



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년01월14일  
(11) 등록번호 10-1008734  
(24) 등록일자 2011년01월10일

(51) Int. Cl.  
A61K 48/00 (2006.01) A61P 15/00 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2009-7012101(분할)  
(22) 출원일자(국제출원일자) 2002년08월27일  
심사청구일자 2009년06월11일  
(85) 번역문제출일자 2009년06월11일  
(65) 공개번호 10-2009-0068301  
(43) 공개일자 2009년06월25일  
(62) 원출원 특허 10-2004-7002640  
원출원일자(국제출원일자) 2002년08월27일  
심사청구일자 2007년08월27일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2002/027571  
(87) 국제공개번호 WO 2003/020892  
국제공개일자 2003년03월13일  
(30) 우선권주장  
60/316,184 2001년08월29일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
FEBS Letters, Vol.462, pp177-181(1999.)\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
제넨테크, 인크.  
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우  
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1  
(72) 발명자  
페라라, 나폴레온  
미국 94109 캘리포니아주 샌 프란시스코 #704 퍼  
시픽 애비뉴 2090  
레 쿠퍼터, 제니퍼  
미국 94117-3435 캘리포니아주 샌 프란시스코 아  
파트먼트 #1 페이지스트리트 585  
(74) 대리인  
장수길, 김영

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 장제환

(54) 유사분열촉진 활성을 가진 B v 8 핵산 및 폴리펩티드

(57) 요약

본 발명은 내피 세포 증식을 유도하고 내피 세포 생존을 증진시키기 위해 Bv8 폴리펩티드를 사용하는 방법을 제공한다. 또한, Bv8 활성의 모듈레이터의 선별 방법이 제공된다. 또한, Bv8 폴리펩티드를 사용한 치료 방법이 제공된다.

대표도 - 도1

```

TGAGGGCGCCATGAGGAGCCTGTGCTGCGCCCCACTCCTGCTCCTCTTGCTGCTGCCGCC
GCTGCTGCTCAGCCCCGCGCTGGGGACGCGCCCGTGATCACCGGGCTTGTGACAAGGA
CTCCCAATGTGGTGGAGGCATGTGCTGTGCTGTGTCAGTATCTGGGTCAAGAGCATAAGGAT
TTGCACACCTATGGGCAAACTGGGAGACAGCTGCCATCCACTGACTCGTAAAAACAATTT
TGGAAATGGAAGGCAGGAAAGAAGAAAGAGGAAGAGAAGCAAAAGGAAAAAGGAGGTTCC
ATTTTTGGGCGGAGGATGCATCACACTTGCCCATGTCTGCCAGGCTTGGCCTGTTTACG
GACTTCATTTAACCGATTTATTTGTTTAGCCAAAAGTAAATCGCTCTGGAGTAGAAACCA
AATGTGA
    
```

**특허청구의 범위**

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

a. 용기; 및

b. SEQ ID NO:2의 아미노산 서열을 갖는 Bv8 폴리펩티드에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 상기 Bv8 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 안티센스 분자인 Bv8 길항물질을 포함하는, 암 또는 종양을 치료하기 위한 제품.

**청구항 29**

삭제

**청구항 30**

제28항에 있어서, 암이 고환암 또는 난소암인 제품.

**청구항 31**

제28항 또는 제30항에 있어서, VEGF 폴리펩티드에 결합하는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 또는 상기 VEGF 폴리펩티드를 코드화하는 폴리뉴클레오티드에 혼성화하는 안티센스 분자인 VEGF 길항물질을 추가로 포함하는 제품.

**청구항 32**

제31항에 있어서, 상기 VEGF 길항물질이 제2의 용기에 들어있는 제품.

**청구항 33**

삭제

**청구항 34**

삭제

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 일반적으로 유사분열촉진 활성을 가진 단백질 Bv8을 사용하는 방법, 조성물 및 분석에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 내피세포

[0003] 국소적인 미세환경은 조직- 또는 기관-특이적 방식으로 혈관 내피 세포의 표현형 및 생육 특성에 상당한 영향을 미치지만, 국소적인 명령 신호의 성질에 관해서는 대부분 알려져 있지 않다. 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및 내피 세포 특이적 성장 인자의 안기오포이에틴 계가 다양한 생리학 및 병리학적 상황에서 배아 발생 및 혈관형성을 위해 필수적이라는 증거가 주목되고 있다 [Ferrara and Alitalo, Nature Medicine, 5:1359-1364 (1999); Carmeliet, Nature Medicine 6:389-395 (2000)]. 또한, 내피 세포 표현형 및 생육의 국소적이고 조직-특이적인 제어에 대해 강력한 증거가 존재한다 [Aird 등, J.Cell.Biol. 138:1117-1124 (1997); Stewart 및 Wiley, Dev.Biol., 84:183-192 (1982)]. 내피 세포의 형태학적 및 기능적 특징은 다른 기관들 중에서도 광범위하게 다양하다 [Simionescu 및 Simionescu, Cell and Tissue Biology, Urban and Schwarzenberg, Baltimore (1988) pp.355-398]. 또한, 적용 부위는 새로운 혈관의 성질을 시험된 혈관형성인자의 유형에 비해 훨씬 상당한 정도까지 결정한다 [Dellian 등, Am.J.Pathology, 149:59-71 (1996); Roberts 등, Am.J.Pathology, 153:1239-1248 (1998)]. 맥관구조의 성질에 미치는 국소 미세환경의 영향을 위한 분자 기초는 알려져 있지 않지만, 분화된 간질이 주요한 역할을 하는 것으로 생각된다 (Dellian, 상동). 아마도, 세포 및 세포외 기질 성분 이외에도 조직-특이적 분비 단백질을 포함할 수 있는 통합된 자극 회로망이 구조 및 기능을 결정할 뿐만 아니라 정주 내피의 성장을 조절하는 기능을 한다.

[0004] 따라서, 내피 세포의 성장 및/또는 분화에 영향을 미치는 인자를 동정하고 특징화할 필요가 있다. 맥관구조의 발생에 관한 지식을 증가시키는 것 이외에도 추가로, 이러한 화합물은 혈관 조직과 연관된 상태를 진단하고 치료하는데 유용할 수 있다.

[0005] 호르몬 분비 세포

[0006] 과학 및 의료 요법의 진보에서 진척이 있었으나, 의학적 질병의 과학적인 새로운 치료법이 여전히 요구되고 있다. 새로운 치료법을 찾아내고자 하는 하나의 접근법은 유기체가 어떻게 작동하는지를 연구하는 것이다. 특히, 신호 세포가 유기체의 거동을 어떻게 조절하는지가 중요하다. 예를 들어, 내피 세포는 호르몬이라 불리는 신호 분자를 분비하고, 이때 이러한 호르몬의 분비 기능이상은 여러 질환을 일으킬 수 있다.

[0007] 호르몬 분비를 위해 분화된 세포는 테스토스테론 (고환의 라이디히 세포), 에스트로겐 (난소여포의 내난포막 세포) 및 프로게스테론 (파열된 난소여포의 황체 세포)를 분비하는 생식소의 세포를 포함한다. 의학 분야에서 테스토스테론, 에스트로겐 및 프로게스테론의 외인성 투여를 이용하는 다양한 치료법이 존재하지만, 이러한 호르몬을 생성하는 세포를 조절하는 것이 여전히 요구되고 있다.

[0008] 호르몬 분비를 위해 분화된 기타 세포들은 부신 세포 및 소화계 세포를 포함한다. 예를 들어 부신 세포는 에핀프린, 노르에핀프린 및 스테로이드 호르몬, 예컨대 미네랄코르티코이드 및 글루코코르티코이드를 분비한다. 특히 중요한 것은 부신의 피질에서 생성되고 많은 세포 유형의 대사에 영향을 미치는 코르티졸이다. 소화계의 세포는 인슐린을 분비하는 췌장의 세포를 포함한다. 인슐린은 랑게르한스섬에 의해 분비되고, 탄수화물의 대사를 위해 필수적이다. 인슐린은 진성 당뇨병의 치료 및 조절에서 사용되지만, 당뇨병과 같은 질환을 효과적으로 치료하는 것이 여전히 요구된다. 소화관 및 호흡관의 기타 주요 호르몬은 세로토닌, 엔돌핀, 소마토스타틴, 가스트린, 시크레틴, 콜레시스토키닌, 글루카곤 및 붐베신을 포함한다.

[0009] 내분비선 내에서 호르몬 분비 세포, 특히 스테로이드형성 내피 세포와 연관된 다수의 질병 및 질환이 존재한다. 따라서, 이러한 내피 세포에 특이적으로 영향을 미치는 성장 인자를 동정하는 것이 바람직하다. 이러한 내피 세포 특이적 성장 인자는, 이러한 세포 유형과 연관된 질병을 진단 및 치료하기 위해, 그리고 이러한 질병의 진단 및 치료에 유용한 약물 후보들을 동정하기 위해 중요한 수단이 된다.

[0010] Bv8

[0011] Bv8은 개구리 붐비나 바리에가타(Bombina variegata)의 피부 분비로부터 최초로 단리된 작은 단백질이다 [Mollay 등, Eur. J.Pharmacol. 374:189-196 (1999)]. Bv8은, 소장 수축을 유도하는데 효력이 높은 것으로 밝혀진 블랙 맘바(black mamba) 독으로부터의 작은 단백질인 MIT-1과 40% 초과 동일성을 나타낸다 [Schweitz 등, FEBS Lett. 461:183-188 (1999)]. Bv8의 여러 포유동물 상동체를 마우스 및 인간으로부터 클론화하였으며, 이것은 동일한 아미노-말단 서열을 갖는 것으로 밝혀졌다 [Wechselberger 등, FEBS Lett. 462:177-181 (1999)]. MIT-1과 유사하게, 인간 Bv8은 서브나노몰 범위의 EC<sub>50</sub>를 갖고 위장 평활근을 강력하게 수축시키는 것으로 밝혀졌다 [Li 등, Mol.Pharm. 59:692-698 (2001)]. Bv8의 2가지 형태가 인간에서 동정되었으며, 더욱 긴 형태가 대안적으로 스플라이스된 엑손의 존재를 반영한다. 인간 Bv8의 더욱 긴 형태는, 미국 특허 출원 09/886,242호에 기재된 VRPA와 대략 78% 상동성이고 58% 동일하다.

**발명의 내용**

**해결 하고자하는 과제**

[0012] 내피 세포와 연관된 상태의 진단 및 치료를 위한 방법 및 물질을 제공한다.

**과제 해결수단**

[0013] 본 발명은 Bv8의 신규 활성의 동정을 기초로 하고 있다. 여기에 상세히 설명된 바와 같이, Bv8 핵산 및 폴리펩티드는 다수의 분석 및 내피 세포와 연관된 상태의 진단 및 치료에서 사용될 수 있다.

**효과**

[0014] 본 발명은 내피 세포 증식을 유도하고 내피 세포 생존을 증진시키기 위해 Bv8 폴리펩티드를 사용하는 방법을 제공한다. 또한, Bv8 활성의 모듈레이터의 선별 방법이 제공된다. 또한, Bv8 폴리펩티드를 사용한 치료 방법이 제공된다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

[0015] **발명의 요약**

[0016] 본 발명은 Bv8의 신규 활성의 동정을 기초로 하고 있다. 특히, Bv8은 내피 세포에서의 증식을 유발하고, 내피 세포의 생존을 촉진하고, 혈관형성을 촉진하는 것으로 밝혀졌다. 여기에 상세히 설명된 바와 같이, Bv8 핵산 및 폴리펩티드는 다수의 분석 및 내피 세포와 연관된 상태의 진단 및 치료에서 사용될 수 있다.

[0017] 하나의 측면에서, 본 발명은 세포 증식을 유발하는 방법을 제공한다. 하나의 구현양태에서, 방법은 세포를 세포의 증식을 유발하기에 유효한 양의 Bv8과 접촉시키는 것을 포함한다. 방법은 세포를 VEGF와 접촉시키는 것을 더욱 포함할 수 있다. 다른 구현양태에서, 방법은 Bv8을 코드화하는 핵산을 세포 증식을 유발하기에 유효한 양으로 세포내에 도입하는 것을 포함한다. 이 방법은 VEGF를 코드화하는 핵산을 세포에 도입하는 것을 더욱 포함할 수 있다.

[0018] 하나의 구현양태에서, Bv8은 천연 서열 Bv8 폴리펩티드이다. 바람직하게는, 천연 서열 Bv8 폴리펩티드는 천연

인간 Bv8 폴리펩티드이다. 천연 인간 Bv8 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 구현양태에서, 천연 서열 Bv8은 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현양태에서, Bv8은 헤파린 결합 가능하다. 또 다른 구현양태에서, Bv8은 Bv8 면역부착소이다. 다른 구현양태에서, Bv8은 키메라 Bv8이다.

- [0019] 하나의 구현양태에서, 세포는 내피 세포, 더욱 바람직하게는 스테로이드형성 선의 세포와 같은 스테로이드형성 내피 세포이다.
- [0020] 추가의 측면에서, 본 발명은 세포 생존을 증진시키는 방법을 제공한다. 하나의 구현양태에서, 이 방법은 세포 생존을 증진시키기에 유효한 양의 Bv8과 세포를 접촉시키는 것을 포함한다. 방법은 세포를 VEGF와 접촉시키는 것을 더욱 포함할 수 있다. 다른 구현양태에서, 이 방법은 Bv8을 코드화하는 핵산을 세포 생존을 증진시키기에 유효한 양으로 세포 내에 도입하는 것을 포함한다. 이 방법은 VEGF를 코드화하는 핵산을 세포에 도입하는 것을 더욱 포함할 수 있다.
- [0021] 하나의 구현양태에서, Bv8은 천연 서열 Bv8 폴리펩티드이다. 바람직하게는, 천연 서열 Bv8 폴리펩티드는 천연 인간 Bv8 폴리펩티드이다. 천연 인간 Bv8 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 구현양태에서, 천연 서열 Bv8은 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현양태에서, Bv8은 헤파린 결합 가능하다.
- [0022] 세포는 바람직하게는 내피 세포이고, 더욱 바람직하게는 스테로이드형성 선의 세포와 같은 스테로이드형성 내피 세포이다.
- [0023] 추가의 측면에서, 본 발명은 포유동물의 호르몬 생성 조직과 관련된 상태의 치료 방법을 제공한다. 하나의 구현양태에서, 방법은 바람직하게는 Bv8 또는 그의 작동물질 또는 길항물질을 포함한 조성물을 상태를 치료하기에 유효한 양으로 포유동물에 투여하는 것을 포함한다. 다른 구현양태에서, 방법은 VEGF 또는 그의 작동물질 또는 길항물질을 포유동물에 투여하는 것을 더욱 포함한다. 포유동물은 바람직하게는 인간이다.
- [0024] 하나의 구현양태에서, Bv8은 헤파린 결합성이다. 다른 구현양태에서, Bv8은 천연 서열 Bv8 폴리펩티드이다. 바람직하게는, 천연 서열 Bv8 폴리펩티드는 천연 인간 Bv8 폴리펩티드이다. 천연 인간 Bv8 폴리펩티드는 SEQ ID NO:2의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 다른 구현양태에서, 천연 서열 Bv8은 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0025] 또 다른 측면에서, 본 발명은 내피 세포 증식의 억제 방법을 제공한다. 하나의 구현양태에서, 방법은 내피 세포를 세포 증식을 억제하기에 유효한 양으로 Bv8 길항물질과 접촉시키는 것을 포함한다.
- [0026] 추가의 측면에서, 본 발명은 포유동물, 바람직하게는 인간에서 Bv8에 민감한 세포에서의 암을 치료하는 방법을 제공한다. 방법은 바람직하게는 암을 치료하기에 유효한 양으로 Bv8 길항물질을 투여하는 것을 포함한다. 하나의 구현양태에서, 암은 호르몬-의존성 암이다. 다른 구현양태에서, 암은 고환 암이다.
- [0027] 다른 측면에서, 본 발명은 포유동물, 바람직하게는 인간에서 생식 기관의 암을 치료하는 방법을 제공한다. 하나의 구현양태에서, 방법은 암을 치료하기에 유효한 양으로 Bv8 길항물질을 포유동물에 투여하는 것을 포함한다. 암은 바람직하게는 고환 암이다.
- [0028] 다른 측면에서, 본 발명은 혈관형성의 유발 방법을 제공한다. 하나의 구현양태에서, 이 방법은 세포를 혈관형성을 유발하기에 유효한 양의 Bv8과 접촉시키는 것을 포함한다. 다른 구현양태에서, 이 방법은 Bv8을 코드화하는 핵산을 혈관형성을 유발하기에 유효한 양으로 세포에 도입하는 것을 포함한다.
- [0029] 추가의 측면에서, 본 발명은 과다하거나, 원하지 않거나 제어되지 않는 혈관형성과 연관된 상태에 대하여 포유동물을 치료하는 방법을 제공한다. 하나의 구현양태에서, 방법은 바람직하게는 Bv8 또는 그의 작동물질 또는 길항물질을 질병을 치료하기에 유효한 양으로 포유동물에 투여하는 것을 포함한다. 포유동물은 바람직하게는 인간이다.
- [0030] 추가의 측면에서, 본 발명은 포유동물에서 수정을 조절하는 방법을 제공한다. 하나의 구현양태에서, 포유동물은 인간이다. 방법은 바람직하게는 수정을 조절하기에 유효한 양으로 포유동물에 Bv8 길항물질을 투여하는 것을 포함한다.
- [0031] 또 다른 추가의 측면에서, 본 발명은 용기, Bv8, 및 Bv8의 사용 지시를 포함하는 제품을 제공한다. 하나의 구현양태에서, 지시는 호르몬 생성 내피 조직, 바람직하게는 고환 조직과 연관된 상태를 치료하기 위해 Bv8을 사

용하기 위한 것이다.

[0032] 다른 측면에서, 본 발명은 포유동물에서 스테로이드 호르몬-의존성 질환의 치료 방법을 제공한다. 하나의 구현양태에서, 방법은 Bv8 또는 그의 작동물질 또는 길항물질을 스테로이드 호르몬-의존성 질환을 치료하기에 유효한 양으로 포유동물에 투여하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다. 스테로이드 호르몬-의존성 질환은 선천성 지형 부신 과형성, 불임증, 성적 성숙, 남성 호르몬 의존성 종양, 조발 청춘기, 맥문-엘버라이트 증후군, 선천성 부신 형성 부전증 및 저고나도트로핀성 성기능저하증으로 구성된 군에서 바람직하게 선택된다.

[0033] 다른 측면에서, 본 발명은 용기, Bv8 길항물질 및 Bv8 길항물질의 사용 지시를 포함하는 제품을 제공한다. 하나의 구현양태에서, 지시는 암, 바람직하게는 고환 암을 치료하기 위해 Bv8 길항물질을 사용하기 위한 것이다. 다른 구현양태에서, 지시는 수정을 조절하기 위해 Bv8 길항물질을 사용하기 위한 것이다.

[0034] 본 발명의 다른 측면은 후보 화합물을 Bv8과 접촉시키고, Bv8 생물학적 활성에 미치는 화합물의 효과를 결정하고, Bv8 생물학적 활성이 억제되는 길항물질을 동정함으로써, Bv8 길항물질을 동정하는 방법을 제공한다. 하나의 구현양태에서, Bv8 길항물질은 내피 세포 증식을 자극하는 Bv8의 능력을 억제함으로써 동정된다. 다른 구현양태에서, Bv8 길항물질은 내피 세포 생존을 촉진하기 위해 Bv8의 활성을 억제함으로써 동정된다.

[0035] **바람직한 구현양태의 상세한 설명**

[0036] I. 정의

[0037] 달리 정의되지 않는 한, 여기에서 사용된 기술 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 보통 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어 문헌 [Singleton 등, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 제2판, J.Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989)] 참조. 본 발명의 목적을 위하여, 하기 용어들이 다음과 같이 정의된다.

[0038] 여기에서 사용된 용어 "Bv8" 및 "Bv8 폴리펩티드"는 서로 바꾸어 사용되고, 각각 여기에서 정의된 천연 서열 Bv8, Bv8 변이체 및 키메라 Bv8을 가리킨다. 임의로, Bv8은 천연 글리코실화와 연관되지 않는다. "천연 글리코실화"는, 포유동물 세포에서, 특히 자연적으로 생성된 세포에서 생성될 때, Bv8에 공유결합으로 부착된 탄수화물 잔기를 가리킨다. 따라서, 비-인간 세포에서 생성된 인간 Bv8이 "천연 글리코실화와 연관되지 않을" 수도 있는 Bv8의 예이다. 때때로, 원핵생물, 예를 들어 이.콜리에서 생성되는 경우에서와 같이, Bv8은 전혀 글리코실화되지 않을 수도 있다.

[0039] Bv8 핵산은, 상기 정의된 바와 같이 Bv8 폴리펩티드를 코드화하거나, 또는 DNA 또는 RNA에 하이브리드되고 엄격한 하이브리드형성 조건하에서 안정하게 결합을 유지하는 RNA 또는 DNA이고, 약 10개 이상의 뉴클레오티드 길이를 갖는다. 엄격한 조건은 (1) 세척을 위해 낮은 이온 강도 및 고온, 예를 들어 50에서 0.15M NaCl/0.015M 시트르산나트륨/0.1% NaDodSO<sub>4</sub>를 사용하거나, (2) 하이브리드형성 동안에 포름아미드와 같은 변성제, 예를 들어 50% (vol/vol) 포름아미드를 pH 6.5에서 42°C에서 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% 피콜/0.1% 폴리비닐피롤리돈/50mM 인산나트륨 완충액과 함께 750mM NaCl, 75mM 시트르산나트륨과 함께 사용하는 것이다.

[0040] 핵산은 다른 핵산 서열과 함께 기능성 관계로 놓여질 때 작동적으로 연결된다. Bv8 핵산은 특정한 숙주 유기체에서 발현될 수 있도록 벡터 내에서 다른 핵산 서열과 함께 작동적으로 연결될 수도 있다. 이것은 당 기술분야에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, 예비서열 또는 분비 리더를 위한 DNA는, 폴리펩티드의 분비에 참여하는 예비단백질로서 발현된다면, 폴리펩티드를 위한 DNA에 작동적으로 연결되거나; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미친다면 코드화 서열에 작동적으로 연결되거나; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 위치된다면 코드화 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, "작동적으로 연결"이란, 연결되는 DNA 서열이 연속적이고 분비 리더의 경우에 해독 단계에서 연속적임을 의미한다. 그러나, 인핸서는 연속적이어서는 안된다. 연결은 편리한 제한 부위에서 결합에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는다면, 통상적인 실행에 따라 합성 올리고뉴클레오티드 어댑터 또는 링커가 사용된다.

[0041] "천연 서열 Bv8"은 제조 방식과는 무관하게 자연에서 유래된 Bv8과 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 즉, 천연 서열 Bv8은 천연 발생 인간 Bv8, 마우스의 Bv8, 또는 다른 포유류 종으로부터의 Bv8의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 예를 들어, 전체-길이 천연 서열 인간 Bv8 아미노산 서열을 도 2(SEQ ID NO:2)에 나타낸다. 두번째 전체-길이 천연 서열 인간 Bv8을 도 4(SEQ ID NO:4)에 나타낸다. 이러한 2개의 서열은 인정

된 헤파린 결합 도메인을 코드화하는 엑손의 대안적인 스플라이싱 결과이다. 따라서, 도 2(SEQ ID NO:2)에 나타난 아미노산 서열을 가진 천연 서열 인간 Bv8은 헤파린 결합 도메인을 포함하는 반면, 도 4(SEQ ID NO:4)에 나타난 천연 서열 Bv8은 그렇지 않다. 천연 서열 마우스 Bv8 아미노산 서열을 도 6(SEQ ID NO:6)에 나타낸다. 인간 및 마우스의 Bv8 서열은 또한 문헌 [Wechselberger 등, FEBS Lett. 462:177-181 (1999)] 및 [Li 등, Mol.Pharm. 59:692-698 (2001)]에 개시되어 있다. 이러한 천연 서열 Bv8은 자연으로부터 단리될 수 있거나 또는 재조합 및/또는 합성 수단에 의해 생성될 수 있다. 용어 "천연 서열 Bv8"은 구체적으로 천연 발생 프리프로, 프로 및 성숙 형태, 및 Bv8의 끝이 절단된 형태, 천연 발생 변이 형태 (예를 들어, 대안적인 스플라이스 형태, 예컨대 도 4(SEQ ID NO:4)에 나타난 것과 같음) 및 천연 발생 대립 변이체를 포함한다. 바람직한 천연 서열 Bv8은 도 2(SEQ ID NO:2)에 나타난 것과 같은 전체-길이 천연 서열 인간 Bv8이다.

[0042] "Bv8 변이체"는, 천연 서열 내의 하나 이상의 아미노산 잔기의 삽입, 결실, 변형 및/또는 치환에 의하여, 인간 및 마우스의 Bv8에 대해 도 2, 4 및 6 (SEQ ID NO:2, 4 및 6)에 나타난 것과 같은 천연 서열 Bv8 폴리펩티드의 서열과는 상이한 아미노산 서열을 가진 생물학적 활성 Bv8 폴리펩티드이다. Bv8 변이체는 일반적으로 도 2(SEQ ID NO:2)의 인간 Bv8과 같은 천연 서열 Bv8과 100% 미만의 서열 동일성을 갖는다. 그러나, 통상적으로 생물학적 활성 Bv8 변이체는 도 2(SEQ ID NO:2)의 인간 Bv8과 같은 천연 발생 Bv8의 아미노산 서열과 약 70% 이상, 바람직하게는 약 75% 이상, 더욱 바람직하게는 약 80% 이상, 더욱 더 바람직하게는 약 85% 이상, 더 더욱 바람직하게는 약 90% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 가질 것이며, 바람직하게는 적어도 약 95%로부터 적어도 약 99%까지 1%의 증분으로 아미노산 서열 동일성이 증가된다. Bv8 변이체는 상응하는 천연 서열 Bv8 폴리펩티드의 생물학적 활성을 유지하는 5개 이상의 아미노산을 가진 펩티드 단편을 포함한다. 또한, Bv8 변이체는 하나 이상의 아미노산 잔기가 천연 Bv8 서열의 N- 또는 C- 말단 또는 그 내부에 첨가된 Bv8 폴리펩티드를 포함한다. Bv8 변이체는 또한 다수의 아미노산 잔기가 결실되고 하나 이상의 아미노산 잔기에 의해 임의로 치환된 Bv8 폴리펩티드를 포함한다. 비-천연 발생 아미노산을 생성하기 위하여, 예를 들어 천연 발생 아미노산과는 다른 부분으로 치환하거나 또는 아미노산 잔기를 변형시킴으로써 Bv8 변이체를 공유결합에 의해 변형시킬 수도 있다. Bv8 변이체는 헤파린 결합 도메인을 포함할 수 있다.

[0043] Bv8 서열에 있어서 "퍼센트 아미노산 서열 동일성"은, 서열을 정렬하고 필요하다면 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해 간극을 도입한 후에 Bv8 서열에서의 잔기와 동일한 후보 서열내의 아미노산 잔기의 퍼센트로서 정의되며, 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로서 간주되지 않는다. N-말단, C-말단, 또는 내부 연장, 결실, 또는 삽입의 어느 것도 서열 동일성 또는 상동성에 영향을 미치는 것으로서 해석되어서는 안된다. 정렬을 위한 방법 및 컴퓨터 프로그램이 당 기술분야에 공지되어 있다. 이러한 컴퓨터 프로그램은 진엔테크 인코포레이티드에 의해 만들어진 "얼라인(ALIGN)-2"이고, 이것은 미국 워싱턴 디.씨. 20559의 미국 저작권 관청에서 사용자 자료로 출원되었으며 미국 저작권 등록 번호 TXU510087호로 등록되었다.

[0044] "키메라 Bv8" 분자는 전체 길이 Bv8을 포함하는 폴리펩티드 또는 이중 폴리펩티드에 융합되거나 결합된 하나 이상의 도메인을 포함하는 폴리펩티드이다. 키메라 Bv8 분자는 일반적으로 천연 발생 Bv8과 공통적인 하나 이상의 생물학적 성질을 공유한다. 키메라 Bv8 분자의 예는 정제 목적을 위해 에피토프 부착된 것이다. 다른 키메라 Bv8 분자는 Bv8 번역부착소이다.

[0045] 본 명세서에서 사용된 용어 "에피토프-표지부착"이란 "표지(tag) 폴리펩티드"에 융합된 Bv8을 포함하는 키메라 폴리펩티드를 가리킨다. 표지 폴리펩티드는 그에 대항하여 항체가 만들어질 수 있는 에피토프에 충분한 잔기를 갖지만, Bv8의 생물학적 활성을 방해하지 않을 정도로 충분히 짧다. 표지 폴리펩티드는, 그것에 대항한 항체가 다른 에피토프와 실질적으로 교차 반응되지 않도록 충분히 특이하다. 적절한 태그 폴리펩티드는 일반적으로 6개 이상의 아미노산 잔기를 갖고, 통상 약 8-50개 아미노산 잔기 (바람직하게는 약 9-30개 잔기)를 갖는다. 니켈에 결합하고, 예를 들어 문헌 [Lindsay 등, Neuron 17:571-574 (1996)]에 기재된 바와 같은 Ni-NTN 크로마토그래피에 의해 표지부착된 단백질을 단리할 수 있는 폴리-히스티딘 서열이 바람직하다.

[0046] "단리된 Bv8"은 Bv8 원천으로부터 정제되거나 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조되고 정제된 Bv8을 의미한다. 정제된 Bv8은 실질적으로 다른 폴리펩티드 또는 펩티드를 갖지 않는다. "실질적으로 갖지 않는"은 약 5% 미만, 바람직하게는 약 2% 미만, 더욱 바람직하게는 약 1% 미만, 더욱 더 바람직하게는 약 0.5% 미만, 가장 바람직하게는 약 0.1% 미만의 다른 원천 단백질로의 오염을 의미한다.

[0047] "실질적으로 순수한" 단백질은 조성물의 총 중량을 기준으로 하여 약 90중량% 이상의 단백질, 바람직하게는 약 95중량% 이상, 더욱 바람직하게는 약 90중량% 이상, 더욱 더 바람직하게는 약 95중량% 이상의 단백질을 포함하는 조성물을 의미한다. "필수적으로 동종" 단백질은 조성물의 총 중량을 기준으로 하여 약 99중량% 이상의 단

백질을 포함하는 조성물을 의미한다.

