(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0032992
(43) 공개일자 2014년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7021322
(22) 출원일자(국제) 2012년02월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년08월13일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2012/052043
(87) 국제공개번호 WO 2012/110360
국제공개일자 2012년08월23일
(30) 우선권주장
13/026,944 2011년02월14일 미국(US)

(71) 출원인
트랜스진 에스.에이.
프랑스, 에프-67400 이으끼르쉬 끄랑팡스따당, 부르발 꽁띠에르 당데르나쉬, 파르끄 뗑노바띠옹
(72) 발명자
헤겔, 헬렌
프랑스 에프-67400 이으끼르쉬 64 루트 데 리옹
시우멜렛, 크리스틴
프랑스 에프-67000 스트라스부르 불러바드 드 라빅투아르 4
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 양영환

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **ＣＳＦ－1Ｒ에 대한 항체**

(57) 요 약

본 발명은 CSF-1R에 대해 특이적인 항체, 상기 항체를 포함하는 조성물, 및 상기 조성물을 사용하는 치료 방법을 제공한다.

(72) 발명자

가이스트, 미쉘

프랑스 에프-67170 브루마스 뤼 에두아르 마넷 18

그렐리어, 브누아

프랑스 에프-67100 스트라스부르 뤼 데 로제 24

마르샹, 장-밥티스트

프랑스 에프-67210 오베르네 뤼 데 오뜨 파트라쥐 1아

특허청구의 범위

청구항 1

(i) (a) 식 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4로 정의되는 제1 가변 영역으로서, 상기 식에서

FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

CDR1은 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 가지고;

CDR2는 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 가지고;

CDR3은 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 가지는 것인

제1 가변 영역; 및

(b) 식 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4로 정의되는 제2 가변 영역으로서, 상기 식에서

FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

CDR1은 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 가지고;

CDR2는 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 가지고;

CDR3은 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 가지는 것인

제2 가변 영역

을 포함하고,

(ii) 하기의 유리한 특성들:

- 서열 번호 29의 20번 내지 41번 아미노산 사이에 위치하는 한 에피토프에 결합하는 특성,

- 42번 내지 90번 아미노산 사이, 및/또는 91번 내지 104번 아미노산 사이에 위치하는 에피토프에 결합하지 않는 특성,

- 105번 내지 199번 아미노산 사이에 위치하는 에피토프에 결합하지 않는 특성,

- 서열 번호 29의 200번 내지 298번 아미노산 사이에 위치하는 에피토프에 결합하지 않는 특성,

- 구축물 pTG18016에 결합하는 특성

중 하나 이상의 특성을 가지는 것을 특징으로 하는,

CSF-1R, 더욱 바람직하게는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하는 단리된, 재조합 또는 정제된 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 하기 추가의 유리한 특성들:

- CSF-1R 수용체에의 결합에 대하여 IL-34 리간드와 경쟁하지 않는 특성,

- CSF-1R 수용체에의 결합에 대하여 CSF-1 리간드와 부분적으로 경쟁하는 특성

중 하나 이상의 특성을 가지는 항체.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 유리한 특성 둘 다를 가지는 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, 정상적인 인간 말초 혈액 단핵 세포의 존재하에서 CSF-1R-발현 인간 세포, 특히 CSF-1R-발현 인간 암 세포에 대하여 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC)을 발휘하는 항체.

청구항 5

제1항에 있어서, CSF-1R-발현 인간 암 세포를 보유하는 비-인간 동물에 대하여 항종양 효과를 발휘하는 항체.

청구항 6

제1항에 있어서, CSF-1R-발현 인간 암 세포를 보유하는 인간을 비롯한 동물에 대하여 항종양 효과를 발휘하는 항체.

청구항 7

제1항에 있어서, AML5 세포의 CSF-1-의존성 증식을 억제시키는 항체.

청구항 8

제1항에 있어서, CSF-1R의 CSF-1-의존성 인산화를 부분적으로 억제시키는 항체.

청구항 9

제1항에 있어서,

- 서열 번호 37 및 서열 번호 38로 이루어진 군에서 선택되는 중쇄, 및
- 서열 번호 39, 서열 번호 40 및 서열 번호 41로 이루어진 군에서 선택되는 경쇄

를 포함하는 항체.

청구항 10

제1항에 있어서,

- 서열 번호 42 및 서열 번호 43으로 이루어진 군에서 선택되는 제1 가변 영역, 및
- 서열 번호 44, 서열 번호 45 및 서열 번호 46으로 이루어진 군에서 선택되는 제2 가변 영역

을 포함하는 항체.

청구항 11

제1항에 있어서, (a) 서열 번호 37로 이루어진 중쇄, 및 (b) 서열 번호 39로 이루어진 경쇄를 포함하는 항체.

청구항 12

제1항에 있어서, (a) 서열 번호 38로 이루어진 중쇄, 및 (b) 서열 번호 40으로 이루어진 경쇄를 포함하는 항체.

청구항 13

제1항에 있어서, (a) 서열 번호 37로 이루어진 중쇄, 및 (b) 서열 번호 41로 이루어진 경쇄를 포함하는 항체.

청구항 14

제1항에 있어서, (a) 서열 번호 42로 이루어진 제1 가변 영역, 및 (b) 서열 번호 44로 이루어진 제2 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 15

제1항에 있어서, (a) 서열 번호 43으로 이루어진 제1 가변 영역, 및 (b) 서열 번호 45로 이루어진 제2 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 16

제1항에 있어서, (a) 서열 번호 42로 이루어진 제1 가변 영역, 및 (b) 서열 번호 46으로 이루어진 제2 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 17

제1항에 있어서, Ki가 1 nM 미만인 항체.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은, 2009년 3월 11일 출원된 PCT/EP2009/001733에 기초한 미국 국내 단계 출원이며, 2008년 3월 14일 출원된 유럽 출원 번호 08 36 0005.6의 우선권, 및 2008년 4월 10일 출원된 미국 가출원 번호 61/043,884의 이점을 주장하는, 2010년 9월 13일 출원된 미국 출원 번호 12/922,441의 일부 계속 출원이다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은, EFS-Web을 통해 제출되었고 그 전문이 본원에 참고로 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2011년 3월 30일에 작성된 상기 ASCII 복사본의 명칭은 13026944.txt이고, 그의 크기는 56,764 바이트이다.

배 경 기 술

[0005] 설명

[0006] CSF-1 (콜로니-자극 인자-1)은 특히 각종 유형의 세포에 의해 발현되는 시토카인이다. 이는 CSF-1에 대한 수용체 (CSF-1R)를 발현하는 단핵 포식세포 계통의 세포에 대한 분화, 성장 및 생존 인자이다 (문헌 [**SHERR.** Colony-stimulating factor-1 receptor, *blood*. 1990, vol.75, no.1, p.1-12.]). CSF-1R은 5개의 면역글로불린-유사 서브도메인에 조직화되어 있는 리간드-결합 세포외 영역과 세포내 키나제 도메인을 포함하는, *c-fms* 프로토온코진에 의해 코딩되는 티로신 키나제 수용체이다. CSF-1에 대해 반응함으로써 생존, 성장 분화, 및 기능의 가역적 변화는 증가하게 된다. *c-fms* 유전자 그 자체가 대식세포 분화 마커이다. *c-fms* 발현 정도는 리소자임 및 대식세포-특이 단백질 티로신 포스파타제를 비롯한, 다른 대식 세포-특이 유전자의 발현보다 강하다 (문헌 [**HUME, et al**. Regulation of CSF-1 receptor expression. *Molecular reproduction and development*. 1997, vol.46, no.1, p.46-52.]).

[0007] 단핵 포식세포 계통의 세포 이외에도, CSF-1R은 또한 많은 유형의 인간 종양에 의해 발현된다. 유방암에서 CSF-1R 발현은 보다 큰 종양 크기 및 생존율 감소와 관련이 있다 (문헌 [**KLUGER, et al**. Macrophage colony-stimulating factor-1 receptor expression is associated with poor outcome in breast cancer by large cohort tissue microarray analysis. *Clinical cancer research*. 2004, vol.10, no.1, p.173-7.]; [**SCHOLL, et al**. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994, vol.86, no.2, p.120-6.]). 상피성 난소암에서 대다수의 원발 성 종양 및 전이는 CSF-1R을 강하게 발현하고, 전이는 빈번하게는 CSF-1과 CSF-1R 을 함께 공동 발현한다. CSF-1R은 또한 종양-침윤성 대식세포에 의해서도 발현된다 (문헌 [**CHAMBERS, et al**. Overexpression of epithelial macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and CSF-1 receptor: a poor prognostic factor in epithelial ovarian cancer, contrasted with a protective effect of stromal CSF-1. *Clinical Cancer Research*. 1997, vol.3, no.6, p.999-1007.]). 난소암 및 자궁내막암에서는 노던 블롯 분석 결과 대다수의 종양이 CSF-1과 CSF-1R을 함께 공동 발현하는 반면, CSF-1R 발현은 정상적인 자궁내막 조직 샘플에서는 단지 약하게 검출되는 것으로 나타났다 (문헌 [**BAIOCCHI, et al.** Expression of the macrophage colony-stimulating factor and its receptor in gynecologic malignancies. *Cancer*. 1991, vol.67, no.4, p.990-6.]). 자궁경부암종에서 CSF-1R 발현은 정상 자궁내막과 비교하였을 때, 종양 기질 및 종양 상피 둘 다에서 상향조절되어 있다 (문헌 [**KIRMA, et al**. Elevated

expression of the oncogene c-fms and its ligand, the macrophage colony-stimulating factor-1, in cervical cancer and the role of transforming growth factor-beta1 in inducing c-fms expression. *Cancer res.* 2007, vol.67, no.5, p.1918-26.]). 신장 암종에서 고수준의 CSF-1R을 발현하는 종양-관련 대식세포의 침윤은 종양 진행과 관련이 있다 (문헌 [**HEMMERLEIN, et al.** Expression of acute and late-stage inflammatory antigens, c-fms, CSF-1, and human monocytic serine esterase 1, in tumor-associated macrophages of renal cell carcinomas. *Cancer immunology, immunotherapy*. 2000, vol.49, no.9, p.485-92.]). CSF-1R은 약 100%의 전립샘 상피내 신생물 또는 암 샘플에 의해 발현된다 (문헌 [**IDE, et al**. Expression of colony-stimulating factor 1 receptor during prostate development and prostate cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*. 2002, vol.99, no.22, p.14404-9.]). CSF-1R 발현은 또한 급성 골수모구 백혈병 및 B-세포 만성 림프성 백혈병에서 검출되었다 (문헌 [**RAMBALDI, et al.** Expression of the macrophage colony-stimulating factor and c-fms genes in human acute myeloblastic leukemia cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1988, vol.81, no.4, p.1030-5.]).

[0008] 면역조직화학법 및 계내 하이브리드화에 의해 수행된 연구에서는 침습성 유방암 세포에서 CSF-1 발현의 특이성이 입증된 반면, 관내성 또는 비-침습성 종양 세포에서의 상기 CSF-1의 생산은 관찰되지 않았다 (문헌 [**SCHOLL, et al**. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994, vol.86, no.2, p.120-6.]; [**TANG, et al.** M-CSF (monocyte colony stimulating factor) and M-CSF receptor expression by breast tumor cells: M-CSF mediated recruitment of tumor infiltrating monocytes. *Journal of cellular biochemistry*. 1992, vol.50, no.4, p.350-6.]). 침습성 종양 세포에 의한 CSF-1의 생산은 환자 혈장 중의 그 농도의 증가와 상관관계에 있는데, 상기 농도는 정상 대상체에서는 300 pg/ml 미만인 것과 비교하여 1,000 pg/ml를 초과할 수 있다. 높은 혈청 농도는 질환의 진행 단계와 바람직하지 못한 단기간의 예후와 상관관계가 있다 (문헌 [**SCHOLL, et al**. Circulating levels of colony-stimulating factor 1 as a prognostic indicator in 82 patients with epithelial ovarian cancer. *British journal of cancer*. 1994, vol.69, no.2, p.342-6.]; [**SCHOLL**. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. *Breast cancer research and treatment*. 1996, vol.39, no.3, p.275-83.]). 또한, CSF-1이 종양 세포의 이동과 침습을 자극한다는 것이 입증되었다 (문헌 [**DORSCH, et al**. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. *European journal of immunology*. 1993, vol.23, no.1, p.186-90.]; [**WANG, et al.** Induction of monocyte migration by recombinant macrophage colony-stimulating factor. *Journal of immunology*. 1988, vol.141, no.2, p.575-9.]; [**FILDERMAN, et al.** Macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) enhances invasiveness in CSF-1 receptor-positive carcinoma cell lines. *Cancer res.* 1992, vol.52, no.13, p.3661-6.]).

[0009] CSF-1은 또한 골수성 세포주의 전구체에 화학주성 효과를 미치는데, 이는 종양에서 단핵구의 침윤을 촉진시킨다. 그러나, 이러한 단핵구의 존재가 면역계에 의한 종양 파괴를 관찰하기에는 충분하지 못하다 (문헌 [**DORSCH, et al**. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. *European journal of immunology*. 1993, vol.23, no.1, p.186-90.]). 유방 종양, 난소 종양 또는 췌장 종양 환자에서 공통적으로 발견되는 고함량의 혈청내 CSF-1은 이들 단핵구가 가지 세포가 아닌 대식세포로 분화할 수 있게 적응시킴으로써 종양 항원을 제시할 수 있게 하고, 종양 세포에 대하여 지시되는 효율적인 세포독성 면역 반응을 개시할 수 있게 하는 것으로 보인다 (문헌 [**SCHOLL**. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. *Breast cancer research and treatment*. 1996, vol.39, no.3, p.275-83.]; [**BARON, et al**. Modulation of MHC class II transport and lysosome distribution by macrophage-colony stimulating factor in human dendritic cells derived from monocytes. *Journal of cell science*. 2001, vol.114, no.pt5, p.999-1010.]).

[0010] CSF-1은 또한 파골세포의 증식과 분화에 필수적이다 (문헌 [**CECCHINI, et al.** Role of CSF-1 in bone and bone marrow development. *Molecular reproduction and development*. 1997, vol.46, no.1, p.75-83.]). 파골세포는, 주로 골 발생, 항상성 및 수복시에 무기질화된 골을 분해시키는 조혈 전구체로부터 유래하는 것으로서, CSF-1R을 발현하는 다핵 세포이다. 예컨대 골다공증, 악성종양으로 인한 고칼슘혈증, 류마티스 관절염, 종양 전이 및 파제트병과 같은 다양한 골격 장애에 있어서, 파골세포에 의한 골 흡수가 골모세포에 의한 골 형성을 초과함으로써 골량은 감소하게 되고, 골격 취약증 및 골절이 일어나게 된다 (문헌 [**BRUZZANITI, et al.**

Molecular regulation of osteoclast activity. *Reviews in endocrine*. 2006, vol.7, no.1-2, p.123-39.]). 예를 들어, 진행성 유방암 환자에서는 빈번하게 골로 전이된다. 골로 전이됨에 따라 종양-유도성 골 손실 (골용해)에 기인하는 난치성 동통 및 고도로 위험한 골절이 일어나게 되는데, 이는 파골세포 활성의 증가로 유발되는 것이다 (문헌 [**CICEK, et al**. Breast cancer bone metastasis and current small therapeutics. *Cancer metastasis reviews*. 2006, vol.25, no.4, p.635-44.]). 골용해는 고수준의 순환 CSF-1과 연관이 있는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [**KITAURA, et al.** The journal of clinical investigation. *M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis*. 2005, vol.115, no.12, p.3418-27.]).

[0011] CSF-1 경로는 또한 예컨대 염증성 장 질환과 같은 질환의 간질성 염증을 매개하는 데 (문헌 [**MARSHALL, et al.** Blockade of colony stimulating factor-1 (CSF-1) leads to inhibition of DSS-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases*. 2007, vol.13, no.2, p.219-24.]), 급성 동종이식 거부 동안 대식세포 증식을 매개하는 데 (문헌 [**JOSE, et al**. Blockade of macrophage colony-stimulating factor reduces macrophage proliferation and accumulation in renal allograft rejection. *American journal of transplantation*. 2003, vol.3, no.3, p.294-300]), 및 감염된 대식세포에서의 HIV-1 복제에 관여한다 (문헌 [**KUTZA, et al.** Macrophage colony-stimulating factor antagonists inhibit replication of HIV-1 in human macrophages. *Journal of immunology*. 2000, no.164, p.4955- 4960]).

[0012] 이러한 이유에서, 암 및 골 분해를 치료하기 위한 목적으로 각종 화합물을 이용해서 CSF-1 활성을 억제시키는 것이 제안되어 왔다.

[0013] 배경 분야

[0014] **WO 01/30381**은 종양 질환 치료용 의약 제조에서의 CSF-1 활성 억제제의 용도에 관한 것이다. CSF-1 활성을 억제시키기 위한 목적으로 제안된 2가지 접근법은 CSF-1의 활성 그 자체를 억제시키는 것과, CSF-1R의 활성을 억제시키는 것이다. CSF-1 또는 그의 수용체에 대한 중화 항체가 CSF-1 활성의 억제제로서 바람직하다.

[0015] **WO 03/059395**에는 CSF-1 활성을 억제시킬 수 있는 물질 및 암 치료를 위한 세포독성 활성을 가지는 물질을 포함하는 조합 생성물이 기술되어 있다.

[0016] **WO 2005/068503**에는 CSF-1에 대한 항체를 대상체에게 투여함으로써 골용해, 암 전이 및 암 전이와 관련된 골 손실을 예방 및 치료하는 방법이 개시되어 있다.

[0017] **EP 1488792 A**는 CSF-1R 티로신 키나제 활성을 효과적으로 억제시킴으로써 분화, 증식 또는 매개인자 방출을 선택적으로 억제시키는 것으로 보이는, 모노시클릭 및/또는 비시클릭 아릴 또는 헤테로아릴 퀴나졸린 화합물의 용도에 관한 것이다. 상기 출원은 또한 비정상적인 세포 증식을 억제시키는 의약의 제조를 위한 상기 화합물의 용도에 관한 것이다.

[0018] **US 2005059113**은 CSF-1에 특이적으로 결합하는 항체 및 그의 항원 결합부에 관한 것이다. 상기 발명은 또한 인간 항-CSF-1 항체 및 그의 항원 결합부에 관한 것이다. 상기 출원 발명은 또한 인간 항-CSF-1 항체를 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 면역글로불린 분자를 코딩하는 핵산 분자를 사용하는 유전자 요법도 제공한다.

[0019] 문헌 [**Roussel and Sherr**, 1989, *PNAS*, 86, 7924-7927] 및 [**Ashmun et al.**, 1989, *Blood*, 73, 827-837]에는 인간 수용체에 결합하는 CSF-1을 특이적으로 차단하여 리간드-의존성 성장을 억제시키는 것인, 인간 CSF-1 수용체 (예컨대 12-3A3 및 2-4A5)에 대한 모노클로날 항체가 개시되어 있다. 인식된 에피토프는 349-512번 아미노산 사이에 위치하고 있다.

[0020] **WO2009/026303**은 CSF-1과 경쟁할 수 있고, 이를 통해 CSF-1이 그의 수용체에 결합하지 못하도록 하며, 특정 실시양태에서, IL-34와 CSF-1R 사이의 결합을 억제하는 항원 결합 단백질을 제공한다. 또한, WO2009/026303의 실험부에는 발명자에 의해 개발된 항체가 대개 CSF-1R의 서열 29의 20 내지 223번 아미노산 사이의 N-말단 (WO2009/026303에서 Ig-유사 루프 1 및 Ig-유사 루프 2에 상응)에 위치하고, Ig-유사 루프 1 및 Ig-유사 루프 2 영역 둘 다가 존재하는 것을 필요로 하는 결합 에피토프라는 것이 명시되어 있다.

발명의 내용

[0021] 본 발명의 개시내용

[0022] 본 발명은 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다.

[0023] 본 출원 전역에서 사용되는 바, "하나"("a" 및 "an")라는 용어는 문맥상 달리 명확하게 언급하지 않는 한, "1

이상," "적어도 제 1," "하나 이상" 또는 "복수 개의" 언급한 성분 또는 단계를 의미한다는 개념으로 사용된다. 예를 들어, "한 세포"라는 용어는 그의 혼합물을 비롯한 복수 개의 세포를 포함한다.

[0024] 본원에서 사용되는 경우, "및/또는"이라는 용어는 "및," "또는," 및 "상기 용어로 연결되어 있는 요소들 모두 또는 그의 임의의 다른 조합"을 의미하는 것을 포함한다.

[0025] 본원에서 사용되는 바, "약" 또는 "대략"이라는 용어는 주어진 값 또는 범위의 20% 이내, 바람직하게는 10% 이내, 및 더욱 바람직하게는 5% 이내에 포함된다는 것을 의미한다.

[0026] 본원에서 사용되는 바, "~을 포함하는 " 및 "~을 포함한다"라는 용어는 부품으로 구성된 키트, 생성물, 조성물 및 방법이 다른 것을 제외하는 것은 아니면서, 언급한 성분 또는 단계를 포함한다는 것을 의미하는 것으로 한다. 생성물, 조성물 및 방법을 정의하는데 사용되는 경우, "본질적으로 ~로 이루어진"이라는 것은 임의로 본질적인 중요성을 지닌 다른 성분 또는 단계는 제외시킨다는 것을 의미하여야 한다. 따라서, 본질적으로 열거된 성분으로 이루어진 조성물은 미량의 오염물질 및 제약상 허용되는 담체는 제외시키지 않을 것이다. "~로 이루어진"이라는 것은 다른 성분 또는 단계 중 다량의 미량 성분을 제외시킨다는 것을 의미하여야 한다.

[0027] 본원에서 사용되는 바, "~에 특이적으로 결합한다"라는 용어는 단백질 및 다른 생물 물질로 구성된 이종성 군집의 존재하에 표적 단백질이 존재하는지를 결정짓는 결합 반응을 의미한다. 따라서, 지정된 검정 조건하에서 본 발명에 따른 항체는 우선적으로 CSF-1R의 적어도 일부에 결합을 하지만, 시험 샘플 중에 존재하는 다른 성분에는 유의적인 양으로 결합하지는 않는다. 본 발명에 따른 항체와 CSF-1R 표적 사이의 특이적인 결합이란 결합 친화도가 10^3 M^{-1} 이상, 및 바람직하게, 10^5 M^{-1}, 10^6 M^{-1}, 10^7 M^{-1}, 10^8 M^{-1}, 10^9 M^{-1} 또는 10^{10} M^{-1}인 것을 의미한다. 특히 유익한 실시양태에서, 결합 친화도는 10^9 M^{-1} 또는 10^{10} M^{-1} 이상이다.

[0028] 본원에서 사용되는 바, "CSF-1R"이라는 용어는 인간 CSF1 수용체를 의미한다. 인간 CSF-1 수용체의 서열은 분석되어 있고, 그의 아미노산 서열은 서열 번호 29에 기재되어 있다.

[0029] 본원에서 사용되는 바, "항체" 또는 "Ab"는 가장 광범위한 의미로 사용된다. 그러므로, "항체" 또는 "Ab"는 천연적으로 생성된 것이거나, 합성된 것일 수 있고, 예로서는, 통상의 하이브리도마 기술, 재조합 기술에 의해 제조된 모노클로날 항체 (mAb) 및/또는 그의 기능적 단편일 수 있다. 본 발명의 항체는 온전한 면역글로불린 분자, 예를 들어, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 (mAb), 단일특이적 항체, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체, 인간 항체, 동물 항체 (예컨대 카멜리드 항체), 키메라 항체 뿐만 아니라, 예를 들어, 경쇄가 없는 면역글로불린 (예를 들어, US 6,005,079 참조), Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, scFv, 항체 단편, 디아바디, Fd, CDR 영역, 또는 항원 또는 에피토프에 결합할 수 있는 항체의 임의의 일부 또는 펩티드 서열과 같이, (예컨대 제한하는 것은 아니지만, 효소적 절단, 펩티드 합성 또는 재조합 기법과 같은 임의의 공지 기법에 의해 제공되는) 항체의 일부, 단편, 영역, 펩티드 및 유도체 모두를 포함하는 의미를 가진다. 항체가 분자와 특이적으로 반응함으로써 상기 분자가 항체에 결합할 수 있게 되다면, 여기서 항체를 분자에 "결합할 수 있는 것"으로 본다. 항체 단편 또는 일부는 온전한 항체의 Fc 단편을 포함하지 않을 수 있고, 온전한 항체보다 더욱 빠르게 순환으로부터 제거될 수 있고, 비특이적인 조직 결합을 덜 할 수 있다. 일례의 항체들은 예를 들어, 효소, 예컨대 파파인 (Fab 단편 생산) 또는 펩신 ($F(ab')_2$ 단편 생산)을 사용하는 단백분해성 절단과 같이 당업계에 주지된 방법을 사용하여 온전한 항체로부터 제조될 수 있다 (예컨대 문헌 [**Wahl et al.**, 24 *J. Nucl. Med.* 316-25 (1983)] 참조). 항체의 일부는 상기 방법 중 임의의 것에 의해 제조될 수 있거나, 재조합 분자의 일부를 발현시킴으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 재조합 항체의 CDR 영역(들)은 단리될 수 있고, 적절한 발현 벡터 내로 서브클로닝될 수 있다.

[0030] 본원에서 사용되는 바, "가변 영역"이라는 용어는 결합 인식 특이성에 대한 결정기를 포함하는 경쇄 (VL) 또는 중쇄 (VH)의 가변 영역 또는 도메인을 의미하는 것이다. 가변 도메인은 항원 인식에 관여하고, 항원 결합 부위를 형성한다. 본원에서 사용되는 바, "프레임워크 영역"이라는 용어는 같은 종의 다른 항체 간에 85% 이상의 상동성을 가지는 경쇄 및 중쇄 가변 영역의 일부 (즉, CDR 이외의 영역의 일부)를 의미하는 것이다. 본원에서 사용되는 바, "상동성"이라는 용어는 스미스-워터맨(Smith-Waterman) 알고리즘 (문헌 [SMITH, et al. Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology*. 1981, no.147, p.195-7.])을 사용하여 정렬되었을 때, 대략 명시된 비율로 동일한 아미노산을 가지는 것인, 두 폴리펩티드를 구성하는 아미노산 간의 비교를 의미하는 것이다. 예를 들어, "85% 상동성"이라는 것은, 최적으로 정렬되었을 때, 85%의 아미노산 동일성을 가지는 것인, 두 폴리펩티드를 구성하는 아미노산 간의 비교를 의미하는 것이다. 카바트(Kabat) 데이터베이스 (문헌 [Kabat et al., 상기 언급된 문헌]) 에서 정의된 바와 같이, 중쇄 및 경쇄의

가변 영역 둘 다는 3개의 초가변 서열 신장부 또는 상보성 결정 영역 (CDR)이 중간에 끼어 있는 4개의 프레임워크 서브영역 (FR1, FR2, FR3, 및 FR4)을 포함하는 세그먼트로 나누어질 수 있으며, 이에 CDR1은 FR1과 FR2 사이에 위치하고, CDR2는 FR2와 FR3 사이에 위치하고, CDR3은 FR3과 FR4 사이에 위치하고 있다. FR1, FR2, FR3 또는 FR4로서 특정 서브영역을 구체적으로 언급하지 않고, 다른 경우에서 언급되는 바와 같이 프레임워크 영역은 단일의 천연적으로 발생된 면역글로불린 쇄의 가변 영역 내의 조합된 FR을 나타낸다. 본원에서 사용되는 바, 하나의 FR은 4개의 서브영역 중 하나를 나타내며, FR은 프레임워크 영역을 구성하는 4개의 서브영역 중 2개 이상을 나타낸다. 다른 경쇄 또는 중쇄의 프레임워크 영역의 서열은 종 내에서는 상대적으로 보존된다. 항체의 프레임워크 영역은 구성적 경쇄 및 중쇄의 조합된 프레임워크 영역이고, 이는 CDR의 위치를 정하고 정렬시키는 역할을 한다. CDR은 주로 항원의 에피토프에 대한 결합 특이성과 친화성을 부여하면서, 항체의 결합 부위를 형성하는 역할을 한다. 특이성이 다른 항체 간에는 극도의 가변성을 나타내기 때문에, 항원 결합 영역에 제공되는 H 또는 L 쇄의 가변 영역 내에 보다 작은 서열인 더빙된 "초가변부" 가 존재하게 된다. 그러한 초가변 영역은 또한 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR" 영역으로서도 지칭된다. 이들 CDR 영역이 특정 항원 결정기 구조에 대하여 항체가 가지는 기본적인 특이성의 원인이 된다. CDR은 가변 영역 내의 비-인접 아미노산 신장부를 나타내지만, 종과는 상관없이, 가변 중쇄 및 경쇄 영역 내에 존재하는 이들 중요한 아미노산 서열의 소재 위치는 가변 쇄의 아미노산 서열 내에서 유사한 위치를 가지는 것으로 밝혀졌다. 모든 항체의 가변 중쇄 및 경쇄는 각각 3개의 CDR 영역을 가지는데, 이들 각각은 각 경쇄 (L) 및 중쇄 (H)에 대해 다른 것 (L1, L2, L3, H1, H2, H3으로 명명되는 것)과 서로 인접해 있지 않다. 허용되는 CDR 영역은 문헌 [Kabat et al, 252 J. Biol. Chem. 6609-16 (1977)]에 기술되어 있고, CDR 루프는 선형 아미노산 서열을 조사하는 동안 상기 원칙을 적용시킴으로써 확인할 수 있다. CDR-H3 루프를 정의하는 원칙은 달라질 수 있지만 (문헌 [Chapter 4, Antibody Engineering: Methods & Protocols, (Lo, ed. Humana Press, Totowa, NJ, 2004)] 참조), 몇몇 CDR-H3 루프의 실제 경계에 대해서는, 예컨대 원편광 이색성 분광 측정법, 핵자기 공명법 또는 X선 결정학적 방법과 같은 실험적 기법을 수행하지 않고는 확인하지 못할 수도 있다. 모든 포유동물 종에서 항체 펩티드는 불변 영역 (즉, 고도로 보존적인 영역) 및 가변 영역을 포함하며, 가변 영역 내에는 CDR과, 중쇄 또는 경쇄의 가변 영역 중에 포함되어 있되 CDR 밖에 있는 아미노산 서열로 구성된 소위 "프레임워크 영역" 이라는 영역이 존재한다. CDR 영역은 또한 코티아(Chothia) 명명법 (문헌 [CHOTHIA and LESK. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins (1987) J Mol Biol. 1987 Aug 20;196(4):901-17])의 사용으로도 정의될 수 있다. 그러므로, 특정 실시양태에서 CDR은 카바트로 정의된 CDR이고, 다른 실시양태에서 CDR은 코티아로 정의된 CDR이다. 항체의 CDR 영역에 의해 인식되는 항원 결정기와 관련하여, 이는 또한 "에피토프"로도 지칭된다. 다시 말해, 에피토프란 항체가 인식할 수 있고 결합할 수 있는 임의의 분자 부위를 의미하는 것이다 (상응하는 항체 결합 영역은 파라토프로 지칭될 수 있다). 일반적으로, 에피토프는 분자, 예를 들어 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 기로 이루어져 있고, 특이적인 3차원적 구조상의 특징과 특이적인 하전 특징을 가진다.

[0031] 본원에서 사용되는 바, "모노클로날 항체" 또는 "mAb"라는 용어는 단일 클론으로부터 유래되는 항체를 의미한다. 모노클로날 항체는 예컨대 문헌 [HARLOW. Antibodies: A Laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor: Laboratory press, 1988] 및 [HAMMERLING, et al. Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas. New York: Elsevier, 1981. p.563-681.]에 개시되어 있는 것과 같은 하이브리도마 기법을 사용함으로써 제조될 수 있다.

[0032] 본원에서 사용되는 바, "인간 항체"라는 용어는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 것이거나, 그에 매우 가깝게 매칭되는 가변 및 불변 영역을 가지는 항체를 의미한다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해서는 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예컨대 시험관내 무작위 또는 부위-특이 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이) 를 포함할 수 있다. 따라서, 본원에서 사용되는 바, "인간 항체"라는 용어는 실질적으로 단백질 모든 부분이 인간 생식계열 항체와 실질적으로 유사한 항체를 의미한다. "실질적으로 유사하다"라는 것은 인간 생식계열 항체의 핵산 서열과 80% 이상, 바람직하게 85% 이상, 더욱 바람직하게 90% 이상 및 더욱더 바람직하게 95% 이상 상동성인 핵산 서열을 가지는 항체를 의미하는 것이다.

[0033] 본원에서 사용되는 바, "Fab"라는 용어는 중쇄 및 경쇄의 가변 영역을 포함하고, 결합 활성을 보이는 항체 분자의 영역을 의미하는 것이다. "Fab"는 하나의 중쇄와 하나의 경쇄로 이루어진 응집체 (보통 Fab로서 알려져 있다)를 포함하는데, 상기 응집체 중 어느 것이든 응집을 통해서 특정 항원 또는 항원 패밀리와 선택적으로 반응할 수만 있다면, 공유적으로 또는 비공유적으로 응집되었는지는 상관이 없다. Fab 단편은 VL, 및 VH 및 CH1 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 이종이량체이다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 Fab' 단편이다.

Fab' 단편은 항체 "힌지 영역"으로부터의 하나 이상의 시스테인을 비롯한 수개의 잔기를 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 포함하고 있다는 점에서 Fab 단편과 상이하다.

[0034] "$F(ab')_2$"는 항체의 펩신 처리로 수득되는 항체 단편 또는 다른 기법, 예컨대 재조합 기술을 통해 수득되는 동등한 단백질을 의미한다. $F(ab')_2$ 단편은 2개의 항원-결합부를 가지며, 여전히 항원과 교차 결합할 수 있다.

[0035] "Fv"는 하나의 완전한 항원 인식 및 결합 부위를 포함하는 최소의 항체 단편이다. 이 영역은 비공유적으로 밀착 회합되어 있는 하나의 중쇄 가변 도메인과 하나의 경쇄 가변 도메인으로 이루어진 이량체로 구성된다. 각 가변 도메인에 있는 3개의 CDR이 상호작용하여 VH VL 이량체의 표면 상에 있는 항원 결합 부위를 정의하는 입체 형상 구조를 가진다. 종합하면, 6개의 CDR이 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 비록 전체 결합부보다는 친화성이 낮기는 하지만, 단일의 가변 도메인 조차도 (또는 항원에 특이적인 단 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반부도) 항원을 인식하고 그에 결합할 수 있는 능력을 가지고 있다.

[0036] "단일 쇄 Fv" 또는 "scFv"는 단일의 폴리펩티드 쇄로 존재하는 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함한다. 바람직하게, scFv는 추가로 scFv가 항원 결합을 위해 원하는 구조를 형성할 수 있게 하는 폴리펩티드 링커를 VH와 VL 도메인 사이에 포함한다 (문헌 [**LENNARD.** Standard protocols for the construction of scFv libraries. *Methods in molecular biology*. 2002, no.178, p.59-71.]).

[0037] 본원에서 사용되는 바, "항체 단편"이라는 용어는 CSF-1R에 특이적으로 결합할 수 있는 능력을 보유하는, 항체의 하나 이상의 단편을 의미하는 것이다.

[0038] "디아바디"라는 용어는 같은 폴리펩티드 쇄 (VH VL)에 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함하는 것인, 2개의 항원 결합 부위를 가지는 작은 항체 단편을 의미하는 것이다. 같은 쇄 상에 있는 두 도메인 사이에서 쌍이 형성되게 하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써 도메인이 또 다른 쇄의 상보적인 도메인과 쌍을 형성하고 2개의 항원 결합 부위를 생성할 수 있도록 한다. 디아바디는 1개 이상의 에피토프에 결합할 수 있다. 디아바디에 대해서 문헌 [**POLJAK**. Production and structure of diabodies. *Structure*. 1994, vol.2, no.12, p.1121-3], [**HUDSON, et al**. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *Journal of immunological methods*. 1999, vol.231, no.1-2, p.177-89] 및 [**KIPRIYANOV**. Generation of bispecific and tandem diabodies. *Methods in molecular biology*. 2002, no.178, p.317-31]에 보다 상세하게 설명되어 있다.

[0039] 항체 단편을 생산하는 다양한 기법이 개발되었다. 전통적으로, 이러한 단편은 온전한 항체의 단백분해성 분해를 통해 유도되었다. 그러나, 이러한 단편은 현재 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생산될 수 있다. Fab, Fv 및 scFv 항체 단편 모두 이. 콜라이(*E. coli*)에서 발현될 수 있고, 그로부터 분비될 수 있는 바, 이를 통해 상기 단편들을 다량으로 생산할 수 있다. 항체 단편을 생산하는 기법은 당업자에게 자명할 것이다. 다른 실시양태에서, 최상의 항체는 단일 쇄 Fv 단편 (scFv)이다.

[0040] 본원에서 사용되는 바 "도메인 항체" (dAb)는 항체의 중쇄 (VH) 또는 경쇄 (VL) 중 어느 하나의 가변 영역에 상응하는, 항체의 최소 기능적 결합 단위로 구성된다. 도메인 항체의 분자량은 대략 13 kDa이거나, 그 크기는 전체 항체의 1/10 미만이다.

[0041] 본원에서 사용되는 바, "Fd"는 VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 항체 단편을 의미한다.

[0042] "항체" 또는 "Ab"라는 용어는 또한 예를 들어, 문헌 [**HOLLIGER, et al.** Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature biotechnology* 2005, vol.23, no.9, p.1126-36] 및 [**HOOGENBOOM, et al.** Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunology today* 2000, vol.21, no.8, p.371-8]에 기술되어 있는 것과 같은, 당업자에게 주지되어 있는 다른 항체 단편을 의미한다.

[0043] 한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0044] (i) 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열, 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열, 또는 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 포함하는 것인 하나 이상의 CDR; 또는

[0045] (ii) 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열, 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열, 또는 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 포함하는 것인 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0046] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0047] - 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열,

[0048] - 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열,

[0049] - 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열,

[0050] - 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열,

[0051] - 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열, 또는

[0052] - 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 포함하는 CDR로 이루어진 군에서 서로로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0053] 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0054] - 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열,

[0055] - 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열,

[0056] - 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열,

[0057] - 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열,

[0058] - 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열, 또는

[0059] - 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 포함하는 CDR로 이루어진 군에서 서로로부터 독립적으로 선택되는, 2, 3, 4 또는 5개 및 더욱더 바람직하게는 6개의 CDR을 포함한다.

[0060] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0061] (i) - 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열,

[0062] - 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열,

[0063] - 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 포함하는 CDR로 이루어진 군에서 서로로부터 독립적으로 선택되는 2개 및 더욱더 바람직하게는 3개의 CDR, 또는

[0064] (ii) - 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열,

[0065] - 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열, 또는

[0066] - 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 포함하는 CDR로 이루어진 군에서 서로로부터 독립적으로 선택되는 2개 및 더욱더 바람직하게는 3개의 CDR을 포함한다.

[0067] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0068] (i) - 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열,

[0069] - 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열, 및

[0070] - 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR로 이루어진 군에서 서로로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 CDR; 또는

[0071] (ii) - 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열,

[0072] - 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열, 및

[0073] - 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR로 이루어진 군에서 서로로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0074] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0075] - 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열,

[0076] - 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열,

[0077] - 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열,

[0078] - 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열,

[0079] - 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열, 및

[0080] - 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR로 이루어진 군에서 서로로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0081] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0082] - 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열,

[0083] - 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열,

[0084] - 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열,

[0085] - 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열,

[0086] - 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열, 및

[0087] - 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR로 이루어진 군에서 서로로부터 독립적으로 선택되는 2, 3, 4 또는 5개 및 더욱더 바람직하게는 6개의 CDR을 포함한다.

