(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0106940
(43) 공개일자 2012년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/40 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7009911
(22) 출원일자(국제) 2010년10월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년04월18일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/053054
(87) 국제공개번호 WO 2011/049868
국제공개일자 2011년04월28일
(30) 우선권주장
61/252,973 2009년10월19일 미국(US)

(71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(72) 발명자
가네산, 라즈쿠마르
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
커초퍼, 다니엘
미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
(74) 대리인
위혜숙, 양영준

전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 **간세포 성장 인자 활성화제의 조절제**

(57) 요 약

본 발명은 간세포 성장 인자 활성화제 기능을 조절하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다.

대 표 도

	CDR-L1											CDR-L2							CDR-L3								
잔기	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	50	51	52	53	54	55	56	89	90	91	92	93	94	95	96	97
Ab39	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	Y	T	T	P	P	T
Ab40	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	N	R	A	P	A	T
Ab40.ΔTrp	R	A	S	Q	D	V	S	T	A	V	A	S	A	S	F	L	Y	S	Q	Q	S	N	R	A	P	A	T
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	*	-	*

	CDR-H1						CDR-H2															CDR-H3									
잔기	30	31	32	33	34	35	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	94	95	96	97	98	99	100	100a	101	102
Ab39	N	G	T	Y	I	H	G	G	I	Y	P	A	G	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	K	W	W	A	W	P	A	F	D	Y
Ab40	N	G	T	Y	I	H	G	G	I	Y	P	A	G	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	K	W	W	A	W	P	A	F	D	Y
Ab40.ΔTrp	N	G	T	Y	I	H	G	G	I	Y	P	A	G	G	A	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	K	W	-	A	W	P	A	F	D	Y
	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	_	*	*	*	*	*	*	*

특허청구의 범위

청구항 1

항체의 전장 IgG 형태가 인간 HGFA에 20 pm 이하의 결합 친화도로 특이적으로 결합하는 단리된 항-HGFA 항체.

청구항 2

제1항에 있어서, 인간 HGFA에 대한 항체의 2가 친화도가 (a) 서열 RASQDVSTAVA (서열 1)을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 SASFLYS (서열 2)를 포함하는 HVR-L2; (c) 서열 QQSYTTPPT (서열 7)을 포함하는 HVR-L3; (d) 서열 GTYIH (서열 4)를 포함하는 HVR-H1; (e) 서열 GIYPAGGATYYADSVKG (서열 5)를 포함하는 HVR-H2; 및 (f) 서열 WWAWPAFDY (서열 6)을 포함하는 HVR-H3을 포함하거나 또는 이로 이루어지거나 또는 이로 본질적으로 이루어진 항체의 2가 친화도보다 낮은 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, HGFA의 잔기 449, 450, 452, 453, 455, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 496, 578, 579, 580, 636, 637, 640, 643, 644 중 적어도 1개, 2개, 3개, 4개 또는 임의의 개수 내지 모두에 결합하고, 또한 HGFA를 알로스테릭하게 억제하고, HGFA에 대한 결합에 대해 HGFA 활성 부위 차단제 KD1 또는 Ac-KQLR-클로로메틸 케톤 (서열 10에 개시된 "KQLR")과 경쟁하지만, HGFA에 대한 결합에 대해 벤즈아미딘과 경쟁하지 않는 항체.

청구항 4

제1항에 있어서, (a) 서열 RASQDVSTAVA (서열 1)을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 SASFLYS (서열 2)를 포함하는 HVR-L2; (c) 서열 QQSNRAPAT (서열 3)을 포함하는 HVR-L3; (d) 서열 GTYIH (서열 4)를 포함하는 HVR-H1; (e) 서열 GIYPAGGATYYADSVKG (서열 5)를 포함하는 HVR-H2; 및 (f) 서열 WWAWPAFDY (서열 6)을 포함하는 HVR-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 및/또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 항체.

청구항 5

제4항에 있어서, (a) 서열 RASQDVSTAVA (서열 1)을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 SASFLYS (서열 2)를 포함하는 HVR-L2; (c) 서열 QQSNRAPAT (서열 3)을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및 (d) 서열 GTYIH (서열 4)를 포함하는 HVR-H1; (e) 서열 GIYPAGGATYYADSVKG (서열 5)를 포함하는 HVR-H2; 및 (f) 서열 WWAWPAFDY (서열 6)을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체.

청구항 6

제5항에 있어서, 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS
FLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNRAPATFGQGTKVEIKR
(서열 8)

을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 추가로 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체.

청구항 7

제5항에 있어서, 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNGTYIHWVRQAPGKGLEWVGGIYPAG
GATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWWAWPAFDYW
GQGTLVTVSS (서열 9)

를 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하고, 추가로 경쇄 가변 도메인을 포함하는 항체.

청구항 8

제5항에 있어서, 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSAS
FLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNRAPATFGQGTKVEIKR
(서열 8)

을 갖는 경쇄 가변 도메인, 및 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNGTYIHWVRQAPGKGLEWVGGIYPAG
GATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWWAWPAFDYW
GQGTLVTVSS (서열 9)

를 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하는 항체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 κ 하위군 컨센서스 프레임워크 서열을 포함하는 항체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 중쇄 인간 하위군 III 컨센서스 프레임워크 서열을 포함하는 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 위치 71 또는 73 중 하나 이상에서의 치환을 포함하는 항체.

청구항 12

제11항에 있어서, 치환이 R71A, N73T, 또는 N78A 중 하나 이상인 항체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 모노클로날 항체인 항체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 항체, 인간화 항체, 친화도 성숙 항체, 인간 항체, 및 이중특이적 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 항체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 단편인 항체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 17

제16항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포.

청구항 18

제17항의 숙주 세포를 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 항체가 생성되도록 배양하는 것을 포함하는, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 항체의 제조 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 숙주 세포로부터 항체를 회수하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 20

제1항의 항체 및 세포독성제를 포함하는 면역접합체.

청구항 21

제1항의 항체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 제제.

청구항 22

제21항에 있어서, 추가의 치료제를 더 포함하는 제약 제제.

청구항 23

제1항에 있어서, 의약으로서 사용하기 위한 항체.

청구항 24

제1항에 있어서, 암을 치료하는데 사용하기 위한 항체.

청구항 25

제1항에 있어서, 혈관신생을 억제하는데 사용하기 위한 항체.

청구항 26

제1항에 있어서, 세포 증식을 억제하는데 사용하기 위한 항체.

청구항 27

의약의 제조에 있어서 제1항의 항체의 용도.

청구항 28

제27항에 있어서, 의약이 암의 치료를 위한 것인 용도.

청구항 29

제27항에 있어서, 의약이 혈관신생의 억제 또는 세포 증식의 억제를 위한 것인 용도.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] <관련 출원에 대한 상호-참조>

[0002] 본 출원은 2009년 10월 19일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 61/252,973을 우선권 주장하며, 그 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0003] <기술 분야>

[0004] 본 발명은 일반적으로 분자 생물학 및 성장 인자 조절 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 간세포 성장 인자 활성화제 기능의 조절제, 및 상기 조절제의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 간세포 성장 인자 활성화제 (HGFA)는 간세포 성장 인자 (HGF, 또한 분산 인자 (SF)로 알려짐)의 분열촉진, 이동촉진 및 형태발생 활성을 조절하는, 주로 간에 의해 분비되는 혈장 트립신-유사 세린 프로테아제이다 (문헌 [Shimomura et al., Cytotech., 8:219-229 (1992)]). HGF는 배아 발생, 조직 재생 및 침습성 종양 성장과 관련된다. 이 활성은 2-쇄 디술피드-연결된 α,β-이종이량체 형태로의 HGF의 단백질분해 처리를 요구한다. HGFA는 지금까지 확인된 것 중에서 가장 강력한 HGF의 활성화제 중 하나이다. (문헌 [Shimomura et al., Eur. J. Biochem. 229 (1995)]). HGFA 발현은 췌장, 간세포, 결장직장, 전립선 및 폐 암 세포에서 뿐만 아니라 정상적인 위장 신장 조직, 및 중추신경계에서 보고되었다. (문헌 [Itoh et al., Biochim. Biophys. Acta,

1491:295-302 (2000)]; [van Adelsberg et al., J. Biol. Chem., 276:15099-15106 (2001)]; [Hayashi et al., Brain Res., 799:311-316 (1998)]; [Moriyama et al., FEBS Lett., 372:78-82 (1995)]; [Parr et al., Int. J. Oncol., 19:857-863 (2001)]; [Kataoka et al., Cancer Res., 60:6148-6159 (2000)]; [Nagata et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 289:205-211 (2001)]). 최근에, 다발성 골수종 세포로부터의 HGFA 분비는 HGF의 강력한 주변분비 및/또는 자가분비 효과에 연관된다. (문헌 [Tjin et al., Blood, 104:2172-2175 (2004)]).

[0006] HGFA는 6개 도메인을 포함하는, 응고 인자 XII (FXIIa)의 것과 같은 도메인 구조를 갖는 96 kDa 지모겐 (프로HGFA)으로 분비된다. 이들 도메인은 N-말단 피브로넥틴 유형 II 도메인, 표피 성장 인자 (EGF)-유사 도메인, 피브로넥틴 유형 1 도메인, 또 다른 EGF-유사 도메인, 크링글 도메인 및 C-말단 트립신 상동성 세린 프로테아제 도메인을 포함한다. (문헌 [Miyazawa, et al., J. Biol. Chem., 268:10024-10028 (1993)]). 잔기 Arg372와 Val373 사이에 칼리크레인-민감성 부위에서의 절단은 처음 5개 도메인이 결핍된 짧은 34 kDa 형태를 생성할 수 있다. 96 kDa 및 34 kDa 형태의 프로HGFA는 둘 모두 트롬빈에 의해 활성 HGFA로 잔기 Arg407과 Ile408 사이에서 절단될 수 있다. (문헌 [Shimomura et al., J. Biol. Chem., 268, 22927-22932 (1993)]). 트롬빈은 프로-응고제 자극의 궁극적인 이펙터이고, 활성 HGFA의 생성은 상처 복구에 있어 HGF의 활성과 일치할 것이다. (문헌 [Bussolino et al., J. Cell Biol., 119:625-641 (1992)]).

[0007] HGF/Met 신호전달에 영향을 미치는 인자 중에는 프로HGFA의 활성화 및 HGFA의 연속적 억제가 있다. HGFA의 확인된 생리학적 억제제는 스플라이스 변이체 HAI-1 및 HAI-1B (간세포 성장 인자 활성화제 억제제-1) 및 HAI-2 (또한 태반 비쿠닌으로 공지됨)이다. (문헌 [Shimomura et al., J. Biol. Chem., 272:6370-6376 (1997)]; [Kawaguchi et al., J. Biol. Chem., 272:27558-27564 (1997)]; [Kirchhofer et al., J. Biol. Chem. 278:36341-36349 (2003)]). HGFA는 기질 특이성을 제한한다 (문헌 [Kataoka et al., Cancer metastasis reviews 22, 223-239 (2005)]; [Miyazawa et al., J Biol Chem 268, 10024-10028 (1993)]): 오직 2개의 거대분자 기질, 프로-간세포 성장 인자 (프로-HGF) (문헌 [Shinomura et al., Eur J Biochem 229, 257-261 (1995)]) 및 프로-대식세포 자극 단백질 (프로-MSP) (문헌 [Kawaguchi et al., Febs J 276(13)3481-3490 (2009)])은 HGFA에 의해 프로세싱되는 것으로 공지되어 있고, 이는 효소의 고도로 제한된 기질 특이성을 예시한다. HGFA는 N-말단 쿠니츠(Kunitz) 도메인-1 (KD1)을 사용하여 규범적 억제 메카니즘에 의해 HGFA를 억제하는, 쿠니츠-유형 억제제 HGFA 억제제-1에 의해 억제된다 (문헌 [Shia et al., J Mol Biol 346, 1335-13492005]). HGFA는 조직 재생에 영향을 미치고, 프로-HGF 프로세싱 및 이어진 HGF/Met 신호전달 경로의 활성화를 통해 암 성장을 촉진한다 (문헌 [Parr and Jiang, Int'l J of Oncol 19, 857-863 (2001)]).

[0008] 정의에 의하면 효소의 알로스테릭 조절은 멀리 떨어진 이펙터 상호작용 부위로부터 발생한 변경된 촉매 활성과 관련된다. 실제로, 모든 동적 단백질 (단량체 및 다량체)은 알로스테릭 작용에 대한 잠재성을 갖고 있는 것으로 보인다 (문헌 [Gunasekaran et al., Proteins 57, 433-443 (2004)]). 알로스테릭 조절 및 그의 커뮤니케이션의 경로의 설명은 상당한 주목을 받았다 (문헌 [Swain and Gierasch, Curr Op in Structural Biol 16, 102-108 (2006)]; [Yu and Koshland, PNAS 98, 9517-9520 (2001)]). 알로스테릭 효과의 고전적인 예는 헤모글로빈에서 관찰되고 (문헌 [Perutz, Nature 228, 726-739 (1970)]), 이는 알로스테릭 조절에 대한 최초의 기계적 이해를 제공한다. 여러 X선 결정학적 연구는 이후에 알로스테릭 조절 동안 입체형태 변화를 명백히 기재하였다 (문헌 [Changeux and Edelstein, Science 308, 1424-1428 (2005)]; [Di Cera, J Biol Chem 281, 1305-1308 (2006)]; [Pellicena and Kuriyan, Nature 228, 726-739 (2006)]; [Xu et al., Nature 388, 741-750 (1997)]). 알로스테릭 효과는 또한 프로테아제의 촉매 활성을 조절하는 매우 통상적이고 강력한 메카니즘이다 (문헌 [Hauske et al., Chembiochem 9, 2920-2928 (2008)]; [Turk, Nature Reviews 5, 785-799 (2006)]). 활성 부위와는 달리, 말초에 위치한 알로스테릭 부위는 일반적으로 덜 보존되고, 특이성을 달성하기 위해 이용될 수 있다 ([Hauske et al., 상기 문헌]). 알로스테릭 항-프로테아제 단백질-기재의 작용제는 이들이 강력하고 고도로 특이적이며, 이들의 표적 프로테아제에 의한 임의의 의도하지 않은 프로세싱으로부터 보호되기 때문에 매우 큰 치료적 잠재성을 갖는다. 세린 프로테아제 패밀리 (클랜(Clan) PA, MEROPS 명명법에서의 패밀리 S1 (문헌 [Rawlings et al., Nucleic Acids Res 36, D320-325 (2008)])에서 알로스테릭 조절제의 예는 HtrA 프로테아제 패밀리에서의 액세서리 PDZ 도메인 (문헌 [Sohn et al., Cell 131, 572-583 (2007)]), 다수의 응고 인자에 대한 칼슘 (문헌 [Bjelke et al., J Biol Chem 283, 25863-25870 (2008)]), 트롬빈에 대한 나트륨 (문헌 [Huntington, Biological chemistry 389, 1025-1035 (2008)]; [Wells and Di Cera, Biochem 31, 11721-11730 (1992)]), 보조인자, 예컨대 응고 인자 VIIa에 대한 조직 인자 (문헌 [Eigenbrot and Kirchhofer, Trends in Cardiovascular Med 12, 19-26 (2002)]) 및 "활성화 포켓"으로의 N-말단 펩티드 삽입 (문헌 [Friedrich et al., Nature 425, 535-539 (2003)]; [Huber and Bode, Acc Chem Res 11, 114-122

(1978)])이다.

[0009] 프로테아제는 다수의 인간 병리학적 과정과 관련된다 (문헌 [Barrett et al., (1998). Handbook of Proteolytic Enzymes. San Diego: Academic Press (1998)]; [Egeblad and Werb, Nature Rev Cancer 2, 161-174 (2002)]; [Hooper, Proteases in Biology and Medicine. In Essays in Biochemistry, London: Portland Press (2002)]; [Luttun et al., Curr Atheroscler. Rep 2, 407-416 (2000)]). 따라서, 활성 부위 위상은 일반적으로 동일한 패밀리의 구성원 사이에서 보존되기 때문에 (문헌 [Hedstrom, Chem Revs 102, 4501-4524 (2002)]), 알로스테릭 억제제에 의한 단백질분해 활성의 조절은 활성 부위 억제제에 대한 유망한 대안적 접근법을 나타낼 수도 있으며 (문헌 [Peterson and Golemis, J Cell Biochem 93, 68-73 (2004)]), 이는 종종 부적절한 특이성으로 인한 피해를 겪기도 한다. 활성 부위와는 달리, 말초에 위치한 알로스테릭 부위는 일반적으로 덜 보존되고, 특이성을 달성하기 위해 이용될 수 있다 ([Hauske et al., 상기 문헌]). 특이적이고 강력한 알로스테릭 억제제의 우수한 예는 응고 인자 VIIa 및 카스파제에 대해 기재되어 있다 (문헌 [Hardy et al., PNAS 101, 12461-12466 (2004)]; [Hardy and Wells, Curr Op Structural Biol 14, 706-715 (2009)]).

[0010] 프로-HGF의 활성화는 전환효소, 예컨대 HGFA에 의한 절단을 요구하기 때문에, HGFA 기능의 조절 및/또는 그의 기질과의 그의 상호작용이 효능있는 치료적 접근법임을 증명할 수 있다. 이와 관련하여, 활성을 조정할 수 있고/거나 HGFA와 특이적으로 상호작용할 수 있는 임상적으로 적절한 작용제를 확인하기 위한 분명한 요구가 있다. 본 발명은 이 요구를 충족시키고, 다른 이익을 제공한다.

[0011] 모든 공보, 특허 및 특허 문헌은 개별적으로 참고로 포함되는 것과 같이 본원에 참고로 포함된다.