- [0048] Bv8 "작동물질"은 천연 서열 Bv8의 하나 이상의 생물학적 성질을 가진 분자 또는 화합물이다. 이들은 작은 유기 분자, 펩티드 및 작동물질 항-Bv8 항체를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0049] 용어 "길항물질"은 가장 넓은 의미로 사용되고, 천연 Bv8 폴리펩티드의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나 또는 중화하는 분자를 포함한다. 적절한 길항물질 분자는 구체적으로 길항물질 항체 또는 항체 단편, 천연 Bv8 폴리펩티드, 펩티드, 유기 소분자 등의 단편 또는 아미노산 서열 변이체를 포함한다. Bv8 폴리펩티드의 작동물질 또는 길항물질의 동정 방법은 Bv8 폴리펩티드를 후보 작동물질 또는 길항물질 분자와 접촉시키고 Bv8 폴리펩티드와 보통 연관된 하나 이상의 생물학적 활성에서의 검출가능한 변화를 측정하는 것을 포함할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 목적을 위한 "활성적인" 또는 "활성"은 천연 또는 자연-발생 Bv8의 생물학적 및/또는 면역학적 활성을 가진 Bv8의 형태(들)를 가리키고, 여기에서 "생물학적"활성이란 천연 또는 자연-발생 Bv8에 의해 소유된 항원성 에피토프에 대항하여 항체의 생성을 유도할 수 있는 능력 이외에 천연 또는 자연-발생 Bv8에 의해 유발된 생물학적 기능 (억제 또는 자극)을 가리키고, "면역학적" 활성이란 천연 또는 자연-발생 Bv8에 의해 소유된 항원성 에피토프에 대항하여 항체의 생성을 유도할 수 있는 능력을 가리킨다.
- [0051] 따라서, "생물학적 활성"은, "Bv8" 또는 "단리된 v8" 또는 Bv8의 작동물질과 함께 사용될 때, 천연 서열 Bv8의 이펙터 기능을 나타내거나 공유하는 Bv8 폴리펩티드를 의미한다. Bv8의 기본 이펙터 기능은 내피 세포의 증식을 자극하는 능력이다. 더욱 더 바람직하게는, 생물학적 활성은 내분비선 내의 모세 내피 세포, 바람직하게는 스테로이드형성 세포에서의 증식을 유발하는 능력이다. Bv8의 추가의 이펙터 기능은 혈관형성을 유도하는 능력이다.
- [0052] "Bv8" 또는 "단리된 Bv8" 또는 Bv8의 "작동물질"과 연관되어 사용될 때 "생물학적 성질"은 (그의 천연 배좌에서 또는 변성 배좌에서) 천연 서열 Bv8에 의해 직접적 또는 간접적으로 유발되거나 실행된 이펙터 또는 항원성 기능 또는 활성을 갖는 것을 의미한다. 이펙터 기능은 내피 세포의 증식 및/또는 혈관형성의 유도를 증진시키는 것을 포함한다.
- [0053] "Bv8 수용체"는 Bv8이 결합하고 Bv8의 생물학적 성질을 매개하는 분자이다.
- [0054] 여기에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 이상 구체적으로 인간, 비-인간 (예, 마우스) 및 인체화 단클론성 항체 (전체 길이 단클론성 항체), 다클론성 항체, 다품이성 항체 (예, 2중 항체) 및 항체 단편을 포함한다.
- [0055] "항체"(Abs) 및 "면역글로블린"(Igs)은 동일한 구조적 특징을 가진 당단백질이다. 항체가 특이적 항원에 결합 특이성을 나타내는 반면, 면역글로블린은 항체 및 항원 특이성을 소실한 다른 항체형 분자를 둘다 포함한다. 후자의 종류의 폴리펩티드는 예를 들어 림프계에 의해 낮은 수준으로 그리고 골수종에 의해 증가된 수준으로 생성된다.
- [0056] "천연 항체" 및 "천연 면역글로블린"은 통상 약 150,000 달톤의 헤테로사량체 당단백질이고, 2개의 동일한 경(L) 사슬 및 2개의 동일한 중(H) 사슬로 구성된다. 각각의 경쇄는 하나의 공유 디설파이드 결합에 의해 중쇄에 연결되는 반면, 디설파이드 결합의 수는 상이한 면역글로블린 이소타입의 중쇄 중에서 변한다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 규칙적인 간격을 가진 사슬내 디설파이드 가교를 갖는다. 각각의 중쇄는 한쪽 말단에서 가변 도메인(V<sub>H</sub>)에 이어서 다수의 불변 도메인을 갖는다. 각각의 경쇄는 한쪽 말단(V<sub>L</sub>)에서 가변 도메인을 갖고 다른쪽 말단에서 불변 도메인을 가지며; 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 첫 번째 불변 도메인과 정렬되고; 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정한 아미노산 잔기는 경- 및 중-쇄 가변 도메인 사이에서 계면을 형성하는 것으로 생각된다.
- [0057] 용어 "가변"이란 가변 도메인의 특정부분이 항체 중의 서열에서 광범위하게 상이하다는 사실을 가리키고, 특정한 항원에 대해 각각의 특정한 항체의 결합 및 특이성에서 사용된다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인을 통해 고르게 분포되어 있지 않다. 이것은 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 양쪽에서 초가변성 영역이라 불리는 3개의 단편에 집중된다. 가변 도메인의 더욱 높게 보존된 부위는 외곽구조 영역(FR)이라 불리운다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 4개의 FR들 (각각 FR1, FR2, FR3 및 FR4)을 포함하고, 3개의 초가변 영역에 의해 연결된 β-시트 배열을 주로 채택하며, 이것은 연결 루프를 형성하고 일부 경우에 β-시트 구조의 일부를 형성한다. 각 사슬에서의 초가변 영역은 FRs에 의해 근접하여 함께 유지되고, 다른 사슬로부터의 초가변 영역과 함께

항체의 항원-결합 부위의 형성을 형성하는데 기여한다 (문헌 [Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 제5판, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), 647-669면] 참조). 불변 도메인은 항원에 항체를 결합시키는데 직접적으로 연관되는 것이 아니라, 항체-의존성 세포 독성에서 항체의 참여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.

[0058] 여기에서 사용된 용어 "초가변 영역"은 항원 결합의 원인이 되는 항체의 아미노산 잔기를 가리킨다. 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (다시말해서, 경쇄 가변 도메인에서의 잔기 24-34(L1), 50-56(L2) 및 89-97(L3) 및 중쇄 가변 도메인에서의 31-35(H1), 50-65(H2) 및 95-102(H3); Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 제5판, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) 및/또는 "초가변 루프"로부터의 잔기 (다시말해서, 경쇄 가변 도메인에서의 잔기 26-32(L1), 50-52(L2) 및 91-96(L3) 및 중쇄 가변 도메인에서의 26-32(H1), 53-55(H2) 및 96-101(H3); Chothia and Lesk, J.Mol.Biol. 196:901-917 (1987)). "외곽구조" 또는 "FR" 잔기는 여기에 정의된 초가변 영역 잔기와는 다른 가변 도메인 잔기이다.

[0059] 항체의 파괴인 소화는 각각 단일의 항원-결합 부위를 가진 "Fab" 단편이라 불리우는 2개의 동일한 항원-결합 단편 및 그 명칭이 쉽게 결정화되는 능력을 반영하는 것인 잔기 "Fc" 단편을 포함한다. 캡신 처리는 2개의 항원-조합 부위를 갖고 여전히 항원을 가교할 수 있는 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 생성한다.

[0060] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 -결합 부위를 함유하는 최소의 항체 단편이다. 이 영역은 단단하고 비-공유 결합으로 하나의 중쇄와 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 구성된다. 이러한 배열에서, 각각의 가변 도메인의 3개의 초가변 영역이 상호작용하여 V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> 이량체의 표면에서 항원-결합 부위를 한정한다. 일반적으로, 6개의 초가변 영역은 항체에 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 하나의 가변 도메인(또는 항원에 대해 특이적인 단지 3개의 초가변 영역을 포함하는 Fv의 반)이라도, 전체 결합 부위 보다 낮은 치환성이긴 하지만, 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0061] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 첫 번째 불변 도메인(CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 경첩 부로부터의 하나 이상의 시스테인(들)을 포함한 중쇄 CH1 도메인의 카르복실 말단에 몇 개의 잔기가 첨가되었다는 점에서 Fab 단편과는 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 자유 티올기를 갖는다는 점에서 Fab'에 대해 붙여진 명칭이다. F(ab')<sub>2</sub> 항체 단편은 본래 그 사이에 경첩 시스테인을 가진 한쌍의 Fab' 단편으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학 결합이 또한 공지되어 있다.

[0062] 척추동물 종으로부터의 항체(면역글로블린)의 "경쇄"는, 불변 도메인의 아미노산 서열을 기준으로 하여, 카파( $\kappa$ ) 및 람다( $\lambda$ )라 불리우는 2개의 분명하게 상이한 유형 중의 하나로 배정될 수 있다.

[0063] 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 의존하여, 면역글로블린이 상이한 부류로 배정될 수 있다. 5개의 주요 부류의 면역글로블린: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 이들의 일부는 하위부류(이소타입), 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2로 더욱 나뉘어질 수 있다. 면역글로블린의 상이한 부류에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  및  $\mu$  라 불리운다. 소단위 구조 및 상이한 부류의 면역글로블린의 3차원 배위가 공지되어 있다.

[0064] "항체 단편"은 전체-길이 항체의 일부, 일반적으로 그의 항원 결합 또는 가변 도메인을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fv 단편; 항체절편(diabody): 직쇄형 항체; 단쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다-특이성 항체를 포함한다.

[0065] 여기에서 사용된 용어 "단클론성 항체"는 실질적으로 동종 항체의 집단으로부터 수득된 항체, 다시말해서 소량으로 존재할 수도 있는 가능한 천연 발생 변이를 제외하고는 집단을 구성하는 각각의 항체가 동일한 항체를 가리킨다. 단클론성 항체는 고 특이성이고, 단일 항원 부위에 대항하여 지시된다. 또한, 상이한 결정인자(에피토프)에 대항하여 지시되는 상이한 항체를 포함하는 통상적인 (다클론성) 항체 제제와는 달리, 각각의 단클론성 항체는 항원 위에서 단일 결정인자에 대항하여 지시된다. 변형인자 "단클론성"은, 항체의 실질적으로 동종 집단으로부터 수득될 때의 항체의 특징을 나타내며, 특정한 방법에 의한 항체의 생성이 필요한 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 단클론성 항체는 문헌 [Kohler 등, Nature 256:495 (1975)]에 의해 처음으로 기재된 하이브리도마 방법에 의해 생성되거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어 미국 특허 4,816,567호 참조)에 의해 생성될 수 있다. "단클론성 항체"는 문헌 [Clackson 등, Nature 352:624-628(1991)] 및 [Marks 등, J.Mol.Biol. 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리

로부터 단리될 수 있다.

- [0066] 여기에서 단클론성 항체는 구체적으로, 이들이 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 이상, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 종으로부터 유래되거나 특정한 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 반면, 사슬(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래되거나 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체 내의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 (면역글로블린), 뿐만 아니라 이러한 항체의 단편을 포함한다 [미국 특허 4,816,567호; 및 Morrison 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 81:6851-6855 (1984)].
- [0067] 비-인간 (예를 들어, 마우스) 항체의 "인체화" 형태는 비-인간 면역글로블린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분, 인체화 항체는, 수용체의 초가변 영역 잔기가 원하는 특이성, 친화성 및 능력을 가진 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류와 같은 비-인간 종(공여체 항체)으로부터의 초가변 영역 잔기로 대체된 인간 면역글로블린(수용체 항체)이다. 일부 경우에, 인간 면역글로블린의 외곽구조 영역(FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인체화 항체는 수용체 항체 또는 공여체 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 이러한 변성은 항체 성능을 더욱 개량시킨다. 일반적으로, 인체화 항체는 실질적으로 적어도 하나, 전형적으로 2개의 가변 도메인의 전부를 포함할 수 있고, 여기에서 초가변 영역의 전부 또는 실질적으로 전부가 비-인간 면역글로블린의 영역에 상응하고, FRs의 전부 또는 실질적으로 전부가 인간 면역글로블린 서열의 것이다. 인체화 항체는 임의로 면역글로블린 불변 영역(Fc)의 적어도 일부, 전형적으로 인간 면역글로블린의 적어도 일부를 포함한다. 더욱 상세한 사항을 위해서는 문헌 [Jones 등, Nature 321: 522-525 (1986); Reichmann 등, Nature 332:323-329 (1988); 및 Presta, Curr.Op. Struct.Biol. 2:593-596 (1992)]를 참조한다.
- [0068] "단쇄 Fv" 또는 "sFv" 항체 단편은 항체의  $V_H$  및  $V_L$  도메인을 포함하고, 여기에서 이러한 도메인들은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 일반적으로, Fv 폴리펩티드는 항원 결합을 위해 sFv가 바람직한 구조를 형성할 수 있는  $V_H$  및  $V_L$  도메인 사이에서 폴리펩티드 링커를 더욱 포함한다. sFv의 검토투를 위하여 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol.113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, 269-315 (1994)] 참조.
- [0069] 용어 "항체절편"은 2개의 항원-결합 부위를 가진 작은 항체 단편을 가리키고, 이 단편들은 동일한 폴리펩티드 사슬( $V_H$ - $V_L$ )에서 경쇄 가변 도메인( $V_L$ )에 연결된 중쇄 가변 도메인( $V_H$ )을 포함한다. 동일한 사슬 위의 2개의 도메인 사이에서 쌍을 이루기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인이 다른 사슬의 상보성 도메인과 강제로 쌍을 이루고, 2개의 항원-결합 부위를 형성한다. 항체절편들은 예를 들어 문헌 EP 404,097; WO 93/11161; 및 [Hollinger 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90:6444-6448(1993)]에 더욱 충분히 기재되어 있다.
- [0070] 표현 "직쇄형 항체"는 본 출원 전체에서 사용될 때 문헌 [Zapata 등, Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)]에 기재된 항체를 가리킨다. 간략하게, 이러한 항체는 한쌍의 항원 결합 영역을 형성하는 한쌍의 탠덤 Fd 단편 ( $V_H$ - $C_H1$ - $V_H$ - $C_H1$ )을 포함한다. 직쇄형 항체는 이특이성 또는 일특이성일 수 있다.
- [0071] 용어 "에피토프"란 단백질 항원 위의 (단클론성 또는 다클론성) 항체를 위한 결합 부위를 가리킨다.
- [0072] "작동물질 항체"란 Bv8 작동물질이고 천연 서열 Bv8의 하나 이상의 생물학적 성질을 가진 항체를 의미한다.
- [0073] 용어 "Bv8 면역부착소"는 용어 "Bv8-면역글로블린 키메라"와 서로 바꾸어 사용되고, Bv8 분자 (천연 또는 변이체)의 적어도 일부를 면역글로블린 서열과 조합한 키메라 분자를 가리킨다. 면역글로블린 서열은 필수적인 것이 아니지만 바람직하게는 면역글로블린 불변 도메인이다. 면역부착소는 인간 항체의 중요한 화학적 및 생물학적 성질을 다수 가질 수 있다. 면역부착소가 적절한 인간 면역글로블린 경첩 및 불변 도메인(Fc) 서열에 연결된 바람직한 특이성을 가진 인간 단백질 서열로부터 구축될 수 있기 때문에, 전적으로 인간 성분을 사용하여, 원하는 결합 특이성을 달성할 수 있다. 이러한 면역부착소는 환자에게 최소로 면역원성이고, 만성 또는 반복 사용에도 안전하다.
- [0074] 치료적 용도를 위해 설명된 동종다합체 면역부착소의 예는 세포 표면 CD4에 대한 HIV의 결합을 차단하기 위한 CD4-IgG 면역부착소를 포함한다. 분만 직전의 임신 여성에게 CD4-IgG를 투여한 단계 I 임상 시험으로부터 얻어진 데이터는, 이러한 면역부착소가 HIV의 모체-태아 전달을 예방하는데 유용할 수 있다는 것을 제안한다 [Ashkenazi 등, Intern.Rev.Immunol. 10:219-227 (1993)]. 종양 괴사 인자(TNF)에 결합하는 면역부착소가 또한 발견되었다. TNF는 패혈증성 쇼크의 주요 매개인자로 밝혀진 전염증성 사이토카인이다. 패혈증성 쇼크의

마우스 모델을 근거로 하여, TNF 수용체 면역부착소가 패혈증성 쇼크를 치료하는데 임상적으로 사용하기 위한 후보로서의 징후를 나타내었다 [Ashkenazi A. 등 (1991) PNAS USA 88: 10535-10539]. IgG Fc에 융합된 TNF 수용체 서열을 포함한 면역부착소인 엔브렐(ENBREL)<sup>(R)</sup> (에타너셉트(etanercept))는 류머티스양 관절염의 치료를 위하여 1998년 11월 2일에 미국 식품 의약 안전청(FDA)에 의해 승인되었다. 류마티스양 관절염의 치료에서 엔브렐<sup>(R)</sup>의 새로운 확장된 용도는 2000년 6월 6일에 FDA에 의해 승인되었다. 엔브렐<sup>(R)</sup>을 포함하여 TNF 봉쇄제에 대한 최근의 정보를 위해서는 문헌 [Love11 등, N.Engl. J.Med. 342: 763-169(2000) 및 첨부된 사설 810-811면]; 및 문헌 [Weinblatt 등, N.Engl.J.Med. 341:253-259 (1999)]를 참조하고, 문헌 [Maini and Taylor, Annu.Rev.Med. 51:207-229 (2000)]에서 검토한다.

[0075] 면역부착소 구조의 2개의 팔이 상이한 특이성을 갖는다면, 이특이성 항체에 대한 유사성에 의하여 면역부착소를 "이특이성 면역부착소"라 명명한다. 문헌 [Dietsch 등, J.Immunol.Methods 162:123 (1993)]은 부착 분자, E-셀렉틴 및 P-셀렉틴의 세포외 도메인을 조합한 이특이성 면역부착소를 기재하고 있으며, 이러한 셀렉틴의 각각은 자연에서 상이한 세포 유형에서 발견된다. 결합 연구는, 이렇게 형성된 이특이성 면역글로블린 융합 단백질이 그것이 유래된 일특이성 면역부착소에 비하여 골수 세포주에 대해 향상된 결합능을 갖는다는 것을 나타내었다.

[0076] 용어 "이종부착소"는 "키메라 이종다합체 부착소"라는 표현과 서로 바꾸어 사용되고, 각각의 키메라 분자가 생물학적 활성 부위, 예컨대 각각의 이종다합체 수용체 단량체의 세포외 도메인을 다합화 도메인과 결합시키는 키메라 분자(아미노산 서열)의 복합체를 가리킨다. "다합화 도메인"은 이종다합체 복합체 내에서 키메라 분자의 안정한 상호작용을 촉진한다. 다합화 도메인은 면역글로블린 서열, 류신 지퍼, 소수성 영역, 친수성 영역 또는 자유 티올을 통해 상호작용하여 키메라 이종다합체의 키메라 분자 사이에서 분자간 디설파이드 결합을 형성할 수 있다. 다합화 도메인은 면역글로블린 불변 영역을 포함할 수도 있다. 또한, 입체 상호작용이 안정한 상호작용을 촉진할 뿐만 아니라 단량체 혼합물로부터 동종이합체에 비해 이종이합체의 형성을 촉진하도록, 다합화 영역을 기술적으로 처리할 수도 있다. 첫번째 폴리펩티드의 계면으로부터의 작은 아미노산 측쇄를 더욱 큰 크기의 측쇄(예, 티로신 또는 트립토판)으로 대체함으로써 "용기"가 만들어진다. 큰 아미노산 측쇄를 더욱 작은 크기의 것 (예, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써, 용기와 동일하거나 유사한 크기의 보상성 "공동"이 두번째 폴리펩티드의 계면 위에서 임의로 생성된다. 면역글로블린 서열은 필수적인 것은 아니지만 바람직하게는 면역글로블린 불변 도메인이다. 본 발명의 키메라에서 면역글로블린 잔기는 IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> 또는 IgG<sub>4</sub> 유형, IgA, IgE, IgD 또는 IgM으로부터 취득될 수 있지만, 바람직하게는 IgG<sub>1</sub> 또는 IgG<sub>3</sub>으로부터 취득된다.

[0077] 여기에서 사용된 "치료"란 유리하거나 바람직한 임상 결과를 얻기 위한 접근법이다. 본 발명의 목적을 위하여, 유리하거나 바람직한 임상 결과는, 증상의 경감, 질병 정도의 감소, 질병 상태의 안정화 (다시말해서, 악화가 아님), 질병 진행의 지연 또는 감속, 질병 상태의 호전 또는 완화, 및 검출가능하거나 또는 검출불가능한 경감 (부분 또는 전체)를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. "치료"는 또한 치료를 받지 않은 경우에 기대되는 생존에 비하여 장기간의 생존을 의미할 수 있다. "치료"는 질병의 발전을 방지하거나 또는 병변을 변화시키기 위한 의도로 수행되는 중재이다. 따라서, "치료"는 치료적 처리 및 예방 또는 방지 수단을 모두 가리킨다. 치료가 필요한 대상은, 이미 질환을 가진 것 뿐만 아니라 질환을 예방해야 하는 것을 포함한다. 구체적으로, 치료는 세포 변성 또는 손상의 병변, 예컨대 암 치료에서 종양 세포의 병변을 직접적으로 방지하거나, 감속시키거나 또는 감소시킬 수 있거나, 또는 세포를 다른 치료제에 의한 치료에 더욱 감수성으로 만들 수 있다.

[0078] "스테로이드생산"은, 세포 스토어로부터 미토콘드리아 외막으로의 콜레스테롤 이동 및 콜레스테롤의 프레그네놀론으로의 전환이 발생하는 내막으로 전위를 특징으로 하는 "스테로이드형성 세포"에서, 스테로이드 호르몬 생합성을 호르몬에 의해 유도하고 CAMP-매개에 의해 급성 조절하는 것을 가리킨다.

[0079] "스테로이드형성 조직"은 스테로이드생산 과정에 의해 스테로이드형성 호르몬을 생성하는 조직을 가리킨다. 그의 예는 부신 조직, 생식 기관, 장관 및 호흡관 조직을 포함한다.

[0080] "만성" 투여는, 장기간 동안 초기 치료 효과(활성)를 유지하기 위하여, 급성 방식과는 반대되는 연속 방식으로 약제(들)을 투여하는 것을 가리킨다. "간헐적" 투여는 중단 없이 연속적으로 수행하는 것이 아니라 주기적으로 수행하는 치료이다.

[0081] 치료 목적을 위한 "포유동물"은 인간, 기타 고등 영장류, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물, 예컨대 개, 고양이, 소, 말, 양, 돼지, 염소, 토끼 등과 같은 분류된 동물을 가리킨다. 바람직하게는, 포

유동물은 인간이다.

- [0082] 여기에서 사용된 "종양"은, 악성이든 양성이든지 모든 신생물성 세포 성장 및 증식과 모든 전-암성 및 암성 세포 및 조직을 가리킨다.
- [0083] 용어 "암" 및 "암성"은 조절되지 않는 세포 성장을 전형적으로 특징으로 하는 포유동물에서 생리학적 상태를 가리키거나 설명한다. 여기에서 특히 중요한 암의 예는 생식 기관의 암, 예를 들어 난소 암, 고환 암, 자궁 암, 경관 암; 전립선 암; 부신 피질의 암 (예를 들어, 부신 피질 암종) 및 부신 수질의 암을 포함한 부신의 암; 갑상선 암; 부갑상선 암; 췌장 암; 및 자궁내막 암종을 포함한다.
- [0084] 질병의 "병변"은 환자의 건강을 손상하는 모든 현상을 포함한다. 암에 있어서, 이것은 제한없이 비정상적 또는 조절불가능한 세포 증식, 전이, 이웃 세포의 정상 기능의 방해, 사이토카인 또는 기타 분비물의 비정상 수준의 방출, 염증성 또는 면역학적 반응의 억제 또는 악화 등을 포함한다.
- [0085] 하나 이상의 추가의 치료제와 "병용된" 투여는 임의의 순서로의 동시(공동) 및 연속 투여를 포함한다.
- [0086] 여기에서 사용된 "담체"는, 사용되는 투여량 및 농도에서 그것에 노출된 세포 또는 포유동물에 비독성인, 제약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 종종 생리학적으로 허용가능한 담체는 수성 pH 완충용액이다. 생리학적으로 허용가능한 담체의 예는 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산을 포함한 산화방지제; 저 분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로블린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함한 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트화 제; 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당 알콜; 소듐과 같은 염-형성 반대이온; 및 /또는 트윈(TWEEN)<sup>TM</sup>, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 플루로닉스(PLURONICS)<sup>TM</sup>와 같은 비이온성 계면활성제를 포함한다.
- [0087] "리포좀"은 포유동물에 약물 (예컨대 Bv8 폴리펩티드 또는 그에 대한 항체)를 전달하기 위해 유용한 다양한 유형의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 구성된 작은 소포이다. 리포좀의 성분들은 이층 형태로 보통 배열되고, 생물학적 막의 지질 배열과 유사하다.
- [0088] "소 분자"는 약 500 달톤 미만의 분자량을 갖는 것으로 정의된다.
- [0089] 용어 "혈관 내피 성장 인자", "VEGF", "VEGF 폴리펩티드" 및 "VEGF 단백질"은 여기에서 사용될 때 천연 서열 VEGF 및 VEGF 변이체를 포함한다 (본 명세서에 더욱 정의됨). VEGF 폴리펩티드는 각종 원천, 예컨대 인간 조직 유형 또는 다른 원천으로부터 단리될 수 있거나, 또는 재조합 및/또는 합성 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0090] "천연 서열 VEGF"는 자연에서 유래된 VEGF와 동일한 아미노산 서열을 가진 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 천연 서열 VEGF는 자연에서 단리될 수 있거나 재조합 및/또는 합성 수단에 의해 제조될 수 있다. 용어 "천연 서열 VEGF"는 구체적으로 자연-발생적인 끝이 절단되거나 분비된 형태 (예를 들어, 세포외 도메인 서열), 자연-발생적 변이체 형태 (예를 들어, 대안적인 스플라이스 형태) 및 VEGF의 자연-발생적 대립 변이체를 포함한다. 본 발명의 하나의 구현양태에서, 천연 서열 VEGF는 5개의 공지된 이소타입, 즉 각각 121개, 145개, 165개, 189개 및 206개 아미노산 잔기로 구성된 이소타입 중의 하나이고, 이들은 예를 들어 미국 특허 5,332,671호 및 5,240,848호; PCT 공개 번호 WO 98/10071호; 문헌[Leung 등, *Science* 246: 1306-1309 (1989)]; 및 문헌[Keck 등, *Science* 246: 1309-1312(1989)]에 기재되어 있다.
- [0091] "VEGF 변이체 폴리펩티드"는 천연 서열 VEGF의 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 바람직하게는 적어도 약 85%, 더욱 바람직하게는 적어도 약 90%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 약 95%, 가장 바람직하게는 적어도 약 98% 아미노산 서열 동일성을 가진 것으로 하기 정의된 활성 VEGF 폴리펩티드를 의미한다. 이러한 VEGF 변이체 폴리펩티드는 예를 들어 N- 및/또는 C-말단에서 뿐만 아니라 천연 서열의 하나 이상의 내부 도메인 내에서 하나 이상의 아미노산 잔기가 첨가되거나 결실된 VEGF 폴리펩티드를 포함한다.
- [0092] VEGF에 대한 서열 동일성 (아미노산 또는 핵산)은 Bv8에 관해 구체적으로 기재된 것과 동일한 접근법을 사용하여 결정된다. 유사하게, 항체에 한정되지는 않지만 이를 포함하여, Bv8의 작동물질 및 길항물질을 위해 제공된 정의를 VEGF 작동물질 및 길항물질에도 적용할 수 있다.
- [0093] **B. 발명을 수행하기 위한 방법**
- [0094] **1. Bv8 변이체의 동정**

- [0095] 여기에 기재된 전체-길이 천연 서열 Bv8 폴리펩티드 이외에도, Bv8 변이체를 동정하고 제조하고 본 발명에서 사용할 수 있는 것으로 생각된다. Bv8 DNA에 적절한 뉴클레오티드 변화를 도입하고/하거나 원하는 Bv8 폴리펩티드의 합성에 의해 Bv8 변이체를 제조할 수 있다. 당업자라면, 아미노산 변화가 Bv8의 후-번역 과정을 변화시킬 수 있고, 예컨대 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 바꿀 수 있다는 것을 이해할 것이다. Bv8 변이체의 제조 방법은 천연 서열 Bv8에 관해 이하 상세히 기재된 것과 동일하고, 유일한 차이점은 천연 서열 Bv8을 코드화하는 핵산을 Bv8 변이체를 코드화하는 핵산으로 치환하는 것이다.
- [0096] Bv8을 코드화하는 핵산 분자가 본 발명의 방법에서 사용된다. 인간 Bv8의 2개의 전체 길이 변이체를 코드화하는 cDNA들을 도 1 및 도 2(SEQ ID NO: 1 및 2)에 나타내고, 상응하는 추정 아미노산 서열을 도 2 및 4 (SEQ ID NO: 2 및 4)에 나타낸다. 마우스 Bv8을 코드화하는 cDNA를 도 5(SEQ ID NO:5)에 나타내고, 상응하는 추정 아미노산 서열을 도 6(SEQ ID NO:6)에 나타낸다. 본 발명에서 사용되는 폴리뉴클레오티드는 당 업자에게 공지된 표준 기술, 예를 들어 하이브리드화 선별 및 PCR 방법을 사용하여 수득될 수 있다.
- [0097] Bv8의 발현을 지시하는 재조합 분자를 생성하기 위하여, Bv8의 아미노산 서열을 코드화하는 뉴클레오티드 서열을 사용할 수 있다. 추가로, 본 발명의 방법은 Bv8 코드화 서열 및 이종 단백질에 대한 두번째 코드화 서열 사이에서 융합 폴리뉴클레오티드를 사용할 수 있다.
- [0098] 전체 Bv8 cDNA를 코드화하는 종으로부터 전체 길이 동종 cDNA 서열을 클론화하거나 또는 대립 변이체와 같은 가계 구성원 또는 변이체를 클론화하기 위하여, 여기에 개시된 cDNA 서열의 일부에 상응하는 단편으로부터 만들어진 표지화된 DNA 프로브를 사용하여, Bv8을 발현하는 것으로 생각되는 세포 또는 조직 유형으로부터 유래된 cDNA 라이브러리를 선별할 수 있다. 더욱 구체적으로, 코드화 서열의 5' 또는 3' 말단에 상응하는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 더욱 긴 뉴클레오티드 서열을 수득할 수 있다.
- [0099] 전체 길이 cDNA를 수득하기 위해 상이한 조직으로부터 다수의 cDNA 라이브러리를 선별하는 것이 필요할 수도 있다. cDNA 클론화에서 종종 겪게되는 상황인, 완전 5' 말단 코드화 영역을 코드화하는 cDNA 클론을 동정하는 것이 곤란한 경우에, RAGE (cDNA 말단의 빠른 증폭) 기술을 사용할 수도 있다. RAGE는 불완전 cDNA의 5'말단을 증폭시키기 위해 입증된 PCR-기초 전략이다. 특유의 고정(anchor) 서열을 함유하는 인간 태반으로부터 합성된 5'-RAGE-레디 RNA를 통상적으로 입수할 수 있다 (클론테크(Clonotech)). cDNA의 5' 말단을 수득하기 위하여, 제공된 고정 프라이머 및 3' 프라이머를 사용하여 5'-RAGE-레디 cDNA 상에서 PCR을 수행한다. 이어서, 제조업자의 지시에 따라서 고정된 프라이머 및 내포된 3' 프라이머를 사용하여 2차 PCR을 수행한다. 일단 수득된 후에, 전체 길이 cDNA 서열을 아미노산 서열로 번역할 수 있고, 번역 개시 및 종료 부위에 의해 인접된 연속 개방 판독 프레임, 잠재적인 신호 서열 및 마지막으로 여기에 개시된 Bv8 서열에 대한 전체 구조 유사성과 같은 특정한 표지물에 대해 시험할 수 있다.
- [0100] 대안적으로, 아래 기재된 적절한 엄격한 조건을 사용하여 주요 유기체로부터 유래된 게놈 라이브러리를 선별하기 위해, 표지된 프로브를 사용할 수도 있다.
- [0101] 여기에 개시된 Bv8 코드화 서열을 기준으로 하여 설계된 2개의 변성 올리고뉴클레오티드 프라이머 풀을 사용하여, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 Bv8 코드화 서열 또는 동종 서열의 단리를 수행할 수 있다. 반응을 위한 주형은, 예를 들어 Bv8 유전자 대립유전자를 발현하는 것으로 알려져 있거나 그렇게 추측되는 인간 또는 비인간 세포주 또는 조직으로부터 제조된 mRNA의 역전사(RT)에 의해 수득되는 cDNA일 수 있다.
- [0102] 증폭된 서열이 Bv8 코드화 서열의 서열을 나타내도록 하기 위하여, PCR 생성물을 서브클론화하고 서열결정할 수도 있다. 이어서, 다양한 방법에 의해 전체-길이 cDNA 클론을 단리하기 위하여 PCR 단편을 사용할 수도 있다. 예를 들어, 증폭된 단편을 표지화하고, 박테리오파지 cDNA 라이브러리를 선별하기 위해 사용할 수도 있다. 대안적으로, 게놈 라이브러리의 선별을 통해 게놈 클론을 단리하기 위하여, 표지화 단편을 사용할 수도 있다.
- [0103] 전체-길이 cDNA 서열을 단리하기 위하여 PCR 기술을 또한 사용할 수도 있다. 예를 들어, 표준 절차에 따라서 적절한 세포 또는 조직 원천으로부터 RNA를 단리할 수 있다. 첫번째 스트랜드 합성의 개시를 위해 증폭된 단편의 대부분의 5' 말단에 대해 특이적인 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 RNA 상에서 RT 반응을 수행할 수도 있다. 표준 말단 트랜스퍼라제 반응을 사용하여, 얻어지는 RNA/DNA 하이브리드에 구아닌으로 "꼬리를 달" 수도 있으며, 하이브리드를 RNA아제 H로 소화시킬 수도 있고, 이어서 두번째 스트랜드 합성을 폴리-C 프라이머로 개시시킬 수도 있다. 따라서, 증폭된 단편의 상류에 있는 cDNA 서열을 쉽게 단리할 수도 있다.
- [0104] Bv8 유전자의 돌연변이체 또는 대립 변이체의 cDNA 클론을 예를 들어 PCR을 사용하여 단리할 수도 있다. 이 경우에, 변이 Bv8 대립유전자를 추정적으로 보유하는 개체에서 Bv8을 발현하는 것으로 알려져 있거나 그렇게 추측

되는 조직으로부터 단리된 mRNA에 올리고-dT 올리고뉴클레오티드를 하이브리드형성하고, 역전사효소에 의해 새로운 스트랜드를 연장함으로써, 첫번째 cDNA 스트랜드를 합성할 수도 있다. 이어서, 정상 유전자의 5' 말단에 특이적으로 하이브리드화되는 올리고뉴클레오티드를 사용하여 cDNA의 두번째 스트랜드를 합성한다. 이러한 2개의 프라이머를 사용하여, PCR을 통해 생성물을 증폭시키고, 적절한 벡터로 클론화하고, 당업자에게 공지된 방법을 통해 DNA 서열 분석한다. 돌연변이체 Bv8 대립유전자의 DNA 서열을 정상 Bv8 대립유전자의 DNA 서열과 비교함으로써, 돌연변이체 Bv8 유전자 생성물의 기능 소실 또는 변경의 원인이 되는 돌연변이(들)를 확인할 수 있다.

[0105] 대안적으로, 돌연변이주 Bv8 대립유전자를 보유하는 것으로 추측되거나 그렇게 알려진 개체로부터 수득된 DNA를 사용하여 게놈 라이브러리를 구축할 수 있거나, 또는 돌연변이주 Bv8 대립유전자를 발현하는 것으로 알려지거나 추측되는 조직으로부터 RNA를 사용하여 cDNA 라이브러리를 구축할 수 있다. 이어서, 손상되지 않은 Bv8 유전자 또는 그의 적절한 단편을 표지화하고, 이러한 라이브러리에서 상응하는 돌연변이주 Bv8 대립유전자를 동정하기 위한 프로브로서 사용한다. 돌연변이주 Bv8 유전자 서열을 함유하는 클론을 정제하고, 당업자에게 공지된 방법에 따라 서열 분석할 수도 있다.

