어는 선택된 유전자가 존재하는 한, 원모세포와 형태학적 또는 유전학 구조적으로 동일한 후손이든 아니든 모세포의 후손을 포함한다.

[0093] 용어 "형질도입" 은 유전자가 일반적으로 파지에 의해 하나의 박테리아에서 다른 박테리아로 전달되는 것을 의미한다. "형질도입" 은 또한 레트로바이러스에 의한 진핵세포 세포 서열의 획득 및 전달을 의미한다.

[0094] 용어 "트랜스펙션" 은 세포에 의해 외부 DNA 또는 외인성 DNA 가 흡수됨을 의미하며, 세포는 외인성 DNA 가 세포 멤브레인 내부로 도입되는 경우에 "트랜스펙션" 된다. 다수의 트랜스펙션 기술은 본 분야에 널리 공지되어 있으며 본원에도 기재되어 있다. 예를 들어, Graham 등의 1973, Virology 52:456 ; Sambrook 등의 2001, Molecular Cloning : A Laboratory Manual, Id. ; Davis 등의 1986, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier ; 및 Chu 등의 1981, Gene 13:197 를 참조하라. 이러한 기술은 적합한 숙주세포 내로 하나 또는 그 이상의 외인성 DNA 성분을 도입하는데 사용할 수 있다.

[0095] 용어 "형질전환" 은 세포의 유전적 특성이 변화됨을 의미하며, 세포는 세포가 새로운 DNA 를 포함하도록 변형된 경우에 형질전환된다. 예를 들어, 세포는 세포가 트랜스펙션, 형질도입 또는 이외의 다른 기술에 의해 천연 상태에서부터 유전적으로 변형된 경우에 형질전환된다. 트랜스펙션시킴거나 형질도입시킨 후에, 형질전환 DNA 는 세포의 염색체로 물리적으로 합성됨으로써 세포의 DNA 와 재조합되거나 또는 복제되지 않고 에피솜성 성분으로 일시적으로 유지되거나 또는 플라스미드로서 독립적으로 복제될 수 있다. 세포는 형질전환 DNA 가 세포 분열시 복제되는 경우에 "안정적으로 형질전환" 된다고 여겨진다.

[0096] 용어 "항원" 은 항체와 같은 선택적인 결합체에 의해 결합될 수 있는 분자 및 부가적으로 상기 항원의 에피토프에 결합할 수 있는 항체를 생산하기 위해 동물에 사용할 수 있는 분자 또는 분자의 일부를 의미한다. 항원은 하나 또는 그 이상의 에피토프를 갖는다.

[0097] 용어 "에피토프" 는 면역글로불린 또는 T-세포 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 결정기, 바람직하게 폴리펩티드 결정기를 포함한다. 특정 실시형태에서, 에피토프 결정기는 아미노산, 당 결사슬, 포스포릴 또는 술폰닐과 같은 화학적으로 활성인 표면기들을 포함하고, 특정 실시형태에서, 에피토프 결정기는 3 차원 구조적 특성 및/또는 특이적인 전하 특성을 나타낸다. 에피토프는 항체가 결합하는 항원의 영역이다. 특정 실시형태에서, 항체가 단백질 및/또는 거대분자의 복합적인 혼합물 내의 표적 항원을 선택적으로 인지할 경우에 항체는 항원에 특이적으로 결합한다. 바람직한 실시형태에서, 해리상수가 약 10 nM 미만이거나 이와 동일할 경우, 더 바람직하게 해리상수가 약 100 pM 미만이거나 이와 동일할 경우, 가장 바람직하게 해리상수가 약 10 pM 미만이거나 이와 동일할 경우에, 항체는 항원에 특이적으로 결합한다.

[0098] 용어 "동일성" 은 둘 또는 그 이상의 폴리펩티드 분자의 서열 또는 둘 또는 그 이상의 핵산 분자 사이의 서열을 비교함으로써 측정된 관계를 나타낸 것이다. 본 분야에서, "동일성" 이란 폴리펩티드 또는 핵산 분자 사이의 서열 관계 정도를 의미하며, 경우에 따라 둘 또는 그 이상의 뉴클레오티드 또는 둘 또는 그 이상의 아미노산 서열 사이의 매치(match)를 측정된 것이다. "동일성" 은 얼마라도 존재하는, 특정한 수학적 모델 또는 컴퓨터 프로그램(즉, "알고리즘")에 기록된 갭 배열과 둘보다 작거나 또는 그 이상의 서열 사이의 동일한 매치 백분율(%)을 측정된 것이다.

- [0111] "Fab 단편" 은 하나의 경쇄와 C_{H1} 및 하나의 중쇄의 가변 영역으로 이루어져 있다. Fab 분자의 중쇄는 다른 중쇄 분자와 이황화물 결합을 형성할 수 없다.
- [0112] "Fab' 단편" 은 하나의 경쇄 및 부가적인 불변 영역인 C_{H1} 및 C_{H2} 둘 다를 포함하는 하나의 중쇄를 포함하며, F(ab')₂ 분자를 형성하는 사슬 간의 이황화물 결합이 두 중쇄 사이에 형성될 수 있다.
- [0113] "F(ab')₂ 단편" 은 두 개의 경쇄 및 불변 영역의 일부분인 C_{H1} 과 C_{H2} 도메인 둘 다를 포함하는 두 개의 중쇄를 포함하며, 사슬 간의 이황화물 결합이 두 중쇄 사이에 형성된다.
- [0114] "Fv 영역" 은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 포함하지만 불변 영역은 포함하지 않는다.
- [0115] "단쇄 항체" 는 중쇄 및 경쇄 가변 영역이 항원-결합 영역을 형성하는 단쇄 폴리펩티드를 형성하기 위해 가요성 링커(flexible linker)로 연결된 Fv 분자이다. 단쇄 항체는 모든 목적으로 본원에 참고문헌으로 인용하고 있는 국제 특허 출원 공개 번호 제 WO 88/01649 호 및 미국 특허 번호 제 4,946,778 호와 제 5,260,203 호에 상세하게 논의되어 있다.
- [0116] 특정 실시형태에서, "다중특이성" 또는 "다기능성" 항체와 다른 "2 가 항체" 는 동일한 항원 특이성을 갖는 결합 부위를 포함한다고 이해된다.
- [0117] "양특이성" 또는 "이작용기성" 항체는 두 개의 상이한 중쇄/경쇄 쌍 및 두 개의 상이한 결합 부위를 갖는 혼성항체이다. 양특이성 항체는 하이브리도마 융합 또는 Fab' 단편의 결합을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 방법으로 제조할 수 있다. 예를 들어, Songsivilai & Lachmann(1990), Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 ; Kostelny 등의 (1992), J. Immunol. 148:1547-1553 을 참조하라.
- [0118] 본 발명의 항체 결합성 및 특이성을 평가하는데 있어서, 초과량의 항체가 카운터리셉터(counterreceptor)에 결합하는 수용체의 양을 적어도 약 20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 85 % 또는 그 이상(생체의 경쟁적 결합 검정으로 측정함)으로 감소시킬 경우에 항체는 수용체에 대한 리간드의 결합을 "실질적으로 저해" 한다.
- [0119] 용어 "제제" 는 화합물, 화합물의 혼합물, 생물학적 거대분자 또는 생물학적 물질로 제조한 추출물을 의미한다.
- [0120] 용어 "표지" 또는 "표지된" 은 예를 들어, 방사선표지된 아미노산 또는 표적 아비딘(예를 들어, 바람직하게 광학적 방법이나 비색 방법으로 검출할 수 있는 형광 마커, 화학발광 마커 또는 효소학적 활성과 같은 검출가능한 마커를 포함하는 스트렙타비딘)으로 검출할 수 있는 비오틴 성분의 폴리펩티드에 대한 부착물을 결합시킴으로써 검출가능한 마커를 결합시킴을 의미한다. 특정 실시형태에서, 표지는 또한 치료학적이다. 폴리펩티드 및 당단백질을 표지하는 다양한 방법은 본 분야에 공지되어 있으며 본원에 기재되어 있는 방법으로 유리하게 사용할 수 있다. 폴리펩티드에 대한 표지의 예는 다음을 포함하지만 이에 한정되지 않는다 : 방사성 동위원소 또는 방사성 핵종(예를 들어, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), 형광 표지(예를 들어, 형

광 이소티오시아네이트(FITC), 로다민 또는 란탄족 인), 효소학적 표지(예를 들어, 고추냉이 퍼옥시 다제, β -갈락토시다제, 루시페라제, 알칼리성 포스파타제), 화학발광 표지, 비오틴기와 같은 헵탄 표지 및 2 차 수용체(예를 들어, 루이신 지퍼 쌍 서열, 2 차 항체에 대한 결합 부위, 금속 결합 도메인, 에피토프 표식)에 의해 인지되는 이미 결정된 폴리펩티드 에피토프. 특정 실시형태 에서, 표지는 잠재적인 입체장애를 감소시키기 위해 다양한 길이의 스페이서 암(spacer arm)[예를 들 어, $n < \text{약 } 20$ 일 경우에 $(\text{CH}_2)_n$]으로 결합된다.

[0121] 용어 "생물학적 시료" 는 생물 또는 살아있던 생물로부터 수득한 모든 양의 물질을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이러한 생물은 사람, 마우스, 원숭이, 랫, 토끼 및 이외의 다른 동물을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 물질은 혈액, 혈청, 요, 세포, 기관, 조직, 골, 골 수, 림프, 림프절, 활액조직(synovial tissue), 연골세포, 활액대식세포(synovial macrophage), 내피세 포, 혈관조직(특히 염증을 일으킨 혈관조직) 및 피부를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 용 어 "약학적 제제" 및 "약물" 은 환자에게 적당히 투여하였을 때 요구되는 치료 효과를 유도할 수 있는 화합물 또는 조성물을 의미한다.

[0122] 용어 "환자" 는 사람 및 동물 피실험자를 포함한다.

[0123] 본원에서 다른 식으로 요구되는 경우를 제외하고는 단수형 용어는 복수형을 포함하고, 복수형 용어 는 단수형을 포함한다.

[0124] 아미노산

[0125] 20 개의 자연 발생적인 아미노산 및 이들의 약어는 일반적으로 사용된다. 모든 목적으로 본 원에 참고문헌으로 인용하고 있는 Immunology--A Sytnhesis, 2nd Edition, (E. S. Golub 및 D. R. Gren, eds.), Sinauer Associates : Sunderland, MA(1991)을 참조하라. 20 개의 통상적인 아미노산의 입체이성질체(예를 들어, D-아미노산), α -, α -비치환된 아미노산과 같은 비천연 아미노산, N-알킬 아 미노산 및 이외의 다른 비통상적인 아미노산도 본 발명의 폴리펩티드에 대한 적합한 성분이다. 비통상적인 아미노산의 예는 다음을 포함한다 : 4-히드록시프롤린, γ -카르복시글루타메이트, ϵ -N,N,N-트리메틸리신, ϵ -N-아세틸리신, O-포스포세린, N-아세틸세린, N-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-히드록시리신, σ -N-메틸아르기닌 및 이외의 다른 유사 아미노산과 이미노산(예를 들어, 4-히드록시 프롤린). 본원에 사용된 폴리펩티드 표기법에서, 표준적으로 사용되는 관례에 따라 왼쪽 방 향은 아미노 말단 방향이고 오른쪽 방향은 카르복시 말단 방향이다.

[0126] 유사하게 다른 식으로 특정되는 경우를 제외하고, 단일-가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 왼쪽 말단은 5' 말단이고 ; 이중-가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 왼쪽 방향은 5' 말단이다. 발생하는 RNA 전 사물이 부가되는 5' 에서의 3' 으로의 방향은 전사 방향이라 하고 ; RNA 전사물로서 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥에서 RNA 전사물의 5' 에서 5' 말단까지의 서열 영역은 "상류 서열" 이라 하며 ; RNA 전사물로서 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥에서 RNA 전사물의 3' 에서 3' 말단까지의 서열 영역은 " 하류 서열" 이라 한다.

[0127] 자연 발생적인 아미노산 잔기는 통상적인 결사슬 특성에 따라 다음과 같은 클래스로 분류할 수 있 다 :

- [0128] 1) 소수성 : 노르루이신(Nor 또는 Nle), Met, Ala, Val, Leu, Ile ; 2) 중성의 친수성 : Cys, Ser, Thr, Asn, Gln ; 3) 산성 : Asp, Glu ; 4) 염기성 : His, Lys, Arg ; 5) 사슬 기원에 영향을 미치는 잔기 : Gly,

Pro ; 및

6) 방향족 : Trp, Tyr, Phe.

- [0129] 보존적인 아미노산 치환은 상기 클래스 중 하나의 멤버가 동일한 클래스의 다른 멤버로 치환되는 것을 포함한다. 보존적인 아미노산 치환은 비-자연 발생적인 아미노산 잔기를 포함하는데, 이는 일반적으로 생물계에서 합성되는 것 보다 화학적 펩티드 합성에 의한 것을 포함한다. 이러한 아미노산은 펩티도유사체 및 이외의 다른 역상 형태의 아미노산 성분을 포함한다.
- [0130] 비-보존적인 치환은 상기 클래스의 한 멤버가 다른 클래스의 멤버로 치환되는 것을 포함한다. 치환된 잔기는 예를 들어, 비-인체 항체와 상동인 인체 항체의 영역 또는 분자의 비-상동성 영역으로 도입될 수 있다.
- [0131] 특정 실시형태에 따른 치환에 있어서, 아미노산의 수치료법 수치가 고려된다. 각각의 아미노산은 이의 소수성 및 전하 특성을 근거로 하여 수치료법 수치가 결정된다. 이 수치는 다음과 같다 : 이소루이신(+4.5) ; 발린(+4.2) ; 루이신(+3.8) ; 페닐알라닌(+2.8) ; 시스테인/시스틴(+2.5) ; 메티오닌(+1.9) ; 알라닌(+1.8) ; 글리신(-0.4) ; 트레오닌(-0.7) ; 세린(-0.8) ; 트립토판(-0.9) ; 티로신(-1.3) ; 프롤린(-1.6) ; 히스티딘(-3.2) ; 글루탐산염(-3.5) ; 글루타민(-3.5) ; 아스파라긴산염(-3.5) ; 아스파라긴(-3.5) ; 리신(-3.9) ; 및 아르기닌(-4.5).
- [0132] 단백질에 대한 상호작용성 생물학적 기능을 부여하는 아미노산 수치료법 수치의 중요성은 본 분야에서 이해된다(예를 들어, Kyte 등의 1982, J. Mol. Biol. 157:105-131 을 참조하라). 특정 아미노산은 유사한 수치료법 수치를 갖는 다른 아미노산으로 치환될 수 있으며 유사한 생물학적 활성도를 가지고 있음이 공지되어 있다. 특정 실시형태에서 수치료법 수치를 근거로 하여 치환하는 데 있어서, 수치료법 수치가 ± 2 이내인 아미노산의 치환이 포함된다. 특정 실시형태에서, 수치가 ± 1 이내인 것들이 포함되며 특정 실시형태에서, ± 0.5 이내인 것들도 포함된다.
- [0133] 유사 아미노산은 친수성을 근거로 효과적으로 치환되며, 특히 이같이 치환시켜 생성된 생물학적으로 기능적인 단백질 또는 펩티드는 본원에 기재되어 있는 바와 같은 면역학적 실시형태에서 사용됨이 본 분야에서 이해된다. 특정 실시형태에서, 인접 아미노산의 친수성에 의해 조절되는 단백질의 매우 국소적인 평균 친수성은 이의 면역원성 및 항원성, 즉 단백질의 생물학적 특성에 관련된 것이다.
- [0134] 아미노산 잔기의 친수성값을 하기에 나타내었다 : 아르기닌(+3.0) ; 리신(+3.0) ; 아스파라긴산염(+3.0 \pm 1) ; 글루탐산염(+3.0 \pm 1) ; 세린(+0.3) ; 아스파라긴(+0.2) ; 글루타민(+0.2) ; 글리신(0) ; 트레오닌(-0.4) ; 프롤린(-0.5 \pm 1) ; 알라닌(-0.5) ; 히스티딘(-0.5) ; 시스테인(-1.0) ; 메티오닌(-1.3) ; 발린(-1.5) ; 루이신(-1.8) ; 이소루이신(-1.8) ; 티로신(-2.3) ; 페닐알라닌(-2.5) ; 및 트립토판(-3.4). 유사한 친수성값을 근거로 하여 치환하는 데 있어서, 특정 실시형태에서는 친수성값이 ± 2 이내인 아미노산의 치환이 포함되며, 친수성값이 ± 1 이내인 아미노산 및 ± 0.5 이내인 아미노산의 치환도 포함된다. 또한 친수성값을 근거로 1 차 아미노산 서열로부터 에피토프를 확인할 수 있다. 이러한 영역은 "에피토프 코어 영역" 이라 한다.
- [0135] 일반적인 아미노산 치환을 표 1 에 나타내었다.

표 1

아미노산 치환

원래 잔기	전형적인 치환	바람직한 치환
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, 노르루이신	Leu
Leu	노르루이신, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4디아미노-부티르산 Acid, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, 노르루이신	Leu

[0136]

[0137]

숙련자들은 널리 공지된 기술을 이용하여 본원에 기재되어 있는 바와 같은 폴리펩티드의 적합한 변이체를 결정할 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 분야의 숙련자들은 활성도를 파괴하지 않으면서 활성도에는 중요한 영향을 미치지 않는 표적 영역으로 치환되는 분자의 적당한 부분을 확인할 수 있다. 특정 실시형태에서, 숙련자들은 유사 폴리펩티드 중에서 보존된 분자의 잔기 및 부분을 확인할 수 있다. 더 나아가 실시형태에서, 생물학적 활성도나 구조에 중요한 영향을 미치는 영역 조차도 생물학적 활성도를 파괴하지 않거나 폴리펩티드 구조에 불리한 영향을 미치지 않으면서 보존적 아미노산 치환을 실시할 수 있다.

[0138]

부가적으로, 본 분야의 숙련자들은 활성도나 구조에 중요한 유사 폴리펩티드의 잔기를 확인하는 구조-작용 연구를 검토할 수 있다. 이러한 비교를 통해, 숙련자들은 유사 단백질의 활성도나 구조에 중요한 아미노산 잔기에 해당하는 단백질내 아미노산 잔기의 중요성을 예측할 수 있다. 본 분야의 숙련자들은 중요한 아미노산 잔기로 예측된 아미노산 잔기를 화학적으로 유사한 아미노산으로 치환할 수 있다.

[0139]

본 분야의 숙련자들은 또한 유사 폴리펩티드의 구조에 관한 아미노산 서열과 3 차원 구조를 분석할 수 있다. 본 분야의 숙련자들은 이러한 정보를 통해 항체의 3 차원 구조에 관한 항체의 아미노산 잔기의 배열을 예측할 수 있다. 특정 실시형태에서, 이러한 잔기는 다른 분자와의 중요한 상호작용에 관계되므로, 본 분야의 숙련자들은 단백질의 표면에서 예측되는 아미노산 잔기에 대한 라디칼 변화가 일어나지 않도록 선택할 수 있다. 또한, 본 분야의 숙련자들은 각각의 바람직한 아미노산 잔기에서의 단일 아미노산을 치환시킨 실험 변이체를 제조할 수 있다. 그런 다음 본 분야의 숙련자들에게 공지된 활성도 검정을 이용하여 이 변이체를 스크리닝할 수 있다. 이러한 변이체는 적당한 변이체에 관한 정보를 수집하는 데 이용할 수 있다. 예를 들어, 특정 아미노산 잔기의 변화로 활성도가 손실되거나 바람직하지 못하게 감소되거나 부적합하게 된다면, 이러한 변이를 갖는 변이체는 피하는 것이 좋다. 즉, 본 분야의 숙련자들

은 일반적인 실험으로부터 수집한 정보를 토대로, 추가 변이가 단독으로 또는 다른 돌연변이와 조합되어 일어나지 않도록 하는 아미노산을 용이하게 결정할 수 있다.

[0140] 2 차 구조를 예상하는 많은 과학적 발표가 있었다. Moulton, 1996, Curr. Op. in Biotech. 7:422-427 ; Chou 등의 1974, Biochemistry 13:222-245 ; Chou 등의 1974, Biochemistry 113:211-222 ; Chou 등의 1978, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47:45-148 ; Chou 등의 1979, Ann. Rev. Biochem. 47:251-276 ; 및 Chou 등의 1979, Biophys. J. 26:367-384 를 참조하라. 또한, 2 차 구조를 예상하는데 도움이 되는 컴퓨터 프로그램을 일반적으로 이용할 수 있다. 2 차 구조를 예상하는 한 방법은 상동성 모델링에 기초하는 방법이다. 예를 들어, 30 % 이상의 서열 동일성 또는 40 % 이상의 유사성을 갖는 두 폴리펩티드 또는 단백질은 종종 유사 구조 위상학을 갖는다. 최근 단백질 구조 데이터베이스(PDB)의 발달은 폴리펩티드나 단백질 구조내의 가능한 접힘의 수를 포함하는 2 차 구조의 예상가능성을 높여주었다. Holm 등의 1999, Nucl. Acid. Res. 27:244-247 을 참조하라. 특정 폴리펩티드 또는 단백질에서의 제한된 접힘의 수가 존재하며 구조의 임계수(critical number)가 일단 정해지면 구조의 예측은 정확해질 것이라고 제시되어 있다 (Brenner 등의 1997, Curr. Op. Struct. Biol. 7:369-376 참조).

[0141] 2 차 구조를 예상하는 부가적인 방법은 "트레딩(threading)"(Jones, 1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7:377-87 ; Sippl 등의 1996, Structure, 4:15-19 참조), "프로필 분석"(Bowie 등의 1991, Science 253:164-170 ; Gribskov 등의 1990, Meth. Enzym. 183:146-159 ; Gribskov 등의 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. 84:4355-4358 참조) 및 "친화론적 연관"(Holm의 1999, 상기 문헌 ; 및 Brenner의 1997, 상기 문헌 참조)를 포함한다.

[0142] 특정 실시형태에서, 항체 변이체는 글리코실화 변이체를 포함하며, 이는 모폴리펩티드의 아미노산 서열과 비교하였을 때 글리코실화 부위의 수 및/또는 유형이 변이된 것이다. 특정 실시형태에서, 단백질 변이체는 천연 단백질보다 많거나 적은 양의 N-결합 글리코실화 부위를 포함한다. N-결합 글리코실화 부위는 다음 서열을 특징으로 한다 : Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr, 여기에서 X로 나타낸 아미노산 잔기는 프롤린을 제외한 모든 아미노산 잔기이다. 이러한 서열을 생성하는 아미노산 잔기의 치환은 N-결합 탄수화물 사슬이 부가될 수 있는 신규한 부위를 제공한다. 선택적으로, 이러한 서열을 제거하는 치환으로 존재하는 N-결합 탄수화물 사슬을 제거하였다. 또한, 하나 또는 그 이상의 N-결합 글리코실화 부위(일반적으로 자연 발생적인 부위임)가 제거되고 하나 또는 그 이상의 신규한 N-결합 부위가 생성된 N-결합 탄수화물 사슬의 재배열을 제공한다. 부가적인 바람직한 항체 변이체는 하나 또는 그 이상의 시스테인 잔기가 모 아미노산 서열로부터 결실되거나 이에 대응하는 다른 아미노산(예를 들어, 세린)으로 치환된 시스테인 변이체를 포함한다. 시스테인 변이체는 항체가 불용성 봉입체를 분리한 후에 생물학적으로 활성인 입체구조로 되접힘되는 경우에 유용하다. 일반적으로 시스테인 변이체는 천연 단백질보다 적은 수의 시스테인 잔기를 가지며, 일반적으로 쌍을 이루지 못한 시스테인으로 인한 상호작용을 최소화시킬 수 있을 정도의 시스테인 잔기를 갖는다.

[0143] 특정 실시형태에서, 아미노산 치환은 (1) 단백질 분해에 대한 감수성을 감소시키고, (2) 산화에 대한 감수성을 감소시키고, (3) 단백질 복합체를 형성하기 위해 결합 친화성을 변화시키고, (4) 결합 친화성을 변화시키고/변화시키거나 (5) 이러한 폴리펩티드에 관한 물리화학적 또는 기능적 특성을 부여하거나 변형시킨다. 특정 실시형태에서, 단일 또는 다중 아미노산 치환(특정 실시형태에서, 보존적 아미노산 치환)은 자연 발생적인 서열(특정 실시형태에서, 분자간 결합을 형성하는 폴리펩티드 외부 도메인의 일부)로 이루어질 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 보존적 아미노산 치환은 일반적으로 모서열의 구조적 특징을 현저하게 변화시키는 않는다(예를 들어, 대체 아미노산은 모서열에서 발생하는 나선을 파괴하지 않거나 모서열을 특징으로 하는 다른 유형의 2 차 구조를 붕괴시키지 않는다). 본 분야에서 인지되는 폴리펩티드 2 차 구조 및 3 차 구조의 예는 각각 본원

에 참고문헌으로 인용하고 있는 Proteins, Structures and Molecular Principles, (Creighton, ed.), 1984, W. H. Freeman and Company, New York ; Introduction to Protein Structure (C. Branden 및 J. Tooze, eds.), 1991, Garland Publishing, New York. N.Y. ; 및 Thornton 등의 (1991), Nature 354:105 에 기재되어 있다.

[0144] 항체의 제조

[0145] 자연 발생적인 항체 구조 단위는 일반적으로 4 량체를 포함한다. 각각의 4 량체는 일반적으로 두 개의 동일한 폴리펩티드 사슬의 쌍을 포함하고, 각각의 쌍은 하나의 전장의 "경"쇄(일반적으로 약 25 kDa 의 분자량을 가짐) 및 하나의 전장의 "중"쇄(일반적으로 약 50-70 kDa 의 분자량을 가짐)을 갖는다. 각 사슬의 아미노-말단 부분은 일반적으로 항원을 인지하는, 일반적으로 약 100 내지 110 또는 그 이상의 아미노산으로 이루어진 가변 영역을 포함한다. 각 사슬의 카르복시-말단 부분은 일반적으로 작동인자로 기능할 수 있는 불변 영역으로 특징된다. 인체 경쇄는 일반적으로 κ 및 λ 경쇄로 분류된다. 중쇄는 일반적으로 μ , σ , γ , α 및 ϵ 으로 분류되며, 이들 각각은 IgM, IgD, IgG, IgA 및 IgE 와 같은 항체 이소타입으로 정의된다. IgG 는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 를 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 서브클래스를 갖는다. IgM 은 IgM1 및 IgM2 를 포함하나 이에 한정되지 않는 서브클래스를 갖는다. IgA 는 IgA1 및 IgA2 를 포함하나 이에 한정되지 않는 서브클래스로 유사하게 분류된다. 일반적으로 전장의 경쇄 및 중쇄에서, 약 12 개 또는 그 이상의 아미노산으로 이루어진 "J" 영역은 약 10 개 또는 그 이상의 아미노산으로 이루어진 "D" 영역을 포함하는 중쇄를 갖는 불변 영역 및 가변 영역을 연결한다. 예를 들어, Fundamental Immunology, Ch. 7, 2nd ed., (Paul, W., ed.), 1989, Raven Press, N.Y. (본원에 참고문헌으로 인용하고 있음)을 참조하라. 각각의 경쇄/중쇄 쌍의 가변 영역의 조합은 일반적으로 항원-결합 부위를 형성한다.

[0146] 각각의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 일반적으로 상보적 결정 영역 또는 CDRs 로 불리는 3 개의 초가변 영역과 결합하는 상대적으로 보존된 4 개의 외곽 구조 영역(FR)을 포함하는 동일한 일반 구조를 나타낸다. 각각의 쌍의 두 사슬의 CDRs 는 외곽 구조 영역으로 결합되며, 이의 배열은 특정 에피토프와 결합가능하다. N-말단에서 C-말단까지, 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 일반적으로 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4 를 포함한다. 각각의 도메인에 대한 아미노산 배열은 일반적으로 Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(1987 및 1991, National Institutes of Health, Bethesda, Md.), Chothia & Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917, 또는 Chothia 등의 1989, Nature 342:878-883)에 정의되어 있는 바에 따른다.

[0147] 모노클로날 항체의 발달로 인해 항체가 유용해졌으며 약학적 제제로도 흥미를 갖게 되었다. 모노클로날 항체는 연속적으로 세포주를 배양함으로써 항체 분자를 생성하는 모든 방법을 사용하여 생성한다. 모노클로날 항체를 제조하는 적합한 방법의 예는 Kohler 등의 (1975, Nature 256:495-497)에 기재되어 있는 하이브리도마 방법 및 인체 B-세포 하이브리도마 방법[Kozbor, 1984, J. Immunol. 133:3001 ; 및 Brodeur 등의 1987, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, (Marcel Dekker, Inc., New York), pp. 51-63 참조]을 포함한다.

[0148] 모노클로날 항체는 치료제로 사용하기 위해 변형시킬 수 있다. 한 예는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 종으로부터 유도된 항체 또는 특정 항체 클래스나 서브클래스에 속하는 항체의 해당 서열과 동일하거나 상동인 반면에 사슬의 나머지는 다른 종에서 유도된 항체 또는 다른 항체 클래스나 서브클래스에 속하는 항체의 해당 서열과 동일하거나 상동인 "키메라" 항체이다. 단편이 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 한, 다른 예로는 이러한 항체의 단편이 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 제 4,816,567 호 ; 및 Morrison 등의(1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 를 참조하라. 관련된 발생 항체는 "CDR-이식된" 항체이며, 상기 항체는 특정 종으로부터 수득한 하나 또는 그 이상의 상보적 결정 영역(CDRs) 또는 특정 항체 클래스나 서브클

래스에 속하는 하나 또는 그 이상의 상보적 결정 영역을 포함하는 반면에 항체 사슬의 나머지는 다른 종에서 유도된 항체 또는 다른 항체 클래스나 서브클래스의 항체의 해당 서열과 동일하거나 상동이다.

[0149] 다른 발생 항체는 "인간화" 항체이다. 비-인체 항체를 인간화하는 방법은 본 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 제 5,585,089 호 및 제 5,693,762 호를 참조하라). 일반적으로 인간화 항체는 비-인체 동물로 제조한 다음 일반적으로 항체의 비-항원 인지 부분의 특정 아미노산 잔기를 대응되는 이소타입 인체 항체의 대응 잔기와 상동이 되도록 변형시킨다. 인간화는 예를 들어, 인체 항체의 대응되는 영역에 대한 설치류의 가변 영역의 적어도 일부분을 치환시킴으로써 본 분야에 기재되어 있는 방법(Jones 등의 1996, Nature 321:522-525 ; Riechmann 등의 1988, Nature 332:323-327 ; Verhoeyen 등의 1988, Science 239:1534-1536 참조)을 이용하여 수행할 수 있다.

[0150] 인체를 항원에 노출시키지 않고 인체 항체("완전 인체 항체")를 발생시키는 것이 좀 더 신규하고 촉망되는 방법이다. 내인성 마우스 면역글로불린이 생성되지 않는 경우에 인체 항체류를 생성할 수 있는 형질전환한 마우스를 사용하여, 항체는 임의로 담체에 결합되는 항원(일반적으로 적어도 6 개의 연속적인 아미노산을 가짐)으로 면역화시켜 생성할 수 있다. 예를 들어, Jakobovits 등의 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551-2555 ; Jakobovits 등의 1993, Nature 362:255-258 ; 및 Bruggermann 등의 1993, Year in Immunol. 7:33 을 참조하라. 이러한 방법의 한 예에서, 형질전환한 동물은 이의 마우스 면역글로불린 중쇄 및 경쇄를 코드하는 내인성 마우스 면역글로불린 좌(locus)를 무능력화시키고 인체 중쇄 및 경쇄 단백질을 코드하는 좌를 이의 게놈에 삽입하여 생성할 수 있다. 완전하게 상보적이지 않은 변형을 갖는 부분적으로 변형된 동물은 모든 바람직한 면역계 변형을 갖는 동물을 수득하기 위해 교잡시킨다. 면역원을 투여하는 경우에, 형질전환한 동물은 가변 영역을 포함하는 마우스 보다는 인체 아미노산 서열을 갖는 항원에 대하여 면역특이적인 항체를 생성한다. 예를 들어, 참고문헌으로 인용하고 있는 PCT 공개 번호 제 WO 96/33735 호 및 제 WO 94/02602 호를 참조하라. 부가적인 방법은 참고문헌으로 인용하고 있는 미국 특허 번호 제 5,545,807 호, PCT 공개 번호 제 WO 91/10741 호, 제 WO 90/04036 호 및 제 EP 546063B1 호와 제 EP 546073A1 호에 기재되어 있다. 인체 항체는 본원에 기재한 바와 같은 숙주세포의 재조합 DNA 를 발현시키거나 하이브리도마 세포에서 발현시켜 제조할 수 있다.

[0151] 완전 인체 항체는 또한 파지-디스플레이 라이브러리(Hoogenboom 등의 1991, J. Mol. Biol. 227:381 ; 및 Marks 등의 1991, J. Mol. Biol. 222:581 에 기재되어 있음)로 제조할 수 있다. 이러한 방법은 섬유상 박테리오파지의 표면 상의 항체를 발현시켜 면역 선별한 다음 선택된 항원과 결합시켜 파지를 선별하는 방법과 유사하다. 이러한 방법은 참고문헌으로 인용하고 있는 PCT 공개 번호 제 WO 99/10494 호에 기재되어 있으며, 상기와 같은 방법을 사용하여 MPL- 및 msk-수용체에 대한 고활성 및 기능적인 작동성 항체를 분리하는 방법도 기재되어 있다.

[0152] 이러한 항체를 코드하는 뉴클레오티드 서열은 결정되어 있으며, 키메라 항체, CDR-이식된 항체, 인간화 항체 및 완전 인체 항체도 또한 재조합 방법으로 제조할 수 있다. 본 분야에 일반적으로 공지된 물질 및 방법으로 항체를 코드하는 핵산은 숙주세포 내로 도입시킨 다음 발현시킨다.

[0153] 본 발명은 인체 IL-1R1 에 결합하는 하나 또는 그 이상의 완전 인체 모노클로날 항체를 제공한다. 바람직하게, 항체는 IL-1R1 의 세 번째 도메인에 결합한다. 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 분자, 특히 이의 가변 영역에 대응되는 서열을 포함하는 아미노산 서열 및 이를 코드하는 뉴클레오티드 서열을 제공한다. 바람직한 실시형태에서, 본

발명은 상보적 결정 영역(CDRs), 특히 CDR1 내지 CDR3 에 대응되는 서열을 제공한다. 부가적인 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 세포주에서 생성되는 면역글로불린 분자 및 모노클로날 항체, 가장 바람직하게 인체 IL-1R1 에 결합하는 정제된 인체 모노클로날 항체를 발현하는 하이브리도마 세포주를 제공한다.

[0154] 인공적인 효모 염색체(YACs)의 백만단위-크기의 인체 좌를 클로닝하고 재구성하며 마우스 생식세포 내로 인공적인 효모 염색체를 도입시키는 능력은 인체 질환에 걸린 유용한 모델을 만들어낼 뿐만 아니라 매우 크거나 천연 그대로 맵핑된 좌의 기능적인 성분을 밝히는데 유리한 방법을 제공한다. 더욱이, 마우스 좌를 인체 등가물로 치환시키는 기술의 사용은 발생하는 동안의 인체 유전자 산물의 발현 및 조절, 다른 시스템과의 교류, 및 질환 발병 및 진행에 있어서의 관련성에 대한 통찰력을 제공한다.