발명의 내용

[0012] <발명의 개시내용>

[0013] 본 발명은 간세포 성장 인자 활성화제 (HGFA) 기능을 조정하여, HGFA 활성의 생리학적 효과를 조정하기 위한 방법, 조성물, 키트 및 제조품을 제공한다. HGFA 기능의 조정은 본원에 기재된 바와 같은 항체의 사용에 의해 영향을 받을 수 있다. 알로스테릭하게 HGFA 기능을 억제하는 항-HGFA 항체가 본원에 기재된다. 알로스테릭 항-프로테아제 항체는 이들이 강력하고 고도로 특이적이며, 이들의 표적 프로테아제에 의한 임의의 의도하지 않은 프로세싱으로부터 보호되기 때문에 매우 큰 치료적 잠재성을 가질 수 있다.

[0014] 한 측면에서, 본 발명은 치료 용도에 적합하고 HGF/c-met 신호전달 경로를 다양한 정도로 분열시킬 수 있는 항-HGFA 치료제를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 단리된 항-HGFA 항체를 제공하며, 여기서 항체의 전장 IgG 형태는 인간 HGFA에 20 pm 이하의 결합 친화도로 특이적으로 결합한다. 한 실시양태에서, 단리된 항-HGFA 항체는 인간 HGFA에 약 $10X10^{5}$ $M^{-1}s^{-1}$ 이상의 K_{on}으로 특이적으로 결합한다. 한 실시양태에서, 단리된 항-HGFA 항체는 인간 HGFA에 약 $1.7X10^{-4}$ s^{-1} 이하의 K_{off}로 특이적으로 결합한다.

[0015] 한 실시양태에서, 본 발명은 친화도 성숙 항-HGFA 항체를 제공하고, 여기서 이 항체의 인간 HGFA에 대한 2가 친화도는 (a) 서열 RASQDVSTAVA (서열 1)을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 SASFLYS (서열 2)를 포함하는 HVR-L2; (c) 서열 QQSYTTPPT (서열 7)을 포함하는 HVR-L3; (d) 서열 GTYIH (서열 4)를 포함하는 HVR-H1; (e) 서열 GIYPAGGATYYADSVKG (서열 5)를 포함하는 HVR-H2; 및 (f) 서열 WWAWPAFDY (서열 6)을 포함하는 HVR-H3을 포함하거나 또는 이로 이루어지거나 또는 이로 본질적으로 이루어진 항체의 2가 친화도 보다 낮고, 예를 들어 적어도 3, 5, 7, 또는 10-배 더 낮거나, 또는 보다 높고, 예컨대 40-배 또는 60-배 또는 이를 초과하여 더 높다.

[0016] 당업계에 잘 확립되어 있는 바와 같이, 리간드의 그의 수용체에 대한 결합 친화도는 임의의 다양한 검정을 사용하여 결정할 수 있고, 다양한 정량적 값으로 표현할 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 결합 친화도는 Kd 값으로 표현하고, 내인성 결합 친화도 (예를 들어, 최소화된 결합력 효과)를 반영한다. 일반적으로 및 바람직하게는, 결합 친화도는 세포-비함유 설정이든지 또는 세포-관련 설정이든지 시험관내 측정된다. 본원에 보다 상세하게 기재된 바와 같이, 결합 친화도의 차이 배수는 인간화 항체 (예를 들어, Fab 형태)의 1가 결합 친화도 값 및 참조/비교 항체 (예를 들어, Fab 형태) (예를 들어, 공여자 초가변 영역 서열을 갖는 뮤린 항체)의 1가 결합 친화도 값의 비로 정량할 수 있고, 여기서 결합 친화도 값은 유사한 검정 조건하에 결정된다. 따라서, 한 실시양태에서, 결합 친화도의 차이 배수는 Fab 형태의 인간화 항체 및 상기 참조/비교 Fab 항체의 Kd 값의 비로 결정된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 (A)가 참조 항체 (M)의 친화도보다 "3-배 더 낮은" 친화도를 갖는다면, 그리고는 A에 대한 Kd 값이 3x라면, M의 Kd 값은 1x일 것이고, M의

Kd에 대한 A의 Kd의 비는 3:1일 것이다. 반대로, 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 (C)가 참조 항체 (R)의 친화도보다 "3-배 더 큰" 친화도를 갖는다면, 그리고는 C에 대한 Kd 값이 1x라면, R의 Kd 값은 3x일 것이고, R의 Kd에 대한 C의 Kd의 비는 1:3일 것이다. 예를 들어, 비아코어(Biacore), 방사성면역검정 (RIA) 및 ELISA를 비롯하여, 본원에 기재된 것을 포함한 당업계에 공지된 다수의 검정 중 임의의 검정을 사용하여 결합 친화도 측정값을 수득할 수 있다.

[0017] 한 측면에서, 본 발명은 단리된 항-HGFA 항체를 제공하고, 여기서 항체는 HGFA의 잔기 446, 449, 450, 452, 453, 455, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 496, 499, 501, 578, 579, 580, 636, 637, 640, 643, 644 중 적어도 1개, 2개, 3개, 4개 또는 임의의 개수 내지 모두에 결합하고, 또한 항체는 HGFA를 알로스테릭하게 억제하고, HGFA에 대한 결합에 대해 HGFA 활성 부위 차단제 KD1 또는 Ac-KQLR-클로로메틸 케톤 (서열 10에 개시된 "KQLR")과 경쟁하지만, HGFA에 대한 결합에 대해 벤즈아미딘과 경쟁하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체는 HGFA 활성 (촉매) 부위를 차단하는 화합물의 부재하에 HGFA에 결합하지만, HGFA 활성 부위를 차단하는 화합물의 존재하에 HGFA에 결합하지 않는다. 일부 실시양태에서, 항체는 HGFA 기질의 HGFA 활성화를 경쟁적으로 억제한다. 일부 실시양태에서, 항체는 HGFA의 잔기 449, 450, 452, 482, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491 중 적어도 1개, 2개, 3개, 4개 또는 임의의 개수 내지 모두에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 HGFA의 잔기 446, 482, 484, 490, 499, 501 중 적어도 1개, 2개, 3개, 4개 또는 임의의 개수 내지 모두에 결합한다.

[0018] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 RASQDVSTAVA (서열 1)을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 SASFLYS (서열 2)를 포함하는 HVR-L2; (c) 서열 QQSNRAPAT (서열 3)을 포함하는 HVR-L3; (d) 서열 GTYIH (서열 4)를 포함하는 HVR-H1; (e) 서열 GIYPAGGATYYADSVKG (서열 5)를 포함하는 HVR-H2; 및 (f) 서열 WWAWPAFDY (서열 6)을 포함하는 HVR-H3으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 및/또는 6개의 초가변 영역 (HVR) 서열을 포함하는 단리된 항-HGFA 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, HVR-H1은 서열 NGTYIH (서열 43)을 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR-H1은 서열 GFTFNGTYIH (서열 44)를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR-H2는 서열 GGIYPAGGATYY (서열 45)를 포함한다. 일부 실시양태에서, HVR-H3은 서열 KWWAWPAFDY (서열 46)를 포함한다.

[0019] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 RASQDVSTAVA (서열 1)을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 SASFLYS (서열 2)를 포함하는 HVR-L2; (c) 서열 QQSNRAPAT (서열 3)을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄를 포함하는 항-HGFA 항체를 제공한다.

[0020] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 GTYIH (서열 4)를 포함하는 HVR-H1; (b) 서열 GIYPAGGATYYADSVKG (서열 5)를 포함하는 HVR-H2; 및 (c) 서열 WWAWPAFDY (서열 6)을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄를 포함하는 항-HGFA 항체를 제공한다.

[0021] 한 측면에서, 본 발명은 (a) 서열 RASQDVSTAVA (서열 1)을 포함하는 HVR-L1; (b) 서열 SASFLYS (서열 2)를 포함하는 HVR-L2; (c) 서열 QQSNRAPAT (서열 3)을 포함하는 HVR-L3을 포함하는 경쇄; 및 (d) 서열 GTYIH (서열 4)를 포함하는 HVR-H1; (e) 서열 GIYPAGGATYYADSVKG (서열 5)를 포함하는 HVR-H2; 및 (f) 서열 WWAWPAFDY (서열 6)을 포함하는 HVR-H3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항-HGFA 항체를 제공한다.

[0022] 한 실시양태에서, 본 발명의 항-HGFA 항체는 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLI
YSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNRAPATFGQGT
KVEIKR (서열 8)

[0023] 을 갖는 경쇄 가변 도메인을 포함하고; 추가로 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0024] 한 실시양태에서, 본 발명의 항-HGFA 항체는 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNGTYIHWVRQAPGKGLEWVGGIY
PAGGATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWWAW
PAFDYWGQGTLVTVSS (서열 9)

[0025] 를 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함하고; 추가로 경쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0026] 한 실시양태에서, 본 발명의 항-HGFA 항체는 서열

[0027] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNRAPATFGQGT KVEIKR (서열 8) 을 갖는 경쇄 가변 도메인; 및 서열

[0028] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNGTYIHWVRQAPGKGLEWVGGIY PAGGATYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWWAW PAFDYWGQGTLVTVSS (서열 9) 를 갖는 중쇄 가변 도메인을 포함한다.

[0029] 본 발명의 항체는 또한 HGFA 결합 활성이 실질적으로 유지되는 한, 임의의 적합한 프레임워크 및/또는 경쇄 가변 도메인 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 이들 항체는 또한 인간 하위군 III 중쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 포함한다. 이들 항체의 한 실시양태에서, 프레임워크 컨센서스 서열은 위치 71, 73 및/또는 78에서의 치환을 포함한다. 이들 항체의 일부 실시양태에서, 위치 71은 A이고/거나, 73은 T이고/거나 78은 A이다. 한 실시양태에서, 이들 항체는 인간화 4D5 항체 (huMAb 4D5-8) (헤르셉틴 (HERCEPTIN)®

, 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc.), 미국 캘리포니아주 사우쓰 샌 프란시스코) (또한, 미국 특허 번호 6,407,213 및 문헌 [Lee et al., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93] 참조)의 중쇄 가변 도메인 프레임워크 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, 인간화 4D5-8 항체는 미국 특허 번호 6,407,213에 기재된 바와 같다. 한 실시양태에서, 이들 항체는 또한 인간 κI 경쇄 프레임워크 컨센서스 서열을 포함한다.

[0030] 한 측면에서, 본 발명은 HGFA에 대한 결합에 대해 상기 언급된 항체 중 임의의 것과 경쟁하는 항체를 제공한다. 한 측면에서, 본 발명은 상기 언급된 항체 중 임의의 것과 동일한 HGFA 상의 에피토프에 결합하는 항체를 제공한다.

[0031] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 친화도 성숙, 인간화, 키메라, 또는 인간 항체이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항체 단편 (본원에 기재된 바와 같음), 또는 실질적으로 전장 항체이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 야생형 Fc 영역, 또는 그의 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 IgG (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgE 또는 IgD이다.

[0032] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 독소, 예컨대 세포독성제에 연결된다. 이들 분자/물질은 첨가제/증진제, 예컨대 방사선 및/또는 화학요법제와 함께 제제화되거나 또는 투여된다.

[0033] HGF/c-met 신호전달 경로는 예를 들어 세포 성장 자극 (예를 들어 세포 증식, 세포 생존, 세포 이동, 세포 형태발생) 및 혈관신생을 비롯하여 다수의 생물학적 및 생리학적 기능과 관련된다. 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은 c-met 활성화된 세포 성장 (예를 들어, 증식 및/또는 생존)을 억제하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 세포 또는 조직을 본 발명의 항체와 접촉시킴으로써, c-met 활성화와 관련된 세포 증식을 억제하는 것을 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 혈관신생을 억제하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 비정상적인 혈관신생과 관련된 상태를 갖는 세포, 조직 및/또는 대상체에게 본 발명의 항체를 투여하여 혈관신생을 억제하는 것을 포함한다.

[0034] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예컨대, 자가면역) 장애 및/또는 혈관신생-관련 장애를 치료학적 및/또는 예방적 치료하기 위한 의약을 제조하는데 있어서 본 발명의 항체의 용도를 제공한다.

[0035] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예컨대, 자가면역) 장애 및/또는 혈관신생-관련 장애를 치료학적 및/또는 예방적 치료하기 위한 의약을 제조하는데 있어서 본 발명의 핵산의 용도를 제공한다.

[0036] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예컨대, 자가면역) 장애 및/또는 혈관신생-관련 장애를 치료학적 및/또는 예방적 치료하기 위한 의약을 제조하는데 있어서 본 발명의 발현 벡터의 용도를 제공한다.

[0037] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예컨대, 자가면역) 장애 및/또는 혈관신생-관련 장애를 치료학적 및/또는 예방적 치료하기 위한 의약을 제조하는데 있어서 본 발명의 숙주 세포의 용도를 제공한다.

[0038] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예컨대, 자가면역) 장애 및/또는

혈관신생-관련 장애를 치료학적 및/또는 예방적 치료하기 위한 의약을 제조하는데 있어서 본 발명의 제조품의 용도를 제공한다.

[0039] 한 측면에서, 본 발명은 질환, 예컨대 암, 종양, 세포 증식성 장애, 면역 (예컨대, 자가면역) 장애 및/또는 혈관신생-관련 장애를 치료학적 및/또는 예방적 치료하기 위한 의약을 제조하는데 있어서 본 발명의 키트의 용도를 제공한다.

[0040] 한 측면에서, 본 발명은 c-met 활성화된 세포 증식을 억제하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 세포 또는 조직을 유효량의 본 발명의 항체와 접촉시켜 c-met 활성화와 관련된 세포 증식을 억제하는 것을 포함한다.

[0041] 한 측면에서, 본 발명은 대상체에서 c-met 활성화의 조절이상과 관련된 병적 상태를 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 유효량의 본 발명의 항체를 대상체에게 투여하여 상기 상태를 치료하는 것을 포함한다.

[0042] 한 측면에서, 본 발명은 c-met 또는 간세포 성장 인자 또는 둘 모두를 발현하는 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 세포를 본 발명의 항체와 접촉시켜 상기 세포의 성장을 억제하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포는 (예를 들어, 주변분비 효과를 통해) 상이한 세포에 의해 발현된 HGF에 의해 접촉된다.

[0043] 한 측면에서, 본 발명은 c-met 또는 간세포 성장 인자, 또는 둘 모두를 발현하는 세포를 포함하는 암성 종양을 갖는 포유동물을 치료학적으로 치료하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 상기 포유동물에게 유효량의 본 발명의 항체 분자를 투여하여 상기 포유동물을 효과적으로 치료하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포는 (예를 들어, 주변분비 효과를 통해) 상이한 세포에 의해 발현된 HGF에 의해 접촉된다.

[0044] 한 측면에서, 본 발명은 HGFA의 증가된 발현 또는 활성과 관련된 세포 증식성 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 본 발명의 항체를 투여하여 상기 세포 증식성 장애를 효과적으로 치료 또는 예방하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 증식성 장애는 암이다.

[0045] 한 측면에서, 본 발명은 c-met 또는 간세포 성장 인자 또는 둘 모두의 증가된 발현 또는 활성과 관련된 세포 증식성 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 본 발명의 항체를 투여하여 상기 세포 증식성 장애를 효과적으로 치료 또는 예방하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 증식성 장애는 암이다.

[0046] 한 측면에서, 본 발명은 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 세포의 성장은 적어도 부분적으로 HGFA의 성장 강화 효과에 의존하고, 상기 방법은 상기 세포를 유효량의 본 발명의 항체와 접촉시켜 상기 세포의 성장을 억제하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포는 (예를 들어, 주변분비 효과를 통해) 상이한 세포에 의해 발현된 HGF에 의해 접촉된다.

[0047] 한 측면에서, 본 발명은 세포의 성장을 억제하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 세포의 성장은 적어도 부분적으로 c-met 또는 간세포 성장 인자, 또는 둘 모두의 성장 강화 효과에 의존하고, 상기 방법은 상기 세포를 유효량의 본 발명의 항체와 접촉시켜 상기 세포의 성장을 억제하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포는 (예를 들어, 주변분비 효과를 통해) 상이한 세포에 의해 발현된 HGF에 의해 접촉된다.

[0048] 한 측면에서, 본 발명은 포유동물에서 종양을 치료학적으로 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 종양의 성장은 적어도 부분적으로 HGFA의 성장 강화 효과에 의존하고, 상기 방법은 상기 세포를 유효량의 본 발명의 항체와 접촉시켜 상기 종양을 효과적으로 치료하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포는 (예를 들어, 주변분비 효과를 통해) 상이한 세포에 의해 발현된 HGF에 의해 접촉된다.

[0049] 한 측면에서, 본 발명은 포유동물에서 종양을 치료학적으로 치료하는 방법을 제공하고, 여기서 상기 종양의 성장은 적어도 부분적으로 c-met 또는 간세포 종양 인자 또는 둘 모두의 성장 강화 효과에 의존하고, 상기 방법은 상기 세포를 유효량의 본 발명의 항체와 접촉시켜 상기 종양을 효과적으로 치료하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포는 (예를 들어, 주변분비 효과를 통해) 상이한 세포에 의해 발현된 HGF에 의해 접촉된다.