[0106] 추가로, 예를 들어 돌연변이주 대립유전자를 보유하는 것으로 추측되거나 알려진 개체에서, 돌연변이주 Bv8 대립유전자를 발현하는 것으로 알려지거나 추측되는 조직으로부터 단리된 RNA로부터 합성된 cDNA를 사용하여 발현 라이브러리를 구축할 수 있다. 이러한 방식으로, 이하 설명되는 바와 같이 정상 Bv8 유전자 생성물에 대항하여 증가되는 항체와 함께 표준 항체 선별 방법을 사용하여, 추정의 돌연변이주 조직에 의해 형성되는 유전자 생성물을 발현하거나 선별할 수도 있다.

[0107] 여기에서 사용된, 용어 핵산, 폴리뉴클레오티드 및 뉴클레오티드는 서로 바꾸어 사용될 수 있고, 데옥시리보뉴클레오티드로 구성되든지 리보뉴클레오티드로 구성되든지 간에, 그리고 포스포르디에스테르 결합으로 구성되든지 또는 포스포트리에스테르, 포스포르아미데이트, 실록산, 카르보네이트, 카르복시메틸에스테르, 아세트아미데이트, 카르바메이트, 티오에테르, 가교 포스포르아미데이트, 가교 메틸렌 포스포네이트, 가교 포스포르아미데이트, 가교 포스포르아미데이트, 가교 메틸렌 포스포네이트, 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포로디티오에이트, 가교 포스포로티오에이트 또는 술폰 결합 및 이러한 결합들의 조합과 같은 변이된 결합으로 구성되든지 간에, 임의의 핵산을 가리킨다.

[0108] 용어 핵산, 폴리뉴클레오티드 및 뉴클레오티드는 구체적으로 5개의 생물학적으로 발생된 염기 (아데닌, 구아닌, 티민, 시토신 및 우라실) 이외의 염기로 구성된 핵산을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 이에 한정되지는 않지만 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-요오도우라실, 하이포크산틴, 크산틴, 4-아세틸시토신, 5-(카르복시히드록실메틸)우라실, 5-카르복시메틸아미노메틸-2-티오우리딘, 5-카르복시메틸아미노메틸-우라실, 디히드로우라실, 베타-D-갈락토실쿠에오신, 이노신, N6-이소펜테닐아데닌, 1-메틸구아닌, 1-메틸이노신, 2,2-디메틸구아닌, 2-메틸아데닌, 2-메틸구아닌, 3-메틸시토신, 5-메틸시토신, N6-아데닌, 7-메틸구아닌, 5-메틸아미노메틸우라실, 5-메톡시아미노메틸-2-티오우라실, 베타-D-만노실쿠에오신, 5N-메톡시카르복시메틸우라실, 5-메톡시우라실, 2-메틸티오-N6-이소펜테닐아데닌, 우라실-5-옥시아세트산(v), 위부톡소신, 슈도우라실, 쿠에오신, 2-티오시토신, 5-메틸-2-티오우라실, 2-티오우라실, 4-티오우라실, 5-메틸우라실, 우라실-5-옥시아세트산 메틸에스테르, 우라실-5-옥시아세트산(v), 5-메틸-2-티오우라실, 3-(3-아미노-3-N-2-카르복시프로필)우라실, (acp3)w 및 2,6-디아미노푸린을 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 변성된 염기 잔기를 함유할 수 있다.

[0109] 더욱이, 본 발명에서 사용된 폴리뉴클레오티드는, 이에 한정되지는 않지만 아라비노스, 2-플루오로아라비노스, 자일롤로스 및 핵소스를 포함하는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 변성 당 잔기를 포함할 수도 있다.

[0110] 본 발명의 방법은 폴리뉴클레오티드의 원천에 의해 한정되는 것으로 생각되지 않는다. 폴리뉴클레오티드는 시험관내에서 합성되거나 화학 합성에 의해 합성되는 재조합 원천으로부터 유래된 인간 또는 비-인간 포유동물로부터의 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA일 수 있고, 이중-가닥, 단일-가닥 또는 부분 이중-가닥 형태로 존재할 수도 있다.

[0111] 본 발명에서 유용한 핵산은, 비제한적인 일례로서, 안티센스 DNA 및/또는 RNA와 같은 올리고뉴클레오티드; 리보자임; 유전자 요법을 위한 DNA; DNA 및/또는 RNA 키메라; 단일-가닥 DNA, 이중-가닥 DNA, 슈퍼코일 DNA 및/또는 삼중나선 DNA를 포함하는 DNA의 다양한 구조 형태; Z-DNA 등을 포함한다. 핵산을 다량으로 제조하기 위해 전형적으로 사용되는 통상적인 수단에 의해 핵산을 제조할 수도 있다. 예를 들어 DNA 및 RNA는 당 기술분야에 공지된 방법에 의해 통상적으로 입수가능한 시약 및 합성제를 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다 (예를 들어 문헌

[Gait, 1985, *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, 영국 옥스포드] 참조). RNA는 SP 65와 같은 플라스미드(미국 위스콘신주 매디슨의 프로메가 코퍼레이션)를 사용하여 시험관내 전사를 통해 고수율로 수득될 수 있다.

- [0112] 특히 mRNA 전구체의 대안적인 스플라이싱 또는 프로세싱으로부터 얻어지는 mRNA 전사체를 포함하여, Bv8 핵산 서열에 의해 코드화된 mRNA 전사체는, 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다.
- [0113] 일부 상황에서, 증가된 뉴클레아제 안정성이 요망된다면, 변성된 뉴클레오시드간 결합을 가진 핵산이 바람직할 수도 있다. 당 기술분야에 공지된 시약 및 방법을 사용하여, 변성된 뉴클레오시드간 결합을 함유하는 핵산을 합성할 수도 있다. 예를 들어, 포스포네이트 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포로아미데이트 메톡시에틸 포스포아미데이트, 포름아세탈, 티오포름아세탈, 디소프로필실릴, 아세트아미데이트, 카르바메이트, 디메틸렌-설파이드(-CH<sub>2</sub>-S-CH<sub>2</sub>), 디메틸렌-술폰(-CH<sub>2</sub>-SO-CH<sub>2</sub>), 디메틸렌-술폰(-CH<sub>2</sub>-SO-CH<sub>2</sub>), 2'-O-알킬, 및 2'-데옥시-2'-플루오로 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 결합을 함유하는 핵산의 합성 방법이 당 기술분야에 공지되어 있다 (문헌[Uhlmann 등, 1990, *Chem.Rev.* 90:543-584; Schneider 등, 1990, *Tetrahedron Lett.* 31:335] 및 그 곳에 인용된 참고문헌 참조).
- [0114] 본 발명의 일부 구현양태에서, 사용된 뉴클레오티드는 α-아노머 뉴클레오티드이다. α-아노머 뉴클레오티드는 상보적인 RNA와 특정한 이중-가닥 하이브리드를 형성하고, 이것은 보통의 β-단위와는 반대로 가닥들이 서로 평행하게 뻗어있다 [Gautier 등, 1987, *Nucl.Acids Res.* 15: 6625-6641]. 뉴클레오티드는 2N-0-메틸리보뉴클레오티드이거나 [Inoue 등, 1987, *Nucl.Acids Res.* 15:6131-6641] 또는 키메라 RNA-DNA 유사체이다 [Inoue 등, 1987, *FEBS Lett.* 215:327-330].
- [0115] 핵산은 당 기술분야에 공지된 적절한 수단에 의해 정제될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 역상 또는 이온 교환 HPLC, 크기 배제 크로마토그래피 또는 겔 전기영동에 의해 정제될 수 있다. 물론, 당업자라면, 정제 방법이 정제하고자 하는 DNA의 크기에 부분적으로 의존된다는 것을 이해할 것이다.
- [0116] Bv8 코드화 서열의 10개 이상의 뉴클레오티드(즉, 하이브리드가능한 부분) 또는 그의 보체를 가진 단리되거나 정제된 폴리뉴클레오티드가 본 발명의 방법에서 또한 사용될 수 있다. 다른 구현양태에서, 폴리뉴클레오티드는 Bv8 코드화 서열의 적어도 25개(연속) 뉴클레오티드, 50개 뉴클레오티드, 100개 뉴클레오티드, 150개 뉴클레오티드, 또는 200개 뉴클레오티드, 또는 전체-길이 Bv8 코드화 서열을 함유한다. 핵산은 단일 또는 이중 가닥일 수 있다. 추가로, 본 발명은 상기 코드화 서열의 보체에 선택적으로 하이브리드화되는 폴리뉴클레오티드에 관한 것이다. 바람직한 구현양태에서, 폴리뉴클레오티드는 Bv8 코드화 서열의 적어도 10개, 25개, 50개, 100개, 150개 또는 200개 뉴클레오티드 또는 전체 길이를 함유한다.
- [0117] Bv8의 변이주, Bv8의 펩티드 단편, Bv8의 끝이 절단된 형태, 및 Bv8 융합 단백질을 코드화하는 뉴클레오티드 서열이 본 발명의 방법에서 유용할 수도 있다. 융합 단백질을 코드화하는 뉴클레오티드는, 전체 길이 Bv8 서열, Bv8의 끝이 절단된 형태, 또는 관계없는 단백질 또는 펩티드에 융합된 도메인에 융합된 Bv8의 펩티드 단편을 코드화하는 뉴클레오티드, 예를 들어 혈류에서 융합 단백질(예, Bv8-Ig)의 안정성 및 반감기를 증가시키는 Ig Fc 도메인; 또는 마커로서 사용될 수 있는 형광 단백질 또는 발광 단백질과 같은 효소를 포함할 수 있지만 이에 한정되지 않는다.
- [0118] 또한, 미국 특허 5,605,793호 및 5,837,458호에 기재된, 일부 형태의 지시된 진화, 예를 들어 유전자 셔플링(shuffling) 및/또는 순환된 서열 재조합에 의해 적어도 부분적으로 발생된 Bv8 폴리뉴클레오티드 변이체가 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 기술을 사용하여, 변경된 기능적 및/또는 구조적 특징을 가진 기능적 및/또는 구조적으로 유사한 단백질을 코드화하는 신규 서열을 발생시키기 위한 출발 지점으로서, Bv8 코드화 서열 또는 다수의 Bv8 코드화 서열을 사용할 수 있다.
- [0119] 상기 기재된 Bv8 코드화 폴리뉴클레오티드 서열과 연관성 높은 유전자 상동체가 본 발명에서 유용할 수 있다. 연관성 높은 유전자 상동체는 도 2 또는 도 4(SEQ ID NO:2 및 4)의 성숙 인간 Bv8과 같은 천연 발생 Bv8의 아미노산 서열과 약 60% 이상, 바람직하게는 적어도 약 65%, 70%, 75%, 80%의 아미노산 서열 동일성을 가진 폴리뉴클레오티드 코드화 단백질이고, 바람직하게는 1% 증분으로 적어도 약 85%에서 적어도 약 99% 까지 아미노산 서열 동일성이 증가된다. 연관성이 높은 상동체들은 Bv8과 기능적 활성을 공유하는 단백질을 코드화할 수 있다.
- [0120] 본 발명의 방법은 (a) 상기 Bv8 코드화 서열 및/또는 그의 보체(즉, 안티센스)를 함유하는 DNA 벡터; (b) 코드화 서열의 발현을 지시하는 조절 요소와 작동적으로 결합된 Bv8 코드화 서열을 함유하는 DNA 발현 벡터; (c) 숙주 세포에서 코드화 서열의 발현을 지시하는 조절 요소와 작동적으로 결합된 Bv8 코드화 서열을 함유하는 유전

자 조작된 숙주 세포; 및 (d) 외인성으로 도입된 조절 요소의 제어하에서 내인성 Bv8 유전자를 발현하는 유전자 조작된 숙주 세포 (즉, 유전자 활성화)를 사용한다는 점에서 유리하다.

[0121] 천연 서열 Bv8 또는 여기에 기재된 Bv8의 다양한 도메인에서의 변이는 예를 들어 미국 특허 5,364,934호에 기재된 보존적 및 비-보존적 돌연변이를 위한 기술 및 지침을 사용하여 형성될 수 있다. 변이는 천연 서열 Bv8에 비하여 Bv8의 아미노산 서열의 변화를 가져오는 Bv8을 코드화하는 하나 이상의 코돈의 치환, 결실 또는 삽입일 수도 있다. 임의로, 하나 이상의 Bv8의 도메인에서 적어도 하나의 아미노산을 다른 아미노산으로 치환함으로써 변이가 이루어진다. 바람직한 활성화에 역효과를 미치지 않으면서 아미노산 잔기가 삽입되거나, 치환되거나 결실될 수 있는지를 결정하는 지침은, Bv8의 서열을 공지된 상동성 단백질 분자의 서열과 비교하고, 높은 상동성 영역에서 만들어진 아미노산 서열 변화의 수를 최소화함으로써 밝혀질 수 있다. 아미노산 치환은 하나의 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 성질을 가진 다른 아미노산으로 치환, 예컨대 류신을 세린으로 치환, 다시 말해서 보존적 아미노산 치환의 결과일 수 있다. 삽입 또는 결실은 임의로 약 1 내지 5개 아미노산의 범위일 수 있다. 허용된 변형은, 서열에서 아미노산의 삽입, 결실 또는 치환을 체계적으로 형성하고, 전체 길이 또는 성숙한 천연 서열에 의해 나타난 활성화에 대해 변이체를 시험함으로써 결정될 수 있다.

[0122] 본 발명의 방법에서 Bv8 폴리펩티드 단편이 유용하다. 이러한 단편은 N-말단 또는 C-말단에서 끝이 절단될 수 있거나, 또는 예를 들어 전체-길이 천연 단백질과 비교할 때 내부 잔류물을 소실할 수도 있다. 특정한 단편은 Bv8 폴리펩티드의 바람직한 생물학적 활성을 위해 필수적이 아닌 아미노산 잔기를 소실한다.

[0123] Bv8 단편은 다수의 통상적인 기술에 의해 제조될 수 있다. 바람직한 펩티드 단편은 화학적으로 합성될 수 있다. 대안적인 접근은, 효소적 소화, 예를 들어 특정한 아미노산 잔기에 의해 정의된 부위에서 단백질을 절단하는 것으로 공지된 효소로 단백질을 처리하거나, 또는 적절한 제한 효소로 DNA를 소화시키고 원하는 단편을 단리함으로써 Bv8 단편을 생성하는 것을 포함한다. 또 다른 적절한 기술은, 원하는 폴리펩티드 단편을 코드화하는 DNA 단편을 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의해 단리하고 증폭시키는 것을 포함한다. DNA 단편의 원하는 말단을 정의하는 올리고뉴클레오티드는 PCR에서 5' 및 5' 프라이머에서 사용된다. 바람직하게는, Bv8 폴리펩티드 단편은 천연 Bv8 폴리펩티드와 적어도 하나의 생물학적 및/또는 면역학적 활성을 공유한다.

[0124] 특정한 구현양태에서, 하기 표 1에서 바람직한 치환이라는 표제 하에 중요한 보존적 치환을 나타낸다. 이러한 치환이 생물학적 활성의 변화를 가져온다면, 표 1에서 치환기 예로 명명되거나 아미노산 부류를 참조하여 이하에서 더욱 설명된 바와 같이 더 많은 실질적 변화를 도입하고 생성물을 선별한다.

**표 1**

| 원래의 잔기  | 치환기 예                               | 바람직한 치환 |
|---------|-------------------------------------|---------|
| Ala(A)  | val; leu; ile                       | val     |
| Arg (R) | lys; gln; asn                       | lys     |
| Asn (N) | gln; his; lys; arg                  | gln     |
| Asp (D) | glu                                 | glu     |
| Cys (C) | ser                                 | ser     |
| Gln (Q) | asn                                 | asn     |
| Glu (E) | asp                                 | asp     |
| Gly (G) | pro; ala                            | ala     |
| His (H) | asn; gln; lys; arg                  | arg     |
| Ile (I) | leu; val; met; ala; phe; norleucine | leu     |
| Leu (L) | norleucine; ile; val; met; ala; phe | ile     |
| Lys (K) | arg; gln; asn                       | arg     |
| Met (M) | leu; phe; ile                       | leu     |
| Phe (F) | leu; val; ile; ala; tyr             | leu     |
| Pro (P) | ala                                 | ala     |
| Ser (S) | thr                                 | thr     |
| Thr (T) | ser                                 | ser     |
| Trp (W) | tyr; phe                            | tyr     |
| Tyr (Y) | trp; phe; thr; ser                  | phe     |
| Val (V) | ile; leu; met; phe; ala; norleucine | leu     |

[0125]

[0126] Bv8 폴리펩티드의 기능 또는 면역학적 동일성에서의 실질적인 변형은, (a) 치환 영역에서 예를 들어 시트 또는

나선형 배좌로서의 폴리펩티드 주쇄 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 하전 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피를 유지하는데 미치는 효과가 상당히 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다. 자연 발생적 잔기는 공통적인 측쇄 성질을 기준으로 하여 여러 군으로 나뉜다:

[0127] (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0128] (2) 중성 소수성: cys, ser, thr;

[0129] (3) 산성: asp, glu;

[0130] (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;

[0131] (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

[0132] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0133] 비-보존적 치환은 이러한 부류들 중의 하나의 구성원을 다른 부류의 것으로 바꾸는 것을 가져온다. 이러한 치환된 잔기는 보존적 치환 부위 내로, 또는 바람직하게는 나머지 (비-보존적) 부위내로 도입될 수 있다.

[0134] 올리고뉴클레오티드-매개 (부위-특이적) 돌연변이, 알라닌 스캐닝, 및 PCR 돌연변이유발과 같은 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 변이를 형성할 수 있다. 부위-특이적 돌연변이유발 [Carter 등, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller 등, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987), 카세트 돌연변이유발 (Wells 등, Gene, 34:315 (1985), 제한 선택 돌연변이유발 (Wells 등, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415(1986)] 또는 기타 공지된 기술이 클론화된 DNA 상에서 수행되어 Bv8 변이주 DNA를 생성할 수 있다.

[0135] 연속 서열을 따라 하나 이상의 아미노산을 동정하기 위하여, 스캐닝 아미노산 분석을 사용할 수 있다. 바람직한 스캐닝 아미노산은 비교적 작고 중성인 아미노산이다. 이러한 아미노산은 알라닌, 글리신, 세린 및 시스테인을 포함한다. 알라닌은 베타-탄소 너머의 측쇄를 제거하고 변이주의 주쇄 배좌를 덜 변경시키는 것으로 생각되기 때문에, 알라닌이 전형적으로 이러한 군 중에서 바람직한 스캐닝 아미노산이다 [Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]. 알라닌은 또한 가장 일반적인 아미노산이기 때문에 전형적으로 바람직하다. 또한, 이것은 매입되고 노출된 위치 양쪽 모두에서 종종 발견된다 [Creighton, The Proteins (W.H.Freeman & CO., N.Y.); Chothia, J.Mol.Biol., 150: 1(1976)]. 알라닌 치환이 적절한 양의 변이주를 생성할 수 없다면, 동소 아미노산을 사용할 수 있다.

[0136] 2. Bv8 및 Bv8 변이체의 생산

[0137] Bv8 및 Bv8 변이체의 생성을 위해 적절한 기술이 당 기술분야에 공지되어 있다. 바람직한 기술은 Bv8 및 Bv8 변이체를 위해 동일하기 때문에, 하기 기재된 기술이 Bv8 변이체 뿐만 아니라 천연 서열 Bv8에 적용된다.

[0138] 바람직한 제조 방법은 폴리펩티드의 내인성 원천, 펩티드 합성 (펩티드 합성체 사용) 및 재조합 기술 (또는 이러한 기술의 조합)으로부터 Bv8을 단리하는 것을 포함한다.

[0139] 이하 대부분의 언급은, Bv8 핵산을 함유한 벡터로 형질전환된 세포를 배양하고 세포 배양액으로부터 폴리펩티드를 회수하는 것에 의한, Bv8의 재조합 생성에 관한 것이다. 그러나, 당업자라면 Bv8을 생성하는 여러 방법이 존재한다는 것을 인식할 것이다.

[0140] 간략하게 이 방법은, Bv8 유전자의 증폭을 제공하기 위하여, Bv8-코드화 유전자를 함유한 일차 인간 세포를, 증폭가능한 유전자 (예컨대 디히드로폴레이트 환원효소 (DHFR) 또는 이하 언급된 다른 것들) 및 Bv8 유전자의 코드화 영역 좌에서 DNA 서열과 상동성인 적어도 약 150bp 길이의 적어도 하나의 플랭킹 영역을 포함한 구성체 (즉, 벡터)로 형질전환시키는 것을 포함한다. 증폭가능한 유전자는 Bv8 유전자의 발현을 방해하지 않는 부위에 존재해야 한다. 증폭가능한 영역을 한정하기 위하여 구성체가 일차 세포의 게놈내로 동종적으로 통합되도록 형질전환을 수행한다.

[0141] 증폭가능한 유전자 또는 구성체에 존재하는 기타 마커에 의하여 구성체를 포함하는 일차 세포를 선택한다. 마커 유전자의 존재는 숙주 게놈 내로 구성체의 존재 및 통합을 입증한다. 두 번째 숙주에서 선택이 이루어질 수 있기 때문에 일차 세포의 추가의 선택은 필요하지 않다. 원한다면, PCR을 사용하고, 얻어진 증폭된 DNA 서열을 서열화하거나 또는 정확한 동종 통합체로부터의 DNA가 존재할 때 PCR 단편의 적절한 길이를 결정하고, 이러한 단편을 함유하는 세포 만을 확장시킴으로써, 동종 재조합 사건의 발생을 결정할 수 있다. 원한다면, 표적 유전자의 다중 카피를 얻기 위해서는, 세포를 적절한 증폭화 제 (예컨대 증폭가능한 유전자가 DHFR이라면 메토티렉

사이트)를 사용하여 긴장시킴으로써, 선택된 세포를 이 지점에서 증폭시킬 수도 있다. 그러나, 이하 기재된 두 번째 변형 후에 까지 증폭 단계를 수행하지 않는 것이 바람직하다.

- [0142] 선택 단계 후에, 전체 증폭가능한 영역을 포함하기에 충분히 큰 크기의 게놈의 DNA 부분을 선택된 일차 세포로부터 단리한다. 이어서, 두 번째 포유동물 발현 숙주 세포를 게놈 DNA 부분으로 형질전환하고, 클론화하고, 증폭가능한 영역을 함유하는 클론을 선택한다. 이어서, 일차 세포에서 이미 증폭되지 않았다면, 증폭화계에 의해 증폭가능한 영역을 증폭시킨다. 마지막으로, 유전자를 발현하고 단백질을 생성하기 위하여, Bv8을 함유한 증폭가능한 영역의 다중 카피를 포함하는 이차 발현 숙주 세포를 생육시킨다.
- [0143] Bv8 mRNA를 소유하고 검출가능한 수준으로 그것을 발현하는 것으로 생각되는 조직으로부터 제조된 cRNA 라이브러리로부터, Bv8을 코드화하는 DNA를 획득할 수 있다. 따라서, 예를 들어 다수의 인간 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 Bv8 DNA가 편리하게 획득될 수 있다. 또한, 게놈 라이브러리로부터 또는 올리고뉴클레오티드 합성에 의해 Bv8-코드화 유전자를 획득할 수도 있다.
- [0144] 원하는 유전자 또는 그것에 의해 코드화되는 단백질을 동정하기 위해 고안된 프로브 (예컨대 Bv8 또는 약 20-80 염기의 올리고뉴클레오티드에 대한 항체)를 사용하여 라이브러리를 선별한다. 문헌 [Sambrook 등, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)의 10-12장에 기재된 표준 절차를 사용하여, cDNA 또는 게놈 라이브러리를 선택된 프로브로 선별할 수 있다. Bv8 코드화 유전자를 단리하기 위해 대안적인 수단은 상기 Sambrook 등의 문헌의 14절에 기재된 PCR 방법을 사용하는 것이다.
- [0145] Bv8 cDNA를 단리하는 바람직한 방법은, 각종 인간 조직으로부터 cDNA 라이브러리를 선별하기 위해 조심스럽게 선택된 올리고뉴클레오티드 서열을 사용하는 것이다. 프로브로서 선택된 올리고뉴클레오티드 서열은 충분한 길이 이를 가져야 하고, 잘못된 포지티브를 최소화하기 위해 충분히 명확해야 한다. 바람직한 서열은 여기에 개시된 자연 발생적 Bv8로부터 획득된다.
- [0146] 선별되는 라이브러리 내의 DNA에 대한 하이브리드형성 시에 올리고뉴클레오티드가 검출될 수 있도록 올리고뉴클레오티드를 표지화하여야 한다. 바람직한 표지화 방법은 당업자에게 알려진 바와 같이 올리고뉴클레오티드를 방사능표지하기 위하여 폴리뉴클레오티드 키나아제와 함께 <sup>32</sup>P-표지화 ATP를 사용하는 것이다. 그러나, 이에 한정되지는 않지만 바이오틴화 또는 효소 표지화를 포함하여, 올리고뉴클레오티드를 표지화하기 위한 다른 방법이 사용될 수도 있다.
- [0147] Bv8을 코드화하는 핵산(예, cDNA 또는 게놈 DNA)를 추가의 클론화 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능한 벡터내에 삽입한다. 많은 벡터들이 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 이에 한정되지는 않지만 신호 서열, 복제 개시점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 인자, 프로모터 및 전사 종료 서열의 하나 이상을 포함한다.
- [0148] 본 발명의 Bv8은 직접적으로 뿐만 아니라 이중 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 생성될 수 있으며, 이것은 바람직하게는 신호 서열이거나 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에서 특정한 절단 부위를 가진 다른 폴리펩티드이다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내로 삽입된 Bv8 DNA의 일부일 수도 있다. 바람직하게 선택된 이중 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 처리 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단)되는 것이다. 천연 Bv8 신호 서열을 인식하고 처리하지 못하는 원핵 숙주 세포에 있어서, 신호 서열이 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, lpp, 및 열 안정성 엔테로톡신 II 리더로 구성된 군에서 선택되는 원핵 신호 서열로 치환한다. 효모 분비를 위하여, 천연 신호 서열을 예를 들어 효모 인버타아제 리더, α-인자 리더 (사카로마이세스(Saccharomyces) 및 클루이베로마이세스(Kluyveromyces) α-인자 리더, (후자는 1991년 4월 23일 특허취득된 미국 특허 5,010,182호에 기재됨) 또는 산 포스파타제 리더, 시.알비칸스(C.albicans) 글루코아밀라제 리더 (1990년 4월 4일 공고된 EP 362,179) 또는 WO 90/13646호 (1990년 11월 15일 공개)에 기재된 신호로 치환할 수도 있다. 포유동물 세포 발현에서, 다른 동물 Bv8 폴리펩티드로부터의 신호 서열, 및 동일하거나 관련된 종의 분비된 폴리펩티드로부터의 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스성 분비 리더, 예를 들어 단순 헤르페스 gD 신호와 같은 기타 포유동물 신호 서열이 적절할 수도 있긴 하지만, 천연 신호 서열 (예, 생체내에서 인간 세포로부터 Bv8의 분비를 정상적으로 지시하는 Bv8 예비서열)이 만족스럽다.
- [0149] 이러한 전구체 영역을 위한 DNA를 판독 프레임에서 성숙한 Bv8 또는 그의 가용성 변이체를 코드화하는 DNA에 결합시킨다.
- [0150] 발현 및 클론화 벡터는 양쪽 모두 하나 이상의 선택된 숙주 세포에서 벡터를 복제시킬 수 있는 핵산 서열을 함유한다. 일반적으로, 클론화 벡터에서, 이 서열은 숙주 염색체 DNA와는 독립적으로 벡터를 복제시킬 수 있는

것이며, 복제 개시점 또는 자기 복제 서열을 포함한다. 이러한 서열은 다양한 세균, 효모 및 바이러스에 대해 알려져 있다. 대부분의 그람-음성 세균을 위해서는 플라스미드 pBR322로부터의 복제 개시점이 적절하고, 효모를 위해서는 2 플라스미드 개시점이 적절하고, 포유동물 세포에서의 벡터를 클론화하기 위해서는 다양한 바이러스성 개시점(SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)가 유용하다. 일반적으로, 포유동물 발현 벡터를 위해서는 복제 성분의 개시점이 필요하지 않다 (SV40 개시점은 미리 프로모터를 함유하기 때문에 SV40 개시점만이 전형적으로 사용될 수 있다).

[0151] 대부분의 발현 벡터는 "서플" 벡터이고, 다시말해서 적어도 하나의 유기체 부류에서 복제할 수 있지만 발현을 위해 다른 유기체 내로 이입될 수 있다. 예를 들어, 벡터를 이.콜리에 클론화한 다음, 비록 숙주 세포 염색체와는 독립적으로 복제할 수 없다 하더라도, 발현을 위한 효모 또는 포유동물 세포 내로 동일한 벡터를 이입시킨다.

[0152] DNA를 숙주 게놈 내로의 삽입에 의해 증폭시킬 수 있다. 이것은 바실러스 종을 숙주로서 사용하여 쉽게 달성되며, 예를 들어 바실러스 게놈 DNA에서 발견되는 서열에 상보적인 DNA 서열을 벡터에 포함시킴으로써 달성된다. 이러한 벡터를 바실러스에 이입하면, 게놈과의 동종 재조합이 일어나고 Bv8 DNA가 삽입된다. 그러나, Bv8 DNA를 잘라내는데 제한 효소 소화가 요구되기 때문에, Bv8 코드화 게놈 DNA의 회수가 외인성 복제 벡터의 회수보다 더 복잡하다.

[0153] 발현 및 클론화 벡터는 선택가능한 마커라 명명되는 선택 유전자를 함유해야 한다. 이러한 유전자는 선택적 배양 배지에서 성장된 형질전환 숙주 세포의 생존 또는 생육을 위해 필요한 단백질을 코드화한다. 선택 유전자를 함유하는 벡터로 형질전환되지 않은 숙주 세포는 배양 배지에서 생존할 수 없게 된다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생물질 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토티렉세이트 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보충하거나, (c) 복합 배지로부터 이용될 수 없는 중요한 영양소, 예를 들어 바실리를 위한 D-알라닌 라세아제를 코드화하는 유전자를 공급하는 단백질을 코드화한다.

[0154] 선택 계획의 한가지 예는 숙주 세포의 생육을 방해하는 약물을 이용하는 것이다. 이종 유전자로 성공적으로 형질전환된 세포는 약물내성을 부여하는 단백질을 생성하고 따라서 선택 섭생법을 견딘다. 이러한 우성 선택의 예는 약물 네오마이신, 마이코페놀산 및 히그로마이신을 사용한다.

[0155] 포유동물 세포를 위해 적절한 선택가능한 마커의 다른 예는, Bv8 핵산을 수용하기에 적극적인 세포를 동정할 수 있는 것, 예컨대 DHFR 또는 티미딘 키나아제이다. 마커를 수용함으로써 형질전환체가 유일하게 생존하기에 적합하게 되도록, 포유동물 세포 형질전환체를 선택 압력하에 놓는다. 배지 중의 선택 시약의 농도가 연속적으로 변화하는 조건하에서 형질전환체를 배양함으로써 선택 압력이 부과되고, 이에 의해 선택 유전자 및 Bv8 코드화 DNA가 둘다 증폭된다. 증폭이란, 생육을 위해 중요한 단백질을 생성하기 위해 상당히 요구되는 유전자가 재조합 세포의 연속 세대의 염색체 내에서 앞뒤로 되풀이되는 과정이다. 증폭된 DNA로부터 증가된 양의 Bv8이 합성된다. 증폭가능한 유전자의 다른 예는 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영양류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등을 포함한다. 바람직한 벡터 체계는 미국 특허 5,561,053호에 제공된다.

[0156] 예를 들어, DHFR의 경쟁적 길항물질인 메토티렉세이트(Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 모든 형질전환체를 배양함으로써 DHFR 선택 유전자로 형질전환된 세포를 동정한다. 야생형 DHFR이 사용될 때 적절한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결여된 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포주이고, 문헌 [Urlaub 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980)]에 기재된 것과 같이 제조되고 증식된다. 이어서, 형질전환된 세포를 증가된 수준의 메토티렉세이트에 노출시킨다. 이에 의해 DHFR 유전자의 다중 카피가 합성되고, 동시에 Bv8을 코드화하는 DNA와 같은 발현 벡터를 포함하는 다른 DNA의 다중 카피가 합성된다. 이러한 증폭 기술은, Mtx에 대해 내성이 높은 변이 DHFR 유전자가 사용된다면 내인성 DHFR의 존재에도 불구하고, 임의의 다른 적절한 숙주, 예를 들어 ATCC No. CCL61 CHO-K1과 함께 사용될 수 있다 (EP 117,060).

[0157] 대안적으로, 아미노글리코시드계 항생물질, 예를 들어 카나마이신, 네오마이신 또는 G418과 같은 선택가능한 마커에 대한 선택 시약을 함유하는 배지 중에서 세포를 생육시킴으로써, Bv8, 야생형 DHFR 단백질, 및 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)와 같은 다른 선택가능한 마커를 코드화하는 DNA 서열로 형질전환되거나 공동-형질전환된 숙주 세포 (특히, 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)를 선택할 수 있다. 미국 특허 4,965,199호 참조.