[0155] 이러한 전략의 중요한 실질적인 방법은 마우스 체액성 면역계의 "인간화" 이다. 내인성 Ig 유전자가 불활성화된 마우스 내로의 인체 면역글로불린(Ig) 좌의 도입은 B-세포 발생에 있어서의 항체의 역할 뿐만 아니라 항체의 프로그램된 발현 및 합성의 기초가 되는 메커니즘을 연구할 기회를 제공한다. 또한 이러한 방법은 완전 인체 모노클로날 항체(MAbs)를 생성하는 원, 특히 치료제로 사용하기 위한 원을 제공한다. 완전 인체 항체는 마우스 또는 마우스-유도 Mabs 에 대한 고유한 면역원성 반응 및 알러지 반응을 최소화하여 치료학적으로 항체를 투여할 경우 효능 및 안정성을 향상시킨 다는 것이 예상된다. 완전 인체 항체는 골관절염, 류마티스성 관절염 및 이외의 다른 염증성 증상과 같은 만성 및 재발성 인체 질환의 치료 및 반복적인 항체 투여가 요구되는 질환을 치료하는데 사용할 수 있다.

[0156] 본 분야의 숙련자들은 마우스 항체가 생성되지 않도록 하기 위해 인체 Ig 좌의 큰 단편으로 마우스 스트레인(mouse strain)을 유전 공학적으로 조작하여 마우스가 마우스 항체를 생성하지 않으면서 인체 항체를 생성하도록 할 수 있다. 큰 인체 Ig 단편은 항체 생산 및 발현을 적당히 조절할 뿐만 아니라 다양한 거대 유전자 다양성을 보존시킬 수도 있다. 항체 다양화 및 선별에 대한 마우스류 및 인체 단백질에 대한 면역학적 내성의 결핍을 이용함으로써, 조작된 마우스 스트레인에서 재생성된 인체 항체류는 인체 항원을 포함하는 목적으로 하는 모든 항원에 결합하는 높은 활성의 항체를 산출한다. 하이브리도마 기술을 사용하여, 바람직한 특이성을 갖는 항원-특이성 인체 MAbs 를 생성하여 선별할 수 있다.

[0157] 특정 실시형태에서, 본 분야의 숙련자들은 키메라 항체를 생성하기 위해 마우스 내의 인체 가변 영역과 인체와 다른 종의 불변 영역을 함께 사용할 수 있다. 본 발명의 항체는 전장의 IL-1R1, IL-1R1 의 수용성 형태 또는 이의 단편을 갖는 동물을 면역화시켜 생성할 수 있다. 예를 들어, 국제 특허 출원 공개 번호 제 WO 93/12227 호를 참조하라.

[0158] 본 발명의 항-IL-1R1 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 CDRs 를 같은 또는 다른 종으로부터의 외곽 구조 영역(FRs)에 이식할 수 있다. 특정 실시형태에서, 항-IL-1R1 항체의 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 CDRs 를 공통 인체 FRs 에 이식할 수 있다. 공통 인체 FRs 를 생성하기 위해서, 몇몇의 인체 중쇄 또는 경쇄 아미노산 서열로부터의 FRs 를 공통 아미노산 서열을 확인하기 위해 나열하였다. 항-IL-1R1 항체 중쇄 또는 경쇄의 FRs 를 다른 중쇄 또는 경쇄의 FRs 로 치환할 수 있다. 일반적으로 항-IL-1R1 항체의 중쇄 및 경쇄의 FRs 에서 미량 아미노산은 치환하지 않았으나 나머지 FR 아미노산은 치환할 수 있다. 미량 아미노산은 FRs 에서는 일반적으로 발견되지 않는 위치에서의 특이적인 아미노산이다. 본 발명의 항-IL-1R1 항체에서의 이식된 가변 영역은 항-IL-1R1 항체의 불변 영역과 다른 불변 영역과 함께 사용할 수 있다. 선택적으로, 이식된 가변 영역은 단쇄 Fv 항체의 부분이다. CDR 이식은 예를 들어 본원에 참고문헌으로 인용된 미국 특허 번호 제 6,180,370 호, 제 5,693,762 호, 제 5,693,761 호,

제 5,585,089 호 및 제 5,530,101 호에 기재되어 있다.

- [0159] 특정 실시형태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 항-IL1-R1 항체를 제공한다 : SEQ ID NO : 61, SEQ ID NO : 62 또는 SEQ ID NO : 63 의 아미노산 서열을 갖는 인체 중쇄 CDR 1 영역 ; SEQ ID NO : 64, SEQ ID NO : 65 또는 SEQ ID NO : 66 의 아미노산 서열을 갖는 인체 중쇄 CDR 2 영역 ; 및/또는 SEQ ID NO : 67, SEQ ID NO : 68 또는 SEQ ID NO : 69 의 아미노산 서열을 갖는 인체 중쇄 CDR 3 영역.
- [0160] 또다른 실시형태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 항-IL1-R1 항체를 제공한다 : SEQ ID NO : 70 또는 SEQ ID NO : 71 의 아미노산 서열을 갖는 인체 경쇄 CDR 1 영역 ; SEQ ID NO : 72 또는 SEQ ID NO : 73 의 아미노산 서열을 갖는 인체 중쇄 CDR 2 영역 ; 및/또는 SEQ ID NO : 74 또는 SEQ ID NO : 75 의 아미노산 서열을 갖는 인체 중쇄 CDR 3 영역.
- [0161] 본 발명의 항체는 마우스의 항체를 생성하는 세포에 삽입된 인체 항체를 생성하는 좌의 실질적인 부분을 갖고, 내인성 마우스의 항체를 생성하지 못하도록 추가로 조작된 트랜스제닉 마우스를 사용하여 바람직하게 제조하였다. 이러한 마우스는 인체 면역글로불린 분자 및 항체를 생산하는 능력이 있으며 실질적으로 감소된 양의 마우스의 면역글로불린 분자 및 항체를 생산하거나 이를 생산하지 않는다. 이러한 결과를 얻기 위해 사용된 기술은 특허, 출원 및 본원의 명세서에 기재된 참고문헌에 기재되어 있다. 바람직한 실시형태에서, 숙련자들이 사용한 방법은 본원에 참고문헌으로 인용된 국제 특허 출원 공개번호 제 WO 98/24893 호에 기재되어 있다. 본원에 참고문헌으로 인용된 Mendez 등의, 1997, Nature Genetics 15:146-156 을 참조하라.
- [0162] 본 발명의 모노클로날 항체(MAbs)를 일반적인 모노클로날 항체 방법론학(예를 들어, standard somatic cell hybridization technique of Kohler and Milstein, 1975, Nature 256:495 참조)을 포함하는 다양한 기술에 의해 생산할 수 있다. 체세포 혼성화 방법을 사용하는 것이 바람직하나, 대체로 모노클로날 항체를 생산하는 다른 기술(예를 들어, B-림프구의 바이러스의 형질전환 또는 종양 유전자의 형질전환)을 사용할 수 있다.
- [0163] 바람직한 실시형태에서, 내인성 μ 및 κ 쇠 좌를 비활성화하는 표적 돌연변이와 함께, 재배열되지 않은 인체 중쇄(μ 및 γ) 및 κ 경쇄 면역글로불린 서열인 인체 면역글로불린 유전자 미니유전자 좌(minilocus)를 함유하는 "HuMab" 마우스로 언급된 마우스를 사용하여 IL-1R1 에 직접 대항하는 인체 모노클로날 항체를 생산할 수 있다. Lonberg 등의, 1994, Nature 368:856-859 를 참조하라. 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는 κ 의 감소된 발현을 나타낼 것이며 면역화 반응에서, 높은 결합력을 가진 인체 IgG κ 모노클로날 항체를 생산하기 위해 도입된 인체 중쇄 및 경쇄 트랜스유전자에 클래스 스위치 및 체세포 돌연변이를 실행하였다. Lonberg 등의, 상기 문헌 ; Lonberg 및 Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 ; Harding 및 Lonberg, 1995, Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546. HuMab 마우스의 제조는 본원의 참고문헌으로 인용된 Taylor 등의, 1992, Nucleic Acids Res. 20:6287-6295 ; Chen 등의, 1993, International Immunology 5:647-656 ; Tuailon 등의, 1994, J. Immunol. 152:2912-2920 ; Lonberg 등의, 1994, Nature 368:856-859 ; Lonberg, 1994, Handbook of Exp. Pharmacology 113:49-101 ; Taylor 등의, 1994, International Immunology 6:579-591 ; Lonberg & Huszar, 1995, Intern. Rev. Immunol. 13:65-93 ; Harding & Lonberg, 1995, Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546 ; Fishwild 등의, 1996, Nature Biotechnology 14:845-851 에 상세히 기재되어 있다. 또한 추가로 본원의 참고문헌으로 인용된 미국 특허 번호 제 5,545,806 호 ; 제 5,569,825 호 ; 제 5,625,126 호 ; 제 5,633,425 호 ; 제 5,789,650 호 ; 제 5,877,397 호 ; 제 5,661,016 호 ; 제 5,814,318 호 ; 제 5,874,299 호 ; 및 제 5,770,429 호 ; Lonberg 및 Kay 등의 모든 참고문헌 뿐만 아니라, Surani 등의 미국 특허 번호 제 5,545,807 호 ; 1993 년 6 월 24 일에 공개된 국제 특허 출원 공개 번호 제 WO 93/1227 호 ; 1992 년 12 월 23 일에 공개된 제 WO 92/22646 호 ; 및 1992 년 3 월 19 일에 공개된 제 WO 92/03918 호를 참조하라. 선택적으로, 하기의 실시예에 기재되어

있는 HCo7 및 HCo12 트랜스제닉 마우스 스트레인을 인체 항-IL-1R1 항체를 생산하기 위해 사용할 수 있다.

[0164] 편리하게, IL-1R1 에 특이적인 완전한 인체 모노클로날 항체를 다음과 같이 제조하였다. 인체 면역글로불린 유전자를 함유한 트랜스제닉 마우스를 원하는 IL-1R1-관련 항원으로 면역시켰다. 항체가 발현되는 마우스로부터 림프 세포(B-세포와 같은)를 수득하였다. 불사화된 하이브리도마 세포주를 생성하기 위해 회수한 이러한 세포를 골수-유형 세포주와 융합시키고, 원하는 항원에 특이적인 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주를 확인하기 위해 이러한 하이브리도마 세포주를 스크리닝하고 선별하였다. 특정 실시형태에서, IL-1R1 에 특이적인 항체를 생성하는 하이브리도마 세포주의 생산을 제공하였다.

[0165] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 항체를 하이브리도마 세포주에 의해 생성하였다. 이러한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 대략 4 pM 내지 100 pM 의 해리 상수(K_d)로 IL-1R1 에 결합하였다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 항체는 약 20 pM 미만의 K_d 로 IL-1R1 에 결합한다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체는 IL-1R1 의 세 번째 도메인에 결합한다. 인체 및 랫 IL1-R1 의 세 번째 도메인의 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열을 도 17 에 나타내었다.

[0166] 바람직한 실시형태에서, 본 발명의 항체는 IgG1, IgG2 또는 IgG4 이소타입이며, IgG2 이소타입이 가장 바람직하다. 본 발명의 바람직한 실시형태에서, 항체는 인체 κ 경쇄 및 인체 IgG1, IgG2 또는 IgG4 중쇄를 포함한다. 특정 실시형태에서, 항체의 가변 영역은 IgG1, IgG2 또는 IgG4 이소타입의 불변 영역 이외의 불변 영역과 결합되었다. 특정 실시형태에서, 본 발명의 항체를 포유동물 세포에서 발현시키기 위해 클로닝하였다.

[0167] 특정 실시형태에서, 항-IL-1R1 항체의 중쇄 및 경쇄의 보존적 아미노산 치환(및 코딩 뉴클레오티드에 일치하는 변형)은 항-IL-1R1 항체의 중쇄 및 경쇄와 비슷한 기능적인 특성 및 화학적인 특성을 갖는 항-IL-1R1 항체를 생산할 수 있다. 대조적으로, 항-IL-1R1 항체의 기능적인 특성 및/또는 화학적인 특성에서 실질적인 변형은 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열에서 선택된 치환에 의해 나타날 수 있으며, 상기 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열은 (a) 치환영역에서 분자 골격의 구조[예를 들어, 시트(sheet) 입체구조 또는 나선 입체구조], (b) 목표 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크(bulk)를 유지하는데 있어서 이들 효과는 매우 다르다.

[0168] 예를 들어, "보존적 아미노산 치환" 은 천연 아미노산 잔기가 그 위치의 아미노산 잔기의 극성 또는 전하에 영향을 거의 미치지 않거나 영향을 미치지 않는 비천연 잔기로 치환됨을 포함한다. 게다가, 폴리펩티드에서 어떤 천연 잔기는 알라닌으로 또한 치환될 수 있으며, 이는 "alanine scanning mutagenesis"[Wells, 1991, Methods Enzymol. 202:390 (e.d. J.J Langone), Academic Press, London]에 이미 상세히 기재되어 있다.

[0169] 이러한 치환이 요구되는 경우에, 요구되는 아미노산 치환(보존적 또는 비-보존적인 치환에 상관없이)은 본 분야에서 숙련자에 의해 결정될 수 있다. 특정 실시형태에서, 아미노산 치환은 본원에 기재된 항-IL-1R1 항체의 중요한 잔기를 확인하거나 항-IL-1R1 항체의 친화력을 증가시키거나 감소시키기 위해 사용할 수 있다.

[0170] 대안적인 실시형태에서, 본 발명의 항체는 하이브리도마 세포주 이외의 세포주에서 발현될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 특정 항체를 코딩하는 서열을 적절한 포유동물 숙주세포의 형질전환을 위해 사용할 수 있다. 이러한 실시형태에 따라서, 예를 들어, 바이러스 내에서(또는 바이러스 벡터 내로) 폴리뉴클레오티드 패키징(packaging) 및 바이러스(또는 벡터)를 사용한 숙주세포 형

질도입을 포함하는 숙주세포로의 폴리뉴클레오티드 도입을 위한 잘 알려진 방법 또는 본 분야에서 널리 공지된 트랜스펙션 방법을 사용하여 형질전환을 할 수 있다. 이러한 방법은 본원에 참고문헌으로 인용된 미국 특허 번호 제 4,399,216 호, 제 4,912,040 호, 제 4,740,461 호 및 제 4,959,455 호에 예시되어 있다. 일반적으로, 사용된 형질전환 방법은 형질전환될 숙주에 따라 다르다. 이중성 폴리뉴클레오티드를 포유동물의 세포로 도입하는 방법은 본 분야에서 잘 알려져 있으며 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 텍스트란-매개 트랜스펙션, 인산칼륨 침전, 폴리브렌-매개 트랜스펙션, 원형질융합, 일렉트로포레이션, 리포솜에서의 폴리뉴클레오티드 캡슐화 및 핵으로의 DNA 의 직접적인 미량주사.

[0171] 본 발명의 방법의 특정 실시형태에 따라서, 본 발명의 IL-1R1 항체의 중쇄 불변 영역, 중쇄 가변 영역, 경쇄 불변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 코드하는 핵산 분자를 표준 결합 기술(standard ligation techniques)을 사용하여 적절한 발현 벡터에 삽입하였다. 바람직한 실시형태에서, IL-1R1 중쇄 또는 경쇄 불변 영역을 적절한 가변 영역의 C-말단에 추가하고 발현 벡터에 결합하였다. 일반적으로 사용된 특정 숙주세포에서 기능적이도록 벡터를 선택하였다[즉, 벡터는 유전자의 증폭 및/또는 유전자의 발현과 같은 숙주세포 조직(host cell machinery)과 양립할 수 있다]. 발현 벡터에 대한 리뷰는 Goeddel(ed.), 1990, Meth. Enzymol. Vol. 185, Academic Press. N.Y 를 참조하라.

[0172] 일반적으로, 모든 숙주세포에 사용된 발현 벡터는 플라스미드 유지를 위한 서열 및 외인성 뉴클레오티드 서열의 클로닝 및 발현을 위한 서열을 포함할 것이다. 특정 실시형태에서 전체적으로 "플래깅 서열" 로 언급된 이러한 서열은 다음과 같은 하나 또는 그 이상의 뉴클레오티드 서열을 일반적으로 포함할 것이다: 프로모터, 하나 또는 그 이상의 인헨서 서열, 복제 기원(origin of replication), 전사 종결 서열, 공여체 및 수용체 스플라이스 부위를 포함하는 완전 인트론 서열, 폴리펩티드 분비를 위한 선도 서열을 코드하는 서열, 리포솜 결합 부위, 폴리아데닐화 서열, 발현될 폴리펩티드를 코드하는 핵산을 삽입하기 위한 폴리링커 영역 및 선택가능한 마커 요소. 이러한 각각의 서열은 하기에 논하였다.

[0173] 임의적으로, 벡터는 "표식"-코딩 서열(즉, IL-1R1 폴리펩티드 코딩 서열의 5' 또는 3' 말단에 위치하는 올리고뉴클레오티드 분자)을 포함한다; 올리고뉴클레오티드 서열은 폴리His(헥사His 와 같은) 또는 FLAG, HA(헤마글루티닌 인플루엔자 바이러스), 또는 상업적으로 입수가능한 항체에 존재하는 myc 와 같은 다른 표식을 코드한다. 이 표식은 폴리펩티드의 발현에 따라 폴리펩티드에 일반적으로 융합하며 친화성 정제 또는 숙주세포로부터 IL-1R1 항체의 검출 수단으로 사용할 수 있다. 친화성 정제는 예를 들어 친화성 매트릭스로서 표식에 대한 항체를 사용한 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 수행할 수 있다. 임의적으로, 절단을 위한 특정 펩티다제를 사용하는 것과 같은 여러가지 수단에 의해 정제된 IL-1R1 폴리펩티드로부터 표식을 제거할 수 있다.

[0174] 플래깅 서열은 동종(즉, 숙주세포로 같은 종 및/또는 같은 계통으로 부터), 이종(즉, 숙주세포 이외의 종 또는 계통으로부터), 하이브리드[즉, 하나 이상의 원(source)으로부터의 플래깅 서열의 조합], 합성 또는 천연이다. 플래깅 서열이 숙주세포 조직에서 기능적이며 활성화 될 수 있는 경우에, 플래깅 서열의 원은 모든 원핵 생물 또는 진핵 생물, 모든 척추동물 또는 무척추동물, 또는 모든 식물로부터 획득할 수 있다.

[0175] 본 발명의 벡터에서 유용한 플래깅 서열은 본 분야에서 잘 알려진 여러가지 방법에 의해 수득할 수 있다. 일반적으로, 본원에서 유용한 플래깅 서열은 맵핑 및/또는 제한 엔도뉴클레아제 절단에 의해 확인할 수 있으며, 따라서 적절한 제한 엔도뉴클레아제를 사용하여 적절한 조직으로부터 분리할 수 있다. 몇몇 경우에서, 플래깅 서열의 완전한 뉴클레오티드 서열은 잘 알려져 있다. 여기에서, 플래깅 서열은 핵산 합성 또는 클로닝을 위한 본원에 기재된 방법을 사용

하여 합성할 수 있다.

[0176] 플랭킹 서열의 전체 또는 부분만이 알려진 경우, 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 사용하고/사용하거나 같은 종 또는 다른 종으로부터의 올리고뉴클레오타이드 및/또는 플랭킹 서열 단편과 같은 적절한 프로브를 사용하는 게놈 라이브러리를 스크리닝하여 수득할 수 있다. 플랭킹 서열이 알려지지 않은 경우에는, 플랭킹 서열을 포함하는 DNA의 단편을 예를 들어, 코딩 서열 또는 다른 유전자 또는 유전자들을 포함하는 DNA의 큰 조각으로부터 분리할 수 있다. 적절한 DNA 단편을 생산하기 위해 제한 엔도뉴클레아제로 절단시킨 후 아가로스겔 정제, Qiagen® 컬럼 크로마토그래피(캘리포니아에 소재하는 채스워스에서 입수) 또는 본 분야의 숙련자에게 잘 알려진 다른 방법을 사용하여 분리하였다. 이러한 방법에 사용되는 적절한 효소의 선택은 본 분야의 숙련자에 의해 명백할 것이다.

[0177] 복제 기원은 일반적으로 상업적으로 입수가능한 원핵 발현 벡터의 부분이며, 개시점(origin)은 숙주 세포에서 벡터의 증폭에 도움을 준다. 만약 선택된 벡터가 복제 기원을 포함하지 않는다면, 알려진 서열을 근거로 화학적으로 합성할 수 있으며 벡터에 결합시킬 수 있다. 예를 들어, 플라스미드 pBR322(매사추세츠 비벌리에 소재하는 뉴 잉글랜드 바이오랩스에서 입수)로부터의 복제 기원은 대부분의 그램-음성균에서의 개시점으로 적절하고 여러가지 바이러스 개시점[예를 들어, SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, 수포성 구내염 바이러스(vesicular stomatitis virus, VSV) 또는 HPV 또는 BPV와 같은 유두종 바이러스]은 포유동물의 세포에서 클로닝 벡터로 유용하다. 일반적으로, 복제 부분의 개시점은 포유동물의 발현 벡터를 필요로 하지 않는다(예를 들어, SV40 개시점은 바이러스 초기 프로모터를 포함하기 때문에 자주 사용한다).

[0178] 전사 말단 서열은 폴리펩티드 코딩 영역의 말단 3'에 일반적으로 위치하며 전사를 종결하는 역할을 한다. 일반적으로, 원핵세포에서 전사 종결 서열은 다음에 G-C가 풍부한 단편에 이어진 폴리-T 서열이다. 이러한 서열은 라이브러리로부터 쉽게 클로닝하거나 심지어 벡터의 부분을 상업적으로 입수할 수 있는 반면에, 본원에 기재된 방법과 같은 핵산 합성 방법을 사용하여 쉽게 합성할 수 있다.

[0179] 선택가능한 마커 유전자는 선택 배양 배지에서 숙주세포 성장 및 생존을 위한 필수적인 단백질을 코드한다. 일반적인 선택 마커 유전자는 다음과 같은 단백질을 코드한다: (a) 원핵의 숙주 세포에서 항생물질 또는 다른 독소(예를 들어, 암피실린, 테트라사이클린 또는 카나마이신)에 대한 내성을 갖는 단백질; (b) 세포의 영양소요구성 결핍을 보충하는 단백질; 또는 (c) 완전 배지 또는 특정 배지로부터 입수할 수 없는 중요한 영양소를 공급하는 단백질. 바람직한 선택가능한 마커는 카나마이신 내성 유전자, 암피실린 내성 유전자 및 테트라사이클린 내성 유전자이다. 네오마이신 내성 유전자는 또한 원핵 숙주세포 및 진핵 숙주세포 둘 다에서 선택하여 사용할 수 있다.

[0180] 다른 선택가능한 유전자는 발현될 유전자를 증폭시키는데 사용할 수 있다. 증폭은 세포 생존 또는 성장에서 중요한 단백질의 생산이 보다 많이 요구되는 유전자가 일반적으로 재조합 세포에서 계속적으로 발생되도록 염색체 내에 직렬로 반복되도록 하는 과정이다. 포유동물의 세포에서 적절한 선택가능한 마커의 예는 디히드로폴레이트 환원효소(DHFR) 및 프로모터결핍 티미딘 키나아제를 포함한다. 포유동물의 세포 형질전환체를 선택 압력 하에 위치시켰으며 여기에서 형질전환체는 벡터에 존재하는 선택가능한 유전자에 의해서만 유일하게 적응하여 생존하였다. 선택 압력은 배지에서 선별 제제의 농도를 계속적으로 증가시키는 조건 하에서 형질전환된 세포를 배양하고 이로 인해, 선택가능한 유전자 및 벡터를 포함하는 IL-1R1 폴리펩티드와 같은 다른 유전자를 코드하는 DNA 둘 다의 증폭이 유도됨에 의한 것이다. 결과적으로, IL-1R1 폴리펩티드

와 같은 증가된 정량의 폴리펩티드를 증폭된 DNA 로부터 합성하였다.

- [0181] 리보솜-결합 부위는 mRNA 의 번역 개시에 일반적으로 필수적이며 샤인-달가르노 서열(원핵생물) 또는 코작 서열(진핵생물)에 의해 특징지어진다. 이 요소는 일반적으로 프로모터에 대한 3' 및 발현될 폴리펩티드의 코딩 서열에 대한 5' 에 위치한다.
- [0182] 몇몇 경우에서, 글리코실화는 진핵의 숙주세포 발현 체계에서 필요로 하며, 이는 글리코실화 또는 수득물을 증가시키기 위해 다양한 예비서열(pre- 또는 prosequences)을 조작할 수 있다. 예를 들어, 글리코실화에 영향을 미칠 수 있는 특정 단일 펩티드의 펩티다제 절단 부위를 바꾸거나 예비서열을 첨가할 수 있다. 최종 단백질 산물은 1 위치(성숙한 단백질의 첫 번째 아미노산)에서 전적으로 제거되지 않는 발현되기 쉬운 하나 또는 그 이상의 부가적인 아미노산을 가질 수 있다. 예를 들어, 최종의 단백질 산물은 아미노-말단에 부착된 펩티다제 절단 부위에서의 하나 또는 두 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 선택적으로, 성숙한 폴리펩티드 내의 이러한 영역에서 효소를 사용하여 절단하는 경우에, 몇몇 효소 절단 부위의 사용은 원하는 폴리펩티드의 절두된 형태를 야기한다.
- [0183] 본 발명의 발현 및 클로닝 벡터는 일반적으로 숙주 생물체에 의해 인지 가능하며 항-IL-1R1 항체를 코딩하는 분자와 결합할 수 있는 프로모터를 포함한다. 프로모터는 구조 유전자의 전사를 조절하는 구조 유전자의 개시 코돈의 상류(즉, 5')에 위치하는 전사되지 않는 서열(일반적으로 약 100 bp 내지 1000 bp 내)이다. 프로모터는 일반적으로 두 가지의 클래스의 하나에 포함된다: 유도 프로모터 및 구성 프로모터. 유도 프로모터는 영양소의 존재 또는 부재, 또는 온도의 변화와 같은 배양 조건에서의 변화에 반응하여 유도 프로모터의 조절 하에 DNA 로부터의 증가된 수준의 전사를 개시한다. 반면에, 구성 프로모터는 유전자 발현에서 조절이 없거나 거의 없는, 지속적인 유전자 산물 생성을 개시한다. 다양한 잠재적인 숙주세포에 의해 인지되는 많은 프로모터는 잘 알려져 있다. 적절한 프로모터는 제한효소 절단에 의해 원 DNA 로부터 프로모터를 제거하고 벡터 내로 요구되는 프로모터 서열을 삽입하여 본 발명의 항-IL-1R1 항체를 포함하는 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 DNA 에 결합시킬 수 있다.
- [0184] 효모 숙주에서 사용하는 적절한 프로모터는 본 분야에서 또한 잘 알려져 있다. 효모 인핸서는 효모 프로모터와 함께 유리하게 사용할 수 있다. 포유동물의 숙주세포에 사용하기 위한 적절한 프로모터는 잘 알려져 있으며 다음과 같은 바이러스의 게놈으로부터 수득한 것을 포함하지만 이로 제한하지 않는다: 폴리오마 바이러스, 수두 바이러스, 아데노바이러스(아데노바이러스 2 와 같은), 소의 유두종 바이러스, 닭의 육종 바이러스, 시토메갈로 바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 가장 바람직하게 시미안 바이러스 40(SV 40). 다른 적절한 포유동물의 프로모터는 이종의 포유동물의 프로모터(예를 들어, 열쇼크 프로모터 및 액틴 프로모터)를 포함한다.
- [0185] 추가적인 프로모터는 다음을 포함하지만 이로 제한하지 않는다: SV 40 초기 프로모터 영역(Bernoist 및 Chambon, 1981, Nature 290:304-10); CMV 프로모터; 라우스 육종 바이러스의 3' 긴 말단 반복에 포함되는 프로모터(Yamamoto 등의, 1980, Cell 22:787-97); 헤르페스 티미딘 키나아제 프로모터(Wagner 등의, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1444-45); 금속티오닌 유전자의 조절 서열(Brinster 등의, 1982, Nature 296:39-42); 베타-락타마아제 프로모터와 같은 원핵의 발현 벡터(Villa-Kamaroff 등의, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-31); 또는 tac 프로모터(DeBoer 등의, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25). 또한 조직 특이성을 갖으며 트랜스제닉 동물에서 사용할 수 있는 다음과 같은 동물 전사 조절 영역을 갖는다: 췌장 포상세포에서 활성인 엘라스타제 I 유전자 조절영역(Swift 등의, 1984, Cell 38:639-46; Ornitz 등의, 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409(1986); MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); 췌장 베타 세포에서 활성인 인슐린 유전자 조절 영역(Hanahan, 1985, Nature 315:115-22); 림프계 세포에서 활성인 면역글로블린 유전자

조절 영역(Grosschedl 등의, 1984, Cell 38:647-58; Adames 등의, 1985, Nature 318:533-38; Alexander 등의, 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-44); 고환세포, 유방세포, 림프계 세포 및 비만세포에서 활성인 마우스 유방의 종양 바이러스 조절 영역(Leder 등의, 1986, Cell 45:485-95); 간에서 활성인 알부민 유전자 조절 영역(Pinkert 등의, 1987, Genes and Devel. 1:268-76); 간에서 활성인 α -태아 단백질 유전자 조절 영역(Krumlauf 등의, 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-48; Hammer 등의, 1987, Science 235:53-58); 간에서 활성인 α 1-항트립신 유전자 조절 영역(Kelsey 등의, 1987, Genes and Devel 1:161-71); 골수세포에서 활성인 β -글로빈 유전자 조절 영역(Mogram 등의, 1985, Nature 315:338-40 ; Kollias 등의, 1986, Cell 46:89-94); 뇌에서의 회돌기교세포에서 활성인 미엘린 염기성 단백질 유전자 조절 영역(Readhead 등의, 1987, Cell 48:703-12); 골격근에서 활성인 미오신 경쇄-2 유전자 조절 영역(Sani, 1985, Nature 314:283-86); 및 시상하부에서 활성인 성선 자극 호르몬 유리 유전자 조절 영역(Mason 등의, 1986, Science 234:1372-78).

- [0186] 고등 진핵생물에 의한 본 발명의 항-IL-1R1 항체를 포함하는 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 DNA의 전사를 증가시키기 위해 벡터에 인핸서 서열을 삽입할 수 있다. 인핸서는 약 10-300 bp 길이의 DNA의 시스-작용 요소이며 전사를 증가시키기 위해서 프로모터 상에서 작용한다. 인핸서는 상대적으로 방향-비의존성 및 위치-비의존성이다. 인핸서는 전사 단위의 5' 및 3'에서 발견된다. 포유동물의 유전자(즉, 글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -태아-단백질 및 인슐린)로부터 입수가 가능한 몇몇의 인핸서 서열은 잘 알려져 있다. 그러나, 일반적으로 바이러스로부터의 인핸서를 사용한다. 본 분야에서 잘 알려진 SV 40 인핸서, 시토크로마티드 초기 프로모터 인핸서, 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서는 진핵생물의 프로모터의 활성화를 위한 바람직한 촉진 요소이다. 인핸서는 핵산 분자의 위치 5' 또는 3'에서 벡터로 스플라이스시킬 수 있으며 이는 일반적으로 프로모터의 5' 부위에 위치한다.
- [0187] 본 발명의 발현 벡터를 상업적으로 입수가 가능한 벡터와 같은 개시 벡터로부터 구성할 수 있다. 이러한 벡터는 바람직한 플랭킹 서열의 모두를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 본원에 기재된 하나 또는 그 이상의 플랭킹 서열이 벡터에 존재하지 않는 경우에, 이를 개별적으로 수득하여 벡터에 결합시킬 수 있다. 각각의 플랭킹 서열의 수득을 위해 사용된 방법은 본 분야의 숙련자에 의해 잘 알려져 있다.
- [0188] 벡터를 구성하고 항-IL-1R1 항체를 포함하는 경쇄나 중쇄 또는 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 핵산 분자를 벡터의 적절한 부위에 삽입한 후에, 완성된 벡터를 증폭 및/또는 폴리펩티드 발현을 위한 적절한 숙주세포에 삽입할 수 있다. 선택된 숙주세포로의 항-IL-1R1 항체를 위한 발현 벡터의 형질 전환을 다음과 같은 잘 알려진 방법에 의해 수행할 수 있다: 트랜스펙션, 주입, 인산칼슘 공동-침전, 일렉트로포레이션, 미량주사, 리포펙션(lipofection), DEAE-텍스트란-매개 트랜스펙션 또는 다른 알려진 기술. 선택된 방법은 사용될 숙주의 유형에 따라 다르다. 이러한 방법 및 다른 적절한 방법은 본 분야의 숙련자들에게 잘 알려져 있으며 예를 들어, Sambrook 등의 상기 문헌에 설명되어 있다.
- [0189] 적절한 조건 하에서 배양하였을 때, 숙주세포가 항-IL-1R1 항체를 합성하였으며, 숙주세포가 이 항체를 배지로 분비한다면 배양 배지로부터 수집할 수 있으며, 또는 이 항체를 분비하지 않는다면 이를 생산하는 숙주세포로부터 직접적으로 수득할 수 있다. 적절한 숙주세포의 선택은 요구되는 발현 수준, 활성을 위해 바람직하거나 필수적인 폴리펩티드 변형(예를 들어, 글리코실화 또는 인산화) 및 생물학적인 활성 분자 내로의 접합의 용이함과 같은 여러가지 요인에 따라 다를 것이다.
- [0190] 발현을 위한 숙주로서의 포유동물의 세포주는 본 분야에서 잘 알려져 있으며, 다음을 포함하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection, A.T.C.C.)으로부터 입수가 가능한 많은 불사화

된 세포주를 포함하지만 이로 제한되지 않는다 : 차이나이즈 햄스터 난소(CHO) 세포, HeLa 세포, 아기 햄스터 신장(BHK) 세포, 원숭이 신장 세포(COS), 인체 간세포성의 암종 세포(예를 들어, Hep G2) 및 다른 많은 세포주. 특정 실시형태에서, 세포주가 높은 발현 수준을 갖고 구성적인 IL-1R1 결합 특성을 수반하는 항체를 생산하는지에 의해 세포주를 선택할 수 있다. 또다른 실시형태에서, 항체를 생산할 수 없으나 이종의 항체를 만들고 생산할 수 있는 능력을 가진 B 세포 계통(예를 들어, 마우스 골수종 세포주 NS0 및 SP2/0)으로부터의 세포주를 선택할 수 있다.

[0191] 본 발명의 항체는 생물학적 시료에서 IL-1R1 탐색에 유용하며 IL-1R1 단백질을 생산하는 세포 또는 조직을 확인하는데 유용하다. IL-1R1 에 결합하며 다른 결합 화합물과의 상호 작용을 막는 상기 항체는 IL-1 매개 질환을 조절하는 치료학적 용도를 갖는다. 바람직한 실시형태에서, IL-1R1 의 항체는 IL-1 β 또는 IL-1 α 에 결합하는 IL-1R1 을 차단할 수 있으며 이는 IL-1 신호 전달 캐스케이드의 파괴를 야기할 수 있다.

[0192] IL-1R1 에 특이적으로 결합하는 본 발명의 항체는 하기에 기재된 IL-1 매개 질환의 치료에 유용할 수 있다. 상기 항체는 IL-1R1 결합을 탐색하기 위한 결합 검정에 유용하며 IL-1 β 및 IL-1R 보조 단백질(IL-1RacP) 또는 IL-1 α 및 IL-1RacP 와의 복합체 형성으로부터 IL-1R1 을 저해하는 능력을 가질 수 있다.

[0193] 특정 실시형태에서, 본 발명은 IL-1 매개 염증반응 또는 IL-1 매개 면역조절 반응과 관련된 질환을 치료하기 위한 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 IL-1 에 의해 매개되는 염증 또는 면역조절 질환을 앓고있는 환자에게 본 발명의 항-IL1R1 항체를 투여하는 방법을 포함한다. 본원에서 사용한 용어 "병", "질병", "의료 증상" 또는 "비정상 증상" 은 용어 "의료 장애" 와 호환성이 있게 사용할 수 있다.