[0088] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0089] (i) - 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열,

[0090] - 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열,

[0091] - 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR로 이루어진 군에서 서로로부터 독립적으로 선택되는 2개 및 더욱더 바람직하게는 3개의 CDR, 또는

[0092] (ii) - 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열,

[0093] - 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열,

[0094] - 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR로 이루어진 군에서 서로로부터 독립적으로 선택되는 2개 및 더욱더 바람직하게는 3개의 CDR을 포함한다.

[0095] 한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, (i) 서열 번호 11, 12, 또는 13 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR; 또는 (ii) 서열 번호 14, 15, 또는 16 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0096] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0097] 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는, 2, 3, 4, 5개 및 더욱더 바람직하게는 6개의 CDR을 포함한다.

[0098] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, (i) 서열 번호 11, 12, 또는 13 중 어느 하나에 기재된 하나 이상의 CDR; 또는 (ii) 서열 번호 14, 15, 또는 16 중 어느 하나에 기재된 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0099] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16 중 어느 하나에 기재된 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0100] 한 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하

고, 서열 번호 11, 12, 13, 14, 15, 또는 16 중 어느 하나에 기재된 2, 3, 4, 5개 및 더욱더 바람직하게는 6개의 CDR을 포함한다.

[0101] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, (i) 서열 번호 17, 18, 또는 19 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR; 또는 (ii) 서열 번호 20, 21, 또는 22 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0102] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0103] 한 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는, 2, 3, 4, 5개 및 더욱더 바람직하게는 6개의 CDR을 포함한다.

[0104] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, (i) 서열 번호 17, 18, 또는 19 중 어느 하나에 기재된 하나 이상의 CDR; 또는 (ii) 서열 번호 20, 21, 또는 22 중 어느 하나에 기재된 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0105] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22 중 어느 하나에 기재된 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0106] 한 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 17, 18, 19, 20, 21, 또는 22 중 어느 하나에 기재되어 있는 2, 3, 4, 5개 및 더욱더 바람직하게는 6개의 CDR을 포함한다.

[0107] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, (i) 서열 번호 23, 24, 또는 25 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR; 또는 (ii) 서열 번호 26, 27, 또는 28 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0108] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 23, 24, 25, 26, 27, 또는 28 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0109] 한 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 23, 24, 25, 26, 27, 또는 28 중 어느 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 2, 3, 4, 5개 및 더욱더 바람직하게는 6개의 CDR을 포함한다.

[0110] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, (i) 서열 번호 23, 24, 또는 25 중 어느 하나에 기재된 하나 이상의 CDR; 또는 (ii) 서열 번호 26, 27, 또는 28 중 어느 하나에 기재된 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0111] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 23, 24, 25, 26, 27, 또는 28 중 어느 하나에 기재된 하나 이상의 CDR을 포함한다.

[0112] 한 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 23, 24, 25, 26, 27, 또는 28 중 어느 하나에 기재되어 있는 2, 3, 4, 5개 및 더욱더 바람직하게는 6개의 CDR을 포함한다.

[0113] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0114] - 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열,

[0115] - 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열, 및

[0116] - 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0117] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0118] - 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열,

[0119] - 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열, 및

[0120] - 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0121] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 11, 12, 및 13에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0122] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 14, 15, 및 16에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0123] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 17, 18, 및 19에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0124] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 20, 21, 및 22에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0125] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 23, 24, 및 25에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0126] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R, 더욱 구체적으로는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 26, 27, 및 28에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0127] 바람직한 실시양태에서, 상기 가변 영역은 추가로 1개, 더욱 바람직하게는 2개, 더욱더 바람직하게는 3개, 및 확실히 바람직하게는 4개의 프레임워크 영역, 및 더욱 바람직하게는 인간 FR을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, "인간 FR"은 천연적으로 발생된 인간 항체의 프레임워크 영역과 75% 이상 상동성인 프레임워크 영역이다.

[0128] 한 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 6에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0129] 더욱 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 6에 기재된 가변 영역을 포함한다.

[0130] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 9에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0131] 또 다른 더욱 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 9에 기재된 가변 영역을 포함한다.

[0132] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 2개의 가변 영역을 포함하며, 여기서 상기 가변 영역은

[0133] (i) - 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열,

[0134] - 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열, 및

[0135] - 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR을 포함하는 가변 영역;

[0136] (ii) - 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열,

[0137] - 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열, 및

[0138] - 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR을 포함하는 가변 영역;

[0139] (iii) 서열 번호 11, 12, 및 13에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역;

[0140] (iv) 서열 번호 14, 15, 및 16에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역;

[0141] (v) 서열 번호 17, 18, 및 19에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역;

[0142] (vi) 서열 번호 20, 21, 및 22에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역;

[0143] (vii) 서열 번호 23, 24, 및 25에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역; 및

[0144] (viii) 서열 번호 26, 27, 및 28에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역으로 이루어진 군에서 서로로부터 독립적으로 선택된다.

[0145] 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0146] (i) - 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열,

[0147] - 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열, 및

[0148] - 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR을 포함하는 제1 가변 영역; 및

[0149] (ii) - 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열,

[0150] - 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열, 및

[0151] - 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR을 포함하는 제2 가변 영역을 포함한다.

[0152] 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0153] - 서열 번호 11, 12, 및 13에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역, 및

[0154] - 서열 번호 14, 15, 및 16에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0155] 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0156] - 서열 번호 17, 18, 및 19에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역, 및

[0157] - 서열 번호 20, 21, 및 22에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0158] 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0159] - 서열 번호 23, 24, 및 25에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역, 및

[0160] - 서열 번호 26, 27, 및 28에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0161] 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0162] - 서열 번호 6에 기재된 가변 영역; 및

[0163] - 서열 번호 9에 기재된 가변 영역을 포함한다.

[0164] 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고,

[0165] (i) - 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR,

[0166] - 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR, 및

[0167] - 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0168] (ii) - 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR,

[0169] - 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR, 및

[0170] - 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0171] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, (i) 서열 번호 11, 12, 및 13에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 (ii) 서열 번호 14, 15, 및 16에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0172] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, (i) 서열 번호 17, 18, 및 19에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 (ii) 서열 번호 20, 21, 및 22에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0173] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, (i) 서열 번호 23, 24, 및 25에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 (ii) 서열 번호 26, 27, 및 28에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0174] 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, (i) 서열 번호 6에 기재된 중쇄 가변 영역, 및 (ii) 서열 번호 9에 기재된 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0175] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, scFv이며, 여기서 상기 scFv는

[0176] (i) - 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR,

[0177] - 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR, 및

[0178] - 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR을 포함하는 가변 영역; 및

[0179] (ii) - 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR,

[0180] - 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR, 및

[0181] - 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0182] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, scFv이며, 여기서 상기 scFv는

[0183] - 서열 번호 11, 12, 및 13에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역, 및

[0184] - 서열 번호 14, 15, 및 16에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0185] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, scFv이며, 여기서 상기 scFv는

[0186] - 서열 번호 17, 18, 및 19에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역, 및

[0187] - 서열 번호 20, 21, 및 22에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0188] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, scFv이며, 여기서 상기 scFv는

[0189] - 서열 번호 23, 24, 및 25에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역, 및

[0190] - 서열 번호 26, 27, 및 28에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 가변 영역을 포함한다.

[0191] 더욱 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, scFv이며, 여기서 상기 scFv는

[0192] - 서열 번호 6에 기재된 가변 영역, 및

[0193] - 서열 번호 9에 기재된 가변 영역을 포함한다.

[0194] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, scFv이며, 여기서 상기 scFv는

[0195] (i) - 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR,

[0196] - 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR, 및

[0197] - 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0198] (ii) - 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR,

[0199] - 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR, 및

[0200] - 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영

역을 포함한다.

[0201] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, scFv이며, 여기서 상기 scFv는

[0202] - 서열 번호 11, 12, 및 13에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0203] - 서열 번호 14, 15, 및 16에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0204] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, scFv이며, 여기서 상기 scFv는

[0205] - 서열 번호 17, 18, 및 19에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0206] - 서열 번호 20, 21, 및 22에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0207] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, scFv이며, 여기서 상기 scFv는

[0208] - 서열 번호 23, 24, 및 25에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0209] - 서열 번호 26, 27, 및 28에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0210] 더욱 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, scFv이며, 여기서 상기 scFv는

[0211] - 서열 번호 6에 기재된 중쇄 가변 영역, 및

[0212] - 서열 번호 9에 기재된 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0213] 더욱더 바람직한 실시양태에 따라, 서열 번호 6 및 9 에 기재된 아미노산 서열 내에 있는 하나 이상의 아미노산이 (표 1 및 표 2에 따라) 치환되어 있는 것인 scFv를 제공한다. 확실하게 바람직한 실시양태에서, 서열 번호 6 및 9 에 기재된 아미노산 서열 내의 표 1 및 표 2에 제시되어 있는 아미노산 모두가 (표 1 및 표 2에 따라) 치환되어 있는 것인 인간 항체를 제공한다.

[0214] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 2에 기재된 중쇄를 포함한다.

[0215] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 4에 기재된 경쇄를 포함한다.

[0216] 더욱 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 2에 기재된 중쇄, 및 서열 번호 4에 기재된 경쇄를 포함한다.

[0217] 더욱더 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 CSF-1R에 특이적으로 결합하고, 서열 번호 2에 기재된 2개의 중쇄, 및 서열 번호 4에 기재된 2개의 경쇄를 포함한다. 이러한 특정 항체는 본 출원 전역에 걸쳐 CXIIG6으로 명명될 것이다.

[0218] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명은

[0219] (i) - 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR,

[0220] - 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR, 및

[0221] - 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역; 및

[0222] (ii) - 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR,

[0223] - 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR, 및

[0224] - 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열에 기재된 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, CSF-1R에 특이적으로 결합하는 인간 항체에 관한 것이다.

[0225] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은

[0226] - 서열 번호 11, 12, 및 13에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0227] - 서열 번호 14, 15, 및 16에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, CSF-1R에 특이적으로 결합하는 인간 항체에 관한 것이다.

[0228] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은

[0229] - 서열 번호 17, 18, 및 19에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0230] - 서열 번호 20, 21, 및 22에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, CSF-1R에 특이적으로 결합하는 인간 항체에 관한 것이다.

[0231] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은

[0232] - 서열 번호 23, 24, 및 25에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0233] - 서열 번호 26, 27, 및 28에 기재된 3개의 CDR을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, CSF-1R에 특이적으로 결합하는 인간 항체에 관한 것이다.

[0234] 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명은

[0235] - 서열 번호 6에 기재된 중쇄 가변 영역, 및

[0236] - 서열 번호 9에 기재된 경쇄 가변 영역을 포함하는, CSF-1R에 특이적으로 결합하는 인간 항체에 관한 것이다.

[0237] 더욱 바람직한 실시양태에서, 서열 번호 6 및 9에 기재된 아미노산 서열 내에 있는 하나 이상의 아미노산이 (표 1 및 표 2에 따라) 치환되어 있는 것인 인간 항체를 제공한다. 더욱더 바람직한 실시양태에서, 서열 번호 6 및 9에 기재된 아미노산 서열 내의 표 1 및 표 2에 제시되어 있는 아미노산 모두가 (표 1 및 표 2에 따라) 치환되어 있는 것인 인간 항체를 제공한다.

표 1

[0238]

서열 번호 6	위치	바람직한 치환
K	3	Q
E	5	V
M	18	L
K	19	R
W	33	Y
S	40	A
E	42	G
M	43	K
A	49	G
E	50	R
I	51	T
A	59	T
F	61	E
E	64	A
S	79	N
V	81	L
R	89	K
P	90	T, A
G	94	A
I	95	V
T	99	A
N	107	Y, V
T	113	L
L	114	V

표 2

서열 번호 9	위치	바람직한 치환
A	9	S
V	13	A
E	17	D
T	18	R
E	27	Q
N	28	G
Q	40	P, D
S	43	A
Q	45	K
V	48	L
H	49	Y
N	53	R
A	55	E
D	56	S
Q	70	D
Y	71	F
S	72	T
K	74	T
N	76	S
S	80	P
G	84	A
S	85	T
H	90	Q
G	100	Q

[0239]

[0240] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은

[0241] (a) 식 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4로 정의되는 제1 가변 영역으로서, 상기 식에서

[0242] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

[0243] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

[0244] CDR1은 서열 번호 2의 45번 위치에서 출발하여 54번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 가지고;

[0245] CDR2는 서열 번호 2의 66번 위치에서 출발하여 87번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 가지고;

[0246] CDR3은 서열 번호 2의 117번 위치에서 출발하여 126번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 가지는 것인 제1 가변 영역; 및

[0247] (b) 식 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4로 정의되는 제2 가변 영역으로서, 상기 식에서

[0248] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

[0249] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

[0250] CDR1은 서열 번호 4의 44번 위치에서 출발하여 56번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 가지고;

[0251] CDR2는 서열 번호 4의 66번 위치에서 출발하여 76번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 가지고;

[0252] CDR3은 서열 번호 4의 109번 위치에서 출발하여 117번 위치에서 끝나는 서열의 5개 이상의 연속되는 아미노산을 가지는 것인 제2 가변 영역

[0253] 을 포함하는, CSF-1R, 더욱 바람직하게는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하는 단리된, 재조합 또는 정제된 항체에 관한 것이다.

[0254] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은

[0255] (a) 식 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4로 정의되는 제1 가변 영역으로서, 상기 식에서

[0256] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

[0257] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

[0258] CDR1은 서열 번호 11, 17, 및 23으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지고;

[0259] CDR2는 서열 번호 12, 18, 및 24로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지고;

[0260] CDR3은 서열 번호 13, 19, 및 25로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 것인 제1 가변 영역; 및

[0261] (b) 식 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4로 정의되는 제2 가변 영역으로서, 상기 식에서

[0262] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

[0263] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

[0264] CDR1은 서열 번호 14, 20, 및 26으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지고;

[0265] CDR2는 서열 번호 15, 21, 및 27로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지고;

[0266] CDR3은 서열 번호 16, 22, 및 28로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 가지는 것인 제2 가변 영역

[0267] 을 포함하는, CSF-1R에 특이적으로 결합하는 단리된, 재조합 또는 정제된 항체에 관한 것이다.

[0268] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은 하기 (i), (ii) 또는 (iii):

[0269] (i) (a) 식 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4로 정의되는 제1 가변 영역으로서, 상기 식에서

[0270] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

[0271] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

[0272] CDR1은 서열 번호 11에 기재되어 있는 것이고;

[0273] CDR2는 서열 번호 12에 기재되어 있는 것이고;

[0274] CDR3은 서열 번호 13에 기재되어 있는 것인 제1 가변 영역; 및

[0275] (b) 식 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4로 정의되는 제2 가변 영역으로서, 상기 식에서

[0276] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

[0277] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

[0278] CDR1은 서열 번호 14에 기재되어 있는 것이고;

[0279] CDR2는 서열 번호 15에 기재되어 있는 것이고;

[0280] CDR3은 서열 번호 16에 기재되어 있는 것인 제2 가변 영역; 또는

[0281] (ii) (a) 식 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4로 정의되는 제1 가변 영역으로서, 상기 식에서

[0282] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

[0283] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

[0284] CDR1은 서열 번호 17에 기재되어 있는 것이고;

[0285] CDR2는 서열 번호 18에 기재되어 있는 것이고;

[0286] CDR3은 서열 번호 19에 기재되어 있는 것인 제1 가변 영역; 및

[0287] (b) 식 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4로 정의되는 제2 가변 영역으로서, 상기 식에서

[0288] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

[0289] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

[0290] CDR1은 서열 번호 20에 기재되어 있는 것이고;

[0291] CDR2는 서열 번호 21에 기재되어 있는 것이고;

[0292] CDR3은 서열 번호 22에 기재되어 있는 것인 제2 가변 영역; 또는

[0293] (iii) (a) 식 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4으로 정의되는 제1 가변 영역으로서, 상기 식에서

[0294] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

[0295] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

[0296] CDR1은 서열 번호 23에 기재되어 있는 것이고;

[0297] CDR2는 서열 번호 24에 기재되어 있는 것이고;

[0298] CDR3은 서열 번호 25에 기재되어 있는 것인 제1 가변 영역; 및

[0299] (b) 식 FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4로 정의되는 제2 가변 영역으로서, 상기 식에서

[0300] FR1, FR2, FR3 및 FR4는 각각 프레임워크 영역이고;

[0301] CDR1, CDR2 및 CDR3은 각각 상보성 결정 영역이고;

[0302] CDR1은 서열 번호 26에 기재되어 있는 것이고;

[0303] CDR2는 서열 번호 27에 기재되어 있는 것이고;

[0304] CDR3은 서열 번호 28에 기재되어 있는 것인 제2 가변 영역

[0305] 중 어느 하나를 포함하는, CSF-1R, 더욱 바람직하게는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하는 단리된, 재조합 또는 정제된 항체에 관한 것이다.

[0306] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은

[0307] - 서열 번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 제1 가변 영역; 및

[0308] - 서열 번호 9의 아미노산 서열을 포함하는 제2 가변 영역을 포함하는, CSF-1R, 더욱 바람직하게는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하는 단리된, 재조합 또는 정제된 항체에 관한 것이다.

[0309] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은

[0310] - 서열 번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 제1 가변 영역; 및

[0311] - 서열 번호 4의 아미노산 서열을 포함하는 제2 가변 영역을 포함하는, CSF-1R, 더욱 바람직하게는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하는 단리된, 재조합 또는 정제된 항체에 관한 것이다.

[0312] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은

[0313] - 서열 번호 37 (도 32 참조) 및 서열 번호 38로 이루어진 군에서 선택되는 중쇄, 및

[0314] - 서열 번호 39, 서열 번호 40 및 서열 번호 41로 이루어진 군에서 선택되는 경쇄를 포함하는, CSF-1R, 더욱 바람직하게는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하는 단리된, 재조합 또는 정제된 항체에 관한 것이다.

[0315] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은

[0316] - 서열 번호 42 및 서열 번호 43으로 이루어진 군에서 선택되는 제1 가변 영역; 및

[0317] - 서열 번호 44, 서열 번호 45 및 서열 번호 46으로 이루어진 군에서 선택되는 제2 가변 영역을 포함하는, CSF-1R, 더욱 바람직하게는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하는 단리된, 재조합 또는 정제된 항체에 관한 것이다.

[0318] 한 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명은

[0319] (a) 서열 번호 37로 이루어진 중쇄, 및 (b) 서열 번호 39로 이루어진 경쇄를 포함하는, CSF-1R, 더욱 바람직하게는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하는 단리된, 재조합 또는 정제된 항체에 관한 것이다.

[0320] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명은 (a) 서열 번호 38로 이루어진 중쇄, 및 (b) 서열 번호 40으로 이루어진 경쇄를 포함하는, CSF-1R, 더욱 바람직하게는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하는 단리된, 재조합 또는 정제된 항체에 관한 것이다.

[0321] 한 유익한 실시양태에 따라, 본 발명은 (a) 서열 번호 37로 이루어진 중쇄, 및 (b) 서열 번호 41로 이루어진 경쇄를 포함하는, CSF-1R, 더욱 바람직하게는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하는 단리된, 재조합 또는 정제된 항체에 관한 것이다.

[0322] 한 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명은 (a) 서열 번호 42로 이루어진 제1 가변 영역, 및 (b) 서열 번호 44로 이루어진 제2 가변 영역을 포함하는, CSF-1R, 더욱 바람직하게는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하는 단리된, 재조합 또는 정제된 항체에 관한 것이다.

[0323] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명은 (a) 서열 번호 43으로 이루어진 제1 가변 영역, 및 (b) 서열 번호 45로 이루어진 제2 가변 영역을 포함하는, CSF-1R, 더욱 바람직하게는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하는 단리된, 재조합 또는 정제된 항체에 관한 것이다.

[0324] 한 유익한 실시양태에 따라, 본 발명은 (a) 서열 번호 42로 이루어진 제1 가변 영역, 및 (b) 서열 번호 46으로 이루어진 제2 가변 영역을 포함하는, CSF-1R, 더욱 바람직하게는 인간 CSF-1R에 특이적으로 결합하는 단리된, 재조합 또는 정제된 항체에 관한 것이다.

[0325] 본 발명에 따른 항체, 더욱 구체적으로는 인간 항체는 상이한 이소형, 예컨대 IgG, IgA, IgM 또는 IgE의 것일 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체, 더욱 구체적으로는 인간 항체는 IgG 이다.

[0326] 관련된 실시양태에서, 인간 항체는 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4의 변형된 또는 비변형된 불변 영역을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 불변 영역은 인간 IgG1 또는 IgG4이며, 이는 특정의 특성을 증진 또는 감소시키기 위해 임의로 변형될 수 있다.

[0327] IgG1의 경우, 불변 영역, 특히 힌지 또는 CH2 영역에 대한 변형은 ADCC 및/또는 CDC 활성을 비롯한, 이펙터 기능을 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 다른 실시양태에서, IgG2 불변 영역은 항체-항원 응집체 형성을 감소시키기 위해 변형된다. IgG4의 경우, 불변 영역, 특히 힌지 영역에 대한 변형은 항체의 절반부가 형성되는 것을 감소시킬 수 있다.

[0328] 항체 중 하나 이상의 아미노산이 돌연변이화되더라도 원하는 결합 친화도는 유지될 수 있다. 이러한 변이체에서는 항체 내의 하나 이상의 아미노산이 다른 잔기로 치환되어 있다. 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은 CDR(들)에 포함되어 있는 아미노산 중 하나 이상의이 보존적으로 치환된, 상기 기술된 바와 같이 CSF1에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 보존적 치환에 대해서는 하기 표 3에 제시되어 있다.

표 3

[0329]

원래의 아미노산	바람직한 보존적 치환	더욱 바람직한 보존적 치환
A	V, L, I	V
R	K, Q, N	K
N	Q, H, D, K, R	Q
D	E, N	E
C	S, A	S
Q	N, E	N
E	D, Q	D
G	A	A
H	N, Q, K, R	R
I	L, V, M, A, F	L
L	I, V, M, A, F	I
K	R, Q, N	R
M	L, F, I	L
F	W, L, V, I, A, Y	Y
P	A	A
S	T	T
T	V, S	S
W	Y, F	Y
Y	W, F, T, S	F
V	L, M, F, A	L

[0330] 본 발명은 또한 친화성 돌연변이에 의해 본 발명의 항체를 변형시키는 방법에 관한 것이다.

[0331] 본원에서 사용되는 바, "친화성 돌연변이"란, 치환을 통해서 CSF-1R 에 대한 항체의 친화성이 그러한 치환(들)을 포함하지 않는 모체 항체에 비해 개선되는 것인, 하나 이상의 CDR에 포함되어 있는 하나 이상의 아미노산의 치환을 의미하는 것이다. 친화성 돌연변이 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [**MARKS, et al.** By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology*. 1992, vol.10, no.7, p.779-83.]; [**BARBAS, et al.** In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994, vol.91, no.9, p.3809-13.]; [**SCHIER**. Identification of functional and structural amino-acid residues by parsimonious mutagenesis. *Gene*. 1996, vol.169, no.2, p.147-55.]; [**YELTON**. Affinity maturation of the BR96 anti-carcinoma antibody by codon-based mutagenesis. *J. Immunol.*. 1995, vol.155, no.4, p.1994-2004.]; [**JACKSON, et al.** In vitro antibody maturation. Improvement of a high affinity, neutralizing antibody against IL-1 beta. *J. Immunol.*. 1995, vol.154, no.7, p.3310-9.] 및 [**HAWKINS, et al.** Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *Journal of molecular biology*. 1992, vol.226, no.3, p.889-96]에 개시되어 있는 방법을 참조할 수 있다.

[0332] 본 발명은 또한 상기 기술된 바와 같은 친화성 돌연변이에 의해 수득된, CSF-1R에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다.

[0333] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 상기 기술된 항체의 아미노산 서열과 80% 이상, 바람직하게 85% 이상, 더욱 바람직하게 90% 이상, 및 더욱더 바람직하게 98% 이상 상동성인 아미노산 서열을 가지는 것인, 상기 기술된 항체의 변이체를 제공한다.

[0334] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 1개 초과의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 예를 들어, 본 발명에 따른 항체는 CSF-1R의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 별법으로, 본 발명에 따른 항체는 CSF-1R 및 또 다른 분자에 결합할 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 1개 초과의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체는 교차 결합된 항체일 수 있다. 예를 들어, 하나의 항체는 아비딘에, 나머지 한 항체는 비오틴에 커플링될 수 있다. 교차 결합된 항체는 당업계에 주지되어 있는 임의의 편리한 교차 결합 방법을 사용함으로써 제조될

수 있다. 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성하는 기법 또한 예를 들어, 문헌 ([**BRENNAN, et al.** Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science*. 1985, vol.229, no.4708, p.81-3.] 및 [**SHALABY, et al.** Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *The Journal of experimental medicine*. 1992, vol.175, no.1, p.217-25], [**KOSTELNY, et al.** Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J. Immunol.*. 1992, vol.148, no.5, p.1547-33.])에 기재되어 있는 것을 참조할 수 있다.

[0335] 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명에 따른, 1개 초과의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체는 디아바디이다.

[0336] 또 다른 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명에 따른, 1개 초과의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체는 문헌 [**ZAPATA, et al.** Engineering linear F(ab')2 fragments for efficient production in Escherichia coli and enhanced antiproliferative activity. *Protein engineering*. 1995, vol.8, no.10, p.1057-62]에 기재되어 있는 것과 같은 선형 항체이다.

[0337] 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 29의 20번 내지 41번 아미노산 사이에 위치하는 하나 이상의 에피토프 (즉, 인간 도메인 D1의 N-말단부)에 특이적으로 결합한다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 서열 번호 29의 20번 내지 41번 아미노산 사이에 위치하는 한 에피토프 (즉, 인간 도메인 D1의 N-말단부)에 결합하지만, 서열 번호 29의 42번 내지 90번 아미노산 사이, 및/또는 91번 내지 104번 아미노산 사이, 및/또는 105번 내지 199번 아미노산 사이, 및/또는 200번 내지 298번 아미노산 사이에 위치하는 에피토프에는 결합하지 않는다. 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 서열 번호 29의 20번 내지 41번 아미노산 사이에 위치하는 최소 에피토프 (즉, 인간 도메인 D1의 N-말단부)를 인식할 수 있다. 유익한 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 구축물 pTG18016을 인식하고, 그에 결합할 수 있다 (도 19, 및 관련 실시예 참조).

[0338] 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 CSF-1R 수용체에의 결합에 대하여 IL-34 리간드와 경쟁하지 않는다. 본원에서 사용되는 바, "IL-34 리간드와 경쟁하지 않는다"라는 용어는 IL-34 리간드의 그의 수용체 CSF-1R에의 결합을 억제시키지 않는다는 것이다.

[0339] 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 CSF-1R 수용체에의 결합에 대하여 CSF-1 리간드와 부분적으로 경쟁한다. 본원에서 사용되는 바, "CSF-1 리간드와 부분적으로 경쟁한다"라는 용어는 CSF-1 리간드의 그의 수용체 CSF-1R에의 결합을 100% 미만, 바람직하게 50% 미만, 및 더욱더 바람직하게, 20% 미만, 및 유리하게는 10% 미만으로 억제시킨다는 것을 의미한다. 이러한 부분 억제제는 오직 리간드 결합을 감소만 시킬 뿐이며, 그 결합을 전체적으로 배제시키지는 못하는 바, 상기 억제는 부분 억제로 명명된다.

[0340] 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 본 발명에서 CSF-1의 그의 수용체 CSF-1R에의 결합을 부분적으로 막을 수는 있지만, 상기 결합을 전체적으로 억제시키지는 못한다. 더욱 특히 본 발명에 따른 항체는 CSF-1의 CSF-1R에의 결합을 대략 5 내지 10% 만큼 감소시킬 수 있다. 특별한 실시양태에 따라, 상기와 같은 결합 감소는 서열 번호 29의 Ile 20 내지 Glu 512에 걸쳐 있는 아미노산 서열을 가지는 수용체 CSF-1R 상에서 결합한 CSF-1 (서열 번호 47의 1번 내지 444번에 걸쳐 있는 아미노산 서열을 가지는 것-도 21 참조)을 측정함으로써 본 실험부에 기술되어 있는 바와 같이 측정된다.

[0341] 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 고도한 친화도로 CSF-1R에 결합하는 것을 특징으로 한다. 더욱 특히 본 발명에 따른 항체의 Ki는 1 nM 미만, 바람직하게, 0.8 nM 미만, 및 더욱더 바람직하게, 0.6 nM 미만이다. 상기와 같이, 예상외로 친화도가 고도함에 따라, 그 결과로서, 본 발명의 항체는 보다 소량으로 투여될 수 있고, 이에 잠재적인 부작용을 없앨 수 있다.

[0342] 특정 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항체가 특이적으로, 또는 우선적으로 결합하는 폴리펩티드, 또는 세포, 즉, CSF-1R-발현 세포, 더욱 바람직하게, CSF-1R-발현 인간 세포, 및 유리하게, CSF-1R-발현 인간 암 세포의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전하게 차단하거나, 억제시키는 길항제 항체이다.

[0343] 본 발명의 구체적인 실시양태에 따라, 본 발명의 항체는 하기 유리한 특성 중 하나 이상의 특성을 가진다:

[0344] - 시험관내 시험: 본 발명에 따른 항체는 CSF-1R 수용체에의 결합에 대하여 IL-34 리간드와 경쟁하지 않는 특성;

[0345] - 시험관내 시험: 본 발명에 따른 항체는 CSF-1R 수용체에의 결합에 대하여 CSF-1 리간드와 부분적으로 경쟁하

는 특성;

[0346] - ADCC 시험: 정상적인 인간 말초 혈액 단핵 세포의 존재하에서 본 발명의 항체는 CSF-1R-발현 인간 세포, 특히 CSF-1R-발현 인간 암 세포에 대하여 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC)을 발휘하는 특성;

[0347] - 생체내 시험: 본 발명의 항체는 CSF-1R-발현 인간 암 세포를 보유하는 비-인간 동물에 대해 항종양 효과를 발휘하거나;

[0348] - 생체내 시험: 본 발명의 항체는 CSF-1R-발현 인간 암 세포를 보유하는 인간을 비롯한 동물에 대해 항종양 효과를 발휘하는 특성;

[0349] - 생체내 시험: 본 발명의 항체는 AML5 세포의 CSF-1-의존성 증식을 억제시키는 특성;

[0350] - 생체내 시험: 본 발명의 항체는 CSF-1R의 CSF-1-의존성 인산화를 부분적으로 억제시키는 특성;

[0351] - 생체내 시험: 본 발명의 항체는 CSF-1R에 대하여 직접적인 길항 활성을 보이는 특성.

[0352] 본 발명에 따른 항체는 글리코실화되거나, 비-글리코실화될 수 있다.

[0353] 본원에서 사용되는 바, "글리코실화"라는 용어는 항체에 공유적으로 부착된 탄수화물 단위가 존재한다는 것을 의미하는 것이다.

[0354] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 방사선감작제, 수용체 및/또는 세포독성제에 접합된다.

[0355] 본원에서 사용되는 바, "방사선감작제"라는 용어는 세포를 방사선 요법에 대하여 더욱 감작화되도록 하는 분자를 의미한다. 방사선감작제로는 메트로니다졸, 미소니다졸, 데스메틸미소니다졸, 피모니다졸, 에타니다졸, 니모라졸, 미토마이신 C, RSU 1069, SR 4233, E09, RB 6145, 니코틴아미드, 5-브로모데옥시우리딘 (BUdR), 5-아이오도데옥시우리딘 (IUdR), 브로모데옥시시티딘, 플루오로데옥시우리딘 (FUdR), 히드록시우레아 및 시스플라틴을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0356] 본원에서 사용되는 바, "수용체"라는 용어는 리간드에 특이적으로 결합할 수 있는 화합물을 의미한다. 본 발명의 바람직한 실시양태에 따라, 수용체는 비오틴이다.

[0357] 본원에서 사용되는 바, 세포독성제라는 용어는 세포에 대해 직접적으로 독성을 띠며, 이를 통해 세포의 재생산 또는 성장을 방해하는 화합물을 의미한다. 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명과 관련하여 사용되는 세포독성제는 암 치료제, 독소 (예컨대 박테리아, 진균, 식물 또는 동물로부터 기원된, 효소적으로 활성을 띠는 독소 또는 그의 단편) 또는 방사성 동위원소를 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0358] 또 다른 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 표지화제에 접합된다.

[0359] 본원에서 사용되는 바, "표지화제"란 검출가능한 화합물을 의미한다. 표지화제는 그 자체에 의해서 (예컨대 방사성 동위원소 또는 형광 표지)에 의해 검출될 수 있거나, 효소 표지인 경우에는 검출가능한 기질 화합물의 화학적 변형을 촉매화시킬 수 있다.

[0360] 본원에서 사용되는 바, "접합된"이라는 용어는 본 발명에 따른 항체와 표지화제가 공유 또는 비공유적으로 결합되어 있는 것을 의미한다.

[0361] "공유 결합"이란 임의로는 교차 결합제 또는 다른 활성화제를 중간에 사용하여 반응성 작용기를 통해 이루어지는 커플링을 의미한다 (예를 들어, 문헌 [HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996] 참조). 본 발명에 따른 항체 및/또는 접합된 작용제는 예를 들어, 활성화된 카르보닐기 (계내에서 활성화된 것 포함) 상에서의 또는 이미도에스테르 상에서의 치환을 통해, 불포화된 카르보닐기 상에서의 부가를 통해, 환원적 아미드화에 의해, 포화된 탄소 원자 또는 헤테로원자 상에서의 친핵성 치환에 의해, 방향족 사이클 상에서의 반응에 의해 그의 커플링이 이루어질 수 있도록 변형될 수 있다. 특히 동종이작용성 또는 이종이작용성 교차 결합제를 사용함으로써 커플링을 수행할 수 있다. 글루타르알데히드, 숙신산 및 DMS (디메틸 수베르이미데이트)와 같은 비스-이미도에스테르를 비롯한, 동종이작용성 교차 결합제는 다양한 모이어티 상에 존재할 수 있는 아민기를 커플링시키는 데 사용될 수 있다. 다수의 일례가 문헌 [HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996. p.118-228]에 제시되어 있으며, 이는 당업자에게 주지되어 있다. 이종이작용성 교차 결합제로는 아민 반응기와 술프히드릴 반응기 둘 다, 카르보닐 반응기와 술프히드릴 반응기 둘 다, 및 술프히드릴 반응기와 광반응성 링커 둘 다를 가지는 교차 결합제를 포함한다. 적합한 이종이작용성 교차 결합제는 예를 들어, 문헌 [HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996. p.229-285]에 기술되어 있다. 그 예로 예를 들

어, SPDP (N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트), SMBP (숙신이미딜-4-(p-말레이미도페닐)부티레이트), SMPT (숙신이미딜옥시카르보닐-α-메틸-α-(2-피리딜디티오)톨루엔), MBS (m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르), SIAB (N-숙신이미딜 (4-아이오도아세틸)아미노벤조에이트), GMBS (γ-말레이미도부티릴옥시) 숙신이미드 에스테르), SIAX (숙신이미딜-6-아이오도아세틸 아미노 헥소네이트, SIAC (숙신이미딜-4-아이오도아세틸 아미노 메틸), NPIA (p-니트로페닐 아이오도아세테이트)가 있다. 다른 예는 탄수화물-함유 분자 (예컨대 env 당단백질, 항체) 를 술프히드릴 반응기에 커플링시키는 데 유용하다. 예로 MPBH (4-(4-N 말레이미도페닐)부티르산 히드라지드) 및 PDPH (4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실-히드라지드 (M2C2H 및 3-2(2-피리딜디티오)프로프리오닐 히드라지드)를 포함한다.

[0362] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산 서열에 관한 것이다.

[0363] "핵산 서열"이라는 용어는 선형의 뉴클레오티드 서열을 의미한다. 뉴클레오티드는 선형의 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드 서열 중 어느 하나 또는 그 둘 다의 혼합물이다. 본 발명과 관련하여 폴리뉴클레오티드의 예로는 싱글 및 더블 스트랜드 DNA, 싱글 및 더블 스트랜드 RNA, 및 싱글 및 더블 스트랜드 DNA 및 RNA의 혼합물 둘 다를 가지는 하이브리드 분자를 포함한다. 추가로, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 가질 수 있다.

[0364] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 핵산 서열은 벡터에 포함된다.

[0365] 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 기원인 것일 수 있고, 적절하다면, 벡터의 형질감염 효율 및/또는 안정성을 개선시키는 하나 이상의 물질과 조합될 수 있다. 이러한 물질은 당업자가 이용할 수 있는 문헌에 널리 기재되어 있다 (예를 들어, 문헌 [**FELGNER, et al**. Cationic liposome mediated transfection. *Proceedings of the Western Pharmacology Society*. 1989, vol.32, p.115-21.]; [**HODGSON, et al.** Virosomes: cationic liposomes enhance retroviral transduction. *Nature biotechnology*. 1996, vol.14, no.3, p.339-42.]; [**REMY, et al**. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconjugate chemistry*. 1994, vol.5, no.6, p.647-54.] 참조). 비제한적인 일례로, 상기 물질은 중합체, 지질, 특히 양이온성 지질, 리포솜, 핵 단백질 또는 중성 지질일 수 있다. 이러한 물질은 단독으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 구현될 수 있는 조합물은 양이온성 지질 (DOGS, DC-CHOL, 스퍼민-chol, 스퍼미딘-chol 등), 리소인지질 (예를 들어, 헥사데실포스포콜린) 및 중성 지질 (DOPE)과 조합된 재조합 플라스미드 벡터 조합물이다.

[0366] 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명에 사용될 수 있는 양이온성 지질은 EP 901463에 기재되어 있는 양이온성 지질, 및 더욱 바람직하게 pcTG90이다.

[0367] 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 플라스미드들의 선택은 매우 방대하다. 이는 클로닝 벡터 및/또는 발현 벡터일 수 있다. 일반적으로, 이 벡터들은 당업자에게 알려져 있고, 많은 벡터들이 상업적으로 이용가능하지만, 이는 또한 유전적 조작 기법을 사용함으로써 이들 벡터를 구축하거나 변형시킬 수도 있다. 언급될 수 있는 그 예로는 pBR322 (기브코 BRL(Gibco BRL)), pUC (기브코 BRL), pBluescript (스트라테이진(Stratagene)), pREP4, pCEP4 (인비트로겐 (Invitrogen)) 또는 pPoly (문헌 [**LATHE, et al**. Plasmid and bacteriophage vectors for excision of intact inserts. *Gene*. 1987, vol.57, no.2-3, p.193-201.])로부터 유래된 플라스미드들이 있다. 바람직하게, 본 발명과 관련하여 사용되는 플라스미드는 생산자 세포 및/또는 숙주 세포에서 확실하게 복제가 개시될 수 있도록 하는 복제 기점을 포함한다 (예를 들어, ColE1 기점은 이. 콜라이에서 생산하고자 하는 플라스미드를 위해 선택될 수 있고, oriP/EBNA1 시스템은 포유동물 숙주 세포에서 자가-복제하는 플라스미드가 요구되는 경우에 선택될 수 있다 (문헌 [**LUPTON, et al**. Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Molecular and cellular biology*. 1985, vol.5, no.10, p.2533-42]; [**YATES, et al**. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*. 1985, vol.313, no.6005, p.812-5])). 플라스미드는 추가로 형질감염된 세포가 선별되거나 확인될 수 있도록 하는 선별 유전자를 포함할 수 있다 (영양요구 돌연변이, 항생제에 대한 내성을 코딩하는 유전자의 보완 등). 천연적으로 플라스미드는 주어진 세포에서 세포의 유지 및/또는 안정성을 개선시켜 주는 추가의 요소를 포함할 수 있다 (플라스미드가 단량체 형태로 유지되는 것을 증진시켜 주는 cer 서열 (문헌 [**SUMMERS, et al.** Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*. 1984, vol.36, no.4, p.1097-103.]), 세포 게놈 내로의 통합을 위한 서열).