[0158] 효모에서 사용하기 위해 적절한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 trp1 유전자이다 [Stinchcomb

등, Nature, 282:39 (1979)]. trp1 유전자는 트립토판에서 생육하는 능력이 소실된 효모의 변이주, 예를 들어 ATCC No. 44076 또는 PEP 4-1에 대한 선택 마커를 제공한다. [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]. 효모 숙주 세포 계몽에서 trp1 병변의 존재는, 트립토판의 부재하에서 생육시키는 것에 의해 형질전환을 검출하기 위한 유효한 환경을 제공한다. 유사하게, Leu2 유전자를 포함한 공지된 플라스미드에 의해 Leu2-결여 효모 균주 (ATCC 20,622 또는 38,626)가 보충된다.

[0159] 또한, 클루이베로마이세스 효모의 형질전환을 위하여 1.6 $\mu$ m 원형 플라스미드 kPD1 으로부터 유래된 벡터가 사용될 수 있다. [Bianchi 등, Curr.Genet., 12:185 (1987)]. 더욱 최근들어, 재조합 송아지 키모신의 대규모 생산을 위한 발현 체계가 문헌 [K.lactis, Van den Berg, Bio/Technology, 8:135(1990)]에 보고되어 있다. 클루이베로마이세스의 산업적 균주에 의해 성숙한 재조합 인간 혈청 알부민의 분비를 위해 안정한 다-카피 발현 벡터가 문헌 [Fleer 등, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)]에 개시되어 있다.

[0160] 발현 및 클론화 벡터는 보통 숙주 유기체에 의해 인식되고 Bv8 핵산에 작동적으로 결합되는 프로모터를 함유한다. 프로모터는, 이들이 작동적으로 결합된 특정한 핵산 서열, 예컨대 Bv8 핵산 서열의 전사 및 번역을 제어하는 구조 유전자(일반적으로 약 100 내지 1000 bp)의 출발 코돈에 대해 상류(5')에 위치한 비번역된 서열이다. 이러한 프로모터는 전형적으로 2개의 부류, 즉 유도 프로모터 및 구조 프로모터에 속한다. 유도 프로모터는, 배양 조건에서의 일부 변화, 예를 들어 영양소 또는 온도 변화의 존재 또는 부재에 대한 반응에서, 그들의 제어 하에 DNA로부터 증가된 수준의 전사를 개시시키는 프로모터이다. 이 때, 각종 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식되는 다수의 프로모터가 알려져 있다. 제한 효소 소화에 의해 원천 DNA로부터 프로모터를 제거하고, 단리된 프로모터 서열을 벡터 내에 삽입함으로써 프로모터들을 Bv8-코드화 DNA에 작동적으로 결합시킨다. Bv8 DNA의 증폭화 및/또는 발현을 지시하기 위하여, 천연 Bv8 프로모터 서열 및 다수의 이중 프로모터를 둘다 사용할 수 있다. 그러나, 이중 프로모터가 일반적으로 천연 Bv8 프로모터에 비해 높은 전사 및 높은 수율의 Bv8을 생성할 수 있기 때문에, 이것이 바람직하다.

[0161] 원핵 숙주와 함께 사용하기에 적절한 프로모터는  $\beta$ -락타마제 및 락토스 프로모터 체계(Chang 등, Nature, 275:615 (1978); Goeddel 등, Nature, 281: 544 (1979)), 알칼리성 포스파타제, 트립토판(trp) 프로모터 체계(Goeddel, Nucleic Acids Res. 8:4057 (1980); EP 36,776), 및 tac 프로모터와 같은 하이브리드 프로모터를 포함한다. [deBoer 등, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. 그러나, 다른 공지된 세균 프로모터가 적절하다. 그들의 뉴클레오티드 서열이 공지되어 있으며, 이에 의해 당업자라면 필요한 제한 부위를 공급하기 위한 링커 또는 어댑터를 사용하여 Bv8 코드화 DNA에 이것을 작동적으로 결합시킬 수 있다. 세균 체계에서 사용하기 위한 프로모터는 Bv8 코드화 DNA에 작동적으로 결합된 샤인-델가르노(Shine-Delgarno)(S.D.) 서열을 함유할 것이다.

[0162] 프로모터 서열이 진핵세포를 위해 알려져 있다. 사실상 모든 진핵 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 상류 쪽으로 약 25 내지 30 염기에 위치한 AT-풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사 개시로부터 상류쪽으로 70 내지 80 염기에서 발견된 다른 서열은 CXCAAT 영역이고, 여기에서 X는 임의의 뉴클레오티드일 수 있다. 대부분의 진핵 유전자의 3' 말단에서, 코드화 서열의 3' 말단에 폴리-A 꼬리를 첨가하기 위한 신호일 수도 있는 AATAAA 서열이 존재한다. 이러한 모든 서열들이 진핵 발현 벡터에 적절하게 삽입된다.

[0163] 효모 숙주와 함께 사용하기 위해 적절한 촉진 서열의 예는, 3-포스포글리세레이트 키나아제 (Hitzeman 등, J.Biol.Chem., 255:2073 (1980) 또는 다른 해당 효소 [Hess 등, J.Adv.Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], 예컨대 엔돌라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소, 헥소키나아제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프럭토키나아제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타아제, 피루베이트 키나아제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제, 및 글루코키나아제를 포함한다.

[0164] 추가로 생육 조건에 의해 조절되는 전사의 장점을 가진 유도성 프로모터인, 다른 효소 프로모터는 알콜 탈수소 효소 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사와 연관된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈수소효소, 및 말토스와 갈락토스 이용을 위해 사용되는 효소를 위한 프로모터 영역이다. 효모 발현에서 사용하기 위해 적절한 벡터 및 프로모터는 EP 73,657호에 더욱 기재되어 있다. 효모 인헨서는 또한 효모 프로모터와 함께 유리하게 사용된다.

[0165] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 Bv9 전사는, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스(1989년 7월 5일 발행된 UK 2,211,504), 아데노바이러스 (예컨대 아데노바이러스 2), 소 파필로마 바이러스, 닭 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 가장 바람직하게는 시미안(Simian) 바이러스

40(SV40)와 같은 바이러스의 게놈으로부터, 이중 포유류 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 면역글로블린 프로모터로부터, 열-쇼크 프로모터로부터, 그리고 Bv8 서열과 보통 연관된 프로모터로부터 수득되는 프로모터에 의해 제어되며, 단 이러한 프로모터들은 숙주 세포 체계와 친화성을 갖는다.

- [0166] SV40 바이러스의 전기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스 복제 개시점을 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 문헌 [Fiers 등, Nature, 273:113 (1978); Mulligan 등, Science, 209: 1422-1427 (1980); Pavlakis 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 78:7398-7402 (1981)]. 인간 사이토메갈로바이러스의 즉시형 초기 프로모터는 HindIII E 제한 단편으로서 편리하게 수득된다. 문헌 [Greenaway 등, Gene, 18:355-360 (1982)]. 벡터로서 소 파필로마 바이러스를 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현하기 위한 체계가 미국 특허 4,419,446호에 개시되어 있다. 이러한 체계의 변형이 미국 특허 4,601,978호에 기재되어 있다. 원숭이 세포에서 면역 인터페론을 코드화하는 cDNA를 발현하는 것에 관해서 문헌 [Gray 등, Nature, 295:503-508 (1982)]; 단순 헤르페스 바이러스로부터의 티미딘 키나아제 프로모터의 제어하에서 마우스 세포에서 인간  $\beta$ -인터페론 cDNA를 발현하는 것에 관해서는 문헌 [Reyes 등, Nature, 297:598-601 (1982)]; 배양된 마우스 및 토끼 세포에서 인간 인터페론  $\beta$  1 유전자의 발현에 관해서는 문헌 [Canaani 등, Proc.Natl.Acad. Sci.USA, 79: 5166-5170 (1982)]; 그리고, 프로모터로서 로우스 육종 바이러스 긴 말단 반복을 사용하여, CV-1 원숭이 신장 세포, 계배 피브로블라스트, 차이나이즈 햄스터 난소 세포, HeLa 세포, 및 마우스 NIH-3T3 세포에서 세균 CAT 서열의 발현에 관해서는 문헌 [Gorman 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 79:6777-6781 (1982)]를 참조한다.
- [0167] 고등 진핵세포에 의한 Bv8 코드화 DNA의 전사는 인헨서 서열을 벡터 내에 삽입함으로써 증가된다. 인헨서는 통상 약 10 내지 300bp를 가진 DNA의 시스-작용 인자이며, 전사를 증가시키기 위해 프로모터 상에 작용한다. 인헨서는 비교적 배향 및 위치 독립적이고, 전사 단위에 대해 5' 말단 (Laimins 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 78:993 (1981)) 및 3' 말단 (Lusky 등, Mol.Cell Bio., 3:1108 (1983))에서, 인트론 내에서 (Banerji 등, Cell. 33:729 (1983)), 뿐만 아니라 그의 코드화 서열 내에서 (Osborne 등, Mol.Cell Bio, 4:1293 (1984))에서 발견된다. 많은 인헨서 서열들이 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민,  $\alpha$ -페도탄백질 및 인슐린)으로부터 알려져 있다. 그러나, 전형적으로, 진핵 세포 바이러스로부터의 인헨서를 사용한다. 그의 예는 복제 개시점의 후기 측 (bp 100-270) 위에 있는 SV40 인헨서, 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 개시점의 후기 측 위에 있는 폴리오마 인헨서, 및 아데노바이러스 인헨서를 포함한다. 또한, 진핵 프로모터의 활성화를 위한 인자를 증진시키는 것에 관해서는 문헌 [Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982)]를 참조한다. 인헨서를 Bv8-코드화 서열에 대해 5' 또는 3' 위치에서 벡터 내로 스플라이스할 수도 있으나, 바람직하게는 프로모터로부터 5' 부위에 위치한다.
- [0168] 진핵 숙주 세포에서 사용된 발현 벡터 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 기타 다세포 유기체로부터의 핵 형성 세포)는 mRNA를 안정화하고 전사를 종료하기 위해 필요한 서열을 함유한다. 이러한 서열은 진핵 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 비번역 영역인 5' 및 때때로 3'로부터 보통 입수될 수 있다. 이러한 영역은 Bv8을 코드화하는 mRNA의 비번역 부위에 있는 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오티드 단편을 함유한다.
- [0169] 하나 이상의 상기-기재된 성분을 함유하는 적절한 벡터의 구축은 표준 결찰 기술을 사용한다. 단리된 플라스미드 또는 DNA 단편을, 필요한 플라스미드를 생성하기 위해 요구되는 형태로, 절단하고 적층시키고 재-결찰시킨다.
- [0170] 구축된 플라스미드에서 정확한 서열을 확인하기 위한 분석에서, 결찰 혼합물을 사용하여 이.콜리 K12 균주 294 (ATCC 31,446)를 형질전환시키고, 적절한 경우 암피실린 또는 테트라사이클린 내성에 의해 성공적인 형질전환체를 선택한다. 형질전환체로부터의 플라스미드를 제조하고, 제한 엔도뉴클레아제 소화에 의해 분석하고, 및/또는 문헌 [Messing 등, Nucleic Acids Res., 9:309 (1981)]의 방법 또는 문헌 [Maxam 등, Methods in Enzymology, 65:499 (1980)]의 방법에 의해 서열화한다.
- [0171] Bv8 및 Bv8 변이체의 제조에서 특히 유용한 것은, Bv8 코드화 DNA의 포유동물 세포에서 일시적인 발현을 제공하는 발현 벡터이다. 일반적으로, 일시적 발현은 숙주 세포에서 효율적으로 복제할 수 있는 발현 벡터를 사용하는 것과 관련되고, 그 결과 숙주 세포가 다수의 발현 벡터 카피를 축적하고 다시말해서 발현 벡터에 의해 코드화된 바람직한 폴리펩티드를 다량 합성한다. 문헌 [Sambrook 등, 상동, pp. 16.17-16.22]. 적절한 발현 벡터 및 숙주 세포를 포함한 일시적 발현 체계는, 클론화 DNA에 의해 코드화된 폴리펩티드의 포지티브 동정화를 편리하게 할 뿐만 아니라 바람직한 생물학적 또는 생리학적 성질에 대해 이러한 폴리펩티드를 신속하게 선별할 수 있도록 한다. 따라서, 생물학적 활성 Bv8인 Bv8의 유사체 및 변이체를 동정하기 위한 목적에서, 일시적 발현 시스템이 본 발명에서 특히 유용하다.

- [0172] 재조합 척추동물 세포 배양액에서 Bv8의 합성에 적응하기 위해 적절한 다른 방법, 벡터 및 숙주 세포가 문헌 [Gething 등, Nature, 293:620-625 (1981)]; 문헌 [Mantei 등, Nature, 281:40-46 (1979)]; EP 117,060호 및 EP 117,058호에 기재되어 있다. Bv8의 포유동물 세포 배양액 발현을 위해 특히 유용한 플라스미드는 pRK5 (EP 307,247) 또는 pSV16B이다. WO 91/08291 (1991년 6월 13일 공개).
- [0173] 벡터에서 DNA를 클론화하거나 발현하기 위해 적절한 숙주 세포는 원핵세포, 효모 또는 고등 진핵세포이다. 이러한 목적을 위해 적절한 원핵세포는 진정세균, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아시에(Enterobacteriaceae), 예컨대 에스케리키아(Escherichia), 예를 들어 이.콜리(E.coli), 엔테로박터(Enterobacter), 에르위니아(Erwinia), 클렙시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 살모넬라(Salmonella), 예를 들어 살모넬라 티피무리움(Salmonella typhimurium), 세라티아(Serratia), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(Serratia marcescans), 및 시겔라(Shigella), 뿐만 아니라 바실러스(Bacillus), 예컨대 비.섭틸리스(B.subtilis) 및 비.리케니포르미스(B.licheniformis) (예를 들어 1989년 4월 12일 발행된 DD 266,710호에 개시된 비.리케니포르미스 41P), 슈도모나스(Pseudomonas), 예컨대 P.애루기노사(P.aeruginosa), 및 스트렙토마이세스(Streptomyces)를 포함한다. 이.콜리 B, 이.콜리 X1776 (ATCC 31,537) 및 이.콜리 W3110 (ATCC 27,325)와 같은 다른 균주가 적절하긴 하지만, 한가지 바람직한 이.콜리 클론화 숙주는 이.콜리 294 (ATCC 31,446)이다. 이러한 예는 제한적인 것이 아니라 예증을 위한 것이다. 균주 W3110은 재조합 DNA 생성물 발효를 위한 일반적인 숙주 균주이기 때문에, 특히 바람직한 숙주 또는 모 숙주이다. 바람직하게는, 숙주 세포는 최소량의 원핵 효소를 분비해야 한다. 예를 들어, 균주 W3110은 단백질 코드화 유전자에서 유전적 돌연변이를 일으키도록 변형될 수도 있고, 이러한 숙주의 예는 이.콜리 W3110 균주 27C7을 포함한다. 27C7의 완전한 유전자형은 tonAΔ ptr3 phoAΔE15 Δ(argF-lac) 169 ompTΔ degP41kan<sup>r</sup>이다. 균주 27C7은 1991년 10월 30일에 아메리칸 타입 컬처 콜렉션에 ATCC No.55,244로 기탁되었다. 대안적으로, 미국 특허 4,946,783호 (1990년 8월 7일 특허취득)에 개시된 변이주 주변세포질 프로테아제를 가진 이.콜리의 균주를 사용할 수도 있다.
- [0174] 원핵세포에 추가로, 사상균 또는 효모와 같은 진핵세포 미생물이 Bv8-코드화 벡터를 위해 적절한 클론화 또는 발현 숙주이다. 하등 진핵 숙주 미생물 중에서, 사카로마이세스 세레비지에 또는 일반적인 빵 효모가 가장 일반적으로 사용된다. 그러나, 다수의 다른 속, 종 및 균주, 예컨대 쉬조사카로마이세스 폼브(Schizosaccharomyces pombe) (Beach 등, Nature, 290:140 (1981); EP 139,383, 1985년 5월 2일 공고); 클루이베로마이세스(Kluyveromyces) 숙주(미국 특허 4,943,529호; Fleer 등, 상동), 예를 들어 K.락티스(lactis) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt 등, J.Bacteriol. 737(1983)), K.프라길리스(fragilis) (ATCC 12,424), K.불가리쿠스(bulgaricus) (ATCC 16,045), K.위케라미이(wickeramii) (ATCC 24,178), K.왈티이(waltii) (ATCC 56,500), K.드로소필라툼(drosophilum) (ATCC 36,906; Van den Berg 등, 상동), K. 서모톨레란스(thermotolerans) 및 K.마르시아누스(marxianus); 야로위아(yarrowia) (EP 402,226); 피키아 파스토리스(Pichia pastoris) (EP 183,070; Sreekrishna 등, J.Basic Microbiol., 28:265-278 (1988)); 칸디다; 트리코데르마 레에시아(Trichoderma reesia) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(Neurospora crassa) (Case 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 76:5259-5263 (1979)); 쉬완니오마이세스(Schwanniomyces), 예컨대 쉬완니오마이세스 옥시덴탈리스(Schwanniomyces occidentalis) (EP 394,538, 1990년 10월 31일 공고); 및 사상균, 예컨대 뉴로스포라(Neurospora), 페니실리움(Penicillium), 톨리포클라디움(Tolypocladium) (WO 91/00357, 1991년 1월 10일 공개), 및 아스퍼길루스 숙주, 예컨대 A.니둘란스(nidulans) (Ballance 등, Biochem. Biophys. Res. Commun. 112:284-289 (1983); Tilburn 등, Gene, 26:205-221 (1983)); Yelton 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 81:1470-1474 (1984)); 및 A.나이저(niger) (Kelly 등, EMBO J. 4:475-479 (1985))가 일반적으로 입수가 가능하고 여기에서 이용될 수 있다.
- [0175] 글리코실화 Bv8의 발현을 위해 적절한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 이러한 숙주 세포는 복잡한 처리 및 글리코실화 활성을 가질 수 있다. 원칙적으로, 척추동물 배양액이든지 또는 무척추동물 배양액이든지, 어떠한 고등 원핵 세포 배양액이라도 가공할 수 있다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) (애벌레), 애데스 애지프티(Aedes aegypti) (모기), 애데스 알보픽투스(Aedes albopictus) (모기), 드로소필라 멜라노가스터(Drosophila melanogaster) (과실파리), 및 봄빅스 모리(Bombyx mori)와 같은 숙주로부터 다수의 바큘로바이러스 균주 및 변이주 및 상응하는 허용 곤충 숙주 세포가 동정되었다. 예를 들어 문헌 [Luckow 등, Bio/Technology, 6:47-55 (1988); Miller 등, Genetic Engineering, Setlow 등, eds. Vol.8 (Plenum Publishing, 1986), pp.277-279; 및 Maeda 등, Nature, 315:592-594 (1985)] 참조. 이입을 위해 각종 바이러스 균주, 예를 들어 오토그래파 캘리포르니카(Autographa californica) NPV의 L-1 변이주 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 대중적으로 입수가 가능하고, 이러한 바이러스

들은, 특히 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포의 이입을 위해, 본 발명에 따른 바이러스로서 사용될 수 있다.

- [0176] 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양액이 숙주로서 이용될 수 있다. 전형적으로, Bv8-코드화 DNA를 함유하도록 미리 조작된 세균 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)의 특징한 균주로 배양함으로써 식물 세포가 이입된다. 식물 세포 배양액과 A.투메파시엔스의 배양 동안에, Bv8을 코드화하는 DNA가 식물 세포 숙주로 전달되어, 이입되고 적절한 조건하에서 Bv8-코드화 DNA를 발현한다. 또한, 식물 세포에 적합한 조절 및 신호 서열, 예컨대 노팔린 합성효소 프로모터 및 폴리아데닐화 신호 서열을 입수할 수 있다. 문헌 [Depicker 등, *J.Mol.Appl.Gen.*, 1:561 (1982)]. 또한, T-DNA 780 유전자의 상류 영역으로부터 단리된 DNA 단편은 재조합 DNA-함유 식물 조직에서 식물-발현가능한 유전자의 전사 수준을 활성화시키거나 증가시킬 수 있다. EP 321,196 (1989년 6월 21일 발행).
- [0177] 그러나, 척추동물 세포가 가장 관심이 높으며, 배양액(조직 배양액) 중에서 척추동물 세포의 증식이 일상적인 절차이다. 예를 들어 [Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, editors (1973)] 참조. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (현탁 배양액 중에서의 생육을 위해 서브클론화된 293 또는 293 세포, Graham 등, *J.Gen Virol.*, 36:59 (1977)); 아기 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이나스 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, Urlaub 등, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 77:4216 (1980)); 마우스 세르틀리 세포 (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 그린 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 대뇌 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버펄로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (Mather 등, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 hepatoma 세포주 (Hep G2)이다.
- [0178] Bv8 생성을 위하여 숙주 세포를 상기 기재된 발현 또는 클론화 벡터로 이입하고 바람직하게는 형질전환하고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나 또는 원하는 서열을 코드화하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절히 개질된 통상적인 영양 배지 중에서 배양시킨다.
- [0179] 이입이란, 임의의 코드화 서열이 사실상 발현되든지 아니든지 간에, 숙주 세포에 의해 발현 벡터가 수용되는 것을 가리킨다. 다수의 이입 방법이 당업자에게 알려져 있으며, 예를 들어 CaPO<sub>4</sub> 및 에レクト로포레이션이 사용된다. 숙주 세포 내에서 이러한 벡터가 작동하는 징후가 나타날 때 이입이 성공적인 것으로 인식된다.
- [0180] 형질전환은, 염색체의 인자 또는 염색체 성분으로서 DNA가 복제될 수 있도록, DNA를 유기체 내에 도입하는 것을 의미한다. 사용된 숙주 세포에 의존하여, 이러한 세포에 적절한 표준 기술을 사용하여 형질전환을 수행한다. 상기 샘브룩(Sambrook)의 문헌의 1.82절에 기재된 것과 같이, 원핵세포 또는 실질적인 세포벽 장벽을 함유한 다른 세포를 위하여, 염화칼슘을 사용한 칼슘 처리 또는 에レクト로포레이션이 일반적으로 사용된다. 문헌 [Shaw 등, *Gene*, 23:315 (1983)] 및 WO 89/05859호(1989년 6월 29일 공개)에 기재된 바와 같이, 특정한 식물 세포의 형질전환을 위하여 아그로박테리움 투메파시엔스로의 감염이 사용된다. 또한, WO 91/00358 (1991년 1월 10일 공개)에 기재된 바와 같이 초음파 처리를 사용하여 식물을 이입시킬 수도 있다.
- [0181] 이러한 세포벽을 갖지 않는 포유동물 세포에 대하여, 문헌 [Graham 등, *Virology*, 52:456-457 (1978)]에 기재된 인산칼슘 침전 방법이 바람직하다. 포유동물 세포 숙주-체계 형질전환의 개략적인 측면은 미국 특허 4,399,216호 (1983년 8월 16일 특허취득)에 기재되어 있다. 효모 내로의 형질전환은 전형적으로 문헌 [Van Solingen 등, *J.Bact.*, 130:946 (1977)] 및 [Hsiao 등, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 76:3829 (1979)]의 방법에 따라 수행된다. 그러나, 세포 내로 DNA를 도입하기 위한 다른 방법들, 예컨대 핵 마이크로주입, 에レクト로포레이션, 비손상 세포와의 세균 원형질체 융합, 또는 다양이온, 예를 들어 폴리브렌, 폴리오르니틴 등이 또한 사용될 수 있다. 포유동물 세포를 형질전환하기 위한 다양한 기술을 위해서는 문헌 [Keown 등, *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990)] 및 [Mansour 등, *Nature*, 336:348-352 (1988)]을 참조한다.
- [0182] Bv8 폴리펩티드를 생성하기 위해 사용된 원핵 세포를 문헌 [Sambrook 등, 상동]에 기재된 바와 같이 적절한 배지에서 배양한다.
- [0183] 본 발명의 Bv8을 생성하기 위해 사용되는 포유동물 숙주 세포를 다양한 배지에서 배양할 수도 있다. 햄스(Ham's) F10(시그마), 최소 필수 배지(MEM, 시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 돌베코 개질 이글스 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (DMEM, 시그마)와 같은 통상적으로 입수가 가능한 배지가 숙주 세포를 배

양하기 위해 적절하다. 또한, 문헌[Ham 등, Meth.Enz., 58:44 (1979), Barnes 등, Anal.Biochem., 102:255 (1980)]; 미국 특허 4,767,704호; 4,657,866호; 4,927,762호; 4,560,655호 또는 5,122,469호; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 등록 30,985호에 기재된 배지를 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용할 수도 있다. 필요에 따라, 이러한 배지 중의 어느 것에 호르몬 및/또는 기타 생육 인자 (예컨대, 인슐린, 트랜스페린, 또는 표피 증식 인자), 염류 (예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘, 및 인산염), 완충액 (예컨대 HEPES), 뉴클레오사이드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생물질 (예컨대 겐타마이신(GENTAMYCIN)<sup>TM</sup> 약물), 미량 원소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 균등한 에너지를 보충할 수 있다. 또한, 다른 필요한 보충물이 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은, 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 앞서 사용된 것이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0184] 일반적으로, 포유동물 세포 배양액의 생산성을 최대화하기 위한 원리, 프로토콜 및 실제 기술은 문헌 [Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M.Butler, ed. (IRL Press, 1991)]에서 찾아볼 수 있다.

[0185] 이러한 개시물에서 언급된 숙주 세포는 배양액 중의 세포 뿐만 아니라 숙주 동물 내에 있는 세포를 모두 포함한다.

[0186] 유전자 증폭 및/또는 발현은 샘플 중에서 직접적으로, 예를 들어 여기에 제공된 서열을 근거로 하여 적절히 표지된 프로브를 사용하여, mRNA의 전사를 정량화하기 위한 통상적인 서던 블로팅, 노던 블로팅 (Thomas, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)), 도트 블로팅 (DNA 분석) 또는 원위치 하이브리드형성에 의해 측정될 수 있다. 다양한 표지, 가장 일반적으로 방사성동위원소, 특히 <sup>32</sup>P가 사용될 수 있다. 그러나, 다른 기술들, 예컨대 폴리뉴클레오티드 내로의 도입을 위해 비오틴-변형 뉴클레오티드를 사용하는 기술을 사용할 수도 있다. 이어서, 비오틴은 아비딘 또는 항체에 대한 결합 부위로서 작용하고, 이것을 방사성핵종, 형광체, 효소 등과 같은 다양한 종류의 표지로 표지화할 수 있다. 대안적으로, DNA 듀플렉스, RNA 듀플렉스, 및 DNA-RNA 하이브리드 듀플렉스 또는 DNA-단백질 듀플렉스를 포함하여 특정한 듀플렉스를 인식할 수 있는 항체를 사용할 수 있다. 항체를 다시 표지화할 수도 있고, 듀플렉스가 표면에 결합된 경우 분석을 수행할 수도 있으며, 그 결과 표면 위에서 듀플렉스가 형성될 때 듀플렉스에 결합된 항체의 존재가 검출될 수 있다.

[0187] 대안적으로, 유전자 생성물의 발현을 직접적으로 정량하기 위하여, 면역학적 방법, 예컨대 조직 절편의 면역조직화학적 염색법 및 세포 배양액 또는 체액의 분석에 의해 유전자 발현을 측정할 수 있다. 면역조직화학적 염색 기술을 사용하여, 전형적으로 탈수 및 고정화에 의해 샘플을 제조한 다음, 결합된 유전자 생성물에 특이적인 표지화 항체와 반응시키고, 이 때 표지는 보통 시작적으로 검출가능한 것, 예컨대 효소적 표지, 형광 표지, 발광 표지 등이다. 본 발명에서 사용하기 위해 적절한 특히 감수성 있는 염색 기술은 문헌 [Hsu 등, Am.J.Clin.Path., 75:734-738 (1980)]에 기재되어 있다.

[0188] 면역조직화학적 염색 및/또는 샘플 유체의 분석을 위해 유용한 항체는 단클론성이거나 또는 다클론성일 수 있고, 여기에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0189] Bv8는 숙주 세포 용해물로부터 회수될 수도 있긴 하지만, 바람직하게는 분비된 폴리펩티드로서 배양 배지로부터 회수된다. Bv8이 막-결합된다면, 적절한 계면활성제 (예를 들어, 트리톤-X 100)를 사용하여 막으로부터 방출될 수 있다.

[0190] Bv8이 인간 근원 이외의 재조합 세포에서 생성될 때, Bv8은 인간 근원의 단백질 또는 폴리펩티드를 완전히 갖지 않는다. 그러나, Bv8에 실질적으로 동종인 제제를 수득하기 위하여 재조합 세포 단백질 또는 폴리펩티드로부터 Bv8을 정제하는 것이 필요할 수 있다. 첫번째 단계로서, 입상 세포 단편을 제거하기 위하여 세포 배지 또는 세포용해물을 원심분리할 수 있다. 하기 절차에 따라서 오염물 가용성 단백질 및 폴리펩티드로부터 Bv8을 정제할 수 있으며, 적절한 정제 절차의 예는 이온-교환 컬럼 위에서의 분별증류; 에탄올 침전; 역상 HPLC; 실리카 상의 크로마토그래피; 크로마토포커싱; 면역친화성; 에피토프-표지부착 결합 수지; SDS-PAGE; 암모늄 설페이트 침전; 예를 들어 세파텍스 G-75를 사용한 겔 여과; 및 IgG와 같은 오염물을 제거하기 위한 단백질 A 세파로스 컬럼이다.

[0191] 3. Bv8의 변이

[0192] Bv8 및 Bv8 변이체의 공유결합 변이도 본 발명의 범위에 포함된다. 공유결합 변이의 한가지 유형은, Bv8 폴리펩티드의 표적 아미노산 잔기를, Bv8의 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화

시약과 반응시키는 것을 포함한다. 이작용성 시약으로의 유도체화는 예를 들어 항-Bv8 항체를 정제하기 위한 방법에서 사용되는 수-불용성 지지체 기질 또는 표면에 Bv8을 가교시키기 위해, 그리고 그 반대경우를 위해 유용하다. 보통 사용되는 가교제는 예를 들어 1,1-비스(디아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타르알데히드, N-히드록시숙신이미드 에스테르, 예를 들어 4-아지도살리실산과의 에스테르, 3,3'-디티오비스(숙신이미딜프로피오네이트)와 같은 디숙신이미딜 에스테르를 포함한 동종이작용성 이미도에스테르, 비스-N-말레이미도-1,8-옥탄과 같은 이작용성 말레이미드, 및 메틸-3-[(p-아지도페닐)디티오]프로피오이미데이트와 같은 시약을 포함한다.

[0193] 다른 변이는, 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기의 상응하는 글루타밀 및 아스파르틸 잔기로의 탈아미드화; 프롤린 및 리신의 히드록실화, 세린 또는 트레오닌 잔기의 히드록실 기의 인산화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 α-아미노기의 메틸화 [T.E.Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H.Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], N-말단 아민의 아세틸화, 및 C-말단 카르복실기의 아미드화를 포함한다.

[0194] 본 발명의 범위에 포함된 Bv8 폴리펩티드의 공유결합 변이의 다른 유형은 폴리펩티드의 천연 글리코실화 패턴을 변화시키는 것을 포함한다. "천연 글리코실화 패턴의 변화"는, 본 발명의 목적을 위하여, (아래에 있는 글리코실화 부위를 제거하거나 화학적 및/또는 효소적 수단에 의해 글리코실화를 결실시킴으로써) 천연 서열 Bv8에서 발견된 하나 이상의 탄수화물 잔기를 결실시키고/시키거나, 천연 서열 Bv8에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위를 첨가하는 것을 의미한다. 또한, 상기 표현은 존재하는 다양한 탄수화물 잔기의 성질 및 비율에서의 변화를 포함하여 천연 단백질의 글리코실화에서의 정성적 변화를 포함한다.

[0195] Bv8 폴리펩티드에 글리코실화 부위를 첨가하는 것은, 아미노산 서열을 변화시킴으로써 달성될 수 있다. 예를 들어 천연 서열 Bv8에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 첨가하거나 치환함으로써 변화를 형성할 수 있다 (O-결합된 글리코실화 부위를 위하여). DNA 수준에서의 변화를 통해, 특히 원하는 아미노산으로 번역되는 코돈이 생성되도록 미리-선택된 염기에서 Bv8 폴리펩티드를 코드화하는 DNA를 변이시킴으로써, Bv8 아미노산 서열을 임의로 변화시킬 수도 있다.

[0196] Bv8 폴리펩티드 위에서 탄수화물 잔기의 수를 증가시키는 다른 수단은 글리코시드를 폴리펩티드에 화학적 또는 효소적으로 결합시키는 것이다. 이러한 방법은 당 기술분야에, 예를 들어 WO 87/05330 (1987년 9월 11일 공개) 및 문헌 [Aplin 및 Wriston, CRC Crit.Rev.Biochem. pp.259-306 (1981)]에 기재되어 있다.