[0194] 특정 실시형태에서, 본 발명의 방법은 이의 세포 표면 수용체(IL-1R1)에 IL-1 의 결합을 예방하는 본 발명의 항-IL-1R1 항체를 환자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0195] IL-1 의 비정상 또는 과도한 발현 또는 비정상이거나 과도한 IL-1 의 신호전달에 의해 특징되는 질환을 치료하기 위해, 질환의 심화정도를 반영하는 적어도 하나의 지표에서 지속적인 호전을 유도하기 위해 본 발명의 IL-1R 유형 I 항체를 포함하는 분자를 충분한 시간 동안 충분한 양을 환자에게 투여하였다. 만약 1 주 내지 4 주로 나누어진 적어도 두 경우에서 환자가 호전된다면, 호전은 "지속적인" 것으로 간주된다. 호전의 정도는 징후 또는 증상을 토대로 결정되며 또한 투여한 환자에게 삶의 질에 대한 설문지와 같은 설문지를 사용할 수 있다.

[0196] 환자의 질병의 범위를 반영하는 다양한 지표는 치료의 양 및 시간이 충분한지를 결정하기 위해 평가할 수 있다. 선택된 지표에 대한 기저선 값은 항체의 첫 번째 투여량을 투여하기 전에 환자의 진찰에 의해 결정된다. 바람직하게, 기저선 검사는 첫 번째 투여량 투여의 약 60 일 내에 이루어진다. 만약 IL-1R 항체를 외상의 손상(외상의 무릎 손상, 뇌졸중, 머리 손상 등)과 같은 급성 증상을 치료하기 위해 투여한다면, 손상 또는 사건이 일어난 후에 가능한 빨리 첫 번째 투여량을 투여한다.

[0197] 호전은 선택된 지표의 기저선을 초과한 호전이 명시될 때까지 항체의 반복적인 투여에 의해 유도된다. 만성 증상 치료에서, 호전의 정도를 적어도 한 달 또는 그 이상(예를 들어, 한 달, 두 달 또는 세 달 또는 더 길게 또는 무한정으로)의 기간 동안 약물을 반복적으로 투여하여 얻을 수 있다. 1 주 내지 6 주의 기간 또는 심지어 한 번의 투여는 급성 증상을 치료하는

데 충분하다.

[0198] 치료 후 환자의 질병의 범위가 하나 또는 그 이상의 지표에 따라 증진된 것처럼 보일 수 있을지라도, 치료를 동일 수준에서 무한정으로 계속할 수 있거나 투여량 또는 횟수를 감소시켜 계속 치료할 수 있다. 한번 치료를 감소시키거나 중지하였을 때, 차후에 증상이 다시 나타났다면 치료를 본래의 수준에서 다시 시작해야 한다.

[0199] 효과적인 투여 경로는 치료학적으로 항체를 투여하기 위해 사용할 수 있다. 항체를 환과 주사 또는 연속 주입에 의해 관절내, 정맥내, 근육내, 병변내, 복강내, 두개내(intracranial)의 경로, 흡입법 또는 피하의 경로를 통해 주사할 수 있다. 예를 들어, 폐 질환은 비강내 및 흡입 방법을 사용할 수 있다. 투여의 다른 적절한 수단은 삽입물, 에어로졸 흡입, 점안제, 경구 제제(환제, 시럽, 함당정제 또는 츄잉검) 및 국소 제제(로션, 젤, 스프레이, 연고)의 서방성 방출 또는 다른 적절한 기술을 포함한다. 흡입에 의한 투여는 폐 질환과 관련된 질환을 치료할 때 특히 이롭다.

[0200] 본 발명의 한 실시형태에서, 본 발명의 항-IL-1R1 항체를 한 달에 한 번 투여할 수 있다. 다른 실시형태에서, 항체를 본원에 기재된 다양한 질환을 치료하기 위해 2 주에 한 번 또는 매주 한 번 투여하였다. 다른 실시형태에서, 항체는 매 주에 적어도 2 번 투여하며 또다른 실시형태에서, 매일 적어도 한 번 투여하였다. 성인 환자는 18 세 이상의 환자이다. 주사할 경우, 성인 투여량의 유효량은 1-200 mg/m² 또는 1-40 mg/m² 또는 약 5-25 mg/m²의 범위에 있다. 선택적으로, 2-400 mg/투여량, 2-100 mg/투여량 또는 약 10-80 mg/투여량의 범위로 투여할 수 있다. 매 주 한 번 이상 투여하는 경우, 전형적인 투여량 범위는 앞서 기재한 투여량 범위와 같거나 낮다. 본 발명의 한 실시형태에서, 하기에 기재한 다양한 지표는 80-100 mg/투여량 또는 선택적으로 80 mg/투여량의 IL-1 수용체 항체를 포함하는 용인가능한 제제의 투여에 의해 치료가능하다. 투여량을 반복적으로 투여하였다. 주사 이외의 투여 경로를 사용할 경우에, 투여량을 표준 의료 실습에 따라서 적절하게 조절할 수 있다. 예를 들어, 투여의 경로가 흡입이면, 투여량은 10 mg/투여량 내지 50 mg/투여량 범위의 투여량으로 매 주 1 번 내지 7 번 투여할 수 있다.

[0201] 바람직한 실시형태에서, 본 발명은 약학적으로 용인가능한 희석제, 담체, 가용화제, 유화제, 방부제 및/또는 아췌반트와 함께 본 발명의 항체의 치료학적 유효량을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 바람직하게, 용인가능한 제형화 물질은 수용자에게 사용된 투여량 및 농도에서 비독성이다. 바람직한 실시형태에서, 항-IL-1R1 항체의 치료학적 유효량을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0202] 특정 실시형태에서, 약학적 조성물은 예를 들어, 조성물의 pH, 삼투 물농도, 점도, 정화도, 색, 등장, 향, 살균, 안정성, 용해나 방출 속도, 흡착 또는 투과를 변형, 유지 또는 보존하기 위한 제형화 물질을 포함한다. 이러한 실시형태에서, 적합한 제형화 물질로는 다음을 포함하나 이에 한정되지는 않는다 : 아미노산(예를 들어, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신) ; 향미생물제 ; 항산화제(예를 들어, 아스코르브산, 황산나트륨 또는 황화수소나트륨) ; 완충용액(예를 들어, 붕산염, 중탄산염, 트리스-HCl, 시트르산염, 인산염 또는 다른 유기산) ; 부피 조절제(예를 들어, 만니톨 또는 글리신) ; 킬레이트제[예를 들어, 에틸렌디아민 테트라아세트산(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)] ; 착화제(예를 들어, 카페인, 폴리비닐피롤리돈, β-시클로덱스틴 또는 히드록시프로필-β-시클로덱스트린) ; 충전제 ; 단당류 ; 이당류 ; 및 그외 탄수화물(예를 들어, 글루코스, 만노스 또는 텍스트린) ; 단백질(예를 들어, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린) ; 색소, 향미제 및 희석제 ; 유화제 ; 친수성 중합체(예를 들어, 폴리비닐피롤리돈) ; 저 분자량 폴리펩티드 ; 염-형성 대이온(예를 들어, 나트륨) ; 방부제(예를 들어, 염화벤잘코늄, 벤조산, 살리실산, 치메로살, 페네틸알콜, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르브산 또는 과산화수소) ; 용매(예를 들어, 글리세

린, 프로필렌글리콜 또는 폴리에틸렌글리콜); 당알콜(예를 들어, 만니톨 또는 소르비톨); 현탁화제; 계면활성제 또는 습윤제(예를 들어, 플루로닉, PEG, 소르비탄에스테르, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80 과 같은 폴리소르베이트, 트리톤, 트로메타민, 레시틴, 콜레스테롤 및 킬옥사팔); 안정성 증강제(예를 들어, 수크로스 또는 소르비톨); 장도 증강제(예를 들어, 알칼리 금속 할로겐 화합물, 바람직하게, 염화나트륨, 염화칼륨, 만니톨 소르비톨); 수송 부형제; 희석제; 보형약; 및/또는 약학적 아췌반트. 본원에서 참고문헌으로 인용한 맥 퍼블리싱 컴퍼니로부터 입수한 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, (A.R. Gennaro, ed.)1990 을 참조하라.

[0203] 특정 실시형태에서, 최적의 약학적 조성물은 예를 들어, 의도된 투여 경로, 수송 형식 및 요구되는 투여량에 따라 본 분야의 숙련자들에 의해 결정될 것이다. 예를 들어, 상기의 Remington's Pharmaceutical Sciences 을 참조하라. 특정 실시형태에서, 상기 조성물은 본 발명의 항체의 생체내 제거 속도, 생체내 방출 속도, 안정성 및 물리적 상태에 영향을 미친다.

[0204] 특정 실시형태에서, 약학적 조성물 내의 원발성 부형제 또는 담체는 자연 상태에서 수성이거나 비수성이다. 예를 들어, 적합한 부형제 또는 담체는 비경구적으로 투여하기 위한 조성물에 일반적으로 다른 물질을 보충하는 것이 가능한 주사용 물, 생리식염수 또는 인공 뇌척수액일 수 있다. 중성인 완충생리식염수 또는 혈청 알부민과 혼합된 생리식염수는 부형제의 부가적인 예이다. 바람직한 실시형태에서, 약학적 조성물은 약 pH 7.0-8.5 의 트리스 완충용액 또는 약 pH 4.0-5.5 의 아세트산염 완충용액을 포함하며, 이는 추가로 소르비톨 또는 적합한 이의 치환체를 포함한다. 본 발명의 특정 실시형태에 있어서, 항-IL-1R1 항체 조성물을 바람직한 순도를 갖는 선택 조성물과 최적의 제형화 제제를 혼합하여(상기 참고문헌으로 인용한 Remington's Pharmaceutical Sciences 을 참조) 동결건조된 케이크 또는 수용액 형태로 저장하기 위해 제조하였다. 더욱이, 특정 실시형태에서, 항-IL-1R1 항체 산물을 수크로스과 같은 적합한 보형제를 사용하여 동결건조물로서 제형화하였다.

[0205] 본 발명의 약학적 조성물을 비경구적 투여를 위해 선택할 수 있다. 조성물을 경구와 같은 소화관을 통한 수송이나 또는 흡입을 위해 선택하였다. 이러한 약학적으로 용인가능한 조성물의 제조는 본 분야의 기술에 속한다.

[0206] 제형화 성분은 바람직하게 투여 부위에 용인가능한 농도로 존재한다. 특정 실시형태에서, 생리학적 pH 또는 약간 낮은 pH, 일반적으로 약 pH 5 내지 약 pH 8 의 범위로 조성물을 유지하기 위해서 완충용액을 사용하였다.

[0207] 비경구적 투여를 의도할 경우, 본 발명에서 사용하는 치료학적 조성물은 약학적으로 용인가능한 부형제에 용해된 요구되는 항-IL-1R1 항체를 포함하는 피로겐이 없는 비경구적으로 용인가능한 수용액 형태를 제공한다. 비경구적 주사에 특히 적합한 부형제는 항-IL-1R1 항체를 멸균 등장액으로서 제형화하는 멸균증류수이며, 이는 적당하게 보존된다. 특정 실시형태에서, 제제는 데포제 주사를 통해 수송될 수 있는 조절방출 및 서방성 산물을 제공하는 주사가 가능한 미소립자, 생-부식(erodable) 입자, 고분자화합물(폴리락트산 및 폴리글리콜산), 비드 또는 리포솜과 같은 제제와 함께 요구되는 분자의 제형을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 히알루론산 또한 사용할 수 있으며, 이는 순환시 지속시간을 증가시키는 효과를 가진다. 특정 실시형태에서, 요구되는 항체 분자를 투입하기 위해 이식가능한 약물 수송장치를 사용할 수 있다.

[0208] 본 발명의 약학적 조성물을 흡입을 위해 제형화할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 항-IL-1R1 항체를 흡입을 위한 건조 분말로 제형화 할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 항-IL-1R1

항체 흡입 용액을 또한 에어로졸 수송을 위한 분사제로 제형화할 수 있다. 특정 실시형태에서, 용액을 분무할 수 있다. 따라서, 폐의 투여 및 제형화 방법은 본원에 참고문헌으로 인용된, 화학적으로 변형된 단백질의 폐 수송에 대해 기재한 국제 특허 공개 번호 제 WO 94/20069 호에 추가로 기재되어 있다.

[0209] 또한 제형을 경구적으로 투여할 수 있다. 이러한 방식으로 투여되는 항-IL-1R1 항체를 정제 및 캡슐과 같은 고체 약제학적 제형의 조제시에 일반적으로 사용되는 담체와 함께 또는 담체 없이 제형화할 수 있다. 특정 실시형태에서, 캡슐은 생체내이용효율이 최대화되고 예비-전신성의 (pre-systemic) 분해가 최소화되는 위장관 위치에서 제형의 유효 부분이 방출되도록 설계될 수 있다. 부가적인 제제를 항-IL-1R1 항체의 흡수를 용이하게 하기 위해 포함할 수 있다. 희석제, 향미료, 저융점 왁스, 식물성 오일, 윤활유, 현탁화제, 정제 방해제 및 결합제 또한 사용할 수 있다.

[0210] 본 발명의 약학적 조성물은 정제의 제조에 적절한 비-독성 부형제와의 혼합물에서 하나 또는 대부분의 항-IL-1R1 항체의 유효량을 포함하는 것을 바람직하게 제공한다. 정제를 멸균수 또는 다른 적절한 부형제에 용해시킴으로써, 용액을 단위 약제학적 제형으로 제조할 수 있다. 적절한 부형제는 다음을 포함하지만 이로 제한하지 않는다: 탄산칼슘, 탄산나트륨 또는 중탄산나트륨, 락토스 또는 인산칼슘과 같은 비활성 희석제; 또는 녹말, 겔라틴 또는 아카시아와 같은 결합제; 또는 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 또는 활석과 같은 윤활제.

[0211] 서방성 수송 제형에서의 항-IL-1R1 항체를 포함하는 제형을 포함하는 부가적인 약학적 조성물은 본 분야의 숙련자에게 명백할 것이다. 리포솜 담체, 생-부식 미세입자 또는 다공성 비드 및 데포제 주사와 같은 다른 다양한 서방성 수송 수단의 제형화 기술은 또한 본 분야의 숙련자에 의해 잘 알려져 있다. 약학적 조성물의 수송을 위한 다공성 고분자 미세입자의 서방성 방출에 대해 기재되어 있는, 본원의 참고문헌으로 기재되어 있는 국제 특허 공개 번호 제 W093/15722 호를 참조하라. 서방성-방출 제제는 형태가 있는 약품(예를 들어, 필름 또는 마이크로캡슐)의 형태에서 반투과성의 중합체 매트릭스를 포함할 수 있다. 서방성 방출 매트릭스는 다음을 포함할 수 있다: 폴리에스테르, 히드로겔, 폴리락티드(미국 특허 번호 제 3,773,919 호 및 유럽 특허 출원 번호 제 EP 058481 호에 기재되어 있다), L-글루탐산 및 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체 (Sidman 등의, 1983, *Biopolymers* 22:545-556), 폴리(2-히드록시에틸-메틸아크릴레이트)(Langer 등의, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 및 Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), 에틸렌 비닐 아세테이트(Langer 등의 상기 문헌) 또는 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산(유럽 특허 출원 공개 번호 제 EP 133,988 호). 서방성 방출 조성물은 또한 본 분야에서 알려진 여러가지 방법에 의해 제조될 수 있는 리포솜을 포함할 수 있다. 예를 들어 Eppstein 등의 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 82:3688-3692; 유럽 특허 출원 공개 번호 제 EP 036,676 호; 제 EP 088,046 호 및 제 EP 143,949 호를 참조하라.

[0212] 일반적으로 생체내로 투여하기 위해 사용되는 약학적 조성물은 일반적으로 멸균 제제로서 제공된다. 멸균 여과막을 통하여 여과시킴으로써 멸균할 수 있다. 조성물을 동결건조시킬 경우, 동결건조 및 재구성 전에 또는 후에 상기 방법을 이용하여 멸균 처리하였다. 비경구 투여용 조성물을 동결건조된 형태나 용제로 저장하였다. 일반적으로 비경구용 조성물을 멸균 접근 구멍(sterile access port)을 구비한 용기, 예를 들어 피하 주사바늘로 찔러넣을 수 있는 스톱퍼(stopper)를 구비한 바이알 또는 정맥내 용액백 내에 보관하였다.

[0213] 일단 약학적 조성물이 제형화되면, 용제, 현탁액, 겔, 에멀전, 고형제 또는 탈수소화되었거나 동결 건조된 분말의 형태로 멸균 바이알에 저장하였다. 이러한 제형을 사용하기 쉬운 형태로 저

장하거나 또는 투여하기 전에 재구성이 요구되는 형태(예를 들어, 동결건조됨)로 저장하였다.

[0214] 본 발명은 또한 단일-투여량 투여 단위를 제공하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 각각 건조된 단백질을 함유하는 1 차 용기 및 수성의 제형을 함유하는 2 차 용기 둘 다를 포함한다. 본 발명의 특정 실시형태에서, 키트는 단실 및 다실 프리필드 주사기[예를 들어, 액체 주사기 및 라이오주사기(lyosyringes)]를 제공한다.

[0215] 치료학적으로 이용되는 항-IL-1R1 항체를 함유한 약학적 조성물의 치료학적 유효량은 예를 들어, 치료 상황 및 대상에 좌우된다. 그러므로, 본 분야에 숙련자들은 치료에 적합한 투여량 수준이 부분적으로 수송 분자, 항-IL-1R1 항체가 사용되는 징후, 투여 경로와 크기(체중, 체표면적 또는 기관 크기) 및/또는 환자의 증상(연령 및 총체적인 건강 상태)에 따라 다양하다는 것을 인지할 것이다. 특정 실시형태에서, 임상적은 최적의 치료 효과를 얻기 위해 투여량을 적정하고 투여 경로를 변경할 수 있다. 일반적인 투여량의 범위는 상기 언급한 인자에 따라 약 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 최대 약 100 mg/kg 또는 그 이상이다. 바람직한 실시형태에 있어서, 투여량 범위는 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 100 mg/kg ; 보다 바람직하게 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 100 mg/kg ; 보다 더 바람직하게 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 100 mg/kg 이다.

[0216] 투여 횟수는 사용된 제형의 특정 항-IL-1R1 항체의 약물동력학 파라미터에 좌우될 것이다. 일반적으로, 임상적은 투여량이 바람직한 효과를 달성할 때까지 조성물을 투여하였다. 그러므로, 조성물을 단일 투여 또는 시간에 따라 두 번 또는 그 이상의 투여(원하는 분자의 동일양을 포함하거나 포함하지 않는) 또는 삽입 장치 또는 카테터를 통해 지속적으로 주입함으로써 투여하였다. 더욱이, 적합한 투여량의 정련은 본 분야의 숙련자에 의해 통상적으로 만들어지며 숙련자에 의해 행해지는 통상적인 일의 영역이다. 적합한 투여량을 적절한 투여-반응 데이터를 이용하여 확인하였다.

[0217] 약학적 조성물의 투여 경로는 예를 들어 다음을 포함하는 공지된 방법에 따른 것이다 : 경구 ; 정맥내, 복강내, 뇌내(뇌실질), 뇌실내, 근육내, 안내, 동맥내, 문맥내, 병변내 경로으로 주사 ; 서방성 시스템 ; 또는 삽입 장치를 이용한 주사. 특정 실시형태에서, 조성물을 농축액 주사하거나 연속적으로 주입 또는 삽입 장치로 투여할 수 있다.

[0218] 조성물을 요구되는 분자가 흡수되거나 또는 캡슐화된 멤브레인, 스폰지 또는 다른 적절한 물질의 삽입을 통하여 국소적으로 투여할 수 있다. 특정 실시형태에서, 삽입 장치를 사용할 경우, 장치를 적절한 조직 또는 기관 내로 삽입하였으며, 요구되는 분자를 확산, 지효성 농축액 또는 연속 투여함으로써 수송하였다.

[0219] 본 발명의 항-IL-1R1 항체 약학적 조성물을 탈체(ex vivo)로 사용하는 것 또한 바람직할 것이다. 이러한 예에서, 환자로부터 제거한 세포, 조직 또는 기관을 항-IL-1R1 항체 약학적 조성물에 노출시킨 후에 다시 환자에게 이식하였다.

[0220] 특히, 항-IL-1R1 항체를 본원에 기재되어 있는 방법을 사용하여 폴리펩티드 발현 및 분비를 위해 유전적으로 조작한 특정 세포를 이식하여 수송할 수 있다. 특정 실시형태에서, 이러한 세포는 동물 또는 인체 세포이며 자가 세포, 이종성 세포 또는 이종발생성 세포일 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포는 불사화될 수 있다. 다른 실시형태에서, 면역 반응의 기회를 줄이기 위해, 세포를 둘러싼 조직의 침윤을 피하기 위해 캡슐화할 수 있다. 추가적인 실시형태에서, 캡슐화된 물질은 일반적으로 단백질 산물을 방출하기 위한 생체적합적인, 반-투과성 고분자 엔

클로저(enclosures) 또는 멤브레인이지만 이는 환자의 면역 시스템 또는 주위의 조직으로부터 다른 유해한 요소에 의한 세포의 파괴를 방지할 수 있다.

[0221] 특정 실시형태에서, 본 발명은 같은 환자에게 투여되는 하나 또는 그 이상의 다른 약물과 함께 본 발명의 항-IL-1R1 항체 또는 약학적 조성물을 동시에 투여함을 추가로 포함하며, 각 약물은 약체의 적절한 양생법에 따라 투여되었다. 이는 예비치료, 동시 치료, 계속적인 치료 및 교체 양생법을 포함한다. 이러한 약물의 예는 다음을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다: 항바이러스 약물, 항생제, 진통제, 코르티코스테로이드, 염증성 사이토카인의 길항물질, 질환-변경 항-류마티스성의 약물(DMARDs) 및 비-스테로이드성 항-염증성 약물.

[0222] 다른 실시형태에서, 본 발명의 항-IL-1R1 항체 또는 약학적 조성물은 길항물질(예를 들어, RANKL, TGFβ, IFNγ, IL-6 또는 IL-8 및 TNF, 특히 TNFα)을 포함하는 다른 사이토카인 저해제와 혼합하여 투여할 수 있다. IL-6 과 혼합할 경우, 본 발명의 항체를 GABA_A 수용체 길항작용에 의해 유도되는 발작, EEG 발작성의 에피소드와 관련된 발작 및 간질 상태 동안에 일어나는 운동성 변연 발작의 재발을 방지하고 치료하기 위해 사용할 수 있다. IFN_γ 저해제와 혼합하는 경우, 본 발명의 항체는 특발성의 폐섬유증 및 낭성 섬유증을 치료하는데 유용하다. IL-1 수용체 항체 및 RANKL 저해제(예를 들어, RANKL 항체)의 혼합물은 다음을 포함하지만 이로 한정되지 않는 다양한 경우에서의 골파괴에 유용하다: 다양한 류마티스성 질환, 골다공증, 다발성 골수종 또는 골 퇴화를 일으키는 악성종양, 또는 골의 전이를 예방하는 항-종양 치료 또는 인공삽입물이 마모된 파편 또는 치주조직염과 관련된 골 파괴. 게다가, 본 발명의 항체를 다음과 같은 IL-17 저해제와 혼합하여 투여할 수 있다: IL-17 수용체(IL-17R:Fc)의 용해된 형태 또는 IL-17 항체 또는 IL-17R 항체, IL-18 결합 단백질, IL-18 수용체의 용해된 형태 및 IL-18 항체, IL-18 수용체에 대한 항체 또는 CD30-리간드 또는 CD4 에 대한 항체.

[0223] 본 발명은 추가로 TNF 저해제, 바람직하게 TNFR : Fc(ENBREL[®])과 혼합하여 본원에 기재된 질환을 치료하기 위한 본 발명의 항-IL1R1 항체 또는 약학적 조성물을 사용하는 방법을 포함하며, 상기 기재된 사이토카인 또는 사이토카인 저해제의 혼합물은 병용 치료에서 유효 제제이다. 예를 들어 본 발명에 따라서, 병용 치료 방법은 류마티스성 관절염, 발작, 천식, 건선 등을 치료하는데 사용할 수 있다.

[0224] 본원에 기재된 항-IL-1R1 항체 또는 약학적 조성물에 의해 유효하게 치료되는 증상은 다음과 같은 폐 질환을 포함하며, IL-1R의 항체 및 IL-4 저해제 및/또는 IL-13 저해제(예를 들어, IL-13 및 IL-4 활성을 저해하는 IL-4R 항체)를 병용하여 치료할 수 있다: 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환, 폐포 단백질증, 블레오미오신-유도 폐질환 및 섬유증, 방사성-유도 폐 섬유증, 낭성 섬유증, 폐에서의 콜라겐 축적 및 ARDS. 본원의 항체 및 본 발명의 약학적 조성물은 또한 다음과 같은 질환의 치료에 유용하다: 기관지-폐의 형성장애(BPD); 만성 폐쇄성 폐질환(예를 들어, 기종 및 만성 기관지염), 유아의 만성 섬유증 폐질환. 게다가, 본 발명의 화합물, 조성물 및 병용 치료는 석면증, 탄광부 진폐증, 규폐증 또는 장기간의 미세 입자 노출과 관련된 유사 증상을 포함하는 직업성 폐 질환을 치료하기 위해 사용하였다. 본 발명의 다른 양상에서, 화합물, 조성물 및 병용 치료는 다음과 같은 질환을 치료하는데 유용하다: 브론티오리터란스(bronchioliterans) 기질화 폐렴, 특발성 폐 섬유증 및 방사선-유도 폐 섬유증을 포함하는 폐 섬유증; 폐 사르코이드증; 및 알레르기 비염, 접촉 피부염, 아토피성 피부염 및 천식을 포함하는 알레르기.

[0225] 이러한 화합물은 다음을 포함하지만 이로 제한되지 않는 여러가지 피부 질환을 앓고 있는 환자를 치료하는데 유용하다: 포진성 피부염(투링 질환), 아토피성 피부염, 접촉 피부염, 만성 특발성 두드러기를 포함하는 두드러기 및 심상성 천포상 및 수포성 유전포상을 포함하는 자가 면역성 수포

질환. IL-1R 항체 및 IL-4 및/또는 IL-13 저해제의 혼합물로 치료가능한 다른 질환은 다음을 포함한다 : 중증근무력증(myesthenia gravis), 폐 사르코이드증을 포함하는 사르코이드증, 피부경화증, 반응성 관절염, 과잉 IgE 증후군, 다발성 경화증 및 특발성 과호산구증가 증후군. 혼합물을 알레르기 반응을 치료하기 위한 약제 및 알레르기 면역요법의 아주반트로서 사용하였다.

[0226] 본원에 기재된 IL-1 수용체 항체 및 약학적 조성물은 말라리아 및 주혈흡충병을 포함하는 원충 질병을 치료하는데 유용하며 나성 결정홍반 ; 세균 또는 바이러스성 뇌막염 ; 폐결핵을 포함하는 결핵 ; 인플루엔자 감염 및 감염성의 세포증가증을 포함하는 세균 또는 바이러스 감염의 이차성 폐렴을 치료하는데 유용하다.

[0227] 심장혈관계 질병 및 손상은 약학적 조성물 또는 항-IL1-R1 항체 둘 중 하나만 또는 다른 사이토카인 저해제와 혼합하여 치료가능하고/치료가능하거나 예방가능하다. 치료가능한 심장혈관계 질병은 다음을 포함한다 : 복부의 대동맥류, 급성 관상의 증후군, 동맥염을 포함하는 대동맥류 ; 대뇌동맥 폐색을 포함하는 혈관 폐색 ; 관상동맥 바이패스 수술의 합병증 ; 국소성 빈혈/재관류 손상 ; 죽상경화성 심장병을 포함하는 심장병 ; 만성 자가면역 심근염 및 바이러스성의 심근염을 포함하는 심근염 ; 만성 심부전, 울혈성 심부전, 심부전의 악액질을 포함하는 심부전 ; 심근경색증 ; 심장 수술 또는 경동맥 기구 혈관성형의 수술 후의 재발 협착증 및/또는 죽상경화증 ; 무증상 심근 허혈 ; 왼쪽 심실의 펌프 기능장애, 왼쪽 심실의 보조 장치의 이식후의 합병증 ; 레이노 현상 ; 혈전성 정맥염 ; 가와사키 맥관염을 포함하는 맥관염 ; 정맥폐색성 질환, 거세포성 동맥염, 베게너 육아종증 ; 심폐회로기 수술 후의 정신 혼란 및 쇠라인-헤노흐 자반.

[0228] 특정 실시형태에서, 본 발명의 항-IL-1R1 항체 및 약학적 조성물은 만성 전립선염/골반 동통 증후군 및 포진후 동통을 포함하는 만성 골반의 동통과 같은 만성 동통 증상을 치료하는데 또한 사용할 수 있다.

[0229] 유년기 발병 당뇨병(자가면역 당뇨병 및 인슐린-의존 유형 당뇨병을 포함함) 및 성숙기 발병 당뇨병(비-인슐린-의존 당뇨병 및 비만-매개 당뇨병을 포함함)를 포함하는 내분비계 질환을 본 발명의 항-IL-1R1 항체 또는 약학적 조성물로 또한 치료할 수 있다. 이러한 질환은 당뇨병성 망막병증, 당뇨병 환자의 신장 이식 거부반응, 비만-매개 인슐린 저항성과 같은 2 차 증상 관련된 당뇨병 및, 단백뇨(proteinurea) 및 고혈압과 관련된 신부전을 포함한다. 다른 내분비 질환은 이러한 화합물로 치료가능하며 내분비 질환으로는 다낭성 난소 질환, X-관련 부신백질 이영양증, 갑상성 기능저하증 및 하시모토 갑상선염(즉, 자가면역 갑상선염)을 포함하는 갑상선염, 정상 갑상선 환자 증후군을 포함하는 갑상선 세포 기능장애를 포함한다.

[0230] 본 발명의 항-IL-1R1 항체 또는 약학적 조성물만으로 또는 다른 치료학적 혼합물과 혼합하여 위장계의 증상을 치료가능하거나 예방가능하다. 이러한 증상은 복강의 질환, 크론 질병 ; 궤양성 대장염 ; 특발성 위마비 ; 만성 췌장염, 급성 췌장염을 포함하는 췌장염 ; 염증성 장 질병 및 위궤양 및 십이지장 궤양을 포함하는 궤양을 포함한다.

[0231] 비노생식기 계통의 질환은 또한 본원에 기재된 항-IL-1R1 항체 또는 약학적 조성물로 치료가능하거나 예방가능하다. 이러한 질환은 자가면역 사구체신염, 독소에 노출되어 발생된 사구체신염 또는 용혈 연쇄상구균 또는 다른 간염성 인자로 2 차 간염된 사구체신염을 포함하는 사구체신염을 포함한다. 또한 본 발명의 화합물, 조성물 및 치료학적 혼합물로 치료가능한 증상은 요독성 증후군, 환경 독소, 약물 또는 다른 원인과 관련된 요독성 증후군을 포함하는 임상적인 합병증(예를 들어, 신부전, 빈혈 및 비후형 심근병증)이 있다. 흡착 기능에서 변화를 유도하는 담낭벽의 염증을 일으키는 합병증은 본 발명의 항체로 치료가능하거나 예방가능하다. 이러한 합

병증은 담석증(담석) 및 총담관결석증(담관석) 및 담석증 및 총담관결석증의 재발이 있다. 본 발명의 화합물, 조성물 및 병용 치료에서 치료가능한 증상은 혈액투석의 합병증; 양성 전립선 비대증, 비세균성 전립선염 및 만성 전립선염을 포함하는 전립선 증상; 및 혈액투석의 합병증이 있다.

[0232] 또한 본원은 다양한 혈액학적 장애 및 종양 장애를 치료하기 위한 본 발명의 항-IL-1R1 항체, 조성물, 혼합 치료를 사용하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 상기에 기재된 항-IL-1R1 항체만 또는 사이토카인 저해제 또는 다른 활성 제제와 혼합하여 사용하여, 다음을 포함하는 다양한 형태의 암을 치료하기 위해 사용할 수 있다: 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 엡스타인-바르 양성-바이러스 비강인두의 암종, 교종, 대장, 위, 전립선 및 신장세포의 암, 자궁경부암, 난소 암 및 암-관련된 악액질, 피로, 무력감, 악액질 및 갈습과다혈증의 방종양성 증후군을 포함하는 폐암(SCLC 및 NSCLC). 육종 및 골육종을 포함하는 충실성 종양 및 선암종(예를 들어, 유방암) 및 편평 세포 암종과 같은 암종 또한 치료가능하다. 부가적으로 치료가능한 암은 식도암, 위암, 담낭 암종 및 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수성 백혈병, 만성 또는 급성 림프모구성 백혈병 및 모발성 세포 백혈병을 포함하는 백혈병을 포함한다. 다발성 골수종을 포함한 침습성의 전이가능성을 가진 다른 악성 종양은 화합물, 조성물 및 병용 치료로 치료할 수 있다.

[0233] 게다가, 본 발명의 항-IL-1R1 항체를 다음과 같은 질병을 치료하기 위해 사용할 수 있다: 만성 특발성 호중구감소증, 만성 질환의 빈혈을 포함하는 빈혈 및 혈액의 장애, 판코니 재생불량성 빈혈을 포함하는 재생불량성 빈혈; 특소성 혈소판 감소성 자반증(ITP); 혈전성 혈소판 감소성 자반증, 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndromes, 환상 철모구의 불응성 빈혈, 잉여 모세포에서 불응성 빈혈, 형질전환의 잉여 모세포에서 불응성 빈혈을 포함하는 불응성 빈혈); 골수섬유증/골수양화생; 및 겸상 적혈구 혈관폐색 발증.

[0234] 다음을 포함하는 다양한 림프세포 증식성 장애 또한 본 발명의 항-IL-1R1 항체로 치료가능하다: 자가면역 림프세포 증식성 증후군(ALPS), 만성 림프모구성 백혈병, 모발성 세포 백혈병, 만성 림프의 백혈병, 말초성의 T-세포 림프종, 작은 림프성의 림프성, 외투세포 림프종, 여포성 림프종, 버키트 림프종, 엡스타인-바르 양성-바이러스 T 세포 림프종, 조직구성 림프종, 호즈킨 병, 산재성 공격 림프종, 급성 림프성 백혈구, T_H 림프세포 증식성 질환, 피부의 B 세포 림프종, 피부의 T 세포 림프종 (즉, 미코시스 홍고이테스) 및 세자리 증후군.

[0235] 고오셔 병, 헌팅턴 병, 선형 IgA 질병 및 근위축증과 같은 유전성 증상을 본 발명의 항체로 치료할 수 있다.

[0236] 본 발명의 IL-1 수용체 항체 또는 약학적 조성물에 의해 치료할 수 있거나 예방할 수 있는 다른 증상은 뇌 손상에 따른 뇌경막하혈종을 포함하는 뇌 또는 척수 손상으로부터 질병을 포함한다. 이러한 치료와 관련하여, 본원의 조성물 및 혼합물은 두측 신경학적 손상의 예방 및 경추성 두통의 예방 및 치료에 적절하다. 기재된 조성물 및 혼합물은 추가로 뇌 방사선 조사와 관련된 신경계 부작용 치료에 적절하다.

[0237] 본 발명의 항-IL-1R1 항체 및 약학적 조성물은 또한 급성 알코올성 간염, 급성 약물-유도 간염 또는 바이러스성 간염, A 형, B 형 및 C 형 간염, 경화성 담관염, 간의 동모양 혈관 상피 및 알 수 없는 원인때문에 유발되는 간의 염증을 포함하는 간염과 같은 간의 증상을 치료하는데 유용하다.