[0368] 바이러스 벡터와 관련하여, 폭스바이러스 (백시니아 바이러스, 특히 MVA, 카나리폭스바이러스 등)로부터, 아데노바이러스로부터, 레트로바이러스로부터, 헤르페스바이러스로부터, 알파바이러스로부터, 포미 바이러스로부터

또는 아데노바이러스-관련 바이러스로부터 유래된 벡터가 구현될 수 있다. 복제 가능 또는 복제 불능 바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 비통합형 벡터를 사용하는 것이 바람직할 것이다. 이와 관련하여, 특히 본 발명을 실행하는 데 있어서 아데노바이러스 벡터 및 폭스바이러스 및 더욱 바람직하게 백시니아 바이러스 및 MVA로부터 유래된 벡터가 매우 적합하다.

[0369] 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명에 따른 바이러스 벡터는 변형된 백시니아 바이러스 앙카라 (MVA)로부터 유래된 것이다. MVA 벡터 및 상기 벡터를 제조하는 방법은 유럽 특허 **EP 83286** 및 **EP 206920** 뿐만 아니라, 문헌 [**SUTTER, et al**. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*. 1992, vol.89, no.22, p.10847-51.]에 상세히 기재되어 있다. 더욱 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명에 따른 핵산 서열은 MVA 벡터의 결실부 I, II, III, IV, V 및 VI, 및 더욱더 바람직하게는, 결실부 III에 삽입될 수 있다 (문헌 [**MEYER, et al**. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *The Journal of general virology*. 1991, vol.72, no.Pt5, p.1031-8.]; [**SUTTER, et al.** A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine*. 1994, vol.12, no.1 1, p.1032-40.]).

[0370] 레트로바이러스는 세포를 감염시키고, 및 대개의 경우에는 세포 내로 통합하여 그를 분열시키는 특성을 가지며, 이러한 점에서 레트로바이러스는 암과 관련하여 사용하기에 특히 적절하다. 본 발명에 따른 재조합 레트로바이러스는 일반적으로 LTR 서열, 캡시드화 영역 및 본 발명에 따른 뉴클레오티드 서열을 포함하는데, 이 뉴클레오티드 서열은 레트로바이러스 LTR의 제어하에 또는 예컨대 하기 기술하는 것과 같은 내재 프로모터의 제어하에 배치되어 있다. 재조합 레트로바이러스는 임의 기원 (뮤린, 영장류, 고양이, 인간 등)의 레트로바이러스로부터, 및 특히 MoMuLV (몰로니 뮤린 백혈병 바이러스), MVS (뮤린 육종 바이러스) 또는 프렌드 (Friend) 뮤린 레트로바이러스 (Fb29)로부터 유래될 수 있다. 바이러스 입자를 구성하는 데 필요한 바이러스 폴리펩티드인 gag, pol 및/또는 env를 트랜스로 공급할 수 있는 캡시드화 세포주에서 증식하게 된다. 상기와 같은 세포주는 문헌에 기재되어 있다 (PA317, Psi CRIP GP + Am-12 등). 본 발명에 따른 레트로바이러스 벡터는 특히 LTR (프로모터 영역을 진핵 세포 프로모터로 대체)에 또는 캡시드화 영역 (이종성 캡시드화 영역, 예를 들어, VL30형으로 대체) (**US 5747323** 참조)에 변형을 포함할 수 있다.

[0371] 숙주 유기체 또는 환경 내에서 벡터가 증식하지 못하도록 하기 위해, 복제에 필수적이고, E1, E2, E4 및 L1-L5 영역으로부터 선택되는 하나 이상의 영역 모두 또는 그 일부가 없는 아데노바이러스 벡터를 사용하는 것 또한 바람직할 것이다. E1 영역의 결실이 바람직하다. 그러나, 상보성 세포주 및/또는 헬퍼 바이러스를 수단으로 하여 결함이 있는 필수 기능이 트랜스로 보완되는 정도까지 특히 E2, E4 및/또는 L1-L5 영역 모두 또는 그 일부에 영향을 줄 수 있는 다른 (또 다른) 변형(들)-/결실(들)과 조합될 수 있다. 이러한 점에서, 제2 세대의 최첨단 벡터를 사용할 수 있다 (예컨대 국제 출원 **WO 94/28152** 및 **WO 97/04119** 참조). 일례로, 특히 E1 영역 및 E4 전사 유닛의 주요부를 결실시키는 것이 매우 이롭다. 클로닝 능력을 증가시키기 위한 목적으로, 비필수 E3 영역 모두 또는 그 일부를 추가로 아데노바이러스 벡터에서 결실시킬 수 있다. 또 다른 대안에 따라, 캡시드화에 필수적인 서열, 즉, 5' 및 3' ITR (역위 말단 반복부), 및 캡시드화 영역을 보유하는 최소의 아데노바이러스 벡터를 사용할 수 있다. 다양한 아데노바이러스 벡터, 및 이러한 벡터를 제조하는 기법이 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [**GRAHAM, et al**. Methods in molecular biology. Edited by MURREY. The human press inc, 1991. p.109-128.] 참조).

[0372] 추가로, 본 발명에 따른 아데노바이러스 벡터의 기원은 종의 관점으로부터 및 혈청형의 관점 둘 다로부터 달라질 수 있다. 벡터는 인간 또는 동물 (개, 조류, 소, 뮤린, 양, 돼지, 원숭이 등) 기원의 아데노바이러스의 게놈으로부터 또는 2개 이상의 상이한 기원을 가지는 아데노바이러스 게놈 단편을 포함하는 하이브리드로부터 유래될 수 있다. 더욱 특히 개 기원의 CAV-1 또는 CAV-2 아데노바이러스, 조류 기원의 DAV 아데노바이러스 또는 소 기원의 Bad 3형 아데노바이러스를 언급할 수 있다 (문헌 [**ZAKHARCHUK, et al**. Physical mapping and homology studies of egg drop syndrome (EDS-76) adenovirus DNA. Archives of virology. 1993, vol.128, no.1-2, p.171-6.]; [**SPIBEY, et al**. Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of two strains of canine adenovirus type 2. *The Journal of general virology*. 1989, vol.70, no.Pt 1, p.165-72.]; [**JOUVENNE, et al.** Cloning, physical mapping and cross-hybridization of the canine adenovirus types 1 and 2 genomes. *Gene*. 1987, vol.60, no.1, p.21-8.]; [**MITTAL, et al**. Development of a bovine adenovirus type 3-based expression vector. *The Journal of general virology*. 1995, vol.76, no.Pt 1, p.93-102.]). 그러나, 바람직하게 혈청형 C-아데노바이러스, 특히 2형 또는 5형 혈청형 C 아데노바이러스로부

터 유래된, 인간 기원의 아데노바이러스 벡터가 바람직할 것이다.

[0373] 본원에서 사용되는 바, "복제 가능"이라는 용어는 임의로 트랜스로 보완하지 않고도 숙주 세포에서 복제할 수 있는 바이러스 벡터를 의미한다.

[0374] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따라, 복제 가능 벡터는 복제 가능 아데노바이러스 벡터이다. 이러한 복제 가능 아데노바이러스 벡터는 당업자에게 주지되어 있다. 이중, ONYX-015 바이러스에서와 같이, 55 kD P53 억제제를 코딩하는 E1b 영역에서 결실된 아데노바이러스 벡터 (문헌 [**BISCHOFF, et al.** An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science.* 1996, vol.274, no.5286, p.373-6.]; [He **HEISE, et al**. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nature Medicine*. 2000, vol.6, no.10, p.1134-9.]; **WO 94/18992**)가 특히 바람직하다. 따라서, 이러한 바이러스는 p53-결핍 신생물성 세포를 선택적으로 감염시키고 사멸시키는 데 사용될 수 있다. 당업계의 숙련가는 또한 확립된 기법에 따라 아데노바이러스 5 또는 다른 바이러스에서 p53 억제제 유전자를 돌연변이화하고 파괴시킬 수 있다. E1A Rb 결합 영역에서 결실된 아데노바이러스 벡터 또한 본 발명에서 사용될 수 있다. 예를 들어, E1A 영역에 24개의 염기쌍 결실을 보유하는 돌연변이체 아데노바이러스인 델타 24 바이러스가 있다 (문헌 [**FUEYO, et al.** A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene*. 2000, vol.19, no.1, p.2-12.]). 델타 24는 Rb 결합 영역에 결실을 가지고, Rb에 결합하지 않는다. 그러므로, 돌연변이체 바이러스의 복제는 정상 세포에서 Rb에 의해 억제된다. 그러나, Rb가 불활성화된 상태이고, 세포가 신생물성이 되면, 델타 24는 더 이상 억제되지 않는다. 대신, 돌연변이체 바이러스는 효율적으로 복제되고, Rb-결핍 세포를 용해시키게 된다.

[0375] 본 발명에 따른 아데노바이러스 벡터는 결찰에 의해 또는 상동성 재조합에 의해 (예컨대 국제 출원 **WO 96/17070** 참조) 또는 그 밖에 상보성 세포주에서의 재조합에 의해 시험관내 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) (이. 콜라이)에서 생성될 수 있다.

[0376] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따라, 벡터는 본 발명에 따른 항체의 발현에 대한 필수 요소를 추가로 포함한다.

[0377] 발현에 대한 필수 요소는 핵산 서열이 RNA로 전사될 수 있게 하고, mRNA가 폴리펩티드로 번역될 수 있게 하는 모든 요소로 구성된다. 이러한 요소로는 특히 프로모터를 포함할 수 있는데, 이는 조절가능형 또는 구성적 프로모터일 수 있다. 천연적으로, 프로모터는 선택된 벡터 및 숙주 세포에 맞게 적합화된다. 그 예로는 PGK (포스포글리세레이트 키나제), MT (메탈로티오네인; 문헌 [**MCIVOR**. Human purine nucleoside phosphorylase and adenosine deaminase: gene transfer into cultured cells and murine hematopoietic stem cells by using recombinant amphotropic retroviruses. *Molecular and cellular biology*. 1987, vol.7, no.2, p.838-46.]), α-1 항트립신, CFTR, 계면활성제, 면역글로불린, 액틴 (문헌 [**TABIN, et al**. Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Molecular and cellular biology*. 1982, vol.2, no.4, p.426-36.]) 및 SRα (문헌 [TAKEBE, et al. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Molecular and cellular biology*. 1988, vol.8, no.1, p.466-72.]) 유전자의 진핵성 프로모터, SV40 바이러스 (시미안 바이러스)의 조기 프로모터, RSV (라우스 육종 바이러스)의 LTR, HSV-1 TK 프로모터, CMV 바이러스 (시토메갈로바이러스)의 조기 프로모터, 백시니아 바이러스의 p7.5K pH5R, pK1L, p28 및 p11 프로모터, 키메라 프로모터, 예컨대 p11 K7.5 및 E1A 및 MLP 아데노바이러스 프로모터가 언급될 수 있다. 프로모터는 또한 종양 또는 암 세포에서의 발현을 자극하는 프로모터일 수 있다. 특히 유방암 및 전립샘암에서 과다발현되는 MUC-1 유전자 (문헌 [**CHEN, et al.** Breast cancer selective gene expression and therapy mediated by recombinant adenoviruses containing the DF3/MUC1 promoter. *The Journal of clinical investigation*. 1995, vol.96, no.6, p.2775-82.]), 결장암에서 과다발현되는 (암종 배아 항원을 나타내는) CEA 유전자 (문헌 [[**SCHREWE, et al.** Cloning of the complete gene for carcinoembryonic antigen: analysis of its promoter indicates a region conveying cell type-specific expression. *Molecular and cellular biology*. 1990, vol.10, no.6, p.2738-48.]), 흑색종에서 과다발현되는 티로시나제 유전자 (문헌 [**VILE, et al.** Use of tissue-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA. *Cancer res.*. 1993, vol.53, no.17, p.3860-4.]), 유방암 및 췌장암에서 과다발현되는 ERBB-2 유전자 (문헌 [**HARRIS, et al.** Gene therapy for cancer using tumor-specific prodrug activation. *Gene therapy.* 1994, vol.1, no.3, p.170-5.]) 및 간암에서 과다발현되는 α-태

아단백질 유전자 (문헌 [KANAI, et al. In vivo gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene. *Cancer res.*. 1997, vol.57, no.3, p.461-5.])의 프로모터를 언급할 수 있다. 특히 시토메갈로바이러스 (CMV) 조기 프로모터가 매우 바람직하다.

[0378] 그러나, 백시니아 바이러스로부터 유래된 벡터 (예컨대 MVA 벡터)를 사용할 경우에는 티미딘 키나제 7.5K 유전자의 프로모터 및 pH5R 프로모터가 특히 바람직하다.

[0379] 필수 요소는 숙주 세포에서의 본 발명에 따른 핵산 서열의 발현과 그의 유지를 개선시켜 주는 추가의 요소를 추가로 포함할 수 있다. 특히 인트론 서열, 분비 신호 서열, 핵 위치 서열, IRES 형의 번역 재개시를 위한 내부 부위, 전사 종결 폴리 A 서열, 3부분 리더 및 복제 기점을 언급할 수 있다. 이러한 요소는 당업자에게 공지되어 있다. 분비 신호 서열 중, 서열 번호 5 및/또는 8에 기재된 폴리펩티드를 코딩하는 서열이 특히 바람직하다.

[0380] 본 발명에 따른 재조합 벡터는 또한 관심의 대상이 되는 하나 이상의 추가의 유전자를 포함할 수 있는데, 이들 유전자는 동일한 조절 요소 (다중시스트론성 카세트) 또는 독립 요소의 제어하에 위치할 수 있다. 그러한 유전자로는 특히 인터루킨 IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, 케모카인, 예컨대 CCL19, CCL20, CCL21, CXCL-14, 인터페론, 종양 괴사 인자 (TNF), 및 선천 면역 및 혈관신생에 작용할 수 있는 인자 (예를 들면, PAI-1 (플라스미노겐 활성인자 억제제를 나타낸다))를 코딩하는 유전자를 언급할 수 있다. 한 특정 실시양태에서, 본 발명에 따른 재조합 벡터는 IL-2를 코딩하는, 관심의 대상이 되는 유전자를 포함한다.

[0381] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 핵산 서열을 포함하는 세포에 관한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 세포는 진핵 세포 및 더욱 바람직하게, 포유동물 세포이다. 발현용 숙주로서 이용가능한 포유동물 세포는 당업계에 주지되어 있고, 다수의 무한증식 세포주, 예컨대 제한하는 것은 아니지만, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 새끼 햄스터 신장 (BHK) 세포 및 기타 다수를 포함한다. 적합한 추가의 진핵 세포로는 효모 및 다른 진균을 포함한다.

[0382] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 세포를 항체 발현을 허용하는 조건하에서 배양하는 단계, 및 세포 또는 세포 주변의 배지로부터 항체를 정제하는 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 항체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0383] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체, 핵산 서열 또는 벡터 중 어느 하나, 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 제약 조성물은 관심의 대상이 되는 화합물을 추가로 포함한다.

[0384] 제약상 허용되는 담체는 바람직하게 등장성, 저장성 또는 약한 고장성이고, 상대적으로 낮은 이온 강도를 가지는 것, 예를 들어, 수크로스 용액이다. 또한, 상기와 같은 담체는 임의의 용매 또는 수성 또는 부분적으로 수성인 액체, 예컨대 비발열성 멸균수를 함유할 수 있다. 추가로, 생체내 사용 요건을 충족시킬 수 있도록 제약 조성물의 pH는 조절되고 완충처리된다. 제약 조성물은 또한 제약상 허용되는 희석제, 아주반트 또는 부형제 뿐만 아니라, 가용화제, 안정화제, 및 방부제를 포함할 수 있다. 주사 투여를 위해서는 수용액, 비수성 용액 또는 등장액 중의 제제가 바람직하다. 이는 액체로 또는 사용시에 적절한 희석제로 재구성될 수 있는 건식 형태 (분말, 동결건조물 등)로 단일 용량 또는 다회 용량으로 제공될 수 있다.

[0385] 본 발명은 또한 (i) 본 발명에 따른 제약 조성물, 항체, 핵산 서열 또는 벡터, 및 (ii) 관심의 대상이 되는 화합물을 포함하는 부품으로 구성된 키트에 관한 것이다.

[0386] 본원에서 사용되는 바, "관심의 대상이 되는 화합물"이라는 용어는 치료학적 화합물 및 바람직하게는 암 치료제 또는 골량 감소를 치료하는 데 유용한 화합물에 관한 것이다.

[0387] 바람직한 실시양태에 따라, 암 치료제는 아브락산 (파클리탁셀 알부민-안정화된 나노입자 제제), 아드리아마이신 (독소루비신 히드로클로라이드), 아드루실 (플루오로우라실), 알다라 (이미퀴모드), 알렘투주맙, 아림타 (페메트렉스트 디소듐), 아미노레불린산, 아나스트로졸, 아트레피탄트, 아리미덱스 (아나스트로졸), 아로마신 (엑세메스탄), 아레논 (넬라라빈), 3 산화 비소, 아바스틴 (베바시주맙), 아자시티딘, 베바시주맙, 벡사로텐, 보르테조밉, 캠파스 (알렘투주맙), 캄프토자 (이리노테칸 히드로클로라이드), 카페시타빈, 카루보프라틴, 세툭시맙, 시스플라틴, 클라폔 (시클로포스파미드), 클로파라빈, 클로파렉스 (클로파라빈), 클로라르 (클로파라빈), 시클로포스파미드, 시타라빈, 시토사르-U (시타라빈), 시톡산 (시클로포스파미드), 다코젠 (데시타빈), 다사티닙, 데시타빈, 데포 Cyt (리포솜 시타라빈), 데포폼 (리포솜 시타라빈), 덱스라족산 히드로클로라이드, 도세탁셀, 독실 (독소루비신 히드로클로라이드 리포솜), 독소루비신 히드로클로라이드, 독소루비신 히드로클로라이드 리포

솜, 독스-SL (독소루비신 히드로클로라이드 리포솜), 에퓨덱스 (플루오로우라실), 엘렌세 (에피루비신 히드로클로라이드), 엘록사틴 (옥살리플라틴), 에멘드 (아트레피탄트), 에피루비신 히드로클로라이드, 어비툭스 (세툭시맙), 엘로티닙 히드로클로라이드, 에바세트 (독소루비신 히드로클로라이드 리포솜), 에비스타 (랄록시펜 히드로클로라이드), 엑세메스탄, 파스로덱스 (폴베스트란트), 페마라 (레트로졸), 플루오로플렉스 (플루오로우라실), 플루오로우라실, 풀베스트란트, 게피티닙, 겜시타빈 히드로클로라이드, 겜투주맙 오조가미신, 젬자 (겜시타빈 히드로클로라이드), 글리벡 (이마티닙 메실레이트), 허셉틴 (트라스투주맙), 하이캄틴 (토포테칸 히드로클로라이드), 이마티닙 메실레이트, 이미퀴모드, 이레사 (제피티닙), 이리노테칸 히드로클로라이드, 이자베필론, 익셈프라 (이자베필론), 케옥시펜 (랄록시펜 히드로클로라이드), 케피반스 (팔리페르민), 라파티닙 디토실레이트, 레날리도미드, 레트로졸, 레블란 (아미노레불산), 리포독스 (독소루비신 히드로클로라이드 리포솜), 리포솜 시타라빈, 메타졸라스톤 (테모졸로미드), 메토트렉세이트, 마이로사르 (아자시티딘), 마일로타그 (겜투주맙 오조가미신), 나노입자 파클리탁셀 (파클리탁셀 알부민 안정화된 나노입자 제제), 넬라라빈, 네오사르 (시클로포스파미드), 넥사바 (소라페닙 토실레이트), 닐로티닙, 놀바덱스 (타목시펜 시트레이트), 온캐스파 (페가스파르가제), 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 파클리탁셀 알부민-안정화된 나노입자 제제, 팔리페르민, 파니투무맙, 파라플랫 (카르보플라틴), 파라플라틴 (카르보플라틴), 페가스파르가제, 페메트렉스트 디소듐, 플라티놀-AQ (시스플라틴), 플라티놀 (시스플라틴), 랄록시펜 히드로클로라이드, 레브리미드 (레날리도미드), 리툭산 (리툭시맙), 리툭시맙, 스클레로졸 흉막내용 에어로졸 (탈크), 소라페닙 토실레이트, 스프라이셀 (다사티닙), 멸균 탈크 분말 (탈크), 스테리탈크 (탈크), 수니티닙 말레이트, 수텐트 (수니티닙 말레이트), 시노비르 (탈리도미드), 탈크, 타목시펜 시트레이트, 타라빈 PFS (시타라빈), 타르세바 (엘로티닙 히드로클로라이드), 타그레틴 (벡사로텐), 타시그나 (닐로티닙), 탁솔 (파클리탁셀), 택소티어 (도세탁셀), 테모다르 (테모졸로미드), 테모졸로미드, 템시로리무스, 탈로미드 (탈리도미드), 탈리도미드, 토텍 (덱스라족산 히드로클로라이드), 토포테칸 히드로클로라이드, 토리셀 (템시로리무스), 트라스투주맙, 트리세녹스 (3 산화 비소), 타이커브 (라파티닙 디토실레이트), 벡티빅스 (파니투무맙), 벨케이드 (보르테조밉), 비다자 (아자시티딘), 보리노스타트, 젤로다 (카페시타빈), 지네카드 (덱스라족산 히드로클로라이드), 졸레드론산, 졸린자 (보리노스타트) 및 조메타 (졸레드론산)를 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0388] 본 발명의 바람직한 실시양태에 따라, 골량 감소를 치료하는 데 유용한 화합물은 비포스포네이트, 선택적 에스트로겐 수용체 조절인자 (SERM), 부갑상샘 호르몬 (PTH) (예컨대 테리파라티드 (포르테오(Forteo))), 스트론튬 라넬레이트, 데노수맙 또는 칼시토닌 또는 그의 조합물이다. 더욱 바람직한 실시양태에 따라, 비포스포네이트는 알렌드로네이트(Alendronate) (포사맥스(Fosamax), 포사맥스 플러스 D(Fosamax Plus D)), 에티드로네이트(Etidronate) (디드로넬(Didronel)), 이반드로네이트(Ibandronate) (보니바(Boniva)), 파미드로네이트(Pamidronate) (아레디아(Aredia)), 리세드로네이트(Risedronate) (액토넬(Actonel), 액토넬 W/칼슘), 틸루드로네이트(Tiludronate) (스키리드(Skelid)), 및 졸레드론산 (레클라스트(Reclast), 조메타(Zometa))을 포함하는 군으로부터 선택된다. 더욱 바람직한 실시양태에 따라, SERM은 랄록시펜 (에비스타), 바제독시펜/프레마린(아프렐랄(Aprelal)) 및 타목시펜을 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0389] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은 파골세포 활성 증가와 관련된 질환을 치료하기 위한, 본 발명에 따른 항체, 핵산 서열, 벡터, 제약 조성물 또는 부품으로 이루어진 키트의 용도에 관한 것이다. 그러한 질환으로는 내분비 장애 (고코르티솔증, 생식샘기능저하증, 원발성 또는 속발성 부갑상샘항진증, 갑상샘기능항진증), 고칼슘혈증, 영양결핍 상태 (구루병/골연화증, 괴혈병, 영양실조), 만성 질환 (흡수장애 증후군, 만성 신부전증 (신장성 골이영양증), 만성 간 질환 (간 골이영양증), 약물 (글루코코르티코이드 (글루코코르티코이드-유도성 골다공증), 안드로겐 차단 요법, 아로마타제 억제제 요법, 헤파린, 알콜), 및 유전병 (불완전 골생성증, 호모시스틴뇨증), 골다공증, 골경화증, 관절염 및 류마티스 관절염과 관련된 골 염증, 치주 질환, 섬유 형성이상, 및/또는 파제트병을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0390] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은 염증 및/또는 자가면역과 관련된 질환을 치료하기 위한, 본 발명에 따른 항체, 핵산 서열, 벡터, 제약 조성물 또는 부품으로 이루어진 키트의 용도에 관한 것이다. 그러한 질환으로는 혈청검사 음성인 척추관절병증 (건선 관절염, 강직척추염, 라이터 증후군, 염증성 장 질환과 관련된 척추관절병증), 인공 관절 이완, 결합 조직 질환 (소아 류마티스 관절염, 류마티스 관절염, 전신 홍반 루푸스 (SLE) 및 루푸스 신장염, 공피증, 쇼그렌 증후군, 혼합 결합 조직병, 다발근육염, 피부근육염), 염증성 장 질환 (예컨대 크론병; 궤양성 대장염), 휘플병, 육아종 회결장염과 관련된 관절염, 염증성 피부 병즈 (자가면역 수포성 유천포창, 자가면역 심상성 천포창, 부종, 피부염), 염증성 폐 질환 (폐포염, 폐 섬유증, 사르코이드증, 천식, 기관지염, 폐쇄 세기관지염), 염증성 신장 질환 (사구체신염, 신장 동종이식 거부, 신세뇨관 염증), 죽상 동맥경화증, 전신성 혈관염 (측두 동맥염/거대 세포 동맥염, 타카야수 동맥염, 결절 다발동맥염, 가와사키병, 베게너 육아종

증, 처그-스토라우스(churg strauss) 증후군, 현미경 다발혈관염, 괴사 사구체신염, 헤노흐 쇤라인 자색반(henoch schonlein purpura), 본태성 한랭글로블린 혈관염 및 다른 소혈관 혈관염, 베체트병), 대식세포 활성화 질환 (대식세포 활성화 증후군 (MAS), 성인 발병성 스틸병, 적혈구잠식성 증후군), 류마티스성 다발성 근육통, 원발성 담즙성 경화, 경화 담관염, 자가면역 간염, 1형 당뇨병, 하시모토 갑상샘염, 그레이브스병, 다발 경화증(MS), 길랭-바레 증후군, 애디슨병, 및/또는 레이노드 현상, 굿파스처 증후군을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0391] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은 암을 치료하기 위한, 본 발명에 따른 항체, 핵산 서열, 벡터, 제약 조성물 또는 부품으로 이루어진 키트의 용도에 관한 것이다.

[0392] 본원에서 사용되는 바, "암"이라는 용어는, 제한하는 것은 아니지만, 아데노암종, 샘꽈리 세포 아데노암종, 부신 피질 암종, 폐포 세포 암종, 역형성 암종, 기저양 암종, 기저 세포 암종, 세기관지 암종, 기관지원성 암종, 신장 샘암종, 배아 암종, 자궁내막양 암종, 섬유층판 간 세포 암종, 소포 암종, 거대 세포 암종, 간세포 암종, 표피내 암종, 상피내 암종, 연수막 암종, 수질성 암종, 멜라닌 암종, 수막 암종, 중후신장 암종, 연맥 세포 암종, 편평 세포 암종, 땀샘 암종, 이행 세포 암종, 관상 세포 암종, 사기질모세포 육종, 혈관결석 육종, 포도형 육종, 자궁내막 기질 육종, 유잉 육종, 섬유속 육종, 거대 세포 육종, 과립구 육종, 면역아세포 육종, 측피질 골육종, 카포시 육종, 백혈구 육종 (백혈병), 림프계 육종 (림프 육종), 수질성 육종, 골수성 육종 (과립구 육종), 뼈육종, 골막 육종, 세망 세포 육종 (조직구 림프종), 원형 세포 육종, 방추 세포 육종, 활막 육종, 모세혈관확장성 청각원성 육종, 버킷 림프종, NPDL, NML, NH 및 미만성 림프성을 의미한다. 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명의 방법은 골로 전이되는 전이성 암 치료에 관한 것으로, 여기서 전이성 암은 유방암, 폐암, 신장암, 다발성 골수종, 갑상샘암, 전립샘암, 아데노암종, 혈액 세포 악성 종양 (백혈병 및 림프종 포함); 두부경부암; 위장관암 (식도암, 위암, 결장암, 장암, 결장직장암, 직장암, 췌장암, 간암, 담관암 또는 담낭암 포함); 여성 생식기 암 (난소암종, 자궁 자궁내막암, 질암, 및 자궁경부암 포함); 방광암; 뇌암 (신경아세포종 포함); 육종, 골육종; 및 피부암 (악성 흑색종 또는 편평 세포 암 포함)이다.

[0393] 본 발명은 암 치료제를 사용한 화학요법적 치료를 받고 있는 암 환자를 상기 개시된 방법을 함께 사용하여 공동 치료하는 단계를 포함하는, 상기 암 환자의 치료를 개선시키는 방법에 관한 것이다.

[0394] 본 발명은 추가로 세포독성 약물 또는 방사선요법을 필요로 하는 환자를 상기 개시된 방법을 함께 사용하여 공동 치료하는 단계를 포함하는, 상기 세포독성 약물 또는 방사선요법의 세포독성 효능을 개선시키는 방법에 관한 것이다.

[0395] 본 발명은 추가로 비스포스포네이트, 선택성 에스트로겐 수용체 조절인자 (SERM), 부갑상샘 호르몬 (PTH) (예로서, 테리파라티드 (포르테오)), 스트론튬 라넬레이트, 데노수맙 또는 칼시토닌 또는 그의 조합을 사용한 치료를 받고 있는, 파골세포 활성 증가와 관련된 질환 환자를 상기 개시된 방법을 함께 사용하여 공동 치료하는 단계를 포함하는, 상기와 같은 치료를 받고 있는 파골세포 활성 증가와 관련된 질환 환자의 치료를 개선시키는 방법에 관한 것이다.

[0396] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체의 용도는 전이성 암 환자에서 골로 전이되는 전이성 암을 예방 또는 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서 주시된다. 관련된 실시양태에서, 전이성 암은 유방암, 폐암, 신장암, 다발성 골수종, 갑상샘암, 전립샘암, 아데노암종, 혈액 세포 악성 종양 (백혈병 및 림프종 포함); 두부경부암; 위장관암 (식도암, 위암, 결장암, 장암, 결장직장암, 직장암, 췌장암, 간암, 담관암 또는 담낭암 포함); 여성 생식기 암 (난소암종, 자궁 자궁내막암, 질암, 및 자궁경부암 포함); 방광암; 뇌암 (신경아세포종 포함); 육종, 골육종; 및 피부암 (악성 흑색종 또는 편평 세포 암 포함)이다.

[0397] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은 의약의 제조에 있어서 본 발명에 따른 항체, 핵산 서열, 벡터, 제약 조성물 또는 부품으로 이루어진 키트의 용도에 관한 것이다.

[0398] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은 암 환자 치료용 의약의 제조에 있어서 본 발명에 따른 항체, 핵산 서열, 벡터, 제약 조성물 또는 부품으로 이루어진 키트의 용도에 관한 것이다.

[0399] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은 파골세포 활성 증가와 관련된 질환을 앓는 환자 치료용 의약의 제조에 있어서 본 발명에 따른 항체, 핵산 서열, 벡터, 제약 조성물 또는 부품으로 이루어진 키트의 용도에 관한 것이다.

[0400] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은 염증성 질환, 더욱 구체적으로는 염증성 장 질환 환자 치료용 의약의 제조에 있어서 본 발명에 따른 항체, 핵산 서열, 벡터, 제약 조성물 또는 부품으로 이루어진 키트의 용도에 관한 것

이다.

[0401] 또 다른 실시양태에 따라, 본 발명은 류마티스 관절염 환자 치료용 의약의 제조에 있어서 본 발명에 따른 항체, 핵산 서열, 벡터, 제약 조성물 또는 부품으로 이루어진 키트의 용도에 관한 것이다.

[0402] 본 발명에 따른 항체, 핵산 서열, 벡터, 제약 조성물 또는 부품으로 이루어진 키트를 투여하는 것은 당업자에게 공지되어 있는 임의의 수단에 의해 달성될 수 있다. 바람직한 투여 경로로는 진피내, 피하, 경구, 비경구, 근육내, 비내, 설하, 기관내, 흡입, 안내, 질내, 및 직장내 경로를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 바람직한 실시양태에 따라, 본 발명에 따른 항체, 핵산 서열, 벡터, 제약 조성물 또는 부품으로 이루어진 키트는 전신으로 전달된다.

[0403] 단일 용량으로 또는 일정한 시간 간격을 두고 1회 또는 수회에 걸쳐 반복되는 용량으로 투여될 수 있다. 바람직하게, 본 발명에 따른 항체, 핵산 서열, 벡터, 제약 조성물 또는 부품으로 이루어진 키트는 주 간격으로 1 내지 10회에 걸쳐 투여된다.

[0404] 일반 지침을 위해, 항체의 적합한 투여량은 약 2 mg/kg (체중) 내지 30 mg/kg (체중), 0.1 mg/kg (체중) 내지 30 mg/kg (체중) 또는 0.1 mg/kg (체중) 내지 10 mg/kg (체중)이다. 본 발명에 따른 벡터의 적합한 투여량은 MVA 벡터의 경우, 약 10^4 내지 10^{10} pfu (플라크 형성 단위), 바람직하게는, 약 10^5 내지 10^8 pfu 로 다양한 반면, 아데노바이러스 기반 벡터의 경우에는 약 10^5 내지 10^{13} iu (감염 단위), 바람직하게는, 약 10^7 내지 10^{12} iu 로 다양하다. 벡터 플라스미드 기반 조성물은 10 ㎍ 내지 20 mg, 이롭게는, 100 ㎍ 내지 2 mg의 용량으로 투여될 수 있다.

[0405] 본 발명에 따른 용도 또는 방법이 암 치료를 위한 것인 경우, 본 발명의 방법 또는 용도는 하나 이상의 통상적인 치료 요법 (예컨대 방사선, 화학요법 및/또는 수술)과 함께 수행될 수 있다. 다중 치료학적 접근법을 사용하면 좀더 광범위한 기반의 중재적 요법을 환자에게 제공할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발병의 방법은 외과적 중재 요법 이전에 또는 그 이후에 수행될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본 방법은 방사선요법 (예로서, 감마 방사선) 이전에 또는 그 이후에 수행될 수 있다. 당업자는 사용될 수 있는 적절한 방사선 요법 프로토콜 및 파라미터를 쉽게 수립할 수 있다 (예를 들어, [PEREZ. Principles and practice of radiation oncology. 2nd edition. LIPPINCOTT, 1992]).

도면의 간단한 설명

[0406] 도 1은 CSF-1R로 형질감염된 NIH/3T3 세포의 mAb CXIIG6에 의한 특이적인 염색을 도시한 것이다.

도 2는 mAb CXIIG6 존재하의 CSF-1의 세포 표면 CSF-1R에의 결합 억제를 보여주는 것이다.

도 3은 가용성 인간 CSF-1R의 mAb CXIIG6에 의한 특이적인 차단을 보여주는 것이다 ('ctrl'은 대조군을 의미하고; 'neg SN'은 음성 대조군 하이브리도마 상청액을 의미한다).

도 4는 mAb CXIIG6 존재하의 매트릭스-메탈로프로테아제-9 (MMP-9)의 인간 파골세포 분화 및 분비 억제를 보여주는 것이다 ('ctrl'은 대조군을 의미하고; 'CXIIG6 SN'은 CXIIG6 하이브리도마 상청액을 의미하고; 'neg SN'은 음성 대조군 하이브리도마 상청액을 의미한다).

도 5는 CSF-1R과 상동성인 다른 티로신 키나제 수용체와 mAb CXIIG6과의 비 -교차-반응성을 보여주는 것이다 ('SN'은 하이브리도마 상청액을 의미한다).

도 6은 CXIIG6 중쇄의 핵산 서열 (서열 번호 1) 및 추정된 아미노산 서열 (서열 번호 2)을 보여주는 것이다. 뉴클레오티드 서열에 첨가되어 있는, 클로닝을 위한 프라이머 서열 (제한 부위 포함)은 밑줄로 표시되어 있다. 제한 부위는 이탤릭체로 밑줄 표시되어 있다. V-도메인의 아미노산 서열은 굵은체로 강조 표시되어 있다.

도 7은 CXIIG6 경쇄의 핵산 서열 (서열 번호 3) 및 추정된 아미노산 서열 (서열 번호 4)을 보여주는 것이다. 뉴클레오티드 서열에 첨가되어 있는, 클로닝을 위한 프라이머 서열 (제한 부위 포함)은 밑줄로 표시되어 있다. 제한 부위는 이탤릭체로 밑줄 표시되어 있다. V-도메인의 아미노산 서열은 굵은체로 강조 표시되어 있다.

도 8은 플라스미드 구축물 pTG17753을 보여주는 것이다.

도 9는 플라스미드 구축물 pTG17727을 보여주는 것이다.

도 10은 플라스미드 구축물 pOptiVEC™를 보여주는 것이다.

도 11은 플라스미드 구축물 pTG17895를 보여주는 것이다.

도 12는 플라스미드 구축물 pTG17812를 보여주는 것이다.

도 13은 플라스미드 구축물 pTG17868을 보여주는 것이다.

도 14는 플라스미드 구축물 pTG17869를 보여주는 것이다.

도 15는 인간화된 CXIIG6 경쇄 변이체를 보여주는 것이다.

도 16은 인간화된 CXIIG6 IgG1 중쇄 변이체를 보여주는 것이다.

도 17은 재조합 뮤린 CXIIG6 및 키메라 CXIIG6 IgG1에 의한 가용성 인간 CSF-1R의 특이적인 차단을 보여주는 것이다.

도 18은 재조합 뮤린 CXIIG6 및 키메라 CXIIG6 IgG1의 존재하의 매트릭스-메탈로프로테아제-9 (MMP-9)의 인간 파골세포 분화 및 분비 억제를 보여주는 것이다.

도 19는 본 발명의 모노클로날 항체의 에피토프 대 상업적으로 이용가능한 항-CSF-1R 항체의 에피토프의 지도화에 사용된 상이한 CSF-1R 구축물을 보여주는 것이다. 인간 서열은 오픈형 막대로 표시되고, 뮤린 서열은 필드형(filled) 막대로 표시되어 있다. 그의 명칭에 X자 표시가 있는 항체는 그 항체가 구축물에 결합하지 않는다는 것을 나타내는 것이다.

도 20은 에피토프를 지도화하는 데 사용된 상이한 CSF-1R 구축물의 Ig-유사 도메인의 한계를 보여주는 것이다.

도 21은 EL4-CSF-1R 상에서의 ^{125}I-H27K15 항체와 표지되지 않은 H27K15 사이의 경쟁 곡선이다.

도 22은 EL4-CSF-1R 상에서의 ^{125}I-H27K15 항체와 각종 항체 사이의 경쟁 곡선이다.

도 23은 CSF-1/mAb의 순서로 mAb를 이후에 인큐베이션시킨 경우의 경쟁 곡선이다.