[0197] Bv8 폴리펩티드 위에 존재하는 탄수화물 잔기의 제거는 화학적으로 또는 효소적으로 달성될 수 있거나, 또는 글리코실화를 위한 표적으로 작용하는 아미노산 잔기를 코드화하는 코돈을 돌연변이 치환함으로써 달성될 수도 있다. 화학적 탈글리코실화 기술은 당 기술분야에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Hakimuddin 등, Arch.Biochem.Biophys., 259:52 (1987)] 및 [Edge 등, Anal.Biochem., 118:131 (1981)]에 기재되어 있다. 폴리펩티드 상에서 탄수화물 잔기의 효소적 절단은 문헌 [Thotakura 등, Meth.Enzymol., 138:350 (1987)]에 기재된 각종 엔도- 및 엑소-글리코시다제를 사용하여 달성될 수 있다.

[0198] Bv8의 공유결합 변이의 다른 유형은, 미국 특허 4,640,835호; 4,496,689호; 4,301,144호; 4,670,417호; 4,791,192호 또는 4,179,337호에 기재된 방식으로, 각종 비단백질성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌의 하나에 Bv8 폴리펩티드를 연결하는 것을 포함한다.

[0199] 본 발명의 Bv8은 다른 이종 폴리펩티드 또는 아미노산 서열에 융합된 Bv8을 포함하는 키메라 분자를 형성하는 방식으로 변이될 수도 있다.

[0200] 하나의 구현양태에서, 이러한 키메라 분자는 Bv8을 표지 폴리펩티드와 융합하는 것을 포함하며, 이것은 anti-표지 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 에피토프를 제공한다. 에피토프 표지는 일반적으로 Bv8의 아미노- 또는 카르복실-말단에 위치한다. Bv8의 에피토프-표지부착 형태의 존재는 표지 폴리펩티드에 대한 항체를 사용하여 검출될 수 있다. 또한, 에피토프 표지를 제공하면, anti-표지 항체 또는 에피토프 표지에 결합하는 다른 유형의 친화성 기질을 사용하여 친화성 정제에 의해 Bv8을 쉽게 정제할 수 있다. 다양한 표지 폴리펩티드 및 각각의 항체가 당 기술분야에 공지되어 있다. 그의 예는, 폴리-히스티딘(폴리-his) 또는 폴리-히스티딘-글리신 (폴리-his-gly) 표지; 플루(flue) HA 표지 폴리펩티드 및 그의 항체 12CA5 (Field 등, Mol.Cell.Biol., 8:2159-2165 (1988)); c-myc 표지 및 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 및 9E10 항체 (Evan 등, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616(1985)); 및 단순 헤르페스 바이러스 당단백질 D (gD) 표지 및 그의 항체 (Paborsky 등, Protein Engineering 3(6): 547-553 (1990))를 포함한다. 다른 표지 폴리펩티드는 플래그(Flag)-펩티드

(Hopp, *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)); KT3 에피토프 펩티드 (Martin 등, *Science*, 255:192-194 (1992));  $\alpha$ -투블린 에피토프 펩티드 (Skinner 등, *J.Biol.Chem.*, 266:15163-15166 (1991)); 및 T7 유전자 10 단백질 펩티드 표지 (Lutz-Freyermuth 등, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 87:6393-6397 (1990))를 포함한다.

- [0201] 대안적인 구현양태에서, 키메라 분자는 Bv8과 면역글로블린 또는 면역글로블린의 특정한 영역의 융합을 포함할 수 있다. 키메라 분자 (또한, "면역부착소"라 일컬어짐)의 2가 형태를 위하여, 이러한 융합은 IgG 분자의 Fc 영역일 수 있다.
- [0202] 가장 단순하고 가장 직접적인 면역부착소 구조는, "부착소" 단백질의 결합 영역(들)을 면역글로블린 중쇄의 경첩 및 Fc 영역과 조합시킨다. 통상, 본 발명에서 사용하기 위한 Bv8-면역글로블린 키메라를 제조할 때, Bv8을 코드화하는 핵산이 면역글로블린 불변 도메인 서열의 N-말단을 코드화하는 핵산에 C-말단에서 융합되지만, N-말단 융합도 또한 가능하다.
- [0203] 전형적으로, 이러한 융합에서 코드화된 키메라 폴리펩티드는, 면역글로블린 중사실의 불변 영역의 적어도 기능적으로 활성인 경첩 및 CH2 및 CH3 도메인을 보유한다. 융합은 불변 도메인의 Fc 부위의 C-말단에 대해 형성되거나, 또는 중쇄의 CH1 또는 그에 상응하는 경쇄 영역에 대해 바로 N-말단에서 형성된다.
- [0204] 융합이 형성되는 정확한 부위는 중요하지 않다; 특별한 부위가 알려져 있으며, Bv8-면역글로블린 키메라의 생물학적 활성을 최적화하기 위해 선택될 수 있다.
- [0205] 일부 구현양태에서, Bv8-면역글로블린 키메라가 단량체로서, 또는 이종- 또는 동종-다합체로서, 특히 WO 91/08298호에 예증된 바와 같이 이합체 또는 사합체로서 조립될 수 있다.
- [0206] 바람직한 구현양태에서, Bv8 서열을 면역글로블린, 예를 들어 면역글로블린 G<sub>1</sub> (IgG1)의 이펙터 기능을 함유하는 항체(특히, Fc 도메인)의 C-말단 부분의 N-말단에 융합시킨다. 전체 중쇄 불변 영역을 Bv8 서열에 융합시킬 수 있다. 그러나, 더욱 바람직하게는, 과파인 절단 부위(화학적으로 IgG Fc를 한정함; 중쇄 불변 영역의 첫번째 잔기를 114로 간주할 때 잔기 216, 또는 다른 면역글로블린의 유사한 부위)의 상류쪽에 있는 경첩 영역에서 시작된 서열이 융합에서 사용된다. 특히 바람직한 구현양태에서, Bv8 아미노산 서열이 IgG1, IgG2 또는 IgG3 중쇄의 경첩부 및 CH2 및 CH3에 융합되거나, 또는 CH1, 경첩, CH2 및 CH3 도메인에 융합된다. 융합이 형성된 정확한 부위는 중요하지 않고, 일반적인 실험에 의해 적정 부위를 결정할 수 있다.
- [0207] 일부 구현양태에서, Bv8-면역글로블린 키메라가 다합체로서, 특히 동종-이합체 또는-사합체로서 조립된다. 일반적으로, 이렇게 조립된 면역글로블린은 공지된 단위 구조를 갖는다. 기본적인 4쇄 구조 단위는 IgG, IgD 및 IgE가 존재하는 형태이다. 4개 단위가 더욱 큰 분자량 면역글로블린에서 반복된다; IgM은 일반적으로 디설파이드 결합에 의해 함께 고정된 기본적인 4-단위의 오합체로서 존재한다. IgA 글로블린 및 때때로 IgG 글로블린은 혈청 내에서 다합체 형태로 존재할 수 있다. 다합체의 경우에, 각각의 4개-단위가 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0208] 대안적으로, 키메라 중쇄를 포함한 면역글로블린이 수득되도록, 면역글로블린 중쇄와 경쇄 서열 사이에 Bv8 서열을 삽입할 수 있다. 이러한 구현양태에서, 경첩과 CH2 도메인 사이에서, 또는 CH2와 CH3 도메인 사이에서, Bv8 서열이 면역글로블린의 각각의 팔에 있는 면역글로블린 중쇄의 3' 말단에 융합된다. 유사한 구조가 문헌 [Hoogenboom 등, *Mol.Immunol.* 28:1027-1037 (1991)]에 기록되어 있다.
- [0209] 본 발명의 면역부착소에서 면역글로블린 경쇄의 존재가 요구되지 않지만, 면역글로블린 경쇄가 Bv8-면역글로블린 중쇄 융합 폴리펩티드에 공유결합으로 연결되거나 또는 Bv8에 직접적으로 융합되어 존재할 수 있다. 전자의 경우에, 면역글로블린 경쇄를 코드화하는 DNA는 Bv8-면역글로블린 중쇄 융합 단백질을 코드화하는 DNA와 공동발현된다. 분비 시에, 하이브리드 중쇄 및 경쇄가 공유결합으로 연결되어, 2개의 디설파이드-결합된 면역글로블린 중쇄-경쇄 쌍을 포함하는 면역글로블린형 구조를 제공한다. 이러한 구조의 제조를 위해 적절한 방법은 예를 들어 미국 특허 4,816,567호 (1989년 3월 28일 특허취득)에 개시되어 있다.
- [0210] 바람직한 구현양태에서, 본 발명의 면역부착소의 구축에서 사용되는 면역글로블린 서열은 IgG 면역글로블린 중쇄 불변 도메인으로부터 유래된다. 인간 면역부착소를 위하여, 인간 IgG1 및 IgG3 면역글로블린 서열의 사용이 바람직하다. IgG1을 사용하는 주요 장점은, IgG1 면역부착소가 고정화 단백질 A 위에서 효율적으로 정제될 수 있다는 것이다. 반대로, IgG3의 정제는 훨씬 덜 불안정한 매질인 단백질 G를 필요로 한다. 그러나, 특정한 면역부착소 구조를 위해 Ig 융합 파트너를 선택할 때, 면역글로블린의 다른 구조적 및 기능적 성질을 고려해야 한다. 예를 들어, IgG3 경첩이 훨씬 길고 더욱 유연하며, 따라서 더욱 큰 부착소 도메인을 수용하여 IgG1에 융합될 때 적절하게 접히거나 작용하지 않을 수도 있다. 다른 고려사항은 원자가이고; IgG 면역부착소는 2가 동종

이합체인 반면, IgA 및 IgM과 같은 Ig 아형은 각각 기본 Ig 동중이합체 단위의 이합체 또는 오합체 구조를 일으킬 수 있다. 생체내 응용을 위해 설계된 Bv8 면역부착소에 있어서, Fc 영역에 의해 특정된 약물동력학적 성질 및 이펙터 기능이 또한 중요하다. IgG1, IgG2 및 IgG4가 모두 생체내에서 21일의 반감기를 갖고 있긴 하지만, 보체 체계를 활성화시키기에 있어서 상대적 효능은 상이하다. IgG4는 보체를 활성화시키지 않고, IgG2는 IgG1에 비해 보체 활성화가 상당히 약하다. 더욱이, IgG1과는 달리, IgG2는 단핵 세포 또는 호중구 위의 Fc 수용체에 결합하지 않는다. IgG3이 보체 활성화를 위해 적당하지만, 그의 생체내 반감기는 다른 IgG 이소타입의 대략 삼분의 일이다. 인간 치료법으로서 사용되도록 설계된 면역부착소를 위해 다른 중요한 고려사항은 특정한 이소타입의 알로형 변이체의 수이다. 일반적으로, 혈청학적으로 한정된 알로형을 거의 갖지 않는 IgG 이소타입이 바람직하다. 예를 들어, IgG1은 단지 4개의 혈청학적으로 한정된 알로형 부위를 가지며, 이 중 2개(G1m 및 2)가 Fc 영역에 위치하고; 이러한 부위 중의 하나인 G1m1은 비-면역원성이다. 반대로, IgG3에는 12개의 혈청학적으로 정의된 알로형이 존재하고 이들 모두는 Fc 영역에 있으며; 이들 부위의 단지 3개 (G3m5, 11 및 21) 만이 비-면역원성인 1개의 알로형을 갖는다. 따라서,  $\gamma$ 3 면역부착소의 잠재적인 면역원성은  $\gamma$ 1 면역부착소의 것보다 더 크다.

[0211] 친 면역글로블린에 있어서, 유용한 결합점은, 2개의 중쇄 사이에서 디설파이드 결합을 형성하는 경첩의 시스템의 바로 상류에 존재한다. 종종 사용되는 설계에서, 분자의 Bv8 부분의 C-말단 잔기를 위한 코돈이, IgG1 경첩 영역의 서열 DKTHTCPPCP를 위한 코돈의 상류에 직접적으로 위치한다.

[0212] 면역부착소의 구축 및 발현을 위해 적절한 일반적인 방법은 Bv8에 대해 상기 개시된 것과 동일하다. Bv8 면역부착소는 프레임 내의 Bv8 부위를 코드화하는 cDNA 서열을 Ig cDNA 서열에 융합시킴으로써 편리하게 구축된다. 그러나, 게놈 Ig 단편으로의 융합이 또한 사용될 수 있다 (예를 들어 [Gascoigne 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 84:2936-2940 (1987); Aruffo 등, Cell, 61:1303-1313 (1990); Stamenkovic 등, Cell, 66:1133-1144 (1991)] 참조). 후자의 융합 유형은 발현을 위하여 Ig 조절 서열의 존재를 필요로 한다. IgG 중-쇄 불변 영역을 코드화하는 cDNA는, 비장 또는 말초혈액 림프구로부터 유래된 cDNA 라이브러리로부터의 공개된 서열을 기초로 하여, 하이브리드화에 의해 또는 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) 기술에 의해 단리될 수 있다. Bv8 및 면역부착소의 Ig 부분을 코드화하는 cDNA를, 선택된 숙주 세포내에서 효과적인 발현을 지시하는 플라스미드 벡터내에 앞뒤로 삽입한다. 포유동물 세포에서의 발현을 위하여, pRK5-기초 벡터 (Schall 등, Cell, 61:361-370 (1990)) 및 CDM8-기초 벡터 (Seed, Nature, 329:840 (1989))를 사용할 수 있다. 올리고뉴클레오티드-특이적 결실 돌연변이유발을 사용하여, 설계된 접합 코돈 사이에 있는 과다 서열을 제거함으로써 실제 접합을 형성할 수 있다 [Zoller 등, Nucleic Acids Res., 10:6487 (1982); Capon 등, Nature, 337:525-531 (1989)]. 각각의 반쪽이 원하는 접합 부위의 서열에 상보적인 합성 올리고뉴클레오티드를 사용할 수 있으며; 이상적으로 이들은 36 내지 48염기이다. 대안적으로, 프레임내 분자의 2개 부분을 적절한 벡터와 결합시키기 위하여 PCR 기술이 사용될 수 있다.

[0213] Bv8 면역부착소의 발현을 위한 숙주 세포주의 선택은 주로 발현 벡터에 의존된다. 다른 고려사항은 필요한 단백질 양이다. 밀리그램 양이 종종 일시적 이입에 의해 생성될 수 있다. 예를 들어, 효과적인 면역부착소 발현이 가능한 인산칼슘 방법의 변형에 의하여, 아데노바이러스 EIA-형질전환된 293 인간 배아 신장 세포주를 pRK5-기초 벡터로 일시적으로 이입할 수 있다. DEAE-텍스트란 방법에 의해 COS 세포를 이입하기 위해 CDM8-기초 벡터가 사용될 수 있다 [Aruffo 등, Cell, 61:1303-1313 (1990); Zettmeissl 등, DNA Cell Biol. US 9:347-353 (1990)]. 다량의 단백질을 원한다면, 숙주 세포주의 안정한 이입 후에 면역부착소를 발현할 수 있다. 예를 들어, 디히드로폴레이트 환원효소(DHFR)를 코드화하고 G418에 대한 내성을 부여하는 추가의 플라스미드의 존재하에서 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포내에 pRK5-기초 벡터를 도입할 수 있다. G418에 대해 내성인 클론을 배양액에서 선택할 수 있고; 이러한 클론을 증가된 수준의 DHFR 억제인자 메토타렉세이트의 존재하에서 생육시키며; 클론을 선택하고, 이때 DHFR 및 면역부착소 서열을 코드화하는 유전자 카피의 수를 공동-증폭시킨다. 면역부착소가 N-말단에서 소수성 리더 서열을 함유한다면, 이 서열이 이입된 세포에 의해 처리되고 분비될 것이다. 더욱 복잡한 구조를 가진 면역부착소의 발현은 특유의 적합한 숙주 세포를 필요로 할 수 있으며; 예를 들어, 경쇄 또는 J 쇄과 같은 성분이 골수종 또는 하이브리도마 세포 숙주에 의해 제공될 수 있다 [Gascoigne 등, 1987, 상동, Martin 등, J.Virol., 67:3561-3568 (1993)].

[0214] 면역부착소가 친화성 크로마토그래피에 의해 편리하게 정제될 수 있다. 친화성 리간드로서 단백질 A의 적합성은 키메라에서 사용되는 면역글로블린 Fc 도메인의 중 및 아이오타입에 의존된다. 인간  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2 또는  $\gamma$ 4 중쇄를 기초로 하는 면역부착소를 정제하기 위하여 단백질 A가 사용될 수 있다 [Lindmark 등, J.Immunol. Meth., 62:1-13 (1983)]. 모든 마우스 이소타입 및 인간  $\gamma$ 3을 위해 단백질 G가 추천된다 [Guss 등, EMBO J.,

5:1567-1575 (1986)]. 친화성 리간드가 부착되는 기질은 종종 아가로스이지만, 다른 기질들이 사용될 수 있다. 조절된 공극 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠과 같은 기계적으로 안정한 기질이, 아가로스로 달성될 수 있는 것 보다 유동 속도를 더 빠르게 하고 처리 시간을 더 짧게 할 수 있다. 단백질 A 또는 G 친화성 컬럼에 면역부착소를 결합시키기 위한 조건은 Fc 도메인의 특징; 다시말해서, 그의 중 및 이소타입에 의해 전적으로 결정된다. 일반적으로, 적절한 리간드가 선택될 때, 조절되지 않은 배양액으로부터 효과적인 결합이 직접적으로 일어난다. 면역부착소의 한가지 특징은, 인간  $\gamma 1$  분자에 대하여, 단백질 A에 대한 결합능이 동일한 Fc 유형의 항체에 비해 다소 저하된다는 것이다. 결합된 면역부착소는 산성 pH (3.0 또는 그 이상)에서 또는 약한 카오트로픽 염을 함유하는 중성 pH 완충액 중에서 효율적으로 용출될 수 있다. 이러한 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 95% 초과 순도를 가진 면역부착소 제제가 얻어질 수 있다.

[0215] 면역부착소를 정제하기 위하여 단백질 A 또는 G 상에서의 친화성 크로마토그래피 대신에, 또는 그 외에 추가로, 당 기술분야에 공지된 다른 방법들을 사용할 수 있다. 면역부착소는 호황성 겔 크로마토그래피[Hutchens 등, Anal. Biochem., 159:217-226 (1986)] 및 고정화 금속 킬레이트 크로마토그래피 [Al-Mashikhi 등, J.Dairy Sci., 71:1756-1763 (1988)]에서 항체에 대해 유사하게 거동한다. 그러나, 항체와는 달리, 이온 교환 컬럼 상에서의 그들의 거동은 등전점에 의해서 뿐만 아니라 키메라 성질로 인해 분자에 존재할 수도 있는 하전 이종극에 의해서 결정된다.

[0216] 원한다면, 면역부착소는 이특이성으로 형성될 수도 있다. 즉, 본 발명의 면역부착소는 Bv8 도메인 및 다른 성장 인자로부터의 도메인과 같은 도메인을 조합할 수도 있다. 이특이성 분자에 있어서, 정제 용이성으로 인하여, 항체형 구조의 하나의 팔에 있는 키메라 항체 중쇄 및 다른 팔에 있는 키메라 항체 중쇄-경쇄 쌍으로 구성된 삼합체 분자가 유리하다. 10개의 사합체들의 혼합물을 생성하는, 이특이성 면역부착소의 생성을 위해 종래 사용된 항체-생성 쿼드로마(quadromas)와는 반대로, 삼합체 면역부착소 구조의 3개 사슬을 코드화하는 핵산으로 이입된 세포는 단지 3개 분자의 혼합물을 생성하며, 그에 따라 이러한 혼합물로부터 원하는 생성물을 정제하는 것이 더욱 용이하다.

[0217] 4. Bv8 활성의 모듈레이터의 제조 및 동정

[0218] 본 발명은, Bv8의 하나 이상의 생물학적 활성을 모방 또는 증진시키거나(작동물질) 또는 Bv8의 효과를 방해하는(길항물질) 화합물을 동정하기 위하여, 화합물을 선별하는 방법을 포함한다. Bv8 작동물질 및 길항물질은 Bv8 모듈레이터라 일컬어진다. 길항물질 약물 후보를 위한 선별 분석은, Bv8 폴리펩티드와 결합하거나 착화되는 화합물 또는 다른 세포 단백질과 Bv8의 상호작용을 방해하는 화합물을 동정하도록 설계된다.

[0219] a. 소 분자 선별

[0220] 소 분자는 Bv8 작동물질 또는 길항물질로서 작용하는 능력을 가질 수도 있고 따라서 치료적으로 유용하다. 이러한 소 분자는 자연 발생적 소 분자, 합성 유기 또는 무기 화합물 및 펩티드를 포함할 수 있다. 그러나, 본 발명에서의 소 분자들은 이러한 형태로 한정되지 않는다. 소 분자의 광범위한 라이브러리가 통상적으로 이용될 수 있고, 원하는 활성을 가진 분자를 선별하기 위하여 당 기술분야에 넓은 종류의 분석법이 알려져 있다.

[0221] 후보 Bv8 작동물질 또는 길항물질 소 분자는, Bv8 활성의 잠재적인 모듈레이터를 빠르게 동정할 수 있는 분석법에서 처음으로 바람직하게 동정된다. 이러한 분석법의 예는, Bv8 수용체에 결합되는 후보 분자의 능력을 측정하는 단백질-단백질 결합 분석이다. 다른 예에서, Bv8 수용체에 대한 Bv8 결합을 방해하는 후보 분자의 능력을 측정한다.

[0222] 바람직한 구현양태에서, Bv8의 하나 이상의 생물학적 활성을 모방하는 능력에 의해 소 분자 Bv8 작동물질이 동정된다. 예를 들어, 내피 세포의 증식을 유도하거나, 하기 실시예 2 및 3에 설명된 바와 같이 내피 세포 생존을 촉진하거나 또는 하기 실시예 4에 기재된 바와 같이 혈관형성을 유발하는 능력에 관하여, 소 분자들을 선별한다.

[0223] 다른 구현양태에서, 소 분자 Bv8 길항물질은 Bv8의 하나 이상의 생물학적 활성을 억제하는 능력에 의해 동정된다. 따라서, 후보 화합물을 Bv8과 접촉시킨다. 이어서, Bv8의 생물학적 활성을 평가한다. 하나의 구현양태에서, 내피 세포 증식을 자극하기 위한 Bv8의 능력을 실시예 2에 기재된 바와 같이 결정한다. 다른 구현양태에서, 예를 들어 실시예 3에 기재된 바와 같이, 내피 세포 생존을 촉진하기 위한 Bv8의 능력을 결정한다. Bv8의 생물학적 활성이 억제되는 경우에 화합물이 길항물질로서 동정된다.

[0224] Bv8 작동물질 또는 길항물질로서 동정된 화합물은 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 예를 들어, Bv8 길항물

질이 암을 치료하기 위해 사용될 수 있다.

- [0225] b. 작동물질 항체의 제조 및 동정
- [0226] Bv8의 생물학적 활성을 모방한 작동물질 인간 및 비-인간 다클론성 및 단클론성 항체 (비-인간 단클론성 항체의 인체화 형태)가 본 발명에서 의도된다. 이들은 아미노산 서열 변이체, 글리코실화 변이체 및 항체의 단편을 포함한다. 이러한 항체의 생성 및 작동물질 항체의 선택을 위한 일반적인 기술이 당 기술분야에 공지되어 있으며 이하 간략하게 설명된다.
- [0227] (i) 다클론성 항체
- [0228] 다클론성 항체의 제조 방법이 당 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어 면역부여제 및 원한다면 아쥘반트를 한 번 이상 주입함으로써, 다클론성 항체가 포유동물에서 증가될 수 있다. 전형적으로, 여러 번의 피하 또는 복강 내 주사에 의해 면역부여제 및/또는 아쥘반트를 포유동물에 주사한다. 면역화되는 포유동물에서 면역원성인 것으로 알려진 단백질, 예컨대 혈청 알부민 또는 대두 트립신 개시체에 면역부여제를 접합시키는 것이 유용할 수도 있다. 사용가능한 아쥘반트의 예는 프로인트의 완전 아쥘반트 및 MPL-TDM을 포함한다.
- [0229] (ii) 단클론성 항체
- [0230] 단클론성 항체는 문헌 [Kohler 등, Nature, 256:495 (1975)]에 처음으로 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 형성될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (미국 특허 4,816,567호)에 의해 형성될 수 있다.
- [0231] 하이브리도마 방법에서, 면역화를 위해 사용되는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생성할 수 있거나 생성하는 림프구를 유발하기 위하여 마우스 또는 기타 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터 또는 마카크 원숭이를 상기 기재된 바와 같이 면역화시킨다. 대안적으로, 림프구를 시험관 내에서 면역화시킬 수도 있다. 이어서, 림프구를 적절한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)].
- [0232] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포를, 비융합된 모 골수종 세포의 생육 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 바람직하게 함유하는 적절한 배양 배지에 접종하고 생육시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포가 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)를 소실한다면, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘 (HAT 배지)을 포함하고, 이것은 HGPRT-결핍 세포의 생육이 방지되는 조건이다.
- [0233] 바람직한 골수종 세포는, 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생성 세포에 의해 항체의 안정한 다량 생성을 뒷받침하고, HAT 배지와 같은 배지에 민감한 세포이다. 이들 중에서, 바람직한 골수종 세포주는 마우스 골수종 세포주, 예컨대 MOP-21 및 M.C.-11 마우스 종양(미국 캘리포니아 샌디에고의 샬크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center)로부터 입수가가능함)으로부터 유래된 세포주, 및 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포 (미국 매릴랜드 락빌의 아메리칸 타입 컬처 콜렉션으로부터 입수가가능함)이다. 인간 단클론성 항체의 생성을 위해 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 또한 기재되어 있다 [Kozbor, J.Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur 등, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63, Marcel Dekker, Inc. New York (1987)].
- [0234] 항원에 대해 지시된 단클론성 항체의 생성을 위하여, 하이브리도마 세포가 생육하는 배양 배지를 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성된 단클론성 항체의 결합 특이성은 면역침전법에 의해 또는 시험관 내 결합 분석, 예컨대 방사성면역분석(RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA)에 의해 결정한다.
- [0235] 단클론성 항체의 결합 친화성은 예를 들어 문헌 [Munson 등, Anal.Biochem., 107:220 (1980)]의 스캐차드 (Scatchard) 분석에 의해 결정될 수 있다.
- [0236] 원하는 특이성, 친화성 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 동정한 후에, 희석 절차를 제한함으로써 세포를 서브클론화하고 표준 방법에 의해 생육할 수 있다 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principle and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]. 이 목적을 위해 적절한 배양 배지는 예를 들어 DMEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포를 동물에서의 복수(ascite) 종양으로서 생체내 생육시킬 수도 있다.
- [0237] 서브클론에 의해 분비된 단클론성 항체를, 통상적인 면역글로블린 정제 절차, 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파티트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또

는 혈청으로부터 적절히 분리한다.

- [0238] 통상적인 절차를 사용하여 단클론성 항체를 코드화하는 DNA를 쉽게 단리하고 서열화한다 (예를 들어 단클론성 항체의 중쇄 및 경쇄를 코드화하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여). 하이브리도마 세포는 DNA의 바람직한 원천으로서 작용한다. 재조합 숙주 세포에서 단클론성 항체의 합성을 수득하기 위하여, 일단 단리된 후에, DNA를 발현 벡터 내로 위치시킬 수 있고, 이어서 이.콜리 세포, 시미안 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 달리 면역글로블린 단백질을 생성하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주 세포내로 이입시킬 수 있다. 예를 들어, 동종 마우스 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인을 위한 코드화 서열을 치환함으로써 [Morrison 등, Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A., 81:6851 (1984)] 또는 비-면역글로블린 폴리펩티드를 위한 코드화 서열의 전부 또는 일부를 면역글로블린 코드화 서열에 공유 결합시킴으로써, DNA를 변이시킬 수도 있다. 이러한 방식에서, 여기에 기재된 Bv8 작동물질 단클론성 항체의 결합 특이성을 가진 "키메라" 또는 "하이브리드" 항체가 제조된다.
- [0239] 가교제와 연관되는 것을 포함하여, 합성 단백질 화학에서 공지된 방법을 사용하여 시험관내에서 키메라 또는 하이브리드 항체를 제조할 수 있다. 예를 들어, 디설파이드 교환 반응을 사용하거나 티오에테르 결합을 형성함으로써, 면역독소를 구축할 수도 있다. 이러한 목적을 위해 적절한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토부티르이미데이트를 포함한다.
- [0240] 항체의 재조합 생성을 이하에서 더욱 상세히 설명할 것이다.
- [0241] (iii) 인체화 항체
- [0242] 일반적으로, 인체화 항체는 비-인간 원천으로부터의 항체에 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이러한 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "수입(import)" 잔기라 일컬어지며, 이것은 전형적으로 "수입" 가변 도메인으로부터 얻어진다. 윈터(Winter)와 그의 공동작업자 [Jones 등, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann 등, Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen 등, Science, 239: 1534-1536 (1988)]의 방법에 따라서, 인간 항체의 상응하는 서열을 설치류 CDRs 또는 CDR 서열로 대체함으로써, 인체화를 필수적으로 실행할 수 있다.
- [0243] 따라서, 이러한 "인체화" 항체는 키메라 항체 (Cabilly, 상동)이고, 여기에서 원상태 인간 가변 도메인에 비해 실질적으로 적은 서열이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 대체되었다. 실제로, 인체화 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하다면 일부 FR 잔기가 설치류 항체에 있는 유사한 부위로부터의 잔기로 대체된 인간 항체이다.
- [0244] 항체는 항원에 대해 높은 친화성 및 기타 유리한 생물학적 성질을 보유하면서 인체화되는 것이 중요하다. 이러한 목적을 달성하기 위하여, 바람직한 방법에 따르면, 모 서열 및 인체화 서열의 3차원 모형을 사용하는, 모 서열 및 각종 개념적인 인체화 생성물의 분석 방법에 의해 인체화 항체를 제조한다. 3차원 면역글로블린 모형이 통상적으로 이용될 수 있고 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로블린 서열의 가능한 3차원 배위 구조를 예측하고 나타내는 컴퓨터 프로그램이 이용될 수 있다. 이러한 디스플레이를 정밀하게 조사하면, 후보 면역글로블린 서열의 작용에서 잔기가 하는 역할을 분석할 수 있고, 다시말해서 후보 면역글로블린이 그의 항체를 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, 표적 항원(들)에 대해 증가된 친화성과 같은 바람직한 항체 특징이 달성되도록, 공통 서열 및 수입 서열로부터 FR 잔기들을 선택하여 조합할 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 직접적으로 그리고 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 미친다. 더욱 상세한 사항은, 1991년 6월 14일 출원된 미국 출원 일련번호 07/715,272호의 계속 출원인 미국 출원 일련번호 07/934,373호 (1992년 8월 12일 출원)을 참조한다.
- [0245] (iv) 인간 항체
- [0246] 하이브리도마 방법에 의해 인간 단클론성 항체를 형성할 수 있다. 인간 단클론성 항체의 생성을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 예를 들어 문헌 [Kozbor, J.Immunol. 133, 3001 (1984)] 및 [Brodeur 등, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63면 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]에 기재되어 있다.
- [0247] 면역화 시에, 내인성 면역글로블린 생성의 부재하에서 인간 항체의 레퍼토리를 생성할 수 있는 형질전환 동물 (예, 마우스)을 생성할 수 있다. 예를 들어, 키메라 및 생식계열 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 연결부(J<sub>H</sub>) 유전자가 동형접합에 의해 결실되면, 내인성 항체 생성이 완전히 억제된다는 것이 설명되어 있다. 이러한 생식계열 돌연변이 마우스에 인간 생식계열 면역글로블린 유전자 어레이를 이식하면, 항원 공격시에 인간 항체가 생

성될 것이다. 예를 들어 문헌 [Jakobovits 등, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 90, 2551-255 (1993); Jakobovits 등, Nature 362, 255-258 (1993)] 참조.

[0248] 멘데즈(Mendez) 등 [Nature Genetics 15:146-156 (1997)]은 기술을 더욱 향상시켜 왔으며, 항원으로 공격 받을 때, 고 친화성의 완전 인간 항체를 발생시키는 "제노마우스(Xenomouse)II"라 명명된 형질전환 마우스 계통을 발생시켰다. 이것은 상기 기재된 바와 같이 내인성 J<sub>H</sub> 단편으로 결실된 마우스 내에 메가베이스 인간 중쇄 및 경쇄 좌를 생식계열 통합함으로써 달성되었다. 제노마우스 II는 약 66 V<sub>H</sub> 유전자, 완전 D<sub>H</sub> 및 J<sub>H</sub> 영역 및 3개의 상이한 불변 영역( $\mu$ ,  $\delta$  및  $\chi$ )을 함유한 인간 중쇄 좌의 1,020kb를 갖고, 또한 32 V<sub>K</sub> 유전자, J<sub>K</sub> 단편 및 C<sub>K</sub> 유전자를 함유한 인간  $\kappa$  좌의 800kb를 갖는다. 이러한 마우스에서 생성된 항체는, 유전자 재배열, 어셈블리 및 레퍼토리를 포함한 모든 측면에서 인간에서 보여진 것과 밀접하게 유사하다. 인간 항체는, 마우스 좌에서 유전자 재배열을 방해하는 내인성 J<sub>H</sub> 단편의 결실로 인하여, 내인성 항체에 비해 우선적으로 발현된다.