[0050] 본 발명의 방법은 예를 들어 HGF의 HGFA 활성화와 관련된 상승된 HGF 활성을 통해, 임의의 적합한 병적 상태, 예를 들어 HGF/c-met 신호전달 경로의 조절이상과 관련된 세포 및/또는 조직에 영향을 미치는데 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 표적화된 세포는 암 세포이다. 예를 들어, 암 세포는 유방암 세포, 결장직장암 세포, 폐암 세포, (예를 들어, 갑상선의) 유두상 암종 세포, 결장암 세포, 췌장암 세포, 난소암 세포, 자궁경부암 세포, 중추 신경계 암 세포, 골원성 육종 세포, 신장 암종 세포, 간세포 암종 세포, 방

광암 세포, 전립선암 세포, 위 암종 세포, 두경부 편평세포 암종 세포, 중피종 세포, 흑색종 세포 및 백혈병 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 표적화된 세포는 과다증식성 및/또는 과형성 세포이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 표적화된 세포는 이형성 세포이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법에서 표적화된 세포는 전이성 세포이다.

[0051] 본 발명의 방법은 추가의 치료 단계를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 방법은 표적화된 세포 및/또는 조직 (예를 들어, 암 세포)을 방사선 치료 또는 화학요법제에 노출시키는 단계를 추가로 포함한다.

[0052] 본원에 기재된 바와 같이, HGF/c-met 활성화는 그의 조절이상이 다수의 병적 상태를 유발하는 중요한 생물학적 과정이다. 따라서, 본 발명의 방법의 한 실시양태에서, 표적화된 세포 (예를 들어, 암 세포)는 HGF/c-met의 활성화가 동일한 조직 기원의 정상 세포와 비교하여 개선된 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 표적화된 세포의 사멸의 원인이 된다. 예를 들어, 본 발명의 조절제 분자와의 접촉은 세포 사멸을 초래하는, c-met 경로를 통한 신호전달에 대한 세포의 무능력을 초래할 수 있다.

[0053] c-met 활성화 (및 이에 따른 신호전달)의 조절이상은 예를 들어 HGF (c-met의 동족 리간드) 및/또는 HGFA의 과다발현, 및/또는 HGFA에 의한 HGF의 상승된 활성화을 비롯하여, 다수의 세포 변화로부터 나타날 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 HGFA, c-met 및 간세포 성장 인자 중 하나 이상이 동일한 기원의 정상 조직과 비교하여 더 풍부하게 발현되고/거나 존재하는 (예를 들어, 암) 조직을 표적화하는 것을 포함한다. HGF 또는 c-met-발현 세포는 다양한 공급원으로부터 HGFA에 의해, 즉 자가분비 또는 주변분비 방식으로 조절될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법의 한 실시양태에서, 표적화된 세포는 (예를 들어, 주변분비 효과를 통해) 상이한 세포에서 발현된 HGFA에 의해 활성화된 간세포 성장 인자에 의해 접촉/결합된다. 상기 상이한 세포는 동일한 또는 상이한 조직 기원의 것일 수 있다. 한 실시양태에서, 표적화된 세포는 (예를 들어, 자가분비 효과/루프를 통해) 표적화된 세포 자체에 의해 발현된 HGFA에 의해 활성화된 HGF에 의해 접촉/결합된다.

[0054] 한 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 본 발명의 항체 및 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 담체는 제약상 허용되는 것이다.

[0055] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 코딩하는 핵산을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 핵산은 조절제 분자를 코딩하고, 이는 항체 또는 그의 단편이거나 또는 이를 포함한다.

[0056] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0057] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 벡터는 임의의 유형의 것, 예를 들어 재조합 벡터, 예컨대 발현 벡터일 수 있다. 임의의 다양한 숙주 세포를 사용할 수 있다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 원핵 세포, 예를 들어 이. 콜라이 (E. coli)이다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 진핵 세포, 예를 들어 포유동물 세포, 예컨대 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포이다.

[0058] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 제조하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 항체 (또는 그의 단편)이거나 또는 이를 포함하는 조절제 분자를 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 적합한 숙주 세포에서 상기 항체 (또는 그의 단편)를 코딩하는 본 발명의 재조합 벡터를 발현시키는 것 및 상기 항체를 회수하는 것을 포함한다.

[0059] 한 측면에서, 본 발명은 용기; 및 용기 내에 함유된 조성물을 포함하는 제조품을 제공하고, 여기서 조성물은 하나 이상의 본 발명의 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 조성물은 본 발명의 핵산을 포함한다. 한 실시양태에서, 항체를 포함하는 조성물은 추가로 담체를 포함하고, 이는 일부 실시양태에서 제약상 허용되는 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제조품은 조성물 (예를 들어, 항체)을 대상체에게 투여하기 위한 설명서를 추가로 포함한다.

[0060] 한 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 본 발명의 항체를 포함하는 조성물을 포함하는 제1 용기; 및 완충제를 포함하는 제2 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 한 실시양태에서, 완충제는 제약상 허용되는 것이다. 한 실시양태에서, 항체를 포함하는 조성물은 담체를 추가로 포함하고, 이는 일부 실시양태에서 제약상 허용되는 것이다. 한 실시양태에서, 키트는 조성물 (예를 들어, 항체)를 대상체에게 투여하기 위한 설명서를 추가로 포함한다.

[0061] 한 측면에서, 본 발명은 조직 세포의 시험 샘플을 본 발명의 항체와 접촉시켜 상기 샘플에서 HGFA의 수준을 결정하는 것을 포함하고, 이에 의해 항체에 의해 결합된 HGFA가 샘플에서 HGFA의 존재 및/또는 양을 나타내는

것인, 질환을 진단하는 방법을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 조직 세포의 시험 샘플을 본 발명의 항체와 접촉시켜 상기 시험 샘플에서 HGFA의 수준을 결정함으로써 샘플에 존재하는 HGFA의 양을 결정하는 것을 포함하고, 여기서 시험 샘플과 동일한 세포 기원의 정상 조직을 포함하는 대조군 샘플과 비교하여 시험 샘플에서 보다 높은 수준의 HGFA가 개체가 질환에 걸릴 위험이 있다는 것을 나타내는 것인, 개체가 질환에 걸릴 위험이 있는지 여부를 결정하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법의 한 실시양태에서, HGFA의 수준은 시험 샘플에서 항체에 의해 결합된 HGFA의 양으로 나타낸 HGFA 폴리펩티드의 양에 기초하여 결정된다. 방법에 사용되는 항체는 임의로 검출가능하게 표지되거나, 고체 지지체에 부착되거나, 또는 기타일 수 있다.

[0062] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 신체상의 유체, 예를 들어 혈액에 존재하는 HGFA에 결합시키는 방법을 제공한다.

[0063] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HGFA를 발현하고/거나 HGFA에 반응성인 세포에 본 발명의 항체에 결합시키는 방법에 관한 것이고, 여기서 방법은 HGFA에 대한 항체의 결합에 적합한 조건하에 상기 세포를 상기 항체와 접촉시키고, 그 사이의 결합을 허용하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 상의 HGFA에 대한 상기 항체의 결합은 HGFA 생물학적 기능을 억제한다. 한 실시양태에서, 상기 항체는 HGFA의 그의 기질 분자와의 상호작용을 억제하지 않는다. 한 실시양태에서, 상기 항체는 세포 상의 HGFA 분자에 결합하고, HGFA 분자에 대한 또 다른 분자 (예컨대, 프로-HGF)의 결합을 억제한다.

[0064] 한 측면에서, 본 발명은 숙주에서 HGFA-관련 조직에 치료제를 표적화하는 방법을 제공하고, 방법은 숙주에게 본 발명의 항체에 연결된 형태의 상기 치료제를 투여하여, 작용제가 숙주에서 HGFA-관련 조직을 표적화되도록 하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, HGFA에 결합하는 항체는 예를 들어 HGFA가 세포의 표면 상에 존재하는 경우에 (시험관내 또는 생체내에서) 세포 상에 위치한 HGFA에 특이적으로 결합할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1: 항-HGFA 항체의 CDR 서열. 잔기는 카바트 넘버링 시스템에 따라 넘버링된다 (문헌 [Kabat et al., 1991]). Ab39와 Ab40 사이의 서열 변화는 음영표시하였다. Fab40의 단일 잔기 결실 (Trp96H)은 볼드체로 강조하였다. 도 1은 모두 각각 발생 순서대로 "CDR-L1"을 서열 1, 1, 및 1로, "CDR-L2"를 서열 2, 2, 및 2로, "CDR-L3"을 서열 22, 3, 및 3으로, "CDR-H1"을 서열 23, 23, 및 23으로, "CDR-H2"를 서열 47, 47, 및 47로, 및 "CDR-H3"을 서열 46, 46, 및 24로 개시한다.

도 2: Ab40에 의한 HGFA 효소 활성의 억제. (a) Ab40의 3-배 일련의 희석액의 존재하에 HGFA에 의한 ^{125}I-프로-HGF의 절단. 절단 생성물 HGF α- 및 β-쇄를 SDS-PAGE (환원 조건), 이후에 X선 필름 노출에 의해 분석하였다. (b) 발색 기질의 부분적 억제, Ab40에 의한 S-2266 가수분해 (HGFA 단편적 활성 v_i/v_o로 표현됨) 및 Ab40.ΔTrp에 의한 억제의 결여. (c) Ab40 (1 μM - 0.004 μM, 3-배 희석 단계; 충전된 다이아몬드형 = "항체 없음" 대조군)에 의한 HGFA 억제의 이디-호프스티(Eadie-Hofstee) 플롯은 경쟁적 억제를 보여준다 (대조군의 경우 V_{max} = 0.99 μM pNA/min 및 K_m = 0.23 mM; 1 μM Ab40의 경우 V_{max}^{app} = 0.99 μM pNA/min 및 K_m^{app} = 0.82 mM).

도 3: HGFA에 대한 항체 결합에 대한 활성 부위 억제제의 효과. (a-b, e-f) HGFA (a, e) 또는 HGFA-KQLR (b, f) 복합체 (서열 10에 개시된 "KQLR")의 동시-주입 이후의 고정된 항체, Ab40 (a-b) 또는 Ab40.ΔTrp (e-f)에 대한 결합의 표면 플라즈몬 공명 (비아코어) 측정값. (c) 상이한 농도의 KD1의 존재하에 고정된 Ab40에 대한 HGFA의 경쟁 결합 (비아코어). (d) 증가하는 항체 농도의 존재하에 비오티닐화된 KD1에 대한 HGFA의 결합을 측정하는 경쟁 결합 ELISA.

도 4: HGFA/Fab40 복합체의 구조. (a) HGFA (리본형)와 Fab40 (경쇄: 밝은 회색 및 중쇄: 어두운 회색) 사이의 복합체에 대해 강조된 2차 구조를 갖는 표면 표현. 촉매 삼작용기 (His57-Asp102-Ser195) 잔기를 나타내고, 99-루프를 화살표로 강조하였다. (b) 99-루프 (흑색)에서의 변화를 제외하고 HGFA의 입체형태에 유의한 변화가 없음을 보여주는, HGFA/Fab75 (문헌 [Wu et al., 2007]) (어두운 회색)와 HGFA/Fab40 (밝은 회색) 구조의 중첩. (c) Fab40의 CDR-루프 (L1-3, H1-3)의 HGFA와의 상호작용의 근접도 (표면 표현). 인터페이스 상호작용에 관련되는 결정적인 잔기를 강조하고, 99-루프는 적색으로 나타내었다. 여러 수소 결합 (어두운 회색 점선)과 별도로, HGFA의 Asp241과 Fab40의 Lys64H 사이에 단일 염 브릿지가 관찰되었다.

도 5: HGFA (밝은 회색) 및 Fab40 (경쇄: 밝은 회색, 중쇄: 어두운 회색)을 갖는, HGFA/Fab40 에피토프 및 파라토프. (a) HGFA (밝은 회색) 상의 Fab40 접촉 영역 (어두운 회색, 4Å 컷오프)의 에피토프. 촉매 삼작용

기 및 기질 결합 하위부위 S1-S4를 나타내었다. (b) 트롬빈 (녹색)에서 엑소사이트-II에 상응하는 영역과 부분적으로 중첩되는, HGFA 상의 Fab40 접촉 영역의 상이한 도면. (c) Fab40 상의 HGFA 접촉 영역 (점선, 4Å 컷오프). 중쇄는 HGFA와의 친밀한 접촉과 관련되고, Fab40 결합시 HGFA 상에 묻힌 전체 접근가능한 표면 영역의 2/3에 기여한다.

도 6: HGFA의 99-루프의 3개의 구조적 스냅샷. (a) 99-루프의 입체형태에서의 '알로스테릭 스위치'는 깊은 소수성 포켓 (어두운 회색으로 채색, HGFA의 잔기 Ala56, Pro90, Tyr88, Val96, Val105 및 Ile107)의 형성을 유발하여 Fab40의 Trp96H의 결합을 허용한다. (b) HGFA/Fab40.ΔTrp에서 소수성 포켓 (어두운 회색으로 채색)의 크기는 Val96 및 이 포켓을 라이닝하는 다른 잔기의 이동으로 인해 심하게 제한된다. (c) 다른 공지된 구조에서 발견된 바와 같은 HGFA의 99-루프의 '이완된' 상태 입체형태 (문헌 [Shia et al., 2005]; [Wu et al., 2007]). (d) HGFA (밝은 회색) 및 HGFA/Fab40 (어두운 회색) 복합체의 99-루프의 중첩. Fab40 결합시 99-루프의 입체형태 전이, 99-루프 잔기의 주쇄는 >1 Å 이동하는 반면, 측쇄 입체형태는 > 2.0 제거된다. Fab40의 CDR-H3 루프는 스틱 표현에서 강조하였다 (상부). (e) HGFA/Fab40.ΔTrp의 99-루프의 HGFA의 99-루프 및 HGFA/Fab40의 99-루프와의 중첩. 99-루프 (밝은 회색)의 입체형태는 Fab40.ΔTrp/HGFA 복합체 구조에서 '이완된' 상태로 거의 다시 복귀한다. Fab40.ΔTrp의 CDR-H3 루프는 스틱 표면에서 강조하였다 (어두운 회색). (f) Fab40의 Trp96H (점선 원)의 결실시 CDR-H3 루프에서의 약간의 변화를 나타내는, HGFA/Fab40.ΔTrp의 99-루프의 HGFA/Fab40의 99-루프와의 중첩.

도 7: 알로스테릭 메카니즘. (a) 펩티드성 억제제 Ac-KQLR-cmk (서열 10에 개시된 "KQLR") (어두운 회색으로 CPK 구체 표현에 내재된 스틱, 하부)의 입체 도면은 HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp 복합체 (서열 10에 개시된 "KQLR")에서 HGFA의 활성 Ser195 및 His57에 공유 결합에 의해 연결된다. P2-Leu는 99-루프의 Pro99a에 대해 단단하게 패킹되고 (밝은 회색으로 점 표현에 내재된 스틱, 상부), Ser99와의 수소 결합은 P4-Lys를 안정화시킨다. (b) HGFA/Fab40 구조의 HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp (서열 10에 개시된 "KQLR")와의 중첩으로부터 수득한 HGFA-KQLR/Fab40 (서열 10에 개시된 "KQLR")의 모델의 입체 도면은 알로스테릭 억제가 Pro99a와 Ser99 사이에서의 99-루프의 P2-Leu와의 입체적 충돌 때문임을 보여준다 (백색으로 점 표현에 내재된 스틱). (c) 결정적인 입체형태 변화 및 HGFA의 Ser99와 억제제의 P4-Lys 사이의 수소 결합의 분열을 강조한, HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp (서열 10에 개시된 "KQLR")의 HGFA-KQLR/Fab40 (서열 10에 개시된 "KQLR")의 모델과의 중첩의 입체 도면.

도 8: 억제의 알로스테릭 메카니즘을 설명하는 카툰 모델. 기능적으로 활성 상태에서, 결합 하위부위는 기질에 접근가능하고, '알로스테릭 스위치'는 "오프" 상태이다. Fab40은 우선적으로 일시적으로 형성된 입체형태 중 하나를 샘플링하고, 평형상태를 기능적으로 활성 상태로부터 멀리 이동시켜, 효소 분자의 주요 집단을 '알로스테릭 스위치' "오프" 상태에서 "온" 상태로 유도한다. 대조적으로, 효소 활성을 억제하는 Fab40.ΔTrp는 오직 상태 변화를 유도하지 않고 효소에 결합할 수 있을 것이다.

도 9: (a) 항체 특이성. 직접적인 결합 ELISA에서, 96-웰 플레이트를 2 mg/ml의 HGFA, 매트립타제 (문헌 [Kirchhofer et al. (2003) J Biol Chem 278:36341-36349]), 우로키나제 (아메리칸 디아그노스티카(American Diagnostica)), 또는 인자 XIIa (아메리칸 디아그노스티카)로 코팅하고, PBS, 0.05% (v/v) 트윈-20 (PBT) 완충제 중에서 10 mg/ml의 항-HGFA 항체와 인큐베이션하였다. 세척 후에, 결합된 항체는 항-인간 항체 HRP 접합체 (PBT 완충제 중에서 1:2,500 희석됨) 및 TMB 기질의 첨가에 의해 검출하였다. 450 nm에서의 흡광도를 마이크로플레이트 판독기 상에서 측정하였다. (b) Ab39 (1 μM - 0.004 μM, 3-배 희석 단계; 충전된 다이아몬드형 = "항체 없음" 대조군)에 의한 HGFA 억제의 이디-호프스티 플롯은 경쟁적 억제를 보여준다 (대조군의 경우 V_{max} = 0.99 μM pNA/min 및 K_m = 0.25 mM; 1 μM Ab39의 경우 V_{max}^{app} = 0.97 μM pNA/min 및 K_m^{app} = 0.91 mM).