도 24는 mAb/CSF-1의 순서로 mAb를 먼저 인큐베이션시킨 경우의 경쟁 곡선이다.

도 25는 mAB + CSF-1을 함께 공동으로 인큐베이션시킨 경우의 경쟁 곡선이다.

도 26은 mAB + CSF-1R을 함께 공동으로 인큐베이션시킨 경우의 경쟁 곡선이다.

도 27은 mAB 변이체의 교차 반응성의 결여를 보여주는 것이다.

도 28은 가용성 CSF-1R의 차단을 보여주는 것이다. 3개의 hCXIIG6 변이체 및 chCXIIG6이 가용성 인간 CD115를 차단하고, M-NFS-60 세포의 CSF-1-의존성 성장을 회복시킨다. 결과는 4중 웰의 평균 ± SEM으로 표시된 것이다. ND50 값은 그래프패드 프리즘(GraphPadPrism) 5 파라미터 로지스틱 방정식을 사용하여 계산하였다.

도 29의 a/b/c/d는 AML5 세포의 CSF-1 의존성 증식 억제를 보여주는 것이다. 도 29a에서, AML5 세포를 항-인간 CD115 mAN 3291 (좌측 패널)로, 또는 chCXIIG6 (우측 패널)으로 염색하였다. 각 패널에서, 좌측 히스토그램은 동위 원소 대조군 (각각 마우스 IgG_1 및 리툭시맙)으로 염색된 AML5 세포에 상응한다. 도 29b는 AML5 세포 성장이 용량-의존성 방식으로 CSF-1에 의해 자극을 받는다는 것을 보여주는 것이다. 도 29c는, 3개의 독립 실험으로부터 얻은 결과를 제시함으로써 hCXIIG6 변이체 및 chCXIIG6이 AML5 세포의 CSF-1-의존성 증식을 억제한다는 것을 보여주는 것이다. 도 29d는 도 29c에 제시된 결과로부터의 값을 그래프패드 프리즘에 의해 계산하여 얻은 EC50 및 R 제곱값을 포함한다.

도 30의 a/b는 EL4-CSF-R 표적 세포에 대한 ADCC 활성을 보여주는 것이다. 30a에서, 혈액 기증자 #1로부터의 PBMC를 이펙터 세포로서 사용하여 E:T 비 = 25에서 EL4-CD115 표적 세포에 대한 H27K5, H27K15 및 H19K12의 세포독성 활성을 측정하였다. 30b에서, 기증자 #2로부터의 PBMC를 명시된 E:T 비에서 도 30a와 동일한 검정으로 시험하였다. 별표 (*)는 리툭시맙과 비교하였을 때, $p<0.05$인 것을 나타내고, 세타 기호 (Φ)는 chCXIIG6과 비교하였을 때, $p<0.05$인 것을 나타낸다.

도 31의 a/b는 BeWo 융모막암종 종양 모델에서의 치료 효과를 보여주는 것이다.

도 32는 서열 번호 37 내지 서열 번호 47의 서열 목록을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0407] **실시예**

[0408] **CSF-1R-형질감염된 NIH/3T3 세포의 mAb CXIIG6에 의한 특이적인 염색**

[0409] 전장의 인간 CSF-1R을 코딩하는 발현 플라스미드로 NIH/3T3 세포를 안정적으로 형질감염시킴으로써 B4-800-5 세포주를 생성하였다. B4-800-5 세포 상에서의 세포-표면 CSF-1R 발현은 이소형 대조군과 비교하여 항-인간 CSF-1R mAb 61701 (마우스 IgG_1, R&D 시스템즈(R&D Systems)) 또는 2-4A5-4 (래트 $IgG_{1,k}$, 진텍스(GeneTex))로 간접적으로 면역염색시켜 확인하였다 (도 1, 상단 및 중간 패널). 하이브리도마 CXIIG6 또는 음성 대조군 하이브리도마로부터 유래된 배양물 상청액은 B4-800-5 세포 또는 모체 NIH/3T3 세포를 면역염색시키는데 사용하였다 (도 1, 하단 패널).

[0410] 유세포 측정 분석법을 통해 하이브리도마 CXIIG6으로부터 유래된 배양물 상청액이 B4-800-5 세포를 선택적으로 염색시킨 것으로 나타났고, 이를 통해 세포-표면 CSF-1R에 대한 mAb 특이성이 입증되었다.

[0411] **CSF-1의 세포-표면 CSF-1R에의 결합에 대한 부분적 억제**

[0412] 3 x 10^5개의 THP-1 세포 (인간 CSF-1R-양성 단핵구성 백혈병 세포주)를 하이브리도마 배양물 상청액, 순수한 (naive) 또는 항-CSF-1R-면역화된 마우스로부터 유래된 혈청 (1:1,000 희석액), mAb 항-CSF-1R 2-4A5-4 (진텍스) 또는 대조군 래트 IgG_1 (10 ㎍/ml) 또는 시약 무함유 물질의 존재하에 4℃에서 30 min 동안 인큐베이션시켰다. 냉 PBS로 2회에 걸쳐 세척한 후, 세포를 30 min 동안 1 ㎍/ml 비오티닐화된 재조합 인간 CSF-1과 함께 인큐베이션시켰다. 세포를 2회에 걸쳐 세척하고, 10 ㎍ /ml 스트렙트아비딘-알렉사 플루오르 488 (인비트로겐)과 함께 4℃에서 30 min 동안 추가로 인큐베이션시켰다. PBS로 세척하고, 4% 파라포름알데히드로 고정시킨 후, 유세포 측정법에 의해 세포 염색을 분석하였다.

[0413] 대조군 샘플과 비교하여 형광 강도가 감소하였다는 것은 CSF-1의 세포 표면 CSF-1R에의 결합이 억제되었다는 것을 반영하는 것이었다. CSF-1R-면역화된 마우스로부터 유래된 혈청이, CSF-1이 THP-1 세포에 결합하는 것을 차단하였다 (도 2). 음성 대조군 하이브리도마 상청액 또는 관련없는 mAb는 어떤 효과도 보이지 않은 반면, 하이브리도마 CXIIG6으로부터 유래된 배양물 상청액은 CSF-1이 THP-1 세포에 결합하는 것을 적어도 부분적으로 억제시키는 것으로 나타났다 (도 2, 우측 하단 패널).

[0414] **mAb CXIIG6 결합 부위에 대한 1차 위치 측정**

[0415] CSF-1R 상의 mAb CXIIG6의 결합 부위를 확인하기 위해, 5개의 세포외 면역글로불린-유사 도메인 (Met 1 내지 Glu 512, R&D 시스템즈) 또는 단 3개의, CSF-1R의 세포외 영역의 N-말단 면역글로불린 -유사 도메인 (Met 1 내지 Ser 290) (2가지 모두 그의 C-말단 단부에서 인간 IgG_1의 Fc 영역에 융합되어 있다)을 포함하는 가용성 형태의 인간 CSF-1R을 사용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 인간 IgG_1의 Fc 영역에 융합된 가용성 형태의 EGFR (R&D 시스템즈)을 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0416] 니트로셀룰로스 시트로 옮기기 전에 천연 조건하에서 100 ng의 각각의 가용성 수용체를 전기영동시키고, 하이브리도마 상청액, 토끼 pAb c-fms/CSF-1R H300 (산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology)), 마우스 mAb 61701 (R&D 시스템즈) 또는 순수한 또는 CSF-1R-면역화된 마우스로부터 유래된 혈청으로 프로빙하였다.

[0417] pAb c-fms/CSF-1R H300, mAb 61701 또는 면역화된 마우스로부터 유래된 혈청으로 프로빙하였을 때, 가용성 형태의 두 CSF-1R 모두 광범위한 밴드로서 검출되었다. 순수한 마우스 혈청 또는 음성 대조군 하이브리도마 상청액을 사용한 경우에는 어떤 검출가능한 신호도 관찰되지 않았다. CXIIG6 하이브리도마 상청액은 $CSF\text{-}1R_{1\text{-}290}$:Fc 뿐만 아니라, $CSF\text{-}1R_{1\text{-}512}$:Fc를 인식하였지만, EGFR:Fc는 인식하지 못하였고, 이는 CXIIG6이 인간 CSF-1R의 3개의 N-말단 면역글로불린-유사 도메인 (잔기 1 내지 290 사이) 내에 있는 에피토프에 특이적으로 결합한다는 것을 시사한다.

[0418] **가용성 인간 CSF-1R의 mAb CXIIG6에 의한 특이적인 차단**

[0419] CSF-1-의존성 뮤린 골수성 백혈병 M-NFS-60 세포주 (#CRL-1838, ATCC)를 사용하여 CXIIG6 하이브리도마 상청액이 인간 및 뮤린 CSF-1R에 미치는 차단 활성을 평가하였다. 5 ng의 가용성 인간 CSF-1R (R&D 시스템즈로부터

입수한 CSF-1R$_{1-512}$:Fc)을 하이브리도마 상청액, mAb 61701 (R&D 시스템즈) 또는 뮤린 이소형 대조군 mAb의 일련의 희석액과 함께 백색 96 웰 마이크로플레이트 중에서 사전인큐베이션시켰다. 이어서, CSF-1의 부재하에서 밤새도록 배양시킨 10^4개 M-NFS-60 세포를 배양물 웰에 0.1 ng의 인간 CSF-1과 함께 최종 부피 100 ㎕로 첨가하였다. 배양물을 37℃에서 48 h 동안 인큐베이션시키고, 세포 증식 ELISA(로슈(Roche))를 사용하여 BrdU 혼입에 의해 증식을 정량화하였다.

[0420] 음성 대조군 IgG$_1$을 함유하거나 함유하지 않는 음성 하이브리도마 상청액의 존재하에서 나타난 바와 같이, 가용성 인간 CSF-1R은 인간 CSF-1에 의해 매개되는 M-NFS-60 세포의 증식을 완전하게 억제시켰다 (도 3; 3개 웰의 평균 ± SEM). 대조적으로, CXIIG6 하이브리도마 상청액 및 양성 대조군 mAb 61701 둘 다는 용량-의존성 방식으로 세포 증식을 회복시킬 수 있었으며, 이는 가용성 인간 CSF-1R을 중화시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

[0421] 본 검정에서, 낮은 희석 비율로 희석된 CXIIG6 하이브리도마 상청액의 존재하에서 활성을 띠는 M-NFS-60 세포 증식을 통해서는 mAb CXIIG6이 M-NFS-60 세포에 의해 발현되는 뮤린 CSF-1R을 차단할 수 없다는 것으로 나타났다. 또한, 가용성 CSF-1R의 부재하에서 수행된 뮤린 CSF-1-지원 M-NFS-60 증식 검정에서, mAb AFS98 항-마우스 CSF-1R (이바이오사이언스(eBioscience))로 처리하자 세포 성장은 농도에 의존하는 방식으로 급격히 감소하였다 (데이터는 나타내지 않음). 음성 대조군 항체 및 음성 하이브리도마 상청액과 같이 CXIIG6 하이브리도마 상청액은 세포 증식을 감소시키지 않았다. 이러한 결과는 mAb CXIIG6이 인간 CSF-1R을 특이적으로 표적화한다는 것을 입증한다.

[0422] **매트릭스-메탈로프로테아제-9 (MMP-9)의 인간 파골세포 분화 및 분비 억제**

[0423] 건강한 혈액 기증자로부터 유래된 PBMC를 용출시켜 수득한 인간 단핵구로부터 파골세포를 생성하였다. 간략하면, 단핵구를 96-웰 플레이트 중 웰 1개당 2 x 10^4개의 세포로 시딩하고, 45 min 동안 하이브리도마 배양물 상청액, mAb 항-인간 CSF-1R 61701 (R&D 시스템즈) 또는 2-4A5-4 (진텍스), mAb 항-인간 CSF-1 26730 (R&D 시스템즈), 뮤린 또는 래트 이소형 대조군 또는 하이브리도마 배양 배지 중에 희석시킨, 순수한 및 CSF-1R-면역화된 마우스로부터 유래된 혈청으로 처리하였다. 인간 CSF-1 및 RANKL (페프로테크(PeproTech), 각각 25 및 40 ng/ml)을 포함하거나 포함하지 않는 배양물 웰에 완전 a-MEM 배지를 첨가하였다. 하이브리도마 상청액, mAb 및/또는 시토카인을 포함하거나 포함하지 않는 배지를 9일 동안 매 3일마다 보충해 주었다. 9일째 조절된 배양물 상청액을 수거하고, ELISA 검정 (R&D 시스템즈)을 사용하여 전체 인간 MMP-9에 대해 검정하였다. 파골세포 형성은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)로부터 입수한 백혈구 산성 포스파타제 키트를 사용하여 타르트레이트-저항성 산성 포스파타제 (TRAP) 염색에 의해 평가하였다.

[0424] CSF-1 + RANKL은 단핵구가, 큰 다핵 TRAP-양성 세포로 정의되는 파골세포로 분화되는 것을 유도한 반면, 시토카인의 부재하에서는 어떤 TRAP-양성 파골세포도 수득되지 않았다. MMP-9 분비가 일어나지 않은 것으로 나타난 바와 같이, 0.5 ㎍/ml 항-CSF-1 mAb 26730을 첨가하자 파골세포 분화는 완전히 폐기되었다. 같은 농도의 항-CSF-1R mAb 61701 또는 2-4A5-4, 및 면역화된 마우스 혈청 (1:1,000 희석액)은 단지 부분적으로만 파골세포 형성을 억제시켰다 (도 4; 시토카인 포함 (+) 또는 시토카인 미포함 (-); 3개 웰의 평균 ± SEM; *: 2개 웰의 평균). 2개의 음성 대조군 하이브리도마 상청액 (A, B)과 비교하였을 때, 1:20 또는 1:100으로 희석된 CXIIG6 하이브리도마 배양물 상청액 처리는 MMP-9 생산 수준을 현저히 감소시켰다. 이러한 결과는 mAb CXIIG6이 세포 표면 CSF-1R의 기능을 차단함으로써 인간 단핵구로부터 파골세포로 분화되는 것을 억제시킨다는 것을 입증한다.

[0425] **CSF-1R의 CSF-1-의존성 인산화 억제**

[0426] 인간 CSF-1R을 발현하는 플라스미드로 NIH/3T3 세포를 안정적으로 형질감염시켜 수득된 B4-800-5 세포주를 사용하여 CXIIG6 하이브리도마 상청액이 CSF-1-의존성 CSF-1R 인산화에 미치는 효과를 조사하였다. 세포를 60 mm 페트리 디쉬 1개당 2 x 10^5개의 세포로 시딩하고, 48 내지 72 h 동안 배양하였다. 37℃에서 1 h 동안 혈청을 고갈시킨 후, 세포를 37℃에서 1 h 동안 CXIIG6 하이브리도마 상청액, mAb 2-4A5-4 (네오마커스(NeoMarkers)) 또는 이소형 대조군 mAb (음성 하이브리도마 상청액 중에 희석된 것)를 함유하는 배양 배지로 처리한 한 후, 37℃에서 5 min 동안 100 ng/ml hCSF-1로 자극시키거나, 자극시키지 않고 그대로 남겨 두었다. 이어서, 세포층을 용해시키고, 전체 단백질을 추출하였다. 토끼 pAb c-fms/CSF-1R H300 또는 토끼 pAb p-c-fms/CSF-1R (Tyr708)-R (산타 크루즈 바이오테크놀로지) 로, 이어서 염소 항-토끼 면역글로불린^{HRP}로 웨스턴 블롯을 프로빙하여 10 ㎍의 단백질을 분석하였다.

[0427] 708번 위치에서 인산화된 CSF-1R에 대해 특이적인 항체에 대해 관찰된 바와 같이, CSF-1의 부재하에서는 CXIIG6 하이브리도마 상청액도 mAb 2-4A5-4도 수용체 인산화를 유도하지는 못했는데, 이는 mAb CXIIG6이 단독으로는 효능적 효과를 발휘하지 못한다는 것을 나타낸다. CSF-1로 자극시킨 경우, CSF-1R은 Tyr708 상에서 인산화되었고, CSF-1R의 양은 자극을 받지 않은 세포와 비교하여 이소형 대조군-처리된 세포에서 감소하였는데, 이는 수용체 분해를 반영하는 것다 (데이터는 나타내지 않음). CXIIG6 하이브리도마 상청액 또는 mAb 2-4A5-4로 전처리하였을 때 CSF-1R 소실은 증진되지 못했다. CXIIG6 하이브리도마 상청액 또는 mAb 2-4A5-4 처리 후에 CSF-1R의 인산화가 감소하였다. 이러한 결과는 mAb CXIIG6이 CSF-1R의 CSF-1-의존성 인산화를 차단할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0428] **mAb CXIIG6의 교차-반응성**

[0429] 티로신 키나제 수용체의 III형 서브패밀리에 속하고, 그의 세포외 Ig-유사 도메인 중에서 CSF-1R과 상동성을 나타내는 일련의 정제된 가용성 수용체 상에서 mAb CXIIG6의 교차-반응성을 ELISA에 의해 시험하였다: ELISA 플레이트. 가용성 EGFR (R&D 시스템즈), 가용성 VEGFR-1, VEGFR-2, Flt-3 및 PDGFRβ (4 가지 모두 Fc 융합 단백질로서 발현된다) 뿐만 아니라, PDGFRα 및 SCFR (c-kit)도 R&D 시스템즈로부터 입수하고, ELISA 플레이트를 코딩하는데 사용하였다. 티로신 키나제 수용체의 EGFR 서브패밀리로부터의 가용성 EGFR (R&D 시스템즈)을 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0430] 코팅된 ELISA 상에서 하이브리도마 CXIIG6 (CXIIG6 SN) 또는 음성 대조군 하이브리도마 또는 항-CSF-1R 마우스 IgG_1 61701 (R&D 시스템즈)로부터의 배양물 상청액을 항체 농도 500 ng/ml로 인큐베이션시켰다. ELISA 플레이트를 세척한 후, 퍼옥시다제-접합된 염소 항-마우스 Ig (시그마)를 사용하여 결합된 항체를 나타내고, $OD_{(450-540\ nm)}$를 측정하였다. 도 5에 도시된 결과는, mAb 61701과 같이, CXIIG6은 CSF-1R에 강하게 결합한 반면, 특이적인 신호는 어떤 다른 티로신 키나제 수용체 상에서도 검출되지 않았음을 나타낸다. 이는 시험된 각종 III형 티로신 키나제 수용체 중에서 CXIIG6이 CSF-1R에 대하여 특이적이라는 것을 나타낸다.

[0431] **mAb CXIIG6을 위한 발현 벡터 구축**

[0432] DG44 포유동물 세포주에서 mAb CXIIG6을 생산하기 위한 목적으로 CXIIG6 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자를 클로닝하는 데 옵티CHO™ 항체 발현 키트 (OptiCHO™ Antibody Express Kit) (인비트로겐, 카탈로그 번호 12762-019)를 사용하였다. 옵티CHO™ 항체 발현 키트는 하기를 포함하였다: (1) CMV 프로모터 하류에 있는 관심의 대상이 되는 유전자가 클로닝될 수 있도록 하는 이시스트론성 플라스미드인 pOptiVEC™ 벡터. 관심의 대상이 되는 유전자의 전사는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)에 의해 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR) 영양요구 선별 마커로부터 분리되어 있고, 이로써 동일한 mRNA 상에 있는 관심의 대상이 되는 유전자와 선별 마커의 전사가 이루어질 수 있다; (2) CMV 프로모터 하류에 있는 관심의 대상이 되는 유전자가 클로닝될 수 있도록 하는 pcDNA™ 3.3 벡터. pcDNA™3.3 은 네오마이신 내성 유전자를 함유하고, 이로써 게네티신(Geneticin)®을 이용하여 선별될 수 있다. pOptiVEC™ 및 pcDNA™3.3 벡터는 관심의 대상이 되는 유전자의 mRNA의 3' 말단에서의 적절한 프로세싱을 지시하는 TK 폴리-A 서열을 포함한다.

[0433] 특이적인 프라이머 (하기 표 4 참조)를 합성하고, 전체 CXIIG6 중쇄 및 경쇄 유전자 (각각 서열 번호 1 및 서열 번호 3; 각각 도 6 및 도 7 참조)의 PCR 증폭 및 클로닝을 위해 상기 프라이머를 사용하였다. 진핵 세포의 효율적인 번역을 위해 역방향 프라이머로는 코작(Kozak) 공통 서열을 포함하였다 (문헌 [KOZAK M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 1987, 15(20): 8125-8148]).

표 4

프라이머	서열
OTG18929	GCCGCCACCATGTACTTGGGACTGAACTATGTATTC (서열 번호 30)
OTG18930	GGAGATCTTCATTTACCCGGAGTCCGGGA (서열 번호 31)
OTG18931	GCCGCCACCATGAGTGTGCCCACTCAGGTCCTG (서열 번호 32)
OTG18932	GCCCGGGCTAACACTCATTCCTGTTGAAGCTC (서열 번호 33)

[0434]

[0435] 플라스미드 pTG17753 (도 8)을 주형으로서 이용하고 OTG18929 및 OTG18930 를 사용함으로써 CXIIG6 중쇄를 PCR 증폭시키고, 벡터 pOptiVEC™-TOPO® (pOptiVEC™-TOPO® TA 클로닝® 키트(pOptiVEC™-TOPO® TA Cloning® Kit), 인비트로겐, 카탈로그 번호 12744-017-01) 및 pcDNA™3.3-TOPO® 벡터 (pcDNA™3.3-TOPO® TA 클로닝® 키트(pcDNA™3.3-TOPO® TA Cloning® Kit), 인비트로겐, 카탈로그 번호 K8300-01)로 클로닝하여 각각 pTG17786 및 pTG17789를 수득하였다.

[0436] 플라스미드 pTG17727 (도 9)을 주형으로서 이용하고 OTG18931 및 OTG18932 를 사용함으로써 CXIIG6 경쇄를 PCR 증폭시키고, 벡터 pOptiVEC™-TOPO® (pOptiVEC™-TOPO® TA 클로닝® 키트, 인비트로겐, 카탈로그 번호 12744-017-01) 및 pcDNA™3.3-TOPO® 벡터 (pcDNA™3.3-TOPO® TA 클로닝® 키트, 인비트로겐, 카탈로그 번호 K8300-01) 로 클로닝하여 각각 pTG17788 및 pTG17787을 수득하였다.

[0437] CMV 프로모터 및 TK 폴리A 신호를 포함한, pTG17786, pTG17787, pTG17788 및 pTG17789의 전체 발현 카세트의 뉴클레오티드 서열을 그의 이론상의 서열에 따라 서열 분석하고, 확인하였다.

[0438] **mAb CXIIG6으로부터의 키메라 항체 생성**

[0439] mAb CXIIG6의 가변 도메인을 인간 불변 영역과 조합하였다.

[0440] 키메라 경쇄 (키메라 CXIIG6 Igκ 쇄로 명명)를 생성하기 위해, CXIIG6 VK 도메인을 코딩하는 서열 (서열 번호 3으로부터의 것)을 인간 IGKC 영역을 코딩하는 서열 (진뱅크(GenBank) 수탁 번호 J00241)에 결합시켜 이론상의 서열을 디자인하였다. 이러한 XbaI NotI DNA 단편은 5' 말단에 뮤린 버전에서 사용된 것 (상기 기술된 pTG17787 및 pTG17788에서의 것)과 동일한 비번역 서열 (코작 서열 포함)을 유지하였다. CHO에서 발현할 수 있도록 키메라 CXIIG6 경쇄 서열의 코돈을 최적화시키고, 합성 올리고뉴클레오티드로부터 조립하고, XbaI NotI를 통한 pOptiVEC™ (도 10)로의 서브클로닝을 진아트 아게(GeneArt AG)에 의해 실시하였다. 수득된 키메라 CXIIG6 경쇄 (가변 및 불변 영역)의 코돈이 최적화된 핵산 서열은 서열 번호 34에 기재되어 있는 것과 같다. 수득된 플라스미드를 pTG17895 (도 11)로 명명하였다.

[0441] 키메라 중쇄 IgG1 및 IgG4 (각각 키메라 CXIIG6 IgG1 및 키메라 CXIIG6 IgG4 쇄로 명명)를 생성하기 위해, CXIIG6 VH 도메인을 코딩하는 서열 (서열 번호 1로부터의 것)을 인간 IGHG1C 영역 (진뱅크 수탁 번호 J00228) 또는 인간 IGHG4C 영역 (진뱅크 수탁 번호 K01316)을 코딩하는 서열에 결합시켜 이론상의 서열을 디자인하였다. 이러한 XbaI NotI DNA 단편은 5' 말단에 뮤린 버전에서 사용된 것 (상기 기술된 pTG17786 및 pTG17789에서의 것)과 동일한 비번역 서열 (코작 서열 포함)을 유지하였다. 이어서, CHO에서 발현할 수 있도록 키메라 CXIIG6 중쇄의 코돈을 최적화시키고, 합성하고, *XbaI NotI*를 통한 pTG17812 (도 12)로의 클로닝을 진아트 아게에 의해 실시하였다. 수득된 키메라 CXIIG6 IgG1 중쇄 (가변 및 불변 영역)의 코돈이 최적화된 핵산 서열은 서열 번호 35에 기재되어 있는 것과 같고, 수득된 플라스미드를 pTG17868 (도 13)로 명명하였다. 수득된 키메라 CXIIG6 IgG4 중쇄 (가변 및 불변 영역)의 코돈이 최적화된 핵산 서열은 서열 번호 36에 기재되어 있는 것과 같고, 수득된 플라스미드를 pTG17869 (도 14)로 명명하였다.

[0442] **mAb CXIIG6으로부터의 인간 항체 생성**

[0443] 인간화된 경쇄 변이체를 생성하기 위해, 서열 번호 9에 기재된 경쇄 가변 영역 내에서 표 2에 따른 아미노산 치환을 실시하였다.

[0444] CXIIG6 VK 도메인 (서열 번호 3으로부터의 것)에 치환을 보유하는 변형된 서열을 인간 IGKC 영역을 코딩하는 서열 (진뱅크 수탁 번호 J00241)에 결합시켜 DNA 서열을 디자인하였다. 이러한 *XbaI NotI* DNA 단편은 5' 말단에 뮤린 버전에서 사용된 것 (상기 기술된 pTG17787 및 pTG17788에서의 것)과 동일한 비번역 서열 (코작 서열 포함)을 유지하였다. 이어서, CHO에서 발현할 수 있도록 인간화된 CXIIG6 경쇄 서열의 코돈을 최적화시키고, 합성 올리고뉴클레오티드로부터 조립하고, *XbaI NotI*를 통한 pOptiVEC™ (도 10)로의 클로닝을 진아트 아게에 의해 실시하였다. 수득된 인간화된 CXIIG6 경쇄 변이체 및 플라스미드는 도 15에 열거되어 있다.

[0445] 인간화된 중쇄 변이체를 생성하기 위해, 서열 번호 6에 기재된 중쇄 가변 영역 내에서 표 1에 따른 아미노산 치환을 실시하였다.

[0446] CXIIG6 VH 도메인 (서열 번호 1로부터의 것)에 치환을 보유하는 변형된 서열을 인간 IGHG1C 영역을 코딩하는 서열 (진뱅크 수탁 번호 J00228) 에 결합시켜 DNA 서열을 디자인하였다. 상기 *XbaI ApaI* DNA 단편은 5' 말단에 뮤린 버전에서 사용된 것 (상기 기술된 pTG17786 및 pTG17789에서의 것)과 동일한 비번역 서열 (코작 서열 포함)을 유지하였다. 이어서, DNA 서열은 CHO에서 발현할 수 있도록 서열의 코돈을 최적화시키고, 합성하고, *XbaI ApaI*를 통한 pTG17812 (도 12)로의 클로닝을 진아트 아게에 의해 실시하였다. 수득된 인간화된 CXIIG6 IgG1 중쇄 변이체 및 플라스미드는 도 16에 열거되어 있다.

[0447] **재조합 뮤린 CXIIG6 및 키메라 CXIIG6 IgG1의 시험관내 억제 활성**

[0448] (상기 기술된 것과 같은) 정제된 재조합 뮤린 CXIIG6 및 그의 키메라 IgG1 변이체 (상기 기술된 것과 같은 키메라 CXIIG6 IgG1)가 가용성 인간 CSF-1R을 차단할 수 있는지 여부를 측정하기 위해, (상기 기술된 것과 같은) MNFS-60 세포 증식 및 파골세포 분화 모델에서 용량-반응 연구를 실시하였다. 로크랜드(Rockland) (로크랜드, 010-0141)로부터 입수한 정제된 폴리클로날 뮤린 IgG2a 및 출원인이 제조한 키메라 IgG1을 대조군 항체로서 함께 동시에 시험하였다. SPR 바이오센서 검정으로 항원 결합에 의해 측정되는 바와 같이, 세포를 다양한 농도 범위의 활성 항-CSF-1R 항체에 노출시킴으로써 차단 효과를 평가하였다. 동량의 전체 항체를 로딩하여 (Fc 결합에 의한 SPR 바이오센서 검정), mAb CXIIG6과 그의 각 대조군 mAb 사이를 비교하였다.

[0449] M-NFS-60 생물학적 검정: M-NFS-60 생물학적 검정에서는, 48 h 동안 50 ng/ml 인간 가용성 CSF-1R 및 1 ng/ml 인간 CSF-1의 존재하에 세포를 0.23 ng/ml 내지 0.5 ㎍/ml의 활성 mAb CXIIG6 (재조합 뮤린 CXIIG6; 키메라 CXIIG6 IgG1) 또는 상응하는 농도의 대조군 mAb로 처리하였다. 도 17에 도시된 결과는 mAb CXIIG6 둘 다 (재조합 뮤린 CXIIG6; 키메라 CXIIG6 IgG1)의 농도가 증가함에 따라 그에 대한 반응으로 M-NFS-60 세포 성장이 증가하였음을 나타내고, 이는 상기 mAb CXIIG6 둘 다가 가용성 CSF-1R의 CSF-1에의 결합을 길항시킨다는 것을 입증한다 (3개 웰의 평균 ± SEM). 세포 증식을 회복시키는 데 있어서 키메라 CXIIG6 IgG1은 재조합 뮤린 CXIIG6 만큼 효과적이었다. 대조군 뮤린 IgG2a 및 키메라 IgG1은 그의 각 농도 범위에 걸쳐서 가용성 CSF-1R에 의한 CSF-1 중화에는 어떤 효과도 나타내지 못했다. 이러한 결과는 정제된 재조합 뮤린 CXIIG6 및 키메라 CXIIG6 IgG1이 가용성 인간 CSF-1R을 억제시킨다는 것을 보여준다.

[0450] 파골세포 생물학적 검정: 파골세포 생물학적 검정에서는 8일 동안 25 ng/ml CSF-1 (이뮤노툴즈(ImmunoTools)) 및 40 ng/ml RANKL의 존재하에서, 용출된 인간 단핵구를 0.85 ng/ml 내지 0.62 ㎍/ml의 활성 mAb CXIIG6 (재조합 뮤린 CXIIG6; 키메라 CXIIG6 IgG1)과 함께 인큐베이션시켰다. 배지와 모든 첨가제를 4일째 및 6일째 보충해 주고, 6일째부터 8일째까지 조절된 배양 배지 중의 총 MMP-9 를 측정하였다. 도 18에 도시된 결과는, 대조군 항체와 비교하여, 재조합 뮤린 CXIIG6 및 그의 키메라 변이체 (키메라 CXIIG6 IgG1)가 각각 파골세포 분화와 함께 병행하여, MMP-9 생산을 유의적으로 감소시킨 것으로 나타났고, 이는 성장이 지연되어 발생하였다는 것을 나타낸다 (도 18; 3개 웰의 평균 ±SEM).

[0451] 이러한 결과는 정제된 재조합 뮤린 CXIIG6 및 키메라 CXIIG6 IgG1이 세포-표면 CSF-1R의 기능을 억제시킨다는 것을 추가로 입증한다.

[0452] 본 발명의 항체 대 시판용 항체의 에피토프 지도화

[0453] 본 실험은 본 발명의 항체의 에피토프의 위치를 측정하고, 더욱 정확하게는, 다수의 상업적으로 이용가능한 항-CSF-1R 항체와 동일한 또는 상이한 에피토프에 결합하는지 여부를 측정하기 위한 것으로 디자인하였다.

[0454] 본 발명의 키메라 CXIIG6 (chCXIIG6), mAb 3291 (뮤린 IgG1, 클론 61701, R&D 시스템즈 MAB3291) 및 mAb JF14

(뮤린 IgG1, 산타 크루즈 sc-80174)는 인간 CSF-1R에는 결합하지만, 뮤린 CSF-1R에는 결합하지 않았다. 모노클로날 항체 3291 및 JF14는 인간 CSF-1R의 N-말단 모이어티에 대해 생성된 것이기 때문에 그러한 이유에서 선택하였다. CSF-1R 상의 mAb 결합 부위를 지도화하기 위하여, 히스티딘 태그에 융합된, 인간 CSF-1R의 절단형 돌연변이체, 및 인간 및 뮤린 D1-D3 CSF-1R 사이의 키메라를 구축하였다 (상세한 설명에 대해서는 도 19 및 20 참조). CHO 세포를 사용하여 상기 구축물을 분비된 단백질로서 발현시켰다. 검출용 항-His 태그 항체를 사용하는 면역블롯 분석법에 의해 구축물의 발현을 검사하였다. 항-His 태그 항체로 코팅된 웰에서 CHO 배양물 상청액을 인큐베이션시킴으로써 모든 구축물이 ELISA 플레이트 상에 포획되었다. 비오틴-NHS (시그마 참조 번호 B3295-10MG)를 사용하여 항체를 비오티닐화시켰다. 비오티닐화된 항체를 각 웰에 첨가하고, 스트렙트아비딘-HRP을 이용하여 결합을 검출하였다. 비오티닐화된 리툭시맙 (문헌 [Du et al., 2007, J. Biol. Chem. 282 (20), 15073-15080], NCBI 수탁 번호 2OSL_H & 2OSL_L)은 (CSF-1R에 결합하지 않는) 음성 이소형 대조군으로서 사용하였다. 결과는 도 19에 요약되어 있다.

[0455] *결과.* 예상대로, 리툭시맙은 시험된 어느 구축물에도 결합하지 않았다. 키메라 CXIIG6, mAb 3291 및 mAb JF14는 인간 CSF-1R의 단리된 도메인 1 (D1)에 결합할 수 있었다 (구축물 pTG18038 참조; 도 19). 추가로, 인간 D1을 뮤린 D1로 치환하자, 3가지 mAb의 결합은 파괴되었다 (구축물 pTG18003 참조; 도 19). 인간 및 뮤린 D1 서브도메인을 조합한 구축물 pTG18015 및 pTG18000을 사용하여 얻은 결과에서는 mAb 3291 및 JF14의 결합을 위해서는 인간 CSF-1R D1 도메인의 N-말단 및 중심부 둘 다가 필요한 반면, 본 발명의 모노클로날 항체의 결합을 위해서는 오직 인간 도메인 D1의 N-말단부만이 필요한 것으로 나타났다 (구축물 pTG18016 참조; 도 19).

[0456] 상기 데이터를 통해 본 발명의 모노클로날 항체의 에피토프는 모노클로날 항체 3291 및 JF14와는 다른 에피토프 상에서 인간 CSF-1R에 결합하는 것으로 나타났다. 흥미롭게도, 인간 및 뮤린 CSF-1R의 N-말단부에서 단지 4개의 잔기만 (: I20A, V27G, K33E 및 A36E: 출발 메티오닌이 잔기 1이다)이 상이하였다.

[0457] **모노클로날 항체 H19K12, H27K5 및 H27K15**

[0458] 인간 CSF-1R에 대한 차단 활성을 가지는, 마우스 IgG_{2a}를 생산하는 하이브리도마 CXIIG6을 생성하는 것은 상기에 기술되어 있다. CXIIG6 IgG_{2a}의 중쇄 및 경쇄를 클로닝하고, 서열 분석하였다 (도 6 및 7 참조). mAb CXIIG6의 가변 도메인 VH 및 VL을 인간 IgG_1 불변 영역과 조합하여 모노클로날 항체의 키메라 버전 (chCXIIG6)을 구축하였다 (상기 참조). 인간 항체 서열과의 상동성을 증가시키고, 모노클로날 항체의 잠재적인 면역원성을 감소시키기 위해, VH 및 VL 도메인에 돌연변이를 도입함으로써 인간화된 변이체를 생성하였다 (도 15 및 16 참조).

[0459] 본 발명의 인간화된 모노클로날 항체의 262개의 버전을 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 일시적으로 발현시키고, 그의 CSF-1R 결합능에 대해 시험하였다. (i) 인간 CSF-1R에 대한 친화도, (ii) 인간 생식계열 서열과의 최고 상동성 (바람직하게, 상기 상동성은 76% 이상, 더욱 바람직하게, 85% 이상), 및 (iii) 최저 인실리코 면역원성에 기초하여 상기 1차 스크리닝 중에서 31개의 인간화된 CXIIG6 변이체 (hCXIIG6)가 선별되었다. 수정 결정 미소저울 (앗타나(Attana)) 기술을 사용하여 친화도 연구를 수행한 바, 선별된 hCXIIG6 변이체들 모두 모체 mAb chCXIIG6과 같이 10^{-9} 내지 10^{-10} M 범위로 재조합 인간 CSF-1R에 대해 유사한 친화도를 가지는 것으로 나타났다. 30개의 인간화된 변이체 중 CSF-1R에 대한 고도한 친화도, 최고도의 인간 상동성 및 최저의 인실리코 면역원성을 특징으로 하는 3개: H19K12, H27K5 및 H27K15를 추가 연구를 위해 선택하였다.

[0460] **본 발명의 모노클로날 항체 H27K15의 생화학적 특징 규명**

[0461] **A-아이오딘-^{125}를 이용한 H27K15 항체의 방사성 표지화**

[0462] *물질*

[0463] 본 발명의 모노클로날 항체 H27K15를 2.1 mg/mL 농도의 수용액 (PBS (pH 7.5))으로서 제공받았다.

[0464] 아이오딘-^{125} 방사성 핵종을 퍼킨 엘머(Perkin Elmer)로부터 10^{-5} N 수산화나트륨 중 아이오딘화나트륨으로서 (비활성: 643.8 GBq/mg - 방사성 핵종 순도: 99.95%) 구입하였다.

[0465] 클로르아민-T (N-클로로-p-톨루엔술폰아미드, PM: 227.6 $g.mol^{-1}$), 메타중아황산나트륨 (PM=190.1 $g.mol^{-1}$), 우혈청 알부민 (BSA) 및 트리클로로아세트산은 시그마로부터 구입하였다.

[0466] 포스페이트-완충처리된 염수 0.1 M (pH 7.2)는 본 발명자들의 실험실에서 제조하였다.

[0467] *방법*

[0468] 100 ㎍의 항체에 1.2 mCi의 Na ^{125}I 용액 (44.4 MBq) 및 7.6 ㎕의 새로 제조된 클로르아민-T 용액 (포스페이트 완충제 중 1 mg/mL)을 첨가하였다. 실온에서 2 min 후, 12.7 ㎕의 메타중아황산나트륨 (포스페이트 완충제 중 1 mg/mL)를 첨가하여 반응을 종결시켰다.