[0249] 대안적으로, 파지 디스플레이 기술 [McCafferty 등, Nature 348:552-553 (1990)]은, 번역화되지 않은 공여체로부터의 번역글로블린 가변(V) 도메인 유전자 레퍼토리로 부터 시험관내에서 인간 항체 및 항체 단편을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 이 기술에 따르면, 항체 V 도메인 유전자가 프레임 내에서 섬유상 박테리오파지, 예컨대 M13 또는 fd의 주 또는 부 코트 단백질 유전자 내로 클론화되고, 파지 입자의 표면 상에서 기능성 항체 단편으로서 나타난다. 섬유상 입자는 파지 계놈의 단일 가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 성질을 기준으로 하여 선택하면 이러한 성질을 나타내는 항체를 코드화하는 유전자가 선택된다. 따라서, 파지는 B-세포의 일부 성질을 모방한다. 파지 디스플레이는 다양한 형식으로 실행될 수 있다; 이를 검토하기 위하여 예를 들어 문헌 [Johnson, Kevin S. 및 Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)]을 참조한다. V-유전자 단편의 몇 가지 원천이 파지 디스플레이를 위해 사용될 수 있다. 클락슨(Clackson) 등 [Nature 352:624-628 (1991)]은, 번역화된 마우스의 비장에서 유래된 V 유전자의 작은 랜덤한 조합 라이브러리로부터 안티-옥사졸론 항체의 다양한 어레이를 단리하였다. 번역화되지 않은 인간 공여체로부터의 V 유전자 레퍼토리를 구축할 수 있고, 필수적으로 문헌 [Marks 등, J.Mol.Biol. 222:581-597 (1991)] 또는 문헌 [Griffith 등, EMBO J. 12:725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라 다양한 항원 어레이 (자기-항원 포함)에 대한 항체를 단리할 수 있다. 자연적인 면역 반응에서, 항체 유전자는 높은 속도로 돌연변이를 축적한다 (체세포 고돌연변이). 도입된 변화의 일부는 높은 친화성을 부여하고, 이후의 항원 공격 동안에 고-친화성 표면 번역글로블린을 나타내는 B 세포가 우선적으로 복제되고 분화된다. 이러한 자연적인 과정은 "사슬 서플링"이라 알려진 기술을 사용하여 모방될 수 있다 [Marks 등, Bio/Technol. 10:779-783 (1992)]. 이 방법에서, 파지 디스플레이에 의해 수득된 "일차" 인간 항체의 친화성은, 중 및 경쇄 V 영역 유전자를, 번역화되지 않은 공여체로부터 수득된 V 도메인 유전자의 자연 발생적 변이체 레퍼토리 (레퍼토리)로 연속하여 대체함으로써 개선될 수 있다. 이러한 기술은 nM 범위의 친화성을 가진 항체 및 항체 단편을 생성할 수 있다. 매우 큰 파지 항체 레퍼토리 ("모든 라이브러리의 모체(mother-of-all libraries)"라고도 알려짐)를 형성하기 위한 방법은 문헌 [Waterhouse 등, Nucl.Acids Res. 21:2265-2266 (1993)]에 기재되어 있고, 이러한 큰 파지 라이브러리로부터 직접적으로 고 친화성 인간 항체를 단리하는 것은 문헌 [Griffith 등, EMBO J. (1994)]에 보고되어 있다. 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도하기 위하여 유전자 서플링이 사용될 수 있고, 이때 인간 항체는 출발 설치류 항체와 유사한 친화성 및 특이성을 갖는다. "에피토프 각인"이라고도 일컬어지는 이 방법에 따르면, 파지 디스플레이 기술에 의해 수득된 설치류 항체의 중 또는 경쇄 V 도메인 영역을 인간 V 도메인 유전자의 레퍼토리로 대체하여 설치류-인간 키메라를 형성한다. 항원에 대한 선택은 기능적 항원-결합 부위를 복원할 수 있는 인간 가변 도메인을 단리시키고, 다시말해서 에피토프가 파트너의 선택을 지배(각인)한다. 나머지 설치류 V 도메인을 대체하기 위해 공정을 반복할 때, 인간 항체가 수득된다 (PCT 특허 출원 WO 93/06213호 (1993년 4월 1일 공개) 참조). CDR 그래프트화에 의한 설치류 항체의 전통적인 인체화와는 달리, 이러한 기술은 완전한 인간 항체를 제공하며, 이것은 설치류 기원의 외곽구조 또는 CDR 잔기를 갖지 않는다.

[0250] (v) 이특이성 항체

[0251] 이특이성 항체는 적어도 2개의 상이한 항원에 대해 결합 특이성을 갖는 단클론성, 바람직하게는 인간 또는 인체화 항체이다. 이특이성 항체의 제조 방법이 당 기술분야에 공지되어 있다. 전통적으로, 이특이성 항체의 재조합 생성은 2개의 번역글로블린 중쇄-경쇄 쌍의 공동발현을 기초로 하고, 이때 2개의 중쇄가 상이한 특이성을 갖는다 [Millstein 및 Cuello, Nature 305, 537-539 (1983)]. 번역글로블린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류 때문에, 이러한 하이브리도마 (퀴드로마)는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적인 혼합물을 생성하고, 이들 중에서 단지 하나가 정확한 이특이성 구조를 갖는다. 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 통상 수행되는 정확한 분

자의 정제는 다소 성가시고, 생성물 수율이 낮다. 유사한 절차가 PCT 출원 공개 WO 93/08829 (1993년 5월 13일 공개) 및 문헌 [Traunecker 등, *EMBO* 10, 3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

- [0252] 상이하고 더욱 바람직한 접근법에 따르면, 바람직한 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)을 가진 항체 가변 도메인이 면역글로블린 불변 도메인 서열에 융합된다. 융합은 바람직하게는 경쇄, CH2 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는 면역글로블린 중쇄 불변 도메인을 갖는다. 적어도 하나의 융합에 존재하는, 경쇄 결합을 위해 필요한 부위를 함유하는 첫번째 중쇄 불변 영역(CH1)을 갖는 것이 바람직하다. 면역글로블린 중쇄 융합 및 원한다면 면역글로블린 경쇄를 코드화하는 DNA들을 별개의 발현 벡터 내에 삽입하고, 적절한 숙주 유기체 내에 동시 이입한다. 이것은, 구축에서 사용되는 상이한 비율의 3가지 폴리펩티드 사슬이 최적의 수율을 제공할 때, 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조절함에 있어서 상당한 융통성을 제공한다. 그러나, 2개 이상의 폴리펩티드 사슬을 동일한 비율로 발현하는 것이 높은 수율로 얻어지거나 또는 비율이 특별한 중요성을 갖지 않을 때, 2개 또는 3개 모두의 폴리펩티드 사슬의 코드화 서열을 하나의 발현 벡터에 삽입할 수 있다. 이러한 접근법의 바람직한 구현양태에서, 이특이성 항체는 하나의 팔에 있는 첫번째 결합 특이성을 가진 하이브리드 면역글로블린 중쇄 및 다른 팔에 있는 하이브리드 면역글로블린 중쇄-경쇄 쌍 (두번째 결합 특이성을 제공함)으로 구성된다. 이특이성 분자의 단지 1/2에만 면역글로블린 경쇄가 존재하는 것은 용이한 분리 방법을 제공하기 때문에, 이러한 비대칭 구조는, 원하지 않는 면역글로블린 사슬 조합으로부터 원하는 이특이성 화합물의 분리를 수월하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 접근법은 PCT 공개 번호 WO 94/04690 (1994년 3월 3일 공개)에 개시되어 있다.
- [0253] 이특이성 항체의 생성에 관한 상세한 사항은 예를 들어 문헌 [Suresh 등, *Methods in Enzymology* 121, 210 (1986)]을 참조한다.
- [0254] (vi) 이중접합체 항체
- [0255] 이중접합체(heteroconjugate) 항체는 2개의 공유 결합된 항체로 구성된다. 이러한 항체는 예를 들어 원하지 않는 세포에 대해 면역 체계 세포를 표적화하고 (미국 특허 4,676,980호) HIV 감염을 치료하기 위해 (PCT 출원 공개 번호 WO 91/00360호 및 WO 92/200373호; EP 03089호) 제안되었다. 이중접합체 항체는 편리한 가교 방법을 사용하여 형성될 수 있다. 적절한 가교제가 당 기술분야에 공지되어 있고, 다수의 가교 기술과 함께 미국 특허 4,676,980호에 개시되어 있다.
- [0256] (vii) 항체 단편
- [0257] 특정한 구현양태에서, Bv8 작동물질 항체 (마우스, 인간 및 인체화 항체 및 항체 변이체 포함)는 항체 단편이다. 항체 단편의 생성을 위하여 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이러한 단편들은 원상태 항체의 단백질분해 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어 [Morimoto 등, *J.Biochem.Biophys.Methods* 24:107-117 (1992)] 및 [Brennan 등, *Science* 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 이제 이러한 단편들은 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생성될 수 있다. 예를 들어, Fab'-SH 단편이 이-콜리로부터 직접적으로 회수되고, 화학적으로 결합하여 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 형성할 수 있다 [Carter 등, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)]. 다른 구현양태에서, F(ab')<sub>2</sub> 분자의 조립을 촉진하기 위하여, 루신 지퍼 GCN4를 사용하여 F(ab')<sub>2</sub>를 형성한다. 다른 접근법에 따르면, 재조합 숙주 세포 배양액으로부터 직접적으로 Fv, Fab 또는 F(ab')<sub>2</sub> 단편을 단리할 수 있다. 항체 단편의 생성을 위한 다른 기술이 숙련된 전문가에게 분명할 것이다.
- [0258] (viii) 작동물질 항체의 동정
- [0259] 생물학적 활성을 기초로 하여 Bv8 작동물질 항체를 동정한다. 하나의 구현양태에서, 실시예 2에 기재된 바와 같이 내피 세포의 증식을 유도하기 위한 능력에 의해 Bv8 작동물질 항체를 동정하였다. 다른 구현양태에서, 실시예 4에 기재된 바와 같이 혈관형성을 유도하기 위한 능력에 의해 Bv8 작동물질 항체를 동정하였다.
- [0260] 5. Bv8과 상호작용하는 단백질을 위한 선별 분석
- [0261] 이에 한정되지는 않지만 막횡단 또는 세포내 단백질을 포함하고 Bv8과 상호작용하는 단백질 또는 기타 분자들을 동정하기 위하여, 단백질-단백질 상호작용을 검출하기 위해 적절한 방법이 사용될 수 있다. 사용가능한 전통적인 방법 중에서, Bv8과 상호작용하는 단백질을 동정하기 위하여 공동-면역침전법, 가교법 및 구배 또는 크로마토그래피 컬럼을 통한 공동-침전이 사용된다. 이러한 분석을 위하여, Bv8 성분은 전체-길이 단백질, 그의 가용성 유도체, 주요 도메인에 상응하는 펩티드, 또는 Bv8의 일부 영역을 함유하는 융합 단백질일 수 있다.
- [0262] Bv8과 상호작용할 수 있는 단백질을 코드화하는 유전자를 동시에 동정하는 방법이 사용될 수도 있다. 이러한

방법들은, 예를 들어 표지화된 Bv8 또는 그의 변이체를 사용하여, 8gt11 라이브러리의 공지된 항체 프로브화 기술과 유사한 방식으로 발현 라이브러리를 프로브화하는 것을 포함한다.

- [0263] 생체내에서 단백질 상호작용을 검출하는 방법인 2-하이브리드 체계가 단지 예증을 위해 비제한적으로 상세히 설명되어 있다. 이러한 체계의 한가지 변형이 문헌 [Chien 등, 1991, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 88:9578-9582]에 기재되어 있으며, 클론테크 (미국 캘리포니아주 팔로 알토)로부터 통상적으로 입수가 가능하다.
- [0264] 간략하게, 이러한 체계를 이용하면, 2개의 하이브리드 단백질을 코드화하는 플라스미드가 구축된다: 하나의 플라스미드는 Bv8, 또는 그로부터의 폴리펩티드, 펩티드 또는 융합 단백질을 코드화하는 뉴클레오티드 서열에 융합된 전사 액티베이터 단백질의 DNA-결합 도메인을 코드화하는 뉴클레오티드로 구성되고, 다른 하나의 플라스미드는 cDNA 라이브러리의 일부로서 이 플라스미드 내에 재조합된 공지된 단백질을 코드화하는 cDNA에 융합된 전사 액티베이터 단백질 활성화 도메인을 코드화하는 뉴클레오티드로 구성된다. DNA-결합 도메인 융합 플라스미드 및 cDNA 라이브러리는 리포터 유전자 (예, HBS 또는 lacZ)을 함유하는 효모 사카로마이세스 세레비지애의 균주 내로 형질전환되고, 그의 조절 영역은 전사 액티베이터의 결합 부위를 함유한다. 하이브리드 단백질 단독으로는 리포터 유전자의 전사를 활성화시킬 수 없다: DNA-결합 도메인 하이브리드는 활성화 기능을 제공할 수 없기 때문에 불가능하고, 활성화 도메인 하이브리드는 액티베이터의 결합 부위에 국소화될 수 없기 때문에 불가능하다. 2개의 하이브리드 단백질 간의 상호작용은 기능적 액티베이터 단백질을 복원시키고, 그 결과 리포터 유전자가 발현되며, 이것은 리포터 유전자 생성물의 분석에 의해 검출된다.
- [0265] "미끼(bait)" 유전자 생성물과 상호작용하는 단백질을 위한 활성화 도메인 라이브러리를 선별하기 위하여, 2-하이브리드 체계 또는 관련된 방법이 사용될 수 있다. 일례로서, 그리고 비제한적으로, Bv8은 미끼 유전자 생성물로서 사용될 수 있다. 전체 게놈 또는 cDNA 서열이 활성화 도메인을 코드화하는 DNA에 융합된다. 이러한 라이브러리 및 DNA-결합 도메인에 융합된 미끼 Bv8 유전자 생성물의 하이브리드를 코드화하는 플라스미드가 효모 리포터 균주 내로 동시형질전환되고, 얻어지는 형질전환체를 리포터 유전자를 발현하는 것에 대하여 선별한다. 예를 들어, 비제한적으로, 미끼 Bv8 유전자 서열, 예를 들어 유전자 개방 관독 프레임을 벡터 내로 클론화하여, GAL4 단백질의 DNA-결합 도메인을 코드화하는 DNA에 번역적으로 융합되도록 한다. 이러한 콜로니들을 정제하고, 리포터 유전자 발현의 원인이 되는 라이브러리 플라스미드를 단리한다. 이어서, 라이브러리 플라스미드에 의해 코드화된 단백질을 동정하기 위하여, DNA 서열화를 사용한다.
- [0266] 당 기술분야에서 일상적으로 실행되는 방법을 사용하여, 미끼 Bv8 유전자 생성물과 상호작용하는 단백질이 검출되어지는 세포주의 cDNA 라이브러리를 형성할 수 있다. 예를 들어, 여기에 기재된 특정한 체계에 따르면, cDNA 단편이 GAL4의 전사 활성화 도메인에 번역에 의해 융합되도록, 이것을 벡터 내로 삽입할 수 있다. 이러한 라이브러리를, 미끼 Bv8 유전자-GAL4 융합 플라스미드와 함께, GAL4 활성화 서열을 함유하는 프로모터에 의해 진행되는 lacZ 유전자를 함유한 효모 균주 내로 공동-형질전환할 수 있다. GAL4 전사 활성화 도메인에 융합되고, 미끼 Bv8 유전자 생성물과 상호작용하는 단백질을 코드화하는 cDNA는 활성화 GAL4 단백질을 복원하고 이에 의해 발현을 진행시킨다. 발현을 진행시키는 콜로니를 당 기술분야에서 일상적인 방법에 의해 검출할 수 있다. 이어서, 이러한 균주로부터 cDNA를 정제하고, 당 기술분야에서 일상적으로 실행된 기술을 사용하여 미끼 Bv8 유전자-상호작용 단백질을 생성하고 단리하는데 사용할 수 있다.
- [0267] a. Bv8 발현 또는 활성을 조절하는 화합물의 분석
- [0268] Bv8과 상호작용하는 (예를 들어, 결합하는) 화합물, Bv8과 그의 결합 파트너, 동족체 또는 수용체와의 상호작용을 방해하는 화합물, 및 Bv8 유전자 발현의 활성을 조절하거나 (다시말해서, Bv8 유전자 발현의 수준을 조절하거나) 또는 신체내에서 Bv8의 수준을 조절하는 화합물을 동정하기 위하여 하기 분석을 설계한다. Bv8 유전자 조절 서열 (예를 들어, 프로모터 서열)에 결합하고, 따라서 Bv8 유전자 발현을 조절할 수 있는 화합물을 동정하는 분석을 추가로 사용할 수도 있다. 예를 들어, 문헌 [Platt, K.A., 1994, J.Biol.Chem. 269:28558-28562]을 참조한다.
- [0269] 본 발명에 따라 선별될 수 있는 화합물은, 펩티드, 항체 및 그의 단편, 및 Bv8 또는 Bv8 수용체에 결합하고, 자연 리간드에 의해 유발된 활성을 모방하거나 (즉, 작동물질) 자연 리간드에 의해 유발된 활성을 억제하는 (즉, 길항물질) 기타 유기 화합물 (예를 들어, 펩티도미메틱스)을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.
- [0270] 이러한 화합물은, 이에 한정되지는 않지만, 펩티드, 예를 들어 랜덤 펩티드 라이브러리 군에 한정되지는 않지만 이를 포함하는 가용성 펩티드 (예를 들어 문헌 [Lam, K.S. 등, 1991, Nature 354:82-84; Houghten, R. 등, 1991, Nature 354:84-86]을 참조); 및 D- 및/또는 L- 배위 아미노산으로 만들어진 조합 화학-유래 분자 라이브

러리, 포스포펩티드 (랜덤하거나 부분적으로 변성되고 지정된 포스포펩티드 라이브러리의 균을 포함하지만 이에 한정되지 않음; 예를 들어 [Songyang, Z. 등, 1993, Cell 72:767-778] 참조), 항체 (다클론성, 단클론성, 인체화, 안티-이디오타입, 키메라 또는 단일 사슬 항체, 및 FAb, F(abN)<sub>2</sub> 및 FAb 발현 라이브러리 단편, 및 그의 에피토프-결합 단편을 포함하지만 이에 한정되지는 않음), 및 유기 또는 무기 소 분자를 포함할 수도 있다.

[0271] 본 발명에 따라 선별될 수 있는 다른 화합물들은, 적절한 세포(예를 들어 내피 세포)로 도입될 수 있고 Bv8 매개 경로에 관련된 Bv8 유전자 또는 일부 기타 유전자의 발현에 영향을 미치는 (예를 들어, 조절 영역 또는 유전자 발현에 연관된 전사 인자와의 상호작용에 의해) 유기 소 분자; 또는 Bv8의 활성 또는 Bv8 신호 전도, 이화 또는 대사 경로에 연관되는 기타 일부 세포내 인자의 활성에 영향을 미치거나 이를 대체하는 화합물을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0272] 컴퓨터 모형화 및 조사 기술은, Bv8 발현 또는 활성을 조절할 수 있는 화합물의 동정 또는 이미 동정된 화합물의 개선을 가능하게 한다. 이러한 화합물 또는 조성물을 동정하면, 활성 부위 또는 영역이 동정된다. 이러한 활성 부위는 전형적으로 리간드 결합 부위일 수 있다. 활성 부위는 당 기술 분야에 공지된 방법을 사용하여, 예를 들어 펩티드의 아미노산 서열로부터, 핵산의 뉴클레오티드 서열로부터, 또는 자연 리간드와 관련된 화합물 또는 조성물의 착물 연구로부터 동정될 수 있다. 후자의 경우에, 인자 위에서 착화 리간드가 발견된 위치를 찾아냄으로써 활성 부위를 찾기 위하여 화학적 또는 X-선 결정학 방법을 사용할 수 있다.

[0273] 이어서, 활성 부위의 3차원 기하 구조를 결정한다. 이것은 완전한 분자 구조를 결정할 수 있는 X-선 결정학을 포함한 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 다른 한편, 특정한 분자내 거리를 결정하기 위하여 고체 또는 액체 상 NMR를 사용할 수 있다. 부분 또는 전체 기하 구조를 수득하기 위하여 다른 실험적인 구조 결정 방법이 사용될 수 있다. 자연적 또는 인위적 착화 리간드를 사용하여 기하 구조를 측정할 수 있으며, 이것은 결정된 활성 부위 구조의 정확성을 증가시킬 수 있다.

[0274] 불완전하거나 불충분하게 정확한 구조가 결정된다면, 컴퓨터 기초 수치 모형화 방법을 사용하여 구조를 완성하거나 정확성을 높일 수 있다. 단백질 또는 핵산과 같은 특정한 생체중합체에 특이적인 파라미터화 모델, 분자 운동 계산을 근거로 한 분자 동력학적 모델, 열 집합을 기초로 한 통계 역학적 모델, 또는 조합된 모델을 포함하여, 어떠한 인지된 모형화 방법이라도 사용할 수 있다. 대부분의 모델 유형에 있어서, 성분 원자와 군 사이의 힘을 나타내는 표준 분자 역장(force field)이 필요하고, 이것은 물리화학에서 공지된 역장으로부터 선택될 수 있다. 불완전하거나 덜 정확한 실험 구조가, 이러한 모형화 방법에 의해 계산된 완전하고 더욱 정확한 구조에 대한 제약조건으로서 작용할 수도 있다.

[0275] 마지막으로, 실험적으로, 모형화에 의해 또는 이들의 조합에 의해 활성 부위 (또는 결합 부위)의 구조를 결정하면, 분자 구조에 대한 정보와 함께 화합물을 함유한 데이터베이스를 조사함으로써 후보 조절 화합물을 동정할 수 있다. 이러한 조사는, 결정된 활성 부위 구조와 일치하고 활성 부위를 한정하는 군과 상호작용하는 구조를 가진 화합물을 찾아낸다. 이러한 조사는 수작업일 수 있지만, 컴퓨터 보조를 받는 것이 바람직하다. 이러한 조사로부터 찾아낸 화합물은 Bv8 활성의 잠재적인 모듈레이터이다.

[0276] 대안적으로, 이미 공지된 조절 화합물 또는 리간드로부터 개선된 조절 화합물을 동정하기 위하여 이러한 방법들이 사용될 수 있다. 공지된 화합물의 조성물이 변경될 수 있고, 새로운 조성물에 적용되는 상기 기재된 실험 및 컴퓨터 모형화 방법을 사용하여 구조적인 변형 효과가 결정될 수 있다. 이어서, 개선된 적응 또는 상호작용이 얻어지는지를 결정하기 위하여, 변경된 구조를 화합물의 활성 부위 구조와 비교한다. 개선된 특이성 또는 활성을 가진 변형된 조절 화합물 또는 리간드를 수득하기 위하여, 이러한 방식으로, 예컨대 측쇄 기를 바꾸는 것에 의하여, 조성에서의 체계적인 변화를 빨리 평가할 수 있다.

[0277] Bv8의 활성 부위 (또는 결합 부위)의 동정화를 기초로 하여 조절 화합물을 동정하기 위해 유용한 실험적 및 컴퓨터 모형화 방법, 및 관련된 형질도입 및 전사 인자가 당업자에게 명백할 것이다.

[0278] 분자 모형화 시스템의 예는 CHARMM 및 퀀타(QUANTA) 프로그램 (미국 메사츄세츠주 왈탐의 폴리젠 코포레이션 (Polygen Corporation))이다. CHARMM은 에너지 최소화 및 분자 동력학적 기능을 수행한다. QUANTA는 분자 구조의 구축, 그래픽 모형화 및 분석을 수행한다. 퀀타는 상호작용 구축, 변형, 가시화, 및 분자 상호간 거동의 분석을 가능하게 한다.

[0279] 다수의 문헌들, 예컨대 문헌 [Rotivinen 등, 1988, Acta Pharmaceutical Fennica 97:159-166; Ripka, New Scientist 54-57 (1988년 6월 16일); McKinaly and Rossmann, 1989, Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 29:111-122; Perry and Davies, OSAR: Quantitative Structure-Activity Relationships in Drug Design pp.189-193

(Alan R.Liss, Inc. 1989); Lewis and Dean, 1989, Proc.R.Soc.Lond. 236:125-140 및 141-162]이 특정한 단백질과 상호작용하는 약물의 컴퓨터 모형을 검토하고 있으며, 핵산 성분을 위한 모형 수용체에 관해서는 문헌 [Askew 등, 1989, J.Am.Chem.Soc. 111:1082-1090]을 참조한다. 화학물질을 선별하고 그래프로 나타내는 다른 컴퓨터 프로그램은, 바이오디자인, 인코포레이티드(BioDesign, Inc.) (미국 캘리포니아주 파사데나); 알레릭스 인코포레이티드(Allelix, Inc.) (캐나다 온타리오 미시소가); 및 하이퍼큐브 인코포레이티드(Hypercube, Inc.) (미국 온타리오 캄브리지)와 같은 회사로부터 입수가 가능하다. 이들은 주로 특정한 단백질에 특이적인 약물에 사용하기 위해 설계되었으나, 일단 영역을 동정한 후에는 DNA 또는 RNA의 영역에 특이적인 약물의 설계에도 적용될 수도 있다.

[0280] 결합을 바꿀 수 있는 화합물의 설계 및 생성을 참조하여 상기 기재되긴 하였으나, 억제인자 또는 활성인자인 화합물을 위하여, 천연 생성물 또는 합성 화학물질 및 단백질을 포함한 생물학적 활성 물질을 포함하여 공지된 화합물의 라이브러리를 선별할 수 있다.

[0281] 여기에 기재된 것과 같은 분석을 통해 동정된 화합물은, 예를 들어 Bv8 유전자 생성물의 생물학적 기능을 밝히는데 유용할 수 있다. 이러한 화합물은 다양한 생리학적 질환을 치료하기 위하여 치료적으로 유효한 양으로 환자에게 투여될 수 있다. 치료적으로 유효한 양이란, 생물학적 증상의 경감, 방해, 예방 또는 변화를 가져오기에 충분한 화합물의 양을 가리킨다.

[0282] b. Bv8에 결합되는 화합물의 분석

[0283] Bv8과 상호작용(예를 들어, 결합)하거나 모방할 수 있는 화합물, 또는 동족 수용체, 결합 파트너 또는 기질에 대한 Bv8의 결합을 방해할 수 있는 화합물을 동정하기 위하여 시스템을 설계할 수 있다. 동정된 화합물은 예를 들어 야생형 및/또는 변이주 Bv8 유전자 생성물의 활성을 조절하는데 유용할 수 있거나; Bv8의 생물학적 기능을 구성하는데 유용할 수 있거나; 정상 Bv8 상호작용을 혼란시키는 화합물을 동정하기 위한 선별에서 사용될 수 있거나; 또는 이러한 상호작용을 그 스스로 붕괴시키거나 활성화할 수 있다.

[0284] Bv8, 또는 Bv8 동족 수용체 또는 기질에 결합하는 화합물을 동정하기 위해 사용되는 분석의 원리는, 2개의 성분이 상호작용하고 결합하기에 충분한 조건하에서 충분한 시간동안 Bv8과 시험 화합물의 반응 혼합물을 제조하고, 따라서 반응 혼합물에서 제거 및/또는 검출될 수 있는 작물을 형성하는 것과 연관된다. 사용된 Bv8 종은 선별 분석의 목표에 따라 다양하게 변할 수 있다. 예를 들어, 천연 수용체의 작동물질을 원한다면, 전체 길이 Bv8 또는 가용성의 끝이 절단된 Bv8, 펩티드, 또는 분석 체계(예를 들어, 표지화, 얻어진 작물의 단리, 등)에 장점을 부여하는 단백질 또는 폴리펩티드에 융합된 하나 이상의 Bv8 도메인을 함유하는 융합 단백질을 이용할 수 있다. Bv8과 직접적으로 상호작용하는 화합물을 추구한다면, Bv8에 상응하는 펩티드 및 Bv8을 함유하는 융합 단백질을 사용할 수 있다.

[0285] 선별 분석은 다양한 방식으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 이러한 분석을 수행하는 한가지 방법은 Bv8, 폴리펩티드, 펩티드 또는 그로부터의 융합 단백질 또는 시험 물질을 고체상에 고정시키고, 반응 마지막에 고체 상에 고정된 Bv8/시험 화합물 작물을 검출하는 것을 포함한다. 이러한 방법의 하나의 구현양태에서, Bv8 반응물을 고체 표면 위에 고정시킬 수 있고, 고정되지 않은 시험 화합물을 직접적으로 또는 간접적으로 표지화할 수 있다.

[0286] 실제로, 마이크로적정 평판이 고체 상으로서 편리하게 사용될 수 있다. 고정된 성분은 비-공유 또는 공유 부착에 의해 고정화될 수 있다. 고체 표면을 단백질 용액으로 간단히 코팅하고 건조시킴으로써 비-공유 부착을 달성할 수 있다. 대안적으로, 고체 표면에 단백질을 고정하기 위하여, 고정화하고자 하는 단백질에 특이적인 고정화 항체, 바람직하게는 단클론성 항체를 사용할 수 있다. 미리 표면을 제조하고 보관할 수도 있다.

[0287] 분석을 수행하기 위하여, 고정된 성분을 함유하는 코팅된 표면에 비고정화 성분을 첨가한다. 반응이 완결된 후에, 형성된 작물이 고체 표면 위에 고정화된 채로 유지되도록 하는 조건하에서 반응되지 않은 성분을 제거한다(예를 들어, 세척에 의해). 고체 표면에 고정된 작물의 검출은 다수의 방법으로 달성될 수 있다. 미리 고정화되지 않은 성분을 예비표지화한다면, 표면 위에 고정화된 표지의 검출은 작물이 형성되었음을 암시하는 것이다. 미리 고정화되지 않은 성분이 예비-표지화되지 않는다면, 예를 들어 미리 고정화되지 않은 성분에 특이적인 표지화 항체를 사용하여, 표면 위에 고정화된 작물을 검출하기 위해 간접적인 표지가 사용될 수 있다(항체를 직접적으로 표지화하거나 간접적으로 표지화 안티-Ig 항체로 표지화할 수도 있다).

[0288] 대안적으로, 반응을 액체상으로 수행하고; 미반응된 성분으로부터 반응 생성물을 분리하고; 예를 들어 Bv8 단백질, 폴리펩티드, 펩티드 또는 융합 단백질 또는 용액 중에 형성된 작물을 고정하기 위해 시험 화합물에 특이적

인 고정화 항체 및 고정된 작물을 검출하기 위해 가능한 작물의 다른 성분에 특이적인 표지화 항체를 사용하여, 작물을 검출한다

[0289]

c. Bv8 상호작용을 방해하는 화합물에 대한 분석

[0290]

이러한 논의를 위하여, Bv8과 상호작용하는 거대분자를 "결합 파트너"라 일컫는다. 이러한 결합 파트너는 Bv8 매개 생물학적 경로에 연관되는 것으로 생각된다. 따라서, 신체에서 Bv8 활성을 조절하거나 증가시키거나/거나 이러한 활성 (또는 그의 결핍)과 연관된 질병을 제어하는데 유용할 수 있는 결합 파트너의 상호작용을 방해하거나 혼란시키는 화합물을 동정하는 것이 바람직하다.

[0291]

Bv8 및 결합 파트너 또는 파트너들 사이의 상호작용을 방해하는 화합물을 동정하기 위해 사용되는 분석 체계의 기본 원리는, 2개의 성분이 상호작용할 수 있기에 충분한 조건하에서 충분한 시간 동안 Bv8 또는 그의 일부 변이체 및 결합 파트너를 함유한 반응 생성물을 제조하고, 이렇게 하여 작물을 형성하는 것을 포함한다. 화합물의 억제 활성을 시험하기 위하여, 시험 화합물의 존재 및 부재하에서 반응 혼합물을 제조한다. 시험 화합물을 초기에 반응 혼합물에 포함시킬 수도 있거나, 또는 Bv8 및 그의 결합 파트너의 첨가에 이어서 첨가할 수도 있다. 시험 화합물 없이, 또는 위약과 함께 대조 반응 혼합물을 배양한다. Bv8과 결합 파트너 간의 작물의 형성을 검출한다. 시험 화합물을 함유하는 반응 혼합물에서가 아니라, 대조 반응에서의 작물 형성은, 화합물이 Bv8 및 상호작용성 결합 파트너의 상호작용을 방해한다는 것을 암시한다. 추가로, 시험 화합물 및 일반적 Bv8 단백질 함유하는 반응 혼합물 내에서의 작물 형성을, 시험 화합물 및 변이체 Bv8을 함유하는 반응 혼합물 내에서의 작물 형성과 비교할 수 있다. 이러한 비교는, 정상 단백질이 아니라 변이체 또는 변이된 Bv8의 상호작용을 특이적으로 혼란시키는 화합물을 동정하고자 하는 경우에 중요할 수 있다.