도 10: 전자 밀도 맵 (1s에서 윤곽을 나타낸 2fofc)의 품질을 설명하는 입체 영상. (a) 99-루프는 HGFA/Fab40 구조에서 '비-컴피턴트' 입체형태를 채택한다. (b) 99-루프는 HGFA/Fab40.ΔTrp 구조에서 '컴피턴트' 입체형태로 복귀한다. (c) 99-루프는 HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp (서열 10에 개시된 "KQLR") 구조에서 '컴피턴트' 입체형태를 채택하므로 HGFA 활성 부위에서 공유 결합된 KQLR 펩티드 (서열 10)는 Fab40ΔTrp의 결합을 교란시키지 않는다.

도 11: HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp 복합체 (서열 10에 개시된 "KQLR") 구조에서 활성 부위의 화학 구조 및 수소 결합 네트워크. 펩티드성 억제제 KQLR (서열 10) (중심)은 Ser195 및 His57에 공유 결합된다.

도 12: HGFA/Fab40.ΔTrp (밝은 회색) 및 HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp (서열 10에 개시된 "KQLR") (보다 어두운 회

색, KQLR (서열 10)-가장 어두운 회색) 복합체 구조의 중첩. 99-루프의 입체형태는 HGFA의 다른 공지된 구조에서 발견된 바와 같이 '컴피턴트' 입체형태이다.

도 13: HGFA/Fab40 및 HGFA/KD1 (문헌 [Shia et al. (2005) J Mol Biol 346(5): 1335-49]) 복합체 구조의 중첩. Fab40의 결합 부위 (어두운 회색, 리본형)는 KD1의 결합 부위 (어두운 회색)와 직접적으로 중첩되지 않으나, 99-루프의 이동은 KD1의 HGFA/Fab40 복합체에 대한 결합에 대해 약간의 입체적 충돌을 발생시킬 수도 있다.

도 14: HGFA/Fab40 (99-루프의 '비-컴피턴트' 입체형태 (교환가능하게 명명된 '긴장성' 입체형태; 밝은 회색) 복합체 및 공개된 HGFA (99-루프의 '컴피턴트' 입체형태 (교환가능하게 명명된 '이완된' 입체형태), 흑색) 구조의 중첩. 입체적 충돌은 '컴피턴트' 입체형태의 HGFA의 99-루프 잔기 사이에서 Fab40의 CDR-H3 루프 잔기 내의 Trp96H, Ala97H 및 Trp98H와 발생할 수 있다.

도 15: 구조적 상동성을 사용하여 정렬된 트립신-유사 프로테아제 도메인. HGFA에 대한 본래의 순차적 잔기 넘버링은 서열 위에 나타내고, 키모트립시노겐 넘버링은 서열 아래 나타내었다. 키모트립시노겐 넘버링은 소문자로 표시된 키모트립시노겐 서열과 관련된 삽입 (예를 들어, His60a) 및 결실 (예를 들어, 잔기 번호 218이 없으며, 이에 따라 217 뒤는 219임)을 포함한다. 잔기 60a, 60b, 60c 및 60d는 잔기 60을 따르고, 잔기 111a, 111b, 111c 및 111d는 잔기 111을 따르고, 잔기 170a 및 170b는 잔기 170을 따른다. 그러나, 잔기 99a는 잔기 99에 선행하고, 잔기 184a는 잔기 184에 선행하고, 잔기 188a는 잔기 188에 선행하고, 잔기 221a는 잔기 221에 선행한다. 도 15a는 각각 발생 순서대로 서열 25-33을 개시하고, 도 15b는 서열 34-41을 개시한다.

도 16: a. 항-HGFA 항체의 경쇄 가변 도메인 서열. b. 중쇄 가변 도메인 서열. 잔기는 카바트 넘버링 시스템에 따라 넘버링되고, 카바트, 코티아 및 접촉 CDR을 도식적으로 묘사하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] <발명의 상세한 설명>

[0067] 본 발명은 간세포 성장 인자 활성화제 기능의 조절제를 포함하는 방법, 조성물, 키트 및 제조품 (이러한 조절제를 사용하는 방법 포함)을 제공한다.

[0068] 이러한 방법, 조성물, 키트 및 제조품의 세부에 대한 상세한 설명을 본원에서 제공한다.

[0069] <일반적 기술>

[0070] 달리 나타내지 않는 한, 본 발명의 실시는 분자 생물학 (재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기술을 이용할 것이고, 이들은 당업계의 기술 범위 내에 속한다. 상기 기술은 예컨대 문헌 ["Molecular Cloning: A Laboratory Manual", second edition (Sambrook et al., 1989)]; ["Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984)]; ["Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987)]; ["Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.)]; ["Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, 및 주기적 증보판)]; ["PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994)]; ["A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988)]; ["Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001)])에 상세하게 설명되어 있다.

[0071] <정의>

[0072] 달리 구체적으로 또는 문맥적으로 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 용어 "간세포 성장 인자 활성화제" 또는 "HGFA"는 HGF에 대한 결합 및/또는 HGF의 활성화의 발생을 허용하는 조건, 예를 들어 HGF의 2개 쇄 형태의 형성을 허용하는 조건하에 HGF에 대한 결합 및/또는 HGF의 활성화를 가능하게 하는 임의의 천연 또는 변이체 (천연 또는 합성 모두) HGFA 폴리펩티드에 관한 것이다. 용어 "야생형 HGFA 서열"은 일반적으로 자연 발생 HGFA에서 발견되는 아미노산 서열을 나타내고, 자연 발생 절단된 또는 분비된 형태, 변이체 형태 (예를 들어, 대안적으로 스플라이싱된 형태) 및 자연 발생 대립유전자 변이체를 포함한다. 야생형 HGFA의 예는 표 4에 나타낸 아미노산 서열 (서열 19)를 포함하는 폴리펩티드이다. HGFA의 서열 넘버링은 SWISS-PROT 엔트리 HGFA_HUMAN 등록 번호 Q04756에 따르고, 표 4에 나타낸 바와 같다. 프로테아제 도메인 내의 잔기의 경우, 키모트립시노겐에서 유래된 대안적 넘버링 도식이 때때로 이용된다. 이러한 2 잔기 넘버링 도식의 상호전환의 경우, 도 15를 참조한다. 일반적으로, 본 출원 전반체에 걸쳐 사용되는 넘버링 시스템이 확인될 것이다.

[0073] "활성화된 HGFA" 또는 그의 변이체는 야생형 HGFA 단백질의 단일 쇄 형태로부터 2 쇄 형태로의 전환시 야생형 HGFA에 의해 채택된 입체형태 중 하나 이상을 갖는 임의의 HGFA 쇄를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 전환은 적어도 부분적으로 HGFA 단백질의 잔기 407과 잔기 408 사이의 절단을 초래한다. 일부 실시양태에서, 입체형태는 특히 프로테아제 도메인의 입체형태를 나타낸다. 활성화된 HGFA는 또한 전장 HGFA의 단편, 예컨대 34 kDa 형태로부터 생성될 수 있다. 34 kDa 형태는 잔기 372와 373 사이의 절단에 의해 생성될 수 있다. HGFA는 다양한 공급원, 예컨대 인간 조직 또는 인간 혈장으로부터 단리되거나 또는 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 활성화된 HGFA의 한 실시양태는 표 5에 나타낸 아미노산 서열 (서열 20)을 포함한다. (넘버링은 본원에 기재된 바와 같은 천연 HGFA의 것임).

[0074] 본원에 사용된 "HGFA 변이체"는 참조 폴리펩티드보다 다양한 서열을 갖는 폴리펩티드를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 참조 폴리펩티드는 표 4에 나타낸 서열을 포함하는 HGFA 폴리펩티드이다. 변이체는 "비-천연" 발생 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체는 표 4에 나타낸 아미노산 서열과 80% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는다. 변이체는 치환, 부가 또는 결실을 갖는 그 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체는 HGF에 결합하고/거나 이를 활성화시키는 생물학적 활성을 갖는다. 다른 실시양태에서, 변이체는 HGF에 결합할 수 있으나, 이를 활성화시킬 수 없다. 통상적으로, HGFA 변이체 폴리펩티드는 표 4에 나타낸 서열을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 HGFA 폴리펩티드 또는 표 5에 나타낸 서열을 포함하는 HGFA 폴리펩티드와 80% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 81% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 82% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 83% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 84% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고; 보다 바람직하게는 85% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 86% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 87% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 88% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 89% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 90% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 91% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 92% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 93% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 94% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 95% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 96% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 96% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 97% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 98% 이상의 서열 동일성을 가질 것이고, 보다 바람직하게는 99% 이상의 서열 동일성을 가질 것이다.

[0075] 펩티드 또는 폴리펩티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 비율 (%)"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 동일성 비율을 달성하도록 갭 (gap)을 도입시킨 후, 특정 펩티드 또는 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 본원에서 정의되고, 임의의 보존적 치환은 서열 동일성의 일부로 간주하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하기 위한 정렬은 당업계 기술 범위 내의 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈린(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 이용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교될 전장 서열에 대한 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 정렬 결정에 적절한 파라미터를 정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 동일성 %값은 미국 특허 번호 6,828,146에 기재되어 있는 바와 같은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 얻을 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 작업 시스템, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D에서 사용되도록 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 변하지 않는다.

[0076] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 사용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 B에, 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 % (대안적으로, 주어진 아미노산 서열 B에, 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대해 특정 아미노산 서열 동일성 %를 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A라는 어구로 기재될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:

[0077] 100 x X/Y의 분율

[0078] 여기서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 A 및 B의 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 매치로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 총수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우에는 B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %가 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임을 이해할 것이다.

[0079] 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 아미노산 서열 동일성 % 값은 ALIGN-2 컴퓨터 프로

그램을 이용하여 바로 앞 단락에서 기재한 바와 같이 구한다.

[0080] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 그에 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하는 것으로 의도된다. 한 가지 유형의 벡터가 "플라스미드"인데, 이는 부가의 DNA 절편을 라이게이션시킬 수 있는 환상 이중가닥 DNA 루프를 지칭한다. 또 다른 유형의 벡터는 파지 벡터이다. 또 다른 유형의 벡터는 추가의 DNA 절편이 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 그것이 도입된 숙주 세포 내에서 자율 복제가 가능하다 (예를 들어, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예를 들어, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입시에 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 이에 의해 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 벡터가 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 상기 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 단순히 "재조합 벡터")로서 칭한다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에 유용한 발현 벡터는 종종 플라스미드의 형태로 존재한다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이기 때문에 상호교환적으로 사용될 수 있다.

[0081] 본원에서 상호교환적으로 사용된 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 나타내고, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 그의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소에 의해, 또는 합성 반응에 의해 중합체 내로 포함될 수 있는 임의의 기질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어 메틸화 뉴클레오티드 및 그의 유사체를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드 구조에 대한 변형이 존재하는 경우, 이러한 변형은 중합체의 조립 이전 또는 이후에 부여될 수 있다. 뉴클레오티드의 서열에 비뉴클레오티드 성분이 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 합성 후에, 예컨대 표지와의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다. 또 다른 유형의 변형은, 예를 들어, "캡," 하나 이상의 자연 발생 뉴클레오티드의 유사체로의 치환, 인터뉴클레오티드 변형, 예를 들어, 전하를 띠지 않는 결합 (예를 들어 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카바메이트 등) 및 전하를 띠는 결합 (예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)이 있는 것, 펜던트 부분, 예로서, 단백질 (예를 들어, 뉴클레아제, 독소, 항체, 신호 펩티드, 폴리-L-리신 등)을 함유하는 것, 인터칼레이터 (예를 들어, 아크리딘, 소랄렌 등)가 있는 것, 킬레이터 (예를 들어, 금속, 방사성 금속, 붕소, 산화성 금속 등)를 함유하는 것, 알킬레이터를 함유하는 것, 변형된 결합이 있는 것 (예를 들어, 알파 아노머 핵산 등) 뿐만 아니라, 변형되지 않은 형태의 폴리뉴클레오티드(들)을 포함한다. 추가로, 당 내에 통상적으로 존재하는 임의의 히드록실기가 예를 들어 포스포네이트기, 포스페이트기로 대체되거나, 표준 보호기로 보호되거나, 추가의 뉴클레오티드에 대한 추가의 연결부가 제조되도록 활성화되거나, 또는 고체 또는 반고체 지지체에 접합될 수 있다. 5' 및 3' 말단 OH가 포스포릴화되거나 또는 아민 또는 1 내지 20개 탄소 원자의 유기 캡핑 기 모이어티로 치환될 수도 있다. 다른 히드록실이 표준 보호기로 유도체화될 수도 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한 예를 들어 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르보시클릭 당 유사체, 알파-아노머 당, 에피머 당, 예컨대 아라비노스, 크실로스 또는 릭소스, 피라노스 당, 푸라노스 당, 세도헵툴로스, 비시클릭 유사체 및 비염기성 뉴클레오시드 유사체, 예컨대 메틸 리보시드를 비롯한, 당업계에 일반적으로 알려져 있는 리보스 또는 데옥시리보스의 유사한 형태를 함유할 수 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 연결부가 대안적 연결기로 대체될 수 있다. 이러한 대안적인 결합 기에는 포스페이트가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR_2 ("아미데이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH_2 ("포름아세탈") (여기서, 각각의 R 또는 R'는 독립적으로 H 또는 에테르(-O-) 결합을 임의로 함유하는 치환 또는 비치환된 알킬 (1-20 C), 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 아르알딜임)로 대체된 실시양태가 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다. 폴리뉴클레오티드 내의 모든 연결부가 동일할 필요는 없다. 전술한 설명은 RNA 및 DNA를 비롯하여 본원에서 언급되는 모든 폴리뉴클레오티드에 적용된다.

[0082] 일반적으로, 본원에 사용된 "올리고뉴클레오티드"는 일반적으로 길이가 약 200개 미만 뉴클레오티드이긴 하지만 반드시 그럴 필요가 없는 짧은, 일반적으로 단일 가닥, 일반적으로 합성 폴리뉴클레오티드를 나타낸다. 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "폴리뉴클레오티드"는 서로 배타적이지 않다. 폴리뉴클레오티드에 대한 상기 기재는 올리고뉴클레오티드에 동일하고 완전하게 적용가능하다.

[0083] "단리된" 항체는 천연 환경 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 항체이다. 항체의 천연 환경의 오염 성분은 상기 항체의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법으로 측정시에 항체의 95 중량%를 초과하는 정도, 가장 바람직하게는 99 중량%를 초과하는 정도로, (2) 스피닝 컵 시퀘네이터를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시

블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하여 환원 또는 비환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 균질한 것으로 나타날 정도로 정제될 것이다. 단리된 항체는 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함하는데, 이는 항체 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 1회의 정제 단계를 통해 제조될 것이다.

[0084] 용어 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링", 및 그의 변수들은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]에서의 항체 편집에서 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용된 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 사용하여, 실제적인 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축, 또는 이러한 FR 또는 CDR 내로의 삽입에 상응하는 몇 개 적거나 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 다음에 단일 아미노산 삽입물 (카바트에 따라 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 다음에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따라 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열의 상동성 영역에서 "표준" 카바트 넘버링 서열과 정렬함으로써 주어진 항체에 대하여 결정할 수 있다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에서 모든 아미노산의 위치의 넘버링은 카바트 넘버링 시스템에 따른다.

[0085] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 행한다. 일반적으로, 이러한 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al.]에서와 같은 하위군이다. 한 실시양태에서, VL에 대한 하위군은 문헌 [Kabat et al.]에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시양태에서, VH의 경우 하위군은 문헌 [Kabat et al.]에서와 같은 하위군 III이다.

[0086] "VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크"는 카바트 등의 가변 중쇄 하위군 III 내의 아미노산 서열로부터 수득된 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 각각의 하기 서열 중 적어도 일부 또는 전부를 포함한다:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (서열 11)-H1-
WVRQAPGKGLEWV (서열 12)-H2-
RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (서열 13)-H3-
WGQGTLVTVSS (서열 14)

[0087] .

[0088] "VL 하위군 I 컨센서스 프레임워크"는 카바트 등의 가변 경쇄 카파 하위군 I 내의 아미노산 서열로부터 수득된 컨센서스 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, VL 하위군 I 컨센서스 프레임워크 아미노산 서열은 각각의 하기 서열 중 적어도 일부 또는 전부를 포함한다:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (서열 15)-L1-
WYQQKPGKAPKLLIY (서열 16)-L2-
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (서열 17)-L3-
FGQGTKVEIK (서열 18)

[0089] .

[0090] 용어 "항체" 및 "이뮤노글로불린"은 가장 광범위한 의미로 상호교환가능하게 사용되고, 모노클로날 항체 (예를 들어, 전장 또는 무손상 모노클로날 항체), 폴리클로날 항체, 다가 항체, 다중특이적 항체 (예를 들어, 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 한 이중특이적 항체)를 포함하고, 또한 특정 항체 단편 (본원에서 더욱 상세하게 기술됨)을 포함할 수 있다. 항체는 인간, 인간화 및/또는 친화도 성숙 항체일 수 있다.

[0091] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부만을 포함하고, 이 때 일부는 무손상 항체 내에 존재할 때 이 부분과 정상적으로 관련된 기능을 적어도 하나, 바람직하게는 대부분 또는 전부 유지한다. 한 실시양태에서, 항체 단편은 무손상 항체의 항원 결합 부위를 포함하여 항원에 결합하는 능력을 보유한다. 또 다른 실시양태에서, 항체 단편, 예를 들어 Fc 영역을 포함하는 항체 단편은, 본래 항체 내에 존재하는 경우에 Fc 영역과 통상적으로 연관된 생물학적 기능들, 예를 들어 FcRn 결합, 항체 반감기 조정, ADCC 기능 및 보체 결합 중의 적어도 하나의 기능을 보유하고 있다. 한 실시양태에서, 항체 단편은 무손상 항체와 실질적으로 유사한 생체내 반감기를 갖는 1가 항체이다. 예를 들어, 이같은 항체 단편은 단편에 생체내 안정성을 부여할 수 있는 Fc 서열에 연결된 항원 결합 아암을 포함할 수 있다.