[0469] 사전에 용리용 완충제 (포스페이트 완충제 0.1M (pH 7.2)/0.5% BSA)로 포화된 세파덱스(Sephadex) G-25 칼럼 (PD-10, 파마시아(Pharmacia)) 상에서 겔 여과에 의해 비혼입된 아이오딘-^{125}를 제거하였다. 40개의 0.5 mL씩의 분취량으로 칼럼을 용리시켰다. 아이오딘-^{125} 방사성 핵종에 대해 보정된 자동 감마 카운터(Gamma Counter) (아이오딘-^{125} 방사성 핵종에 대해 보정된 월리스 위자드(Wallace Wizard) 2470 자동 감마 카운터)에서 각 분획에서의 방사능을 측정하고, 원하는 방사성아이오딘화된 생성물을 함유하는 분획을 풀링하였다.

[0470] 용리제로서 10% TCA를 사용하여 겔만 사이언시즈(Gelman Sciences) 프리코팅된 실리카 겔 플레이트 상에서 수행된 ITLC 분석에 의해 방사성 표지된 화합물의 방사 화학 순도를 예측하였다.

[0471] *방사성 표지된 항체의 용액의 결과 및 특징*

[0472] 정제하기 전, ITLC에 의해 측정된 방사 화학 수율은 97.8%였다.

[0473] 방사성 표지된 항체의 용액의 특징은 하기와 같이 요약되었다:

[0474]

	^{125}I- H27K15
분자량 (Da)	150 000
농도 μg/mL	58.19
nM	387.93
비활성 (mCi/mg)	10.51
아이오딘/항체 비	0.72
부피 활성	612.57
방사 화학 순도 (%)	99.84

[0475] 환원 및 비-환원 조건하에서 나트륨 도데실 술페이트폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE)에 의해 방사성 표지된 항체의 순도 및 무결성을 평가하였다. 10 내지 250 kDa의 10개의 분자량 마커로 이루어진, 폭넓은 범위의 분자량 표준 (바이오래드 라보라토리즈(Biorad Laboratories))을 사용하여 겔을 보정하였다. 쿠마시 블로로 겔을 염색하였다. 2단계에서, 겔을 건조시키고, 포스포르이미저(PhosphorImager) 445 SI (아머샴 바이오사이언시즈(Amersham Biosciences))를 사용하는 자가방사선술을 위해 스크린 상에 노출시켰다. 이미지제이(ImageJ) 소프트웨어 (몰레큘라 다이내믹스(Molecular Dynamics))를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0476] 쿠마시 블루 및 자가방사선술 후에 얻은 전기영동 프로파일은 동일하였다. 비-환원 조건하에서는 150 kDa에서 하나의 주요 밴드가 시각화되었는데, 이는 전체 IgG 분자에 상응하는 것이었다. 환원 조건하에서는 50 kDa 및 25 kDa 밴드가 검출되었는데, 이는 각각 항체의 중쇄 및 경쇄에 상응하는 것이었다. 상기 전기영동 결과를 통해 클로르아민-T 방법이 항체의 무결성에는 어떠한 영향도 미치지 않는다는 것을 확인할 수 있었다.

[0477] **B- EL4-CSF-1R 세포 상에서의 방사성 표지된 H27K15 항체의 결합 검정**

[0478] **b1 ^{125}I-H27K15의 친화성 결합 측정**

[0479] 평형 해리 상수 (KD)를 결합 친화도의 척도로서 사용하였다. 일정 개수의 세포에 방사성 표지된 항체를 농도를 증가시키면서 첨가하는 포화 검정에 의해 ^{125}I-H27K15 항체에 대한 KD를 측정하였다.

[0480] *물질*

[0481] 0.5% BSA를 함유하는 PBS 중 방사성 표지된 항체의 용액

	^{125}I-H27K15
비활성 (mCi/mg)	10.51
방사 화학 순도(radiopurity) (%)	99.84
0.5% BSA를 함유하는 PBS 중의 희석액	농도 범위: 4.5 ㎍/mL 내지 0.54 ng/mL (30 nM 내지 3.6 pM) 2배 희석되는 일련의 희석액

[0482]

[0483] 100배 몰 과량의 표지되지 않은 항체 (비-특이 결합)를 포함하는 방사성 표지된 항체의 용액: 45 ㎍/mL의 표지되지 않은 항체 및 0.45 ㎍/mL의 방사성 표지된 항체를 함유하는 용액을 제조한 후, PBS/BSA 0.5% 중에서 4배 희석되는 일련의 희석을 수행하였다.

[0484] 세포: 0.5% BSA를 함유하는 PBS 중 40 x 10^6개의 세포/mL의 EL4-CSF-1R 세포 현탁액을 제조하였다.

[0485] *방법*

[0486] 방사성 표지된 항체의 농도를 증가시켜 가면서 최종 부피 150 ㎕로 1 h 동안 얼음상에서 교반시키면서 EL4-CSF-1R 세포를 인큐베이션시켰다 (50 ㎕ PBS/BSA 0.5% 중 2x10^6개).

[0487] 과량의 표지되지 않은 항체 (100배 몰 과량)와 함께 공동으로 인큐베이션시킴으로써 비-특이 결합을 측정하였다.

[0488] 인큐베이션시킨 후, 반응 혼합물을 200 ㎕의 디부틸프탈레이트 오일 쿠션 상에 오버레이시키고, 미세분리 튜브 중에서 12,000 rpm으로 3 min 동안 원심분리하였다. 튜브를 액체 질소 중에서 냉동시키고, 아이오딘-^{125} 방사성 핵종에 대해 보정된 월리스 위자드 2470 자동 감마 카운터를 사용하여 방사능을 측정하기 위해 세포 펠릿을 함유하는 튜브의 팁을 컷 오프하였다 (효율: 63%).

[0489] 100배 몰 과량의 표지되지 않은 항체를 함유하는, 4개 지점의 농도의 방사성 표지된 항체의 결합 방사능을 측정함으로써 비-특이 결합을 측정하였다. 결합 분획 대 유리 분획을 플롯팅한 그래프를 제작하고, 선형 회귀를 사용하여 직선의 기울기를 정의하였다. 과량의 표지되지 않은 항체의 부재하에서 관찰된 결합 (총 결합)으로부터 과량의 표지되지 않은 항체의 존재하에서 관찰된 결합 (비-특이 결합)을 감산함으로써 특이 결합을 정의하였다.

[0490] *결과*

[0491] 프리즘(Prism) 소프트웨어에 의해 EL4-CSF-1R 세포에 대한 인간화된 ^{125}I-H27K15 항체의 친화도 상수 및 세포 1개당 최대 결합 부위를 측정하였다.

[0492] EL4-CSF-1R 세포에 대한 ^{125}I-H27K15 항체의 결합 특징은 하기와 같이 요약되었다:

	^{125}I-H27K15
해리 상수 (nM) (μg/mL)	 0.7161 ± 0.061 0.107 ± 0.009
$B_{최대}$ (cpm)	26422 ± 552
세포 1개당 결합 부위의 개수	3393 ± 71

[0493]

[0494] **b2 표지되지 않은 H27K15의 억제 상수 측정**

[0495] 본 연구의 목적은 면역반응성 방사성 표지된 항체의 친화성이 표지되지 않은 항체의 것과 동일한지 여부를 측정하는 것이었다. 일정한 농도의 방사성 표지된 항체와, 일련의 표지되지 않은 항체 희석액을 사용하여 방사성 표지된 치환 결합 검정을 수행하였다.

[0496] *물질*

[0497]

0.5% BSA를 함유하는 PBS 중 방사성 표지된 항체의 용액	^{125}I-H27K15
비활성 (mCi/mg)	10.51
방사 화학 순도 (%)	99.84
농도	1.5 nM

[0498] 표지되지 않은 *항체의 용액*: 450 nM (67.5 ㎍/mL)의 용액을 제조한 후, PBS/BSA 0.5% 중에서 2.5배 희석되는 일련의 희석을 수행하였다.

[0499] 농도 범위: 450 nM 내지 7.56 pM.

[0500] *세포*: 0.5% BSA를 함유하는 PBS 중 40 x 10^6개의 세포/mL의 EL4-CSF-1R 세포 현탁액을 제조하였다.

[0501] *방법*: 표지되지 않은 항체의 부재하에 (총 결합: 대조군 웰), 및 (상기 언급된 바와 같이) 농도를 달리하면서 50 ㎕의 표지되지 않은 항체의 존재하에서 1.5 nM의 50 ㎕의 방사성 표지된 항체와 함께 1 h 동안 얼음상에서 교반시키면서 세포를 인큐베이션시켰다 (50 ㎕ PBS/BSA 0.5% 중 2x10^6개).

[0502] 인큐베이션시킨 후, 반응 혼합물을 200 ㎕의 디부틸프탈레이트 오일 쿠션 상에 오버레이시키고, 미세분리 튜브 중에서 12,000 rpm으로 3 min 동안 원심분리하였다. 튜브를 액체 질소 중에서 냉동시키고, 감마 카운터를 사용하여 방사능을 측정하기 위해 세포 펠릿을 함유하는 튜브의 팁을 컷 오프하였다.

[0503] 방사성 표지된 항체의 상대 결합률(%)은 하기와 같이 계산하였다:

[0504] $$\frac{\text{대조군 웰의 방사능}}{\text{시험 웰의 방사능}} \times 100$$

[0505] (대조군 웰은 표지되지 않은 항체가 존재하지 않는 것이다).

[0506] *결과*

[0507] 결합 데이터는 도 21에 제시되어 있다.

[0508] 경쟁 곡선으로부터 얻은 IC_{50} 값을 프리즘 소프트웨어에 의해 확인하고, 첸-프루소프(Cheng-Prusoff) 방정식을 사용하여 절대 억제 상수 Ki로 전환시켰다 (문헌 [Biochem. Pharmacol., 22, 3099-3108, 1973]):

[0509] $$Ki = \frac{IC_{50}}{1 + ([L]/K_D)}$$

[0510] ([L]은 본 검정에서 사용된 방사성 표지된 항체의 농도이고,

[0511] IC_{50}은 방사성 표지된 항체를 50% 억제시키는 데 필요한 표지되지 않은 항체의 농도이다).

[0512] IC_{50} 값 및 억제 상수는 하기와 같이 요약된다:

[0513]

	H27K15
IC_{50} (nM) (㎍/mL)	 0.856 ± 0.090 0.128± 0.013
억제 상수 (nM) (㎍/mL)	 0.504 ± 0.053 0.076 ± 0.008

[0514] **b3 ^{125}I-H27K15와 각종 항체 사이의 경쟁에 관한 연구**

[0515] *물질*

[0516] *0.5% BSA를 함유하는 PBS 중 방사성 표지된 H27K15 항체의 용액*:

[0517] 상기와 같이,

[0518] 표지되지 않은 *항체의 용액*

[0519] 하기와 같이 상이한 항체가 표에 제시되어 있다:

[0520]

	H19K12	H27K5	chCXIIG6	3291	JF14	2-4A5
원액의 농도 (mg/mL)	2.4	0.3	1	8.92	2	2

[0521] 각 항체에 대해, 450 nM (67.5 ㎍/mL)의 용액을 제조한 후, PBS/BSA 0.5% 중에서 2.5배 희석되는 일련의 희석을 수행하였다.

[0522] 농도 범위: 450 nM 내지 7.56 pM.

[0523] *세포*: 0.5% BSA를 함유하는 PBS 중 40 x 10^6개의 세포/mL의 EL4-CSF-1R 세포 현탁액을 제조하였다.

[0524] *방법*:

[0525] 표지되지 않은 경쟁자의 부재하에 (총 결합: 대조군 웰), 및 (상기 언급된 바와 같이) 농도를 달리하면서 50 ㎕의 표지되지 않은 경쟁자의 존재하에서 1.5 nM의 50 ㎕의 ^{125}I-H27K15 항체와 함께 1 h 동안 얼음상에서 교반시키면서 세포를 인큐베이션시켰다 (50 ㎕ PBS/BSA 0.5% 중 2x10^6개).

[0526] 인큐베이션시킨 후, 반응 혼합물을 200 ㎕의 디부틸프탈레이트 오일 쿠션 상에 오버레이시키고, 미세분리 튜브 중에서 12,000 rpm으로 3 min 동안 원심분리하였다. 튜브를 액체 질소 중에서 냉동시키고, 감마 카운터를 사용하여 방사능을 측정하기 위해 세포 펠릿을 함유하는 튜브의 팁을 컷 오프하였다.

[0527] 방사성 표지된 항체의 상대 결합률(%)은 하기와 같이 계산하였다:

[0528] $$\frac{\text{시험웰의 방사능} \times 100}{\text{대조군웰의 방사능}}$$

[0529] (대조군 웰은 경쟁자가 존재하지 않는 것이다).

[0530] *결과*

[0531] 결합 데이터는 도 22에 제시되어 있다.

[0532] 경쟁 곡선으로부터 얻은 IC_{50} 값을 프리즘 소프트웨어에 의해 확인하고, 첸-프루소프 방정식을 사용하여 절대 억제 상수 Ki로 전환시켰다:

[0533] $$Ki = \frac{IC_{50}}{1 + ([L]/K_D)}$$

[0534] ([L]은 본 검정에서 사용된 ^{125}I-H27K15 항체의 농도이고,

[0535] IC_{50}은 ^{125}I-H27K15 항체를 50% 억제시키는 데 필요한 경쟁자의 농도이고,

[0536] K_D는 ^{125}I-H27K15 항체의 친화도 상수이다).

[0537] 각 경쟁자에 대한 IC_{50} 값 및 Ki 상수는 하기와 같이 요약된다:

	chCXIIG6	H19K12	H27K5	3291	JF14	2-4A5
IC50 (nM)	1.483 ± 0.220	1.280 ± 0.246	0.998 ± 0.173	2.176 ± 0.281	3.025 ± 0.568	비경쟁
Ki (nM)	0.874 ± 0.130	0.754 ± 0.145	0.588 ± 0.102	1.281 ± 0.165	1.781 ± 0.334	

[0538]

[0539] 본 발명의 모노클로날 항체 (H27K15, chCXIIG6, H19K12 및 H27K5)의 친화도는 매우 유사하였으며, Ki 값은 0.5 내지 0.8 nM이었다.

[0540] 시판용 모노클로날 항체 3291 및 JF14의 Ki 값은 1 nM보다 높았다. 결과적으로, 상기 항체는 CSF-1R 항원에 대하여 본 발명의 모노클로날 항체보다 더 낮은 친화도를 가졌다.

[0541] **C - 인간 CSF-1의 D1-D5 인간 CSF-1R에의 경쟁적 결합 검정**

[0542] 비오틴-NHS (시그마 참조 번호 B3295-10MG)를 사용하여 CSF-1 (1-444)을 비오티닐화시켰다. 비오티닐화된 CSF-1 (0.012 ㎍/ml로 100 ㎕/웰)을 FC-D1-D5 인간 CSF-1R (1 ㎍/mL로 100 ㎕/웰) (R&D 시스템즈 참조 번호 329-MR-100)로 코팅된 웰에 첨가하고, 스트렙트아비딘-HRP를 사용하여 결합된 분자를 검출하였다. 경쟁 실험을 위해, 모노클로날 항체의 양을 증가시켜가면서 (0.030 ㎍/ml 내지 200 ㎍/ml로 100 ㎕/웰) 비오티닐화된 CSF-1보다 먼저, 그와 함께 공동으로, 그보다 후에 인큐베이션시켰다.

[0543] 본 발명자들은 시판용 모노클로날 항체 3291 (R&D 시스템즈 참조 번호 MAB3291), 본 발명의 모노클로날 하나 H27K15, CSF-1의 수용체에의 결합에 대해 CSF-1과 경쟁하는 것으로 알려져 있는 바, 양성 대조군으로서의 모노클로날 항체 X (WO2009/026303), 및 음성 대조군으로서의 리툭시맙을 시험하였다.

[0544] 먼저 인큐베이션시키는 경우, 비오티닐화된 CSF-1을 첨가하기 1시간 전에 모노클로날 항체를 코팅된 인간 CSF-1R과 함께 인큐베이션시켰다.

[0545] 이후에 인큐베이션시키는 경우, 모노클로날 항체를 첨가하기 1시간 전에 비오티닐화된 CSF-1을 코팅된 인간 CSF-1R과 함께 인큐베이션시켰다.

[0546] 함께 공동 인큐베이션시키는 경우, 비오티닐화된 CSF-1 및 모노클로날 항체를 코팅된 인간 CSF-1R과 함께 인큐베이션시켰다.

[0547] *결과*: 앞서 3291 및 H27K15 항체는, CSF-1과 동일한 결합 부위에 결합하는 것으로 알려져 있는 양성 대조군 항체 X에 의해 인식되는 것 (즉, Ig-유사 도메인 2-3)과는 다른 한 에피토프 (즉, Ig-유사 도메인 1)를 인식하는 것으로 밝혀졌었다 (상기 참조). 여기서 본 발명자들은 양성 대조군과는 대조적으로, 3291 및 H27K15 항체 둘 다가 심지어 고용량의 항체에서도 (즉, IC_{50}의 ~100배) CSF-1 결합의 부분 경쟁자라는 것을 보여주었다. 모든 설정 환경하에서 (먼저, 그와 함께, 그보다 후에 인큐베이션시키는 경우), 및 모든 포화 용량에서, H27K15는 CSF-1R에의 CSF-1의 결합을 대략 10 내지 20% 만큼 감소시킬 수 있는 반면 (도 23, 24, 및 25 참조), 항체 3291은 실험 설정 환경에 따라 상기 결합을 대략 30 내지 40% 만큼 감소시킬 수 있었다.

[0548] 따라서, 본 발명의 모노클로날은 CSF1의 그의 수용체 CSF-1R에의 결합을 부분적으로 방해할 수 있었다.

[0549] 이는 하기 실험을 통해 확인할 수 있었다.

[0550] ELISA 마이크로플레이트를 0.1 ㎍ (즉, 1 ㎍/ml로 100 ㎕)의 인간 CSF1 1-444 (진아트-서열 번호 47 참조, 도 32)로 코팅하였다. 항체의 농도를 증가시켜가면서 상기 항체의 조재하에서 0.125 ㎍/mL의 Fc-D1-D5 인간 CSF-1R (R&D 시스템즈 참조 번호 329-MR-100) 100 ㎕를 함께 공동 인큐베이션시켰다. 항-IgG-Fc-인간-HRP (베틸 (Bethyl) A80-204P)를 사용하여 CSF1에의 결합된 Fc-D1-D5 인간 CSF-1R을 검출하였다. 검출에 사용된 항체는 인간 Fc에 결합하기 때문에, 경쟁을 위해서는 항체 H27K15 대신 뮤린 항체 CXIIG6을 사용하였다. 경쟁자 mAb X (WO2009/026303)는 인간 CSF-1과 동일한 부위에서 인간 CSF-1R에 결합하는 것으로 알려져 있는 바, 이를 양성 대조군으로서 사용하였다. (hCD115에 결합하지 않는 관련이 없는 이소형 항체인) 래트 IgG2a는 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0551] *결과*: WO2009/026303에 명시되어 있는 바와 같이, mAb X는 경쟁 항체에 대하여 예상된 바와 같이, CSF1 (1-444)의 Fc-D1-D5 인간 CSF-1R에의 결합을 완전하게 억제시켰다. 3291 및 mCXIIG6 둘 다는 심지어 고용량의 항

체 (즉, 100 ㎍/mL)에서도 CSF1에의 Fc-D1-D5 인간 CSF-1R의 결합을 단지 부분적으로만 감소시켰다. mCXIIG6 및 3291은 각각 CSF1의 Fc-hCD115에의 결합을 대략 5-10% 및 10-20% 만큼 감소시켰다 (도 26 참조). 이러한 결과는 H27K15, 또는 mAb 3291에 의한, Fc-D1-D5 인간 CSF-1R에의 CSF1 결합의 부분적인 억제를 입증하는 상기 기술된 결과와 일치하였다.

[0552] 도 26은 각종 mAb에 의한, 재조합 인간 Fc-인간 D1-D5 CD115의 인간 CSF1에의 결합의 부분적인 감소를 보여주는 것이다 (공동 인큐베이션 실험). 인간 CSF1 (0.1 ㎍/mL)을 96 웰 플레이트 상에서 코팅하고, 재조합 Fc-D1-D5 인간 CSF-1R (0.125 ㎍/mL), 및 mAb의 농도를 증가시켜가면서 상기 mAb로 이루어진 믹스 (공동 인큐베이션 실험)와 함께 1시간 45분 동안 인큐베이션시켰다. HRP에 접합된 항-인간 Fc-IgG를 사용하여 hCSF-1에 결합하는 CD115를 검출하였다.

[0553] **D- ^{125}I-H27K15와, CSF-1R 수용체의 천연 리간드로 알려져 있는 IL-34 사이의 경쟁에 관한 연구.**

[0554] *물질*

[0555] 0.5% BSA를 함유하는 PBS 중 *방사성 표지된 항체, ^{125}I-H27K15의 용액* (상기 참조).

[0556] *리간드의 용액*: 0.422 mg/mL 농도의 재조합 인간 IL-34 (26.1 kDa)를 R&D 시스템즈로부터 구입하였다. 450 nM의 용액을 제조한 후, PBS/BSA 0.5% 중에서 2.5배 희석되는 일련의 희석을 수행하였다.

[0557] 농도 범위: 450 nM 내지 7.56 pM.

[0558] *세포*: 0.5% BSA를 함유하는 PBS 중 40 x 10^6개의 세포/mL의 EL4-CSF-1R 세포 현탁액을 제조하였다.

[0559] *방법*:

[0560] 천연 리간드를 이용하여 진행되는 상기 경쟁에 관한 연구 동안 2개의 상이한 프로토콜을 수행하였다.

[0561] 제1 프로토콜에서는, 표지되지 않은 경쟁자의 부재하에 (총 결합: 대조군 웰), 및 (상기 언급된 바와 같이) 농도를 달리하면서 50 ㎕의 표지되지 않은 경쟁자의 존재하에서 1.5 nM의 50 ㎕의 ^{125}I-H27K15 항체와 함께 1 h 동안 얼음상에서 교반시키면서 세포를 함께 공동 인큐베이션시켰다 (50 ㎕ PBS/BSA 0.5% 중 2x10^6개).

[0562] 제2 프로토콜의 경우, 방사성 표지된 H27K15 항체를 첨가하기 전에, 리간드의 농도를 증가시켜가면서 상기 리간드와 함께 30 min 동안 얼음상에서 EL4-CSF-1R 세포를 인큐베이션시켰다. 이어서, 2차 인큐베이션 또한 1 h 동안 얼음상에서 교반시키면서 실시하였다.

[0563] 상기 두 실험에서, 반응 혼합물을 200 ㎕의 디부틸프탈레이트 오일 쿠션 상에 오버레이시키고, 미세분리 튜브 중에서 12,000 rpm으로 3 min 동안 원심분리하였다. 튜브를 액체 질소 중에서 냉동시키고, 감마 카운터를 사용하여 방사능을 측정하기 위해 세포 펠릿을 함유하는 튜브의 팁을 컷 오프하였다.

[0564] 방사성 표지된 항체의 상대 결합률(%)은 하기와 같이 계산하였다:

[0565] $$\frac{\text{시험 웰의 방사능} \times 100}{\text{대조군 웰의 방사능}}$$

[0566] (대조군 웰은 리간드가 존재하지 않는 것이다).

[0567] *결과*; ^{125}I-H27K15 항체 결합의 치환은 관찰되지 않았다. 결과적으로, H27K15 항체 및 IL-34 리간드는 CSF-1R 항원의 상이한 에피토프를 인식하였다.

[0568] 또한, ^{125}I-IL-34와 인간화된 H27K15 항체 사이의 경쟁 결합 연구를 수행하였는데, H27K15 항체의 농도를 증가시켰을 때, ^{125}I-IL-34 결합은 치환되지 않은 것으로 나타났으며, 여기서 이것은 본 발명의 항체가 CSF-1R 수용체에의 결합에 대하여 IL-34과 경쟁하지 않는다는 것으로 나타내는 것이다.

[0569] **hCXIIG6 변이체 H27K5, H27K15 및 H19K12 생물학적 특징 규명.**

[0570] **A. 모노클로날 항체의 발현 및 정제**

[0571] 부착성 CHO-K1 또는 CHO-DG44 세포의 일시적인 형질감염에 의해, 또는 안정한 CHO-DG44 형질감염체의 폴리클로날 풀에 의해 키메라 CXIIG6, hCXIIG6 변이체 H19K12, H27K5, H27K15 및 리툭시맙을 발현시켰다.

[0572] **B. 다른 티로신 키나제 수용체 중 CSF-1R에 대한 H27K5, H27K15 및 H19K12의 특이성**

[0573] *방법*

[0574] 마이크로타이터 플레이트 (맥시소르프(Maxisorp), 눈크(Nunc))를, R&D 시스템즈로부터 구입한, 하기의 각 가용성 수용체를 이용하여 웰당 300 ng로 코팅하였다: CSF-1R$_{20-512}$-Fc (카탈로그 번호 329-MR/CF), (EGFR)2-Fc-6xhis (카탈로그 번호 1129-ER), Flt-3-Fc-6xhis (카탈로그 번호 368-ST/CF), PDGFRβ-Fc-6xhis (카탈로그 번호 385-PR/CF), 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR)2-Fc-6xhis (카탈로그 번호 357-KD/CF), VEGFR1-Fc-6xhis (카탈로그 번호 321-FL-050), 인간 SCFR (카탈로그 번호 332-SR/CF) 및 PDGFRα ECD (카탈로그 번호 322-PR/CF). 50 ㎕의 H27K5, H27K15, H19K12 mAb 또는 리툭시맙 (PBS 중 500 ng/ml)을 웰에 첨가하고, 플레이트를 37℃에서 1 h 동안 인큐베이션시켰다. 웰이 효율적으로 코팅될 수 있도록 제어하기 위해, 항-인간 IgG (염소 항-인간 IgG, 시그마 카탈로그 번호 I3382) 또한, 수용체-인간 Fc 융합 단백질 Flt-3-Fc-, PDGFRβ-Fc, VEGFR2-Fc, VEGFR1-Fc로 코팅된 웰과 함께 인큐베이션시킨 반면, PDGFRα- 및 SCFR-코팅된 웰은 각각 항-PDGF-Rα (마우스 IgG1, R&D 시스템즈 카탈로그 번호 MAB322) 및 항-SCF-R 염소 IgG (R&D 시스템즈 카탈로그 번호 AF332)와 함께 인큐베이션시켰다. 인간 Ig 카파 경쇄 (베틸 라보라토리즈, 카탈로그 번호 A80-115P), 염소 IgG (산타 크루즈 카탈로그 번호 sc2033) 또는 마우스 Ig (시그마 카탈로그 번호 A 0412)에 대한 호스래디쉬 퍼옥시다제 (HRP)-접합된 Ab를 이용하여 항체 결합을 검출하였다. 테트라메틸벤지딘 (시그마, 카탈로그 번호 T8665) (0.05 M 아세트산나트륨, 0.05 M 시트르산, H_2O_2 1/7,000 중 0.1 mg/ml)을 이용하여 밝혀낸 후, 450 nm에서 흡광도를 측정하고, 분광광도계 (베르톨드(Berthold), 트리스타(Tristar) LB941)를 사용하여 540 nm에서의 흡광도를 감산함으로써 보정하였다.

[0575] *결과*

[0576] chCXIIG6과 같이, 인간화된 변이체 중 어느 것도 다른 수용체 ECD 중 어느 것에 대하여 면역반응성을 보이지 않았지만, 이들은 고정화된 CSF-1R ECD에 강하게 결합한 것으로 나타났다 (도 27). 이러한 결과는 인간화가 다른 티로신 키나제 수용체 중 CSF-1R에 대한 mAb H19K12, H27K5 및 H27K15의 특이성을 변경시키지는 못한다는 것을 나타낸다.

[0577] **C. hCXIIG6 변이체의 CSF-1R-차단 활성**

[0578] **C.1 M-NFS-60 세포 증식 검정으로 시험된 가용성 CSF-1R-Fc의 차단**

[0579] *방법*

[0580] M-NFS-60 세포를, CSF-1을 함유하지 않는 완전 RPMI-1640 배지로 2회에 걸쳐 세척하고, CSF-1 고갈을 위해 같은 배지 중에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 가용성 인간 CSF-1R의 중화에 대해 검정하기 위해, 5 ng의 인간 CSF-1R20-512-Fc를, 완전 RPMI-1640 배지 중 항체 (H27K5, H27K15, H19K12 mAb, chCXIIG6 또는 리툭시맙의 일련의 희석액과 함께 흰색 96-웰 마이크로플레이트 (뷰플레이트™-96(ViewPlate™-96), 팩커드(Packard)) 중에서 30 min 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, CSF-1이 고갈된 10^4개의 세포를 100 ㎕의 최종 검정 부피 중 0.1 ng의 인간 CSF-1와 함께 배양물 웰에 첨가하였다. 세포를 37℃에서 48 h 동안 인큐베이션시키고, 제조사의 프로토콜에 따라 로슈로부터 입수한 세포 증식 ELISA (카탈로그 번호 11647223001)를 이용하여 2 h 동안 5-브로모-2'-데옥시우리딘 (BrdU)을 혼입시킨 후, 증식을 정량화하였다. 분광광도계 (베르톨드, 트리스타 LB941)를 사용하여 OD를 측정하였다.

[0581] *결과*

[0582] 마우스 골수성 백혈병 세포주 M-NFS-60은 그의 성장을 위해 CSF-1에 의존하는 데, 앞서 이를 이용하여 뮤린 mAb CXIIG6의 CSF-1R-차단 활성에 대해 입증한 바 있다. 이러한 검정에서, M-NFS-60 세포를 인간 CSF-1 및 인간 가용성 동종이량체 이황화-결합된 CSF-1R20-512-Fc와 함께 배양하였다. 가용성 CSF-1R에 의한 CSF-1의 포획으로 세포 증식은 억제되었다. 인간 CSF-1R을 중화시키는 항체를 첨가하자, 가용성 CSF-1R에 의한 CSF-1의 포획은 이루어지지 못하게 방해받았고, 세포 성장은 회복되었다. 음성 대조군인 리툭시맙의 존재하에서 가용성 CSF-1R은 CSF-1에 의해 매개되는 M-NFS-60 세포의 증식이 완전하게 억제되었다 (도 28). H19K12, H27K5 및 H27K15는 chCXIIG6과 같이, 용량-의존성 방식으로 가용성 CSF-1R20-512-Fc를 중화시켰고, 세포 증식을 회복시켰다. 5 파라미터 로지스틱 방정식을 사용하여 그래프패드 프리즘 소프트웨어로 계산된 ND50 (최대 CSF-1R-차단 효과의 50%를 발휘하는 중화 용량)은 시험된 3개의 hCXIIG6 변이체에 대하여 유사하였지만 (H19K12, H27K5 및 H27K15에

대해 각각 29.8, 30.7, 및 29.1 ng/ml), 모체 mAb chCXIIG6의 값 (18.1 ng/ml)과는 유의적인 차이는 없어 보였다.

[0583] **C.2 AML5-세포 기반 검정으로 시험된 세포-표면 CSF-1R의 차단**

[0584] *방법*

[0585] *AML5 세포에 대한 면역세포화학법 및 유세포 측정법*

[0586] AML5 세포 (OCI-AML5, DSMZ 카탈로그 번호 ACC-247)를 면역세포화학법 및 유세포 측정법으로 분석하였다. 100 ㎕ PBS 중 항-인간 CSF-1R mAb 3291 (뮤린 IgG1, 클론 61701, 10 ㎍/ml) (R&D 시스템즈 카탈로그 번호 #MAB3291), 뮤린 IgG1 이소형 대조군 (R&D 시스템즈 카탈로그 번호 #MAB002, 10 ㎍/ml), chCXIIG6 (10 ㎍/ml) 또는 리툭시맙과 함께 얼음상에서 30 min 동안 5 x 10^5개의 세포를 인큐베이션시켰다. 이어서, 얼음상에서 30 내지 45 min 동안 피코에리트린-접합된 염소 항-마우스 Ig (BD 파미겐(BD Pharmingen) 카탈로그 번호 #550589) 또는 플루오레세인 이소티오시아네이트-접합된 항-인간 IgG $F(ab')_2$ (밀리포어(Millipore) 카탈로그 번호 #AQ112F)로 세포를 표지화하였다.

[0587] *CSF-1이 AML5 세포 증식에 미치는 효과*

[0588] 평편한 바닥형 (실험 1 및 2에서, TPP 카탈로그 번호 #92096) 또는 둥근 바닥형 (실험 3에서, 팔콘(Falcon) 카탈로그 번호 #3077) 96-웰 플레이트에서 AML5 세포를 2.5 x 10^4개 세포/100 ㎕/웰로 플레이팅하였다. 인간 CSF-1을 함유하는 배지를 100 ㎕씩 첨가하였다. 48 h 동안 세포를 배양하고, 제조사의 프로토콜에 따라 로슈로부터 입수한 세포 증식 ELISA (카탈로그 번호 11647223001)를 이용하여 4 h 동안 BrdU를 혼입시킨 후, 세포 증식에 대해 측정하였다. 분광광도계 (베르톨드, 트리스타 LB941)를 사용하여 OD를 측정하였다. 4중 웰로부터의 평균 OD ± sem을 계산하고, 그래프패드 프리즘을 이용하여 로그[CSF-1] (ng/ml)에 대해 플롯팅함으로써 3 파라미터 방정식을 사용하여 비선형 회귀로 피팅하였다.

[0589] *hCXIIG6 변이체가 AML5 세포 증식에 미치는 효과*

[0590] 상기 기술된 바와 같이 세포를 배양하고, 96-웰 플레이트에 플레이팅시켰다. 구배량의 chCXIIG6, H27K15, H27K5, H19K12, 또는 음성 대조군 리툭시맙을 50 ㎕ 배지 중에서 첨가하였다. 37℃에서 30 min 동안 인큐베이션시킨 후, 40 ng/ml hCSF-1을 함유하는 배지를 웰당 50 ㎕씩 첨가하였다. 각 실험은 각 mAb 농도를 2중으로 포함하는 4개의 동일한 96-웰 플레이트 상에서 수행하였다. 48 h 동안 세포를 배양하고, 상기와 같이 4 h 동안 BrdU를 혼입시킨 후, 세포 증식에 대해 측정하였다. 먼저, 그래프패드 프리즘을 이용하여 각 플레이트로부터 얻은 결과를 분석하여 5 파라미터 방정식을 사용하여 비선형 회귀로 피팅하였다. 시험된 4개의 mAb 중 3개 이상에 대하여 그래프패드 프리즘에 의해 피팅되는 결과를 제시하는 플레이트를 선별하여 평균 ± sem을 계산하였다. 따라서, 실험 1 및 2는 4개의 플레이트 중 2개로부터 얻은 결과에 기초하여 분석하고 (4중 OD 값으로부터 계산된 평균), 실험 3은 4개의 플레이트 중 3개로부터 얻은 결과에 기초하여 분석하였다 (6개의 OD 값으로부터 계산된 평균). 시험된 각 mAb에 대한 EC50 및 R 제곱은 그래프패드 프리즘에 의해 계산하였다.

[0591] *결과*

[0592] 콜로니-자극 인자-1은 인간 급성 골수성 백혈병 세포주 OCI-AML5 (AML5)의 성장을 자극시키는 것으로 보고된 바 있다 (문헌 [Drexler HG, Zaborski M, Quentmeier H., 2007. Cytokine response profile of human myeloid factor-dependent leukaemia cell lines. Leukemia 11 :701-8]). 면역세포화학법 및 유세포 측정법에 의해 AML5 세포를 분석하였다. (마우스 IgG1 이소형 대조군과의 비교로) 시판용 항-hCSF-1R 마우스 IgG1 3291에 대해, 및 (리툭시맙과의 비교로) chCXIIG6에 대해 염색은 양성을 띠었고, 이는 AML5 세포가 표면 CSF-1R을 발현하였다는 것을 나타낸다 (도 29a).

[0593] CSF-1R 차단 효과를 연구하기 위한 모델을 설정하기 위해서는 먼저 CSF-1이 용량-의존성 방식으로 이루어지는 AML5 세포 증식 증가를 유도하였다는 것을 확인할 필요가 있었다. 도 29b는 AML5가 외인성 CSF-1의 부재하에서도 성장을 할 수 있지만, 배양 배지에 성장 인자를 첨가하면, 세포 증식은 용량-의존성 방식으로 증가한다는 것을 보여주는 것이다. 그러므로, AML5 세포는 그의 성장을 위해 CSF-1에 엄격하게 의존하는 것이 아니라, CSF-1에 반응성인 것이다.

[0594] 이어서, 거의 최대 증식에 가깝게 유도하는 농도인 10 ng/ml의 CSF-1과 함께 배양된 AML5 세포에 대한 hCXIIG6 변이체, 및 chCXIIG6의 효과를 시험하였다 (도 29b). 도 29c는 3개의 독립 실험으로부터 얻은 결과를

보여준다. 인간화된 변이체 H27K5, H27K15 및 H19K12 뿐만 아니라, chCXIIG6은 용량-의존성 방식으로 이루어지는 AML5 세포 증식 감소를 유도하였다. 실험들 간의 가변성이 관찰되었는데, 이는 각 mAb에 대한 EC50의 차이, 및 특히 실험 1에서, 그래프패드 프리즘을 사용하여 계산된 상당히 낮은 R 제곱에 의해 반영되었다 (도 29d). 그러므로, hCXIIG6 변이체는 상기 검정에서 그의 EC50에 따라 신뢰성있게 등급화될 수는 없었다. 3개의 hCXIIG6 변이체 모두 AML5 세포의 CSF-1-의존성 증식을 억제함에 있어 동등한 효능을 지닌 것으로 보였다.

[0595] **C.3 CSF-1R 신호전달에 미치는 비-효능적 효과 및 CSF-1-의존성 인산화에 미치는 억제 효과**

[0596] 방법

[0597] B4-800-5는, 인간 CSF-1R을 코딩하는 발현 플라스미드인 pTG17366으로 뮤린 NIH/3T3 세포를 안정적으로 형질감염시킴으로써 수득한 재조합 세포주이다. B4-800-5 세포를 60 mm 페트리 디쉬당 2 x 10^5개의 세포로 시딩하고, 72 h 동안 배양하였다. 실험을 수행하기 전 1 h 동안 37℃에서 1% FCS를 함유하는 1 ml DMEM 배지 중에서 배양함으로써 세포에서 혈청을 고갈시켰다.

[0598] 교차 결합 부재하의 항체의 효과 또는 CSF-1R 차단을 연구하기 위해, 세포를 37℃에서 1 h 동안 mAb chCXIIG6, H19K12, H27K5, H27K15, 또는 인간 IgG1 이소형 대조군 리툭시맙을 함유하는 1 ml DMEM-1% FCS로 처리하였다. 100 ng/ml hCSF-1 (이뮤노툴즈 카탈로그 번호 11343115)을 37℃에서 5 min 동안 세포 배양물에 첨가하거나, 세포를 자극시키지 않고 그대로 남겨 두었다.