[0292]

Bv8과 결합 파트너 간의 상호작용을 방해하는 화합물의 분석은 이중 또는 동종 방식으로 수행될 수 있다. 이중 분석은 Bv8 또는 그의 결합 파트너를 고체 상 위에 고정시키고, 반응 마지막에 고체 상 위에 고정된 작물을 검출하는 것을 포함한다. 동종 분석에서, 전체 반응을 액체상에서 수행한다. 어느 하나의 접근법에서, 반응물의 첨가 순서를 달리하여, 시험되는 화합물에 대해 상이한 정보를 수득할 수 있다. 예를 들어, 시험 물질의 존재 하에서 반응을 수행함으로써, 다시말해서 Bv8 및 상호작용성 결합 파트너의 전에 또는 그와 동시에 시험 물질을 반응 혼합물에 첨가함으로써, 경쟁에 의해 상호작용을 방해하는 시험 화합물을 동정할 수 있다. 대안적으로, 작물이 형성된 후에 반응 혼합물에 시험 화합물을 첨가함으로써, 미리 형성된 작물을 붕괴시키는 시험 화합물, 예를 들어 작물로부터 하나의 성분을 치환하는 더 높은 결합 상수를 가진 화합물을 시험할 수 있다. 다양한 방식을 이하 간략하게 설명한다.

[0293]

이중 분석 체계에서, 비-고정된 종을 직접적으로 또는 간접적으로 표지화하면서, Bv8 또는 상호작용성 결합 파트너를 고체 표면 위에 고정시킨다. 실제로, 마이크로적정 평판이 편리하게 사용된다. 고정된 종을 비-공유결합 또는 공유결합 부착에 의해 고정화시킬 수도 있다. 비-공유결합 부착은 고체 표면을 Bv8 용액 또는 결합 파트너로 코팅하거나 건조시킴으로써 간단하게 달성될 수 있다. 대안적으로, 고정되는 종에 특이적인 고정화 항체를 사용하여 종을 고체 표면에 고정시킬 수도 있다. 표면을 미리 제조하고 보관할 수도 있다.

[0294]

분석을 수행하기 위하여, 고정된 종의 파트너를 시험 화합물과 함께 또는 시험 화합물 없이 코팅 표면에 노출시킨다. 반응을 완결한 후에, 반응되지 않은 성분을 제거(예를 들어, 세척에 의해)하고, 형성된 작물을 고체 표면 상에 고정화된 채로 유지시킨다. 고체 표면 위에 고정된 작물의 검출은 여러 방법으로 달성될 수 있다. 비-고정화된 종을 예비-표지화한 경우, 표면 위에 고정화된 표지의 검출은 작물이 형성되었음을 암시하는 것이다. 비-고정화 종을 예비-표지화하지 않은 경우에, 예를 들어 초기에 비-고정화된 종에 대해 특이적인 표지화 항체를 사용하여, 표면 위에 고정된 작물을 검출하기 위하여 간접적인 표지가 사용될 수 있다 (다시말해서, 항체를 직접적으로 표지화할 수도 있거나 또는 표지화된 안티-Ig 항체로 간접적으로 표지화할 수도 있다). 반응 성분의 첨가 순서에 의존하여, 작물 형성을 억제하거나 미리형성된 작물을 붕괴시키는 시험 화합물을 검출할 수 있다.

[0295]

대안적으로, 예를 들어, 용액중에 형성된 작물을 고정화시키기 위해 결합 성분중의 하나에 특이적인 고정화된 항체, 및 고정된 작물을 검출하기 위해 다른 파트너에 특이적인 표지화 항체를 사용하여, 시험 화합물, 미반응된 성분으로부터 분리된 반응 생성물, 및 검출된 작물의 존재 또는 부재하에 액체 상에서 반응을 수행할 수 있다. 다시, 액체 상으로의 반응물 첨가 순서에 의존하여, 작물을 억제하거나 미리형성된 작물을 붕괴시키는 시험 화합물을 동정할 수 있다.

[0296]

본 발명의 대안적인 구현양태에서, 동종 분석을 사용할 수 있다. 이러한 접근법에서, Bv8 및 상호작용성 결합

파트너의 미리형성된 착물이 제조되며, 이때 Bv8 또는 그의 결합 파트너의 어느 하나가 표지화되지만, 표지에 의해 발생된 신호는 착물 형성으로 인해 제거된다 (예를 들어, 미국 특허 4,109,496호(Rubenstein) 참조, 이 특허는 면역분석을 위해 이러한 접근법을 사용한다). 미리형성된 착물로부터의 하나의 종과 경쟁하고 이것을 대체하는 시험 화합물을 첨가하면, 배경 위에서 신호가 발생될 수 있다. 이러한 방식으로, 상호작용을 붕괴시키는 시험 물질을 동정할 수 있다.

[0297] 특정한 구현양태에서, 고정화를 위해 Bv8 용합을 제조할 수 있다. 예를 들어, 얻어진 용합 단백질에서 결합 활성이 유지되도록, pGEX-5X-1과 같은 용합 벡터를 사용하여 Bv8 또는 그의 펩티드 단편을 글루타티온-S-트랜스퍼라제 (GST) 유전자에 용합시킬 수 있다. 당 기술분야에서 일상적으로 실행되고 상기 기재된 방법을 사용하여, 단클론성 항체를 증가시키기 위해 상호작용성 결합 파트너를 정제하고 사용할 수 있다. 예를 들어, 당 기술분야에서 보통 실행되는 방법에 의하여, 이러한 항체를 방사성 동위원소 <sup>125</sup>I로 표지화할 수 있다. 이중 분석에서, 글루타티온-아가로스 비이드에 용합 단백질을 고정시킬 수 있다. 이어서, 상호작용 및 결합이 일어나도록, 시험 화합물의 존재 또는 부재하에 결합 파트너를 첨가할 수 있다. 반응 기간의 마지막에, 결합되지 않은 물질을 세척해 낼 수 있고, 표지화된 단클론성 항체를 체계에 첨가하여 착물화 성분에 결합시킬 수 있다. Bv8과 상호작용성 결합 파트너 간의 상호작용은 글루타티온-아가로스 비이드와 연관된 방사능의 양을 측정함으로써 검출될 수 있다. 시험 화합물에 의해 상호작용을 성공적으로 억제하면 측정된 방사능이 저하될 것이다.

[0298] 대안적으로, GST 용합 단백질 및 상호작용성 결합 파트너를 고체 글루타티온-아가로스 비이드의 부재하에 액체 중에서 함께 혼합할 수 있다. 종을 상호작용시키는 동안 또는 그 후에 시험 화합물을 첨가할 수 있다. 이러한 혼합물을 글루타티온-아가로스 비이드에 첨가하고 결합되지 않은 물질을 세척해 낼 수 있다. Bv8과 결합 파트너 간의 상호작용의 억제 정도는, 표지화 항체를 첨가하고, 비이드와 연관된 방사능을 측정함으로써 검출될 수 있다.

[0299] 본 발명의 다른 구현양태에서, 전체 길이 단백질의 하나 또는 양쪽 모두 대신에, (결합 파트너가 단백질인 경우에) Bv8 및/또는 상호작용성 또는 결합 파트너의 결합 도메인에 상응하는 펩티드 단편을 사용하여 동일한 기술을 사용할 수 있다. 결합 부위를 동정하고 단리하기 위하여, 당 기술분야에서 보통 실행되는 다수의 방법을 사용할 수 있다. 이러한 방법은, 하나의 단백질을 코드화하는 유전자를 돌연변이시키고 및 공동-면역침전 분석에서 결합 붕괴를 선별하는 것을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 이어서, 착물에서 두번째 종을 코드화하는 유전자의 보상성 돌연변이를 선택할 수 있다. 각각의 단백질을 코드화하는 유전자의 서열 분석은, 상호작용성 결합에 연관된 단백질의 영역에 상응하는 돌연변이를 밝혀낸다. 대안적으로, 상기 기재된 방법을 사용하여 하나의 단백질을 고체 표면에 고정시킬 수 있고, 트립신과 같은 단백질분해 효소로 처리된 그의 표지화 결합 파트너와 상호작용하거나 그에 결합될 수 있다. 세척 후에, 결합 도메인을 포함하는 비교적 짧은 표지화 펩티드는 고체 물질과 연결된 채로 유지되고, 이것은 아미노산 서열화에 의해 단리되고 동정될 수 있다. 또한, 세포내 결합 파트너를 코드화하는 유전자가 일단 수득된 후에, 단백질의 펩티드 단편을 발현하기 위해 짧은 유전자 단편을 기술적으로 처리할 수 있고, 이어서 결합 활성에 대해 시험하고 정제하거나 합성할 수 있다.

[0300] 예를 들어, 비제한적으로, GST 용합 단백질을 형성하고, 이것을 글루타티온 아가로스 비이드에 결합시킴으로써, Bv8을 상기 기재된 바와 같이 고체 재료에 고정시킬 수 있다. 상호작용성 결합 파트너를 방사성 동위원소, 예컨대 <sup>35</sup>S로 표지화하고, 트립신과 같은 단백질분해 효소로 절단할 수 있다. 이어서, 절단 생성물을 고정화 용합 단백질에 첨가하고 결합시킬 수 있다. 결합되지 않은 펩티드를 세척해 낸 후에, 세포내 결합 파트너 결합 도메인을 나타내는 표지화된 결합 물질을 용출하고, 정제하고, 공지된 방법에 의해 아미노산 서열에 대해 분석할 수 있다. 이렇게 동정된 펩티드를 합성적으로 생성하거나 제조할 DNA 기술을 사용하여 적절한 촉진성 단백질에 용합시킬 수 있다.

[0301] 6. 제약학적 조성물

[0302] 여기에 기재된 Bv8 폴리펩티드 및 그의 모듈레이터를 치료제로서 사용할 수도 있다. 공지된 방법에 따라서 본 발명의 Bv8 폴리펩티드 및 Bv8 모듈레이터를 제형하여 제약학적으로 유용한 조성물을 제조하고, 이에 의해 Bv8 생성물을 제약학적으로 허용가능한 담체 부형제와의 혼합물로 조합한다. 원하는 정도의 순도를 가진, 바람직하게는 필수적으로 순수한 Bv8을 임의의 생리학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제(레밍턴스 파마슈티칼 사이언스, 상동)와 혼합함으로써 동결건조된 케이크 또는 수용액의 형태로 Bv8의 치료 제제를 제조한다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는, 사용되는 투여량 및 농도에서 노출된 세포 또는 포유동물에 대해 비독성이다. 그의 예는 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산을 포함한 산화방지제; 저 분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로블

린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함한 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트화제; 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당 알콜; 소듐과 같은 염-형성 반대이온; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 트윈(Tween), 플루로닉스(Pluronic) 또는 PEG를 포함한다.

- [0303] 생체내 투여를 위해 사용되는 Bv8은 무균성이어야 한다. 이것은, 동결건조 및 복원 전 또는 후에, 당 기술분야에 공지된 방법, 예컨대 무균 여과 막을 통해 여과함으로써 쉽게 달성될 수 있다. Bv8은 동결건조된 형태로 보관될 수도 있다. 일반적으로 무균 획득 포트, 예를 들어 피하 주사 바늘로 구멍을 뚫을 수 있는 마개를 가진 정맥내 용액 주머니 또는 바이알을 가진 용기 내에 치료용 Bv8 조성물을 넣는다.
- [0304] 임의로, 다른 성장 인자와 협력하여 Bv8을 조합하거나 투여한다. 예를 들어, 이것을 EG-ECGF 또는 VEGF와 조합할 수도 있다.
- [0305] Bv8을 암을 치료하기 위한 기타 통상적인 치료법과 함께 사용할 수도 있다.
- [0306] 투여 경로는 공지된 방법, 예를 들어 정맥, 복강내, 뇌내, 근육내, 안구내, 동맥내 또는 병소내 경로에 의한 주사 또는 주입, 국소 투여 또는 서방형 체계에 따른다.
- [0307] 본 발명의 제약학적 조성물의 투여량 및 원하는 약물 농도는 의도하는 특정한 용도에 의존하여 변할 수 있다. 적절한 투여량 또는 투여 경로의 결정은 내과외사에 기술 범위에 속한다. 동물 실험은 인간 요법을 위해 유효한 투여량의 결정을 위해 신뢰할 수 있는 지침을 제공한다. 유효한 투여량의 중간 조정은 문헌 [Mordenti, J. 및 Chappell, W. "The use of interspecies scaling in toxicokinetics", Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobi 등, Eds., Pergamon Press, New York 1989, pp.42-96]에 기재된 원리에 따라 수행될 수 있다.
- [0308] Bv8 폴리펩티드의 투여를 필요로 하는 질병 또는 질환의 치료를 위해 적합한 방출 특성을 가진 제제에서 Bv8 폴리펩티드 또는 모듈레이터의 서방형 투여가 바람직한 경우, Bv8 폴리펩티드 또는 모듈레이터의 미소캡슐화가 의도된다. 예를 들어, 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐 (예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐), 콜로이드성 약물 전달 체계 (예를 들어, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 또는 마크로에멀전에 정제된 형태의 Bv8을 포획시킬 수도 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 제16판, 1980 (A.Osol.Ed.)]에 개시되어 있다.
- [0309] 치료 용도를 위한 서방형 제제 내에 Bv8을 혼입할 수도 있다. 서방형 제제의 적절한 예는 성형품 형태, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 반투과성 중합체 기질을 포함한다. 서방형 기질의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예, 문헌 [Langer 등, J.Biomed.Mater.Res., 15:167-277 (1981)] 및 [Langer, Chem. Tech, 12:98-105 (1982)]에 기재된 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 3,773,919호, EP 58,481), L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체 (Sidman 등, Biopolymers 22:547 (1983)), 비분해성 에틸렌 비닐 아세테이트 (Langer 등, 상동) 또는 분해성 젯산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포트(Lupron Depot)<sup>TM</sup> (젯산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 미소구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산 (EP 133,988)을 포함한다.
- [0310] 에틸렌-비닐 아세테이트 및 젯산-글리콜산과 같은 중합체는 100일에 걸쳐 분자를 방출할 수 있으나, 특정한 히드로겔은 더 짧은 기간동안 단백질을 방출한다. 캡슐화된 단백질이 장기간 동안 신체내에 유지될 때, 37°C에서 수분에 노출된 결과로서 이들이 변성되거나 응집될 수 있고 그 결과 생물학적 활성이 소실되고 면역원성이 변화될 수 있다. 관련된 메카니즘에 의존하여 단백질 안정화를 위해 합리적인 전략을 궁리해 낼 수 있다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디설파이드 상호교환을 통해 분자간 S-S 결합인 것으로 밝혀진다면, 술폰히드릴 잔기를 변성시키고, 산성 용액으로부터 동결건조하고, 적절한 첨가제를 사용하여 수분 함량을 조절하고, 특정한 중합체 기질 조성물을 개발함으로써 안정화를 달성할 수 있다.
- [0311] 서방형 Bv8 조성물은 또한 리포솜에 포획된 Bv8을 포함한다. Bv8을 함유하는 리포솜은 당 기술분야에 공지된 방법에 의해 제조된다 [Epstein 등, 1985, Proc.Natl.Acid.Sci. 82:3688; Hwang 등, 1980, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4030; DE 3 218 121 A; EP 52322A; EP 36676A; EP 88046A; EP 143949A; EP 142641A; 일본 특허 출원 83-118008호; 미국 특허 4,485,045호 및 4,544,545호; 및 EP 102,324A]. 통상적으로, 리포솜은 작은 (약 200 내지 800 Å) 단일라멜라 유형이고, 여기에서 지질 함량은 약 30몰% 콜레스

테를 보다 많고, 선택된 비율은 최적의 Bv8 요법을 위해 조절된다.

- [0312] 국소 적용될 때, Bv8은 다른 성분들, 예컨대 담체 및/또는 아주반트와 적절히 조합된다. 이들이 생리학적으로 허용가능하고 원하는 투여를 위해 효능이 있어야 하며, 조성물의 활성 성분의 활성을 저하시키지 말아야 하는 것을 제외하고는, 다른 성분들의 성질에 대해 특별한 제한이 없다. 적절한 부형제의 예는 정제된 콜라겐을 갖거나 갖지 않은 연고, 크림, 겔, 또는 현탁액을 포함한다. 조성물은 경피 패치, 플라스터 및 봉대 내에, 바람직하게는 액체 또는 반액체 형태로 함침될 수도 있다.
- [0313] 겔 제제를 수득하기 위하여, 액체 조성물에 제형된 Bv8을 유효량의 수용성 다당류 또는 합성 중합체, 예컨대 PEG와 혼합하여, 국소 적용하기에 적절한 점도를 가진 겔을 형성할 수 있다. 사용될 수 있는 다당류는 예를 들어 셀룰로스 유도체, 예컨대 알킬 셀룰로스, 히드록시알킬 셀룰로스 및 알킬히드록시알킬 셀룰로스, 예를 들어 메틸셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스, 카르복시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스 및 히드록시프로필 셀룰로스를 포함한 에테르화 셀룰로스 유도체; 전분 및 분류된 전분; 한천; 알긴산 및 알기네이트; 아라비아 고무; 플루란; 아가로스; 카라기난; 텍스트란; 텍스트린; 프러탄; 이눌린; 만난; 크실란; 아라비난; 키토산; 글리코겐; 글루칸; 및 합성 생체중합체; 뿐만 아니라 크산탄 고무; 구아 고무; 로커스트 콩 고무; 아라비아고무; 트라가칸트 고무; 및 카라야 고무; 및 이들의 유도체 및 혼합물을 포함한다. 바람직한 겔화제는 생물학적 체계에 불활성이고, 비독성이고, 제조가 간단하고, 너무 유동성이거나 점성이 아니고, 그 안에 유지된 Bv8을 불안정화시키지 않는 것이다.
- [0314] 바람직하게는, 다당류는 에테르화 셀룰로스 유도체, 더욱 바람직하게는 정의되고 정제되고 USP에 기록된 것, 예를 들어 메틸셀룰로스 및 히드록시알킬 셀룰로스 유도체, 예컨대 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스 및 히드록시프로필 메틸셀룰로스이다. 가장 바람직한 것은 메틸셀룰로스이다.
- [0315] 겔화를 위해 유용한 폴리에틸렌 글리콜은 전형적으로 적절한 점도를 수득하기 위해 고 분자량 및 저 분자량 PEG의 혼합물이다. 예를 들어, 페이스트를 수득하기 위해 적절한 비율로 혼합할 때, 분자량 400-600의 PEG와 분자량 1500의 PEG의 혼합물이 이 목적을 위해 효과적이다.
- [0316] 다당류 및 PEG에 적용되는 용어 "수용성"이란, 콜로이드성 용액 및 분산액을 포함하는 것을 의미한다. 일반적으로, 셀룰로스 유도체의 용해성은 에테르기의 치환 정도에 의해 결정되고, 여기에서 유용한 안정화 유도체는, 유도체에 수용성을 부여하기 위하여, 셀룰로스 사슬 내의 안히드로글루코스 단위 당 충분한 양의 에테르기를 가져야 한다. 안히드로글루코스 단위 당 적어도 0.35개 에테르기의 치환 정도가 일반적으로 충분하다. 추가로, 셀룰로스 유도체는 알칼리 금속 염, 예를 들어 Li, Na, K 또는 Cs 염의 형태일 수 있다.
- [0317] 메틸셀룰로스가 겔에서 사용된다면, 바람직하게는 약 2 내지 5%, 더욱 바람직하게는 약 3%의 겔을 포함하고, Bv8은 겔 1ml당 약 300-1000mg의 양으로 존재한다.
- [0318] 특정한 상황에서 약물을 전달하기 위한 수단으로서 반투과성, 이식가능한 막 장치가 유용하다. 예를 들어 Bv8, Bv8 변이체, Bv8 키메라 또는 Bv8 작동물질 또는 길항물질을 분비하는 세포를 캡슐화할 수 있고, 이러한 장치를 환자에게 이식할 수 있다. 따라서, 특정한 조건을 위해 필요에 따라 Bv8, 그의 작동물질 또는 길항물질을 분비하는 세포를 그것을 필요로 하는 환자의 신체에 이식하는 것을 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법이 포함된다. 마지막으로, 본 발명은 반투과성 막을 포함한 이식물을 환자에게 이식함으로써 암을 치료 또는 예방하기 위한 장치, 및 상기 막 내에서 캡슐화된 Bv8 (또는 특정한 조건을 위해 필요한 경우 그의 작동물질 또는 길항물질)을 분비하는 세포를 제공하고, 상기 막은 Bv8 (또는 그의 작동물질 또는 길항물질)에 투과성이고 세포에 해로운 환자로부터의 인자에는 불투과성이다. 생체외에서 Bv8을 생성하도록 형질전환된 환자 자신의 세포를, 임의로 이러한 캡슐화 없이도, 환자에게 직접적으로 이식할 수 있다. 생체 세포의 막 캡슐화를 위한 방법은 당업자에게 친숙하고, 부당한 실험 없이도 캡슐화된 세포의 제조 및 환자 내로의 이식을 달성할 수 있다.
- [0319] Bv8 또는 Bv8 작동물질 또는 길항물질을 포함하는 제약학적 조성물을 바람직하게는 적절한 용기에 위치시킨다. 용기는 제약학적 조성물의 적절한 사용 및 투여량에 관한 상세한 지시를 첨부하는 것이 바람직하다. 당업자라면, 처리 방법에 의존하여 이러한 지시가 변할 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0320] 7. 치료 방법

[0321] 여기에 제공된 치료제를 다수의 치료에서 사용할 수 있다. 치료는 호르몬을 생성하는 조직 또는 내분비선과 연관된 상태 및/또는 과다하거나 원하지 않거나 조절되지 않은 혈관형성과 연관된 상태를 가진 포유동물, 바람직하게는 인간을 치료하는 것을 포함한다. 하나의 측면에서, Bv8 또는 Bv8 작동물질을 그것이 필요한 포유동물에

그 상태를 치료하기에 유효한 양으로 투여한다. Bv8은 폴리펩티드 또는 핵산 형태로 투여될 수 있다. 바람직하게는, 특정한 호르몬을 생성하는 세포 수의 증가 또는 세포의 생존을 필요로 하는 조건에서 Bv8 또는 Bv8 작동물질이 사용된다. 이러한 상태의 예는 당뇨병이다. 다른 상태는 생식 기관의 세포, 예컨대 고환 세포의 수를 증가시키거나 그의 생존을 향상시키는 것을 원하는 상태이다. 다른 상태는 새로운 혈관의 형성을 저하시키는 것을 원하는 상태이다. 이러한 상태의 예는 종양, 예컨대 고환암을 포함한다.

[0322] 다른 화합물 또는 조성물과 함께 Bv8을 투여할 수 있다. 하나의 구현양태에서, 화합물은 VEGF 또는 그의 작동물질 또는 길항물질이다. 임의로, 화합물은 VEGF와 같은 폴리펩티드를 코드화하는 핵산일 수도 있다.

[0323] 하나의 구현양태에서, 상기 4 및 5 절에서 선별 분석에 의해 동정된 것과 같은 화합물을 사용하여 Bv8 활성 또는 발현 수준을 조절할 수 있다. 구체적으로, Bv8 작동물질로서 동정되거나 수용체에 대한 Bv8의 결합을 자극할 수 있는 것으로 동정된 화합물은, 증가된 수준의 Bv8 활성이 요망되는 치료를 위해 유용할 수 있다. 유사하게, Bv8 유전자 발현을 증가시킬 수 있는 것으로 동정된 화합물은 이러한 유형의 치료를 위해 유용할 수도 있다.

[0324] 바람직하게는, Bv8 또는 그의 작동물질 또는 길항물질을, 호르몬 생성 조직 또는 내분비선과 연관된 상태, 바람직하게는 특정한 호르몬을 생성하는 세포 수의 감소, 세포 증식의 저하 또는 혈관형성의 감소가 필요한 상태를 가진 개체에 투여한다. 예를 들어, 수정을 조절하기에 유효한 양으로 Bv8 길항물질을 개체에 투여하는 것을 포함하는, 개체에서의 수정을 조절하는 방법이 제공된다. 또한, Bv8 길항물질은 포낭 및 호르몬 생성 조직에서의 과다증식과 연관된 기타 상태를 치료하기 위해 투여될 수도 있다.

[0325] 또한, 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 스테로이드 호르몬-의존성 질환을 해결할 수도 있다. 이러한 질환은 선천성 지형 부신 과형성, 불임증, 성적 성숙, 남성호르몬 의존성 종양, 조발 청춘기, 맥쿤-앨버라이트 증후군, 선천성 부신 형성 부전증, 및 저고나도트로핀성 성기능저하증을 포함한다.

[0326] 여기에 제공된 약제 및 조성물에 의해 치료될 수 있는 특정한 상태는 암, 특히 스테로이드-, 예를 들어 안드로겐-의존성 암이다. 여기에 제공된 암의 바람직한 치료 방법은, Bv8 길항물질을 암을 치료하는데 유효한 양으로 암에 걸렸거나 암에 걸릴 위험이 있는 개체에 투여하는 것을 포함한다. 하나의 구현양태에서, 암은 고환암이다.

[0327] 추가의 구현양태에서, Bv8 길항물질을 암의 치료에서 하나 이상의 화학요법제와 조합하여 환자에게 투여한다. 치료 효능이 증가되도록 화학요법제로 처리하기 전, 동안 또는 후에 Bv8을 투여할 수도 있다. 바람직한 화학요법제는 빈크리스틴, 시스플라틴, 메토티렉세이트, 3'-아지도-3'-테옥시티딘, 탁산 (예, 파클리탁셀 (탁솔 (TAXOL)<sup>(R)</sup>, 브리스틀-마이어스 스쿼브 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology), 미국 뉴저지주 프린스턴) 및 도세탁셀 (탁소테르(TAXOTERE)<sup>(R)</sup>, 룡 뵈랑 로러(Rhone Poulenc Rorer), 프랑스 안토니) 및/또는 안트라사이클린 항생물질을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 화학요법 약제를 위한 제조 및 투여 스케줄을 결정하는데 있어서 제조업자의 지시를 따를 수 있거나, 또는 숙련된 의사에 의해 경험적으로 결정될 수 있다. 이러한 화학요법을 위한 제조 및 투여 스케줄은 문헌 [Chemotherapy Service Ed., M.C.Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)]에 기재되어 있다.

[0328] 세포 증식을 증가시키고 세포 증식을 억제하는 방법은 생체내에서 또는 시험관내에서 수행될 수 있는 것으로 이해된다. 일부 경우에, 특정한 세포 유형의 증식을 자극하기 위하여 Bv8을 세포 치료에 시험관내에서 첨가하는 것이 바람직할 수도 있다. 이어서, 선별 분석에서 Bv8 처리된 샘플을 사용하거나 치료가 필요한 개체 또는 동물 모델에 이식할 수도 있다.

[0329] 치료적으로 사용되는 Bv8 또는 Bv8 작동물질 또는 길항물질의 유효량은 예를 들어 치료 목적, 투여 경로 및 환자의 상태에 의존된다. 따라서, 치료전문가가 최적의 치료 효과를 얻기 위해 투여량을 적정하고 필요한대로 투여 경로를 개선시키는 것이 필요하다. 전형적으로, 임상의학자는 원하는 효과를 달성하는 투여량에 달성될 때까지 Bv8을 투여할 것이다. 전신 치료를 위해 전형적인 1일 투여량은, 투여 경로에 의존하여, 1일당 포유동물 체중 kg당 약 10ng 내지 약 100mg이고, 바람직하게는 약 1μg/kg/일 내지 10mg/kg/일로 변할 수 있다. 상이한 치료 화합물 및 상이한 질병에 대하여 상이한 제제가 효과적이고, 하나의 기관 또는 조직을 표적으로 하는 투여는 다른 기관 또는 조직으로의 투여와는 상이한 방식으로 전달을 필요로 할 수도 있는 것으로 기대된다.

[0330] 대안적인 일반적인 제안으로서, Bv8을 제형하고, 조직내에서 효과적이지만 부당하게 독성이 아닌 Bv8 수준을 달성할 수 있는 투여량으로 표적 부위 또는 조직에 전달할 수 있다. 가능하다면 경험적으로 결정된 빈도로 연속

주입, 지속 방출, 국소 적용, Bv8-발현 세포 이식 또는 주사에 의해, 이러한 조직내 농도가 유지되어야 한다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 분석에 의해 쉽게 탐지될 수 있다.

[0331] 투여 섭생법은 각각의 상황을 기초로 하여 결정되어야 한다. 그러나, 바람직한 구현양태에서, Bv8 또는 Bv8 작동물질 또는 길항물질은 매일, 더욱 바람직하게는 격일, 더욱 더 바람직하게는 1주일에 2회 이상 투여된다. 치료는 바람직하게는 6개월 동안, 더욱 바람직하게는 1개월 동안, 더욱 더 바람직하게는 2주 이상 동안 계속된다. 당업자라면, 각각의 상황을 기초로 하여 치료전문가에 의해 실제 투여 섭생법이 결정되어야 함을 이해할 것이다.

[0332] Bv8 폴리펩티드를 코드화하는 핵산이 유전자 요법에서 사용될 수 있다. 유전자 요법 용도에서, 치료적으로 유효한 유전자 생성물의 생체내 합성을 달성하기 위하여 예를 들어 결핍 유전자의 치환을 위하여 유전자를 세포내에 도입한다. "유전자 요법"은, 단일 치료에 의해 지속적인 효과가 달성되는 통상적인 유전자 요법, 및 치료적으로 유효한 DNA 또는 mRNA의 1회 또는 반복 투여를 포함한 유전자 치료제의 투여를 모두 포함한다. 안티센스 RNA 및 DNA는 생체내에서 특정한 유전자의 발현을 차단하기 위한 치료제로서 사용될 수 있다. 세포막에 의한 제한된 섭취로 인해 세포내 농도가 낮은 것에도 불구하고, 짧은 안티센스 올리고뉴클레오티드는 이들이 억제제로서 작용하는 경우에 세포내로 들어올 수 있다는 것이 이미 밝혀졌다 [Zamecnik 등, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*. 83:4143-4146 (1986)]. 올리고뉴클레오티드는, 예를 들어 네가티브 하전된 포스포디에스테르 기를 비하전기로 치환함으로써, 그들의 섭취를 향상시키도록 개질될 수 있다.

[0333] 생체 세포 내로 핵산을 도입하기 위해 유용한 각종 기술이 존재한다. 이 기술은, 원하는 숙주 세포에서 핵산이 시험관내에서 배양된 세포로 전이되는지 또는 생체내에서 전이되는지의 여부에 따라 변한다. 시험관내에서 포유동물 세포내로 핵산을 전이시키기 위해 적절한 기술은 리포솜의 사용, 일렉트로포레이션, 마이크로주입, 세포 융합, DEAE-텍스트란, 인산칼슘 침전 법 등을 포함한다. 현재 바람직한 생체내 유전자 전이 기술은, 바이러스성 (전형적으로 레트로바이러스) 벡터를 사용한 이입 및 바이러스성 코트 단백질-리포솜 매개 이입을 포함한다 [Dzau 등, *Trends in Biotechnology*, 11, 205-210 (1993)]. 일부 상황에서, 핵산 원천에 표적 세포를 표적으로 하는 시약, 예컨대 세포 표면 막 단백질 또는 표적 세포에 특이적인 항체, 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드 등을 제공하는 것이 바람직하다. 리포솜이 사용되는 경우에, 특정한 세포 유형에 대해 굴성인 캡시드 단백질 또는 그의 단편, 순환에서 내부이행을 겪는 단백질에 대한 항체, 세포내 국소화를 표적으로 하고 세포내 반감기를 향상시키는 단백질을 표적화하고/하거나 섭취를 촉진하기 위하여, 엔도시토시스와 연관된 세포 표면 막 단백질에 결합하는 단백질을 사용할 수 있다. 수용체-매개 엔도시토시스의 기술은 예를 들어 문헌 [Wu 등, *J.Biol.Chem.* 262, 4429-4432 (1987); 및 Wagner 등, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 87, 3410-3414 (1990)]에 기재되어 있다. 유전자 표시 및 유전자 요법 프로토콜의 검토를 위하여 문헌 [Anderson 등, *Science* 256, 808-813 (1992)]를 참조한다.

[0334] 진단 방법에서 Bv8 서열이 사용될 수 있다. Bv8의 과다발현은 생식 기관에서 낭포 또는 암을 나타낼 수 있다. 게다가, 환자로부터의 샘플을 돌연변이 또는 이상기능 Bv8을 위해 분석할 수도 있다. 일반적으로, 이러한 방법은 환자로부터의 샘플 중의 Bv8 발현을 대조군의 발현과 비교하는 것을 포함한다.

[0335] 8. 제품

[0336] 다른 측면에 따르면, 본 발명은 질병 또는 질환의 치료 또는 예방을 위해 유용하거나 수정을 조절하기 위해 유용한 물질을 포함하는 제품을 의도한다. 제품은 바람직하게는 용기 및 용기 위에 있거나 용기와 연관된 표지 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적절한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 등을 포함한다. 유리 및 플라스틱과 같은 각종 재료로부터 용기를 형성할 수 있다. 용기는 Bv8 또는 그의 작동물질 또는 길항물질을 포함한 조성물을 보유하며, 표지 또는 포장 삽입물은 Bv8 또는 그의 작동물질 또는 길항물질을 사용하기 위한 지시를 제공한다. 하나의 구현양태에서, 제품은 Bv8 길항물질 및 암을 치료 또는 예방하기 위해 Bv8 길항물질을 사용하기 위한 지시를 포함한다. 다른 구현양태에서, 제품은 호르몬 생성 내피 조직과 연관된 상태를 치료 또는 예방하기 위하여 Bv8 및 Bv8을 사용하기 위한 지시를 포함한다. 또 다른 구현양태에서, 제품은 Bv8 길항물질 및 수정을 조절하기 위해 Bv8 길항물질을 사용하기 위한 지시를 포함한다. 포장 삽입물은 적절한 투여 섭생법을 나타낼 수 있다. 하나의 구현양태에서, 삽입물은 조성물이 약 0.01 µg/kg 내지 50 mg/kg의 투여량으로 투여됨을 나타낸다.