[0092] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동질성인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 나타내고, 즉, 이러한 집단을 포함하는 개개의 항체는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고

는 동일하다. 모노클로날 항체는 고도로 특이적이고, 단일 항원에 대하여 지시된다. 추가로, 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 달리, 각각의 모노클로날 항체는 항원상의 단결정자에 대해 지시된 것이다.

[0093] 구체적으로, 본원에서의 모노클로날 항체는 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 특정 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 쇄(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 클래스 또는 하위클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체, 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한은 이러한 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 번호 4,816,567; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)]).

[0094] 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린에서 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역의 잔기가 바람직한 특이성, 친화도 및 능력을 보유하는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 초가변 영역의 잔기로 치환된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 예에서, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기를 상응하는 비인간 잔기로 대체한다. 추가로, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 개선되게 한다. 일반적으로, 인간화 항체는 하나 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 모두 또는 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비인간 이뮤노글로불린의 초가변 루프에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 FR이다. 인간화 항체는 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 것을 또한 포함할 것이다. 추가의 상세한 내용은 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다. 또한 하기 검토 논문 및 여기에 인용된 참고문헌을 참조한다: 문헌 [Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)]; [Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)]; [Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)]을 참조한다.

[0095] "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체의 아미노산 서열에 상응하는 아미노산 서열을 갖고/거나 본원에 개시된 바와 같은 인간 항체 제조 기술 중 임의의 것을 이용하여 제조된 것이다. 인간 항체의 이러한 정의에서 비-인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 특히 제외된다.

[0096] "친화도 성숙" 항체는 변경(들)을 갖지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시키는, 하나 이상의 CDR에 하나 이상의 변경을 갖는 항체이다. 바람직한 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어는 피코몰의 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙 항체는 당업계에 공지된 절차에 의해 제조된다. 문헌 [Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992)]에서는 VH 및 VL 도메인 셔플링 (shuffling)에 의한 친화도 성숙을 설명하고 있다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이유발은 문헌 [Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994)]; [Schier et al. Gene 169:147-155 (1995)]; [Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)]; [Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)]; 및 [Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]에 기재되어 있다.

[0097] "차단" 항체 또는 "길항제" 항체는 이것이 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 항체이다. 바람직한 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다.

[0098] "장애"는 본 발명의 물질/분자 또는 방법을 사용한 치료로부터 이익을 얻는 임의의 상태이다. 여기에는 만성 및 급성 장애 또는 질환 (포유동물이 당해 장애에 걸리기 쉬운 병적 상태 포함)이 포함된다. 본원에서 치료하고자 하는 장애의 비-제한적 예에는 악성 및 양성 종양; 비-백혈병 및 림프성 악성 종양; 뉴런, 신경교, 성상세포, 시상하부 및 다른 선상, 대식세포, 상피, 간질성 및 포배강 장애; 및 염증성, 면역학적 및 다른 혈관신생-관련 장애가 포함된다.

[0099] 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 어느 정도의 비정상적인 세포 증식과 관련된 장애를 나타낸다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 암이다.

[0100] 본원에 사용된 "종양"은 모든 신생물성 세포 성장 및 증식 (악성 또는 양성 여부와 상관 없음), 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 나타낸다. 본원에 나타낸 바와 같이, 용어 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 상호 배타적인 것이 아니다.

[0101] 용어 "암" 및 "암성"은 일반적으로 조절되지 않은 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 나타내거나 설명한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예로는 편평세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포성 암, 위장암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종 및 여러 유형의 두경부암이 포함된다.

[0102] 혈관신생의 조절이상은 본 발명의 조성물 및 방법에 의해 치료될 수 있는 다수의 장애를 유발할 수 있다. 이러한 장애에는 비-신생물 및 신생물 상태 둘 모두가 포함된다. 신생물성 상태는 상기 기재된 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 비-신생물성 장애에는 바람직하지 못하거나 또는 비정상적인 비대증, 관절염, 류마티스 관절염 (RA), 건선, 건선성 플라크, 사르코이드증, 아테롬성동맥경화증, 아테롬성동맥경화판, 당뇨성 및 다른 증식성 망막병증 (미숙아 망막병증 포함), 후수정체 섬유증식증, 신생혈관 녹내장, 연령-관련 황반변성, 당뇨병성 황반 부종, 각막 신생혈관형성, 각막 이식 신생혈관형성, 각막 이식 거부, 망막 또는 맥락막 신생혈관형성, 각 신생혈관형성 (피부홍조), 안구 신생혈관 질환, 혈관 재협착, 동정맥 기형 (AVM), 수막종, 혈관종, 혈관섬유종, 갑상선 증식증 (그레이브스병 포함), 각막 및 다른 조직 이식, 만성 염증, 폐 염증, 급성 폐 손상/ARDS, 패혈증, 원발성 폐고혈압, 악성 폐 삼출물, 뇌 부종 (예를 들어, 급성 뇌졸중/폐쇄성 두부 손상/외상과 관련됨), 활막 염증, RA의 판누스 형성, 골화성 근염, 비후성 골 형성, 골관절염 (OA), 내화성 복수, 다낭성 난소 질환, 자궁내막증, 체액의 제3 공간 질환 (췌장염, 구획 증후군, 화상, 장 질환), 자궁 섬유증, 조기 분만, 만성 염증, 예컨대 IBD (크론병 및 궤양성 결장염), 신장 동종이식 거부, 염증성 장 질환, 신증후군, 바람직하지 못하거나 비정상적인 질량 덩어리 (비-암), 혈우병성 관절, 비후성 반흔, 모발 성장의 억제, 오슬레-웨버(Osler-Weber) 증후군, 화농성 육아종, 수정체후 섬유증식증, 경피증, 트라코마, 혈관 부착, 활막염, 피부염, 전자간증, 복수, 심낭 삼출액 (예컨대, 심막염과 관련) 및 흉막 삼출이 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0103] 본원에서의 "자가면역 질환"은 개체 자신의 조직으로부터 발생되고 이에 대해 지시되는 비-악성 질환 또는 장애이다. 본원에서의 자가면역 질환은 악성 또는 암성 질환 또는 상태를 특히 제외하고, B 세포 림프종, 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 모발상 세포 백혈병 및 만성 골수모구성 백혈병을 특히 제외한다. 자가면역 질환 또는 장애의 예는 염증성 반응, 예컨대 염증성 피부 질환, 예를 들어 건선 및 피부염 (예를 들어, 아토피성 피부염); 전신 경피증 및 경화증; 염증성 장 질환 (예를 들어, 크론병 및 궤양성 결장염)과 관련이 있는 반응; 호흡 곤란 증후군 (예를 들어, 성인 호흡 곤란 증후군; ARDS); 피부염; 수막염; 뇌염; 포도막염; 결장염; 사구체신염; 알레르기 상태, 예컨대 습진 및 천식, 및 T 세포의 침윤 및 만성 염증성 반응을 수반하는 다른 상태; 아테롬성동맥경화증; 백혈구 부착 결핍; 류마티스 관절염; 전신 홍반성 루푸스 (SLE); 당뇨병 (예를 들어, 제I형 당뇨병 또는 인슐린 의존성 당뇨병); 다발성 경화증; 레이노 증후군; 자가면역성 갑상선염; 알레르기성 뇌척수염; 쇼그렌 증후군; 소아 발병형 당뇨병; 및 결핵, 사르코이드증, 다발성근염, 육아종증 및 혈관염에서 전형적으로 발견되는, 시토카인 및 T-림프구에 의해 매개되는 급성 및 지연형 과민증과 관련이 있는 면역 반응; 악성 빈혈 (애디슨병); 백혈구 누출을 수반하는 질환; 중추신경계 (CNS) 염증성 장애; 다발성 장기 손상 증후군; 용혈성 빈혈 (예를 들어, 비제한적으로 한랭글로불린혈증 또는 쿰스 양성 빈혈); 중증 근무력증; 항원-항체 복합체 매개 질환; 항-사구체 기저막 질환; 항인지질 증후군; 알레르기성 신경염; 그레이브스병; 램버트-이튼 근무력증 증후군; 수포성 유천포창; 천포창; 자가면역 다발성내분비병증; 라이터병; 강직 인간 증후군; 베체트병; 거대 세포 동맥염; 면역 복합체 신염; IgA 신병증; IgM 다발성신경병증; 면역 혈소판감소성 자반증 (ITP) 또는 자가면역 혈소판감소증 등을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0104] 본원에 사용된 "치료"는 치료될 개체 또는 세포의 자연적인 과정을 변경하려는 시도에서의 임상적 개입을 나타내고, 예방을 위해 또는 임상 병리상태의 과정 도중에 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 호전, 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 축소, 전이의 예방, 질환 질행 속도의 감소, 질환 상태의 호전 또는 완화, 및 차도 또는 개선된 예후를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 질환 또는 장애의 발생을 지연시키기 위해 사용된다.

[0105] "유효량"은 바람직한 치료 또는 예방 결과 달성에 필요한 용량에서 이러한 기간 동안 효과적인 양을 나타낸다.

[0106] 본 발명의 물질/분자, 효능제 또는 길항제의 "치료 유효량"은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 개체에게서 바람직한 반응을 도출시킬 수 있는 본 발명의 물질/분자, 효능제 또는 길항제의 능력과 같은 요인들

에 따라 달라질 수 있다. 또한 치료 유효량은 물질/분자, 효능제 또는 길항제의 치료적으로 이로운 효과가 임의의 독성 또는 해로운 효과를 능가하는 양이다. "예방 유효량"은 바람직한 예방 결과 달성에 필요한 용량 및 이러한 기간 동안 효과적인 양을 나타낸다. 반드시는 아니지만, 전형적으로 예방 용량은 질환 발생 전에 또는 질환의 초기 단계에 대상체에 사용되기 때문에, 예방 유효량은 치료 유효량 미만일 것이다.

[0107] 본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 저해하고/하거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 나타낸다. 이 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 예를 들어 메토트렉세이트, 아드리아미신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포시드), 독소루비신, 멜팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 다른 인터칼레이팅제, 효소 및 그의 단편, 예컨대 뉴클레오티드분해 효소, 항생제, 및 박테리아, 진균류, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소 (이의 단편 및/또는 변이체 포함) 또는 소분자 독소와 같은 독소, 및 하기에 개시되는 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함하도록 의도된다. 다른 세포독성제는 하기 기재되어 있다. 종양사멸제는 종양 세포의 파괴를 야기한다.

[0108] "화학요법제"는 암 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예를 들어, 티오테파 및 시톡산(CYTOXAN)®

시클로스포스파미드; 알킬 술포네이트, 예를 들어, 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예를 들어, 벤조도파, 카르보쿠온, 메트우레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히, 불라타신 및 불라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)®

); 베타-라파콘; 라파콜; 콜키신; 베툴린산; 캄프토테신 (예를 들어, 합성 유사체 토포테칸 (하이캄틴(HYCAMTIN)®

), CPT-11 (이로노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)®

), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴, 및 9-아미노캄프토테신); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히, 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체인 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어, 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜파란, 노벤비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들어, 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예를 들어, 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히, 칼리케아미신 감마1I 및 칼리케아미신 오메가I1 (예를 들어, 문헌 [Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); 다이네미신 (다이네미신 A 포함); 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색단백질 에네디인 항생제 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칵티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 덱토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (아드리아미신(ADRIAMYCIN)®

, 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포솜 주사(독실(DOXIL)®

) 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사제, 예컨대 메토트렉세이트, 겜시타빈 (겜자르(GEMZAR)®

), 테가푸르 (유프토랄(UFTORAL)®

), 카페시타빈 (젤로다(XELODA)®

), 에포틸론 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예를 들어, 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어, 플루다라빈, 6-메르캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리

미딘 유사체, 예를 들어, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예를 들어, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스톨락톤; 항부신제, 예를 들어, 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충제, 예를 들어, 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예를 들어, 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미토크산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK®

폴리사카라이드 복합체 (제이에이치에스 내츄럴 프로덕츠(JHS Natural Products), 오레곤주 유진 소재); 로족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안귀딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)®

, 필데신(FILDESIN)®

); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)®

), 파클리탁셀의 알부민-조작 나노입자 제제 (아브락산(ABRAXANE)™), 및 독세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)®

); 클로란부실; 6-티오구아닌; 메르캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예를 들어, 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)®

); 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)®

); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)®

); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어, 레티노산; 및 상기 임의의 물질의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체 뿐만 아니라 2개 이상의 상기 물질의 조합물, 예를 들어, CHOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 및 프레드니솔론의 조합 요법의 약어) 및 FOLFOX (5-FU 및 류코보빈과 조합한 옥살리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN)™을 사용한 치료 요법의 약어)를 포함한다.

[0109] 또한, 상기 정의에는 암의 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 효과를 조절하거나 감소시키거나 차단하거나 억제하는 작용을 하고, 종종 전신 치료의 형태인 항-호르몬제도 포함된다. 이들은 그 자체가 호르몬일 수 있다. 예로는 타목시펜 (놀바덱스(NOLVADEX)®

타목시펜 포함), 랄록시펜 (에비스타(EVISTA)®

), 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 토레미펜 (파레스톤(FARESTON)®

)이 예를 들어 포함되는 항-에스트로겐 및 선택적인 에스트로겐 수용체 조절자 (SERM); 항-프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향-조절제 (ERD); 에스트로겐 수용체 길항제, 예컨대 풀베스트란트 (파슬로덱스(FASLODEX)®

); 난소를 저해하거나 정지시키는 기능을 하는 작용제, 예를 들어 황체형성 호르몬-방출 호르몬 (LHRH) 효능제, 예컨대 류프롤리드 아세테이트 (루프론®

및 엘리가드(ELIGARD)®

), 고세렐린 아세테이트, 부세렐린 아세테이트 및 트리프테렐린; 다른 항-안드로겐제, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 부신에서의 에스트로겐 생성을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예컨대 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메게스트롤 아세테이트 (메가세(MEGASE)®

), 엑세메스탄 (아로마신(AROMASIN)®

), 포르메스타니에, 파드로졸, 보로졸 (리비소르(RIVISOR)®

), 레트로졸 (페마라(FEMARA)®

), 및 아나스트로졸 (아리미덱스(ARIMIDEX)®

)이 포함된다. 또한, 상기 화학요법제의 이러한 정의는 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)®

또는 오스탁(OSTAC)®

), 에티드로네이트 (디드로칼(DIDROCAL)®

), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트 (조메타(ZOMETA)®

), 알렌드로네이트 (포사막스(FOSAMAX)®

), 팔미드로네이트 (아레디아(AREDIA)®

), 틸루드로네이트 (스켈리드(SKELID)®

) 또는 리세드로네이트 (악토넬(ACTONEL)®

), 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히, 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R)와 같은, 이상 세포 증식과 관련이 있는 신호전달 경로의 유전자의 발현을 억제하는 것들; 백신, 예컨대 테라토프(THERATOPE)®

백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)®

백신, 류벡틴(LEUVECTIN)®

백신 및 박시드(VAXID)®

백신; 토포이소머라제 1 억제제 (예를 들어, 루르토테칸(LURTOTECAN)®

); rmRH (예를 들어, 아바렐릭스(ABARELIX)®

); 라파티닙 디토실레이트 (GW572016으로도 공지된 ErbB-2 및 EGFR 이중 티로신 키나제 소분자 억제제); COX-2 억제제, 예컨대 셀레콕시브 (셀레브렉스(CELEBREX)®

; 4-(5-(4-메틸페닐)-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-1-일) 벤젠술폰아미드; 및 임의의 상기 물질들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0110] 본원에 사용된 경우 "성장 억제제"는 시험관내 또는 생체내에서 그의 성장이 HGF/c-met 활성화에 의존하는 세포의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 HGF/c-met-의존성 세포의 백분율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 단계에) 차단하는 작용제, 예컨대 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 작용제를 포함한다. 통상적인 M기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C는 S기 정지로까지 이어질 수도 있다. 추가의 정보는 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995)] (특히 p. 13)에서 찾아볼 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 모두 주목에서 유래된 항암 약물이다. 유럽형 주목에서 유래된 도세탁셀 (탁

소테레®

, 론-프랑 로러(Rhone-Poulenc Rorer))은 파클리탁셀 (탁솔®

, 브리스톨-마이어스 스퀴브(Bristol-Myers Squibb))의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜불린 이량체로부터의 미세소관 어셈블리를 촉진하고, 탈중합을 방지함으로써 미세소관을 안정화시켜서 세포에서의 유사분열 억제를 야기한다.

[0111] "독소루비신"은 안트라시클린 항생제이다. 독소루비신의 완전한 화학명은 (8S-시스)-10-[(3-아미노-2,3,6-트리데옥시-α-L-릭소-헥사피라노실)옥시]-7,8,9,10-테트라히드로-6,8,11-트리히드록시-8-(히드록시아세틸)-1-메톡시-5,12-나프타센디온이다.

[0112] 벡터, 숙주 세포 및 재조합 방법

[0113] 본 발명의 항체의 재조합 생성을 위해서는, 이를 코딩하는 핵산을 단리시키고, 추가의 클로닝 (DNA 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능한 벡터에 삽입한다. 항체를 코딩하는 DNA는 통상의 절차를 사용 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용)하여 쉽게 단리 및 서열분석된다. 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터의 선택은 부분적으로는 사용되는 숙주 세포에 따른다. 일반적으로, 바람직한 숙주 세포는 원핵세포 또는 진핵세포 (일반적으로, 포유동물) 기원 중 하나이다.