[0599] 항체 교차 결합 실험에서, 세포를 얼음상에서 1 h 동안 mAb chCXIIG6, H19K12, H27K5, H27K15, 인간 IgG1 이소형 대조군 리툭시맙, 재조합 마우스 $IgG2_a$ CXIIG6 또는 마우스 $IgG2_a$ 이소형 대조군 (R&D 시스템즈 카탈로그 번호 MAB003)을 함유하는 1 ml DMEM-1% FCS로 처리하였다. 세포를 빙냉 PBS로 세척하였다. 20 ㎍/ml 폴리클로날 염소 항-마우스 IgG (R&D 시스템즈 카탈로그 번호 AF007), 20 ㎍/ml 폴리클로날 염소 항-인간 IgG Fc^{HRP} (잭슨 카탈로그 번호 109-035-098) 또는 100 ng/ml hCSF-1을 37℃에서 10 min 동안 세포에 첨가하거나, 세포를 처리하지 않고 그대로 남겨 두었다. 배지를 제거하고, 페트리 디쉬에 추출용 완충제 (62 mM 트리스, 10% 글리세롤, 2% SDS, 100 mM DTT (pH 6.8))를 첨가하여 세포층을 용해시켰다. 세포 추출물을 웨스턴 블롯상에서 분석하고, 각각 티로신^{708}-인산화된 CSF-1R, 전체 CSF-1R 및 β-액틴 검출을 위해 하기 항체: 폴리클로날 토끼 항-포스포-$CSF\text{-}1R^{Tyr708}$ (산타 크루즈 바이오테크놀로지 카탈로그 번호 sc-33358-R), 폴리클로날 토끼 항-CSF-1R (H300, 산타 크루즈 바이오테크놀로지 카탈로그 번호 sc-13949, 희석율 1/200) 및 모노클로날 마우스 항-β-액틴 (시그마-알드리치 카탈로그 번호 A2228, 희석율 1/2,000)으로 프로빙하였다. 토끼 및 마우스 1차 항체를 각각 폴리클로날 염소 항-토끼 또는 토끼 항-마우스 Ig^{HRP} (닥코시토메이션(DakoCytomation) 카탈로그 번호 P0448, P0260)로 검출하였다.

[0600] *결과*

[0601] 본 발명자들은 hCXIIG6 변이체 H19K12, H27K5 및 H27K15가, 그리고 chCXIIG6이 티로신^{708}의 CSF-1-의존성 인산화에 미치는 효과, 및 그의 효능적 효과의 부재에 대해 조사하였다. 티로신^{708} 상에서 인산화된 CSF-1R에 대해 특이적인 항체를 통해 알 수 있는 바와 같이, 0.1, 1 또는 10 ㎍/ml로 시험되었을 때, CSF-1의 부재하에서는 어느 mAb도 수용체 인산화를 유도하지 못했다. 이는 키메라 형태든 또는 인간화된 형태든 모든 CXIIG6-mAb 유도체가 단독으로 B4-800-5 세포에 적용되었을 때에는 어떤 효능적 효과도 발휘하지 못하였다는 것을 보여주는 것이다.

[0602] CSF-1 자극시, 리툭시맙 이소형 대조군과 함께 배양된 세포 또는 항체를 함유하지 않는 세포에서 전장의 CSF-1R에 상응하는 ~150 kDa의 밴드는 인산화된 것이었고, 전체 세포 CSF-1R은 감소하였다. 항-포스포-$CSF\text{-}1R^{Tyr708}$ 항체로 보다 낮은 분자량의 다른 밴드 3개가 검출되었다. CSF-1로 자극시키기 전에, B4-800-5 세포를 chCXIIG6 또는 hCXIIG6 변이체와 함께 37℃에서 인큐베이션시켰을 때, 항-포스포-$CSF\text{-}1R^{Tyr708}$ mAb에 의해 인식되는 4개의 밴드의 강도는 리툭시맙으로 처리된 세포에서 관찰된 것에 비하여 감소되어 있었다. 150 kDa 밴드의 강도 감소는 앞서 유사한 조건하에서 하이브리도마-유래 CXIIG6을 이용하여 관찰된 것과 유사하였다. 보다 낮은 2개의 밴드의 강도는 더욱 급격하게 감소한 것으로 나타났다. chCXIIG6 및 hCXIIG6 변이체가 CSF-1R Tyr^{708} 인산화에 미치는 억제 효과는 0.1, 1 및 10 ㎍/ml에서 관찰되었다.

[0603] 치료받은 환자의 mAb에서의 hCXIIG6에 대한 체액성 반응 (인간 항-인간 항체 반응)의 잠재적인 발생을 예측하기 위해, 본 발명자들은 이어서 2차 항-IgG Ab에 의한 mAb 교차 결합이 CSF-1R 수용체 인산화에 미치는 효과를 조사하였다. 앞서 하이브리도마-유래 CXIIG6을 이용하여 관찰된 것과 같이, 마우스 CXIIG6의 교차 결합을 통해서는 항-포스포-CSF-1R^{Tyr708} 항체로 검출되는 150 kDa의 희미한 밴드만이 생성되었고, 전체 CSF-1R의 약간의 하향 조절이 검출가능하였는데, 이는 가능하게는 CSF-1R의 약한 활성화를 반영한다. 교차 결합시, hCXIIG6 변이체 및 chCXIIG6은 또한 낮은 강도의 150 kDa 밴드를 생성하였다. 100 ng/ml CSF-1로 자극을 받은 후에 관찰된 것과 비교하였을 때, 150 kDa의 인산화된 CSF-1R 밴드의 강도는 극도로 약하였다. chCXIIG6이든 또는 hCXIIG6 변이체이든, 임의의 항-CSF-1R mAb 유도체의 교차 결합 후, CSF-1에 의해 유도된 더 낮은 MW의 밴드는 항-CSF-1R^{Tyr708} 항체에 의해 검출되지 않았다.

[0604] 상기 실험을 통해, chCXIIG6과 같은 hCXIIG6 변이체 H19K12, H27K5 및 H27K15는 CSF-1R의 CSF-1-의존성 인산화를 부분적으로 억제시킬 수 있고, CSF-1R에 대해 직접적인 효능적 활성은 없는 것으로 입증되었다. 세포 표면 상에서의 mAb의 교차 결합은 단지 CSF-1R 인산화에 대하여 최소의 효과만을 발휘하였다.

[0605] **D- EL4-CSF-1R 표적 세포에의 세포독성**

[0606] *방법*

[0607] 인간 전장의 CSF-1R을 코딩하는 렌티바이러스 벡터로 뮤린 림프종-유래 T 세포주 EL4 (ATCC 카탈로그 번호 TIB-39)를 안정적으로 형질감염시킴으로써 EL4-CSF-1R 재조합 세포주를 생성하였다. mAb CXIIG6 (마우스 IgG2a) 또는 3291로 면역염색시키는 것, 및 유세포 측정 분석법 (데이터는 제시되지 않음)에 의해 표면 CSF-1R 발현을 확인하였다.

[0608] EL4-CSF-1R 세포를 DMEM 완전 배지 중에서 세척하고, 같은 배지 중에 재현탁시키고, 96-웰 플레이트에서 50 ㎕ 웰당 2 x 10^4개의 세포로 시딩하였다. 배양 배지 중에서 희석된 50 ㎕의 항체와 함께 얼음상에서 45-60 min 동안 세포를 옵소닌으로 처리하였다. 이어서, 50 ㎕의 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 다양한 이펙터-대-표적 (E:T) 비로 첨가하였다. 인간화된 CXIIG6 변이체인 chCXIIG6 및 음성 대조군 리툭시맙을 10 ng/ml, 0.3 및 10 ㎍/ml로 시험하였다. 150 ㎕의 배양 배지, 표적 세포 또는 PBMC만을 단독으로 함유하는 대조군 웰을 함께 동시에 진행시켜 (i) 배양 배지 (CM) 배경, (ii) 배양 배지 + 용해용 용액 배경, (iii) 표적 세포의 자발적 방출 (SR), (iv) 각 PBMC 농도에서의 이펙터 세포의 자발적 방출 및 (v) 용해용 용액의 존재하의 표적 세포의 최대 방출 (MR)을 측정하였다. 250 x *g*로 4 min 동안 플레이트를 원심분리하고, 37℃에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 다음날, 15 ㎕의 용해용 용액 10 X (프로메가(Promega) 카탈로그 번호 G182A)를 배양 배지 또는 표적 세포만을 단독으로 함유하는 대조군 웰에 첨가하고, 플레이트를 37℃에서 45 min 동안 추가로 인큐베이션시켰다. 제조사의 설명서에 따라 시토톡스 96® 비-방사성 세포독성 검정(CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay) (프로메가 카탈로그 번호 G1780)을 이용하여 배양물 상청액 중의 락테이트 데스히드로게나제 (LDH)를 정량화하였다. 트리스타 LB 941 판독기 및 마이크로윈(MikroWin) 2000 소프트웨어 (베르톨드 테크놀로지스(Berthold Technologies))를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 기록하였다.

[0609] 실험, 표적 SR 및 이펙터 SR 값으로부터 평균 CM 배경을 감산하였다. 표적 MR 값으로부터 평균 CM + 용해용 용액 배경을 감산하였다. 평균 CM 및 SR 대조군의 감산을 실시한 후, (chCXIIG6 또는 각 hCXIIG6 변이체와 리툭시맙과의 비교를 위해) 비-파라미터 만-휘트니(Mann-Whitney) 단측 t-검정, 또는 (각 hCXIIG6 변이체와 chCXIIG6의 비교를 위해 양측 t-검정을 이용하여 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하는 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 이용하고, OD 값을 사용하여 통계학적 분석을 수행하였다. 하기 공식을 사용하여 용해율(%)을 계산하였다:

[0610] $$\text{용해율(\%)} = \frac{\text{실험-평균표적 SR-평균이펙터 SR}}{\text{평균표적 MR-평균표적 SR}} \times 100$$

[0611] *결과*

[0612] 상이한 혈액 기증자로부터 얻은 PBMC를 사용하여 표적 EL4-CSF-1R 세포에 대한 chCXIIG6, 및 hCXIIG6 변이체 (인간 IgG_1)의 ADCC 활성을 시험하였다.

[0613] 기증자 #1로부터 얻은 이펙터 세포를 E:T 비 = 25:1로 사용하였다 (도 30a). 상기 실험에서는 mAb의 부재하에서 10% 초과의 직접적인 용해가 관찰되었는데, 이는 PBMC에 함유되어 있는 NK 세포의 활성을 반영하는 것일 수

있다. 음성 대조군 리툭시맙을 이용하였을 때 얻은 값은 같은 범위에 있었다. 유세포 측정 분석법에 의해 확인한 바, EL4-CSF-1R 세포는 리툭시맙에 결합하지 않는 것으로 나타났다 (데이터는 제시되지 않음). 항-CSF-1R mAb의 경우, 10 ng/ml mAb에서 (리툭시맙의 존재하에서 관찰되는 비특이 용해보다 큰) 비특이적인 용해가 관찰되었다. 0.3 ㎍/ml mAb에서 chCXIIG6은 20% 초과의 세포독성을 유도하였다. 3개의 hCXIIG6 변이체에 의해 용해는 크기 정도가 동일하였다. 고농도 (10 ㎍/ml)의 mAb에서 3개의 hCXIIG6 변이체 모두 35%에 가까운 세포독성을 보인 반면, chCXIIG6에 의한 용해는 20% 미만인 상태 그대로였다.

[0614] E:T 비 = 25:1, 50:1 또는 100:1로 기증자 #2로부터의 이펙터를 사용하여 또 다른 실험을 수행하였다 (도 30b). 1차 실험과는 대조적으로, 직접적인 용해는 검출되지 않았다. 시험된 모든 E:T 비에서 배경 세포독성은 리툭시맙의 경우의 10%보다 더 낮았다. 결과는 이전 실험으로부터 얻은 결과와 우수한 상관관계에 있었다: 0.3 및 10 ㎍/ml를 제외한 저농도의 mAb (10 ng/ml)에서는 비특이적인 용해가 관찰되지 않았고, chCXIIG6 및 3개의 hCXIIG6 변이체는 EL4-CSF-1R 세포의 유의적인 특이 용해를 유도하였다. 시험된 모든 E:T 비와, 상기 두 mAb 농도 모두에서 표적 세포의 용해는 또한 chCXIIG6의 경우에서도 보다 H27K5, H27K15 및 H19K12의 경우에 더 높았다 (p=0.02).

[0615] 이러한 결과를 통해 chCXIIG6 및 hCXIIG6 변이체는 표면 CSF-1R을 발현하는 표적 세포를 사멸시킬 수 있는 잠재능을 가진다는 것이 입증되었다.

[0616] **BeWo 종양 모델에서 키메라 및 인간화된 항-CSF-1R mAb의 치료 효과**

[0617] chCXIIG6 및 hCXIIG6 변이체는 인간 CSF-1R에 대해 특이적이고, 그의 뮤린 상동체를 인식하지 못하는 바, 그의 생체내 효과는 오직 인간 CSF-1R-양성 종양을 이용하여 마우스 모델에서만 조사가 가능하였다. 그러나, 인간 CSF-1의 부재하에서, 인간 CSF-1R은 불활성 상태로 유지되었고, 그의 작용 차단은 연구할 수 없었다. 또한, 치료학적 유익할 것으로 예상되는 CSF-1R-양성 숙주 세포 (종양-관련 대식세포, 파골세포)를 차단하는 것은 상기 모델 시스템에서는 실현 불가능한 것이었다. 인간 CSF-1R-양성 BeWo 종양을 사용하여 수행된 하기 실험에서는 오직 mAb가 종양 세포에 미치는 세포 독성 효과만으로 치료학적 효능을 얻을 수 있었다.

[0618] *BeWo 인간 융모막암종 세포는 표면 CSF-1R을 발현한다*

[0619] 시험관내에서 배양된 BeWo 세포를 mAb H27K15 (리드인간화된 항-CSF-1R)로 면역염색하고, 공초점 현미경으로 형광성을 분석하였다. 음성 대조군 리툭시맙과 비교하여, H27K15의 경우에 관찰된 특이적인 염색을 통해 BeWo 세포가 그의 표면상에서 인간 CSF-1R을 발현시킨다는 것이 나타났다. 배양물 상청액의 ELISA의 적정을 통해 발견된 바 (결과는 나타내지 않음), BeWo 세포는 CSF-1을 분비하지 않았다.

[0620] 면역조직화학법에 의한 분석을 위해 NMR1 누드 마우스에 피하로 이식된 BeWo 세포로부터 유래된 고형 종양을 OCT에 포함시켰다. 냉동된 조직 절편을 뮤린 버전의 CXIIG6 또는 이소형 대조군으로 염색하였다. 종양 전체에 걸쳐 강한 특이적인 염색이 관찰되었는데, 이는 생체내 BeWo 종양 세포에서의 hCSF-1R의 세포 표면 및 세포질 발현 둘 다를 반영하는 것이다.

[0621] *실험 1: BeWo 융모막암종 종양 모델에서 키메라 CXIIG6의 치료 효과*

[0622] 4 x 10^6개의 BeWo 세포를 NMR1 누드 마우스의 옆구리쪽에 피하로 이식하였다. 11마리의 마우스로 이루어진 한 군에서는 키메라 CXIIG6을 3회 주사하여 처리하고 (chCXIIG6, PBS 중 50 mg/kg, IP, 1, 3, 및 7일째 투여), 11마리의 마우스로 이루어진 또 다른 군에서는 같은 계획에 기초하여 리툭시맙 이소형 대조군으로 처리하였다. chCXIIG6으로 처리된 마우스에서 종양 성장 억제 (도 31a) 및 마우스 생존 연장 (도 31b)이 관찰되었는데, 이는 인간 CSF-1R-양성 BeWo 종양을 상기 mAb로 표적화하는 것이 치료학적으로 효과가 있음을 보여주는 것이다.

[0623] *실험 2: BeWo 융모막암종 종양 모델에서 키메라 CXIIG6 및 인간화된 H27K15의 치료 효과*

[0624] 상기 프로토콜을 반복하였는데, 단, 2가지는 변형시킨 상태로 수행하였다:

[0625] - chCXIIG6 또는 인간화된 H27K15 mAb를 시험하고 (1군당 10마리의 마우스), 이소형 대조군 리툭시맙과 비교하였고,

[0626] - mAb를 오직 1주인 것만을 대신하여 3주 동안 주당 3회에 걸쳐 주사하였다.

[0627] chCXIIG6 또는 H27K15로 장기간 처리하였을 때, 종양 성장 억제 또는 마우스 생존면에 있어서 그 결과는 제1 실험과 비교하여 개선되지 못하였다. 그러나, 두 mAb는 모두 리툭시맙 이소형 대조군에 비하여 종양 성장을 억제시켰다. H27K15의 경우, 14일째 만-휘트니 검정을 사용하였을 때, 종양 부피의 감소는 통계학상 유의적이었고,

추후 시점 (17일째 및 21일째)에서는 유의적인 값에 가깝게 나타났다. chCXIIG6의 경우, 종양 부피의 감소는 통계학상 유의적인 값에 가깝게 나타났다.

[0628] **참조 문헌**

- WO 01/30381
- WO 03/059395
- WO 2005/068503
- EP 1488792 A
- US 2005059113
- EP 901463 B
- EP 83286 A
- EP 206920 A
- US 5747323
- WO 94/28152
- WO 97/04119
- WO 94/18992
- WO 96/17070
- WO2009/026303
- SHERR. Colony-stimulating factor-1 receptor. *blood*. 1990, vol.75, no.1, p.1-12.
- HUME, et al. Regulation of CSF-1 receptor expression. *Molecular reproduction and development.* 1997, vol.46, no.1, p.46-52.
- Roussel AND SHERR, 1989, PNAS, 86, 7924-7927
- ASHMUN et al., 1989, Blood, 73, 827-837
- KLUGER, et al. Macrophage colony-stimulating factor-1 receptor expression is associated with poor outcome in breast cancer by large cohort tissue microarray analysis. *Clinical cancer research* . 2004, vol.10, no.1, p.173-7.
- SCHOLL, et al. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *Journal of the National Cancer Institute*. 1994, vol.86, no.2, p.120-6.
- CHAMBERS, et al. Overexpression of epithelial macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and CSF-1 receptor: a poor prognostic factor in

[0629]

epithelial ovarian cancer, contrasted with a protective effect of stromal CSF-1. *Clinical Cancer Research.* 1997, vol.3, no.6, p.999-1007.

- BAÏOCCHI, et al. Expression of the macrophage colony-stimulating factor and its receptor in gynecologic malignancies. *Cancer.* 1991, vol.67, no.4, p.990-6.
- KIRMA, et al. Elevated expression of the oncogene c-fms and its ligand, the macrophage colony-stimulating factor-1, in cervical cancer and the role of transforming growth factor-beta1 in inducing c-fms expression. *Cancer res..* 2007, vol.67, no.5, p.1918-26.
- HEMMERLEIN, et al. Expression of acute and late-stage inflammatory antigens, c-fms, CSF-1, and human monocytic serine esterase 1, in tumor-associated macrophages of renal cell carcinomas. *Cancer immunology, immunotherapy* . 2000, vol.49, no.9, p.485-92.
- IDE, et al. Expression of colony-stimulating factor 1 receptor during prostate development and prostate cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A..* 2002, vol.99, no.22, p.14404-9.
- RAMBALDI, et al. Expression of the macrophage colony-stimulating factor and c-fms genes in human acute myeloblastic leukemia cells. *Journal of Clinical Investigation.* 1988, vol.81, no.4, p.1030-5.
- SCHOLL, et al. Anti-colony-stimulating factor-1 antibody staining in primary breast adenocarcinomas correlates with marked inflammatory cell infiltrates and prognosis. *Journal of the National Cancer Institute.* 1994, vol.86, no.2, p.120-6.
- TANG, et al. M-CSF (monocyte colony stimulating factor) and M-CSF receptor expression by breast tumor cells: M-CSF mediated recruitment of tumor infiltrating monocytes?. *Journal of cellular biochemistry.* 1992, vol.50, no.4, p.350-6.
- SCHOLL, et al. Circulating levels of colony-stimulating factor 1 as a prognostic indicator in 82 patients with epithelial ovarian cancer. *British journal of cancer.* 1994, vol.69, no.2, p.342-6.

[0630]

- SCHOLL. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. *Breast cancer research and treatment.* 1996, vol.39, no.3, p.275-83.
- DORSCH, et al. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. *European journal of immunology.* 1993, vol.23, no.1, p.186-90.
- WANG, et al. Induction of monocyte migration by recombinant macrophage colony-stimulating factor. *Journal of immunology .* 1988, vol.141, no.2, p.575-9.
- FILDERMAN, et al. Macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) enhances invasiveness in CSF-1 receptor-positive carcinoma cell lines. *Cancer res..* 1992, vol.52, no.13, p.3661-6.
- DORSCH, et al. Macrophage colony-stimulating factor gene transfer into tumor cells induces macrophage infiltration but not tumor suppression. *European journal of immunology.* 1993, vol.23, no.1, p.186-90.
- SCHOLL. Circulating levels of the macrophage colony stimulating factor CSF-1 in primary and metastatic breast cancer patients. A pilot study. *Breast cancer research and treatment.* 1996, vol.39, no.3, p.275-83.
- BARON, et al. Modulation of MHC class II transport and lysosome distribution by macrophage-colony stimulating factor in human dendritic cells derived from monocytes. *Journal of cell science.* 2001, vol.114, no.pt5, p.999-1010.
- CECCHINI, et al. Role of CSF-1 in bone and bone marrow development. *Molecular reproduction and development.* 1997, vol.46, no.1, p.75-83.
- BRUZZANITI, et al. Molecular regulation of osteoclast activity. *Reviews in endocrine .* 2006, vol.7, no.1-2, p.123-39.
- CICEK, et al. Breast cancer bone metastasis and current small therapeutics. *Cancer metastasis reviews.* 2006, vol.25, no.4, p.635-44.

[0631]

- KITAURA, et al. The journal of clinical investigation. *M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis.* 2005, vol.115, no.12, p.3418-27.
- MARSHALL, et al. Blockade of colony stimulating factor-1 (CSF-I) leads to inhibition of DSS-induced colitis. *Inflammatory bowel diseases.* 2007, vol.13, no.2, p.219-24.
- JOSE, et al. Blockade of macrophage colony-stimulating factor reduces macrophage proliferation and accumulation in renal allograft rejection. *American journal of transplantation .* 2003, vol.3, no.3, p.294-300.
- KUTZA, et al. Macrophage colony-stimulating factor antagonists inhibit replication of HIV-1 in human macrophages. *Journal of immunology .* 2000, no.164, p.4955-4960.
- SMITH, et al. Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology.* 1981, no.147, p.195-7.
- HARLOW. Antibodies: A Laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor: Laboratory press, 1988.
- HAMMERLING, et al. Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas. New York: Elsevier, 1981. p.563-681.
- SMITH, et al. Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology.* 1981, no.147, p.195-7.
- LENNARD. Standard protocols for the construction of scFv libraries. *Methods in molecular biology .* 2002, no.178, p.59-71.
- POLJAK. Production and structure of diabodies. *Structure.* 1994, vol.2, no.12, p.1121-3.
- HUDSON, et al. High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. *Journal of immunological methods.* 1999, vol.231, no.1-2, p.177-89.
- KIPRIYANOV. Generation of bispecific and tandem diabodies. *Methods in molecular biology .* 2002, no.178, p.317-31.
- HOLLIGER, et al. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature biotechnology.* 2005, vol.23, no.9, p.1126-36.

[0632]

- HOOGENBOOM, et al. Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunology today.* 2000, vol.21, no.8, p.371-8.
- MARKS, et al. By-passing immunization: building high affinity human antibodies by chain shuffling. *Biotechnology* . 1992, vol.10, no.7, p.779-83.
- BARBAS, et al. In vitro evolution of a neutralizing human antibody to human immunodeficiency virus type 1 to enhance affinity and broaden strain cross-reactivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994, vol.91, no.9, p.3809-13.
- SCHIER. Identification of functional and structural amino-acid residues by parsimonious mutagenesis. *Gene.* 1996, vol.169, no.2, p.147-55.
- YELTON. Affinity maturation of the BR96 anti-carcinoma antibody by codon-based mutagenesis. *J. immunol..* 1995, vol.155, no.4, p.1994-2004.
- JACKSON, et al. In vitro antibody maturation. Improvement of a high affinity, neutralizing antibody against IL-1 beta. *J. immunol..* 1995, vol.154, no.7, p.3310-9.
- HAWKINS, et al. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *Journal of molecular biology.* 1992, vol.226, no.3, p.889-96.
- SMITH, et al. Identification of common molecular subsequences. *Journal of Molecular Biology.* 1981, no.147, p.195-7.
- BRENNAN, et al. Preparation of bispecific antibodies by chemical recombination of monoclonal immunoglobulin G1 fragments. *Science.* 1985, vol.229, no.4708, p.81-3.
- SHALABY, et al. Development of humanized bispecific antibodies reactive with cytotoxic lymphocytes and tumor cells overexpressing the HER2 protooncogene. *The Journal of experimental medicine.* 1992, vol.175, no.1, p.217-25.
- KOSTELNY, et al. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J. immunol..* 1992, vol.148, no.5, p.1547-33.

[0633]

- ZAPATA, et al. Engineering linear F(ab')2 fragments for efficient production in Escherichia coli and enhanced antiproliferative activity. *Protein engineering.* 1995, vol.8, no.10, p.1057-62.
- HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996.
- HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996. p.118-228.
- HERMANSON. Bioconjugate techniques. Academic press, 1996. p.229-285.
- FELGNER, et al. Cationic liposome mediated transfection. *Proceedings of the Western Pharmacology Society.* 1989, vol.32, p.115-21.
- HODGSON, et al. Virosomes: cationic liposomes enhance retroviral transduction. *Nature biotechnology.* 1996, vol.14, no.3, p.339-42.
- REMY, et al. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconjugate chemistry.* 1994, vol.5, no.6, p.647-54.
- LATHE, et al. Plasmid and bacteriophage vectors for excision of intact inserts. *Gene.* 1987, vol.57, no.2-3, p.193-201.
- LUPTON, et al. Mapping genetic elements of Epstein-Barr virus that facilitate extrachromosomal persistence of Epstein-Barr virus-derived plasmids in human cells. *Molecular and cellular biology.* 1985, vol.5, no.10, p.2533-42.
- YATES, et al. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature.* 1985, vol.313, no.6005, p.812-5.
- SUMMERS, et al. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell.* 1984, vol.36, no.4, p.1097-103.
- SUTTER, et al. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A..* 1992, vol.89, no.22, p.10847-51.
- MEYER, et al. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *The Journal of general virology.* 1991, vol.72, no.Pt5, p.1031-8.

[0634]

- SUTTER, et al. A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus. *Vaccine.* 1994, vol.12, no.11, p.1032-40.
- GRAHAM, et al. Methods in molecular biology. Edited by MURREY. The human press inc, 1991. p.109-128.
- ZAKHARCHUK, et al. Physical mapping and homology studies of egg drop syndrome (EDS-76) adenovirus DNA. *Archives of virology* . 1993, vol.128, no.1-2, p.171-6.
- SPIBEY, et al. Molecular cloning and restriction endonuclease mapping of two strains of canine adenovirus type 2. *The Journal of general virology* . 1989, vol.70, no.Pt 1, p.165-72.
- JOUVENNE, et al. Cloning, physical mapping and cross-hybridization of the canine adenovirus types 1 and 2 genomes. *Gene.* 1987, vol.60, no.1, p.21-8.
- MITTAL, et al. Development of a bovine adenovirus type 3-based expression vector. *The Journal of general virology.* 1995, vol.76, no.Pt 1 , p.93-102.
- BISCHOFF, et al. An adenovirus mutant that replicates selectively in p53-deficient human tumor cells. *Science.* 1996, vol.274, no.5286, p.373-6.
- HEISE, et al. An adenovirus E1A mutant that demonstrates potent and selective systemic anti-tumoral efficacy. *Nature Medicine.* 2000, vol.6, no.10, p.1134-9.
- FUEYO, et al. A mutant oncolytic adenovirus targeting the Rb pathway produces anti-glioma effect in vivo. *Oncogene.* 2000, vol.19, no.1, p.2-12.
- MCIVOR. Human purine nucleoside phosphorylase and adenosine deaminase: gene transfer into cultured cells and murine hematopoietic stem cells by using recombinant amphotropic retroviruses. *Molecular and cellular biology.* 1987, vol.7, no.2, p.838-46.

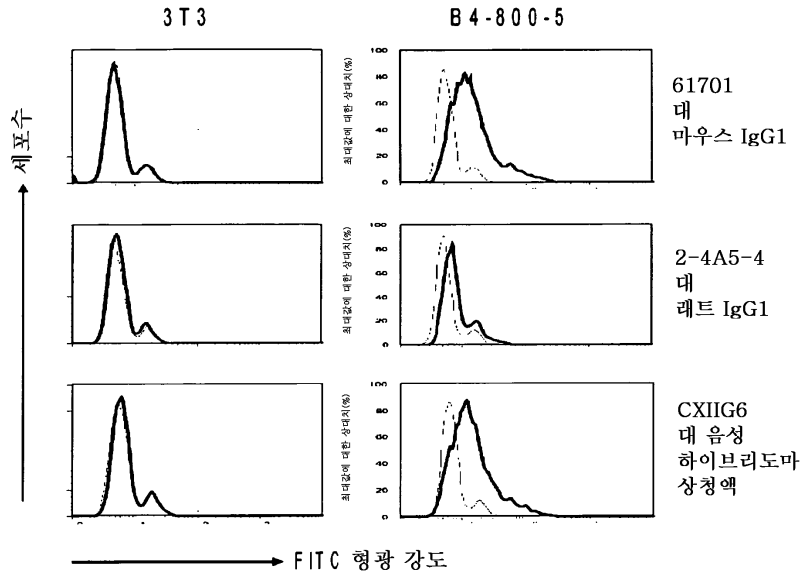
[0635]

- TABIN, et al. Adaptation of a retrovirus as a eukaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Molecular and cellular biology.* 1982, vol.2, no.4, p.426-36.
- TAKEBE, et al. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the simian virus 40 early promoter and the R-U5 segment of human T-cell leukemia virus type 1 long terminal repeat. *Molecular and cellular biology.* 1988, vol.8, no.1, p.466-72.
- CHEN, et al. Breast cancer selective gene expression and therapy mediated by recombinant adenoviruses containing the DF3/MUC1 promoter. *The Journal of clinical investigation.* 1995, vol.96, no.6, p.2775-82.
- SCHREWE, et al. Cloning of the complete gene for carcinoembryonic antigen: analysis of its promoter indicates a region conveying cell type-specific expression. *Molecular and cellular biology.* 1990, vol.10, no.6, p.2738-48.
- VILE, et al. Use of tissue-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA. *Cancer res..* 1993, vol.53, no.17, p.3860-4.
- HARRIS, et al. Gene therapy for cancer using tumor-specific prodrug activation. *Gene therapy.* 1994, vol.1, no.3, p.170-5.
- KANAI, et al. In vivo gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene. *Cancer res..* 1997, vol.57, no.3, p.461-5.
- PEREZ. Principles and practice of radiation oncology. 2nd edition. LIPPINCOTT, 1992.
- KOZAK M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 1987,15(20): 8125–8148.
- CHOTHIA and LESK. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins (1987) J Mol Biol. 1987 Aug 20;196(4):901-17.

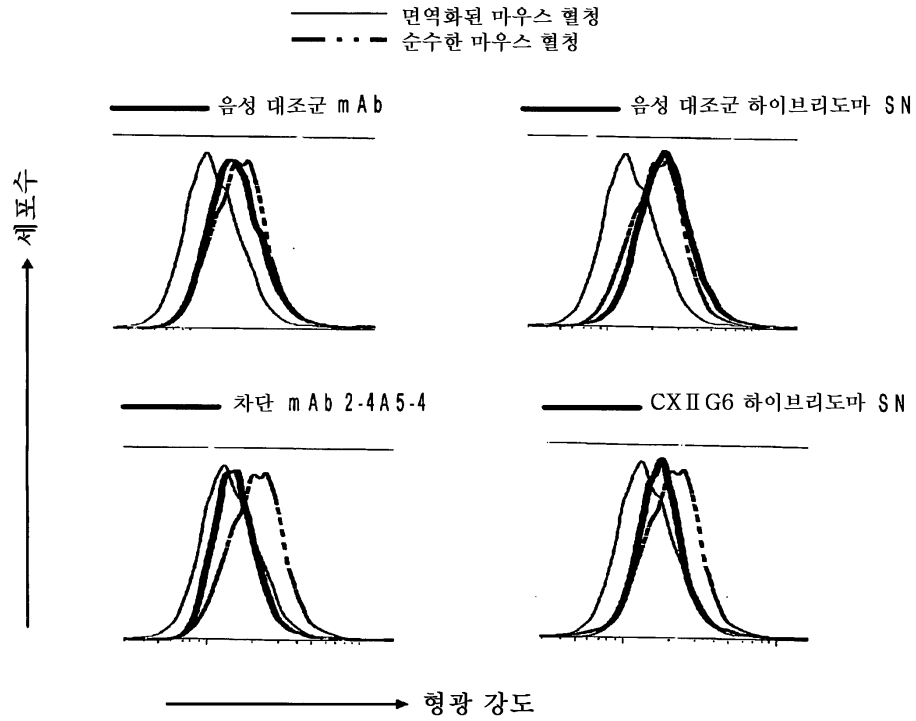
[0636]

도면

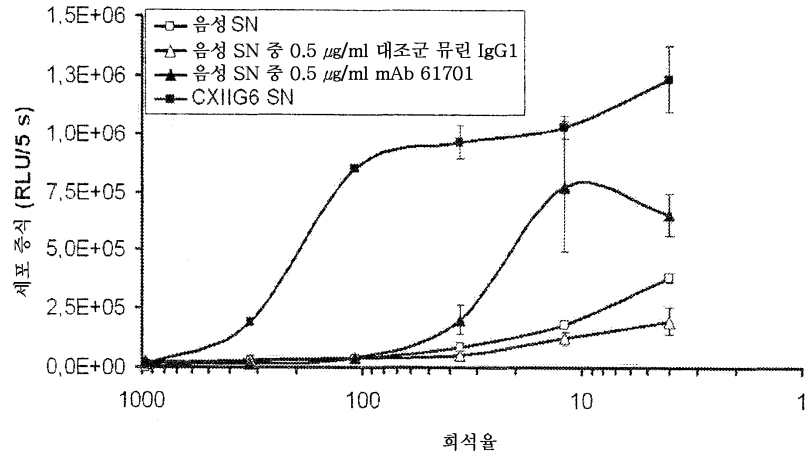
도면1



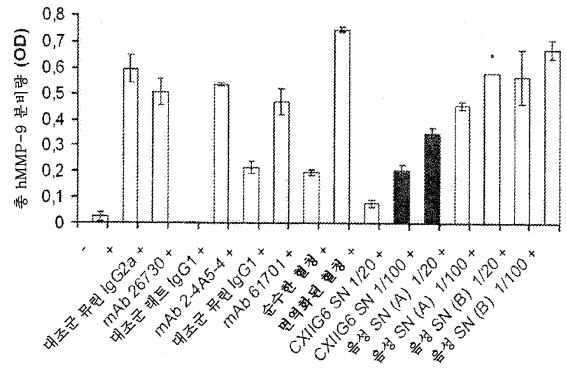
도면2


면역화된 마우스 혈청
순수한 마우스 혈청
음성 대조군 mAb
음성 대조군 하이브리도마 SN
차단 mAb 2-4A5-4
CXⅡG6 하이브리도마 SN
세포수
형광 강도

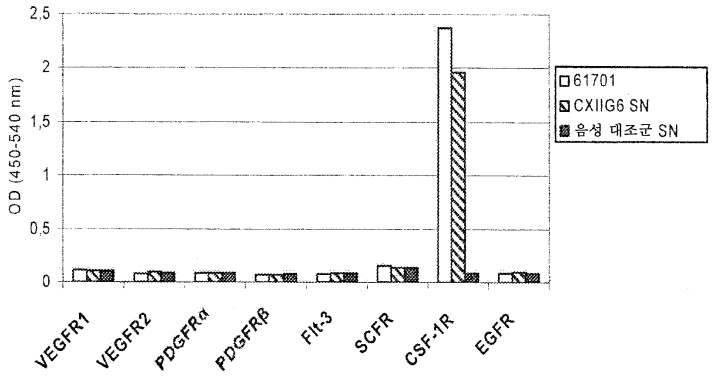
도면3


음성 SN
음성 SN 중 0.5 ㎍/ml 대조군 뮤린 IgG1
음성 SN 중 0.5 ㎍/ml mAb 61701
CXIIG6 SN
세포 증식 (RLU/5 s)
1,5E+06
1,3E+06
1,0E+06
7,5E+05
5,0E+05
2,5E+05
0,0E+00
1000
100
10
1
희석율

도면4


총 hMMP-9 분비량 (OD)
0,8
0,7
0,6
0,5
0,4
0,3
0,2
0,1
0
대조군 뮤린 IgG2a +
mAb 26730 +
대조군 래트 IgG1 +
mAb 2-4A5-4 +
대조군 뮤린 IgG1 +
mAb 61701 +
순수한 혈청 +
면역화된 혈청 +
CXIIG6 SN 1/20 +
CXIIG6 SN 1/100 +
음성 SN (A) 1/20 +
음성 SN (A) 1/100 +
음성 SN (B) 1/20 +
음성 SN (B) 1/100 +