[0337] [실시에]

[0338] 실시예에 관련하여 통상적으로 이용가능한 시약은 다른 표시가 없는 한 제조업자의 지시에 따라 사용되었다.

명세서 전반에 걸쳐 ATCC 수탁 번호에 의해 하기 실시예에서 동정된 세포의 공급원은 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (미국 버지니아주 마나사스)이다.

[0339] **실시예 1**

[0340] **노던 블로트 분석**

[0341] Bv8의 발현 패턴을 밝히기 위하여, 다양한 종류의 인간, 마우스 및 래트 조직으로부터의 RNA를 사용하여 노던 블로트 분석을 사용하였다. 인간 RNA 블로트를 인간 Bv8 cDNA를 기초로 하여 <sup>32</sup>P-표지화 DNA에 하이브리드화하는 반면, 마우스 및 래트 RNA 블로트를 마우스 Bv8 cDNA를 기초로 하여 <sup>32</sup>P-표지화 DNA 프로브에 하이브리드화하였다.

[0342] 당 기술분야에 공지된 방법에 따라서 노던 블로트 분석을 수행하였다. 예를 들어, 레디-프라임(Redi-Prime) II 키트 (아머샴(Amersham))을 가진 인간 또는 마우스 cDNA 단편의 30 내지 50ng을 사용하여, <sup>32</sup>P-dCTP 3000 μCi/밀리몰(아머샴)을 사용하여 cDNA 프로브를 제조하였다. 세파텍스 G50 스핀 컬럼 (파르마시아) 상에서 프로브를 정제하고, 익스프레스하이브(ExpressHyb) 하이브리드화 용액 (스트라타젠(Stratagene)) 중에서 68℃에서 하이브리드화를 수행하였다. 다른 실시예에서, 42℃에서 60시간동안 하이브리드화 완충액 (5X SSPE; 2X 덴하르트 용액; 100mg/ml 변성되고 변형된 연어 정액 DNA; 50% 포름아미드; 2% SDS)중에서 블로트를 프로브와 함께 배양하였다. 블로트를 2X SSC중에서 수회 세척하고; 실온에서 1시간동안 0.05% SDS로 세척한 다음, 0.1X SSC 중에서 30분 세척하고, 50℃에서 0.1% SDS로 세척하였다. 블로트를 인영상장치 분석(후지(Fuji))에 의해 밤새 노출시킨 후 전개시켰다. 대조 액틴 프로브로의 하이브리드화에 의해 등량의 RNA 부하량을 평가하였다.

[0343] Bv8 mRNA 전사체를 검출하였다. 도 9는 1.8kb의 단일 mRNA 종이 인간 Bv8 프로브를 가진 인간 고환에서 검출되었음을 나타낸다. 분석된 다른 인간 조직에서는 어떠한 발현도 검출되지 않았다. 도 10A는 단일 mRNA 종이 마우스 고환 및 심장에서 검출되었음을 나타낸다. 도 10B는 1.8kb 및 0.8kb 전사물이 래트 고환에 존재하지만 다른 래트 조직에는 존재하지 않음을 나타낸다. 이러한 연구결과는, 고환이 Bv8 mRNA의 주요 발현 부위임을 나타내는 것이다.

[0344] **실시예 2**

[0345] **세포 증식 분석**

[0346] Bv8에 대한 특정한 세포 유형의 반응성을 결정하기 위하여, 증식 반응에 대하여 소 부신 피질 모세 내피세포(ACE) 및 소 뇌 모세 내피세포(BBC)를 분석하였다.

[0347] 간략하게, ACE (부신 피질 모세 내피 세포) 및 BBC (소 뇌 모세관) 내피 세포를 10% 송아지 혈청으로 보충된 저글루코스 DMEM에서 배양하였다. 세포 증식 분석을 위하여, 대조를 위해 어떠한 첨가물도 갖지 않은 배지(도 11의 "C"), 10ng/ml VEGF (도 11의 "V") 50, 10 또는 1nM Bv8 (Fc-표지부착 재조합 단백질)중에서 6000개 세포를 12-웰 평판의 각각의 웰에 평판배양하였다. 코울터 계수기를 사용하여 1주일 후에 전체 세포 수를 얻었다. 세포 수에서의 배-증가를 1의 값으로 임의로 설정된 대조 조건과 비교한다. 배지 및 기타 세포 배양 반응물을 라이프 테크놀로지스 인코포레이티드(Life Technologies, Inc.)로부터 획득하였다. 분석 실행을 위하여, 문헌 [Aravind 및 Koonin, Curr.Biol. 8:477-478 (1998)]을 참조한다.

[0348] 예비 결과를 도 11A 및 11B에 나타내고, 이것은 대조군에 비해 세포 수의 증가를 표시한다. Bv8은 시험된 모든 농도에서 세포 증식의 증가를 생성하였으며 50nM의 농도에서 최대 효과가 관찰되었다. 포지티브 대조인 VEGF는 비처리 대조군에 비하여 ACE 및 BCC 세포 양쪽 모두에서 거의 3배의 증식 증가를 유도하였다.

[0349] **실시예 3**

[0350] **세포 생존 분석**

[0351] 내피 세포의 생존에 대한 Bv8의 효과를 측정하였다. 대략  $2 \times 10^5$  소 뇌 모세관(BBC) 세포를 완전 배지(상기 실시예 2에 기재됨)를 함유하는 6-웰 평판의 각각의 웰에 평판배양하였다. 다음 날 완전 배지를 흡입하고, 어떠한 첨가물도 갖지 않은 배지 중에서 또는 하기 성분: 2% FCS, 10%FCS, 20ng/ml VEGF (도 12의 "V"), 5nM Bv8, 25nM Bv8, 20ng/ml VEGF + 25nM Bv8 (도 12의 "V+Bv8") 또는 25nM EG-VEGF중의 하나를 포함한 배지 중에서 세포를 배양하였다. 48시간동안 배양 후에, 트립신처리에 의하여 세포를 제거하고, 수 시간동안 냉 70% 에탄올 중에 고정시켰다. 이어서, 실온에서 2 내지 4시간동안 PBS중의 5μg/ml 프로피듐 요오드 및 20ng/ml RN아제를

사용하여 세포를 염색하였다. FACS 분석에 의해 세포의 서브-G1 프로파일을 결정하였다. 세포 집단의 이러한 퍼센트를 도 12의 그래프의 수직축 위에서 아팍토시스가 일어난 세포 퍼센트로서 좌표로 나타내었다.

[0352] 도 12에서 알 수 있듯이, Bv8은 BBC 내피 세포의 생존을 증가시켰다. 특히, 2% FCS 또는 25nM EG-VEGF의 존재 하에서 보다 Bv8의 농도의 존재하에서 배양액중에 아팍토시스가 일어난 세포가 훨씬 적게 보였다. Bv8 및 VEGF는 상승 효과를 나타내었으며, 두 화합물들을 조합하면 그 자체 또는 10% FCS에 대한 성장 인자에 비하여 훨씬 큰 정도로 세포 생존을 증가시켰다.

[0353] **실시예 4**

[0354] 혈관형성의 생체내 유도

[0355] 혈관형성 반응을 유도하기 위한 Bv8의 능력을 측정하였다. 하나의 실험 세트에서, 베이지(Beige) 무모 수컷 마우스의 고환에서 고환내 혈관 증식에 미치는 Bv8의 효과를 결정하였다.

[0356] LacZ, VEGF 및 EG-VEGF를 코드화하는 아데노바이러스가 앞서 설명되었다 [LeCouter, Nature, 412: 877-84, 2001]. Bv8을 코드화하는 아데노바이러스의 생성을 위하여, 마우스 Bv8 81 아미노산 이소형 단백질을 코드화하는 cDNA를 CMV 서플 벡터(스트라타젠) 내에 클론화하고, 재조합 아데노바이러스 벡터 및 재조합 바이러스를 생성하기 위해 제조업자의 지시에 따랐다. 비라퓨어(Virapur) (미국 캘리포니아주 칼스배드)로부터 대규모 키트를 사용하여 바이러스를 정제하고, 적정하였다.

[0357] 생체내 연구를 위하여, 아데노바이러스 벡터(LacZ, VEGF, EG-VEGF 및 Bv8)를  $10^7$  내지  $10^8$  pfu (n=5)의 농도로 베이지 무모 마우스의 고환에 주입하였다. 7일 후에, 동물을 죽이고 고환을 고정시키고 조직학을 위해 처리하였다.

[0358] 도 13에서 알 수 있듯이, VEGF 및 EG-VEGF와 유사한 Bv8은, 무모 마우스의 고환 세포에서 생체내 간질 모세관 형성을 증가시켰다. PBS 또는 LacZ 아데노바이러스 대조 군의 어디에서도 간질 모세관 형성 또는 혈관형성에서의 증가가 관찰되지 않았다. 다수의 처리된 동물에서, 관상 위축이 관찰되었다. 관상 위축은 혈관형성 반응의 유도에서 생긴 간질 압력의 증가로부터 발생할 수도 있다.

[0359] 상기 기재된 명세서는 당업자가 본 발명을 실행하기에 충분한 것으로 생각된다. 그러나, 여기에 나타내고 기재된 것 이외에도, 첨부된 청구 범위의 범위에 속하는 이상, 상기 설명으로부터 본 발명의 다양한 변형이 당업자에게 명백할 것이다.

**도면의 간단한 설명**

[0360] 도 1은 인간 Bv8 상동체를 코드화하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:1)을 나타낸다. 또한, 굵은 글씨로 밑줄그어 나타낸 것은 각각의 개시 코돈 및 정지 코돈의 위치이다.

[0361] 도 2는 SEQ ID NO:1의 코드화 서열로부터 유래된 인간 Bv8 상동체 폴리펩티드의 아미노산 서열(SEQ ID NO:2)을 나타낸다. 추정 신호 서열은 아미노산 1 내지 21로 구성된다.

[0362] 도 3은 인간 Bv8 상동체의 대안적인 스플라이스 변이체를 코드화하는 cDNA의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:3)을 나타낸다. 또한, 굵은 글씨로 밑줄그어 나타낸 것은 각각의 개시 코돈 및 정지 코돈의 위치이다.

[0363] 도 4는 SEQ ID NO:3의 코드화 서열로부터 유래된 인간 Bv8 상동체 폴리펩티드의 아미노산 서열(SEQ ID NO:4)을 나타낸다.

[0364] 도 5는 마우스 Bv8 상동체의 뉴클레오티드 서열(SEQ ID NO:5)을 나타낸다. 또한, 굵은 글씨로 밑줄그어 나타낸 것은 각각의 출발 및 정지 코돈의 위치이다.

[0365] 도 6은 SEQ ID NO:5의 코드화 서열로부터 유래된 마우스 Bv8 상동체 폴리펩티드의 아미노산 서열(SEQ ID NO:6)을 나타낸다.

[0366] 도 7은 마우스 및 인간 Bv8 상동체의 정렬을 나타낸다. 잠재적인 헤파린-결합 도메인을 박스형으로 둘러쌌다. 나타낸 것과 같이, 이러한 도메인은 대안적인 스플라이스 전사체에 존재하지 않는다. 마우스 및 인간 Bv8 상동체는 대략 96% 동일하다.

[0367] 도 8은 인간 Bv8 및 EG-VEGF의 아미노산 서열의 정렬을 나타낸다. 인간 Bv8은 인간 EG-VEGF와 대략 60% 동일하다.

- [0368] 도 9는 대략 1.8kb의 단일 전사체를 밝혀내는 인간 RNA 샘플의 노던 블로트 분석을 나타낸다. 정소에서 발현이 가시화되었다. 레인의 내용물을 블로트의 위에 나타내고, 크기(kb)를 오른쪽에 나타낸다.
- [0369] 도 10A 및 10B는 마우스 및 래트에서 Bv8의 발현의 노던 블로트 분석을 나타낸다. 마우스에서, Bv8 발현은 심장 및 고환에서 볼 수 있다 (도 10A). 래트에서, Bv8 발현은 고환에서만 볼 수 있다 (도 10B). 또한, 0.8kb의 더욱 작은 띠를 래트 고환에서 볼 수 있다.
- [0370] 도 11A 및 11B는 Bv8이 내피 세포의 증식을 유발함을 나타낸다. 도 11A는 1, 10 및 50nM의 농도로 Bv8의 투여가 비처리된 대조군("C")에 비하여 소 부신 피질 모세 내피(ACE) 세포의 증식을 증가시킨다는 것을 나타낸다. 유사하게, 도 11B는 모든 3개의 농도에서 Bv8이 소 뇌 모세 세포의 증식을 증가시킨다는 것을 나타낸다. 양쪽 경우에서, Bv8에 의해 유도된 증식이 VEGF("V")에 의해 유도된 것보다 낮다.
- [0371] 도 12는 Bv8이 내피 세포 생존을 촉진한다는 것을 나타낸다. 5 또는 25nM Bv8을 함유하는 배지에서 배양한 이후에, 소의 뇌 모세 세포가 2% FCS 또는 EG-VEGF에서 배양한 후에 비하여 아폽토시스 (apoptosis)가 훨씬 덜 일어났다. Bv8 및 VEGF는 상승 효과를 나타내었으며, Bv8 및 VEGF 모두와 함께 배양한 후에 배양액 중의 아폽토시스된 세포가 개별적으로 배양할 때에 비하여 훨씬 적게 존재하였다.
- [0372] 도 13은 Bv8이 무모 마우스의 고환에서 간질 모세관 형성을 증가시킨다는 것을 나타낸다. LacZ, VEGF, EG-VEGF 또는 Bv8를 발현하는 아데노바이러스 벡터를 마우스의 고환을 주입한 후에, Bv8-처리된 동물에서 고환내 혈관 증식의 증가가 관찰되었다.

**도면**

**도면1**

```

TGAGGGCGCCATGAGGAGCCTGTGCTGCGCCCCACTCCTGCTCCTCTTGCTGCTGCCGCC
GCTGCTGCTCACGCCCCGCGCTGGGGACGCGCCCGTGATCACCGGGGCTTGTGACAAGGA
CTCCCAATGTGGTGGAGGCATGTGCTGTGCTGTGAGTATCTGGGTCAAGAGCATAAGGAT
TTGCACACCTATGGGCAAACTGGGAGACAGCTGCCATCCACTGACTCGTAAAAACAATTT
TGGAAATGGAAGGCAGGAAAGAAGAAAGAGGAAGAGAAGCAAAAGGAAAAAGGAGTTCC
ATTTTTTGGGCGGAGGATGCATCACACTTGCCCATGTCTGCCAGGCTTGGCCTGTTTACG
GACTTCATTTAACCATTATTTGTTTTAGCCCCAAAAGTAATCGCTCTGGAGTAGAAACCA
AATGTGA
    
```

**도면2**

```

MRSLLCAPLLLLLLLLPPLLLTPRAGDAAVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWVKSIRICT
PMGKLGDSCHPLTRKNNFNGRQERRKRKRKRKKEVPPFFGRRMHHTCPCLPGLACLRT
SFNRFICLAQK
    
```

단백질의 중요 특징:

신호 서열:

1-21

막횡단 도메인:

없음

cAMP- 및 cGMP-의존성 단백질 키나아제 인산화 부위:  
87-90

N-미리스토일화 부위:

41-46

42-47

43-48

아미드화 부위:

99-102

도면3

GAGGGCGCCATGAGGAGCCTGTGCTGCGCCCACTCCTGCTCCTCTTGCTGCTGCCGCCG  
 CTGCTGCTCAGCCCGCGCTGGGGACGCCCGCGTGATCACCGGGGCTTGTGACAAGGAC  
 TCCCAATGTGGTGGAGGCATGTGCTGTGCTGTGTCAGTATCTGGGTCAAGAGCATAAGGATT  
 TGCACACCTATGGGCAAACTGGGAGACAGCTGCCATCCACTGACTCGTAAAGTTCCATTT  
 TTTGGGCGGAGGATGCATCACACTGCCCCATGTCTGCCAGGCTTGGCCTGTTTACGGACT  
 TCATTTAACCGATTTATTTGTTTAGCCCAAAGTAATCGCTCTGGAGTAGAAACCAAATG  
 TGA

도면4

MRSLLCCAPLLLLLLPPLLLTPRAGDAAVITGACDKDSQCGGGMCCA<sup>VS</sup>IWVKSIRICT  
 PMGKLGDSCHPLTRKVPFFGRRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLAQK

단백질의 중요 특징:

신호 서열:  
1-21

막횡단 도메인:  
없음

N-미리스도일화 부위:  
41-46  
42-47  
43-48

아미드화 부위:  
78-81

도면5

CGGACGCGTGGGCGTCCCCTAACCGCCACCGCTCCCCGGGACGCCATGGGGGACCCGCG  
 CTGTGCCCGCTACTGCTACTTCTGCTGCTACCGCTGCTGTTACACCGCCCGCCGGGGA  
 TGCCCGCGGTCAACACCGGGGCTTGCACAAGGACTCTCAGTGCAGGAGGAGGCATGTGCTG  
 TGCTGTGTCAGTATCTGGGTTAAGAGCATAAGGATCTGCACACCTATGGGCCAAGTGGGCGA  
 CAGCTGCCACCCCTGACTCGGAAAGTTCCATTTTGGCGGCGGAGGATGCACACACCTG  
 CCCCTGCCTGCCAGGCTTGGCGTGTAAAGGACTCTTTCAACCGGTTTATTTGCTTGGC  
 CCGGAAATGATCACTCTGAAGTAGGAACTTGAATGCGACCCCTCCGCTGCACAATGTCCG  
 TCGAGTCTCACTTGTAAATGTGGCAAACAAGAATACCCAGAAAGAAATGTTCTCCCCC  
 TTCCTTGACTTTCCAAGTAAAGTTTCTATCTTTGATTTTGAAGTGGCTTTTTTTTTTTT  
 TTTTTTTTCTTTCTTGAAGGAAAGTTTGTATTTTGGAGAGATTTATAGAGGACTTTC  
 TGACATGGCTTCTCATTTCCCTGTTTATGTTTTGCCTTGACATTTTGAATGCCAATAAC  
 AACTGTTTTCAAAAATAGGAGAATAAGAGGGAACAATCTGTTGCAGAAACTTCCTTTTGC  
 CCTTTGCCCACTCGCCCGCCCGCCCGCCCGCCCTGCCCATGCGCAGACAGACACA  
 CCCTTACTCTTCAAAGACTCTGATGATCCTCACCTTACTGTAGCATTGTGGGTTTCTACA  
 CTTCCCCGCTTGTGGTGGACCCACTGAGGAGGCTCAGAGAGCTAGCACTGTACAGGTT  
 TGAACCAAGATCCCCAAGCAGCTCATTTGGGGCAGACGTTGGGAGCGCTCCAGGAACTTT  
 CCTGCACCCATCTGGCCCACTGGCTTTCAGTTCTGCTGTTTAACTGGTGGGAGGACAAAA  
 TTAACGGGACCCGAAGGAACCTGGCCCGTTTATCTAGATTTGTTAAGTAAAGACAT  
 TTCTCCTTGTGTGGAATATTACATGTCTTTTTCTTTTTTATCTGAAGCTTTTTTTTTTT  
 TTCTTTAAGTCTTCTTGTGGAGACATTTAAAGAACGCCACTCGAGGAAGCATTGATTT  
 TCATYTGCCATGACAGGAGTCAATTTTAAAAAATCGGTGTAAAGTTATAATTTAAACT  
 TTATTTGTAACCCAAAGGTYTAATGTAATGGATTTCCCTGATATCCTGCCATTTGTACTG  
 GTATCAATATTTTATGT

도면6

MGDPRCAPLLLLLLLPPLFTPPAGDAAVITGACDKDSQCGGGMCCAVSIWVKSIRICTP  
MGQVGDSCHEPLTRKVPFWGRMRMHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLARK

단백질의 중요 특징:

신호 서열:  
1-20

막횡단 도메인:  
없음

N-미리스토일화 부위:  
40-45  
41-46  
42-47

아미드화 부위:  
77-80

도면7

M RSLCCAPLLLLLLLPPLLLTPRAGDAAVITGACD KD SQCGGGM CCAVSI 50 인간

M GD PRCAPLLLLLLLPPLFTPRAGDAAVITGACDKD SQCGGGM CCAVSI 50 마우스

W VKSIRICTPMGKLGDSCHPLTRKNNFGNGRQERRKRKRKRKKEVPPFF-G

W VKSIRICTPMGQVGDSCHEPLTRKSHVANGRQERRRAKRRKRKKEVPPFWG

RRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLAQK

RRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLARK

도면8

M RSLCCAPLLLLLLLPPLLLTPRAGDAAVITGACDKDSQCGGGMCCAVSI 50 Bv8

\_\_\_\_\_AVITGACERDVQCGAGTCCAISL 50 EG-VEGF

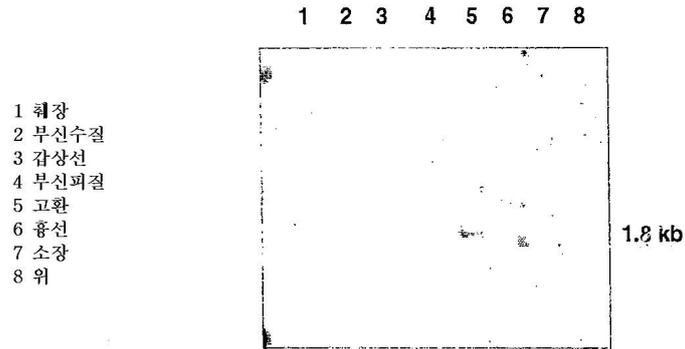
W VKSIRICTPMGKLGDSCHPLTRKNNFGNGRQ ERRKRKRKRKKEVPPFFG

W VKSIRICTPMCTPLGREGECHPGSHK VPPFR

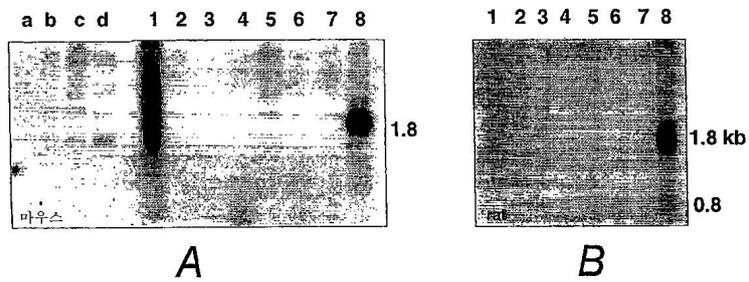
RRMHHTCPCLPGLACLRTSFNRFICLAQK

KRKHHTCPCLPNLLCSRFPDGRYRCSMDLKNINF

도면9



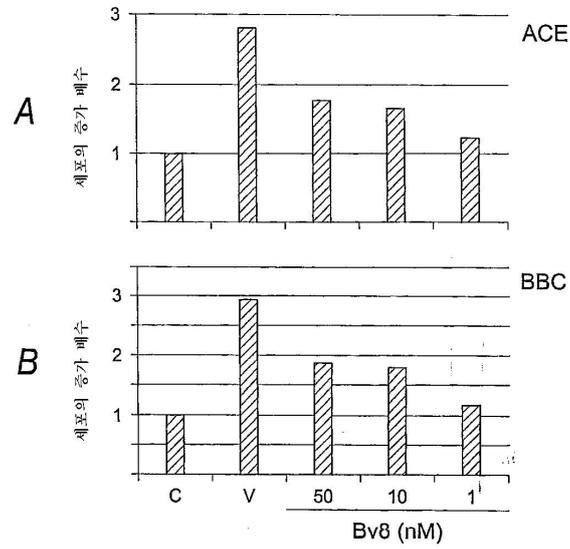
도면10



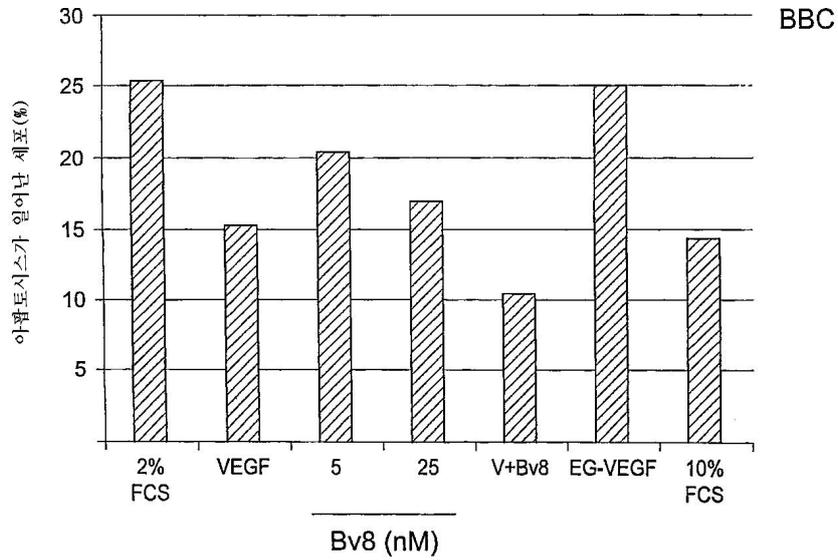
- |         |      |       |
|---------|------|-------|
| a- 제7일  | 1 심장 | 5 간   |
| b- 제11일 | 2 뇌  | 6 골격근 |
| c- 제15일 | 3 비장 | 7 신장  |
| d- 제17일 | 4 폐장 | 8 고환  |

도면11

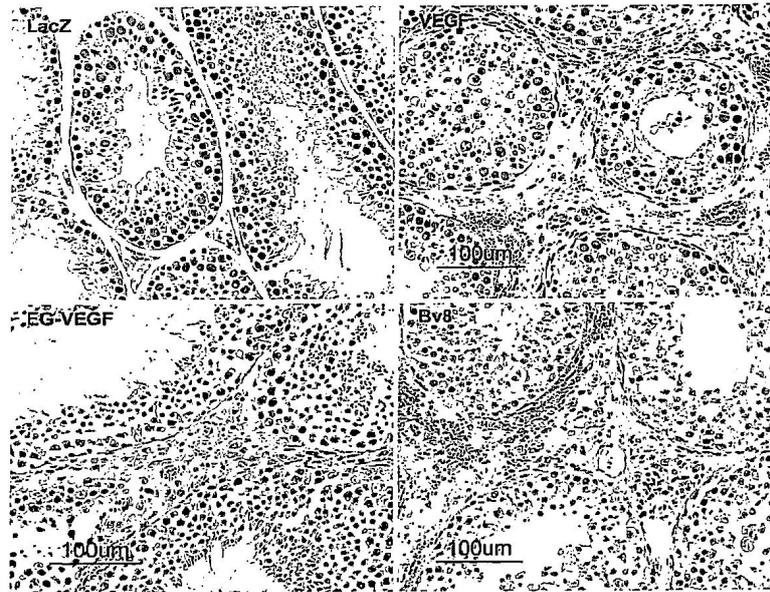
Bv8 생활성:  
부신 및 뇌 모세 내피 세포



도면12



도면13



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC.  
FERRARA, Napoleone  
LE COUTER, Jennifer

<120> BV8 NUCLEIC ACIDS AND POLYPEPTIDES WITH  
MITOGENIC ACTIVITY

<130> GENENT.088VPC

<150> US 60/316,184

<151> 2001-08-29

<160> 6

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 427

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

tgagggcgcc atgaggagcc tgtgtgcgc cccactcctg ctctcttgc tgctgccgc 60
gctgtgctc acgccccgcg ctggggacgc cgcctgatc accggggctt gtgacaagga 120
ctcccaatgt ggtggaggca tgtgtgtgc tgtcagtatc tgggtcaaga gcataaggat 180
ttgcacacct atgggcaaac tgggagacag ctgccatcca ctgactcgta aaaacaattt 240
tggaaatgga aggcaggaaa gaagaaagag gaagagaagc aaaaggaaaa aggaggttcc 300
atTTTTTggg cggaggatgc atcacacttg cccatgtctg ccaggcttgg cctgtttacg 360
gacttcattt aaccgattta tttgtttagc ccaaaagtaa tcgctctgga gtagaaacca 420

aatgtga 427

```

<210> 2  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Met Arg Ser Leu Cys Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Leu Leu Thr Pro Arg Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly  
 20 25 30  
 Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val  
 35 40 45  
 Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Lys Leu  
 50 55 60  
  
 Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Asn Asn Phe Gly Asn Gly  
 65 70 75 80  
 Arg Gln Glu Arg Arg Lys Arg Lys Arg Ser Lys Arg Lys Lys Glu Val  
 85 90 95  
 Pro Phe Phe Gly Arg Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly  
 100 105 110  
 Leu Ala Cys Leu Arg Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Gln  
 115 120 125

Lys

<210> 3  
 <211> 363  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 3  
 gagggcgcca tgaggagcct gtgtgcgc cccactcctg tcctcttgc gctgccgcc 60  
 ctgtgtctca cgccccgcg tggggacgc gccgtgatc cggggctt tgacaaggac 120  
 tcccaatgtg gtggaggcat gtgtgtgtc gtcagtatc tgggtcaagag cataaggatt 180  
 tgcacaccta tgggcaaac tgggagacgc tgccatccac tgactcgtaa agttccattt 240  
 tttggcgga ggatgcatc cacttgcca tgtctgccag gcttggcctg tttacggact 300  
 tcatttaacc gatttattg tttagccaa aagtaatcg tctggagtag aaacaaatg 360  
 tga 363

<210> 4  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 Met Arg Ser Leu Cys Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Pro Leu Leu Leu Thr Pro Arg Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly  
 20 25 30  
 Ala Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val  
 35 40 45  
 Ser Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Lys Leu  
 50 55 60  
 Gly Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val Pro Phe Phe Gly Arg  
 65 70 75 80  
 Arg Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg  
 85 90 95  
 Thr Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Gln Lys  
 100 105

<210> 5  
 <211> 1338  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 5  
 cggacgcgtg ggcgtccctt aaccgccacc gcgtccccgg gacgccatgg gggacccgcg 60  
 ctgtgcccc ctactgtact ttctgtctg accgctgctg ttcacaccgc ccgccgggga 120  
 tgcccggtc atcaccgggg cttgcgacaa ggactctcag tgcggaggag gcatgtgctg 180  
 tgctgtcagt atctgggtta agagcataag gatctgcaca cctatgggcc aagtggcgca 240  
 cagctgccac cccctgactc ggaaagtcc attttggggg cggaggatgc accacacctg 300  
 cccctgcctg ccaggcttgg cgtgtttaag gacttctttc aaccggttta ttgcttggc 360  
 ccggaatga tcaacttgaa gtaggaactt gaaatgcgac cctccgctgc acaatgtccg 420  
 tcgagtctca cttgtaattg tggcaaacaa agaatactcc agaaagaaat gttctcccc 480  
 ttccttgact ttccaagtaa cgtttctatc ttgattttt gaagtggctt ttttttttt 540  
 ttttttttc tttccttgaa ggaaagtttt gatttttgga gagatttata gaggactttc 600  
 tgacatggct tctcatttcc ctgtttatgt ttgacctga catttttgaa tgccaataac 660  
 aactgttttc acaaatagga gaataagagg gaacaatctg ttgcagaaac ttccttttgc 720  
 cctttgcccc actcgcctcg ccccgccccg ccccgccctg cccatgcgca gacagacaca 780  
 cccttactct tcaagactc tgatgactct caccttactg tagcattgtg ggtttctaca 840  
 ctccccgcc ttgctggtgg acccaactgag gaggctcaga gagctagcac tgtacaggtt 900  
 tgaaccagat cccccaagca gctcatttgg ggcagacgtt gggagcgtc caggaacttt 960  
 cctgcacca tctggcccac tggctttcag ttctgtgtt taactggtgg gaggacaaaa 1020  
 ttaacgggac cctgaaggaa cctggccccg ttatctagat ttgtttaagt aaaagacatt 1080  
 ttctccttgt tgtggaatat tacatgtctt tttcttttt atctgaagct ttttttttt 1140  
 ttctttaagt ctcttgttg gagacattt aaagaacgcc actcgaggaa gcattgattt 1200  
 tcatytgga tgacaggagt catcatttta aaaaatcggg gtttaagtta aatttaact 1260  
 ttatttata cccaaggtg taatgtaaat ggatttctg atatcctgcc atttgtactg 1320

gtatcaatat ttytatgt

1338

<210> 6

<211> 107

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Met Gly Asp Pro Arg Cys Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro  
 1                   5                   10                   15  
 Leu Leu Phe Thr Pro Pro Ala Gly Asp Ala Ala Val Ile Thr Gly Ala  
                   20                   25                   30  
 Cys Asp Lys Asp Ser Gln Cys Gly Gly Gly Met Cys Cys Ala Val Ser  
           35                   40                   45  
 Ile Trp Val Lys Ser Ile Arg Ile Cys Thr Pro Met Gly Gln Val Gly  
   50                   55                   60  
  
 Asp Ser Cys His Pro Leu Thr Arg Lys Val Pro Phe Trp Gly Arg Arg  
 65                   70                   75                   80  
 Met His His Thr Cys Pro Cys Leu Pro Gly Leu Ala Cys Leu Arg Thr  
           85                   90                   95  
 Ser Phe Asn Arg Phe Ile Cys Leu Ala Arg Lys  
           100                   105