- [0238] 청력 손실 관련 장애 및 비정상 IL-1 발현과 관련된 장애는 본 발명의 항-IL-1R1 항체 또는 약학적 조성물로 치료가능하다. 이러한 장애는 자가면역 과정의 결과로 인하여 달팽이관-관련 청력 손실(즉, 자가면역 청력 손실)을 포함한다. 또한 본 발명의 항-IL-1R1 항체 또는 약학적 조성물로 치료가능하거나 예방가능한 증상은 청력 손실과 관련된 메니에르 증후군 및 진주종 및 중이염이 있다.
- [0239] 골 및 관절의 비-관절염 장애 또한 본원에 기재된 항체로 치료할 수 있다. 이 질환은 골 손실을 일으키는 파골세포 장애를 포함하며 파골세포 장애는 다음을 포함하나 이로 한정되지는 않는다 : 폐경기후 골다공증을 포함하는 골다공증, 골관절염, 치근막염에 의한 치아동요(齒牙動搖) 또는 치아손실, 관절 교체 후 인공삽입물의 느슨해짐(loosening)(조직파편을 마멸시키기 위한 면역 반응에 일반적으로 관련됨). 후자의 증상은 또한 "정형외과적 삽입물 골용해(orthopedic implant osteolysis)" 라고도 불린다. 본 발명의 화합물, 조성물 및 복합 치료로 치료가능한 그외의 증상은 측두하악관절 기능부전(temporal mandibular joint dysfunction, TMJ)이다.
- [0240] 본 발명의 항-IL-1R1 항체 또는 약학적 조성물은 또한 성인 및 연소성 류마티스관절염 ; 공피증 ; 전신성 홍반성루푸스 ; 통풍 ; 골관절염 ; 류마티스성 다발성근육증 ; 강직성 척추염을 포함하는 혈청반응 검사음성 척추관절증(seronegative spondylarthropathy) 및 라이트병, 건선성 관절염 및 만성 라임 관절염을 포함하는 류마티스성 질환을 치료하는데 사용할 수 있다. 본 발명의 항체는 또한 피부근염, 봉입체 근염(inclusion body myositis), 다발성근염 및 림프관 평활근염(lymphangiomyomatosis)을 포함하는 수의근 및 그외 근육의 염증을 치료하는데 유용하다.
- [0241] 본 발명의 항체 및 약학적 조성물의 다른 용도는 알츠하이머병, 속발성 반응성 유전분증 ; 다운 증후군 ; 및 투석-관련 유전분증을 포함하는 다양한 증상을 특징으로 하는 원발성 유전증과 속발성 유전증의 치료 및/또는 예방이다. 또한, 본 발명의 항체 또는 약학적 조성물로 치료가능한 질환은 가족성 지중해열, 과면역글로불린 D 및 주기열 증후군 및 TNF-수용체 관련 주기 증후군(TNF-receptor associated periodic syndrome, TRAPS)을 포함하는 유전 주기열 증후군이다.
- [0242] 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체 또는 약학적 조성물은 또한 피부나 점막에 관련된 장애를 치료하는데 사용할 수 있다. 이러한 장애는 다리에병을 포함하는 극세포분리성 질환, 모낭각화증 및 심상성천포창을 포함한다. 본 발명의 항체로 치료할 수 있는 부가적인 피부 질환은 다음을 포함한다 : 여드름, 주사성좌창, 원형탈모증, 아프타성 구내염, 수포성 유천포창, 열상, 습진, 다형홍반 및 수포성 다형홍반(스티븐스-존슨 증후군)을 포함하는 홍반, 면역성 피부 질환, 편평태선, 선형 IgA 수포성 질환(유년기의 만성 수포성 피부병), 피부 탄력의 감소, 위궤양을 포함하는 점막 표면 궤양, 호중성 피부염(스위트 증후군), 피부근염, 모공성 홍색비강진, 건선, 괴저성 농피증, 다중심낭내조직구증 및 중독성 표피박리. 본 발명의 치료 및 복합 치료로 치료가능한 그외의 피부 관련 증상은 포진성 피부염을 포함한다.
- [0243] 본 발명의 항체 또는 약학적 조성물로 치료할 수 있는 추가적인 장애는 대숙주성 이식편병 및 심장, 간, 피부, 신장, 폐(폐 이식 기도 제거)와 같은 실질기관 이식 또는 골수 이식을 포함하는 그외 이식을 포함한다.
- [0244] 안구 장애 또한 본 발명의 항-IL-1R1 항체 또는 약학적 조성물로 치료가능하거나 예방가능하며 이 장애는 파열성 망막박리 및 흡연 및 황반변성에 관련된 염증성 안구 질환을 포함하는 염증성 안구 질환을 포함한다.

- [0245] 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 항체 또는 약학적 조성물은 여성 생식계에 영향을 미치는 장애를 치료하는데 유용하다. 이러한 장애의 예는 다음을 포함하나 이로 한정되지는 않는다 : 다수의 착상 실패(multiple implant failure)/불임증 ; 태아 손실 증후군(fetal loss syndrome) 또는 IV 배아 손실(자연유산) ; 자간전증 임신 또는 자간증 ; 자궁내막증, 만성 자궁경관염 및 조기분만.
- [0246] 게다가, 본 발명의 항체 또는 약학적 조성물은 좌골신경통, 노화에 따른 증상, 심한 약물 작용(예를 들어, IL-2 독성 또는 블레오마이신-유도 폐병증 및 섬유증)을 치료하고/치료하거나 예방하는데 유용하고 또는 심장역에서의 동종 적혈구 세포의 수혈 또는 그외 수술 전, 동안 또는 후의 염증 반응을 억제시키는데 유용하며 또는 외상성 무릎 손상과 같은 사지나 관절의 외상성 손상을 치료하는데 유용하다. 본 발명의 항-IL-1R1 항체 또는 약학적 조성물로 치료가능한 그외의 다양한 의학적 장애는 X 염색체 연관 정신박약을 포함하는 유전 결핍증에 관련된 다양한 자가면역 장애나 질환 뿐만 아니라 다음을 포함한다 : 다발성 경화증 ; 베세트 증후군 ; 쇼그렌 증후군 ; 자가면역성 용혈성 빈혈 ; β -탈라세미아 ; 근위축성 측삭경화증(루 게릭병) ; 파킨슨병 ; 및 알려지지 않은 이유로 발생하는 건조염.
- [0247] 게다가, 본 발명의 항-IL-1R1 항체 또는 약학적 조성물은 중추신경계(CNS)에서의 염증의 자극 동안 방출된 신경독 신경전달물질의 효과를 포함하는 중추신경계 손상을 치료하는데 유용하며 중추신경계 손상 부위의 글리아 반흔(glial scars)의 발달을 저해하고 예방하는데 유용하다. 간질 및 급발작의 치료와 관련하여, 급발작의 재발 횟수 및 심각성을 감소시키고 급발작의 해로운 효과의 심각성을 감소시키며 신경원 손실, 신경원 변성 및 급발작에 관련된 신경교증식증을 감소시킨다.
- [0248] 본 발명의 항체 또는 약학적 조성물의 부가적인 용도는 다음 질환을 치료함을 포함하나 이에 한정되지는 않는다 : 중증의 다발성 신경장애 및 근증(critical illness polyneuropathy and myopathy, CIPNM) 급성 다발성 신경장애 ; 신경성 식욕부진 ; 벨 마비 ; 만성 피로 증후군 ; 크로이츠펠트-야콥병을 포함하는 전염성 치매 ; 탈수초성 신경변증 ; 궤랑-마레 증후군 ; 척추 디스크 질환 ; 걸프전 증후군 ; 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경장애, 중증근무력증 ; 무증상 대뇌 국소빈혈 ; 수면발작 및 수면성 무호흡을 포함하는 수면 장애 ; 만성 신경원 변성 ; 및 대뇌 허혈성 질환을 포함하는 발작. 본 발명의 항체의 또다른 추가적인 용도는 다음을 포함한다 : 식욕부진 및/또는 식욕부진 증상, 복막염, 내독소혈증 및 패혈증, 육아종 형성, 열사병, 처그-스트라우스 증후군, 결핵 및 나병과 같은 급성 감염 후의 만성 염증, 전신성 경화증 및 비후성 반흔.
- [0249] 다른 실시형태에서, 본 발명의 IL-1R1 항체 중 하나의 아미노산 서열을 포함하는 아비딘 융합 단백질은 다양한 목적을 위해 구성될 수 있다. 예를 들어, 특히 표적 유전자 융합 파트너의 삽입을 위한 다중 클로닝 부위에 인접한 재조합 닭 아비딘을 코드하는 cDNA 서열을 함유하는 포유 동물 발현 벡터를 사용하여 아비딘 융합 단백질을 생성하였다. 벡터는 자연적으로 신호 서열을 함유하지 않는 분리된 융합 유전자 파트너의 분비를 가능하게 하기 위해 내인성 신호 서열을 갖는 아비딘 서열을 포함할 수 있다. 벡터에 의해 발현되는 융합 단백질은 융합 파트너의 N-말단 부분에 아비딘 단백질 표식을 갖는다. 본원에 기술된 융합 전략은 신호 전달 유전자 또는 핵 호르몬 수용체와 같이 일반적으로 세포내로 발현되는 단백질 분비 능력을 갖는다.
- [0250] 대안적으로, 벡터를 그것의 내인성 신호 서열 없이 아비딘을 코드하는데 사용할 수 있으며, 이는 융합 단백질 파트너의 C-말단 표식을 야기할 것이다. C-말단 아비딘 융합은 또한 융합 파트너의 내인성 신호 서열을 기저로 하는 단백질 분비를 가능하게 한다. 이러한 전략은 정확한 단백질 프로세싱 및 접힘을 제공하며 또는 목적 신호 서열의 유효성을 측정할 수 있게 한다. 부가적으로, 벡터는 아비딘 및 융합 파트너 서열 사이에 특히 효소-절단 기질로서

작용할 수 있는 아미노산 서열을 코드하는 짧은 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 이러한 효소-절단 서열은 정제 또는 단백질 방출 목적을 위해 아비딘으로부터 융합 파트너를 분리시킨다.

- [0251] 본 발명의 아비딘 융합 단백질은 예를 들어, 항체 스크리닝, 기능적 특성화(작동물질이나 길항물질, 중화제 등으로서의 항체의 유용성을 측정함), 에피토프 맵핑 또는 면역화 전략에 사용할 수 있다. 표적 단백질의 아비딘 융합은 또한 혈액, 뇨 또는 그의 조직 시료에서의 치료학적 항체의 존재여부에 대한 예비 임상 시료나 임상 환자 시료를 시험하기 위한 약리학, 효능 또는 그의 표준 검정 구성에 사용할 수 있다. 아비딘 융합 단백질 파트너를 전장 또는 절두된 서열, 분리된 특이 구조 도메인으로서 또는 다른 종으로부터의 융합 파트너와 다른 상동체와의 키메라 서열로서 제조할 수 있다.
- [0252] 아비딘 융합 단백질을 본원에 기재된 바와 같이 세포내로 유전자를 도입하는 모든 표준 방식을 사용하여 발현시킬 수 있다. 리포펙타민(캘리포니아 칼스바드에 소재하는 인비트로젠에서 입수)과 같은 지질 용액에 용해시킨 아비딘 융합 구성물을 세포 내로 트랜스펙션시켜, 예를 들어 293 세포 또는 CHO 세포에서 단백질을 발현시킬 수 있다.
- [0253] 조정 배지 및/또는 융합 단백질을 발현하는 세포로부터의 세포 용균액을 수집하여 비오틴-코팅 폴리스티렌 비드 또는 비오틴-코팅 ELISA 플레이트와 같은 검정 기질에 공급하였다. 조정 배지 및/또는 세포 용균액을 융합 단백질이 최상으로 발현되는 시점에서 수집하였다. 이 시점은 본 분야의 숙련자들에 의해 실험적으로 결정될 수 있으나 일반적으로 트랜스펙션 후 약 48 시간이다. 융합 단백질을 또한 세포막에서 분석할 수 있으며 또는 발현이나 알려진 리간드, 수용체 또는 항체에 결합시의 작용성을 세포내적으로 분석할 수 있다.
- [0254] 본 발명의 아비딘 융합 단백질은 비오틴-아비딘 상호작용을 이용한 공지된 또는 이미 특성화된 방법으로 분석할 수 있다. 이러한 방법은 유동세포 계측법 및 형광 화상진단/현미경법을 포함하나 이로 한정되지는 않는다. 예를 들어, 배지나 세포 용균액에서 발현된 아비딘 융합체를 비오틴-코팅 비드에 공급하고 형광 표식된 항-아비딘 항체로 염색하여 발현 수준을 나타낼 수 있다. 또한, 형광 항체는 다중비색 검정(multicolorimetric assay) 구성에서 특이 융합 단백질 파트너를 인식할 수 있도록 제공되었다. 부가적으로, 경쟁 검정에서 융합 단백질 파트너에 대해 특이적인 비표지 항체를 형광 표식된 항체와 동시에 공급할 수 있다.
- [0255] 특정 실시형태에서, 본 발명은 아비딘 융합 단백질을 이용하여 에피토프를 맵핑하는 방법을 제공한다. 본 발명의 에피토프 맵핑 방법의 예는 항-IL-1R1 항체에 대한 에피토프의 맵핑에 대해 하기에 제공되었다. 그러나, 본 분야의 숙련자는 이러한 방법이 모든 항체에 대한 에피토프의 맵핑에 쉽게 적용될 수 있으며 이는 IL-1R1 항체에 국한되지 않음을 인지할 것이다. 예를 들어, 닭 아비딘을 코드하는 cDNA(내인성 신호 서열을 가짐)를 3' 말단에서 FLAG-표식 서열에 융합된 목적 단백질(즉, 에피토프 결정이 요구되는 항체에 의해 인지되는 단백질)을 코드하는 cDNA의 5' 말단과 결합시킬 수 있다. FLAG-표식 융합 유전자를 통상적인 분자 기술을 사용하여 발현 벡터 내로 삽입시킬 수 있다. 특정 아미노산이 치환된(예를 들어, 다른 동물 종으로부터의 상응하는 아미노산 잔기로 치환) 돌연변이 아비딘-FLAG 표식 단백질을 통상적인 기술을 사용하여 생성할 수 있다. 돌연변이 단백질 및 야생형 단백질을 숙주세포 내에서 발현시킬 수 있으며 목적 항체와 야생형 또는 돌연변이 단백질의 결합을 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 웨스턴 블롯팅 분석 또는 비드-기저 결합 검정을 사용하여 검출할 수 있다. 그러므로, 에피토프는 목적 항체와의 결합이 파괴되는 돌연변이 단백질의 치환을 측정하여 정의될 수 있다.

실시예

[0256] 실행한 실험 및 수득한 결과를 포함하는 하기 실시예는 단지 설명하려는 목적을 위해 제공된 것이며 본 발명을 제한하려는 것은 아니다.

[0257] **실시예 1**

[0258] **인터루킨-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)에 대한 인체 모노클로날 항체의 생산**

[0259] 트랜스제닉 HuMab 마우스

[0260] IL-1 수용체 제 1 형(IL-1R1)에 대한 완전 인체 모노클로날 항체를 인체 항체 유전자를 발현하는 트랜스제닉 마우스의 HCo7 스트레인을 사용하여 제조하였다. 이러한 각각의 마우스 스트레인에서, 내인성 마우스 κ 경쇄 유전자를 Chen 등의 문헌(1993, EMBO J. 12:811-820)에 기재된 바와 같이 동형접합적으로 분열시켰으며 내인성 마우스 중쇄 유전자를 국제 특허 출원 공개 번호 제 WO 01/09187 호(참고문헌으로 인용됨)의 실시예 1 에 기재된 바와 같이 동형접합적으로 분열시켰다. 각각의 마우스 스트레인은 Fishwild 등의 문헌(1996, Nature Biotechnology 14:845-851)에 기재된 바와 같이 인체 κ 경쇄 트랜스유전자(transgene)인 KCo5 를 함유하고 있다. HCo7 스트레인은 미국 특허 번호 제 5,545,806 호 ; 제 5,625,825 호 ; 제 5,545,807 호(참고문헌으로 인용됨)에 기재된 바와 같이 HCo7 인체 중쇄 트랜스유전자를 함유하고 있다. 본원에서 HCo7 스트레인을 HuMab 마우스로서 언급하였다.

[0261] HuMab 면역화

[0262] IL-1R1 에 대한 완전 인체 모노클로날 항체를 생성하기 위해, HuMab 마우스를 항원인 곤충 또는 포유동물 세포(예를 들어, CHO 세포)로부터 유래된 정제된 재조합 IL-1R1(예를 들어, 인체 IL-1R1 의 서열은 진뱅크 기탁 번호 제 NM_000877 호로 기탁되어 있음)로 면역화시켰다. HuMab 마우스에 대한 일반적인 면역화 계획은 Lonberg 등의 문헌(1994, Nature 368:856-859 ; Fishwild 등의 상기 문헌 ; 및 국제 특허 출원 공개 번호 제 WO 98/24884 호, 이들 각각의 학설은 참고문헌으로 인용됨)에 기재되어 있다. 6-16 주된 마우스에게 항체를 첫 번째 주입하였다. IL-1R1 항원(예를 들어, IL-1R1 을 발현하는 트랜스펙션된 곤충 또는 포유동물 세포로부터 정제됨)의 정제된 재조합 제제(25-50 μ g)를 복강내(IP) 또는 피하(Sc)로 주입하여 HuMab 마우스를 면역화시켰다.

[0263] 완전 프로인트 아췌반트와 두 주사액에 용해된 항원을 사용하여 HuMab 트랜스제닉 마우스를 면역화시킨 후 2-4 주에 불완전 프로인트 아췌반트에 용해된 항원을 IP 주입하여 면역화시켰다(총 11 회까지의 면역화). 수십마리의 마우스를 각각의 항원으로 면역화시켰다. HCo7 스트레인의 총 149 마리의 마우스를 IL-1R1 로 면역화시켰다. 면역 반응을 안와후방의 출혈로 확인하였다.

[0264] IL-1R1 에 결합하는 항체를 생성하는 HuMab 마우스를 선별하기 위해, 면역화시킨 마우스의 혈청을 Fishwild 등의 상기 문헌에 기재된 바와 같이 ELISA 로 시험하였다. 간단히, 곤충 또는 포유동물 세포로부터의 정제된 재조합 IL-1R1 을 PBS 에 1-2 μ g/mL 로 용해시켜 마이크로플레이트에 50 μ L/웰로 코팅하고 4 $^{\circ}$ C 에서 밤새 항온한 다음, PBS/트윈(0.05 %)에 용해시킨 5 % 닭 혈청 200 μ L/웰로 차단시켰다. IL-1R1-면역화된 마우스의 혈장 희석액을 각 웰에 첨가하고 주위 온도에서 1-2 시간 동안 항온하였다. 플레이트를 PBS/트윈으로 세척한 후 고추냉이 퍼옥시다제(HRP)에 결합한 염소-항-인체 IgG Fc-특이 폴리클로날 시약과 함께 실온에서 1 시간 동안 항온하였다. 플레이트를 PBS/트윈으로 세척하고 고추냉이 퍼옥시다제(HRP)에 결합한 염소-항-인체 IgG Fc-특이 폴리클로날 시약과 함께 실온에서 1 시간 동안 항온하였다. 세척한 후, 플레이트를

ABTS 기질(미국 미주리 세인트 루이스에 소재하는 시그마 케미컬 컴퍼니에서 입수, 카탈로그 번호 제 A-1888 호, 0.22 mg/mL)로 발색시켰으며 415-495 의 OD 에서 분광광도측정으로 분석하였다. 항-IL-1R1 인체 면역글로불린의 충분한 역가를 갖는 마우스를 하기 기재된 바와 같이 모노클로날 항체를 생성하는데 사용하였다.

[0265] IL-1R1 에 대한 인체 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마의 생산

[0266] 마우스를 희생시키기 2 일 전에 정맥내로 항원을 추가항원자극하여 모노클로날 항체를 생성하였으며 희생시킨 후 비장을 제거하였다. 마우스 비세포를 HuMab 마우스로부터 분리하고 표준 프로토콜을 사용하여 PEG 와 함께 마우스 골수종 세포주에 융합시켰다. 일반적으로, 각각의 항원에 대한 20-30 개의 융합체를 생성하였다.

[0267] 간략하게, 면역화된 마우스로부터의 비립프구(Splenic lymphocyte)의 단일 세포 현탁액을 50 % PEG(시그마에서 입수)를 갖는 P3X63-Ag8.653 비분비 마우스 골수종 세포(ATCC 기탁 번호 제 CRL 1580 호) 또는 SP2/0 비분비 마우스 골수종 세포(ATCC 기탁 번호 제 CRL 1581 호) 중 ¼ 과 융합하였다. 세포를 넓은 바닥 마이크로플레이트에 약 1×10^5 /웰로 평판한 후 10 % 우태아혈청, 10 % P388D1(ATCC 기탁 번호 제 CRL TIB-63 호)-조정 배지, 5 mM 의 HEPES 를 보충한 DMEM(메디아테크에서 입수, 카탈로그 번호 제 CRL 10013 호, 고함량 글루코스, L-글루타민 및 피루브산나트륨)에 용해된 3-5 % 오리젠(origen, IGEN 에서 입수), 0.055 mM 2-머캅토에탄올, 50 mg/mL 의 젠타마이신 및 1x HAT(시그마에서 입수, 카탈로그 번호 제 CRLP-7185 호)를 함유하는 선별 배지에서 약 2 주간 항온하였다. 1-2 주 후, HAT 를 HT 로 교체한 배지에 세포를 배양하였다.

[0268] 결과적으로 생성된 하이브리도마를 항원-특이 항체의 생산에 대하여 스크리닝하였다. 각각의 웰을 인체 항-IL-1R1 모노클로날 IgG 항체에 대한 ELISA(상기 기재됨)로 스크리닝하였다. 하이브리도마를 대규모로 성장시킬 때, 배지를 일반적으로 10-14 일 후에 확인하였다. 항체-분비 하이브리도마를 재평판하고 다시 스크리닝하였으며 여전히 인체 IgG 에 대해 양성이라면, 항-IL-1R1 모노클로날 항체를 한계 희석으로 적어도 2 번 서브클로닝하였다. 안정한 서브클론을 특성화를 위한 조직배양 배지에 배양하여 소량의 항체를 생성하였다.

[0269] IL-1R1 에 결합하는 인체 모노클로날 항체의 선별

[0270] 상기 기재된 ELISA 검정은 IL-1R1 면역원과의 양성 반응성을 보이는 하이브리도마를 스크리닝하는데 사용하였다. IL-1R1 에 높은 결합활성으로 결합하는 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 서브클로닝하고 추가로 특성화시켰다. 모세포의 반응성을 유지하고 있는 각각의 하이브리도마로부터의 하나의 클론을 선별하여 액체 질소에 보관되는 5-10 개의 작은병 세포 은행을 만들었다.

[0271] 본원에 기재된 바와 같이 생성된 모노클로날 항체의 이소타입을 결정하기 위해 이소타입-특이 ELISA 를 실행하였다. 이러한 실험에서, PBS 에 용해시킨 1 µg/mL 의 마우스-항-인체 κ 경쇄 용액을 마이크로플레이트에 50 µL/웰로 코팅시키고 4 °C 에서 밤새 항온하였다. 5 % 닭 혈청으로 차단시킨 후, 플레이트를 각각의 시험 모노클로날 항체 및 정제된 이소타입 대조로부터의 상청액과 반응시켰다. 플레이트를 주위 온도에서 1-2 시간 동안 항온하였다. 그런 다음 웰을 인체 IgG1, IgG2 또는 IgG4-특이 고추냉이 퍼옥시다제-결합 염소 항-인체 폴리클로날 항혈청과 반응시키고 플레이트를 발색시키고 하기와 같이 분석하였다.

[0272] ELISA 에 의해 검출된 바와 같이 IL-1R1 에 잘 결합하는 하이브리도마 상청액으로부터의 정제한 모노클로날 항체를 생체의 결합 검정 및 인체 연골세포(캘리포니아 샌디에고에 소재하는 셀 어플리케

이선스 인코포레이티드에서 입수)와 전혈세포-기저 검정을 사용하여 생물학적 활성에 대해 추가로 시험하였다. 가장 좋은 활성을 나타내는 항체를 15C4, 26F5, 27F2, 24E12 및 10H7 로 명명하였다. 항체에 예비 에피토프 선별 시험(preliminary epitope sorting experiment)을 실시하였다. ELISA 플레이트를 인체 sIL-1R1(1 + 2 + 3 도메인), 절두된 인체 sIL-1R1(1 + 2 도메인), 랫 sIL-1R1, 인체 sIL-1R 제 2 형 및 오브알부민(음성 대조)으로 코팅하였다. 고추냉이 피옥시다제-결합 항-인체 Fc 항체(일리노이 록포드에 소재하는 피어스 케미컬 컴퍼니에서 입수)로 항체 결합을 검출하였다. 결과는 표 2 에 나타내었다. 표 2 의 "√" 는 결합에 대해 양성 결과를 나타내며 ; "X" 는 음성 결과를 나타낸다. 항체 15C4, 26F5, 27F2 및 24E12 는 3 개의 모든 세포의 도메인을 갖는 IL-1R1 단백질에만 결합하며 이는 각각의 에피토프가 세 번째 도메인 내에 존재함을 나타낸다. 항체 10H7 은 전장의 세포의 도메인 IL-1R1 및 도메인 1 및 2 만 갖는 절두된 단백질 둘 다에 결합하며 이는 이 항체에 대한 에피토프가 도메인 1 이나 2 중 어느 하나에 존재함을 입증하는 것이다. 인체 제 2 형 수용체 또는 랫 IL-1R1 과 교차-반응한 시험 항체는 없었다.

표 2

항체	OA (음성 대조)	Hu sIL-1R1 (1+2+3 도메인)	Hu sIL-1R1 (1+2 도메인)	Hu sIL-1RII (1+2+3 도메인)	Rat sIL-1R1 (1+2+3 도메인)
15C4	X	√	X	X	X
26F5	X	√	X	X	X
27F2	X	√	X	X	X
24E12	X	√	X	X	X
10H7	X	√	√	X	X

[0273]

[0274]

실시예 2

[0275]

항-IL-1R1 항체에 의한 IL-1 수용체 제 1 형 복합체 형성의 생체의 저해

[0276]

IL-1 신호전달에 필요한 세포의 결합을 저해하는 항체의 능력은 IL-1R 에 대한 IL-1 결합이 IL-1RAcP 에 대한 높은 친화성 결합 부위를 형성하는 생체의 검정에서 재조합 단백질로 평가하였다. IL-1 결합 IL-1R 에 대한 IL-1RAP 의 결합("복합체 형성" 으로도 언급함)을 다음과 같이 측정하였다. 재조합 단백질을 항체가 결합되거나(대조) 존재하는 마이크로플레이트에서 결합 검정으로 항온하였다. 10fM 및 1µM 사이의 농도로 존재하는 항체로부터 수득한 수치와 대조 수치를 비교하여 IC₅₀ 수치를 얻었다. 간략하게, 검정은 하기와 같이 실행하였다. 비오틴화된 IL-1R1 및 스트렙타비딘-코팅 비드(다이날에서 입수, 다이내비즈 M-28)를 마이크로플레이트에 분배하였다. 그런 다음 항체를 넓은 농도 범위로 계열 희석하여 적절한 웰에 첨가하였다. IL-1β 또는 IL-1α 를 1 nM 의 농도로 첨가하고 루테늄[IGEN 프로토콜에 따라 NHS-표식(IGEN)으로 재조합]으로 표지된 IL1RAcP 를 최종 농도가 5 nM 이 되도록 첨가하였다. 실온에서 1 시간 동안 항온한 후, ORIGEN™ 1.5 또는 M8 기구(IGEN 인터네셔널 인코포레이티드에서 입수) 중 하나로 결합 반응을 분석하였다. IL-1 결합 IL-1R1 에 대한 IL-1RAcP 결합을 IL-1R1 결합 비드와 관련된 전기화학발광 신호를 검출하여 측정하였다. IL-1 또는 IL-1RAcP 결합 중 어느 하나의 항체 경쟁으로부터 야기된 신호의 감소는 최대 결합(경쟁하지 않았을 때)에 대한 ECL 신호의 백분율로서 계산하였다.

[0277] 이러한 결합 검정에서의 각 항체에 대한 저해 반응 곡선을 확립하였으며 IC₅₀ 을 PRISM™ 소프트웨어를 사용하여 얻었다. 결합으로 인한 IL-1β 의 저해 결과는 도 12 의 그래프로 나타내었다. 복합체 형성의 저해에 대한 IC₅₀ 수치는 하기 표 3 에 나타내었다. 항체 15C4, 26F5, 27F2 및 24E12 는 복합체 형성을 강력하게 저해하였다. 이러한 항체는 상기 기재한 바와 같이 모든 IL-1R1 의 세 번째 도메인에 결합한다. 항체 10H7 은 세 번째 도메인이 결합된 IL-1R 의 구성에 결합하는 항체의 클래스에 포함된다. IL-1RAcP 의 IL-1 유도 결합에 있어서 10H7 은 세 번째 도메인에 결합하는 항체보다 효과적이지 못한 저해제이다. 본 발명의 항체에 의한 복합체 형성의 저해를 IL-1ra 에 의한 저해와 비교하였다. 세 번째 도메인에 결합하는 항체는 IL-1ra 와 비교시 복합체 형성을 저해하는 능력이 유사하거나 약간 높았다.

[0278] 도 13 은 IL-1R1/IL-1 α /RAcP 복합체 형성을 저해하는 항체 15C4 의 능력을 나타낸 것이다. IL-1R1/IL-1 α /RAcP 복합체 형성에 대한 IC₅₀ 은 43 pM 이다.

표 3

	인체 항-IL-1R1					rIL-1ra
	15C4	26F5	27F2	24E12	10H7	
IC50	96 pM	160 pM	333 pM	348 pM	5.3 nM	555 pM
95% 신뢰 한계	71 pM 내지 129 pM	118 pM 내지 219 pM	214 pM 내지 517 pM	223 pM 내지 542 pM	3.6 nM 내지 7.5 nM	414 pM 내지 743 pM

[0279]

실시예 3

[0280]

[0281] 항-IL-1R1 항체는 수용체에 대한 IL-1β 및 IL-1ra 의 결합을 저해한다

[0282] IL-1R1 에 대한 IL-1β 또는 IL-1ra 중 어느 하나의 결합을 저해하는 항-IL-1R1 항체의 능력을 재조합 단백질을 갖는 검정으로 평가하였다. 반응 혼합물은 0.1 mg/mL 의 다이아비드 M-280 스트랩타비딘(다이날에서 입수) 및 1 nM 의 비오틴화 IL-1R1 을 포함한다. 여기에 항체를 320 nM 내지 0.3 nM 의 농도로 첨가하였다. 루테늄-표식 IL-1β (5 nM) 또는 IL-1ra(1 nM)을 첨가하고 실온에서 1 시간 동안 두어 결합이 일어나게 하였다. 반응 혼합물을 ORIGEN™ 1.5 또는 M8 기구(IGEN 인터네셔널 인코포레이티드에서 입수)를 사용하여 상기와 같이 측정하였다. 최대 결합(경쟁하지 않았을 때)에 대한 ECL 신호의 백분율로서 계산하여 경쟁율을 나타내었다. 가장 효과적인 항체인 항체 15C4, 26F5 및 27F2 는 수용체에 결합하는 리간드(IL-1β)를 차단하였으나 IgG 대조와 비교했을 때 IL-1ra 의 결합은 크게 저해하지 못했다. 이와는 반대로, 항체 24E12 는 수용체에 결합하였으나 수용체에 대한 IL-1β 또는 IL-1ra 의 결합은 차단하지 않았다. 그러므로, 항체 24E12 는 15C4, 26F5 및 27F2 로 나타내어 지는 클래스와는 다른 세 번째 도메인 결합 항체의 유일한 클래스를 나타낸다. 항체 10H7 은 수용체에 결합하는 IL-1 β 및 IL-1ra 둘 다를 저해한다. 결과는 도 14 에 나타내었다.

[0283]

실시예 4

[0284]

연골세포 및 인체 전혈 검정

[0285] 일차 인체 연골세포(캘리포니아 샌디아고에 소재하는 셀 어플리케이션스 인코포레이티드에서 입수)를 1% PBS 및 1% 펜 스트렙(Pen Strep, 기브코에서 입수)을 함유하는 DMEM 배지에 10,000 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 접종하였다. 10 nM 내지 0.1 pM 범위의 농도로 항-IL-1R1 항체를 20 분간 첨가하기 전에 세포를 밤새 재생시켰다. IL-1β 를 1 pM (~EC₅₀)의 농도로 첨가하고 37 °C 에서 16 시간 동안 항온한 후 배양 상청액을 수득하였다. 상청액에서의 IL-6 수준을 제조업자의 지시에 따라 ELISA(일리노이 록포드에 소재하는 피어스-엔도젠에서 입수, 카탈로그 번호 제 EH2IL-65 호)를 사용하여 측정하였다. 세포-기저 검정에서의 본 발명의 각 항체에 대한 저해 반응 곡선을 확립시키고 PRISM™ 소프트웨어를 사용하여 IC₅₀ 수치를 얻었다. 항체 15C4, 26F5 및 27F2 가 IL-1ra 에 비해 더 효과적인 IL-1 신호전달의 저해제이다(도 15A). 항체 24E12 및 10H7 은 15C4 및 27F2 보다 상당히 적은 효과를 나타낸다(도 15B). IL-1β 유도된 IL-6 생산 인체 연골세포의 저해에 대한 IC₅₀ 수치는 표 4A 및 표 4B 에 나타나있다(각각 도 15A 및 15B 와 상응함).

[0286] 항-IL-1R1 모노클로날 항체 15C4, 26F5 및 27F2 를 헤파린나트륨 진공채혈관(vacutainer)으로 일반 자원자로부터 수득한 인체 전혈과 함께 40-60 분간 예비항온하였다. 검정은 다음과 같이 진행하였다 : 분리된 신선한 혈액 100 μL 를 96-웰 플레이트의 웰에 동량으로 나누어 넣었다. 50 μL 의 항체를 100 % 인체 AB 혈청을 함유하는 RPMI 배지에 용해시켜 첨가하였다. 그런 다음 IL-1β 를 30 pM(EC₅₀)의 농도로 첨가하였다. 18 시간 후에 배양 상청액을 수득하였으며 상청액 내의 IL-6 수준을 ELISA 를 사용하여 측정하였다. 대조로서 IL-1ra 를 전혈과 함께 40-60 분간 예비항온하고 IL-6 생성을 상기와 같이 측정하였다. 3 개의 항-IL-1R1 항체가 IL-1ra 보다 더 효과적으로 IL-1 활성을 저해하였다(도 16). 인체 전혈에서의 IL-1-유도 IL-6 생성의 저해에 대한 IC₅₀ 수치를 표 5 에 나타내었다.