도면5



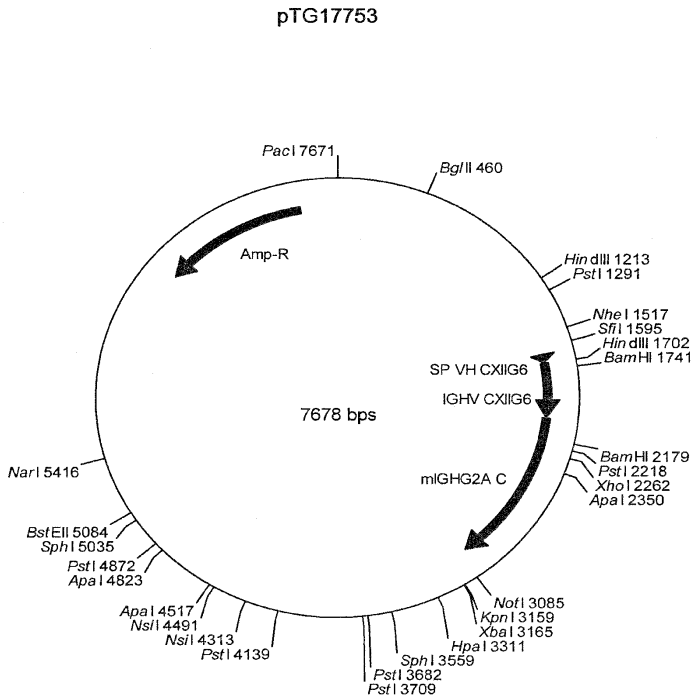
도면6

```
     SfiI
GGCCCAGCCGGCCCAGTGACAGACACAGACATAGAACATTCACGATGTACTTGGGACTGA 60
                                                M  Y  L  G  L  N
ACTATGTATTCATAGTTTTTCTCCTAAATGGTGTCCAGAGTGAAGTGAAGCTTGAGGAGT 120
  Y  V  F  I  V  F  L  L  N  G  V  Q  S  E  V  K  L  E  E  S
CTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGAGGATCCATGAAACTCTCTTGTGCTGCCTCTGGAT 180
  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  M  K  L  S  C  A  A  S  G  F
TCACTTTTAGTGACGCCTGGATGGACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGAGATGGGACTTGAGT 240
  T  F  S  D  A  W  M  D  W  V  R  Q  S  P  E  M  G  L  E  W
GGGTTGCTGAAATTAGAAGCAAAGCTAATAATCATGCAACATTCTATGCTGAGTCTGTGA 300
  V  A  E  I  R  S  K  A  N  N  N  H  A  T  F  Y  A  E  S  V  K
AAGGGAGGTTCACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTAGTGTCTACCTGCAAATGAACA 360
  G  R  F  T  I  S  R  D  D  S  K  S  S  V  Y  L  Q  M  N  S
GCTTAAGACCTGAAGACACTGGCATTTATTACTGTACCAGGGTAAAGGTAGGCTTTGACA 420
  L  R  P  E  D  T  G  I  Y  Y  C  T  R  V  K  V  G  F  D  N
ACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCT 480
  W  G  Q  G  T  T  L  T  V  S  S  A  K  T  T  A  P  S  V  Y
ATCCACTGGCCCCTGTGTGTGGAGATACAACTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCTGG 540
  P  L  A  P  V  C  G  D  T  T  G  S  S  V  T  L  G  C  L  V
TCAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGTG 600
  K  G  Y  F  P  E  P  V  T  L  T  W  N  S  G  S  L  S  S  G
GTGTGCACACCTTCCCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTGA 660
  V  H  T  F  P  A  V  L  Q  S  D  L  Y  T  L  S  S  S  V  T
       XhoI
CTGTAACCTCGAGCACCTGGCCCAGCCAGTCCATCACCTGCAATGTGGCCCACCCGGCAA 720
  V  T  S  S  T  W  P  S  Q  S  I  T  C  N  V  A  H  P  A  S
GCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCCTC 780
  S  T  K  V  D  K  K  I  E  P  R  G  P  T  I  K  P  C  P  P
CATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAA 840
  C  K  C  P  A  P  N  L  L  G  G  P  S  V  F  I  F  P  P  K
AGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATG 900
  I  K  D  V  L  M  I  S  L  S  P  I  V  T  C  V  V  V  D  V
TGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACA 960
  S  E  D  D  P  D  V  Q  I  S  W  F  V  N  N  V  E  V  H  T
CAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCC 1020
  A  Q  T  Q  T  H  R  E  D  Y  N  S  T  L  R  V  V  S  A  L
TCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACA 1080
  P  I  Q  H  Q  D  W  M  S  G  K  E  F  K  C  K  V  N  N  K
AAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGAACCATCTCAAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTC 1140
  D  L  P  A  P  I  E  R  T  I  S  K  P  K  G  S  V  R  A  P
CACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGA 1200
  Q  V  Y  V  L  P  P  P  E  E  E  M  T  K  K  Q  V  T  L  T
CCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGA 1260
  C  M  V  T  D  F  M  P  E  D  I  Y  V  E  W  T  N  N  G  K
AAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCA 1320
  T  E  L  N  Y  K  N  T  E  P  V  L  D  S  D  G  S  Y  F  M
TGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTT 1380
  Y  S  K  L  R  V  E  K  K  N  W  V  E  R  N  S  Y  S  C  S
CAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGG 1440
  V  V  H  E  G  L  H  N  H  H  T  T  K  S  F  S  R  T  P  G
                                                    NotI
GTAAATGAGCTCAGCACCCACAAAACTCTCAGGTCCAAAGAGACACCCACGCGGCCGC 1498
  K  *
```

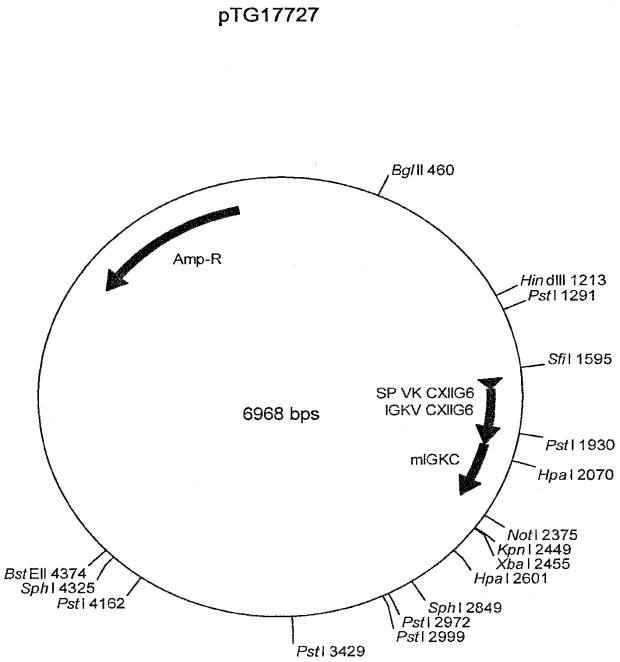
도면7

```
    SfiI
GGCCCAGCCGGCCGGAGTCAGCCTCACACTGATCACACACAGACATGAGTGTGCCCACTC 60
                                            M  S  V  P  T  Q

AGGTCCTGGGGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGATGCCAGATGTGACATCCAGATGACTC 120
 V  L  G  L  L  L  L  W  L  T  D  A  R  C  D  I  Q  M  T  Q

AGTCTCCAGCCTCCCTATCTGTATCTGTGGGAGAAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAA 180
 S  P  A  S  L  S  V  S  V  G  E  T  V  T  I  T  C  R  A  S

GTGAGAATATTTACAGTAATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGC 240
 E  N  I  Y  S  N  L  A  W  Y  Q  Q  K  Q  G  K  S  P  Q  L

TCCTGGTCCATGCTGCAACAAACTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTG 300
 L  V  H  A  A  T  N  L  A  D  G  V  P  S  R  F  S  G  S  G

GATCAGGCACACAGTATTCCCTCAAGATCAACAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGGGAGTT 360
 S  G  T  Q  Y  S  L  K  I  N  S  L  Q  S  E  D  F  G  S  Y

ATTACTGTCAACATTTTTGGGGTACTCCTCGGACGTTCGGTGGAGGCACCAAGTTGGAAA 420
 Y  C  Q  H  F  W  G  T  P  R  T  F  G  G  G  T  K  L  E  I

TCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAA 480
 K  R  A  D  A  A  P  T  V  S  I  F  P  P  S  S  E  Q  L  T

CATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATG 540
 S  G  G  A  S  V  V  C  F  L  N  N  F  Y  P  K  D  I  N  V

TCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCTGAACAGTTGGACTGATC 600
 K  W  K  I  D  G  S  E  R  Q  N  G  V  L  N  S  W  T  D  Q

AGGACAGCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCTCACGTTGACCAAGGACGAGT 660
 D  S  K  D  S  T  Y  S  M  S  S  T  L  T  L  T  K  D  E  Y

ATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTG 720
 E  R  H  N  S  Y  T  C  E  A  T  H  K  T  S  T  S  P  I  V

TCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTTAGAGACAAAGGTCCTGAGACGCCACCACCAGCT 788
 K  S  F  N  R  N  E  C  *

  NotI
GCGGCCGC 788
```

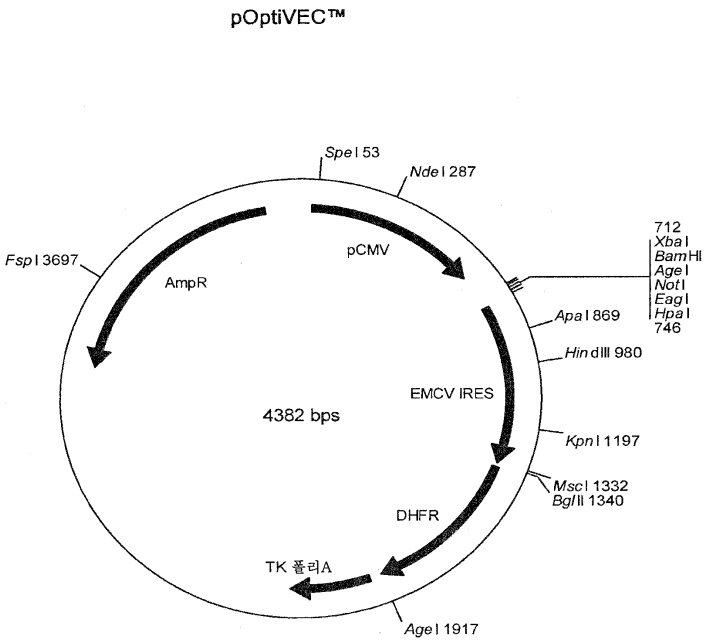
도면8



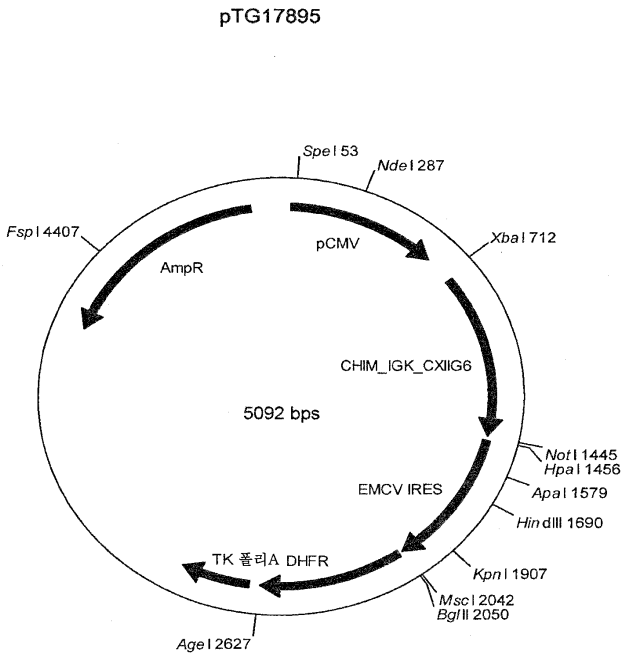
도면9


pTG17727
BglII 460
Amp-R
HindIII 1213
PstI 1291
SfiI 1595
SP VK CXIIG6
IGKV CXIIG6
6968 bps
mIGKC
PstI 1930
HpaI 2070
NotI 2375
KpnI 2449
XbaI 2455
HpaI 2601
BstEII 4374
SphI 4325
PstI 4162
SphI 2849
PstI 2972
PstI 2999
PstI 3429

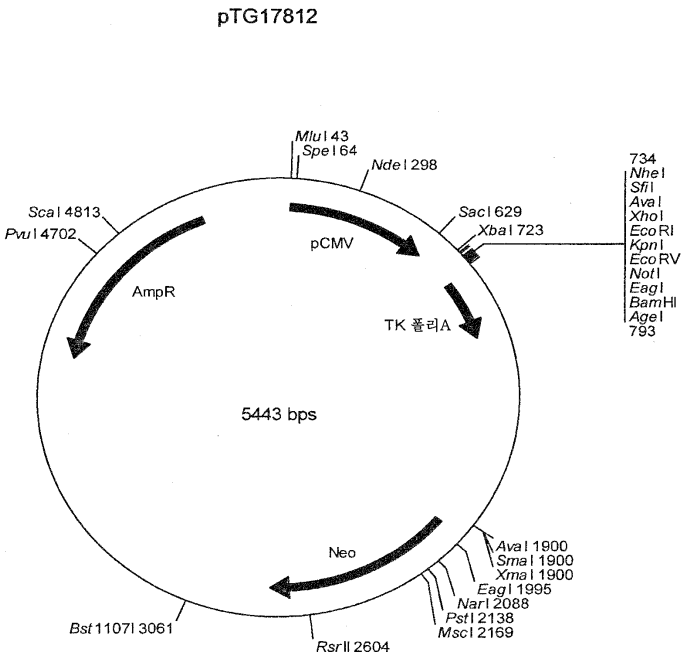
도면10


pOptiVEC™
SpeI 53
NdeI 287
712
XbaI
BamHI
AgeI
NotI
EagI
HpaI
746
FspI 3697
AmpR
pCMV
ApaI 869
HindIII 980
EMCV IRES
4382 bps
KpnI 1197
MscI 1332
BglII 1340
DHFR
TK 폴리A
AgeI 1917

도면11

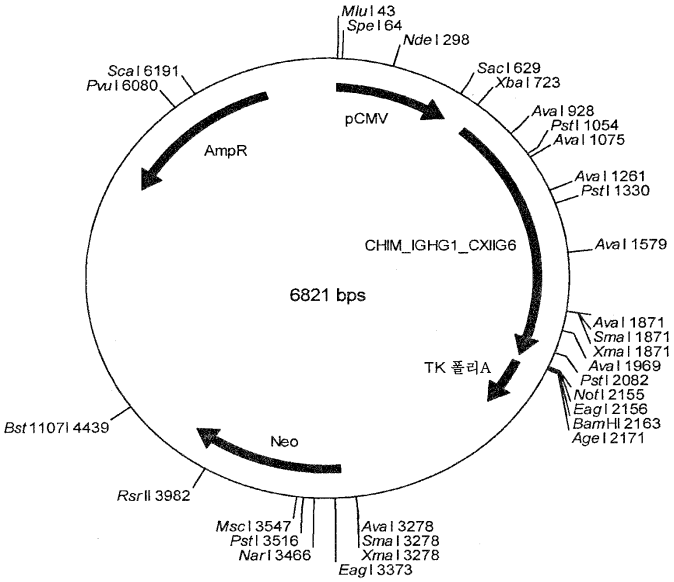

pTG17895
Spe I 53
Nde I 287
Xba I 712
pCMV
AmpR
Fsp I 4407
CHIM_IGK_CXIIG6
5092 bps
Not I 1445
Hpa I 1456
Apa I 1579
Hin dIII 1690
EMCV IRES
TK 폴리A
DHFR
Kpn I 1907
Msc I 2042
Bgl II 2050
Age I 2627

도면12


pTG17812
Mlu I 43
Spe I 64
Nde I 298
734
Nhe I
Sfi I
Ava I
Xho I
Eco RI
Kpn I
Eco RV
Not I
Eag I
BamHI
Age I
793
Sca I 4813
Pvu I 4702
Sac I 629
Xba I 723
pCMV
AmpR
TK 폴리A
5443 bps
Neo
Ava I 1900
Sma I 1900
Xma I 1900
Eag I 1995
Nar I 2088
Pst I 2138
Msc I 2169
Bst 1107I 3061
Rsr II 2604

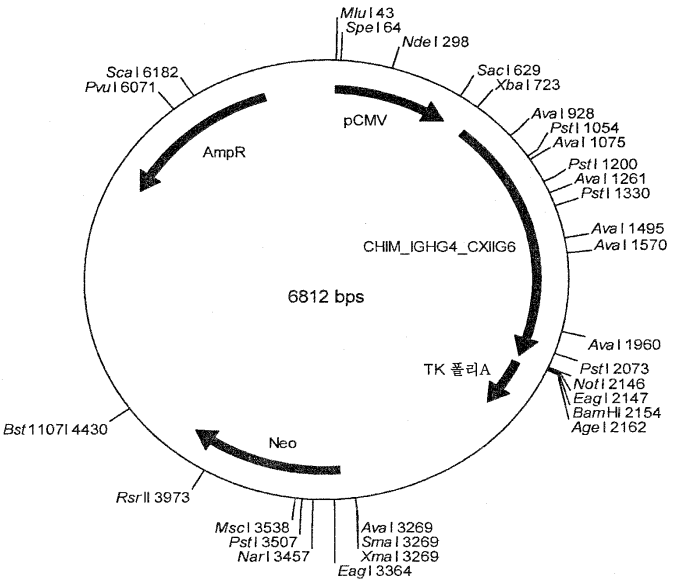
도면13

pTG17868



도면14

pTG17869



도면15

		VL CXIIG에서 치환된 아미노산[a]																			
K1	pTG17896	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K	V48L	H49Y	N53R	A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P	G84A	S85T	G100Q
K2	pTG17897	A9S	V13A	E17D	T18R		S43A	Q45K	V48L	H49Y	N53R	A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S		G84A	S85T	G100Q
K3	pTG17899	A9S	V13A	E17D	T18R		S43A	Q45K	V48L			A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S		G84A	S85T	G100Q
K4	pTG17900	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K		H49Y	N53R	A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S			S85T	G100Q
K5	pTG17901	A9S		E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K				A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P		S85T	G100Q
K6	pTG17902	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K				A55E	D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S			S85T	G100Q
K7	pTG17903	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K					D56S	Q70D			N76S				G100Q
K8	pTG17904			E17D																	G100Q
K9	pTG17905	A9S	V13A	E17D	T18R		S43A	Q45K	V48L				D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S		G84A	S85T	G100Q
K10	pTG17906	A9S		E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K					D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P		S85T	G100Q
K11	pTG17907	A9S		E17D	T18R		S43A	Q45K					D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S			S85T	G100Q
K12	pTG17947	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40D										K74T	N76S	S80P			
K13	pTG17948	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40D	S43A	Q45K	V48L				D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P	G84A	S85T	G100Q
K14	pTG17949	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40P										K74T	N76S	S80P			
K15	pTG17950	A9S	V13A	E17D	T18R	Q40P	S43A	Q45K	V48L				D56S	Q70D	S72T	K74T	N76S	S80P	G84A	S85T	G100Q

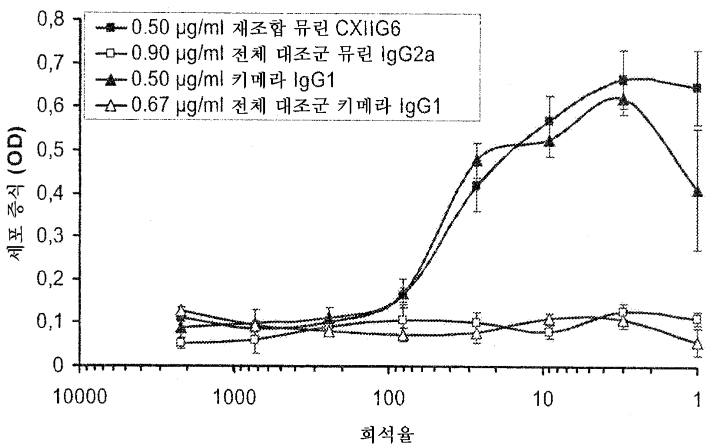
[a]굵은체로 표시된 아미노산은 상대 측쇄 용매-접근도가 50%를 초과하는 것이고,
밑줄로 표시된 것은 25%를 초과하는 것이다.

도면16

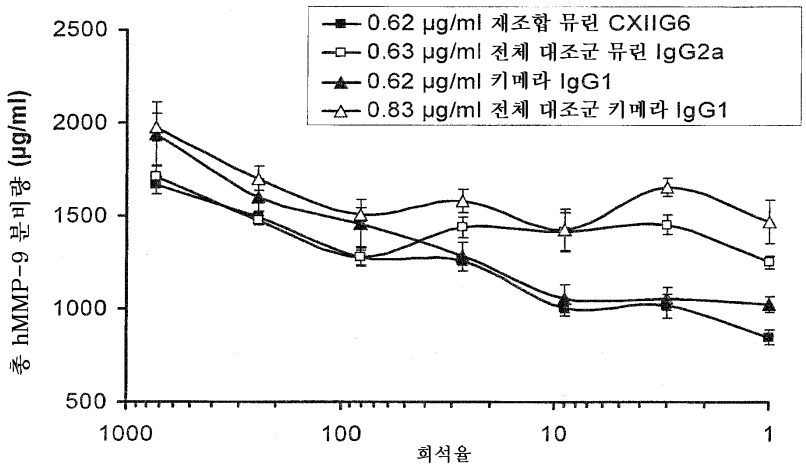
		VH CXIIG6에서 치환된 아미노산[a]																			
H1	pTG17870		K3Q	E5V	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R	F61E	E64A	S79N	V81L	R89K	P90T	G94A	I95V	T113L	L114V
H2	pTG17871		K3Q	E5V	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R	F61E	E64A	S79N	V81L	R89K	P90T	G94A	I95V	T113L	
H3	pTG17872		K3Q	E5V	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R	F61E	E64A	S79N	V81L	R89K	P90T	G94A	I95V		L114V
H4	pTG17873		K3Q	E5V	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R		E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	T113L	L114V
H5	PTG17874		K3Q	E5V	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R		E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	T113L	
H6	pTG17875		K3Q	E5V	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G	E50R		E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V		L114V
H7	pTG17883		K3Q	E5V		K19R	S40A	E42G	M43K				E64A	S79N		R89K			I95V	T113L	L114V
H8	pTG17884		K3Q	E5V		K19R	S40A	E42G	M43K				E64A	S79N		R89K			I95V	T113L	
H9	pTG17885		K3Q	E5V		K19R	S40A	E42G	M43K				E64A	S79N		R89K			I95V		L114V
H10	pTG17886		K3Q	E5V		K19R		E42G	M43K				E64A			R89K				T113L	L114V
H11	pTG17887		K3Q	E5V		K19R		E42G	M43K				E64A			R89K				T113L	
H12	pTG17888		K3Q	E5V		K19R		E42G	M43K				E64A			R89K					L114V
H13	pTG17889					K19R										R89K				T113L	L114V
H14	pTG17890					K19R										R89K				T113L	
H15	pTG17891					K19R										R89K					L114V
H16	pTG17892		K3Q	E5V	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G			E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	T113L	L114V
H17	pTG17893		K3Q	E5V	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G			E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V	T113L	
H18	pTG17894		K3Q	E5V	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K	A49G			E64A	S79N	V81L	R89K		G94A	I95V		L114V
H19	pTG17943		K3Q	E5V	M18L												P90A				
H20	pTG17944		K3Q	E5V	M18L	K19R		E42G	M43K				E64A			R89K				T113L	L114V
H21	pTG17945		K3Q	E5V	M18L	K19R		E42G	M43K				E64A			R89K	P90A			T113L	L114V
H22	pTG17946		K3Q	E5V	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K				E64A			R89K	P90A		I95V	T113L	L114V
H23	pTG17968		K3Q	E5V	M18L	K19R		E42G	M43K							R89K				T113L	L114V
H24	pTG17969		K3Q	E5V	M18L	K19R		E42G	M43K							R89K	P90A			T113L	L114V
H25	pTG17970		K3Q	E5V	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K							R89K	P90A		I95V	T113L	L114V
H26	pTG17985		K3Q	E5V	M18L	K19R		E42G	M43K							R89K	P90T			T113L	L114V
H27	pTG17986		K3Q	E5V	M18L	K19R	S40A	E42G	M43K							R89K	P90T		I95V	T113L	L114V

[a]굵은체로 표시된 아미노산은 상대 측쇄 용매-접근도가 50%를 초과하는 것이고, 밑줄로 표시된 것은 25%를 초과하는 것이다.

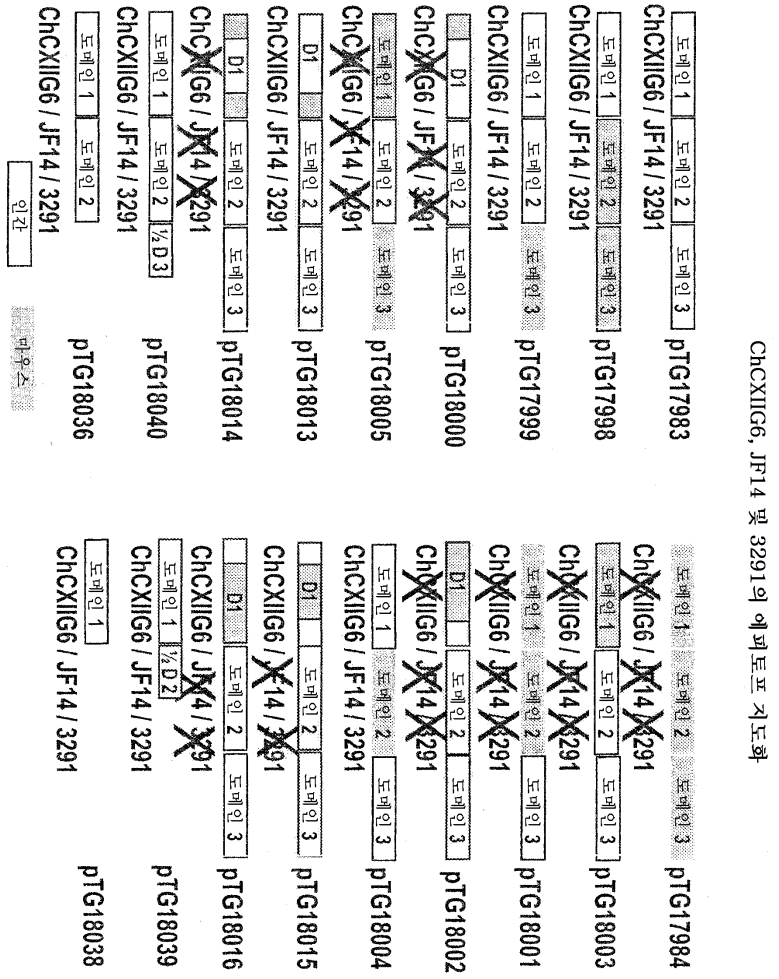
도면17



도면18


0.62 μg/ml 재조합 뮤린 CXIIG6
0.63 μg/ml 전체 대조군 뮤린 IgG2a
0.62 μg/ml 키메라 IgG1
0.83 μg/ml 전체 대조군 키메라 IgG1
총 hMMP-9 분비량 (μg/ml)
2500
2000
1500
1000
500
1000
100
10
1
희석율

도면19


ChCXIIG6, JF14 및 3291의 에피토프 지도화
도메인 1
도메인 2
도메인 3
ChCXIIG6 / JF14 / 3291
pTG17983
pTG17998
pTG17999
pTG18000
pTG18005
pTG18013
pTG18014
pTG18040
pTG18036
pTG17984
pTG18003
pTG18001
pTG18002
pTG18004
pTG18015
pTG18016
pTG18039
pTG18038
D1
½ D3
½ D2
인간
마우스

도면20

회색 밑줄 표시=CD115 마우스

흰색 밑줄 표시 =CD115 인간

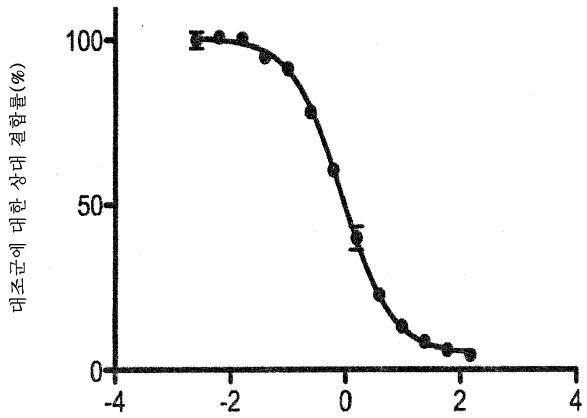
	Ig-유사 도메인 1 (D1) aa 20 내지 104	Ig-유사 도메인 2 (D2) aa 105 to 내지 199	Ig-유사 도메인 3 (D3) aa 200 내지 298
pTG17983	IPVIE...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES
pTG17984	APVIE...YVKDP	AHSWN...VNRVH	PEPPQ...QVVES
pTG17998	IPVIE...YVKDP	AHSWN...VNRVH	PEPPQ...QVVES
pTG17999	IPVIE...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PEPPQ...QVVES
pTG18003	APVIE...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES
pTG18001	APVIE...YVKDP	AHSWN...VNRVH	PGPPA...RVVES
pTG18005	APVIE...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PEPPQ...QVVES
pTG18004	IPVIE...YVKDP	AHSWN...VNRVH	PGPPA...RVVES

	Ig-유사 도메인 1 (D1) aa 20 내지 104			Ig-유사 도메인 2 (D2) aa 105 내지 199	Ig-유사 도메인 3 (D3) aa 200 내지 298
	aa20 내지 41	aa42 내지 90	aa91 내지 104		
pTG18000	APVIE...TVTLR	CVGNG...EPGDP	LGGSA...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES
pTG18002	APVIE...TVTLR	CVSNG...ELEDP	LGGSA...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES
pTG18013	IPVIE...TVTLR	CVGNG...EPGDP	MAGST...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES
pTG18014	APVIE...TVTLR	CVGNG...EPGDP	MAGST...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES
pTG18015	IPVIE...TVTLR	CVSNG...ELEDP	LGGSA...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES
pTG18016	IPVIE...TVTLR	CVSNG...ELEDP	MAGST...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...RVVES

	Ig-유사 도메인 1 (D1) aa 20 내지 104	Ig-유사 도메인 2 (D2) aa 105 내지 199	½ Ig-유사 도메인 3 (D3) aa 200 내지 246
pTG18040	IPVIE...YVKDP	ARPWN...VQKVI	PGPPA...TKLAI
pTG18036	IPVIE...YVKDP	ARPWN...VQKVI	
	Ig-유사 도메인 1 (D1) aa 20 내지 104	½ Ig-유사 도메인 2 (D2) aa 105 내지 157	
pTG18039	IPVIE...YVKDP	ARPWN... NYSFS	
pTG18038	IPVIE...YVKDP		

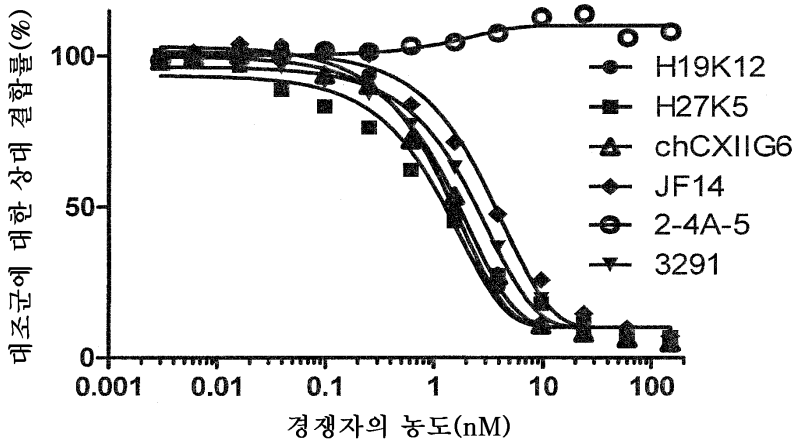
도면21

EL4-CD115 상에서의 ^{125}I-H27K15 항체와 표지되지 않은 H27K15 사이의 경쟁 곡선



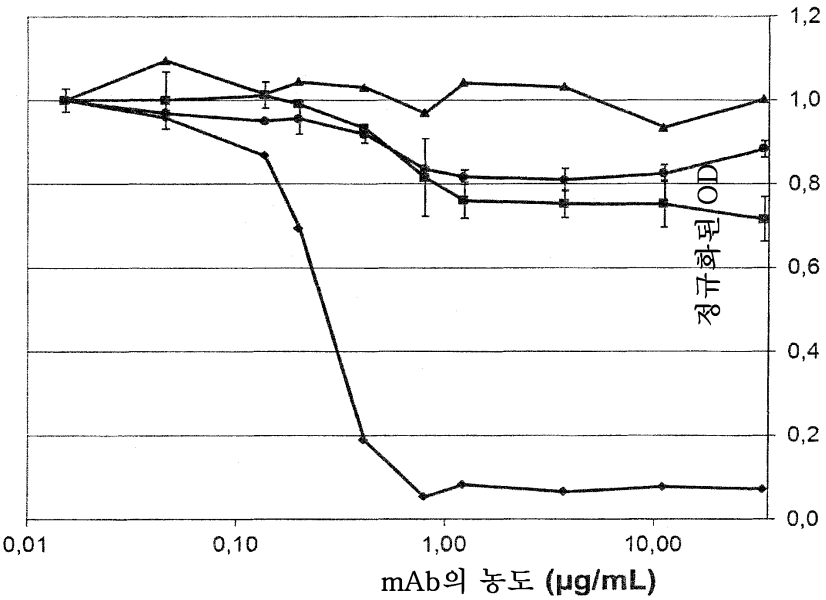
도면22

EL4-CD115 상에서의 ^{125}I-H27K15 항체와 각종 항체 사이의 경쟁 곡선



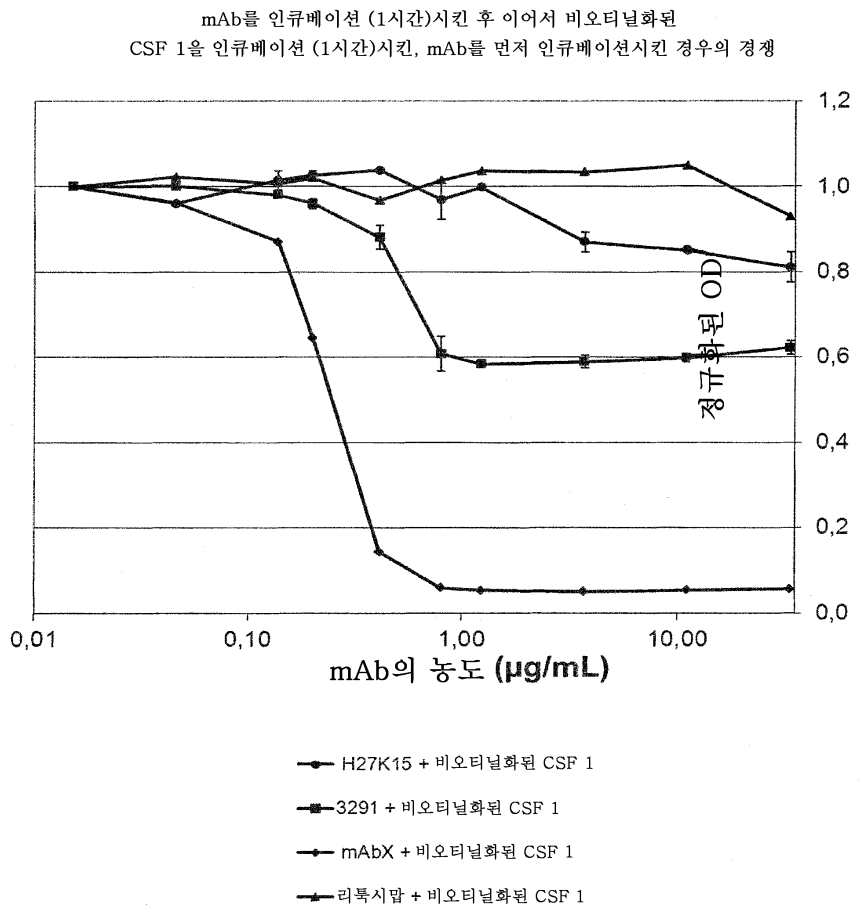
도면23

비오티닐화된 CSF 1을 인큐베이션 (1시간)시킨 후 이어서 mAb를
인큐베이션 (1시간)시킨, mAb를 이후에 인큐베이션시킨 경우의 경쟁



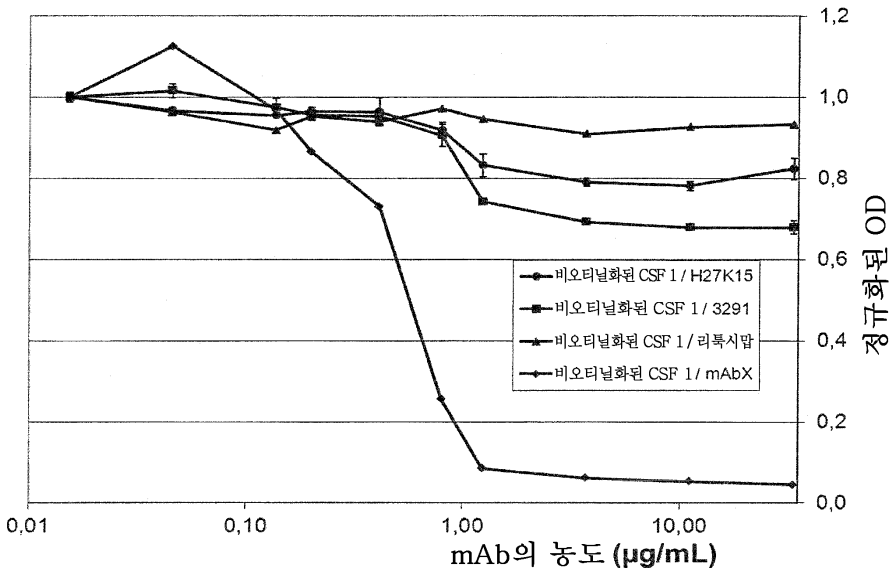
비오티닐화된 CSF 1 + H27K15
비오티닐화된 CSF 1 + 3291
비오티닐화된 CSF 1 + mAbX
비오티닐화된 CSF 1 + 리툭시맙

도면24

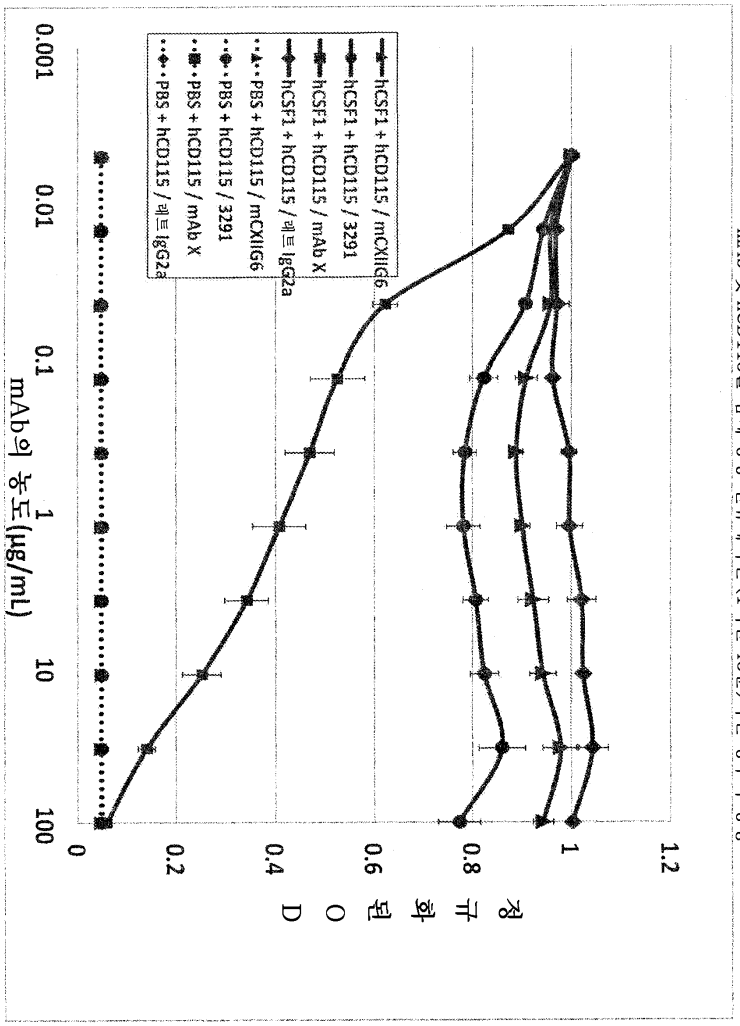

mAb를 인큐베이션 (1시간)시킨 후 이어서 비오티닐화된
CSF 1을 인큐베이션 (1시간)시킨, mAb를 먼저 인큐베이션시킨 경우의 경쟁
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
정규화된 OD
0,01
0,10
1,00
10,00
mAb의 농도 (μg/mL)
H27K15 + 비오티닐화된 CSF 1
3291 + 비오티닐화된 CSF 1
mAbX + 비오티닐화된 CSF 1
리툭시맙 + 비오티닐화된 CSF 1

도면25

mAb 및 비오티닐화된 CSF 1을 함께 공동 인큐베이션
(1시간)시킨 경우의 경쟁

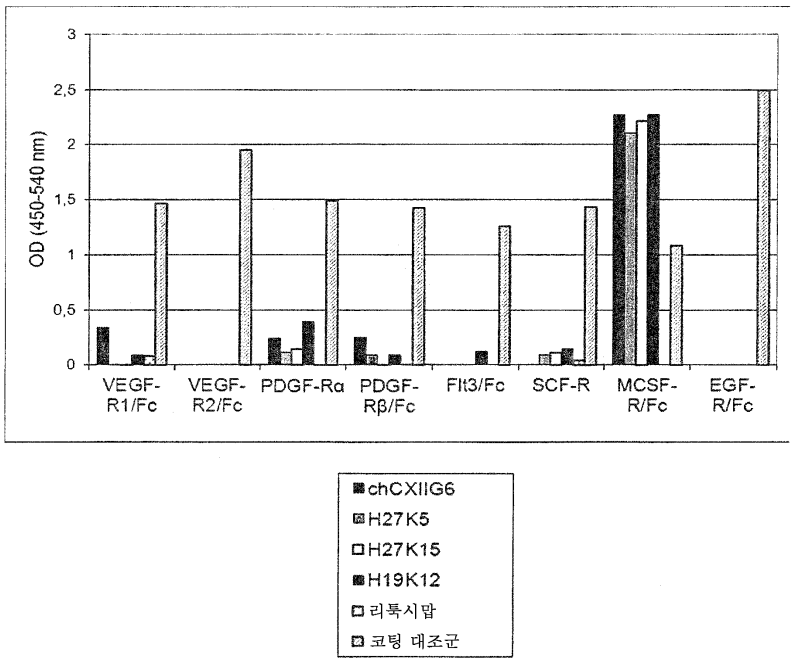


도면26


mAb 및 hCD115를 함께 공동 인큐베이션 (1시간 45분)시킨 경우의 경쟁
hCSF1 + hCD115 / mCXIIG6
hCSF1 + hCD115 / 3291
hCSF1 + hCD115 / mAb X
hCSF1 + hCD115 / 레트 IgG2a
PBS + hCD115 / mCXIIG6
PBS + hCD115 / 3291
PBS + hCD115 / mAb X
PBS + hCD115 / 레트 IgG2a
정규화된 OD
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
0.001
0.01
0.1
1
10
100
mAb의 농도(μg/mL)

도면27

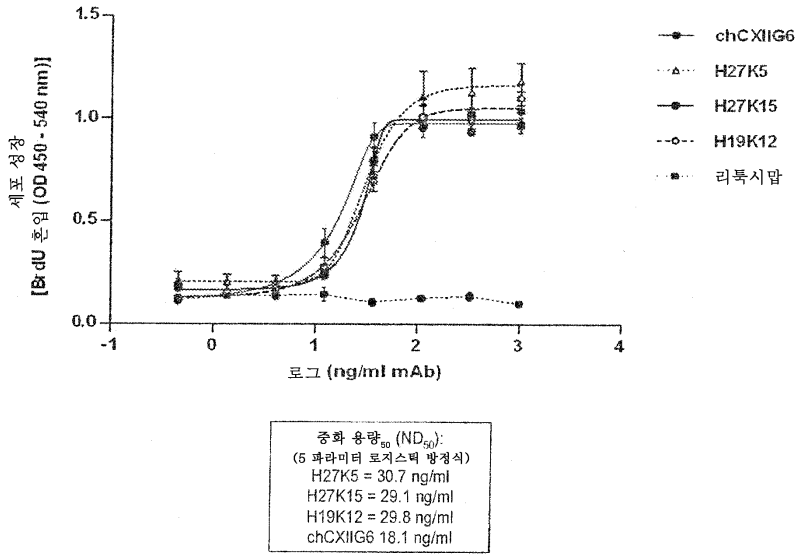
hCXIIG6 변이체와, CD115 이외의 다른 III형 서브패밀리로부터의 티로신 키나제 수용체와의 교차 반응성의 결여



막대는 단일 웰로부터 측정된 값에 상응하며, 2개의 독립 실험으로부터 얻은 값을 나타낸 것이다.