[0114] 원핵 숙주 세포를 사용한 항체의 생성:

[0115] 벡터 구축

[0116] 본 발명의 항체의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 표준 재조합 기술을 사용하여 얻을 수 있다. 바람직한 폴리뉴클레오티드 서열은 항체 생성 세포, 예컨대 하이브리도마 세포로부터 단리되어 서열 결정될 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 일단 얻은 후에, 폴리펩티드를 코딩하는 서열은 원핵 숙주에서 이종 폴리뉴클레오티드를 복제 및 발현할 수 있는 재조합 벡터 내로 삽입된다. 입수가능하고 당업계에 공지된 많은 벡터를 본 발명의 목적에 사용할 수 있다. 적절한 벡터의 선택은 주로 벡터에 삽입되는 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환되는 특정 숙주 세포에 따를 것이다. 각각의 벡터는 그의 기능 (이종 폴리뉴클레오티드의 증폭 또는 발현, 또는 둘 모두) 및 벡터가 존재하게 되는 특정 숙주 세포와의 상용성에 따라 다양한 성분을 포함한다. 벡터 성분은 일반적으로 복제 기점, 선택 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위 (RBS), 신호 서열, 이종 핵산 삽입물 및 전사 종결 서열을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0117] 일반적으로, 숙주 세포와 상용성인 종으로부터 유래된 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 플라스미드 벡터가 상기 숙주와 함께 사용된다. 벡터는 통상적으로 복제 부위, 및 형질전환된 세포에서 표현형 선택을 제공할 수 있는 마킹 서열을 포함한다. 예를 들어, 이. 콜라이는 전형적으로 이. 콜라이 종으로부터 유래된 플라스미드인 pBR322를 사용하여 형질전환시킨다. pBR322는 암피실린 (Amp) 및 테트라시클린 (Tet) 내성을 코딩하는 유전자를 함유하고, 따라서 형질전환된 세포를 확인하기 위한 용이한 수단을 제공한다. pBR322, 그의 유도체, 또는 다른 미생물 플라스미드 또는 박테리오파지 또한 내인성 단백질의 발현을 위해 미생물 유기체에 의해 사용될 수 있는 프로모터를 함유하거나 상기 프로모터를 함유하도록 변형될 수 있다. 특정 항체의 발현을 위해 사용되는 pBR322 유도체의 예는 미국 특허 번호 5,648,237 (Carter et al.)에 상세하게 기재되어 있다.

[0118] 또한, 숙주 미생물과 상용성인 레플리콘 및 제어 서열을 함유하는 파지 벡터를 상기 숙주에 대한 형질전환 벡터로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 박테리오파지, 예컨대 λGEM.TM.-11이 이. 콜라이 LE392와 같은 감수성 숙주 세포의 형질전환에 사용될 수 있는 재조합 벡터의 제조에 이용될 수 있다.

[0119] 본 발명의 발현 벡터는 각각의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 2종 이상의 프로모터-시스트론 쌍을 포함할 수 있다. 프로모터는 시스트론의 발현을 조정하는, 시스트론의 상류 (5')에 위치하는 번역되지 않는 제어 서열이다. 원핵세포 프로모터는 전형적으로 두 유형의 프로모터, 즉 유도성 및 구성적 프로모터로 분류된다. 유도성 프로모터는 배양 조건에서의 변화, 예를 들어 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도에서의 변화에 반응하여 그의 제어 하에 있는 시스트론의 전사 수준 증가를 개시시키는 프로모터이다.

[0120] 다양한 잠재적 숙주 세포에 의해 인식되는 수많은 프로모터가 공지되어 있다. 선택된 프로모터는, 제한 효소 소화를 통해 공급원 DNA로부터 프로모터를 제거하고 단리된 프로모터 서열을 본 발명의 벡터 내로 삽입함으로

써 경쇄 또는 중쇄를 코딩하는 시스트론 DNA에 작동가능하게 연결될 수 있다. 천연 프로모터 서열 및 많은 이종 프로모터를 둘 모두 사용하여 표적 유전자의 증폭 및/또는 발현을 지시할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이종 프로모터는 일반적으로 천연 표적 폴리펩티드 프로모터에 비해 발현된 표적 유전자의 보다 큰 전사 및 보다 높은 수율을 가능하게 하기 때문에 이것이 이용된다.

[0121] 원핵 숙주에 사용하기 적합한 프로모터에는 PhoA 프로모터, β-갈락타마제 및 락토스 프로모터 시스템, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 및 하이브리드 프로모터, 예컨대 tac 또는 trc 프로모터가 포함된다. 그러나, 박테리아에서 기능적인 다른 프로모터 (예컨대, 다른 공지의 박테리아 또는 파지 프로모터)도 적합하다. 그의 뉴클레오티드 서열은 공개되어 있고, 당업자는 임의의 요구되는 제한 부위를 공급하도록 링커 또는 어댑터를 사용하여 이들 서열을 표적 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 시스트론에 작동가능하게 라이게이션할 수 있다 (문헌 [Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269).

[0122] 본 발명의 한 측면에서, 재조합 벡터 내의 각각의 시스트론은 발현된 폴리펩티드의 막을 가로지른 전위를 지시하는 분비 신호 서열 성분을 포함한다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 한 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내에 삽입되는 표적 폴리펩티드 DNA의 일부일 수 있다. 본 발명의 목적을 위해 선택된 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식되고 프로세싱 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단)되는 것이어야 한다. 이종성 폴리펩티드에 천연인 신호 서열을 인식 및 프로세싱하지 않는 원핵생물 숙주 세포에 대해서, 신호 서열이 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정성 장독소 II (STII) 리더, LamB, PhoE, PelB, OmpA 및 MBP로 이루어진 군으로부터 예를 들어 선택된 원핵생물 신호 서열로 치환된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 발현 시스템의 시스트론 모두에 사용되는 신호 서열은 STII 신호 서열 또는 그의 변이체이다.

[0123] 또 다른 측면에서, 본 발명에 따른 이뮤노글로불린의 생성은 숙주 세포의 세포질에서 일어날 수 있으며, 따라서 각 시스트론 내의 분비 신호 서열의 존재를 요구하지 않는다. 이와 관련하여, 이뮤노글로불린 경쇄 및 중쇄가 발현되고, 폴딩되고, 어셈블리되어, 세포질 내에서 기능적 이뮤노글로불린을 형성한다. 특정 숙주 균주 (예를 들어, 이. 콜라이 trxB$^-$ 균주)는 디술피드 결합 형성에 유리한 세포질 조건을 제공함으로써, 발현된 단백질 서브유닛의 적절한 폴딩 및 어셈블리를 허용한다. 문헌 [Proba and Pluckthun Gene, 159:203 (1995)].

[0124] 본 발명은 발현된 폴리펩티드 성분의 정량적 비가 분비되고 적절하게 어셈블리된 항체의 수율을 최대화하도록 조정될 수 있는 발현 시스템을 제공한다. 이러한 조절은 폴리펩티드 성분에 대한 번역 강도의 동시 조절에 의해 적어도 부분적으로 달성된다.

[0125] 번역 강도의 조절을 위한 한 가지 기술은 미국 특허 번호 5,840,523 (Simmons et al.)에 개시되어 있다. 이는 시스트론 내의 번역 개시 영역 (TIR)의 변이체를 이용한다. 소정의 TIR에 대해, 일련의 아미노산 또는 핵산 서열 변이체는 일정 범위의 번역 강도로 생성됨으로써, 상기 인자를 특정 쇄의 목적하는 발현 수준을 위해 조정하는 편리한 수단을 제공할 수 있다. TIR 변이체는 아미노산 서열을 변경할 수 있는 코돈 변화를 초래하는 통상적인 돌연변이유발 기술에 의해 생성될 수 있지만, 뉴클레오티드 서열의 침묵 변경이 바람직하다. TIR의 변경은 예를 들어 신호 서열의 변경과 함께 샤인-달가노 (Shine-Dalgarno) 서열의 수 또는 간격의 변경을 포함할 수 있다. 돌연변이체 신호 서열을 생성하는 한 가지 방법은 신호 서열의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 (즉, 변화가 침묵된) 코딩 서열의 시작점에서의 "코돈 뱅크 (codon bank)"의 생성이다. 이는 각각의 코돈의 제3 뉴클레오티드 위치의 변화에 의해 달성될 수 있으며; 또한 류신, 세린 및 아르기닌과 같은 일부 아미노산은 상기 뱅크를 제조하는데 있어서 복잡성을 추가할 수 있는 다수의 제1 및 제2 위치를 갖는다. 이 돌연변이유발의 방법은 문헌 [Yansura et al. (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158]에 상세히 기재되어 있다.

[0126] 바람직하게는, 그 안의 각각의 시스트론에 대한 일정 범위의 TIR 강도를 갖는 벡터의 세트가 생성된다. 상기 제한된 세트는 각각의 쇄의 발현 수준 뿐만 아니라 다양한 TIR 강도 조합 하에서 목적하는 항체 생성물의 수율의 비교를 제공한다. TIR 강도는 미국 특허 번호 5,840,523 (Simmons et al.)에 상세히 기재된 바와 같이 리포터 유전자의 발현 수준을 정량화함으로써 결정될 수 있다. 번역 강도 비교를 기초로 하여, 본 발명의 발현 벡터 구조물에 조합되도록 목적하는 개별 TIR을 선택한다.

[0127] 본 발명의 항체의 발현에 적합한 원핵 숙주 세포에는 원시세균 및 유박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체가 포함된다. 유용한 박테리아의 예에는 에스케리키아(Escherichia) (예를 들어, 이. 콜라이), 바실루스 (예를 들어, 비. 서브틸리스(B. subtilis)), 엔테로박테리아), 슈도모나스(Pseudomonas) 종 (예를 들어, 피. 아에루기노사(P. aeruginosa)), 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium), 세라티아 마르세스칸스(Serratia marcescans), 클레브시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 시겔라(Shigella), 리조비아

(Rhizobia), 비트레오실라(Vitreoscilla) 또는 파라코쿠스(Paracoccus)가 포함된다. 한 실시양태에서, 그람-음성 세포가 사용된다. 한 실시양태에서, 이. 콜라이 세포가 본 발명에서 숙주로서 사용된다. 이. 콜라이 균주의 예로는 균주 W3110 (문헌 [Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219]; ATCC 기탁 번호 27,325) 및 그의 유도체, 예컨대 유전자형 W3110 ΔfhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 kan^R을 갖는 균주 33D3 (미국 특허 번호 5,639,635)이 포함된다. 다른 균주 및 그의 유도체, 예컨대 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446), 이. 콜라이 B, 이. 콜라이$_\lambda$ 1776 (ATCC 31,537) 및 이. 콜라이 RV308 (ATCC 31,608)이 또한 적합하다. 이러한 예들은 제한적이기보다는 예시적이다. 특정 유전자형을 갖는 언급된 박테리아의 유도체 중 어느 하나를 제작하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990)]에 기재되어 있다. 박테리아 세포 내의 레플리콘의 복제능을 고려하여 적절한 박테리아를 선택하는 것이 일반적으로 필요하다. 예를 들어, pBR322, pBR325, pACYC177, 또는 pKN410과 같은 널리 공지된 플라스미드를 사용하여 레플리콘을 공급하는 경우에는, 이. 콜라이, 세라티아, 또는 살모넬라 종이 숙주로서 적합하게 사용될 수 있다. 전형적으로, 숙주 세포는 최소량의 단백질 분해 효소를 분비해야 하며, 추가의 프로테아제 억제제는 바람직하게는 세포 배양물에 혼입될 수 있다.

[0128] 항체 생성

[0129] 숙주 세포를 상기 기재된 발현 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 바람직한 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 필요에 따라 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양시킨다.

[0130] 형질전환은 DNA가 염색체외 요소로서 또는 염색체 통합체에 의해 복제가능하도록 DNA를 원핵 숙주 내로 도입하는 것을 의미한다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 그 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 염화칼슘을 사용한 칼슘 처리는 실질적인 세포벽 장벽을 함유하는 박테리아 세포에 일반적으로 사용된다. 또 다른 형질전환 방법은 폴리에틸렌 글리콜/DMSO를 사용한다. 사용되는 또 다른 기술은 전기천공이다.

[0131] 본 발명의 폴리펩티드를 생성하는데 사용되는 원핵세포를 당업계에 공지되고 선택된 숙주 세포의 배양에 적합한 배지에서 성장시킨다. 적합한 배지의 예에는 필수 영양 보충물이 부가된 루리아 브로쓰(luria broth; LB)가 포함된다. 일부 실시양태에서, 배지는 또한 발현 벡터를 함유하는 원핵세포의 성장을 선택적으로 허용하는, 발현 벡터의 구성을 기초로 하여 선택된 선택제를 함유한다. 예를 들어, 암피실린은 암피실린 내성 유전자를 발현하는 세포를 성장시키기 위한 배지에 첨가된다.

[0132] 또한, 탄소, 질소 및 무기 포스페이트 공급원 이외의 임의의 필요한 보충물이, 단독으로, 또는 복합 질소 공급원과 같은 또 다른 보충물 또는 배지와의 혼합물로서 도입되어 적절한 농도로 포함될 수 있다. 임의로, 배양 배지는 글루타티온, 시스테인, 시스타민, 티오글리콜레이트, 디티오에리트리톨 및 디티오트레이톨로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 환원제를 함유할 수 있다.

[0133] 원핵 숙주 세포를 적합한 온도에서 배양한다. 이. 콜라이 성장을 위해, 바람직한 온도는 예를 들어 약 20℃ 내지 약 39℃, 보다 바람직하게는 약 25℃ 내지 약 37℃, 보다 더 바람직하게는 약 30℃이다. 배지의 pH는 주로 숙주 유기체에 따라 약 5 내지 약 9 범위의 임의의 pH일 수 있다. 이. 콜라이의 경우, pH는 바람직하게는 약 6.8 내지 약 7.4, 보다 바람직하게는 약 7.0이다.

[0134] 유도성 프로모터가 본 발명의 발현 벡터에 사용되는 경우에, 단백질 발현은 프로모터의 활성화에 적합한 조건하에서 유도된다. 본 발명의 한 측면에서, PhoA 프로모터가 폴리펩티드의 전사의 제어에 사용된다. 따라서, 형질전환된 숙주 세포는 유도용의 포스페이트-제한 배지에서 배양된다. 바람직하게는, 포스페이트-제한 배지는 C.R.A.P 배지이다 (예를 들어, 문헌 [Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147] 참조). 당업계에 공지된 바와 같이, 사용되는 벡터 구조물에 따라 다양한 다른 유도제가 사용될 수 있다.

[0135] 한 실시양태에서, 본 발명의 발현된 폴리펩티드는 숙주 세포의 원형질막 공간 내로 분비되고 그로부터 회수된다. 전형적으로, 단백질 회수는 일반적으로 삼투압 충격, 초음파 처리 또는 용해와 같은 수단에 의해 미생물을 분쇄하는 것을 포함한다. 세포가 분쇄되면, 세포 잔해 또는 전체 세포를 원심분리 또는 여과에 의해 제거할 수 있다. 단백질은 예를 들어 친화성 수지 크로마토그래피에 의해 추가로 정제할 수 있다. 대안적으로, 단백질을 배양 배지 내로 옮기고, 그 안에서 단리할 수 있다. 세포를 배양물로부터 제거하고, 배양 상청액을 여과하고 농축하여 생성된 단백질을 추가로 정제할 수 있다. 발현된 폴리펩티드를 추가로 단리하고, 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (PAGE) 및 웨스턴 블롯 검정과 같은 통상적으로 공지된 방법을 이용하여 확인할 수 있다.

[0136] 본 발명의 한 측면에서, 항체 생성은 발효 공정에 의해 대량으로 수행된다. 다양한 대규모 유가식 발효 절차가 재조합 단백질의 생성에 이용가능하다. 대규모 발효는 적어도 1000 리터의 용량, 바람직하게는 약 1,000 내지 100,000 리터의 용량을 갖는다. 이러한 발효조는 산소 및 영양소, 특히 글루코스 (바람직한 탄소/에너지 공급원)를 분배시키는 교반기 추진기를 사용한다. 소규모 발효는 일반적으로, 용적이 대략 100 리터 이하인 발효조 내에서의 발효를 지칭하는데, 이는 약 1 리터 내지 약 100 리터 범위일 수 있다.

[0137] 발효 공정에서, 단백질 발현의 유도는 전형적으로 세포를 적합한 조건 하에서 목적하는 밀도, 예를 들어 약 180 내지 220의 OD_{550}으로 성장시킨 후에 개시되며, 이 단계에서 세포는 초기 정지상이다. 당업계에 공지되고 상기 기재된 바와 같이, 사용되는 벡터 구조물에 따라 다양한 유도제를 사용할 수 있다. 세포를 유도 전에 보다 짧은 기간 동안 성장시킬 수 있다. 세포를 통상적으로 약 12 내지 50시간 동안 유도하지만, 보다 길거나 보다 짧은 유도 시간이 사용될 수도 있다.

[0138] 본 발명의 폴리펩티드의 생성 수율 및 품질을 향상시키기 위해, 다양한 발효 조건을 변형시킬 수 있다. 예를 들어, 분비된 항체 폴리펩티드의 적당한 어셈블리와 폴딩을 개선시키기 위해, 샤페론 단백질, 예를 들어 Dsb 단백질 (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD 및/또는 DsbG) 또는 FkpA (샤페론 활성을 갖는 펩티딜프롤릴 시스,트랜스-이소머라제)를 과다발현하는 부가의 벡터를 사용하여 숙주 원핵 세포를 공동-형질전환시킬 수 있다. 샤페론 단백질은 박테리아 숙주 세포에서 생성된 이종 단백질의 적절한 폴딩 및 가용성을 용이하게 하는 것으로 입증되었다. 문헌 [Chen et al. (1999) J Bio Chem 274:19601-19605]; 미국 특허 번호 6,083,715 (Georgiou et al.); 미국 특허 번호 6,027,888 (Georgiou et al.); [Bothmann and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105]; [Ramm and Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113]; [Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210].