표 4A

	인체 항-IL-1R1항체			rIL-1ra
	15C4	27F2	26F5	
IC ₅₀	16 pM	32 pM	26 pM	32 pM
95% 신뢰 한계	15 pM 내지 18 pM	21 pM 내지 49 pM	19 pM 내지 36 pM	22 pM 내지 46 pM

[0287]

표 4B

	인체 항-IL-1R1항체				rIL-ra
	15C4	27F2	10H7	24E12	
IC ₅₀	7 pM	28 pM	7.5 pM	NA	20 pM
95% 신뢰 한계	5.8 pM 내지 7.9 pM	22 pM 내지 35 pM	5.6 nM 내지 10 nM	NA	17 pM 내지 23 pM

[0288]

표 5

공여자	분석 파라미터	15C4	26F5	27F2	IL-1ra
1047	IC50	126 pM	410 pM	249 pM	241 pM
	95% 신뢰 한계	47 pM 내지 339 pM	213 pM 내지 790 pM	88 pM 내지 703 pM	124 pM 내지 471 pM
1319	IC50	111 pM	174 pM	579 pM	381 pM
	95% 신뢰 한계	59 pM 내지 208 pM	60 pM 내지 501 pM	249 pM 내지 1.3 nM	167 pM 내지 875 pM
조성 (폴링 데이터)	IC50	126 pM	372 pM	387 pM	264 pM
	95% 신뢰 한계	62 pM 내지 255 pM	187 pM 내지 739 pM	202 pM 내지 748 pM	134 pM 내지 517 pM

[0289]

[0290]

[0291]

실시예 5

돌연변이유발 및 에피토프 맵핑

[0292]

IL-1R1의 부위 특이적 돌연변이유발(Altered Sites[®]) 생체의 돌연변이 시스템, 위스콘신 매디슨에 소재하는 프로메가에서 입수)로 랫 아미노산 잔기가 상응하는 인체 서열로 치환된 돌연변이 단백질("뮤테인")을 제조하였다. 15 개의 상이한 돌연변이 플라스미드를 구성하였다(도 17의 번호가 매겨진 굵은 선을 참조하라). 이러한 치환된 단백질 및 원조 IL-1R1을 코딩하는 플라스미드를 CHO 세포(ATCC 기탁 번호 제 CRL-9096 호)에 순간적으로 트랜스펙션시켰다. 아무것도 트랜스펙션시키지 않은 트랜스펙션체를 음성 대조로서 제조하였다. 이러한 세포로부터의 조정 배지(CM)를 센트리프렙(Centriprep) 10 농축 컬럼(아미콘에서 입수)을 사용하여 20 배까지 농축시켰다. 뮤테인의 발현을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯팅으로 측정하였다. 13 개의 돌연변이 단백질이 항체 결합이 발생하는 수준에서 발현되었다. 단백질을 겔에 로딩하고 전기영동하고 막으로 이전시켰다. 막을 PBS, 0.1% 트윈-20에 용해된 1% 우유로 차단한 후 PBS 및 0.1% 트윈-20에 용해시킨 0.5 µg/mL의 항-IL-1R 항체 15C4, 27F2 또는 24E12와 함께 실온에서 1시간 동안 항온하였다. 세척한 후, 막을 염소 항-인체 IgG-Fc-HRP와 함께 항온하였다. 화학발광(ECL) 기질(일리노이 록포드에 소재하는 피어스 케미컬 컴퍼니에서 입수)을 사용하여 신호를 검출하였다. 항체 결합에 대해 결정적인 인체 특이 서열은 ECL 신호가 감소되거나 제거된 랫 서열로 치환된 인체 서열로서 확인하였다. 돌연변이 1, 2, 4 및 10의 15C4 인식은 24E12와 비교시 더 낮았다(도 18, 첫 번째 부분). 마찬가지로, 돌연변이 1, 2 및 4에 대한 27F2의 결합도 낮았다(도 18, 가운데 부분). 24E12는 돌연변이 12, 13, 14 및 15에 대한 결합이 현저하게 낮았다(도 18, 마지막 부분).

[0293]

인체 항-IL-1R1의 분리 및 특성화로 서로 다른 3개의 클래스의 경쟁적 항체를 확인하였다(도 19). 세포-기저 생검정에 의해 검증된 IL-1 생물학적 활성의 가장 강한 저해제는 IL-1R1의 세 번째 도메인에 결합하고 IL-1β 결합을 예방하는 상기 항체이다. 세 번째 도메인 돌연변이 단백질을 사용하는 에피토프 맵핑 실험으로 15C4, 27F2 및 26F5를 포함하는 이러한 클래스의 항체가 오버랩핑 에피토프를 공유하나 동일한 형태학적 에피토프는 공유하지 않음을 증명하였다. 도 20 및 21은 IL-1ra 결합 IL-1 수용체의 리본 도표(ribbon diagram)(Schreuder 등의, 1997, Nature 386:194-200)에서 IL-1 수용체의 세 번째 도메인 상의 15C4 에피토프의 위치를 나타낸 것이다. 가장 효과적인 클래스의 항체의 결합을 규정하는 IL-1 수용체 잔기는 회색으로 나타내었다. 이러한 항체는 뛰어난 효능을 나타내므로 이 에피토프는 뛰어난 효능을 갖는 클래스의 항체에 대한 결합 부위로 정의된다. 15C4 및 27F2 결합 부위는 오버랩핑되었으나 상기 기술한 IL-1R1 내 15개의 상이한 부위의 돌연변이 분석에 의해 결정된 바와 같이, 동일하지는 않았다. 이 부위는 도 17에 단백질 서열의 위쪽에 번호가 매겨진 굵은선으로서 묘사하였다. 상호작용의 결정적 부위는 부위 1(LSDIA; SEQ ID NO: 41), 부위 2(VIDE; SEQ ID NO: 42), 부

위 4(YSV) 및 부위 10(TCFA ; SEQ ID NO : 43)에서의 돌연변이 내에서 나타난다. 15C4 및 27F2 결합 부위는 부위 1 및 부위 2 내에 포함되며 이는 이러한 부위 중 어느 하나에서 인체 잔기가 랫 잔기로 치환되어 결합이 저해되기 때문이다. 부위 4 에서의 변화로 결합이 완전히 차단된 반면 15C4 의 결합은 감소되기는 했지만 완전히 차단되지는 않았다는 점에서 27F2 는 15C4 와 상이하다. 돌연변이 10 또한 15C4 결합을 감소시키나 27F2 는 이 부위와 명백한 상호작용을 나타내지 않았다. 결정 구조의 실험은 결합된 리간드가 차지하는 공간을 향하여 이러한 잔기가 배향된 세 번째 도메인의 표면을 정의함을 나타낸다(도 20 및 21)(Vigers 등의, 1997, Nature 386:190-194).

[0294] 확인된 두 번째 클래스의 항체인 10H7 은 결합을 위한 세 번째 도메인이 필요하지 않으며 바람직한 클래스와는 다르게 IL-1ra 결합을 저해한다. 이 클래스는 생검정에서는 활성을 나타내지만 바람직한 클래스보다 적은 효능을 나타낸다.

[0295] 바람직한 클래스의 항체를 갖는 IL-1 생검정의 강한 저해와는 반대로, 24E12 는 생검정에서 효과적인 저해제가 아니다. 항체 24E12 는 IL-1-결합 IL-1R 과의 IL-1RAcP 결합을 저해한다. 돌연변이 12, 13, 14 및 15 에 의해 정의된 이러한 클래스의 항체의 에피토프는 IL-1R1 의 트랜스멤브레인의 도메인에 근접해있으며 IL-1 또는 IL-1ra 결합 중 어느 하나와 직접적으로 관련된 영역 내에 존재한다(도 22).

[0296] **실시예 6**

[0297] **항-IL-1R1 항체 중쇄 및 경쇄의 클로닝**

[0298] 항-IL-1R1 15C4 MAb 경쇄의 클로닝

[0299] α IL-1R1 결합 모노클로날 항체인 15C4, 27F2 및 26F5 를 발현하는 3 개의 하이브리도마에 대한 경쇄를 포유동물 세포 발현 벡터 pDSR α 19(암젠 인코포레이티드에서 입수, 본원에 참고문헌으로 인용된 국제 특허 공개 번호 제 WO 90/14363 호를 참조하라) 내로 클로닝하였다. 15C4 κ 경쇄를 코딩하는 플라스미드의 구성은 본원에 명백하게 기술되어 있다 ; 다른 경쇄 종류의 클로닝은 유사한 방법을 사용하여 수행하였다. TRIzol[®] 시약(인비트로젠에서 입수)을 사용하여 제조한 α IL-1R1 하이브리도마 15C4 총 RNA 로부터 제조한 제 1 가닥 DNA 로부터 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭 방법을 사용하여 α IL-1R1 경쇄 가변 영역을 수득하였다. 연장 연결자(extension adapter)(5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT-3' ; SEQ ID NO : 44)와 함께 무작위 프라이머를 사용하여 제 1 가닥 cDNA 를 합성하였으며 5' RACE(cDNA 말단의 급성 증폭)를 GeneRacer™ 키트(인비트로젠에서 입수)를 사용하여 수행하였다. 완전 경쇄에서, 전진(forward) 프라이머는 GeneRacer™ 내포 프라이머(5'-GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA-3' ; SEQ ID NO : 45)이며 역 프라이머는 5'-GGG GTC AGG CTG GAA CTG AGG-3'(SEQ ID NO : 46)이다. RACE 산물을 pCR4-TOPO(인비트로젠에서 입수) 내로 클로닝하였으며 DNA 서열을 결정하였다. 15C4 κ 쇄 공통 DNA 서열을 전장의 항체 사슬 PCR 증폭에 대한 프라이머를 설계하는데 사용하였다. 5' κ PCR 프라이머는 신호 서열의 아미노 말단, XbaI 제한효소 부위 및 최적화된 코작 서열을 코딩한다(5' CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GTC GCC ATC ACA ACT CAT TGG G-3' ; SEQ ID NO : 47). 3' 프라이머는 SalI 제한 부위 뿐만 아니라 카복시 말단 및 종결 코돈을 코딩한다(5'-CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C-3' ; SEQ ID NO : 48).

5' αIL-1R1 15C4 카파 프라이머 (SEQ ID NO: 47):

5'- CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GTC GCC ATC ACA ACT
XbaI 코작 M S P S Q L

CAT TGG G -3'

I G (SEQ ID NO: 49)

3' αIL-1R1 15C4 카파 프라이머 (SEQ ID NO: 48):

5'- CTT GTC GAC TCA ACA CTC TCC CCT GTT GAA GCT C -3'

SalI * C E G R N F S (SEQ ID NO: 50)

[0300]

[0301]

전장의 αIL-1R1 15C4 κ쇄 클론을 5' 및 3' αIL-1R1 15C4 κ 프라이머를 수반하는 PCR 증폭에 의한 pCR4 : 15C4 κ 클론을 사용하여 수득하였다. αIL-1R1 15C4 κ쇄의 233 개 아미노산 잔기(19 개 아미노산 κ쇄 신호 서열을 포함함)을 코드하는 733 bp 산물을 PCR 작용으로 제조하였다. PCR 산물을 QIAquick PCR 정제 키트(퀴아젠 카탈로그 번호 제 28104 호)를 사용하여 정제하고 XbaI 및 SalI 로 절단한 후 겔 분리하고 QIAquick 겔 추출 키트(퀴아젠 카탈로그 번호 제 28704 호)를 사용하여 정제하였다. 그런 다음 완전한 αIL-1R1 15CA κ쇄를 함유하는 이러한 PCR 단편을 포유동물 발현 벡터 pDSR α 19 내로 결합시켰다. 15C4 하이브리도마에서 확인된 동일한 펩티드를 코드함을 확인하기 위해 15C4 κ쇄 발현 클론을 DNA 서열확인하였다. 최종 발현 벡터인 pDSR α 19 : 15C4 κ는 5468 bp 이며 표 6 에 기재된 7 개의 기능적인 영역을 포함한다.

표 6

플라스미드 염기쌍
번호 :

2 내지 881	소의 뇌하수체 글리코단백질 호르몬의 α -서브유닛 (α -FSH) 으로부터의 전사 말단/폴리아데닐화 신호 (Goodwin 등의, 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> <u>11</u> :6873-82; 진뱅크 기탁 번호 제 X00004 호)
882 내지 2027	내인성 마우스 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 프로모터, cDNA 코딩 서열 및 DHFR 전사 말단/폴리아데닐화 신호를 함유하는 마우스 DHFR 미니 유전자 (Gasser 등의, 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> <u>79</u> :6522-6; Nunberg 등의, 1980, <i>Cell</i> <u>19</u> :355-64; Setzer 등의, 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> <u>257</u> :5143-7; McGrogan 등의, 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> <u>260</u> :2307-14)
2031 내지 3947	암피실린 내성 마커 유전자 및 <i>E. coli</i> 내의 플라스미드의 복제 기원을 함유하는 pBR322 서열 (진뱅크 기탁 번호 제 J01749 호)
3949 내지 4292	SV40 초기 프로모터, 인핸서 및 복제 기원 (Takebe 등의, 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> <u>8</u> :466-72, 진뱅크 기탁 번호 제 J02400 호)
4299 내지 4565	HTLV-1 LTR 로부터의 번역 인핸서 요소 (Seiki 등의, 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> <u>80</u> :3618-22, 진뱅크 기탁 번호 제 J02029 호)
4574 내지 4730	SV40 16S, 19S 스플라이스 공여체/수용체 신호로부터의 인트론 (Okayama 및 Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> <u>3</u> :280-9, 진뱅크 기탁 번호 제 J02400 호)
4755 내지 5468	<i>Xba</i> I 및 <i>Sa</i> lI 부위 사이의 15C4 카파 경쇄 cDNA

[0302]

[0303] pDSR : hIgG1C_{H1} 의 구성

[0304] pDSR α 19 : 랫 가변 영역/인체 불변 영역 IgG1(rVh/hCh1) MAb 발현 플라스미드를 *Xba*I 및 *Bsm*BI 말단 랫 항체 가변 영역 PCR 산물, *Sa*lI 절단에 의해 유도된 인체 IgG1 불변 영역(C_{H1}, 힌지, C_{H2} 및 C_{H3} 도메인) 및 선형 플라스미드 pDSR α 19 : hIgG1 C_H(*Hind*III 및 *Bsm*BI 말단)와 *Xba*I 및 *Sa*lI 말단을 갖는 선형화된 pDSR α 19 로부터의 *Bsm*BI 및 *Sa*lI 단편의 겔 분리물의 3 조각을 결합시켜 구성하였다(공동-소유 및 공동-계류중인 2002년 4월 5일에 출원된 미국 가출원 번호 제 60/370,407 호, "선택적인 OPGL 경로 저해제로서의 인체 항-OPGL 중화 항체" 를 참조하라). 최종 발현 벡터인 pDSR α 19 : 랫 가변 영역/인체 불변 영역 IgG1(rVh/hCh1)는 6158 bp 이며 표 7A 및 7B 에 기재된 7 개의 기능적인 영역을 포함한다.

표 7A

플라스미드 염기쌍
번호 :

2 내지 881	소의 뇌하수체 글리코단백질 호르몬의 α -서브유닛 (α -FSH) 으로부터의 전사 말단/폴리아데닐화 신호 (Goodwin 등의, 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> <u>11</u> :6873-82; 진뱅크 기탁 번호 제 X00004 호)
882 내지 2027	내인성 마우스 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 프로모터, cDNA 코딩 서열 및 DHFR 전사 말단/폴리아데닐화 신호를 함유하는 마우스 DHFR 미니 유전자 (Gasser 등의, 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> <u>79</u> :6522-6; Nunberg 등의, 1980, <i>Cell</i> <u>19</u> :355-64; Setzer 등의, 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> <u>257</u> :5143-7; McGrogan 등의, 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> <u>260</u> :2307-14)
2031 내지 3947	암피실린 내성 마커 유전자 및 <i>E. coli</i> 내의 플라스미드의 복제 기원을 함유하는 pBR322 서열 (진뱅크 기탁 번호 제 J01749 호)
3949 내지 4292	SV40 초기 프로모터, 인핸서 및 복제 기원 (Takebe 등의, 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> <u>8</u> :466-72, 진뱅크 기탁 번호 제 J02400 호)
4299 내지 4565	HTLV-1 LTR 로부터의 번역 인핸서 요소 (Seiki 등의, 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> <u>80</u> :3618-22, 진뱅크 기탁 번호 제 J02029 호)
4574 내지 4730	SV40 16S, 19S 스플라이스 공여체/수용체 신호로부터의 인트론 (Okayama 및 Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> <u>3</u> :280-9, 진뱅크 기탁 번호 제 J02400 호)
4755 내지 6158	<i>Xba</i> I 및 <i>Sal</i> I 부위 사이의 rVh/hCh1 중쇄 cDNA. 이 중쇄 단편 서열은 밑줄이 그어진 제한 부위 서열을 갖는 하기 서열이다 (SEQ ID NO: 51): <i>Xba</i> I TCTAG ACCACCATGG ACATCAGGCT CAGCTTAGTT TTCCTTGTCCTTTTCATAAA AGGTGTCCAG TGTGAGGTAG AACTGGTGGA GTCTGGGGGC GGCTTAGTAC AACCTGGAAG GTCCATGACA CTCTCCTGTG CAGCCTCGGG ATTCAC TTTC AGAACCTATG GCATGGCCTG GGTCCGCCAG GCCCAACGA AGGGTCTGGA GTGGGTCTCA

[0305]

표 7B

	<p>TCAATTACTG CTAGTGGTGG TACCACCTAC TATCGAGACT CCGTGAAGGG CCGCTTCACT ATTTTATAGGG ATAATGCAAA AAGTACCCTA TACCTGCAGA TGGACAGTCC GAGGTCTGAG GACACGGCCA CTTATTTCTG TACATCAATT</p> <p style="text-align: center;"><i>BsmBI</i></p> <p>TCGGAATACT GGGGCCACGG AGTCATGGTC ACCGTCCTCA GTGCCTCCACCAAGGGGCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACT CCCCGAACCG GTGACGGTGT CGTGGAAGCTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC CCAAATCTTG TGACAAAAC CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG GACCGTCAGT CTTCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGACCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA AGGAGTACAAGTGAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ATAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA</p> <p style="text-align: center;"><i>SalI</i></p> <p>AATGATAAGT CGAC</p>
--	---

[0306]

[0307]

랫 가변 영역을 제거하기 위해 제한효소 XbaI 및 BsmBI 로 pDSR19 : 랫 가변 영역/인체 불변 영역 IgG1 플라스미드를 절단시켜 선형 플라스미드 pDSR α 19 : hIgG1C_H 를 제조하였으며 이를 QIAquick 겔 추출 키트를 사용하여 정제하였다. 1 kbp 인체 IgG1 불변 영역 도메인을 함유하는 선형 플라스미드 pDSR α 19 : hIgG1C_H 를 하이브리도마 유래된 α IL-1R 항체 가변 영역을 수득하는데 사용하였다.

[0308]

항-IL-1R1 15C4 MAb 중쇄의 클로닝

[0309]

α IL-1R1 결합 모노클로날 항체인 15C4, 27F2 및 26F5 를 발현하는 10 개의 하이브리도마에 대한 중쇄를 포유동물 세포 발현 벡터 pDSR α 19 내로 클로닝하였다. 15C4 중쇄를 코드하는 플라스미드의 구성은 명백하게 기술되었으며 ; 다른 중쇄 종류의 클로닝을 유사한 방법을 사용하여 수행하였다. α IL-1R1 15C4 중쇄 가변 영역을 TRIzol[®] 시약을 사용하여 제조한 α IL-1R1 하이브리도마 15C4 총 RNA 로부터 제조한 제 1 가닥 cDNA 로부터 PCR 증폭 방법을 사용하여 제조하였다. 연장 연결자(5'-GGC CGG ATA GGC CTC CAN NNN NNT-3' ; SEQ ID NO : 44)를 갖는 무작위 프라이머를 사용하여 제 1 가닥 cDNA 를 합성하였으며 5' RACE(cDNA 말단의 급성 증폭)를 GeneRacer[™] 키트를 사용하여 수행하였다. 부분적 길이의 중쇄에서, 전진 프라이머는 GeneRacer[™] 내포 프라이머(5'-GGA CAC TGA CAT GGA CTG AAG GAG TA-3' ; SEQ ID NO : 45)이며 역 프라이머는 5'-TGA GGA CGC TGA CCA CAC G-3'(SEQ ID NO : 52)이다. RACE 산물을 pCR4-TOPO 내로 클로닝하였으며 DNA 서열을 결정하였다. 15C4 중쇄 가변 영역 공통 DNA 서열을 중쇄 가변 영역 PCR 증폭에 대한 프라이머를 설계하는데 사용하였다. 5' 중쇄 PCR 프라이머는 신호 서열의 아미노 말단, XbaI 제한효소 부위 및 최적화된 코작 서열을 코드한다(5'-CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC CAT GGG GTC AAC CGC CAT CCT CG-3' ; SEQ ID NO : 53). 3' 프라이머는 자연 발생 센스 가닥 BsmBI 부위를 포함하는 가변 영역의 카르복시 말단을 코드한다(5'-GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG GTT CC-3' ;

SEQ ID NO : 54).

5'αIL-1R1 15C4 중쇄 프라이머 (SEQ ID NO: 53):

5'- CAG CAG AAG CTT CTA GAC CAC C ATG GGG TCA ACC GCC
 *Xba*I 코작 M G S T A
 ATC CTCG -3'

I L (SEQ ID NO: 55)

3'αIL-1R1 15C4 중쇄 프라이머 (SEQ ID NO: 54):

5'- GTG GAG GCA CTA GAG ACG GTG ACC AGG GTT CC-3'
 T S A S S V T V L T G (SEQ ID NO: 56)

[0310] *Bsm*BI

[0311] 항-IL-1R1 IgG1 중쇄 발현 클론의 구성

[0312] 전장의 α IL-1R1 15C4 중쇄 클론을 5' 및 3' α IL-1R1 15C4 중쇄 프라이머를 수반하는 PCR 증폭에 의한 pCR4 : 15C4 중쇄 클론으로부터 획득하였다. α IL-1R1 15C4 중쇄 가변 영역의 137개 아미노산 잔기(19개 아미노산 중쇄 신호 서열을 포함함)를 코드하는 442 bp 산물을 PCR 반응으로 생성하였다. PCR 산물을 QIAquick PCR 정제 키트를 사용하여 정제한 후 *Xba*I 및 *Bsm*BI 로 절단하고 겔 분리하였으며 QIAquick 겔 추출 키트를 사용하여 정제하였다. 그런 다음 완전한 α IL-1R1 15CA 중쇄 가변 영역을 함유하는 이러한 단편을 포유동물 발현 벡터 pDSR α 19 : hIgG1_H 내로 결합시켰다. 15C4 중쇄 IgG1 발현 클론을 15C4 하이브리도마에서 확인된 동일한 중쇄 가변 영역 펩티드를 코드함을 확인하기 위해 DNA 서열결정하였다. 최종 발현 벡터인 pDSR α 19 : 15C4 IgG1 중쇄는 6173 bp 이며 표 8 에 기재된 7 개의 기능적인 영역을 함유한다.

표 8

플라스미드 염기쌍
번호 :

2 내지 881	소의 뇌하수체 글리코단백질 호르몬의 α -서브유닛 (α -FSH) 으로부터의 전사 말단/폴리아데닐화 신호 (Goodwin 등의, 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11:6873-82; 진뱅크 기탁 번호 제 X00004 호)
882 내지 2027	내인성 마우스 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 프로모터, cDNA 코딩 서열 및 DHFR 전사 말단/폴리아데닐화 신호를 함유하는 마우스 DHFR 미니 유전자 (Gasser 등의, 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79:6522-6; Nunberg 등의, 1980, <i>Cell</i> 19:355-64; Setzer 등의, 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257:5143-7; McGrogan 등의, 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260:2307-14)
2031 내지 3947	암피실린 내성 마커 유전자 및 <i>E. coli</i> 내의 플라스미드의 복제 기원을 함유하는 pBR322 서열 (진뱅크 기탁 번호 제 J01749 호)
3949 내지 4292	SV40 초기 프로모터, 인핸서 및 복제 기원 (Takebe 등의, 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8:466-72, 진뱅크 기탁 번호 제 J02400 호)
4299 내지 4565	HTLV-1 LTR 로부터의 번역 인핸서 요소 (Seiki 등의, 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 80:3618-22, 진뱅크 기탁 번호 제 J02029 호)
4574 내지 4730	SV40 16S, 19S 스플라이스 공여체/수용체 신호로부터의 인트론 (Okayama 및 Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> 3:280-9, 진뱅크 기탁 번호 제 J02400 호)
4755 내지 6173	XbaI 및 SalI 부위 사이의 15C4 중쇄 IgG1 cDNA

[0313]

[0314] pDSR α 19 : hIgG2C_H의 구성

[0315] pDSR α 19 : 인체 가변 영역/인체 불변 영역 IgG2(hVh/hCh2) MAb 발현 플라스미드를 XbaI 및 BsmBI 말단 인체 항체 가변 영역 PCR 산물, BsmBI 및 SalI 말단을 갖는 인체 IgG2 불변 영역(C_{H1}, 힌지, C_{H2} 및 C_{H3} 도메인) PCR 산물 및 XbaI 및 SalI 말단을 갖는 선형화된 pDSR α 19 의 3-조각을 결합시켜 구성하였다. 최종 발현 벡터인 pDSR α 19 : 인체 가변 영역/인체 불변 영역 IgG1(hVh/hCh2)(공동-소유 및 공동-계류중인 2002년 4월 5일에 출원한 미국 가출원 번호 제 60/370,407 호, "선택적인 OPGL 경로 저해제로서의 인체 항-OPGL 중화 항체"를 참조하라)은 6164 bp 이고 표 9A 및 9B 에 기재된 7 개의 기능적인 영역을 함유한다.

표 9A

플라스미드 염기쌍
번호 :

2 내지 881	소의 뇌하수체 글리코단백질 호르몬의 α -서브유닛 (α -FSH) 으로부터의 전사 말단/폴리아데닐화 신호 (Goodwin 등의, 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> <u>11</u> :6873-82; 진뱅크 기탁 번호 제 X00004 호)
882 내지 2027	내인성 마우스 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 프로모터, cDNA 코딩 서열 및 DHFR 전사 말단/폴리아데닐화 신호를 함유하는 마우스 DHFR 미네 유전자 (Gasser 등의, 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> <u>79</u> :6522-6; Nunberg 등의, 1980, <i>Cell</i> <u>19</u> :355-64; Setzer 등의, 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> <u>257</u> :5143-7; McGrogan 등의, 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> <u>260</u> :2307-14)
2031 내지 3947	암피실린 내성 마커 유전자 및 <i>E. coli</i> 내의 플라스미드의 복제 기원을 함유하는 pBR322 서열 (진뱅크 기탁 번호 제 J01749 호)
3949 내지 4292	SV40 초기 프로모터, 인핸서 및 복제 기원 (Takebe 등의, 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> <u>8</u> :466-72, 진뱅크 기탁 번호 제 J02400 호)
4299 내지 4565	HTLV-1 LTR 로부터의 번역 인핸서 요소 (Seiki 등의, 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> <u>80</u> :3618-22, 진뱅크 기탁 번호 제 J02029 호)
4574 내지 4730	SV40 16S, 19S 스플라이스 공여체/수용체 신호로부터의 인트론 (Okayama 및 Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> <u>3</u> :280-9, 진뱅크 기탁 번호 제 J02400 호)
4755 내지 6164	<i>Xba</i> I 및 <i>Sal</i> I 부위 사이의 hVh/hCh2 중쇄 cDNA. 이 중쇄 단편의 서열은 밑줄이 그어진 제한 부위 서열을 갖는 하기 서열이다 (SEQ ID NO: 57): <i>Xba</i> I

[0316]

표 9B

	<p>TCTAGA CCACCATGGA CATGAGGGTC CCCGCTCAGC TCCTGGGGCT CCTGCTATTG TGGTTGAGAG GTGCCAGATG TGAGGTCCAG CTGGTGCAGTCTGGGGGAGG CTTGGTACAT CCTGGGGGGT CCCTGAGACT CTCCTGTGCAGGCTCTGGAT TCACCTTCAG TGGCCATGCT TTGCACTGGG TTCGCCAGGCTCCAGGAAAA GTCTGGAGT GGGTATCAGG TATTGGTACT CATGGTGGGACATACTATGC AGACTCCGTG AAGGGCCGAT TCACCATCTC CAGAGACAATGCCAAGAACT CTTGTTTCT TCAAATGAAC AGCCTGAGCG CCGAGGACATGGCTGTGTAT TACTGTACAA GAAGAAACTG</p> <p style="text-align: center;"><i>BsmBI</i></p> <p>GGGACAATTT GACTACTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACC GTCTCTAGTG CCTCCACCAA GGGCCCATCGGTCTTCCCC TGCGCCCTG CTCCAGGAGC ACCTCCGAGA GCACAGCGGCCCTGGGCTGC CTGGTCAAGG ACTACTTCCC CGAACCGGTG ACGGTGTCGTGGAACCTCAGG CGCTCTGACC AGCGCGTGC ACACCTTCCC AGCTGTCCTACAGTCTCAG GACTCTACTC CCTCAGCAGC GTGGTGACCG TGCCCTCCAGCAACTTCGGC ACCCAGACCT ACACCTGCAA CGTAGATCAC AAGCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGACA GTTGAGCGCA AATGTTGTGT CGAGTGCCACCGTGCCAG CACCACCTGT GGCAGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCCAAAAACCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACGTGCGTGGTGGTGA CGTGAGCCAC GAAGACCCCG AGGTCCAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCAC GGGAGGAGCAGTTCAACAGC ACGTTCCTGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTT GTGCACCAGGACTGGCTGAA CGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCAA CAAAGGCCTCCAGCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA ACCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTACCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACACCTCCCATGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCTGATGCATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG</p> <p style="text-align: center;"><i>Sall</i></p> <p>AAGAGCCTCT CCCTGTCTCCGGGTAAATGA TAAGTCGAC</p>
--	--

[0317]

[0318] 인체 가변 영역을 제거하기 위해 제한효소 XbaI 및 BsmBI 로 pDSR α 19 : 인체 가변 영역/인체 불변 영역 IgG2 플라스미드를 절단하여 선형 플라스미드 pDSR α 19 : hIgG2_H 를 제조하고 QIAquick 겔 추출 키트를 사용하여 정제하였다. 1 kbp 의 인체 IgG2 불변 영역 도메인을 함유하는 선형 플라스미드 pDSR α 19 : hIgG2_H 를 하이브리도마 유래 α IL-1R 항체 가변 영역을 수득하기 위해 사용하였다.

[0319] 항-IL-1R1 IgG2 중쇄 발현 클론의 구성

[0320] 상기 기재된 α IL-1R1 15C4 중쇄 가변 영역 단편을 포유동물 발현 벡터 pDSR α 19 : hIgG2_H 내로 결합시켰다. 15C4 중쇄 IgG2 발현 클론을 15C4 하이브리도마 내에서 확인된 동일한 중쇄 가변 영역 펩티드를 코드함을 확인하기 위해 DNA 서열결정하였다. 최종 발현 벡터인 pDSR α 19 : 15C4 IgG2 중쇄는 6161 bp 이며 표 10 에 기재된 7 개의 기능적인 영역을 함유한다.

표 10

플라스미드 염기쌍
번호 :

2 내지 881	소의 뇌하수체 글리코단백질 호르몬의 α -서브유닛 (α -FSH) 으로부터의 전사 말단/폴리아데닐화 신호 (Goodwin 등의, 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11:6873-82; 진뱅크 기탁 번호 제 X00004 호)
882 내지 2027	내인성 마우스 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 프로모터, cDNA 코딩 서열 및 DHFR 전사 말단/폴리아데닐화 신호를 함유하는 마우스 DHFR 미니 유전자 (Gasser 등의, 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79:6522-6; Nunberg 등의, 1980, <i>Cell</i> 19:355-64; Setzer 등의, 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257:5143-7; McGrogan 등의, 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260:2307-14)
2031 내지 3947	암피실린 내성 마커 유전자 및 <i>E. coli</i> 내의 플라스미드의 복제 기원을 함유하는 pBR322 서열 (진뱅크 기탁 번호 제 J01749 호)
3949 내지 4292	SV40 초기 프로모터, 인핸서 및 복제 기원 (Takebe 등의, 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8:466-72, 진뱅크 기탁 번호 제 J02400 호)
4299 내지 4565	HTLV-1 LTR 로부터의 번역 인핸서 요소 (Seiki 등의, 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 80:3618-22, 진뱅크 기탁 번호 제 J02029 호)
4574 내지 4730	SV40 16S, 19S 스플라이스 공여체/수용체 신호로부터의 인트론 (Okayama 및 Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> 3:280-9, 진뱅크 기탁 번호 제 J02400 호)
4755 내지 6161	<i>Xba</i> I 및 <i>Sal</i> I 부위 사이의 15C4 중쇄 IgG2 cDNA

[0321]

[0322] pDSR α 19 : hIgG4_{C_H1} 의 구성

[0323] *Xba*I 및 *Bsm*BI 말단 인체 항체 가변 영역 PCR 산물, 겔 분리된 *Bsm*BI 및 *Sal*I 절단 인체 IgG4 불변 영역(C_{H1}, 힌지, C_{H2} 및 C_{H3} 도메인) 단편 및 *Xba*I 및 *Sal*I 말단을 갖는 선형화된 pDSR α 19 의 3-조각을 결합시켜 pDSR α 19 : 인체 가변 영역/인체 불변 영역 IgG4(hVh/hCh4) MAb 발현 플라스미드를 구성하였다. 최종 발현 벡터인 pDSR α 19 : 인체 가변 영역/인체 불변 영역 IgG4(hVh/hCh4)(공동 소유 및 공동-계류중인 2002 년 4 월 5 일에 제출된 미국 가출원 번호 제 60/370,407 호, "선택적인 OPGL 경로 저해제로서의 인체 항-OPGL 중화 항체" 를 참조하라)는 6167 bp 이며 표 11A 및 11B 에 기재된 7 개의 기능적인 영역을 함유한다.

표 11A

플라스미드 염기쌍
번호 :

2 내지 881	소의 뇌하수체 글리코단백질 호르몬의 α -서브유닛 (α -FSH) 으로부터의 전사 말단/폴리아데닐화 신호 (Goodwin 등의, 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11:6873-82; 진뱅크 기탁 번호 제 X00004 호)
882 내지 2027	내인성 마우스 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 프로모터, cDNA 코딩 서열 및 DHFR 전사 말단/폴리아데닐화 신호를 함유하는 마우스 DHFR 미니 유전자 (Gasser 등의, 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79:6522-6; Nunberg 등의, 1980, <i>Cell</i> 19:355-64; Setzer 등의, 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257:5143-7; McGrogan 등의, 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260:2307-14)
2031 내지 3947	암피실린 내성 마커 유전자 및 <i>E. coli</i> 내의 플라스미드의 복제 기원을 함유하는 pBR322 서열 (진뱅크 기탁 번호 제 J01749 호)
3949 내지 4292	SV40 초기 프로모터, 인핸서 및 복제 기원 (Takebe 등의, 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8:466-72, 진뱅크 기탁 번호 제 J02400 호)
4299 내지 4565	HTLV-1 LTR 로부터의 번역 인핸서 요소 (Seiki 등의, 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 80:3618-22, 진뱅크 기탁 번호 제 J02029 호)
4574 내지 4730	SV40 16S, 19S 스플라이스 공여체/수용체 신호로부터의 인트론 (Okayama 및 Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> 3:280-9, 진뱅크 기탁 번호 제 J02400 호)
4755 내지 6167	<i>Xba</i> I 및 <i>Sal</i> I 부위 사이의 hVh/hCh4 중쇄 cDNA. 이 중쇄 단편의 서열은 밑줄이 그어진 제한 부위를 갖는 하기 서열이다 (SEQ ID NO:58): <p style="text-align: center;"><i>Xba</i>I</p> <p>TCT AGACCACCAT GGACATGAGG GTCCCCGCTC AGCTCCTGGG GCTCCTGCTA TTGTGGTTGA GAGGTGCCAG ATGTGAGGTC CAGCTGGTGCAGTCTGGGGG AGGCTTGGTA CATCCTGGGG GGTCCCTGAG ACTCTCCTGTGCAGGCTCTG GATTCACCTT CAGTGGCCAT GCTTTGCACT GGGTTCGCCAGGCTCCAGGA AAAGGTCTGG AGTGGGTATC AGGTATTGGT ACTCATGGTGGGACATACTA TGCAGACTCC GTGAAGGGCC GATTCACCAT CTCCAGAGACAATGCCAAGA ACTCCTTGTT TCTTCAAATG AACAGCCTGA GCGCCGAGGACATGGCTGTG TATTACTGTA CAAGAAGAAA CTGGGGACAA TTTGACTACTGGGGCCAGGG</p> <p style="text-align: center;"><i>Bsm</i>B1</p> <p>AACCCTGGTC ACCGTCTCTA GTGCCAGCAC CAAGGGGCCATCCGTCCTCC</p>

[0324]

표 11B

	CCCTGGCGCC CTGCTCCAGG AGCACCTCCG AGAGCACAGCCGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCGAACCG GTGACGGTGTCTGTGGAATC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTCCTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCCTCCAGCAGCTTG GGCACGAAGA CCTACACCTG CAACGTAGAT CACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGAGT CCAAATATGG TCCCCATGCCCATCATGCC CAGCACCTGA GTTCCTGGGG GGACCATCAG TCTTCCTGTTCCCCCAAAA CCCAAGGACA CTCTCATGAT CTCCCGGACC CCTGAGGTACGTCGCTGGT GGTGGACGTG AGCCAGGAAG ACCCCGAGGT CCAGTTCAACTGGTACGTGG ATGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTTC AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGCACCAGGACTG GCTGAACGGC AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAAGGCCTCCCGT CCTCCATCGA GAAAACCATC TCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAGCCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCAGGAG GAGATGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA CCCAGCGACATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACT CCGACGGCTC CTCTTCCTC TACAGCAGGCTAACCGTGGA CAAGAGCAGG TGGCAGGAGG GGAATGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC <div style="text-align: right;"><i>SaII</i></div> ACACAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAATGATAAG TCGAC
--	---

[0325]

[0326] 인체 가변 영역을 제거하기 위해 pDSR19 : 인체 가변 영역/인체 불변 영역 IgG4 플라스미드를 제한 효소 XbaI 및 BsmBI 로 절단하여 선형 플라스미드 pDSR α 19 : hIgG4C_H 를 제조하였으며 이를 QIAquick 겔 추출 키트를 사용하여 정제하였다. 1 kbp 인체 IgG4 불변 영역 도메인을 함유하는 선형 플라스미드 pDSR α 19 : hIgG4C_H 를 하이브리도마 유래 α IL-1R 항체 가변 영역을 수득하기 위해 사용하였다.