도면28

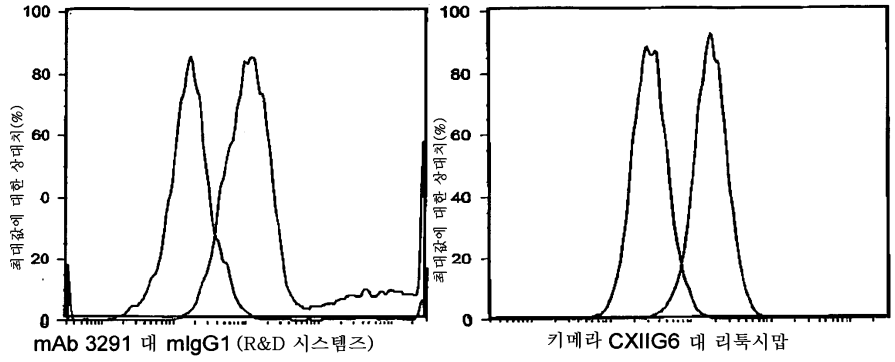
M-NFS-60 세포 기반 검정에서의 hCXIIG6 변이체 및 chCXIIG6에 의한 가용성 CD115의 차단



도면29a

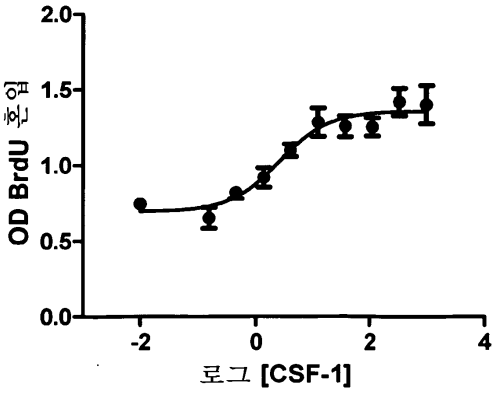
hCXIIG6 변이체에 의한 AML5 세포의 CSF-1 의존성 증식 억제

29a: AML5 세포는 표면 CD115를 발현한다



도면29b

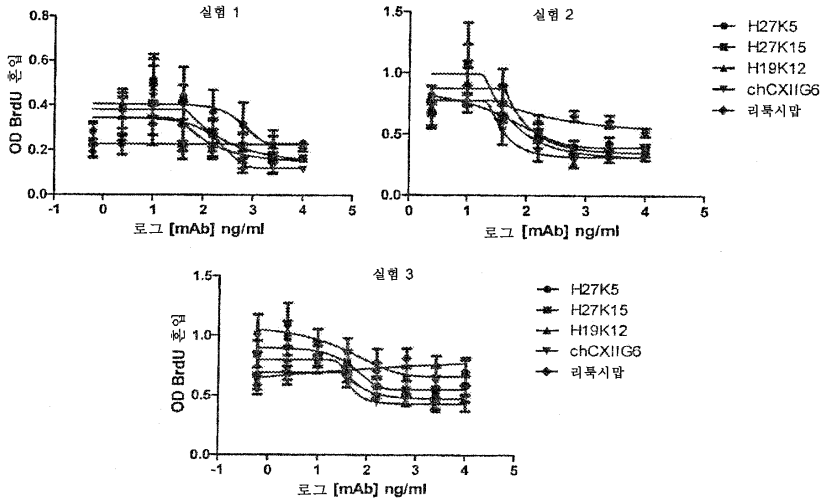
29b: AML5 세포 성장은 용량-의존성 방식으로 CSF-1에 의해 자극을 받는다.



도면29c

hCXIIG6 변이체에 의한 AML5 세포의 CSF-1 의존성 증식 억제

29c: hCXIIG6 변이체 및 chCXIIG6은 AML5 세포의 CSF-1 의존성 증식을 억제시킨다.



도면29d

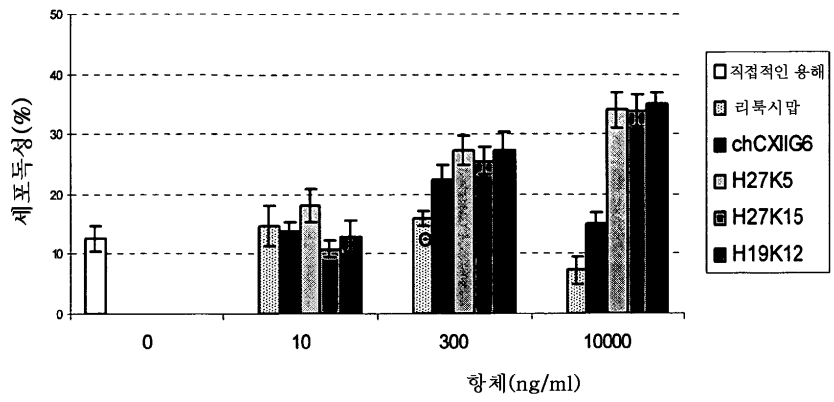
29d: c에 제시된 결과로부터의 값을 그래프패드 프리즘에 의해 계산하여 얻은 EC50 및 R 제곱값

	EC50 / R 제곱값			
	H27K5	H27K15	H19K12	chCXIIG6
실험 1	608 / 0,19	188 / 0,36	105 / 0,23	217 / 0,27
실험 2	50 / 0,74	86 / 0,56	46 / 0,62	37 / 0,57
실험 3	40 / 0,22	54 / 0,34	48 / 0,41	49 / 0,44

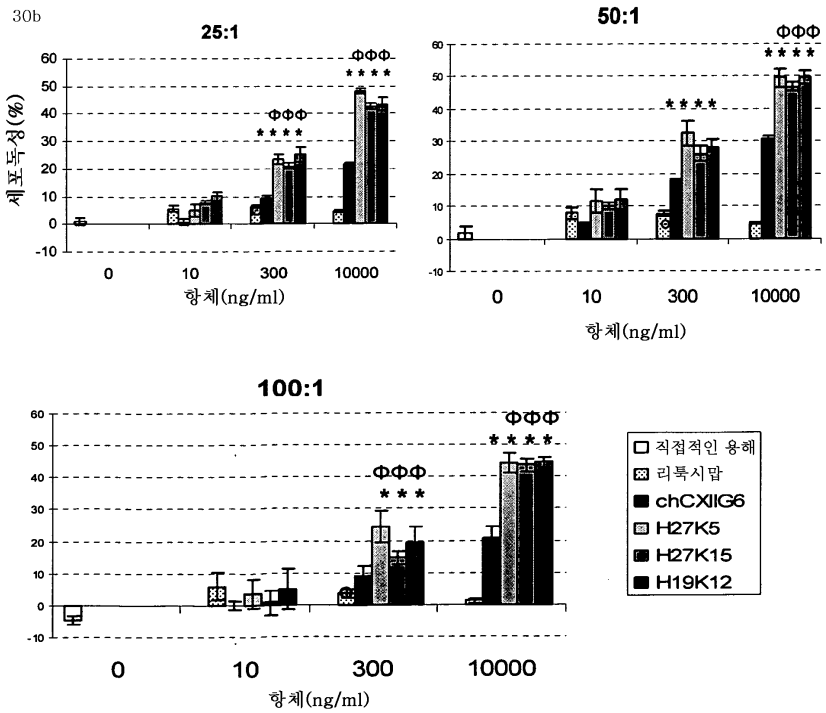
도면30a

EL4-CD115 표적 세포에 대한 hCXIIG6 변이체의 ADCC 활성

30a

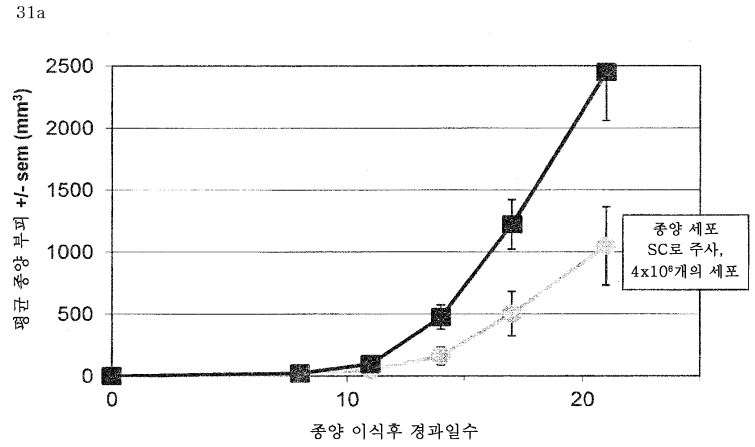


도면30b

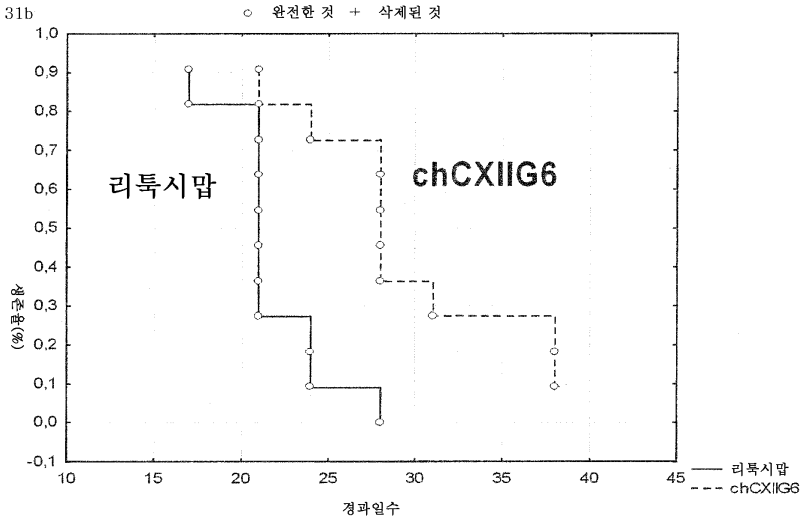


도면31a

BeWo 융모막암종 종양 모델에서의 키메라 CXIIG6의 치료 효과



도면31b



도면32a

서열 "H27" - 상응하는 가변 영역은 밑줄로 표시되어 있다 (서열 번호 37)

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly Val Gln Ser Glu

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

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val

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

Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

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

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

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

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

도면32b

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

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

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

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

서열 "H19" - 상응하는 가변 영역은 밑줄로 표시되어 있다 (서열 번호 38)

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly Val Gln Ser Glu

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

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro

Glu Met Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val

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

Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

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

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

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

도면32c

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys

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

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

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

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

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

서열 "K5" - 상응하는 가변 영역은 밑줄로 표시되어 있다 (서열 번호 39)

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala Arg Cys

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

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

도면32d

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val His Ala Ala Thr Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser

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

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

서열 "K12" - 상응하는 가변 영역은 밑줄로 표시되어 있다 (서열 번호 40)

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala Arg Cys

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

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Asp

Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly

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

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

도면32e

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

서열 "K15" - 상응하는 가변 영역은 밑줄로 표시되어 있다 (서열 번호 41)

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr Asp Ala Arg Cys

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

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln

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

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr

Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

서열 "VH27" - 가변 영역 (서열 번호 42)

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

도면32f

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val

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

Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

서열 "VH19" - 가변 영역 (서열 번호 43)

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

Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro

Glu Met Gly Leu Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val

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

Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

서열 "VK5" - 가변 영역 (서열 번호 44)

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

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Val His Ala Ala Thr Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser

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

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

도면32g

서열 "VK12" - 가변 영역 (서열 번호 45)

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

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Asp

Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

서열 "VK15" - 가변 영역 (서열 번호 46)

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

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Leu His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gln

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

인간 CSF1, 1-444의 서열 (서열 번호 47)

MetThrAlaProGlyAlaAlaGlyArgCysProProThrThrTrpLeuGlySerLeuLeu

LeuLeuValCysLeuLeuAlaSerArgSerIleThrGluGluValSerGluTyrCysSer

HisMetIleGlySerGlyHisLeuGlnSerLeuGlnArgLeuIleAspSerGlnMetGlu

도면32h

ThrSerCysGlnIleThrPheGluPheValAspGlnGluGlnLeuLysAspProValCys
TyrLeuLysLysAlaPheLeuLeuValGlnAspIleMetGluAspThrMetArgPheArg
AspAsnThrProAsnAlaIleAlaIleValGlnLeuGlnGluLeuSerLeuArgLeuLys
SerCysPheThrLysAspTyrGluGluHisAspLysAlaCysValArgThrPheTyrGlu
ThrProLeuGlnLeuLeuGluLysValLysAsnValPheAsnGluThrLysAsnLeuLeu
AspLysAspTrpAsnIlePheSerLysAsnCysAsnAsnSerPheAlaGluCysSerSer
GlnAspValValThrLysProAspCysAsnCysLeuTyrProLysAlaIleProSerSer
AspProAlaSerValSerProHisGlnProLeuAlaProSerMetAlaProValAlaGly
LeuThrTrpGluAspSerGluGlyThrGluGlySerSerLeuLeuProGlyGluGlnPro
LeuHisThrValAspProGlySerAlaLysGlnAlaProProArgSerThrCysGlnSer
PheGluProProGluThrProValValLysAspSerThrIleGlyGlySerProGlnPro
ArgProSerValGlyAlaPheAsnProGlyMetGluAspIleLeuAspSerAlaMetGly
ThrAsnTrpValProGluGluAlaSerGlyGluAlaSerGluIleProValProGlnGly
ThrGluLeuSerProSerArgProGlyGlyGlySerMetGlnThrGluProAlaArgPro
SerAsnPheLeuSerAlaSerSerProLeuProAlaSerAlaLysGlyGlnGlnProAla
AspValThrGlyThrAlaLeuProArgValGlyProValArgProThrGlyGlnAspTrp
AsnHisThrProGlnLysThrAspHisProSerAlaLeuLeuArgAspProProGluPro
GlySerProArgIleSerSerLeuArgProGlnGlyLeuSerAsnProSerThrLeuSer
AlaGlnProGlnLeuSerArgSerHisSerSerGlySerValLeuProLeuGlyGluLeu
GluGlyArgArg

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Transgene S.A.

<120> Antibody against the CSF-1R

<130> U1109 PCT S3

<150> 13/026,944

<151> 2011-02-14

<160> 47

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1404

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

atgtacttgg gactgaacta tgtattcata gtttttctcc taaatggtgt ccagagtgaa 60

gtgaagcttg aggagtctgg aggaggcttg gtgcagcctg gaggatccat gaaactctct 120

tgtgctgcct ctggattcac ttttagtgac gcctggatgg actgggtccg ccagtctcca 180

gagatgggac ttgagtgggt tgctgaaatt agaagcaaag ctaataatca tgcaacattc 240

tatgctgagt ctgtgaaagg gaggttcacc atctcaagag atgattccaa aagtagtgtc 300

tacctgcaaa tgaacagctt aagacctgaa gacactggca tttattactg taccagggta 360

aaggtaggct ttgacaactg gggccaaggc accactctca cagtctcctc agccaaaaca 420

acagccccat cggtctatcc actggcccct gtgtgtggag atacaactgg ctcctcggtg 480

actctaggat gcctggtcaa gggttatttc cctgagccag tgaccttgac ctggaactct 540

ggatccctgt ccagtggtgt gcacaccttc ccagctgtcc tgcagtctga cctctacacc 600

ctcagcagct cagtgactgt aacctcgagc acctggccca gccagtccat cacctgcaat 660

gtggcccacc cggcaagcag caccaaggtg gacaagaaaa ttgagcccag agggcccaca 720

atcaagccct gtcctccatg caaatgccca gcacctaacc tcttgggtgg accatccgtc 780

ttcatcttcc ctccaaagat caaggatgta ctcatgatct ccctgagccc catagtcaca 840

tgtgtggtgg tggatgtgag cgaggatgac ccagatgtcc agatcagctg gtttgtgaac 900

aacgtggaag tacacacagc tcagacacaa acccatagag aggattacaa cagtactctc 960

cgggtggtca gtgccctccc catccagcac caggactgga tgagtggcaa ggagttcaaa 1020

tgcaaggtca acaacaaaga cctcccagcg cccatcgaga gaaccatctc aaaacccaaa 1080

gggtcagtaa gagctccaca ggtatatgtc ttgcctccac cagaagaaga gatgactaag 1140

aaacaggtca ctctgacctg catggtcaca gacttcatgc ctgaagacat ttacgtggag 1200

tggaccaaca acgggaaaac agagctaaac tacaagaaca ctgaaccagt cctggactct 1260

gatggttctt acttcatgta cagcaagctg agagtggaaa agaagaactg ggtggaaaga 1320

aatagctact cctgttcagt ggtccacgag ggtctgcaca atcaccacac gactaagagc 1380

ttctcccgga ctccgggtaa atga 1404

<210> 2

<211> 467

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

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

50 55 60

Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe

65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser

85 90 95

Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr

100 105 110

Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Val Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly

115 120 125

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

130 135 140

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val

145 150 155 160

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu

165 170 175

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

180 185 190

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr

195 200 205

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro

210 215 220

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr

225 230 235 240

Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly

245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met

260 265 270

Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu

275 280 285

Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val

290 295 300

His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu

305 310 315 320

Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly

325 330 335

Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile

340 345 350

Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val

355 360 365

Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr

370 375 380

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

385 390 395 400

Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro

405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val

420 425 430

Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val

435 440 445

His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr

450 455 460

Pro Gly Lys

465

<210> 3

<211> 705

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

atgagtgtgc ccactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 120

atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacag 180

ggaaaatctc ctcagctcct ggtccatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca 240

aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct 300

gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttggggta ctcctcggac gttcggtgga 360

ggcaccaagt tggaaatcaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420

tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 480

cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540

aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg 600

ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 660

tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag 705

<210> 4

<211> 234

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
35 40 45

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

Gln Leu Leu Val His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn
85 90 95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
100 105 110

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

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

165 170 175
Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190
Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
195 200 205
His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
210 215 220
Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230

<210> 5
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 5
Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15
Val Gln Ser

<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 6
Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Met Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Met Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
50 55 60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Val Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 330
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 7
Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
1 5 10 15
Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60
Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80
Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp

145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg

165 170 175

Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln

180 185 190

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn

195 200 205

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly

210 215 220

Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met

245 250 255

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu

260 265 270

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

275 280 285

Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn

290 295 300

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr

305 310 315 320

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

325 330

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys

20

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu

1 5 10 15

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe

20 25 30

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

35 40 45

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser

50 55 60

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu

65 70 75 80

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser

85 90 95

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

100 105

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala Trp

1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Thr Arg Val Lys Val Gly Phe Asp Asn

1 5

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Glu Asn Ile Tyr Ser Asn

1 5

<210> 15

<211> 3

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

Ala Ala Thr

1

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Asp Ala Trp Met Asp

1 5

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 18

Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe Tyr Ala Glu Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 19

Val Lys Val Gly Phe Asp Asn

1 5

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr

1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 23

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala

1 5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 24

Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala

1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 25

Val Lys Val Gly Phe Asp Asn

1 5

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 27

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 28

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg Thr

1 5

<210> 29

<211> 972

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Gly Pro Gly Val Leu Leu Leu Leu Leu Val Ala Thr Ala Trp His

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Glu Trp Asp Gly Pro Pro Ser Pro His Trp Thr Leu Tyr Ser Asp Gly

50 55 60

Ser Ser Ser Ile Leu Ser Thr Asn Asn Ala Thr Phe Gln Asn Thr Gly

65 70 75 80

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

85 90 95

Ile His Leu Tyr Val Lys Asp Pro Ala Arg Pro Trp Asn Val Leu Ala

100 105 110

Gln Glu Val Val Val Phe Glu Asp Gln Asp Ala Leu Leu Pro Cys Leu

115 120 125

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

130 135 140

Gly Arg Pro Leu Met Arg His Thr Asn Tyr Ser Phe Ser Pro Trp His

145 150 155 160

Gly Phe Thr Ile His Arg Ala Lys Phe Ile Gln Ser Gln Asp Tyr Gln

165 170 175

Cys Ser Ala Leu Met Gly Gly Arg Lys Val Met Ser Ile Ser Ile Arg

180 185 190

Leu Lys Val Gln Lys Val Ile Pro Gly Pro Pro Ala Leu Thr Leu Val

195 200 205

Pro Ala Glu Leu Val Arg Ile Arg Gly Glu Ala Ala Gln Ile Val Cys

210 215 220

Ser Ala Ser Ser Val Asp Val Asn Phe Asp Val Phe Leu Gln His Asn

225 230 235 240

Asn Thr Lys Leu Ala Ile Pro Gln Gln Ser Asp Phe His Asn Asn Arg

245 250 255

Tyr Gln Lys Val Leu Thr Leu Asn Leu Asp Gln Val Asp Phe Gln His

260 265 270

Ala Gly Asn Tyr Ser Cys Val Ala Ser Asn Val Gln Gly Lys His Ser

275 280 285

Thr Ser Met Phe Phe Arg Val Val Glu Ser Ala Tyr Leu Asn Leu Ser

290 295 300

Ser Glu Gln Asn Leu Ile Gln Glu Val Thr Val Gly Glu Gly Leu Asn

305 310 315 320

Leu Lys Val Met Val Glu Ala Tyr Pro Gly Leu Gln Gly Phe Asn Trp

325 330 335

Thr Tyr Leu Gly Pro Phe Ser Asp His Gln Pro Glu Pro Lys Leu Ala

340 345 350

Asn Ala Thr Thr Lys Asp Thr Tyr Arg His Thr Phe Thr Leu Ser Leu

355 360 365

Pro Arg Leu Lys Pro Ser Glu Ala Gly Arg Tyr Ser Phe Leu Ala Arg

370 375 380

Asn Pro Gly Gly Trp Arg Ala Leu Thr Phe Glu Leu Thr Leu Arg Tyr

385 390 395 400

Pro Pro Glu Val Ser Val Ile Trp Thr Phe Ile Asn Gly Ser Gly Thr

405 410 415

Leu Leu Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Pro Gln Pro Asn Val Thr Trp Leu

420 425 430

Gln Cys Ser Gly His Thr Asp Arg Cys Asp Glu Ala Gln Val Leu Gln
435 440 445
Val Trp Asp Asp Pro Tyr Pro Glu Val Leu Ser Gln Glu Pro Phe His
450 455 460
Lys Val Thr Val Gln Ser Leu Leu Thr Val Glu Thr Leu Glu His Asn
465 470 475 480

Gln Thr Tyr Glu Cys Arg Ala His Asn Ser Val Gly Ser Gly Ser Trp
485 490 495
Ala Phe Ile Pro Ile Ser Ala Gly Ala His Thr His Pro Pro Asp Glu
500 505 510
Phe Leu Phe Thr Pro Val Val Val Ala Cys Met Ser Ile Met Ala Leu
515 520 525
Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Tyr Lys Tyr Lys Gln Lys Pro
530 535 540

Lys Tyr Gln Val Arg Trp Lys Ile Ile Glu Ser Tyr Glu Gly Asn Ser
545 550 555 560
Tyr Thr Phe Ile Asp Pro Thr Gln Leu Pro Tyr Asn Glu Lys Trp Glu
565 570 575
Phe Pro Arg Asn Asn Leu Gln Phe Gly Lys Thr Leu Gly Ala Gly Ala
580 585 590
Phe Gly Lys Val Val Glu Ala Thr Ala Phe Gly Leu Gly Lys Glu Asp
595 600 605

Ala Val Leu Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ser Thr Ala His Ala
610 615 620
Asp Glu Lys Glu Ala Leu Met Ser Glu Leu Lys Ile Met Ser His Leu
625 630 635 640
Gly Gln His Glu Asn Ile Val Asn Leu Leu Gly Ala Cys Thr His Gly
645 650 655
Gly Pro Val Leu Val Ile Thr Glu Tyr Cys Cys Tyr Gly Asp Leu Leu
660 665 670

Asn Phe Leu Arg Arg Lys Ala Glu Ala Met Leu Gly Pro Ser Leu Ser

675 680 685

Pro Gly Gln Asp Pro Glu Gly Gly Val Asp Tyr Lys Asn Ile His Leu

690 695 700

Glu Lys Lys Tyr Val Arg Arg Asp Ser Gly Phe Ser Ser Gln Gly Val

705 710 715 720

Asp Thr Tyr Val Glu Met Arg Pro Val Ser Thr Ser Ser Asn Asp Ser

725 730 735

Phe Ser Glu Gln Asp Leu Asp Lys Glu Asp Gly Arg Pro Leu Glu Leu

740 745 750

Arg Asp Leu Leu His Phe Ser Ser Gln Val Ala Gln Gly Met Ala Phe

755 760 765

Leu Ala Ser Lys Asn Cys Ile His Arg Asp Val Ala Ala Arg Asn Val

770 775 780

Leu Leu Thr Asn Gly His Val Ala Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala

785 790 795 800

Arg Asp Ile Met Asn Asp Ser Asn Tyr Ile Val Lys Gly Asn Ala Arg

805 810 815

Leu Pro Val Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe Asp Cys Val Tyr

820 825 830

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

835 840 845

Phe Ser Leu Gly Leu Asn Pro Tyr Pro Gly Ile Leu Val Asn Ser Lys

850 855 860

Phe Tyr Lys Leu Val Lys Asp Gly Tyr Gln Met Ala Gln Pro Ala Phe

865 870 875 880

Ala Pro Lys Asn Ile Tyr Ser Ile Met Gln Ala Cys Trp Ala Leu Glu

885 890 895

Pro Thr His Arg Pro Thr Phe Gln Gln Ile Cys Ser Phe Leu Gln Glu

900 905 910

Gln Ala Gln Glu Asp Arg Arg Glu Arg Asp Tyr Thr Asn Leu Pro Ser

915 920 925

Ser Ser Arg Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Ser Glu Leu Glu Glu
930 935 940
Glu Ser Ser Ser Glu His Leu Thr Cys Cys Glu Gln Gly Asp Ile Ala
945 950 955 960
Gln Pro Leu Leu Gln Pro Asn Asn Tyr Gln Phe Cys
965 970

<210> 30
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer sequence
<400> 30
gccgccacca tgtacttggg actgaactat gtattc 36

<210> 31
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer sequence
<400> 31
ggagatcttc atttacccgg agtccggga 29

<210> 32
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer sequence
<400> 32
gccgccacca tgagtgtgcc cactcaggtc ctg 33

<210> 33
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> primer sequence
<400> 33

gcccgggcta acactcattc ctgttgaagc tc 32

<210> 34

<211> 705

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleic acid sequence of an antibody light chain

<400> 34

atgagcgtgc ccacccaggt gctgggcctg ctgctgctgt ggctgaccga cgccagatgc 60

gacatccaga tgacccagag ccccgccagc ctgagcgtga gcgtgggcga gaccgtgacc 120

atcacctgca gggccagcga gaacatctac agcaacctgg cctggtatca gcagaagcag 180

ggcaagagcc cccagctgct ggtgcacgct gccaccaacc tggccgacgg cgtgccctcc 240

aggttcagcg gcagcggctc cggcacccag tacagcctga agatcaacag cctgcagagc 300

gaggacttcg gcagctacta ctgccagcac ttctggggca ccccaaggac cttcggcggc 360

ggcaccaagc tggagatcaa gaggaccgtg gccgccccca gcgtgttcat cttcccccca 420

agcgacgagc agctgaagag cggcaccgcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 480

ccccgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caacagccag 540

gaaagcgtca ccgagcagga cagcaaggac tccacctaca gcctgagcag caccctgacc 600

ctgagcaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtgac ccaccagggc 660

ctgtccagcc ccgtgaccaa gagcttcaac aggggcgagt gttga 705

<210> 35

<211> 1404

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleic acid sequence of an antibody heavy chain

<400> 35

atgtacctgg gcctgaacta cgtgttcatc gtgtttctgc tgaacggcgt gcagagcgag 60

gtgaagctgg aggaaagcgg cggagggctg gtgcagccag gcgggagcat gaaactgtcc 120

tgcgccgcca gcggcttcac cttcagcgac gcctggatgg actgggtgcg ccagagcccc 180

gagatgggcc tggagtgggt ggccgagatc aggtccaagg ccaacaacca cgccaccttc 240

tacgccgaga gcgtgaaggg caggttcacc atcagcaggg acgacagcaa gagcagcgtg 300

tacctgcaga tgaacagcct gaggcccgag gacaccggca tctactactg caccagagtg 360

aaagtgggct tcgacaactg gggccagggc accacactga ccgtgtccag cgccagcacc 420

aagggcccca gcgtgttccc cctggccccc agctccaaga gcaccagcgg aggaacagct 480

gctctgggct gcctggtgaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ttggaacagc 540

ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 600

agcctgagca gcgtggtgac agtgcccagc agcagcctgg gcacccagac ctacatctgc 660

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc 720

gacaagaccc acacctgtcc tccctgccca gccccagagc tgctgggcgg accctccgtg 780

ttcctgttcc cccccaagcc caaggacacc ctgatgatca gcaggacccc cgaggtgacc 840

tgcgtggtgg tggacgtgtc ccacgaggac ccagaggtga agttcaactg gtacgtggac 900

ggcgtggagg tgcacaacgc caagaccaag cccagagagg aacagtacaa cagcacctac 960

agggtggtgt ccgtgctgac cgtgctgcac caggactggc tgaacggcaa ggaatacaag 1020

tgcaaggtct ccaacaaggc cctgccagcc cccatcgaaa agaccatcag caaggccaag 1080

ggccagccac gggagcccca ggtgtacacc ctgccccccc cccgggacga gctgaccaag 1140

aaccaggtgt ccctgacctg tctggtgaag ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca acggccagcc cgagaacaac tacaagacca ccccccccagt gctggacagc 1260

gacggcagct tcttcctgta cagcaagctg accgtggaca agagcaggtg gcagcagggc 1320

aacgtgttca gctgcagcgt gatgcacgag gccctgcaca accactacac ccagaagagc 1380

ctgagcctgt cccccggcaa gtga 1404

<210> 36

<211> 1395

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleic acid sequence of an antibody heavy chain

<400> 36

atgtacctgg gcctgaacta cgtgttcatc gtgtttctgc tgaacggcgt gcagagcgag 60

gtgaagctgg aggaaagcgg cggagggctg gtgcagcctg gaggaagcat gaagctgtcc 120

tgcgctgcca gcggcttcac cttcagcgac gcctggatgg actgggtgcg ccagagcccc 180

gagatgggcc tggagtgggt ggccgagatc aggtccaagg ccaacaacca cgccaccttc 240

tacgccgaga gcgtgaaggg caggttcacc atcagcaggg acgacagcaa gagcagcgtg 300

tacctgcaga tgaacagcct gaggcccgag gacaccggca tctactactg caccagagtg 360

aaggtgggct tcgacaactg gggccagggc accacactga ccgtgtccag cgccagcacc 420

aagggcccaa gcgtgttccc cctggccccc tgcagcagaa gcaccagcga gagcacagcc 480

gccctgggct gcctggtgaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ttggaacagc 540

ggagccctga ccagcggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagcag cggcctgtac 600

agcctgagca gcgtggtgac cgtgcccagc agcagcctgg gcaccaagac ctacacctgc 660

aacgtggacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga gggtggagag caagtacggc 720

ccaccctgcc cctcttgccc agcccccgag ttcctgggcg gacccagcgt gttcctgttc 780

ccccccaagc ccaaggacac cctgatgatc agcaggaccc ccgaggtgac ctgcgtggtg 840

gtggacgtgt cccaggaaga tccagaggtc cagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 900

gtgcacaacg ccaagaccaa gcccagagag gaacagttta acagcaccta cagggtggtg 960

tccgtgctga ccgtgctgca ccaggactgg ctgaacggca aggaatacaa gtgcaaggtc 1020

tccaacaagg gcctgcccag ctccatcgaa aagaccatca gcaaggccaa gggccagcca 1080

cgggagcccc aggtgtacac cctgccaccc agccaagagg aaatgaccaa gaaccaggtg 1140

tccctgacct gtctggtgaa gggcttctac cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 1200

aacggccagc ccgagaacaa ctacaagacc acccccccag tgctggacag cgacggcagc 1260

ttcttcctgt acagcaggct gaccgtggac aagtccaggt ggcaggaagg caacgtcttt 1320

agctgcagcg tgatgcacga ggccctgcac aaccactaca cccagaagag cctgagcctg 1380

tccctgggca agtga 1395

<210> 37

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of antibody heavy chain

<400> 37

Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe

65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser

85 90 95

Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr

100 105 110

Gly Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Val Lys Val Gly Phe Asp Asn 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
385 390 395 400
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

405 410 415
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460
Pro Gly Lys
465

<210> 38
<211> 467

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> amino acid sequence of antibody heavy chain
<400> 38
Met Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Val Phe Ile Val Phe Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15
Val Gln Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

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

50 55 60

Glu Trp Val Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe

65 70 75 80

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser

85 90 95

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

100 105 110

Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Arg Val Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly

115 120 125

Gln Gly Thr Thr Leu 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

385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

450 455 460

Pro Gly Lys

465

<210> 39

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of antibody light chain

<400> 39

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

20 25 30

Val Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn

35 40 45

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

50 55 60

Lys Leu Leu Val His Ala Ala Thr Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp

100 105 110

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

115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

195 200 205

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

210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 40

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of antibody light chain

<400> 40

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Asp Gly Lys Ser Pro
50 55 60

Gln Leu Leu Val His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

225 230

<210> 41

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of antibody light chain

<400> 41

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr

1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser

20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn

35 40 45

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

50 55 60

Lys Leu Leu Leu His Ala Ala Thr Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

130 135 140

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

145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

180 185 190

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

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

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 42
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> amino acid sequence of antibody variable region
<400> 42

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

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

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

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Gly Val Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Val Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of antibody variable region

<400> 43

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
20 25 30

Trp Met Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Met Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Glu Ile Arg Ser Lys Ala Asn Asn His Ala Thr Phe Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Arg Val Lys Val Gly Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino acid sequence of antibody variable region

<400> 44

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Arg
85 90 95

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

<210> 45
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> amino acid sequence of antibody variable region
<400> 45

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Asp Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val

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

<210> 46
<211> 107
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> amino acid sequence of antibody variable region
<400> 46

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

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

<210> 47
<211> 444

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> amino acid sequence of human CSF1
<400> 47
Met Thr Ala Pro Gly Ala Ala Gly Arg Cys Pro Pro Thr Thr Trp Leu
1 5 10 15
Gly Ser Leu Leu Leu Leu Val Cys Leu Leu Ala Ser Arg Ser Ile Thr
20 25 30
Glu Glu Val Ser Glu Tyr Cys Ser His Met Ile Gly Ser Gly His Leu
35 40 45
Gln Ser Leu Gln Arg Leu Ile Asp Ser Gln Met Glu Thr Ser Cys Gln

50 55 60
Ile Thr Phe Glu Phe Val Asp Gln Glu Gln Leu Lys Asp Pro Val Cys
65 70 75 80
Tyr Leu Lys Lys Ala Phe Leu Leu Val Gln Asp Ile Met Glu Asp Thr
85 90 95

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

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

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

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

305 310 315 320
Thr Glu Leu Ser Pro Ser Arg Pro Gly Gly Gly Ser Met Gln Thr Glu
325 330 335
Pro Ala Arg Pro Ser Asn Phe Leu Ser Ala Ser Ser Pro Leu Pro Ala

340 345 350

Ser Ala Lys Gly Gln Gln Pro Ala Asp Val Thr Gly Thr Ala Leu Pro

355 360 365

Arg Val Gly Pro Val Arg Pro Thr Gly Gln Asp Trp Asn His Thr Pro

370 375 380

Gln Lys Thr Asp His Pro Ser Ala Leu Leu Arg Asp Pro Pro Glu Pro

385 390 395 400

Gly Ser Pro Arg Ile Ser Ser Leu Arg Pro Gln Gly Leu Ser Asn Pro

405 410 415

Ser Thr Leu Ser Ala Gln Pro Gln Leu Ser Arg Ser His Ser Ser Gly

420 425 430

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

435 440