[0139] 발현된 이종 단백질 (특히, 단백질 분해에 감수성인 단백질)의 단백질 분해를 최소화하기 위해, 단백질 분해 효소가 결핍된 특정 숙주 균주를 본 발명에 사용할 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포 균주를 변형시켜, 공지된 세균성 프로테아제, 예를 들어 프로테아제 III, OmpT, DegP, Tsp, 프로테아제 I, 프로테아제 Mi, 프로테아제 V, 프로테아제 VI 및 그의 조합을 코딩하는 유전자에서 유전적 돌연변이(들)를 수행할 수 있다. 몇몇 이. 콜라이 프로테아제-결핍 균주가 이용가능하며, 예를 들어 [Joly et al. (1998), 상기 문헌]; 미국 특허 번호 5,264,365 (Georgiou et al.); 미국 특허 번호 5,508,192 (Georgiou et al.); 문헌 [Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)]에 기재되어 있다.

[0140] 한 실시양태에서, 단백질분해 효소가 결핍되고 하나 이상의 샤페론 단백질을 과다발현하는 플라스미드로 형질전환된 이. 콜라이 균주가 본 발명의 발현 시스템에서 숙주 세포로 사용된다.

[0141] 항체 정제

[0142] 한 실시양태에서, 추가적인 분석법 및 용도를 위한 실질적으로 균질한 제제를 수득하기 위해 본원에서 생산된 항체 단백질이 추가로 정제하였다. 당업계에 공지된 표준 단백질 정제 방법이 이용될 수 있다. 하기 절차는 적합한 정제 절차의 예이다: 면역친화성 또는 이온-교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상 또는 DEAE와 같은 양이온-교환 수지 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 황산암모늄 침전, 및 예를 들어 세파덱스(Sephadex) G-75를 이용한 겔 여과.

[0143] 한 측면에서, 고체상에 고정된 단백질 A가 본 발명의 전장 항체 생성물의 면역친화성 정제에 사용된다. 단백질 A는 항체의 Fc 영역에 고친화도로 결합하는 스타필로코쿠스 아우레우스(Staphylococcus aureas) 유래의 41 kD 세포벽 단백질이다. 문헌 [Lindmark et al. (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13]. 단백질 A가 고정되는 고체상은 바람직하게는 유리 또는 실리카 표면을 포함하는 칼럼, 보다 바람직하게는 제어된 공극 유리 칼럼 또는 규산 칼럼일 수 있다. 일부 용도에서, 칼럼을 글리세롤과 같은 시약으로 코팅하여 가능하게는 오염물의 비특이적 부착을 방지한다.

[0144] 정제의 제1 단계로서, 상기 기재된 바와 같은 세포 배양액으로부터 유래된 제제를 단백질 A 고정된 고체상에 적용하여 관심 항체가 단백질 A에 특이적으로 결합하게 할 수 있다. 그 후, 고체상을 세척하여 고체상에 비-특이적으로 결합된 오염물을 제거하였다. 최종적으로, 관심 항체를 용출에 의해 고체상으로부터 회수한다.

[0145] 진핵 숙주 세포를 사용한 항체의 생성:

[0146] 벡터 성분은 일반적으로 다음 중 하나 이상을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열.

[0147] (i) 신호 서열 성분

[0148] 진핵 숙주 세포에 사용하기 위한 벡터는 또한 신호 서열, 또는 관심 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드를 함유할 수 있다. 바람직하게 선택된 이종 신호 서열은 숙주 세포에 의해 인식 및 프로세싱 (즉, 신호 펩티다제에 의해 절단)되는 것이다. 포유동물 세포 발현시에는, 포유동물 신호 서열 및 또한 바이러스 분비 리더, 예를 들어 단순 포진 gD 신호가 이용가능하다.

[0149] 이러한 전구체 영역을 위한 DNA는 항체를 코딩하는 DNA에 리딩 프레임으로 라이게이션된다.

[0150] (ii) 복제 기점

[0151] 일반적으로, 복제 기점 성분은 포유동물 발현 벡터에 대해서는 필요하지 않다. 예를 들어, SV40 기점이 전형적으로 사용될 수 있는데, 그 이유는 단지 이것이 초기 프로모터를 함유하기 때문이다.

[0152] (iii) 선택 유전자 성분

[0153] 발현 및 클로닝 벡터는 선택가능한 마커라고도 불리는 선택 유전자를 함유할 수 있다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토트렉세이트 또는 테트라시클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 관련이 있는 경우에는 영양요구성 결핍을 보충하거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요한 영양소를 공급하는 단백질을 코딩한다.

[0154] 선택 양식의 한 예는 숙주 세포의 성장을 정지시키기 위해 약물을 사용한다. 이종 유전자로 연속적으로 형질전환된 세포는 약물 내성을 부여하는 단백질을 생성하고, 이에 따라 선택 처방을 살린다. 이러한 우세한 선택의 예는 약물 네오마이신, 미코페놀산 및 히그로마이신을 사용한다.

[0155] 포유동물 세포에 적합한 선택가능한 마커의 또 다른 예는 항체 핵산을 취할 수 있는 세포 성분의 확인을 가능하게 하는 것, 예컨대 DHFR, 티미딘 키나제, 메탈로티오네인-I 및 -II, 바람직하게는 영장류 메탈로티오네인 유전자, 아데노신 데아미나제, 오르니틴 데카르복실라제 등이다.

[0156] 예를 들어, DHFR 선택 유전자로 형질전환된 세포는 우선 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토트렉세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지에서 모든 형질전환체를 배양함으로써 확인한다. 야생형 DHFR을 사용할 때의 적절한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결여된 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주 (예를 들어, ATCC CRL-9096)이다.

[0157] 대안적으로, 항체, 야생형 DHFR 단백질, 및 또 다른 선택성 마커, 예컨대 아미노글리코시드 3'-포스포트랜스퍼라제 (APH)를 코딩하는 DNA 서열로 형질감염되거나 공동-형질감염된 숙주 세포 (특히 내인성 DHFR을 함유하는 야생형 숙주)를 아미노글리코시드성 항생제, 예를 들어, 카나마이신, 네오마이신 또는 G418과 같은 선택성 마커에 대한 선택제를 함유하는 배지에서의 세포 성장에 의해 선택할 수 있다. 미국 특허 번호 4,965,199를 참조한다.

[0158] (iv) 프로모터 성분

[0159] 발현 및 클로닝 벡터는 보통 숙주 유기체에 의해 인식되고 항체 폴리펩티드 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 프로모터 서열은 진핵생물에 대해 공지되어 있다. 실질적으로 모든 진핵세포 유전자는 전사가 개시되는 부위로부터 대략 25 내지 30개 염기 상류에 위치하는 AT-풍부 영역을 갖는다. 많은 유전자의 전사 출발점으로부터 70 내지 80개 염기 상류에 존재하는 또 다른 서열은 CNCAAT 영역 (여기서, N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)이다. 코딩 서열의 3' 말단에 폴리 A 꼬리의 부가를 위한 신호일 수 있는 AATAAA 서열이 대부분의 진핵세포 유전자의 3' 말단에 존재한다. 모든 이러한 서열들이 진핵 발현 벡터 내로 적합하게 삽입된다.

[0160] 포유동물 숙주 세포에서의 벡터로부터의 항체 폴리펩티드 전사는, 예를 들어, 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스 (예컨대, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)와 같은 바이러스의 게놈으로부터, 이종성 포유동물 프로모터, 예를 들어, 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터로부터, 또는 열 충격 프로모터로부터 수득된 프로모터에 의해 제어될 수 있고, 단, 이같은 프로모터들은 숙주 세포 시스템과 혼화성이다.

[0161] SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득하였다. 인간 시토메갈로바이러스의 극초기 프로모터가 HindIII E 제한 단편으로 편리하게 수득하였다. 소 유두종 바이러스를 벡터로 사용하여 포유동물 숙주에서 DNA를 발현시키기 위한 시스템이 미국

특허 번호 4,419,446에 개시되어 있다. 이러한 시스템의 변형은 미국 특허 번호 4,601,978에 기재되어 있다. 또한, 단순 포진 바이러스로부터의 티미딘 키나제 프로모터의 제어하에 마우스 세포에서 인간 β-인터페론 cDNA의 발현에 대해서는 또한 문헌 [Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982)]을 참조한다. 대안적으로, 라우스 육종 바이러스의 긴 말단 반복체를 프로모터로 사용할 수 있다.

[0162] (v) 인핸서 요소 성분

[0163] 고등 진핵세포에 의한 본 발명의 항체 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 전사는 종종 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가된다. 많은 인핸서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α-태아단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 전형적으로는 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용할 것이다. 이것의 예는 복제 기점의 하류 쪽 (bp 100-270)의 SV40 인핸서, 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점 하류 쪽의 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 또한, 진핵 프로모터의 활성화를 위한 증강 요소에 대한 문헌 [Yaniv, Nature 297:17-18 (1982)]을 참조한다. 인핸서는 항체 폴리펩티드-코딩 서열에 대해 위치 5' 또는 3'에서 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 부위 5'에 위치한다.

[0164] (vi) 전사 종결 성분

[0165] 진핵 숙주 세포에 사용되는 발현 벡터는 보통 전사 종결 및 mRNA 안정화에 필요한 서열 또한 함유할 것이다. 이러한 서열은 진핵생물 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 통상적으로 이용가능하다. 이들 영역은 항체를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사되는 뉴클레오티드 절편을 포함한다. 유용한 전사 종결 성분 중 하나는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 영역이다. WO94/11026 및 이에 개시된 발현 벡터를 참조한다.

[0166] (vii) 숙주 세포의 선택 및 형질전환

[0167] 본원의 벡터에서 DNA의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포에는 척추동물 숙주 세포를 비롯하여 본원에 기재된 보다 고등한 진핵세포가 포함된다. 배양 (조직 배양)시 척추동물 세포의 증식은 일상적인 방법이 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40으로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (293 세포 또는 현탁 배양으로 성장시키기 위해 서브클로닝된 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 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 (문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간종양 세포주 (Hep G2)이다.

[0168] 숙주 세포를 상기 기재된 항체 생성을 위한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시킨 다음, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 바람직한 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형시킨 통상의 영양 배지에서 배양시킨다.

[0169] (viii) 숙주 세포 배양

[0170] 본 발명의 항체를 생산하는데 사용된 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 시판 배지, 예컨대 햄 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM) (시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 둘베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (DMEM) (시그마)가 숙주 세포의 배양에 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)], [Barnes et al., Anal. Biochem.102:255 (1980)], 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 기재된 배지 중 임의의 배지를 숙주 세포용 배양 배지로 사용할 수 있다. 임의의 이들 배지에는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대, HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대, 겐타마이신(GENTAMYCIN)™ 약물), 미량 원소 (통상적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 등가의 에너지원이 보충될 수 있다. 또한, 임의의 다른 필요한 보충물을 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함시킬 수도 있다. 배양 조건, 예컨대 온

도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 이용된 것이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0171] (ix) 항체의 정제

[0172] 재조합 기술을 사용할 때, 항체는 세포 내에서 생성되거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생성되는 경우, 제1 단계로서 입자형 잔해인 숙주 세포 또는 용해된 단편을 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거하였다. 항체가 배지로 분비되는 경우, 일반적으로는 우선 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 사용하여 농축시킨다. 단백질분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제, 예를 들어 PMSF를 임의의 이전 단계에 포함시킬 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 저해하기 위해 항생제를 포함시킬 수 있다.

[0173] 세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를 들어 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있는데, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화도 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A가 γ1, γ2 또는 γ4 중쇄를 기초로 한 항체를 정제하기 위해 사용될 수 있다 (문헌 [Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 γ3에 대해 권장된다 (문헌 [Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)]). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 공극이 제어된 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스로 달성할 수 있는 것보다 더 빠른 유속 및 더 짧은 프로세싱 시간을 가능하게 한다. 항체가 C_H3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지 (제이. 티. 베이커(J. T. Baker), 뉴저지주 필립스버그 소재)가 정제에 유용하다. 회수할 항체에 따라, 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카에서의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스(SEPHAROSE)™ 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예를 들어, 폴리아스파르트산 칼럼)에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전이 이용될 수도 있다.

[0174] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물로 pH 약 2.5 내지 4.5의 용리 완충제를 사용하는, 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어 약 0 내지 0.25 M 염)에서 수행되는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피를 실시할 수 있다.

[0175] 활성 검정

[0176] 본 발명의 항체는 당업계에 공지된 다양한 검정에 의해 그의 물리적/화학적 성질 및 생물학적 기능에 대해 특성화될 수 있다.

[0177] 정제된 이뮤노글로불린은 N-말단 서열분석, 아미노산 분석, 비-변성 크기 배제 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC), 질량 분광법, 이온 교환 크로마토그래피 및 파파인 소화가 포함되지만 이에 제한되지는 않는 일련의 검정에 의해 추가로 특성화할 수 있다.

[0178] 본 발명의 특정 실시양태에서, 본원에서 제조된 항체는 그의 생물학적 활성에 대하여 분석된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 이뮤노글로불린은 그의 항원 결합 활성에 대하여 시험된다. 당업계에 공지되고 본원에서 사용될 수 있는 항원 결합 검정은 웨스턴 블롯, 방사성 면역검정, ELISA (효소 결합 면역흡착 검정), "샌드위치" 면역검정, 면역침전 검정, 형광 면역검정 및 단백질 A 면역검정과 같은 기술을 이용한 임의의 직접적 또는 경쟁적 결합 검정을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 항원 결합 검정은 이하의 실시예 섹션에서 제공된다.

[0179] 한 실시양태에서, 본 발명은 생체내 항체의 반감기가 중요하지만 특정 이펙터 기능 (예컨대, 보체 및 ADCC)이 불필요하거나 유해한 다수의 응용에서 항체를 바람직한 후보자로 만드는 작동체 기능 일부 (전부는 아님)를 갖는 변형된 항체를 고찰한다. 특정 실시양태에서, 항체의 Fc 활성을 측정하여 원하는 특성만이 유지되는 것을 확인한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정을 수행할 수 있다. 예를 들어, 항체에 FcγR 결합은 없지만 (따라서, 아마도 ADCC 활성이 없을 것임), FcRn 결합 능력은 보유하고 있는 것을 확인하기 위해서 Fc 수용체 (FcR) 결합 검정을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 FcγRIII 만을 발현하는 반면에, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII을 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)]의

페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위한 시험관내 검정의 예가 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재되어 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초혈 단핵 세포(PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다. 항체가 C1q에 결합하지 못하여 CDC 활성이 결여되어 있는지를 확인하기 위해 또한 C1q 결합 검정을 수행할 수도 있다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재되어 있는 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다. 또한, FcRn 결합 및 생체내 청소율/반감기 측정을 당업계에 공지된 방법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0180] 인간화 항체

[0181] 본 발명은 인간화 항체를 포함한다. 비-인간 항체를 인간화하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 인간화 항체에는 비-인간 공급원으로부터 유래된 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입되어 있을 수 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입" 잔기라 지칭되고, 전형적으로는 "유입" 가변 도메인으로부터의 것이다. 인간화는 인간 항체의 상응하는 서열을 초가변 영역 서열로 치환하여 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료들의 방법 (문헌 [Jones et al. (1986) Nature 321:522-525]; [Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-327]; [Verhoeyen et al. (1988) Science 239:1534-1536])을 따라 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 부분이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체 (미국 특허 번호 4,816,567)이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 초가변 영역 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

[0182] 인간화 항체의 제조에 사용되는 인간 가변 도메인 경쇄 및 중쇄 둘 다의 선택은 항원성 감소에 매우 중요하다. 소위 "최적 맞춤(best-fit)" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인 서열을 공지의 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열이 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크로서 받아들여진다 (문헌 [Sims et al. (1993) J. Immunol. 151:2296]; [Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크를 이용한다. 동일한 프레임워크가 여러 상이한 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다 (문헌 [Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285]; [Presta et al. (1993) J. Immunol., 151:2623]).

[0183] 추가로, 항체가 항원에 대해 높은 친화도를 보유하고 다른 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화하는 것이 중요하다. 이러한 목적을 달성하기 위해서, 한 방법에 따라, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 공정에 의해 제조된다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하고, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이를 조사하면 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 수용자 서열 및 도입 서열로부터 선택 및 조합되어 바람직한 항체 특징, 예를 들어 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, 항원 결합에 대한 영향에는 초가변 영역 잔기가 직접적이고 가장 실질적으로 관여한다.

[0184] 항체 변이체

[0185] 한 측면에서, 본 발명은 Fc 영역을 포함하는 Fc 폴리펩티드의 인터페이스 내에서의 변형을 포함하는 항체를 제공하며, 이러한 변형은 이종이량체화를 용이하게하고/하거나 촉진시킨다. 이들 변형은 제1 Fc 폴리펩티드 내로의 돌출부 도입 및 제2 Fc 폴리펩티드 내로의 캐비티의 도입을 포함하고, 여기서 상기 돌출부는 상기 캐비티 내에 위치하여 제1 및 제2 Fc 폴리펩티드의 복합체화를 촉진시킬 수 있다. 이러한 변형을 갖는 항체를 생성하는 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 미국 특허 번호 5,731,168에 기재되어 있다.