[0327] 항-IL-1R1 IgG4 중쇄 발현 클론의 구성

[0328] 상기 기술된 α IL-1R1 15C4 중쇄 가변 영역 단편을 포유동물 발현 벡터 pDSR α 19 : hIgG4C_H 내로 결합시켰다. 15C4 하이브리도마에서 확인된 동일한 중쇄 가변 영역 펩티드를 코드함을 확인하기 위해 15C4 중쇄 IgG4 발현 클론을 DNA 서열결정하였다. 최종 발현 벡터인 pDSR α 19 : 15C4 IgG4 중쇄는 6164 bp 이며 표 12 에 기재된 7 개의 기능적인 영역을 함유한다.

표 12

플라스미드 염기쌍
번호 :

2 내지 881	소의 뇌하수체 글리코단백질 호르몬의 α-서브유닛 (α-FSH) 으로부터의 전사 말단/폴리아데닐화 신호 (Goodwin 등의, 1983, <i>Nucleic Acids Res.</i> 11:6873-82; 진뱅크 기탁 번호 제 X00004 호)
882 내지 2027	내인성 마우스 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 프로모터, cDNA 코딩 서열 및 DHFR 전사 말단/폴리아데닐화 신호를 함유하는 마우스 DHFR 미니 유전자 (Gasser 등의, 1982, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 79:6522-6; Nunberg 등의, 1980, <i>Cell</i> 19:355-64; Setzer 등의, 1982, <i>J. Biol. Chem.</i> 257:5143-7; McGrogan 등의, 1985, <i>J. Biol. Chem.</i> 260:2307-14)
2031 내지 3947	암피실린 내성 마커 유전자 및 <i>E. coli</i> 내의 플라스미드의 복제 기원을 함유하는 pBR322 서열 (진뱅크 기탁 번호 제 J01749 호)
3949 내지 4292	SV40 초기 프로모터, 인핸서 및 복제 기원 (Takebe 등의, 1988, <i>Mol. Cell Biol.</i> 8:466-72, 진뱅크 기탁 번호 제 J02400 호)
4299 내지 4565	HTLV-1 LTR 로부터의 번역 인핸서 요소 (Seiki 등의, 1983, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 80:3618-22, 진뱅크 기탁 번호 제 J02029 호)
4574 내지 4730	SV40 16S, 19S 스플라이스 공여체/수용체 신호로부터의 인트론 (Okayama 및 Berg, 1983, <i>Mol. Cell Biol.</i> 3:280-9, 진뱅크 기탁 번호 제 J02400 호)
4755 내지 6164	XbaI 및 SalI 부위 사이의 15C4 중쇄 IgG4 cDNA

[0329]

[0330]

[0331]

실시예 7

차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포에서의 항-IL-1R1 항체의 발현

[0332]

제조항 항-IL-1R1 항체를 미국 특허 번호 제 6,210,924 호(본원에 참고문헌으로 인용됨)에 기재된 바와 같이 차이니스 햄스터 난소 세포, 특히 CHO AM-1/D(암젠 인코포레이티드에서 입수)에서 생성하였다. 간략하게, 본 발명의 각 항-IL-1R1 항체의 완전 중쇄 또는 경쇄를 코딩하는 DNA 서열을 발현 벡터 내로 클로닝시켰다. 완전 중쇄를 발현할 수 있는 발현 벡터 및 적절한 항-IL-1R1 항체의 완전 경쇄를 발현하는 발현 벡터를 함께 CHO AM-1/D 세포에 공동-트랜스펙션시켰다. 예를 들어, 26F5 항체를 생성하기 위해, SEQ ID NO : 38 에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 완전 경쇄를 발현할 수 있는 벡터 및 SEQ ID NO : 20, SEQ ID NO : 22 또는 SEQ ID NO : 24 에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 완전 중쇄를 발현할 수 있는 벡터를 세포에 공동-트랜스펙션시켰다. 27F2 항체를 생성하기 위해, SEQ ID NO : 38 에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 완전 경쇄를 발현할 수 있는 벡터 및 SEQ ID NO : 26, SEQ ID NO : 28 또는 SEQ ID NO : 30 에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 완전 중쇄를 발현할 수 있는 벡터를 세포에 공동-트랜스펙션시켰다. 15C4 항체를 생성하기 위해, SEQ ID NO : 40 에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하는 완전 경쇄를 발현할 수 있는 벡터 및 SEQ ID NO : 32, SEQ ID NO : 34 또는 SEQ ID NO : 36 에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 완전 중쇄를 발현할 수 있는 벡터를 세포에 공동-트랜스펙션시켰다. 표 13 에 다양한 IL-1R1 항체의 완전 중쇄 및 완전 경쇄를 나타내었다. ".../IgG_" 의 표기는 특정 항체의 불변 영역의 서열을 기재한 것이다.

표 13

항체	중쇄 가변 영역 + 중쇄 불변 영역	완전 중쇄
26F5/IgG1 (뉴클레오티드)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 19
26F5/IgG1 (아미노산)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 20
26F5/IgG2 (뉴클레오티드)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 21
26F5/IgG2 (아미노산)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 22
26F5/IgG4 (뉴클레오티드)	SEQ ID NO: 9 + SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 23
26F5/IgG4 (아미노산)	SEQ ID NO: 10 + SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 24
27F2/IgG1 (뉴클레오티드)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 25
27F2/IgG1 (아미노산)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 26
27F2/IgG2 (뉴클레오티드)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 27
27F2/IgG2 (아미노산)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 28
27F2/IgG4 (뉴클레오티드)	SEQ ID NO: 13 + SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 29
27F2/IgG4 (아미노산)	SEQ ID NO: 14 + SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 30
15C4/IgG1 (뉴클레오티드)	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 31
15C4/IgG1 (아미노산)	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 32
15C4/IgG2 (뉴클레오티드)	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 33
15C4/IgG2 (아미노산)	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 34
15C4/IgG4 (뉴클레오티드)	SEQ ID NO: 15 + SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 35
15C4/IgG4 (아미노산)	SEQ ID NO: 16 + SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 36
항체	경쇄 가변 영역 + 경쇄 불변 영역	완전 경쇄
26F5/27F2 (뉴클레오티드)	SEQ ID NO: 11 + SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 37
26F5/27F2 (아미노산)	SEQ ID NO: 12 + SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 38
15C4 (뉴클레오티드)	SEQ ID NO: 17 + SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 39
15C4 (아미노산)	SEQ ID NO: 18 + SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 40

[0333]

[0334] 항-IL-1R1 항체의 안정한 발현은 발현 벡터들을 디하이드로폴레이트 환원효소 결핍(DHFR⁻) CHO AM-1/D 세포에 공동-트랜스펙션시켜 이루었다. 표준 기술(인산칼슘 공동-침전) 및 DHFR 선별을 사용하여 트랜스펙션을 실행하였다. 트랜스펙션된 콜로니를 분리하고 24-웰 플레이트에서 집합으로 성장시켰다. 트랜스펙션된 세포에 의해 생성된 항체를 적절한 집합 및 중화 활성에 대해 실험하였다. IgG1, IgG2 및 IgG4 이소타입의 적절하게 접혀진 항-IL-1R1 항체를 과생산하는 클론을 선별하고 항체를 하기와 같이 정제하였다.

[0335]

실시예 8

[0336]

항-IL-1R1 항체의 생산

[0337] 항-IL-1R1 항체를 CHO 세포의 클론주에서 발현시켜 생산하였다. 각각의 생산에서, 하나의 작은 병으로부터의 세포를 무혈청 세포배양 배지 내에서 녹였다. 세포를 초기에는 T-플라스크에서 배양시키고 20 L 생물반응기에 접종하기에 적절한 접종물을 생산할 때까지 연속적인 회전 (Spinner) 플라스크에서 연속적으로 증가시켰다. 5-10 일 동안 성장시킨 후에, 배양물을 300 L 생물반응기에 접종하는데 사용하였다. 추가로 5-10 일 동안 더 성장시킨 후에, 배양물을 2000 L 생물반응기에 접종하는데 사용하였다. 유가 배양법을 사용하여 2000 L 생물반응기에서 생산하였으며 농축된 배지 성분을 함유하는 영양 먹이를 첨가하여 세포 성장 및 배양 생존력을 유지하였다. 항-IL-1R1 항체가 세포에 의해 구조적으로 생산되고 세포배양 배지 내로 분비되는 시간인 약 2 주간 생산을 지속하였다.

[0338] 생산 반응기를 pH, 온도 및 용존 산소 수준을 맞추어 조절하였다 : pH 는 이산화탄소 가스 및 탄산나트륨을 첨가하여 조절하였으며 ; 용존 산소는 공기, 질소 및 산소 가스 흐름으로 조절하였다.

[0339] 생산의 마지막에서, 세포 배양액을 디스크 스택 원심분리기(disk stack centrifuge) 내로 공급하고 배양 상청액을 세포로부터 분리하였다. 농축물을 심도(depth) 필터에 통과시킨 후 0.2 μm 필터에 통과시켜 더 투명하게 만들었다. 그런 다음 투명한 조정 배지를 접선 유동 한외여과 (tangential flow ultrafiltration)로 농축시켰다. 조정 배지를 15 내지 30 배 농축시켰다. 결과적으로 생성된 농축 조정 배지를 훗날의 정제를 위해 정제시키거나 냉동시켰다.

[0340] **실시예 9**

[0341] **아비딘-융합 단백질을 사용한 에피토프 맵핑**

[0342] 아비딘-융합 단백질을 생산하기 위해, 닭 아비딘을 코딩하는 cDNA(내인성 신호 서열을 수반함)를 3' 말단에서 FLAG-표식 서열에 융합된 인체 또는 사이노몰구스 IL-1R1 의 성숙한 외인성 도메인을 코딩하는 cDNA 의 5' 말단에 결합시켰다. FLAG-표식 융합 유전자를 통상적인 분자 기술을 사용하여 pALTERMAX 벡터(프로메가 코포레이션에서 입수) 내로 결합시켰다. 아비딘-인체 IL-1R1 융합 단백질의 아미노산 서열을 도 23 에 나타내었다(SEQ ID NO : 59). 아비딘-사이노몰구스 IL-1R1 융합 단백질의 아미노산 서열을 도 24 에 나타내었다(SEQ ID NO : 60). 상응하는 사이노몰구스 잔기로 치환된 인체 아미노산의 돌연변이 아비딘 사이노IL-1R1-FLAG 단백질을 Altered Site® II 포유동물 생체의 돌연변이유발 시스템(프로메가 코포레이션에서 입수)을 사용하여 생성하였다. 돌연변이는 도 24 에 나타내었다.

[0343] 아비딘 huIL-1R1 FLAG 단백질 뿐만 아니라 아비딘-사이노IL-1R1 돌연변이 및 야생형 단백질을 코딩하는 플라스미드를 사이토팩트 트랜스펙션 시약(바이오-라드 라보라토리스, 인코포레이티드에서 입수)을 사용하여 293T 세포(통상적으로 입수가 가능한 표준 인체 신장 세포주임)에 순간적으로 트랜스펙션시켰다. 아무것도 트랜스펙션시키지 않은 트랜스펙션체를 음성 대조로서 사용하였다. 이러한 단백질에 결합하는 항-huIL-1R1 모노클로날 항체(MAb)를 트랜스펙션된 세포로부터 수확한 조정 배지(CM)을 사용하여 웨스턴 블롯팅 및 비드-기저 결합 검정으로 평가하였다.

[0344] 웨스턴 블롯팅 검정에서, CM 을 비환원 SDS 시료 완충용액에 1 : 3 으로 희석시키고 5-10 분간 끓인 후 10 % 트리스-글리신 겔에 로딩시켰다. SDS-PAGE 및 웨스턴 전이 후 막을 PBS/0.1 % 트윈-20(PBST)에 용해된 3 % BSA/1 % 오브알부민으로 차단하고 항-huIL-1R1 MAb 로 염색하였다.

PBST 에 1 : 15,000 으로 희석된 염소 항-인체 IgG-Fc-HRP 항체(피어스 케미컬 컴퍼니에서 입수)를 2 차 검출에 사용하였다. 항-FLAG 검출은 단백질 로딩을 표준화하는데 사용되었다. 이미지 캡처(Image capture) 및 농도계측을 FluorChem 8000 디지털 이미징 시스템(알파 이노텍 코포레이션에서 입수)을 사용하여 수행하였다. 항-huIL-1R1 MAb 에 대한 신호 강도를 단백질 로딩에서의 변이를 설명하기 위해 항-FLAG 항체에 대한 수치에 대해 표준화하였다. 항체 결합은 아비딘-인체 IL-1R1-FLAG 에 대한 결합의 백분율로서 나타내었다.

[0345] 웨스턴 블롯팅의 결과는 도 25A 에 나타내었다. 도 25B 는 2 회의 웨스턴 블롯팅 시험의 농도계측 분석을 나타낸 것이다. 항체 결합에 결정적인 인체 잔기는 사이노IL-1R1 내로 치환되었을 때 신호가 회복되는 잔기이다. 일반적으로, 단독으로 또는 조합한 돌연변이 1 및 2 (도 24 에 나타냄)에서 많은 항체(15C4/IgG2, 5B8, 1C2, 24H2, 16E9, 24E4 및 20G1)와의 결합이 회복된 반면 돌연변이 10.1 및 10.2 는 그렇지 않았다. 이들 항체중 야생형 사이노IL-1R1 에 결합한 항체는 없었다. 두 항체(27F2 및 19C8)는 야생형 사이노IL-1R1 뿐만 아니라 모든 돌연변이 단백질에 일관되게 결합하였다. 이는 랫/인체 유사체(paralog) 단백질에서 확인되고 사이노물구스 IL-1R1 에서 변화가 일어나지 않은 에피토프 4(사이노IL-1R1 의 잔기 Y279-V281)가 이러한 항체에 대한 우성 에피토프임을 제시한다. 에피토프 4 는 도 24 에 나타낸 아미노산 서열에서 밑줄이 그어진 굵은 이탤리체로 나타내었다.

[0346] 다중화된 비드-기저 결합 검정에서, 아비딘 융합 단백질을 비오틴-코팅 형광 비드와 함께 CM 에서 항온하여 수득하였으며 융합 단백질 당 하나의 비드이다(비드라이트 멀티-비오틴 10플렉스 비드 키트; 업스테이트 바이오테크놀로지스에서 입수). 비드를 세척하고 PBST 에 풀링시키고(pooled) 96-웰 필터 바닥 플레이트(밀리포어 코포레이션에서 입수)의 각 웰에 동량으로 분배하였다. 항체(항-huIL-1R1 MAb 또는 항-FLAG MAb)를 25 µg/ml 로 첨가하고 1 시간 동안 항온하였다. 비드를 다시 세척하고 피코에리트린-결합 항-마우스 IgG 항체 및 항-인체 IgG(Fab')₂ 의 혼합물을 항체 결합을 검출하는데 사용하였다. 1 시간 동안 항온한 후, 비드를 세척하고 PBST 에 재현탁시켰다. 평균 형광물질 강도(MFI)를 루미넥스 100(루미넥스 코포레이션에서 입수)을 사용하여 측정하였다. 데이터를 단백질 로딩에서의 변이를 설명하기 위해 항-FLAG MAb 결합에 대한 MFI 수치를 사용하여 표준화하였다. 항체 결합을 아비딘-huIL-1R1-FLAG 와의 결합의 백분율로서 표현하였다(도 26). 야생형 사이노물구스 및 인체 IL-1R1 단백질 뿐만 아니라 인체 잔기로 돌연변이를 일으킨 아비딘-사이노IL-1R1-FLAG 단백질에 대한 항-IL-1R1 항체의 결합 패턴은 도 25 에 보여진 이뮤노블롯 분석과 일치한다.

[0347] 상기 명세서는 본 발명의 특정 실시형태를 강조한 것이며 이의 모든 변형물 또는 대체 등가물이 첨부된 청구범위에 설명된 본 발명의 정신 및 범주 내에 포함됨이 이해될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1A-1B 는 인체 항-IL-1R1 항체 중쇄 IgG1 불변 영역(SEQ ID NO : 1)을 코드하는 cDNA 서열(도 1A) 및 인체 항-IL-1R1 항체 중쇄 IgG1 불변 영역(SEQ ID NO : 2)의 아미노산 서열(도 1B)을 나타낸 것이다.

[0046] 도 2A-2B 는 인체 항-IL-1R1 항체 κ 쇄 불변 영역(SEQ ID NO : 3)을 코드하는 cDNA 서열(도 2A) 및 인체 항-IL-1R1 항체 κ 쇄 불변 영역(SEQ ID NO : 4)의 아미노산 서열(도 2B)을 나타낸 것이다.

[0047] 도 3A-3B 는 인체 항-IL-1R1 항체 중쇄 IgG2 불변 영역(SEQ ID NO : 5)을 코드하는 cDNA 서열(도 3A) 및 인체 항-IL-1R1 항체 중쇄 IgG2 불변 영역(SEQ ID NO : 6)의 아미노산 서열(도 3B)을 나타낸 것이다.

[0048] 도 4A-4B 는 인체 항-IL-1R1 항체 중쇄 IgG4 불변 영역(SEQ ID NO : 7)을 코드하는 cDNA 서열(도 4A) 및 인체 항-IL-1R1 항체 중쇄 IgG4 불변 영역(SEQ ID NO : 8)의 아미노산 서열(도 4B)을 나타

낸 것이다.

- [0049] 도 5A-5B 는 26F5 항-IL-1R1 항체 중쇄 가변 영역(SEQ ID NO : 9)을 코드하는 cDNA 서열(도 5A) 및 26F5 항-IL-1R1 항체 중쇄 가변 영역(SEQ ID NO : 10)의 아미노산 서열(도 5B)을 나타낸 것이다.
- [0050] 도 6A-6B 는 26F5 항-IL-1R1 항체 κ 쇄 가변 영역(SEQ ID NO : 11)을 코드하는 cDNA 서열(도 6A) 및 26F5 항-IL-1R1 항체 κ 쇄 가변 영역(SEQ ID NO : 12)의 아미노산 서열(도 6B)을 나타낸 것이다.
- [0051] 도 7A-7B 는 27F2 항-IL-1R1 항체 중쇄 가변 영역(SEQ ID NO : 13)을 코드하는 cDNA 서열(도 7A) 및 27F2 항-IL-1R1 항체 중쇄 가변 영역(SEQ ID NO : 14)의 아미노산 서열(도 7B)을 나타낸 것이다.
- [0052] 도 8A-8B 는 15C4 항-IL-1R1 항체 중쇄 가변 영역(SEQ ID NO : 15)을 코드하는 cDNA 서열(도 8A) 및 15C4 항-IL-1R1 항체 중쇄 가변 영역(SEQ ID NO : 16)의 아미노산 서열(도 8B)을 나타낸 것이다.
- [0053] 도 9A-9B 는 15C4 항-IL-1R1 항체 κ 쇄 가변 영역(SEQ ID NO : 17)을 코드하는 cDNA 서열(도 9A) 및 15C4 항-IL-1R1 항체 κ 쇄 가변 영역(SEQ ID NO : 18)의 아미노산 서열(도 9B)을 나타낸 것이다.
- [0054] 도 10 은 15C4, 27F2 및 26F5 로 명명되는 항-IL-1R1 항체 중쇄의 아미노산 서열 배열을 나타낸 것이다. 상보적 결정 영역(CDRs)을 밑줄로 표시하였다. 26F5 에 대한 CDR1 은 SEQ ID NO : 61 에 나타내었고 ; 27F2 에 대한 CDR1 은 SEQ ID NO : 62 에 나타내었으며 ; 15C4 에 대한 CDR1 은 SEQ ID NO : 63 에 나타내었다. 26F5 에 대한 CDR2 는 SEQ ID NO : 64 에 나타내었고 ; 27F2 에 대한 CDR2 는 SEQ ID NO : 65 에 나타내었으며 ; 15C4 에 대한 CDR2 는 SEQ ID NO : 66 에 나타내었다. 26F5 에 대한 CDR3 는 SEQ ID NO : 67 에 나타내었고 ; 27F2 에 대한 CDR3 는 SEQ ID NO : 68 에 나타내었으며 ; 15C4 에 대한 CDR3 는 SEQ ID NO : 69 에 나타내었다.
- [0055] 도 11 은 15C4, 27F2 및 26F5 로 명명되는 항-IL-1R1- γ 항체 경쇄의 아미노산 서열 배열을 나타낸 것이다. 26F5/27F2 에 대한 CDR1 은 SEQ ID NO : 70 에 나타내었고 ; 15C4 에 대한 CDR1 은 SEQ ID NO : 71 에 나타내었다. 26F5/27F2 에 대한 CDR2 는 SEQ ID NO : 72 에 나타내었고 ; 15C4 에 대한 CDR2 는 SEQ ID NO : 73 에 나타내었다. 26F5/27F2 에 대한 CDR3 는 SEQ ID NO : 74 에 나타내었고 ; 15C4 에 대한 CDR3 는 SEQ ID NO : 74 에 나타내었으며 ; 15C4 에 대한 CDR3 는 SEQ ID NO : 75 에 나타내었다.
- [0056] 도 12 는 IL-1R/IL-1 β /IL-1RacP 복합체 형성에 대한 항-IL-1R1 항체의 저해 효과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [0057] 도 13 은 IL-1R/IL-1 α -IL-1RacP 복합체 형성에 대한 본원에 기재되어 있는 15C4 로 명명되는 항-IL-1R1 모노클로날 항체의 저해 효과를 그래프로 나타낸 것이다.
- [0058] 도 14 는 IL-1ra 의 결합은 현저하게 방해하지 않으면서, IL-1 β 결합을 차단하는 항-IL-1R1 항체의 능력을 IgG 대조군과 비교하여 그래프로 나타낸 것이다.
- [0059] 도 15A 는 본원에 기재되어 있는 15C4, 26F5 및 27F2 로 명명되는 항-IL-1R1 항체에 의한 일차 인체 연골세포에서의 IL-6 의 생성 저해를 IL-1ra 와 비교하여 그래프로 나타낸 것이다.
- [0060] 도 15B 는 IL-1ra 및 모노클로날 항체 15C4 와 27F2 에 의한 일차 인체 연골세포에서의 IL-6 의 생성 저해를 모노클로날 항체류를 대표하는 10H7 및 24E12 와 비교하여 그래프로 나타낸 것이다.
- [0061] 도 16 은 15C4, 26F5 및 26F2 로 명명되는 항-IL-1R1 모노클로날 항체에 의한 인체 전혈에서의 IL-6 의 생성 저해를 IL-1ra 와 비교하여 그래프로 나타낸 것이다.
- [0062] 도 17 은 세 번째 도메인 IL-1R1 서열의 인체 아미노산 서열(SEQ ID NO : 76)과 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO : 77) 및 랫 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO : 78)과 아미노산 서열(SEQ ID NO : 79)을 나타낸 것이다. 인체 서열 상의 번호가 매겨진 굵은 선은 15 개의 상이한 돌연변이 단백질을 구성하기 위해 돌연변이된 15 개의 상이한 부위를 나타낸다. 돌연변이에 의해 유도된 랫 잔

기는 랫 핵산 서열 아래에 기재하였다.

- [0063] 도 18 은 IL-1R1 돌연변이를 인지하는 항-IL-1R1 모노클로날 항체를 나타내는 웨스턴 블롯팅 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [0064] 도 19 는 (I) IL-1R1 과 IL-1 β 가 결합되고 IL-1RacP 가 보충되어 시작되는 IL-1 신호전달 경로의 활성화, 및 항-IL-1R1 항체의 세 개의 클래스인 (II) 세 번째 도메인 에피토프 IL-1 차단제, (III) 세 번째 도메인 에피토프 RAcP 차단제, 및 (IV) 첫 번째/두 번째 도메인 에피토프 IL-1 차단제를 도시하여 나타낸 것이다.
- [0065] 도 20 은 본원에 기재한 바와 같은 돌연변이 10 을 갖는 15C4 및 27F2 의 결정구조를 나타낸 것이다. 회색으로 나타낸 잔기는 15C4 및 27F2 에피토프를 나타낸 것이다.
- [0066] 도 21 은 세포외 IL-1R1 의 세 번째 도메인 내의 15C4 에피토프를 나타낸 것이다.
- [0067] 도 22 는 세포외 IL-1R1 의 세 번째 도메인 내의 24E12 에피토프를 나타낸 것이다.
- [0068] 도 23 은 본 발명의 아비딘-인체 IL-1R1-FLAG 키메라 단백질의 아미노산 서열(SEQ ID NO : 59)을 나타낸 것이다.
- [0069] 도 24 는 아비딘-사이노몰구스 IL-1R1-FLAG 키메라 단백질의 아미노산 서열(SEQ ID NO : 60)을 나타낸 것이다. 재조합 닭 아비딘(이텔릭체로 기재)은 6 개의 아미노산 링커에 의해 사이노몰구스 IL-1R1 의 성숙한 세포외 도메인(밑줄 표시, 굵은체로 표시한 C-말단 FLAG 표식을 수반함)에 결합된다. 사이노몰구스 서열 내로 단독 및 서로 조합하여 도입되는 인체 IL-1R1 의 4 개의 아미노산은 사이노몰구스 서열 아래에 굵은체로 나타내었다. 에피토프 4 는 굵은 이텔릭체로 나타낸 다음 밑줄로 표시하였다.
- [0070] 도 25A 는 IL-1R1 에 결합하는 항-인체 IL1-R1 항체(항-huIL1-R1)의 웨스턴 블롯팅 분석 결과를 나타낸 것이다. * 가 표시된 항체는 5 μ g/mL 로 사용되고 나머지 항체는 1 μ g/mL 로 사용된다.
- [0071] 도 25B 는 2 회에 걸친 웨스턴 블롯팅 실험의 농도계측적 분석 결과를 요약하여 나타낸 것이다.
- [0072] 도 26 은 아비딘 IL-1R1-FLAG 단백질에 결합하는 항-huIL1R1 항체의 결합에 대한 다중화된 비드-기저 결합 검정 결과를 나타낸 것이다.

도면

도면1A

중쇄 IgG1 불변 영역

```

gctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120
tggaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtccctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacc tcatgatctc ccggaccct 420
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag 720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactcag acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacagc 960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990
    
```


도면1B

ASTKGPSVFP	LAPSSKSTSG	GTAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSKV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTQT	YICNVNHNKPS	NTKVDKKVEP	KSCDKHTTCP	PCPAPELLGG	120
PSVFLFPPPKP	KDTLMISRTP	EVTCVVVDVSV	HEDPEVKFNW	YVDGVEVHNA	KTKPREEQYN	180
STYRVVSVLT	VLHQDWLNGK	EYKCKVSNKA	LPAPIEKTIS	KAKGQPREPQ	VYTLPPSRDE	240
LTKNQVSLTC	LVKGFYPSDI	AVEWESNGQP	ENNYKTTTPV	LDSGGSFFLY	SKLTVDKSRW	300
QQGNVFSCSV	MHEALHNHYT	QKSLSLSPGK				330

도면2A

κ쇄 불변 영역

cgaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcatc	ttcccccat	ctgatgagca	gttgaaatct	60
ggaactgcct	ctgttggtg	cctgctgaat	aacttctatc	ccagagaggc	caaagtacag	120
tggaaggtgg	ataacgcct	ccaatcgggt	aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	180
agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	accctgacgc	tgagcaaagc	agactacgag	240
aaacacaaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcaciaag	300
agcttcaaca	ggggagagtg	t				321

도면2B

RTVAAPSVFI	FPPSDEQLKS	GTASVVCLLN	NFYPREAKVQ	WKVDNALQSG	NSQESVTEQD	60
SKDSTYSLSS	TLTLSKADYE	KHKVYACEVT	HQGLSSPVTK	SFNRGEC		107

도면3A

중쇄 IgG2 불변 영역

gcctccacca	agggcccatc	ggtcttcccc	ctggcgccct	gctccaggag	cacctccgag	60
agcacagcgg	ccctgggctg	cctgggcaag	gactacttcc	ccgaaccggg	gacgggtgctg	120
tggaactcag	gcgctctgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	cagctgtcct	acagtcctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcaacttcgg	caccagacc	240
tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggaacaagac	agttgagcgc	300
aaatggtggtg	tcgagtgcct	accgtgcccc	gcaccacctg	tggaaggacc	gtcagctctc	360
ctcttcccc	caaaacccaa	ggacaccctc	atgatctccc	ggaccctga	ggtcacgtgc	420
gtgggtggtg	acgtgagcca	cgaagacccc	gaggtccagt	tcaactggta	cgtggacggc	480
gtggaggtgc	ataatgccaa	gacaaagcca	cgggaggagc	agttcaacag	caggttccgt	540
gtggtcagcg	tcctcaccgt	tgtgcaccag	gactggctga	acggcaagga	gtacaagtgc	600
aaggtctcca	acaaaggcct	cccagcccc	atcgagaaaa	ccatctccaa	aaccaagggg	660
cagccccgag	aaccacaggt	gtacaccctg	ccccatccc	gggaggagat	gaccaagaac	720
caggtcagcc	tgacctgct	ggtcaaaggc	ttctacccca	gcgacatcgc	cgtggagtgg	780
gagagcaatg	ggcagccgga	gaacaactac	aagaccacac	ctccatgct	ggactccgac	840
ggctccttct	tcctctacag	caagctcacc	gtggacaaga	gcaggtggca	gcaggggaac	900
gtcttctcat	gctccgtgat	gcatgaggct	ctgcacaacc	actacacgca	gaagagcctc	960
tcctctgctc	cgggtaaa					978

도면3B

ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSNFGTQT	YTCNVDPKPS	NTKVDKTVR	KCCVECP	APPVAGPSVF	120
LFPPKPKDTL	MISRTPEVTC	VVVDVSHEDP	EVQFNWYVDG	VEVHNAKTKP	REEQFNSTFR	180
VVSVLTVVHQ	DWLNQKEYKC	KVSNKGLPAP	IEKTIKTKG	QPREPQVYTL	PPSREEMTKN	240
QVSLTCLVKG	FYPSDIAVEW	ESNGQPENNY	KTPPMLDSD	GSFFLYSKLT	VDKSRWQQGN	300
VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL	SLSPGK				326

도면4A

중쇄 I_gG4 불변 영역

gccagcacca	aggggccatc	cgtcttcccc	ctggcgcct	gctccaggag	cacctccgag	60
agcacagccg	ccctgggctg	cctgggtcaag	gactacttcc	ccgaaccggt	gacgggtgctg	120
tggaactcag	gcgccctgac	cagcggcgtg	cacaccttcc	cggtgtctct	acagtctctca	180
ggactctact	ccctcagcag	cgtggtgacc	gtgccctcca	gcagcttggg	cacgaagacc	240
tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggacaagag	agttgagtcc	300
aaatattggtc	ccccatgccc	atcatgccc	gcacctgagt	tcctggggggg	accatcagtc	360
ttcctgttcc	ccccaaaacc	caaggacact	ctcatgatct	cccggacccc	tgagggtcacg	420
tgctgtgggg	tggactgtgag	ccaggaagac	cccaggttcc	agttcaactg	gtactgtggat	480
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccgcggggagg	agcagttcaa	cagcacgtac	540
cgtgtgggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	tgaacggcaa	ggagtacaag	600
tgcaaggtct	ccaacaaagg	cctcccgtcc	tccatcgaga	aaacctctc	caaagccaaa	660
ggcagcccc	gagagccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccaggagga	gatgaccaag	720
aaccaggtca	gcctgacctg	cctgggtcaaa	ggcttctacc	ccagcgacat	cgccgtggag	780
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgctcccctg	gctggactcc	840
gacggctcct	tcttctctca	cagcaggcta	accgtgraca	agagcaggtg	gcaggagggg	900
aatgtcttct	catgctccgt	gakgcatgag	gctctgcaca	accactacac	acagaagagc	960
ctctccctgt	ctctgggtaa	a				981

도면4B

ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	60
GLYSLSSVVT	VPSSSLGTKT	YTCNVDPKPS	NTKVDKRVES	KYGPPCPSCP	APFEGGSPSV	120
FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSEQD	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	180
RVVSVLTVLH	QDWLNQKEYK	CKVSNKGLPS	SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	240
NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTPPVLDL	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	300
NVFSCSVMHE	ALHNHYTQKS	LSLSLQK				327

도면5A

26F5 중쇄

atggagtttg	ggctgagctg	ggtcttctcc	gttgcctttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcgtg	gtccagcctg	ggaggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagcgt	ctggattcac	cttcagcaac	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcaggcatt	tggaatgatg	gaattaataa	ataccatgca	240
cactccgtga	ggggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcccagagac	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgcgag	agcacggctc	360
ttcgactggc	tattatttga	gttctggggc	cagggaaacc	tggtcacctg	ctctagt	417

도면5B

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQPGRSLRLS	CAASGFTFSN	YGMHWVRQAP	60
GKGLEWVAGI	WNDGINKYHA	HSVRGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSPRAEDT	AVYYCARARS	120
FDWLLFEFWG	QGTLVTVSS					139

도면6A

26F5 K 쇠

atggaagccc	cagctcagct	tctcttcctc	ctgctactct	ggctcccaga	taccaccgga	60
gaaattgtgt	tgacacagtc	tccagccacc	ctgtctttgt	ctccagggga	aagagccacc	120
ctctcctgca	gggccagtca	gagtgtagc	agctacttag	cctggtacca	acagaaacct	180
ggccaggctc	ccaggctcct	catctatgat	gcatccaaca	gggccactgg	catcccagcc	240
aggtcagtg	gcagtgggtc	tgggacagac	ttcactctca	ccatcagcag	cctagagcct	300
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcagcag	cgtagcaact	ggcctccgct	cactttcggc	360
ggagggacca	aggtggagat	caaa				384

도면6B

MEAPAQLLFL	LLLWLPDTTG	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP	60
GQAPRLLIYD	ASNRATGIPA	RFSGSGSGTD	FTLTISLEP	EDFAVYVCQQ	RSNWPLTFG	120
GGTKVEIK						128

도면7A

27F2 증쇄

atggagtttg	ggctgagctg	ggttttcctc	gttgctcttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcgtg	gtccagcctg	ggaggtccct	gagactctcc	120
tgtgcagtg	ctggattcac	cttcagtaac	tatggcatgc	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcagctata	tggaatgatg	gagaaaataa	acaccatgca	240
ggctccgtga	ggggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaaca	gcctgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	actgtgagag	aggacgatat	360
tttgactggt	tattatttga	gtattggggc	cagggaaacc	tggtcaccgt	ctctagt	417

도면7B

MEFGLSWVFL	VALLRGVQCQ	VQLVESGGGV	VQPGRSLRLS	CAVSGFTFSN	YGMHWVRQAP	60
GKGLEWVAAI	WNDGENKHHA	GSVRGRFTIS	RDNSKNTLYL	QMNSLRAEDT	AVYYCARGRY	120
FDWLLFEYWG	QGTLVTVSS					139

도면8A

15C4 중쇄

atgggggtcaa	ccgccatcct	cgccctcctc	ctggctgttc	tccaaggagt	ctgtgccgag	60
gtgcagctga	tgcagtctgg	agcagaggtg	aaaaagcccg	gggagtctct	gaagatctcc	120
tgtaaggggtt	ctggatacag	cttttccttc	cactggatcg	cctgggtgcg	ccagatgcc	180
gggaaaggcc	tggagtggat	ggggatcatc	catcctgggtg	cctctgatac	cagatacagc	240
ccgtccttcc	aaggccaggt	caccatctca	gccgacaact	ccaacagcgc	cacctacctg	300
cagtggagca	gcctgaaggc	ctcggacacc	gccatgtatt	tctgtgcgag	aaaaggga	360
ctcgactact	ttgactactg	gggccaggga	accctggtea	ccgtctctag	t	411

도면8B

MGSTAILALL	LAVLQGVCAE	VQLMQSGAEV	KKPGESLKIS	CKGSGYSFSF	HWIAWVRQMP	60
GKLEWMGII	HPGASDTRYs	PSFQGQVTIS	ADNSNSATYL	QWSSLKASDT	AMYFCARQRE	120
LDYFDYWGQG	TLVTVSS					137

도면9A

15C4 K쇄

atgtgccat	cacaactcat	tggtttctg	ctgctctggg	ttccagcctc	caggggtgaa	60
attgtgctga	ctcagtctcc	agactttcag	tctgtgactc	caaaggagaa	agtcaccatc	120
acctgccggg	ccagtcagag	cattggtagt	agcttacact	ggtaccagca	gaaaccagat	180
cagtctccaa	agctcctcat	caagtatget	tcccagtcct	tctcaggggt	cccctcgagg	240
ttcagtggca	gtggatctgg	gacagatttc	accctcacca	tcaatagcct	ggaagctgaa	300
gatgctgcag	cgtattactg	tcatcagagt	agtagtttac	ctctcacttt	cggcggaggg	360
accaaggtgg	agatcaaa					378

도면9B

MSPSQLIGFL	LLWVPASRGE	IVLTQSPDFQ	SVTPKEKVTI	TCRASQSIGS	SLHWYQKPD	60
QSPKLLIKYA	SQSFSGVPSR	FSGSGSTDF	TLTINSLEAE	DAAAYYCHQS	SSLPLTFGGG	120
TKVEIK						126

도면10

	CDR1			CDR2	
26F5	QVQLVESGGG	VVQGRSLRL	SCAASGFTFS	<u>NYGMHWVRQA</u>	PGKGLEWVAG <u>IWNDGINKYH</u>
27F2	QVQLVESGGG	VVQGRSLRL	SCAVSGFTFS	<u>NYGMHWVRQA</u>	PGKGLEWVAA <u>IWNDGENKHH</u>
15C4	EVQLMQSGAE	VKKPGESLKI	SCKGSGYSFS	<u>FHWIAWVRQM</u>	PGKGLEWMGI <u>IHPGASDTRY</u>

	CDR3					
26F5	<u>AHSVGRFTI</u>	SRDNSKNTLY	LQMNSPRAED	TAVYYCARAR	<u>SFDWLLFEFW</u>	GQGLTIVTVSS
27F2	<u>AGSVGRFTI</u>	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARGR	<u>YFDWLLFEYW</u>	GQGLTIVTVSS
15C4	<u>SPSFQGQVTI</u>	SADNSNSATY	LQWSSLKASD	TAMYFCARQR	<u>ELDYFDYWGQ</u>	GTIVTVTVSS

도면11

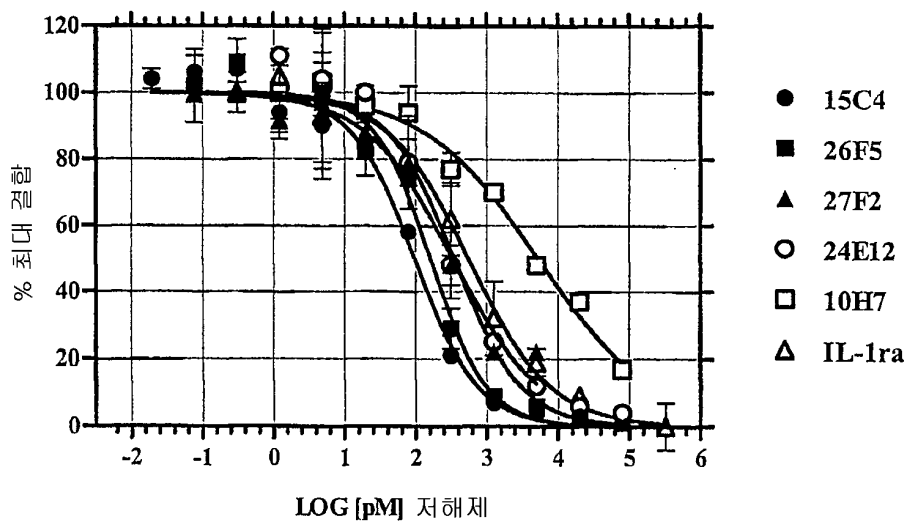
	CDR1				
26F5/27F2	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	SYLAWYQQKP	GQAPRLLIYD
15C4	EIVLTQSPDF	QSVTPKEKVT	ITCRASQSIG	SSLHWYQQKP	DQSPKLLIKY

	CDR2	CDR3			
26F5/27F2	<u>ASNRTGIPA</u>	RFSGSGSGTD	FTLTISSELP	EDFAVYYCQQ	RSNWPLTFG
15C4	<u>ASQSFSGVPS</u>	RFSGSGSGTD	FTLTINSLEA	EDAAAYYCHQ	SSSLPLTFGG

26F5/27F2	GGTKVEIK
15C4	GTKVEIK

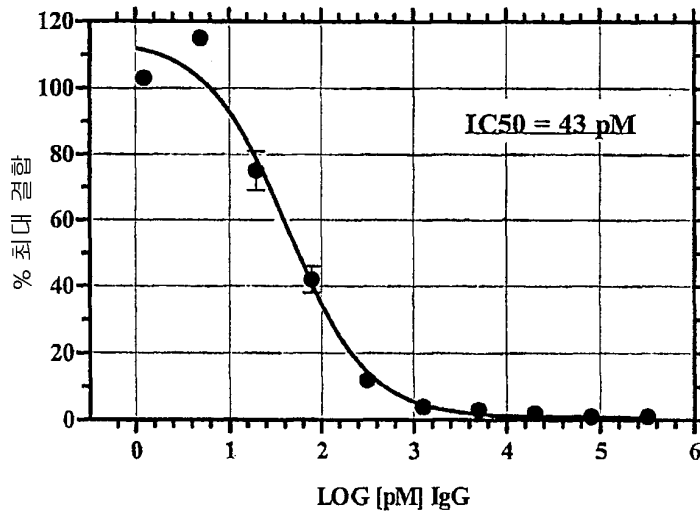
도면12

IL-1R1/IL-1β/RAcP 복합체 형성의 경쟁



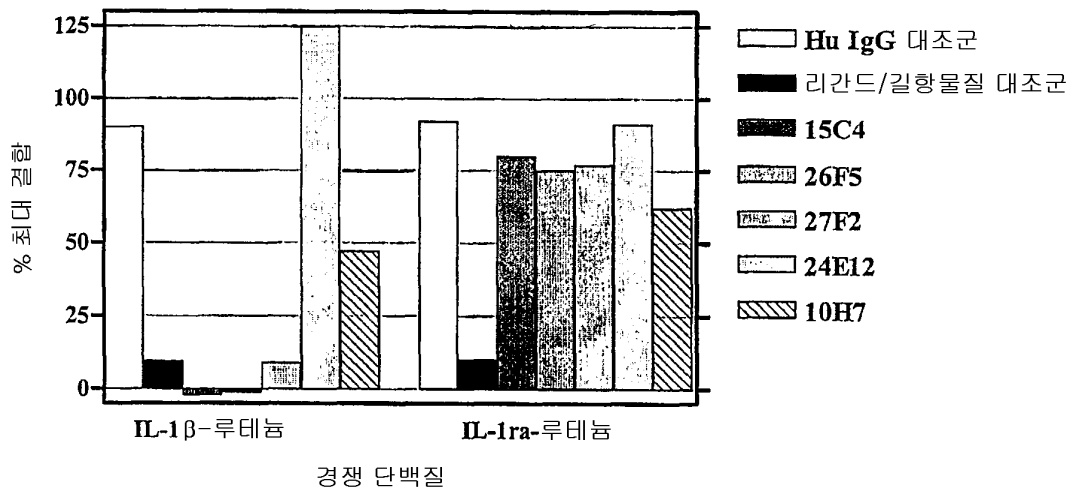
도면13

IL-1R1/IL-1 α /RAcP 복합체 형성의 15C4 경쟁



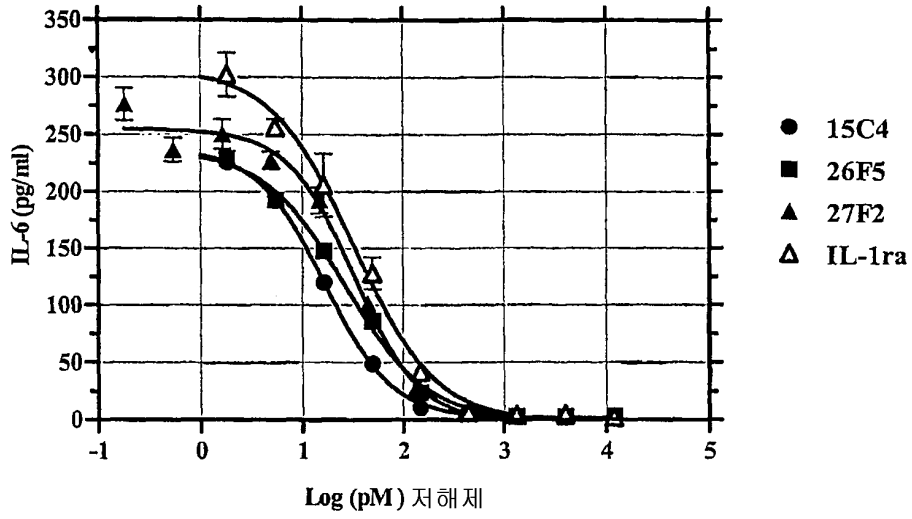
도면14

IL-1R1 에 결합하는 IL-1 β 및 IL-1ra 의 경쟁



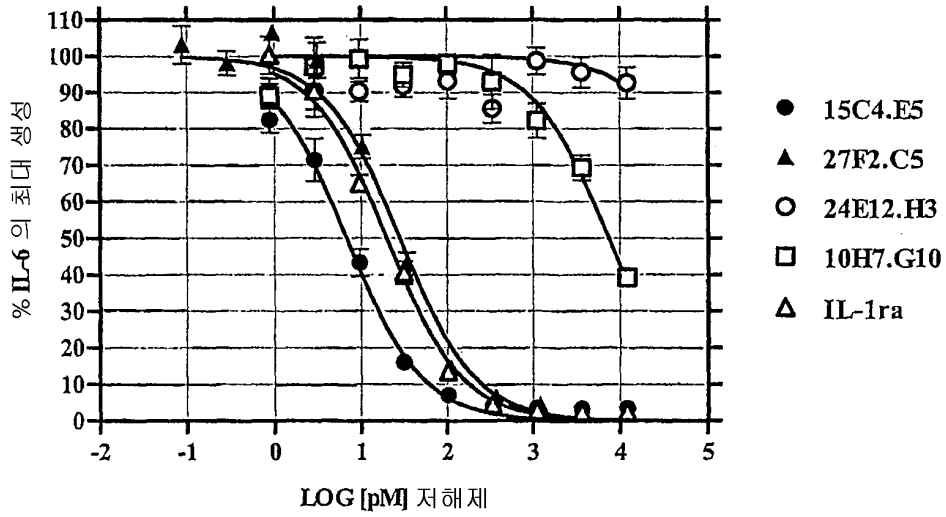
도면15A

일차 인체 연골세포에서의 IL-1 유도 IL-6 생성 저해



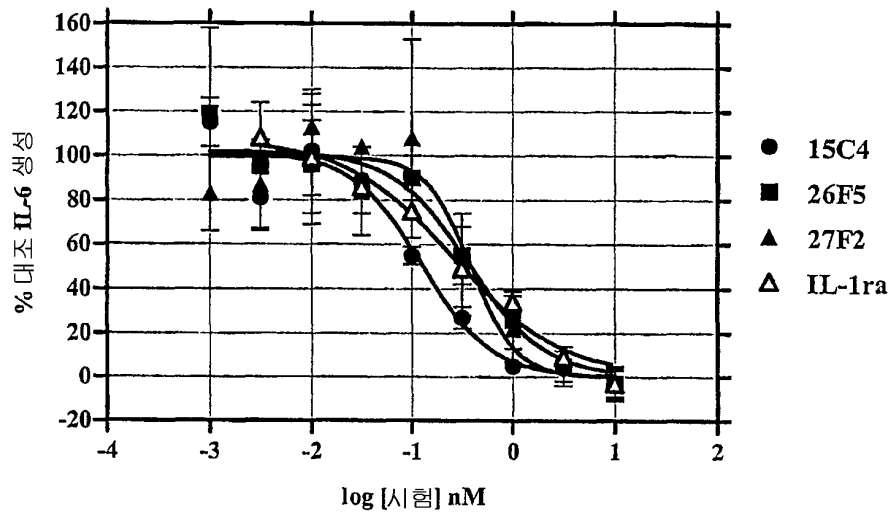
도면15B

일차 인체 연골세포에서의 IL-1 유도 IL-6 의 저해

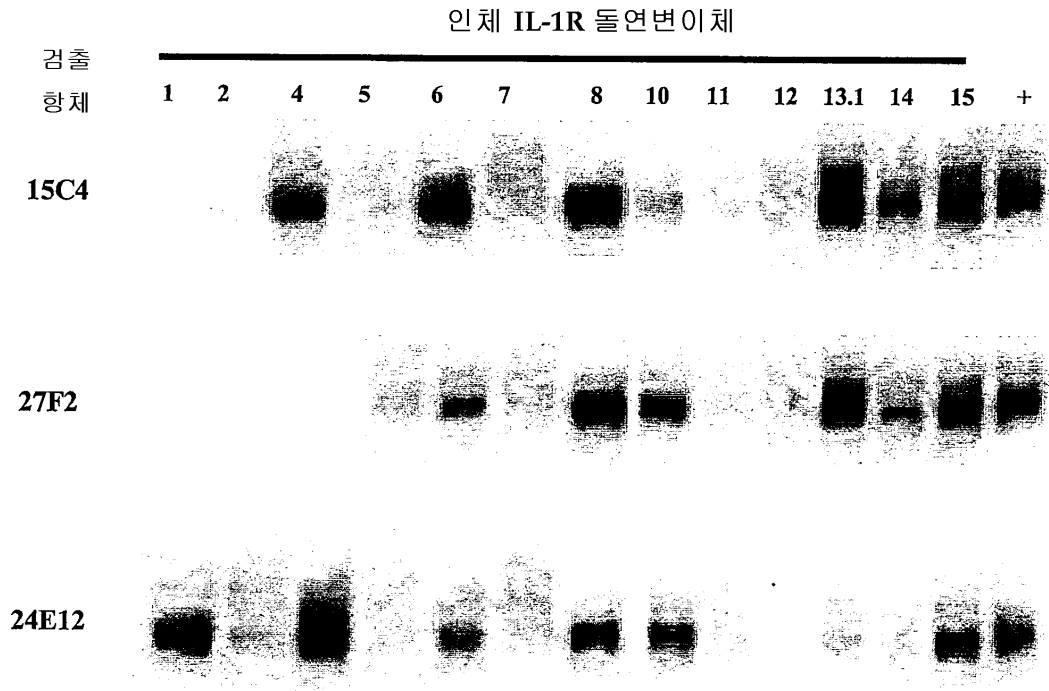


도면16

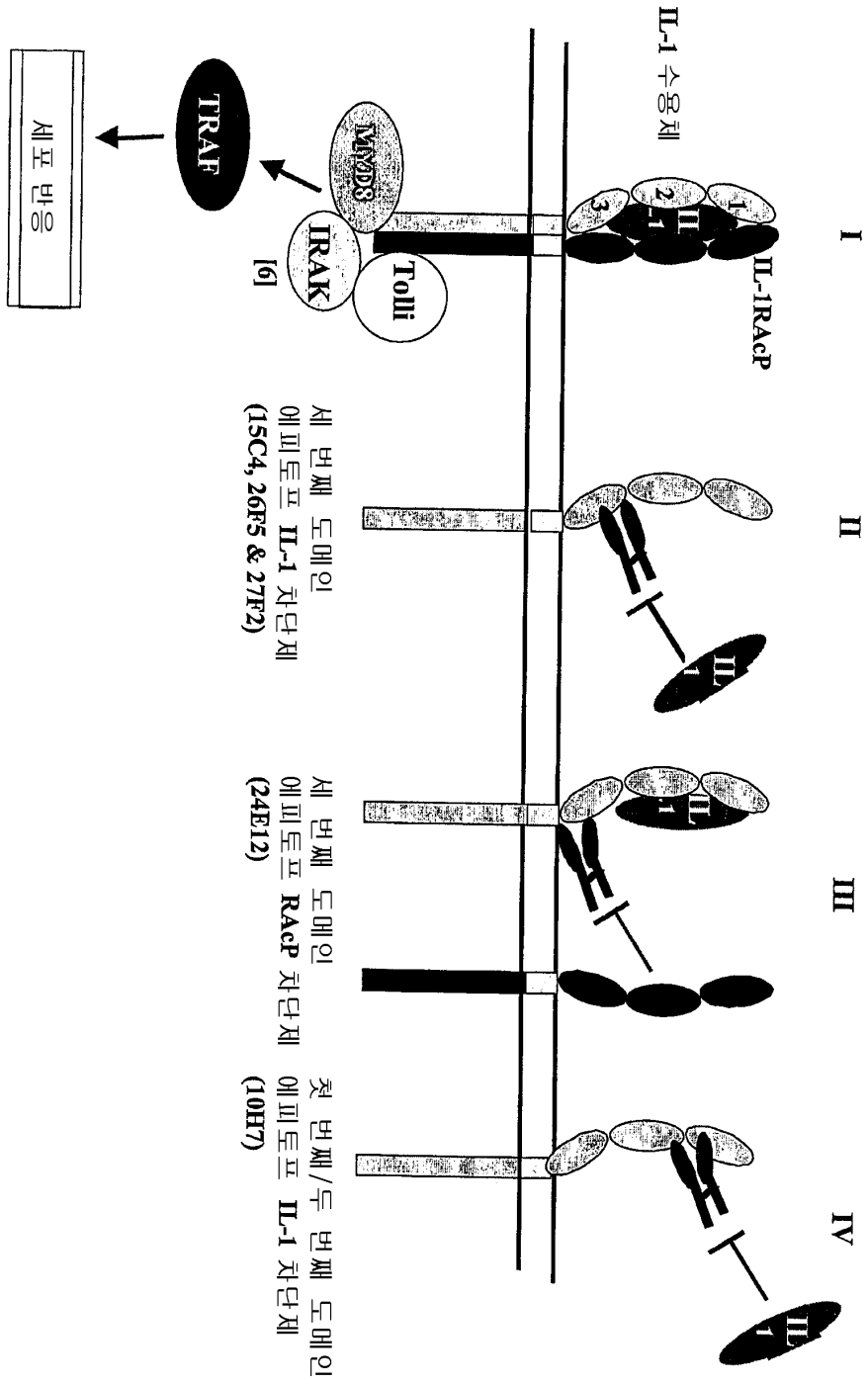
인체 전혈(복합물)에서의 IL-1 유도 IL-6 의 생성 저해



도면18



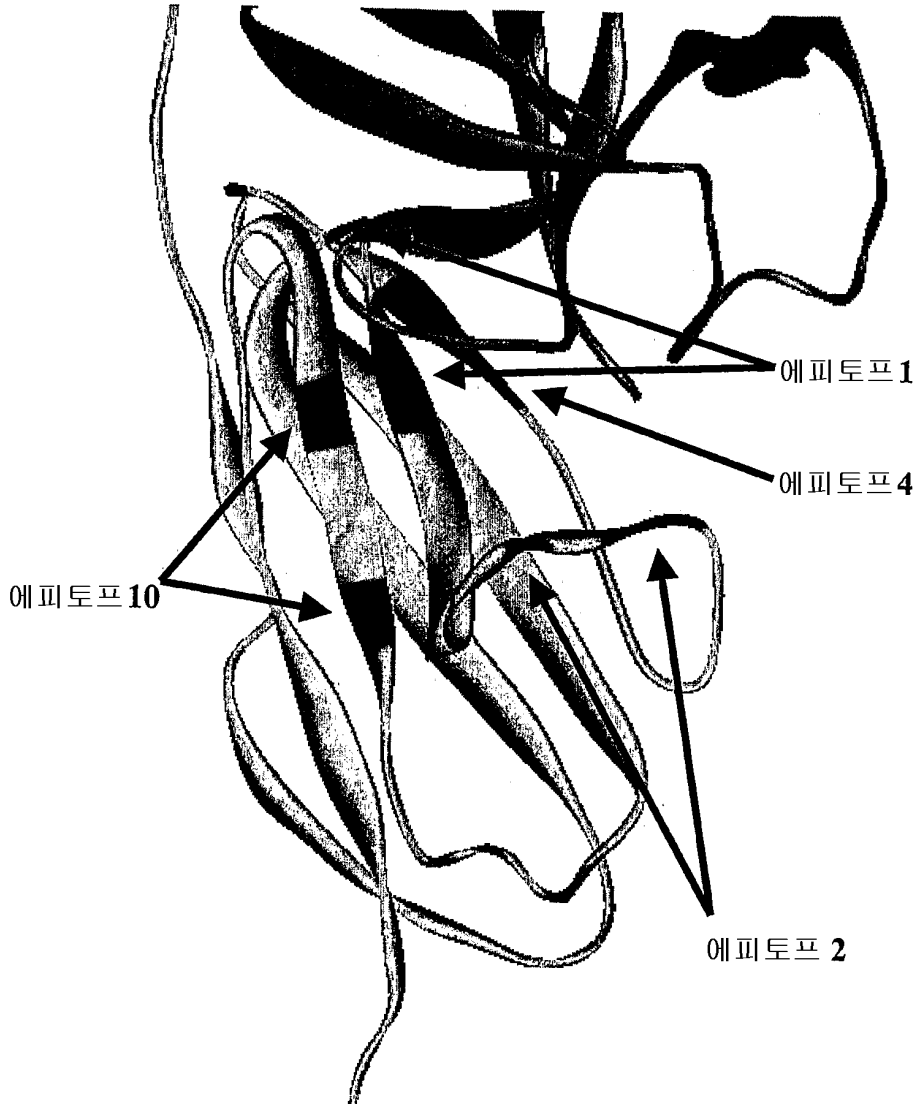
도면19



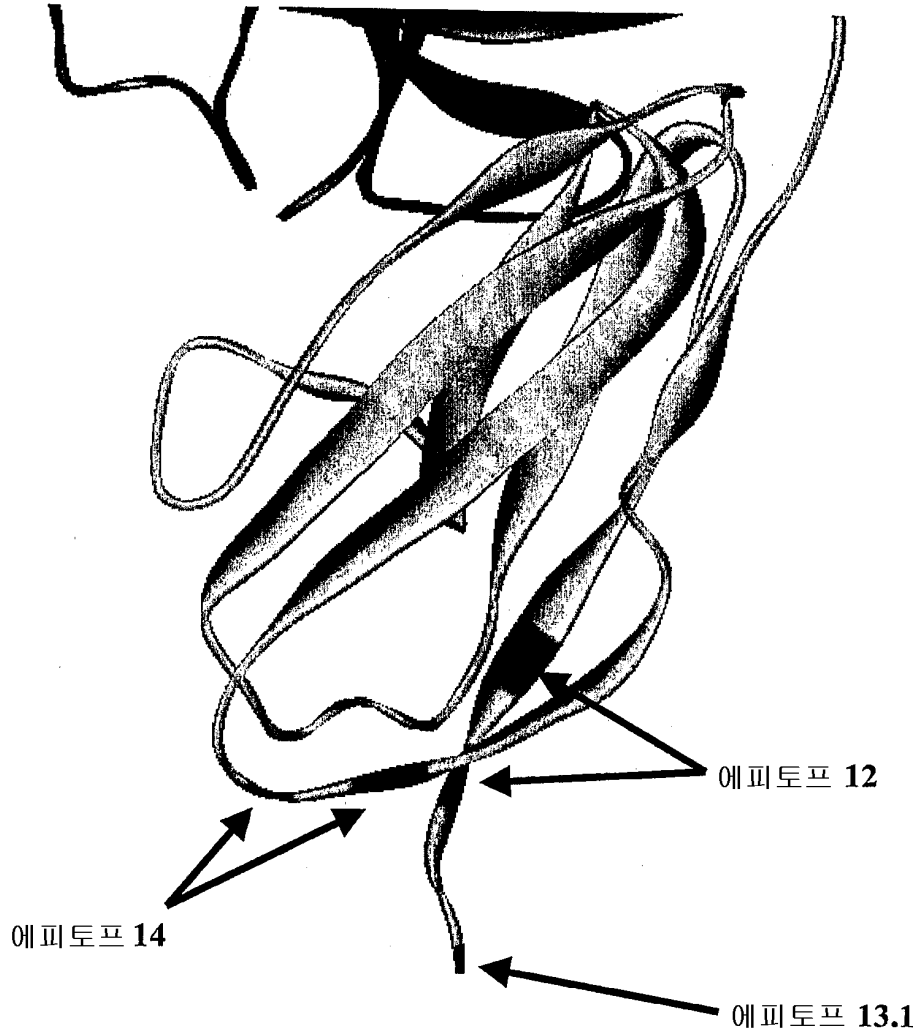
도면20



도면21



도면22



도면23

MVHATSPLLL	LLLLSLALVA	PGLSARKCSL	TGKWTNDLGS	NMTIGAVNSK	GEFTGTYTTA	60
VTATSNEIKE	SPLHGTQNTI	NKRTQPTFGF	TVNWKFSSEST	TVFTGQCFID	RNGKEVLKTM	120
WLLRSSVNDI	GDDWKATRVG	INIFTRLRTQ	KEQLLASLLE	ADKCKEREK	IILVSSANEI	180
DVRPCPLNPN	EHKGTITWYK	DDSKTPVSTE	QASRIHQHKE	KLWFPAMVE	DSGHYYCVVR	240
NSSYCLRIKI	SAKFVENEEN	LCYNAQAIFK	QKLPVAGDGG	LVCPYMEFFK	NENNELPKLQ	300
WYKDCKPLLL	DNIHFSGVKD	RLIVMNVAEK	HRGNYTCHAS	YTYLGKQYPI	TRVIEFITLE	360
ENKPTRPVIV	SPANETMEVD	LGSQIQLICN	VTGQLSDIAY	WKWNGSVIDE	DDPVLGEDYY	420
SVENPANKRR	STLITVLNIS	EIESRFYKHP	FTCFAKNTHG	IDAAYIQLIY	PVTNFQKDYK	480
DDDDK						485

도면24

1 MVHATSPLLL LLLLSLALVA PGLSARKCSL TGKWTNDLGS NMTIGAVNSK GEFTGTYYTTA
 61 VTATSNEIKE SPLHGTQNTI NKRTQPTFGF TVNWKFSSEST TVFTGQCFID RNGKEVLKTM
 121 WLLRSSVNDI GDDWKATRVG INIFTRLRTQ KEQLLASLLE ADKCNEREK IILVSSANEI
 181 DVRPCPLNPN EYKGTITWYK NDSKTPISTE QASRIHQHKK KLWFVPAKVE DSGHYVCVVR
 241 NSSYCLRIKI TAKFVENEPN LCYNAEAIK QRLPVAGDGG LVCPYMEFFK DENNELPKLL
 301 WYKDCKPLLL DNIHFSGVKD RLIVMNVAEK HRGNYTCHAS YTYLGKQYPI TRVIEFITLE

돌연변이 1 돌연변이 2



361 ENKPTRPVIV SPANETIEVD LGSQIQLICN VTGQLSDTAY WKWNGSFIDE DDPVLGEDYY
 인체

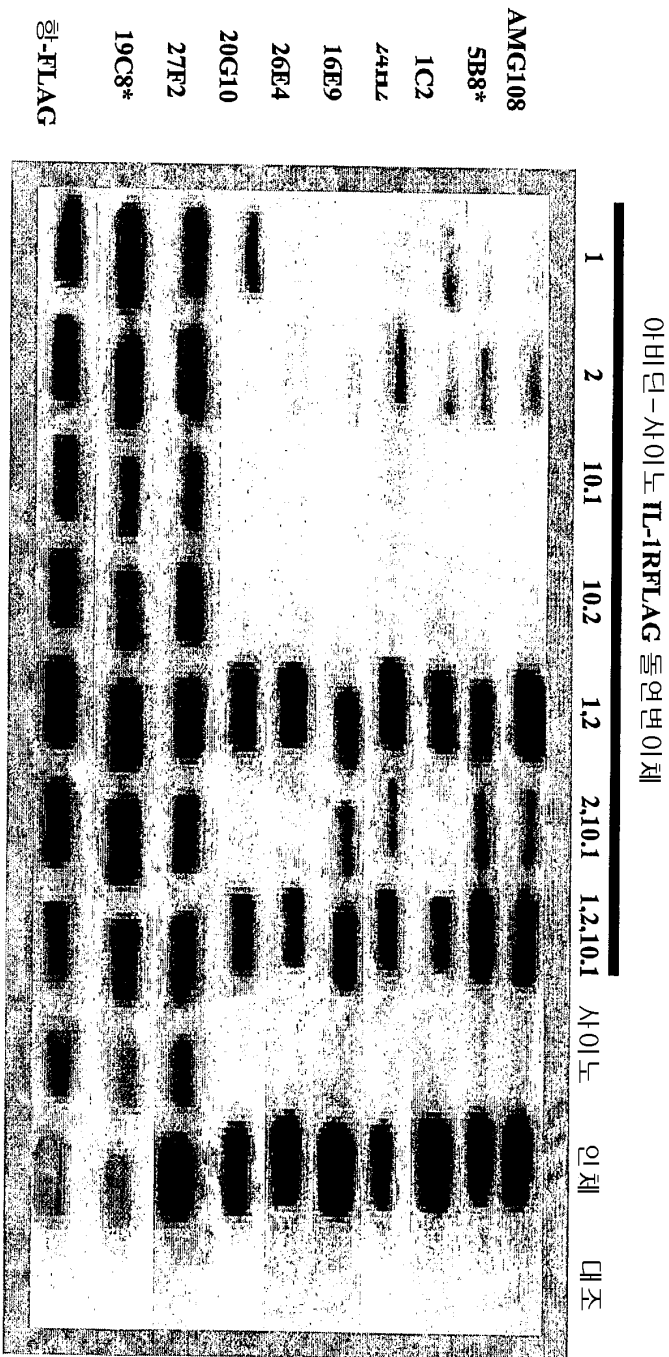
돌연변이 10.1 돌연변이 10.2



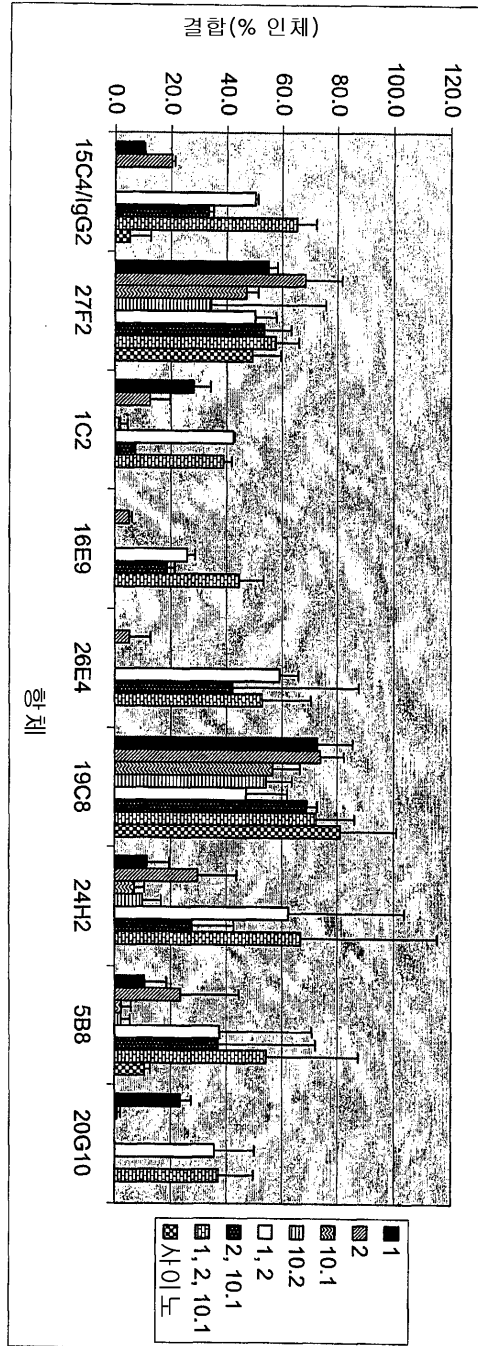
421 SVENPANKRR STLITVLNIS ETESRFYKHP FTCLARNTHG MDAAYVQLIY PVTKFQKDYK
 인체

481 DDDDK

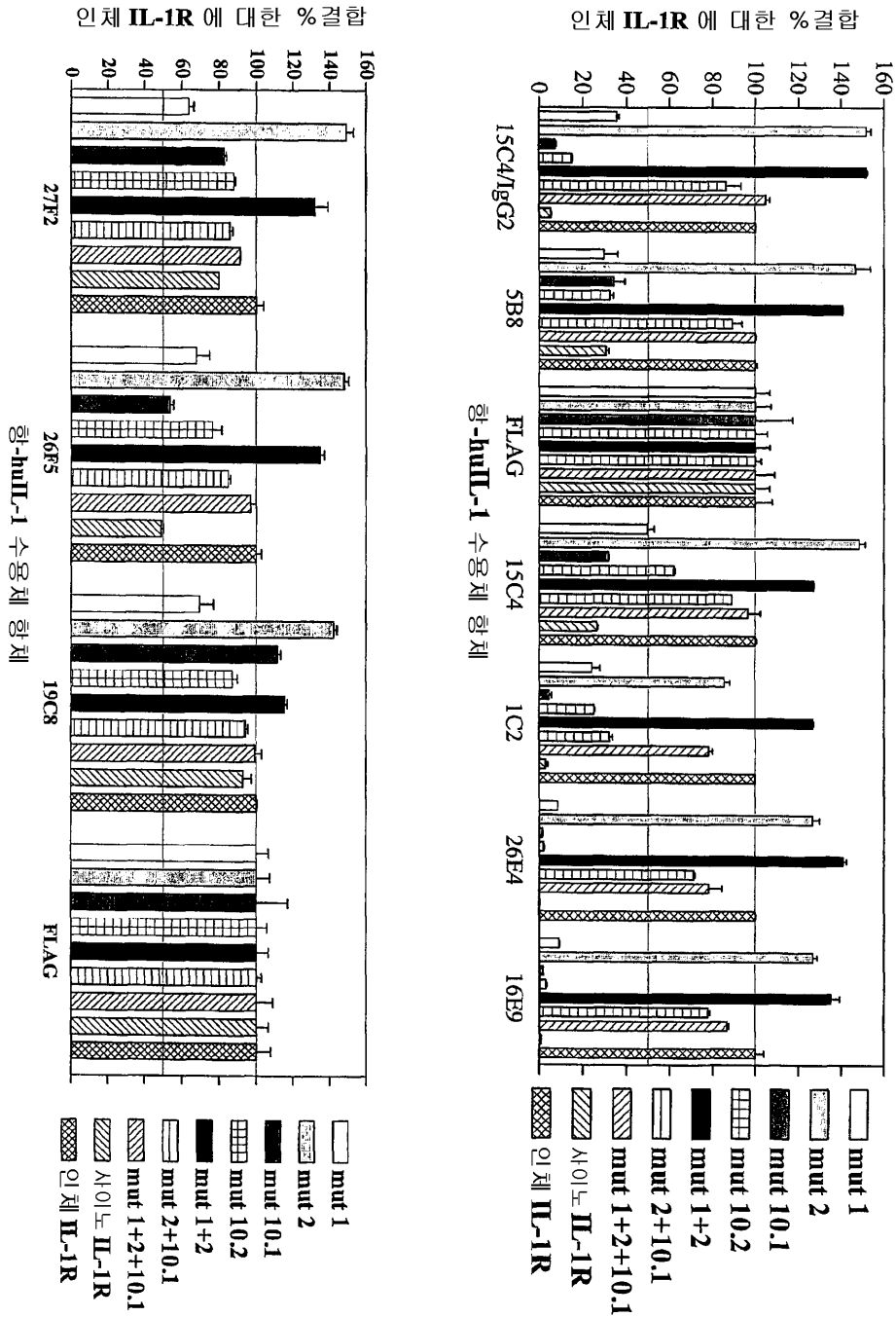
도면25A



도면25B



도면26



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Varnum, Brian

Witte, Alison

Vezina, Chris

Wong, Lu Min

Qian, Xueming

<120> Therapeutic Human Anti-IL-1R Monoclonal Antibody

<130> 01,1554

<160> 79

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 990

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 1
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60

ggcacagcgg cctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120

tggaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180

ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240

tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc 300

aaatcttgtg acaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360

ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc aaggacaccc teatgatctc cggaccct 420

gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtaa gttcaactgg 480

tacgtggagc gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540

agcacgtacc gtgtggcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660

aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacc tgccccatc cgggatgag 720

ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840

ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900

cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag 960

cagaagagcc tetccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 2

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245

250

255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 3

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 3

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 5

<211> 978

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60

agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120
 tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacaccttcc cagctgtcct acagtctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc 300
 aatgtttgtg tcgagtgcc accgtgcccga gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc 360
 ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 420
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc 480
 gtggaggtgc ataatccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt 540
 gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 600
 aaggtctcca acaaaggcct ccagccccc atcgagaaaa ccatctcaa aaccaaaggg 660
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac 720
 caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcg cgtggagtgg 780
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctccatgct ggactccgac 840
 ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac 900
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggt ctgcacaacc actacagca gaagagcctc 960
 tcctgtctc cgggtaaa 978

<210> 6

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

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

195

200

205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 7

<211> 981

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 7

gccagcacca aggggccatc cgtcttcccc ctggcgcct gtcaccaggag cacctccgag 60

agcacagccg cctgggctg cctggtaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120

tggaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300

aaatatggtc ccccatgccc atcatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360

ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420

tgcgtggggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540

cgtgtgggtca gcgtctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600

tgcaaggctct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaacctctc caagccaaa 660

gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag 720

aaccaggtca gctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 840

gacggctcct tcttctcta cagcaggcta accgtgraca agagcaggtg gcaggagggg 900

aatgtttct catgctccgt gakgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960

ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 8

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

245

250

255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 9

<211> 417

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 9

atggagtttg ggctgagctg ggtcttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc 120

tgtgcagcgt ctggattcac cttcagcaac tatggcatgc actgggtccg ccaggtcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcaggcatt tggaatgatg gaattaataa ataccatgca 240

cactccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcccgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agcacggtct 360

ttcactggc tattatttga gttctggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctagt 417

<210> 10

<211> 139

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Gly Ile Trp Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr His Ala
 65 70 75 80

His Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Pro Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 11

<211> 384

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 11

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggcctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
 ggccaggctc ccaggtcctt catctatgat gcatccaaca gggcactgg catcccagcc 240
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
 gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctecgct cactttcggc 360
 ggagggacca aggtggagat caaa 384

<210> 12

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110

Asn Trp Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

<210> 13

<211> 417

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 13

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc 120

tgtgcagtgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggtcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggaatgatg gagaaaataa acaccatgca 240

ggctccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag aggacgatat 360

tttgactggt tattatttga gtattggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctagt 417

<210> 14

<211> 139

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

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

Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys His His Ala
65 70 75 80

Gly Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 15

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 15

atggggtcaa cgcceatcct cgcctcctc ctgctgttc tccaaggagt ctgtgccgag 60
 gtgcagctga tgcagtctgg agcagagggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc 120
 tgtaagggtt ctggatacag ctttctctc cactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc 180
 gggaaaggcc tggagtggat ggggatcacc catcctggtg cctctgatac cagatacagc 240
 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaact ccaacagcgc cacctacctg 300
 cagtggagca gcctgaagge ctcggacacc gccatgtatt tctgtgagag acaaaggaa 360
 ctcgactact ttgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctctag t 411

<210> 16

<211> 137

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
 1 5 10 15
 Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
 35 40 45

Ser Phe His Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Met Gly Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
 65 70 75 80

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Asn Ser
 85 90 95

Ala Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 17

<211> 378

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 17

atgtcgcct cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcctc caggggtgaa 60

attgtgctga ctcagtctcc agactttcag tctgtgactc caaaggagaa agtcaccatc 120

acctgccggg ccagtcagag cattggtagt agcttacct ggtaccagca gaaaccagat 180

cagtctccaa agctctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg 240

ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc accctcacca tcaatagcct ggaagctgaa 300

gatgctgcag cgtattactg tcatcagagt agtagtttac ctctcacttt cggcggaggg 360

accaaggtgg agatcaaa

378

<210> 18

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val
20 25 30

Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys
50 55 60

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

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
85 90 95

Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser
100 105 110

Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 19

<211> 1407

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 19

atggagtttg ggctgagctg ggtcttctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcct gagactctcc 120

tgtgcagcgt ctggattcac cttcagcaac tatggcatgc actgggtccg ccaggtcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcaggcatt tggaatgatg gaattaataa ataccatgca 240

cactccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcccagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agcacggtct 360

ttcactggc tattatttga gttctggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctagtgcc 420

tccaccaagg gcccatcggc cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540

aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 600

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac 660

atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 720

tcttgtgaca aaactcacac atgeccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780

tcagtcttcc tcttcecccc aaaacceag gacacctca tgatctccc gaccttgag 840

gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactgttac 900

gtgacggcg tggaggtgca taatccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960

acgiaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1080

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1140

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaagget tctatcccag cgacatcgcc 1200

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260

gaticcgagc gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380

aagagcctct cctgtctcc gggtaaa 1407

<210> 20

<211> 469

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Gly Ile Trp Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr His Ala

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcct gagactctcc 120

tgtgcagcgt ctggattcac cttcagcaac tatggcatgc actgggtccg ccaggtcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcaggcatt tggaatgatg gaattaataa ataccatgca 240

cactccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcccagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agcacggtct 360

ttcgactggc tattatttga gtcttggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctagtgcc 420

tccaccaagg gcccatcggc ctccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540

aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 600

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca acttcggcac ccagacctac 660

acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaaa 720

tgttgtgtcg agtgcaccac gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc 780

ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga ccctgaggt cacgtgcgtg 840

gtggtggacg tgagccacga agaccccag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 900

gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 960

gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 1020

gttccaaca aaggcctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaac caaagggcag 1080

ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1140

gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagc acatgccct ggagtgggag 1200

agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1260

tcctttcttcc tctacagcaa gctcacctgt gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320

ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380

ctgtctccgg gtaaa 1395

<210> 22

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Gly Ile Trp Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr His Ala
65 70 75 80

His Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Pro Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe

115

120

125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
210 215 220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
225 230 235 240

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
275 280 285

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
 405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460

Lys
 465

<210> 23

<211> 1398

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 23

atggagtttg ggctgagctg ggtcttctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120

tgtgcagcgt ctggattcac cttcagcaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcaggcatt tggaatgatg gaattaataa ataccatgca 240

caticcgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcccgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag agcacggtct 360
 ttcgactggc tattatttga gttctggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctagtgcc 420
 agcaccaagg ggccatccgt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480
 acagccgccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac gaagacctac 660
 acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagagagt tgagtccaaa 720
 tatggtcccc catgccatc atgccagca cctgagttcc tggggggacc atcagtcttc 780
 ctgttcccc caaaaccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 840
 gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc 900
 gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 960
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 1020
 aaggtctcca acaaaggcct cccgtctccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 1080
 cagccccgag agccacaggt gtacacctg cccccatccc aggaggagat gaccaagaac 1140
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacceca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
 ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtgracaaga gcaggtggca ggagggaat 1320
 gtcttctcat gctccgtgak gcatgagget ctgcacaacc actacacaca gaagacctc 1380
 tcctgtctc tgggtaaa 1398

<210> 24

<211> 466

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Gly Ile Trp Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr His Ala
65 70 75 80

His Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Pro Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 225 230 235 240

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 275 280 285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

Gly Lys
 465

<210> 25

<211> 1407

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 25

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcctc gagactctcc 120

tgtgcagtgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggaatgatg gagaaaataa acaccatgca 240

ggctccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag aggacgatat 360

tttgactggt tattatttga gtattggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctagtgcc 420

tccaccaagg gcccatcggg cttcccctcg gcaacctcct ccaagagcac ctctgggggc 480

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtctcagga 600

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660

atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa 720

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780

tcagtcttcc tcttccccc aaaaccaag gacacctca tgatctcccg gaccttgag 840

gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 900

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctgc ctgaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020

tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctcaaa 1080

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1140

accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatgcc 1200

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260

gactccgacg gctcttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380

aagacctct cctgtctcc gggtaaa 1407

<210> 26

<211> 469

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

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

Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys His His Ala
 65 70 75 80

Gly Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
225 230 235 240

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
245 250 255

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
325 330 335

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
355 360 365

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
370 375 380

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 27

<211> 1395

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

atggagtttg ggctgagctg ggttttctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60

gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct gagactctcc 120

tgtgcagtgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180

ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggaatgatg gagaaaataa acaccatgca 240

ggctccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag aggacgatat 360

tttgactggt tattatttga gtattggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctagtgcc 420

tccaccaagg gcccatcggg cttccccctg ggcacctgct ccaggagcac ctccgagagc 480

acagcggccc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540

aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccag ctgtcctaca gtcctcagga 600

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccttccagca acttcggcac ccagacctac 660

acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaaa 720

tgttgtgtcg agtgcaccac gtgccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttctc 780

ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga ccctgaggt cacgtgctg 840
 gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca actggtacgt ggacggcgtg 900
 gaggtgcata atgccaagac aaagccacgg gaggagcagt tcaacagcac gttccgtgtg 960
 gtcagcgtcc tcaccgttgt gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 1020
 gtctccaaca aaggctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaagggcag 1080
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1140
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacacctc ccatgctgga ctccgacggc 1260
 tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
 ctgtctccgg gtaaa 1395

<210> 28

<211> 465

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

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

Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys His His Ala
 65 70 75 80

Gly Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys
 225 230 235 240

Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro
 245 250 255

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 260 265 270

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp

275

280

285

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val
 305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu
 405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460

Lys
 465

<210> 29

<211> 1398

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt ccagtgtcag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc 120
tgtgcagtgt ctggattcac cttcagtaac tatggcatgc actgggtccg ccaggtcca 180
ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggaatgatg gagaaaataa acaccatgca 240
ggctccgtga ggggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag aggacgatat 360
tttgactggt tattatttga gtattggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctagtgcc 420
agcaccaagg ggccatccgt ctccccctg gcgccttctt ccaggagcac ctccgagagc 480
acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggigac ggtgtcgtgg 540
aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac gaagacctac 660
acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagagagt tgagtcaaaa 720
tatggtcccc catgcccata atgcccagca cctgagttcc tggggggacc atcagtcttc 780
ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc 840
gtggtggtgg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggtg cgtggatggc 900
gtggaggtgc ataatgcaaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt 960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc 1020
aaggtctcca acaaaggcct cccgtctccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1080

cagccccgag agccacaggt gtacacctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac 1140
 caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
 ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtgracaaga gcaggtggca ggaggggaat 1320
 gtcttctcat gctccgtgac gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc 1380
 tccctgtctc tgggtaaa 1398

<210> 30

<211> 466

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30

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

Ser Asn Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Ala Ile Trp Asn Asp Gly Glu Asn Lys His His Ala
 65 70 75 80

Gly Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser
 145 150 155 160

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val
 210 215 220

Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
 225 230 235 240

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly
 245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 275 280 285

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 340 345 350

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 405 410 415

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp
 420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 435 440 445

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

Gly Lys
 465

<210> 31

<211> 1401

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 31

atgggggtcaa cgccatcct cgcctctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag 60

gtgcagctga tgcagctcgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc 120

tgtaagggtt ctggatacag cttttccttc cactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc 180

gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc catcctggtg cctctgatac cagatacagc 240
 ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaact ccaacagcgc cacctacctg 300
 cagtggagca gcctgaaggc ctcgacacc gccatgtatt tctgtgcgag acaaagggaa 360
 ctcgactact ttgactactg gggccagga accctggtca ccgtctctag tgcctccacc 420
 aagggcccat cggcttctcc cctggcacc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
 gccctgggct gcctgtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
 ggcgccciga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac 600
 tcctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 660
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
 gacaaaactc acacatgcc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
 cgtgtggtca gcgtctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 tgcaaggtct ccaacaaage cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1080
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
 aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1260
 gacggctctt tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380

ctctccctgt ctccggtaa a

1401

<210> 32

<211> 467

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

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

Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Ser Phe His Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
65 70 75 80

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Asn Ser
85 90 95

Ala Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu

aagggccat cggctctccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcg 480
gccttgggct gcctgtgcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
ggcgctctga ccagcggcgt gcacaccttc ccagctgtcc tacagtcttc aggactctac 600
tcctcagca gctgtgtgac cgtgccctcc agcaacttcg gcacccagac ctacacctgc 660
aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt 720
gtcagtgcc caccgtgcc agcaccacct gtggcaggac cgtcagictt cctcttcccc 780
ccaaaacca aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacgtg cgtggtggtg 840
gacgtgagcc acgaagacc cgaggtccag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 900
cataatgcca agacaaagcc acgggaggag cagttcaaca gcacgttccg tgtggtcagc 960
gtcctcaccg ttgtgacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 1020
aacaagcc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aaaccaaagg gcagccccga 1080
gaaccacagg tgtacacct gccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
ctgacctgcc tggtaaaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1200
gggcagccgg agaacaacta caagaccaca cctcccatgc tggactccga cggctcttc 1260
ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
tgctccgta tgcattgagc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctcctgtct 1380
ccgggtaaa 1389

<210> 34

<211> 463

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

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

Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Met Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Ser Phe His Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
65 70 75 80

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Asn Ser
85 90 95

Ala Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 35

<211> 1392

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

atggggtcaa ccgccatcct cgcctcctc ctggctgttc tccaaggagt ctgtgccgag 60

gtgcagctga tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct gaagatctcc 120

tgtaagggtt ctggatacag cttttccttc cactggatcg cctgggtgcg ccagatgccc 180

gggaaaggcc tggagtggat ggggatcadc catcctggtg cctctgatac cagatacagc 240

ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaact ccaacagcgc cacctacctg 300

cagtggagca gcctgaaggc ctggacacc gccatgtatt tctgtgag acaaaggaa 360

ctcgactact ttgactactg gggccagga accctggtca ccgtctctag tgccagcacc 420

aaggggcat ccgtcttccc cctggcgccc tgctccagga gcacctccga gagcacagcc 480

gcctgggct gcctgtgcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540

ggcgccctga ccagcggcgt gcacacttc ccggtgtcc tacagtcttc aggactctac 600

tcctcagca gctgtgtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacgaagac ctacacctgc 660

aacgtagatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gagttgagtc caaatatggt 720

ccccatgcc catcatgccc agcacctgag ttctggggg gaccatcagt cttctgttc 780

ccccaaaac ccaaggacac tctcatgac tcccggacce ctgaggtcac gtgcgtggtg 840

gtggacgtga gccaggaaga ccccagggtc cagttcaact ggtacgtgga tggcgtggag 900

gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagttca acagcacgta ccgtgtggtc 960

agcgtctca ccgtctgca ccaggactgg ctgaacggca aggagtacaa gtgcaaggtc 1020

tccaacaaag gcctccgctc ctccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1080

cgagagccac aggtgiacac cctgccccca tcccaggagg agatgaccaa gaaccaggtc 1140

agcctgacct gcctggtcaa aggttcttac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200

aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc 1260

ttcttctct acagcaggct aaccgtgrac aagagcaggt ggcaggaggg gaatgtctc 1320

tcatgctccg tgakgcatga ggctctgcac aacctacta cacagaagag cctctccctg 1380

tctctgggta aa 1392

<210> 36

<211> 464

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

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

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

20

25

30

Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45

Ser Phe His Trp Ile Ala Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Met Gly Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
65 70 75 80

Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Asn Ser Asn Ser
85 90 95

Ala Thr Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala
145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His
210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly
225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser
245 250 255

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

260

265

270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
275 280 285

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
305 310 315 320

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
325 330 335

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
340 345 350

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
355 360 365

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser
420 425 430

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450 455 460

<210> 37

<211> 705

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 37

atggaagccc cagctcagct tctcttcctc ctgctactct ggcctccaga taccaccgga 60

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120

ctctcctgca gggccagtca gagtgtagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 180

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 240

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccgct cactttcggc 360

ggagggacca aggtggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc 540

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccttg 600

acgtgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 705

<210> 38

<211> 235

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser
 100 105 110

Asn Trp Pro Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230 235

<210> 39

<211> 699

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 39

atgicccat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcctc caggggtgaa 60

attgtgctga ctcagctctc agactttcag tctgtgactc caaaggagaa agtcaccatc 120

acctgccggg ccagtcagag cattggtagt agcttacact ggtaccagca gaaaccagat 180

cagctcctca agctcctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg 240

ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc accctacca tcaatagcct ggaagctgaa 300

gatgctgcag cgtattactg tcatcagagt agtagtttac ctctcacttt cggcggaggg 360

accaaggtgg agatcaaacg aactgtgctt gcaccatctg tcttcatctt cccgcatct 420

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480

agagaggcca agtacagtg gaaggtgat aacgcctcc aatcgggtaa ctcccaggag 540

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgtg 600

agcaaagcag actacagaaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcacca tcagggcctg 660

agctgccecg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgt 699

<210> 40

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val
20 25 30

Thr Pro Lys Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
35 40 45

Gly Ser Ser Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys
50 55 60

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

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Ser
85 90 95

Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Ala Tyr Tyr Cys His Gln Ser Ser Ser
100 105 110

Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Leu Ser Asp Ile Ala
 1 5

<210> 42

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Val Ile Asp Glu
 1

<210> 43

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Thr Cys Phe Ala
1

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> oligonucleotide primer for PCR

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(23)

<223> n is a, c, t, or g

<400> 44

ggccgtag gctccann nnnt

24

<210> 45

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleotide primer for PCR

<400> 45

ggacactgac atggactgaa ggagta

26

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleotide primer for PCR

<400> 46

ggacactgac atggactgaa ggagta

26

<210> 47

<211> 46

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleotide primer for PCR

<400> 47

cagcagaagc ttctagacca ccatgtcgcc atcacaactc attggg

46

<210> 48

<211> 34

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleotide primer for PCR

<400> 48

cttgtcgact caaactctc ccctgttgaa gctc

34

<210> 49

<211> 8

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> amino acid sequence encoded by 5' anti-IL-1R1 15C4 kappa primer

<400> 49

Met Ser Pro Ser Gln Leu Ile Gly
 1 5

<210> 50

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> amino acid sequence encoded by 3' anti-IL-1R1 15C4 kappa primer

<400> 50

Cys Glu Gly Arg Asn Phe Ser
 1 5

<210> 51

<211> 1409

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

tctagaccac catggacatc aggcctcagct tagttttcct tgccttttc ataaaagggtg 60

tccagtgtga ggtagaactg gtggagtctg ggggcggctt agtacaacct ggaaggteca 120

tgacactctc ctgtgcagcc tcgggattca ctttcagaac ctatggcatg gcctgggtcc 180

gccaggcccc aacgaagggt ctggagtggg tctcatcaat tactgctagt ggtggtacca 240

cctactatcg agactccgtg aaggccgct tcactatfff tagggataat gcaaaaagta 300

ccctatacct gcagatggac agtccgaggt ctgaggacac ggccacttat ttctgtacat 360
 caatttcgga atactggggc cacggagtca tggtcaccgt ctctagtgcc tccaccaagg 420
 gcccatcggg ctccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc acagcggccc 480
 tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcagcgg 540
 ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtctcagga ctctactccc 600
 tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg 660
 tgaatcacia gcccaacaac accaaggtgg acaagaaagt tgagccaaa tcttgtgaca 720
 aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc 780
 tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctccc gaccttgag gtcacatgcg 840
 tgggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactgttac gtggaccggc 900
 tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg 960
 tggtcagcgt cctcaccgtc ctgaccagg actggtgaa tggcaaggag tacaagtgca 1020
 aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaaggc 1080
 agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatccc ggatgagctg accaagaacc 1140
 aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatgcc gtggagtggg 1200
 agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccagcc tcccgtgctg gactccgacg 1260
 gtccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg 1320
 tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgacg aagacctct 1380
 ccctgtctcc gggtaaatga taagtcgac 1409

<210> 52

<211> 19

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleotide primer for PCR

<400> 52

tgaggacgct gaccacacg

19

<210> 53

<211> 44

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleotide primer for PCR

<400> 53

cagcagaagc ttctagacca ccatggggtc aaccgccatc ctcg

44

<210> 54

<211> 32

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> oligonucleotide primer for PCR

<400> 54

gtggaggcac tagagacggt gaccagggtt cc

32

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> amino acid sequence encoded by 5' anti-IL-1R1 15C4 heavy chain prime

<400> 55

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu
1 5

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> amino acid sequence encoded by 3' anti-IL-1R1 15C4 heavy chain prime

<400> 56

Thr Ser Ala Ser Ser Val Thr Val Leu Thr Gly
 1 5 10

<210> 57

<211> 1415

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 57

tctagaccac catggacatg aggggtcccg ctcagctcct ggggctcctg ctattgtggt 60

tgagaggtgc cagatgtgag gtccagctgg tgcagctctgg gggaggcttg gtacatcctg 120

gggggtccct gagactctcc tgtgcaggct ctggattcac cttcagtggc catgetttgc 180

actgggttcg ccaggtccca ggaaaaggtc tggagtgggt atcaggtatt ggtactcatg 240

gtgggacata ctatgcagac tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca 300

agaactcctt gtttcttcaa atgaacagcc tgagcgccga ggacatggct gtgtattact 360

gtacaagaag aaactgggga caatttgact actggggcca ggaaccctg gtcaccgtct 420

ctagtgcctc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc gcctgtctcc aggagcacct 480

ccgagagcac agcggccctg ggcctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg 540

tgtcgtggaa ctcaggcgtc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccagct gtcctacagt 600

cctcaggact ctactcctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcaac ttcggcaccc 660
 agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagacagtgtg 720
 agcgcaaatg ttgtgtcgag tgcccaccgt gccacgacc acctgtggca ggaccgtcag 780
 tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca 840
 cgtgctggt ggtggacgtg agccacgaag accccgaggt ccagttcaac tggtagtgg 900
 acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccacggga ggagcagttc aacagcacgt 960
 tccgtgtggt cagcgtctc accgttgtgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca 1020
 agtgcaaggt ctccaacaaa ggctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca 1080
 aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca 1140
 agaaccaggt cagcctgacc tgcttggta aagcttcta cccagcgac atgcccgtgg 1200
 agtgggagag caatgggcag ccgagaaca actacaagac cacacctccc atgctggact 1260
 ccgacggctc ctcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg 1320
 ggaacgtctt ctcatgctc gtgatgatg aggtctgca caaccactac acgcagaaga 1380
 gcctctcct gtctccgggt aatgataag tcgac 1415

<210> 58

<211> 1418

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 58

tctagaccac catggacatg aggggtcccc ctcagctcct ggggctcctg ctattgttgt 60

tgagaggtgc cagatgtgag gtccagctgg tgcagctctgg gggaggcttg gtacatcctg 120

gggggtccct gagactctcc tgtgcaggct ctggattcac cttcagtggc catgctttgc 180

actgggttcg ccaggctcca ggaaaagtc tggagtggtg atcaggtatt ggtactcatg 240

gtgggacata ctatgcagac tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca 300

agaactcctt gtttcttcaa atgaacagcc tgagcgccga ggacatggct gtgtattact 360

gtacaagaag aaactgggga caatttgact actggggcca ggaaccctg gtcaccgtct 420

ctagtgccag caccaagggg ccatccgtct tccccctggc gccctgctcc aggagcacct 480

ccgagagcac agccgcctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa cgggtgacgg 540

tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgct gtcctacagt 600

cctcaggact ctactcctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcacga 660

agacctacac ctgcaacgta gatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg 720

agtcxaaata tggccccca tgccatcat gccagcacc tgagttcctg gggggacat 780

cagctttcct gttccccca aaaccaagg acactctcat gatctcccgg acccctgagg 840

tcacgtgcgt ggtgggtggac gtgagccagg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg 900

tggatggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag ttcaacagca 960

cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctacccgtcc tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt 1020

acaagtgcaa ggtctccaac aaaggcctcc cgctctccat cgagaaaacc atctccaaag 1080

ccaaagggca gccccgagag ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccag gaggagatga 1140

ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg 1200

tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct cccgtgctgg 1260
 actccgacgg ctcttcttc ctctacagca ggctaaccgt ggacaagagc aggtggcagg 1320
 aggggaatgt ctctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga 1380
 agagcctctc cctgtctctg ggtaaagat aagtcgac 1418

<210> 59

<211> 485

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Met Val His Ala Thr Ser Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

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

Lys Trp Thr Asn Asp Leu Gly Ser Asn Met Thr Ile Gly Ala Val Asn
 35 40 45

Ser Lys Gly Glu Phe Thr Gly Thr Tyr Thr Thr Ala Val Thr Ala Thr
 50 55 60

Ser Asn Glu Ile Lys Glu Ser Pro Leu His Gly Thr Gln Asn Thr Ile
 65 70 75 80

Asn Lys Arg Thr Gln Pro Thr Phe Gly Phe Thr Val Asn Trp Lys Phe
 85 90 95

Ser Glu Ser Thr Thr Val Phe Thr Gly Gln Cys Phe Ile Asp Arg Asn
 100 105 110

Gly Lys Glu Val Leu Lys Thr Met Trp Leu Leu Arg Ser Ser Val Asn
 115 120 125

Asp Ile Gly Asp Asp Trp Lys Ala Thr Arg Val Gly Ile Asn Ile Phe
 130 135 140

Thr Arg Leu Arg Thr Gln Lys Glu Gln Leu Leu Ala Ser Leu Leu Glu
 145 150 155 160

Ala Asp Lys Cys Lys Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val Ser Ser
 165 170 175

Ala Asn Glu Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn Glu His
 180 185 190

Lys Gly Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Asp Asp Ser Lys Thr Pro Val Ser
 195 200 205

Thr Glu Gln Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Glu Lys Leu Trp Phe
 210 215 220

Val Pro Ala Met Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val Val Arg
 225 230 235 240

Asn Ser Ser Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Ser Ala Lys Phe Val Glu
 245 250 255

Asn Glu Pro Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Gln Ala Ile Phe Lys Gln Lys
 260 265 270

Leu Pro Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met Glu Phe
 275 280 285

Phe Lys Asn Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Gln Trp Tyr Lys Asp
 290 295 300

Cys Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val Lys Asp
 305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn Tyr Thr
 325 330 335

Cys His Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile Thr Arg
 340 345 350

Val Ile Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg Pro Val
 355 360 365

Ile Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Met Glu Val Asp Leu Gly Ser Gln
 370 375 380

Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Ile Ala Tyr
 385 390 395 400

Trp Lys Trp Asn Gly Ser Val Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val Leu Gly
 405 410 415

Glu Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg Ser Thr
 420 425 430

Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe Tyr Lys
 435 440 445

His Pro Phe Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile Asp Ala Ala
 450 455 460

Tyr Ile Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Asn Phe Gln Lys Asp Tyr Lys
 465 470 475 480

Asp Asp Asp Asp Lys
 485

<210> 60

<211> 485

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> avidin-cynomolgus IL-1R1-FLAG chimeric protein

<400> 60

Met Val His Ala Thr Ser Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15

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

Lys Trp Thr Asn Asp Leu Gly Ser Asn Met Thr Ile Gly Ala Val Asn
 35 40 45

Ser Lys Gly Glu Phe Thr Gly Thr Tyr Thr Thr Ala Val Thr Ala Thr
 50 55 60

Ser Asn Glu Ile Lys Glu Ser Pro Leu His Gly Thr Gln Asn Thr Ile
 65 70 75 80

Asn Lys Arg Thr Gln Pro Thr Phe Gly Phe Thr Val Asn Trp Lys Phe
 85 90 95

Ser Glu Ser Thr Thr Val Phe Thr Gly Gln Cys Phe Ile Asp Arg Asn
 100 105 110

Gly Lys Glu Val Leu Lys Thr Met Trp Leu Leu Arg Ser Ser Val Asn
 115 120 125

Asp Ile Gly Asp Asp Trp Lys Ala Thr Arg Val Gly Ile Asn Ile Phe
 130 135 140

Thr Arg Leu Arg Thr Gln Lys Glu Gln Leu Leu Ala Ser Leu Leu Glu
 145 150 155 160

Ala Asp Lys Cys Asn Glu Arg Glu Glu Lys Ile Ile Leu Val Ser Ser
 165 170 175

Ala Asn Glu Ile Asp Val Arg Pro Cys Pro Leu Asn Pro Asn Glu Tyr
 180 185 190

Lys Gly Thr Ile Thr Trp Tyr Lys Asn Asp Ser Lys Thr Pro Ile Ser
 195 200 205

Thr Glu Gln Ala Ser Arg Ile His Gln His Lys Lys Lys Leu Trp Phe
 210 215 220

Val Pro Ala Lys Val Glu Asp Ser Gly His Tyr Tyr Cys Val Val Arg
 225 230 235 240

Asn Ser Ser Tyr Cys Leu Arg Ile Lys Ile Thr Ala Lys Phe Val Glu
 245 250 255

Asn Glu Pro Asn Leu Cys Tyr Asn Ala Glu Ala Ile Phe Lys Gln Arg

260

265

270

Leu Pro Val Ala Gly Asp Gly Gly Leu Val Cys Pro Tyr Met Glu Phe
 275 280 285

Phe Lys Asp Glu Asn Asn Glu Leu Pro Lys Leu Leu Trp Tyr Lys Asp
 290 295 300

Cys Lys Pro Leu Leu Leu Asp Asn Ile His Phe Ser Gly Val Lys Asp
 305 310 315 320

Arg Leu Ile Val Met Asn Val Ala Glu Lys His Arg Gly Asn Tyr Thr
 325 330 335

Cys His Ala Ser Tyr Thr Tyr Leu Gly Lys Gln Tyr Pro Ile Thr Arg
 340 345 350

Val Ile Glu Phe Ile Thr Leu Glu Glu Asn Lys Pro Thr Arg Pro Val
 355 360 365

Ile Val Ser Pro Ala Asn Glu Thr Ile Glu Val Asp Leu Gly Ser Gln
 370 375 380

Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Thr Ala Tyr
 385 390 395 400

Trp Lys Trp Asn Gly Ser Phe Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val Leu Gly
 405 410 415

Glu Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg Ser Thr
 420 425 430

Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Thr Glu Ser Arg Phe Tyr Lys
 435 440 445

His Pro Phe Thr Cys Leu Ala Arg Asn Thr His Gly Met Asp Ala Ala
 450 455 460

Tyr Val Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Lys Phe Gln Lys Asp Tyr Lys
 465 470 475 480

Asp Asp Asp Asp Lys
 485

<210> 61

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Asn Tyr Gly Met His
1 5

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Thr Phe Ser Asn Tyr Gly Met His
1 5

<210> 63

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Phe His Trp Ile Ala
1 5

<210> 64

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

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

Gly

<210> 65

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

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

Gly

<210> 66

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Ile Ile His Pro Gly Ala Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 67

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Ala Arg Ser Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Phe
 1 5 10

<210> 68

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Gly Arg Tyr Phe Asp Trp Leu Leu Phe Glu Tyr

1 5 10

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Gln Arg Glu Leu Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 70

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 71

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Ser Leu His
1 5 10

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 73

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Tyr Ala Ser Gln Ser Phe Ser
1 5

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Leu Thr
 1 5 10

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

His Gln Ser Ser Ser Leu Pro Leu Thr
 1 5

<210> 76

<211> 111

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

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

Ser Gln Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Leu Ser Asp Ile
 20 25 30

Ala Tyr Trp Lys Trp Asn Gly Ser Val Ile Asp Glu Asp Asp Pro Val

35

40

45

Leu Gly Glu Asp Tyr Tyr Ser Val Glu Asn Pro Ala Asn Lys Arg Arg
 50 55 60

Ser Thr Leu Ile Thr Val Leu Asn Ile Ser Glu Ile Glu Ser Arg Phe
 65 70 75 80

Tyr Lys His Pro Phe Thr Cys Phe Ala Lys Asn Thr His Gly Ile Asp
 85 90 95

Ala Ala Tyr Ile Gln Leu Ile Tyr Pro Val Thr Asn Phe Gln Lys
 100 105 110

<210> 77

<211> 350

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 77

cctgtgattg tgagcccagc taatgagaca atggaagtag acttgggatc ccagatacaa 60

ttgatctgta atgtcaccgg ccagttgagt gacattgctt actggaagtg gaatgggtca 120

gtaattgatg aagatgacct agtgctaggg gaagactatt acagtgtgga aaatcctgca 180

aacaaaagaa ggagtacct catcacagtg cttaatatat cggaaattga aagtagattt 240

tataaacatc catttacctg ttttgccaag aatacacatg gtatagatgc agcatatc 300

cagttaatat atccagtcac taatttcag aagcacatga ttggtatatg 350

<210> 78

<211> 350

<212> DNA

<213> Rattus sp.

<400> 78

cctgtgatta tgagcccacg gaatgagacg atggaagctg acccaggatc cacgatacaa 60
 ctgatctgca acgtcacggg ccagttcacc gaccttgtct actggaagtg gaatgggtcg 120
 gaaattgaat gggacgatcc aatcctagcc gaagactatc agtttttggga acacccttca 180
 gccaaaagaa agtacactct cattacaaca cttaacgttt cagaggtcaa aagccagttt 240
 tatcgctatc cgttcatctg ctctgtaag aaacctcata ttctggagac tgcacacgta 300
 cggtagtat acccagttcc tgacttcaag aattacctca tcgggggctt 350

<210> 79

<211> 111

<212> PRT

<213> Rattus sp.

<400> 79

Pro Val Ile Met Ser Pro Arg Asn Glu Thr Met Glu Ala Asp Pro Gly
 1 5 10 15

Ser Thr Ile Gln Leu Ile Cys Asn Val Thr Gly Gln Phe Thr Asp Leu
 20 25 30

Val Tyr Trp Lys Trp Asn Gly Ser Glu Ile Glu Trp Asp Asp Pro Ile
 35 40 45

Leu Ala Glu Asp Tyr Gln Phe Leu Glu His Pro Ser Ala Lys Arg Lys

50

55

60

Tyr Thr Leu Ile Thr Thr Leu Asn Val Ser Glu Val Lys Ser Gln Phe
 65 70 75 80

Tyr Arg Tyr Pro Phe Ile Cys Phe Val Lys Asn Thr His Ile Leu Glu
 85 90 95

Thr Ala His Val Arg Leu Val Tyr Pro Val Pro Asp Phe Lys Lys
 100 105 110