[0186] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)이 구현된다. 예를 들어, 항체의 결합 친화성 및/또는 다른 생물학적 특성을 개선시키는 것이 바람직할 수 있다. 항체의 아미노산 서열 변이체들은 적절한 뉴클레오티드 변화를 항체 핵산 내에 도입함으로써, 또는 펩티드 합성에 의해 제조된다. 이러한 변형은 예를 들어 항체의 아미노산 서열 내 잔기의 결실 및/또는 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 최종 구축물이 원하는 특성을 갖는다는 조건하에 결실, 삽입 및 치환의 임의 조합이 이루어져 최종 구축물에 도달된다. 아미노산 변경은 서열이 제조되는 시점에 대상 항체 아미노산 서열에 도입될 수 있다.

[0187] 돌연변이유발에 바람직한 위치인 항체의 특정 잔기 또는 영역을 확인하는데 유용한 방법은 문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085]에 기재된 바와 같이 "알라닌 스캐닝 돌연변이유발"이라 불린다. 여기서, 잔기 또는 표적 잔기들의 군이 확인되고 (예를 들어, 하전된 잔기, 예컨대 arg, asp, his, lys, 및 glu), 중성 또는 음으로 하전된 아미노산 (가장 바람직하게는 알라닌 또는 폴리알라닌)으로 치환되어 아미노산과 항원과의 상호작용에 영향을 미친다. 그 후, 치환에 대해 기능적 감수성을 나타내는 아미노산 위치가 치환 부위에 또는 치환 부위에 대해 추가적인 또는 다른 변이체를 도입함으로써 정제된다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이 그 자체의 성질을 미리 결정할 필요는 없다. 예를 들어, 주어진 부위에서의 돌연변이의 성능을 분석하기 위해, 표적 코돈 또는 영역에서 ala 스캐닝 또는 무작위 돌연변이유발을 수행하고, 발현된 이뮤노글로불린을 바람직한 활성에 대해 스크리닝한다.

[0188] 아미노산 서열 삽입에는 길이 범위가 1개의 잔기 내지 100개 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드에 이르는 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합 뿐만 아니라 단일 또는 다수 아미노산 잔기의 서열내 삽입이 포함된다. 말단 삽입의 예로는 N-말단 메티오닐 잔기가 있는 항체 또는 세포독성 폴리펩티드에 융합된 항체가 포함된다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는 효소 (예를 들어, ADEPT의 경우) 또는 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드가 항체의 N- 또는 C-말단에 융합된 것을 포함한다.

[0189] 또 다른 유형의 변이체는 아미노산 치환 변이체이다. 이러한 변이체에서는 항체 분자 내의 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 잔기로 대체된다. 치환 돌연변이유발에 가장 흥미로운 부위에는 초가변 영역이 포함되지만, FR 변경 또한 고려된다. 보존적 치환은 "바람직한 치환"의 표제 하에 표 A에 나타낸다. 이같은 치환으로 생물학적 활성이 변하게 되면, 표 A에서 "예시적인 치환"으로 명명된 또는 아미노산 클래스와 관련하여 하기에 추가로 기재되는 바와 같은 더욱 실질적인 변화가 도입될 수 있고, 생성물을 스크리닝하게 된다.

[0190] [표 A]

본래의 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신	Leu
Leu (L)	노르류신 ; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신	Leu

[0191]

[0192] 항체의 생물학적 특성에 있어서의 실질적인 변형은 (a) 예를 들어 시트 또는 나선 형상으로서, 치환 영역 내의 폴리펩티드 백본의 구조, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피를 유지하는 것에 대한 효과가 현저하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다. 아미노산은 그의 측쇄 특성의 유사성에 따라 하기 군으로 나뉠 수 있다 (문헌 [A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)]):

[0193] (1) 비-극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

[0194] (2) 비하전 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

[0195] (3) 산성: Asp (D), Glu (E)

[0196] (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His (H)

[0197] 대안적으로, 자연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성에 기초하여 하기 군으로 나뉠 수 있다:

[0198] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0199] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0200] (3) 산성: Asp, Glu;

[0201] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

[0202] (5) 쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;

[0203] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0204] 비-보존적 치환은 이들 클래스 중의 하나의 구성원을 또 다른 클래스로 교환하는 것을 수반할 것이다. 이러한 치환된 잔기를 또한 보존적 치환 부위에, 또는 더욱 바람직하게는 나머지 (비-보존된) 부위에 도입할 수 있다.

[0205] 치환 변이체의 한 가지 유형은 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 초가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가적인 개발용으로 선택된 생성된 변이체(들)은 이들이 생성되는 모 항체에 비해 생물학적 특성이 개선될 것이다. 이러한 치환 변이체를 생성하는 편리한 방법은 파지 디스플레이를 사용한 친화도 성숙이다. 간략하게 설명하면, 여러 초가변 영역 부위 (예를 들어, 6 내지 7개 부위)를 각 부위에서 모든 가능한 아미노산 치환이 생성되도록 돌연변이시킨다. 이렇게 생성된 항체가 필라멘트형 파지 입자로부터 각각의 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합물로서 디스플레이된다. 이어서, 파지-디스플레이된 변이체를 본원에 개시된 바와 같이 이들의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화성)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 초가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌-스캐닝 돌연변이유발을 수행하여 항원 결합에 유의하게 기여하는 초가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체 및 항원 사이의 접촉 지점을 확인하기 위해서는 항원 항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 이같은 접촉 잔기와 인접하는 잔기는 본원에서 상술된 기술에 따른 치환에 대한 후보이다. 일단 이같은 변이체가 생성되면, 변이체들의 패널을 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 한가지 이상의 관련 검정에서 우수한 특성을 갖는 항체를 추가적인 개발을 위해 선택할 수 있다.

[0206] 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이러한 방법에는 천연 공급원으로부터의 단리 (자연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우), 또는 항체의 앞서 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 올리고뉴클레오티드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발 및 카세트 돌연변이유발에 의한 제조가 포함되지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0207] 본 발명의 이뮤노글로불린 폴리펩티드의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 변형을 도입하여 Fc 영역 변이체를 생성시키는 것이 바람직할 수 있다. Fc 영역 변이체는 힌지 시스테인의 위치를 포함한 하나 이상의 아미노산 위치에서의 아미노산 변형 (예를 들어 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예를 들어, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0208] 본원 명세서 및 선행기술의 교시 내용에 따라, 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법에 사용된 항체는 야생형 대응 항체와 비교하여, 예를 들어 Fc 영역에 하나 이상의 변경을 포함할 수 있음이 고려된다. 그럼에도 불구하고 이러한 항체는 그의 야생형 대응물과 비교하여 치료학적 유용성에 요구되는 실질적으로 동일한 특성을 유지할 것이다. 예를 들어, WO99/51642에 기재된 바와 같이, 예를 들어 변경된 (즉, 향상된 또는 감소된) C1q 결합 및/또는 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 초래할 특정 변경이 Fc 영역에서 이루어질 수 있는 것으로 생각된다. Fc 영역 변이체의 또 다른 예에 관한 문헌 [Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO94/29351을 또한 참조한다.

[0209] 면역접합체

[0210] 본 발명은 세포독성제, 예컨대 화학요법제, 약물, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는

동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성접합체)에 접합된 항체를 포함하는 면역접합체 또는 항체-약물 접합체 (ADC)에 또한 관련된다.

[0211] 암의 치료에서 세포독성제 또는 세포증식억제제, 즉 종양 세포를 사멸시키거나 억제하는 약물의 국소적 전달을 위해 항체-약물 접합체를 사용하는 것 (문헌 [Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614]; [Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172]; 미국 특허 번호 4,975,278)은 종양에 대한 약물 모이어티의 표적화 전달 및 그곳에서의 세포내 축적을 허용하고, 반면에 접합되지 않은 이러한 약물 작용제의 전신 투여는 제거하려고 하는 종양 세포뿐만 아니라 정상 세포에 허용할 수 없는 수준의 독성을 초래할 수 있다 (문헌 [Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05]; [Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506]). 이에 의해 최소 독성과 함께 최대 효능이 추구된다. 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체 둘 모두가 이러한 전략에 유용하다고 보고되었다 (문헌 [Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87]). 상기 방법에 사용되는 약물은 다우노미신, 독소루비신, 메토트렉세이트, 및 빈데신을 포함한다 (문헌 [Rowland et al., (1986) 상기 문헌]). 항체-독소 접합체에 사용된 독소로는 박테리아 독소, 예컨대 디프테리아 독소, 식물 독소, 예컨대 리신, 소분자 독소, 예컨대 겔다나미신 (문헌 [Mandler et al. (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581]; [Mandler et al. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028]; [Mandler et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791]), 메이탄시노이드 (EP 1391213; 문헌 [Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623]), 및 칼리케아미신 (문헌 [Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928]; [Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342])이 포함된다. 독소는 튜불린 결합, DNA 결합, 또는 토포이소머라제 억제를 포함하는 메카니즘에 의해 그의 세포독성 및 세포증식억제 효과를 나타낼 수 있다. 일부 세포독성 약물은 큰 항체 또는 단백질 수용체 리간드에 접합되는 경우에 불활성이 되거나 활성이 감소되는 경향이 있다.

[0212] 제발린 (ZEVALIN®) (이브리투모맙 티욱세탄, 비오겐 (Biogen)/이덱 (Idec))은 티오우레아 링커-킬레이터에 의해 결합된, 정상 및 악성 B 림프구의 표면 상에서 발견되는 CD20 항원에 대해 지시된 뮤린 IgG1 카파 모노클로날 항체 및 ^{111}In 또는 ^{90}Y 방사성동위원소로 이루어진 항체-방사성동위원소 접합체이다 (문헌 [Wiseman et al. (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77]; [Wiseman et al. (2002) Blood 99(12):4336-42]; [Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63]; [Witzig et al. (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69]). 제발린은 B-세포 비-호지킨 림프종 (NHL)에 대해 활성을 갖지만, 투여는 대부분의 환자에서 중증 및 장기 혈구감소증을 일으킨다. 칼리키아마이신에 연결된 hu CD33 항체로 구성된 항체-약물 접합체인 밀로타르그(MYLOTARG)™ (젬투주맙 오조가미신, 와이어쓰 파마슈티칼스(Wyeth Pharmaceuticals))은 주사에 의한 급성 골수성 백혈병의 치료에 대해 2000년에 승인되었다 (문헌 [Drugs of the Future (2000) 25(7):686]; 미국 특허 번호 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). 칸투주맙 메르탄신 (이뮤노겐, 인크.(Immunogen, Inc.)) (디술피드 링커 SPP를 통해 메이탄시노이드 약물 잔기, DM1에 연결된 huC242 항체로 이루어진 항체 약물 접합체)은 CanAg를 발현하는 암, 예컨대 결장암, 췌장암, 위암 등의 치료를 위해 제II상 임상 시험이 진행되고 있다. MLN-2704 (밀레니엄 팜.(Millennium Pharm.), BZL 바이올로직스(BZL Biologics), 이뮤노겐 인크.) (메이탄시노이드 약물 잔기, DM1에 연결된 항-전립선 특이적 막 항원 (PSMA) 모노클로날 항체로 이루어진 항체 약물 접합체)는 전립선 종양의 잠재적인 치료를 위해 개발되고 있다. 아우리스타틴 펩티드인 아우리스타틴 E (AE) 및 모노메틸아우리스타틴 (MMAE) (돌라스타틴의 합성 유사체)이 키메라 모노클로날 항체 cBR96 (암종 상의 루이스(Lewis) Y에 특이적) 및 cAC10 (혈액학적 악성종양 상의 CD30에 특이적)에 접합되었고 (문헌 [Doronina et al. (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784]), 치료용으로 개발 중이다.

[0213] 이러한 면역접합체의 생성에 유용한 화학요법제는 앞서 기재된 바 있다. 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비-결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사(Pseudomonas aeruginosa)로부터 유래됨), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(Aleurites fordii) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(Phytolaca americana) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(momordica charantia) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(sapaonaria officinalis) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 방사성접합된 항체의 생성을 위한 다양한 방사선핵종이 이용가능하다. 예는 ^{212}Bi,

^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, 및 ^{186}Re를 포함한다. 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질-커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디프이미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)를 사용하여 제조된다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 대한 방사성뉴클레오티드의 접합을 위한 예시적 킬레이트화제이다. WO94/11026을 참조한다.

[0214] 항체 및 하나 이상의 소분자 독소, 예를 들어 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 트리코테센 및 CC1065, 및 독소 활성을 지닌 이들 독소의 유도체의 접합체가 또한 본원에 고려된다.

[0215] 메이탄신 및 메이탄시노이드

[0216] 한 실시양태에서, 본 발명의 항체 (전장 또는 단편)는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된다.

[0217] 메이탄시노이드는 튜불린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타(Maytenus serrata)로부터 처음 단리되었다 (미국 특허 번호 3,896,111). 이후, 특정 미생물이 또한 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생성하는 것으로 발견되었다 (미국 특허 번호 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체는 예를 들어 하기 특허에 개시되어 있고, 이들의 개시내용은 본원에 참고로 명백하게 포함된다: 미국 특허 번호 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533.

[0218] 메이탄시노이드-항체 접합체

[0219] 메이탄신 및 메이탄시노이드의 치료 지수를 개선시키기 위한 시도로서, 이들을 종양 세포 항원과 특이적으로 결합하는 항체에 접합시켰다. 메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체 및 그의 치료 용도는 예를 들어 미국 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에 개시되어 있으며, 이들의 개시 내용은 본원에 참고로 명백하게 포함된다. 문헌 [Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)]에는 인간 결장직장암에 대해 작용하는 모노클로날 항체 C242에 연결된 DM1로 명명된 메이탄시노이드를 포함하는 면역접합체가 기재되어 있다. 상기 접합체는 배양된 결장암 세포에 대해 고도로 세포독성인 것으로 밝혀졌고, 생체내 종양 성장 검정에서 항종양 활성을 나타냈다. 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]에서는 메이탄시노이드가 인간 결장암 세포주 상의 항원에 결합하는 뮤린 항체 A7에 또는 HER-2/neu 종양유전자에 결합하는 다른 뮤린 모노클로날 항체 TA.1에 디술피드 링커를 통해 접합된 면역접합체를 설명하고 있다. TA.1-메이탄시노이드 접합체의 세포독성은 세포당 3 x 10^5개 HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3에 대해 시험관내 시험되었다. 약물 접합체는 유리 메이탄시노이드 약물에 유사한 수준의 세포독성을 달성하였고, 이것은 항체 분자당 메이탄시노이드 분자의 수를 증가시켜 증가시킬 수 있다. A7-메이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 나타냈다.

[0220] 항체-메이탄시노이드 접합체 (면역접합체)

[0221] 항체-메이탄시노이드 접합체는 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의하게 감소시키지 않으면서 항체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결시킴으로써 제조된다. 항체 분자 당 평균 3 내지 4개로 접합된 메이탄시노이드 분자는 항체의 기능 또는 용해도에 부정적인 영향 없이 표적 세포의 세포독성을 증진시키는 효능을 나타냈지만, 1개의 독소/항체 분자일지라도 네이키드 항체의 사용에 비해 세포독성을 증진시킬 것이라 예상된다. 메이탄시노이드는 당업계에 공지되어 있으며, 공지의 기술에 의해 합성될 수도 있고 천연 공급원으로부터 단리될 수도 있다. 적합한 메이탄시노이드는 예를 들어 미국 특허 번호 5,208,020 및 본원에서 상기 언급된 다른 특허 및 비특허 간행물에 개시되어 있다. 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀, 및 메이탄시놀 분자의 방향족 고리 또는 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예컨대 다양한 메이탄시놀 에스테르이다.

[0222] 항체-메이탄시노이드 접합체를 제조하는 것으로 당업계에 공지된 많은 연결기가 있으며, 예를 들어 미국 특허 번호 5,208,020 또는 EP 특허 0 425 235 B1, 및 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]에

개시된 것을 포함한다. 연결기는 상기 언급된 특허에 개시된 바와 같이 디술피드 기, 티오에테르 기, 산 불안정성 기, 광분해성 기, 펩티다제 불안정성 기 또는 에스테라제 불안정성 기를 포함하고, 디술피드 및 티오에테르 기가 바람직하다.

[0223] 각종 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올)프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스 (p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여, 항체와 메이탄시노이드의 접합체를 만들 수 있다. 특히 바람직한 커플링제로는 디술피드 연결을 제공하는 N-숙신이미딜-4-(2-피리딜티오)펜타노에이트 (SPP) 및 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP) (문헌 [Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978]])가 포함된다.

[0224] 링커는 연결 유형에 따라 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연결부는 통상적인 커플링 기술을 이용하여 히드록실 기와의 반응으로 형성될 수 있다. 반응은 히드록실 기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실 기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실 기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.

[0225] 칼리케아미신

[0226] 관심있는 또 다른 면역접합체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자와 접합된 항체를 포함한다. 칼리케아미신 부류의 항생제는 피코몰 미만의 농도에서 이중 가닥 DNA 절단부를 생성할 수 있다. 칼리케아미신 부류의 접합체의 제조에 대해서는, 미국 특허 번호 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (모두 아메리칸 시아나미드 캄파니(American Cyanamid Company))을 참조한다. 사용할 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체는 γ_1^I, α_2^I, α_3^I, N-아세틸-γ_1^I, PSAG 및 θ^I_1을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다 (문헌 [Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993)], [Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)] 및 상기 언급된 아메리칸 시아나미드의 미국 특허). 항체가 접합될 수 있는 또 다른 항-종양 약물은 항폴레이트인 QFA이다. 칼리케아미신 및 QFA는 둘 모두 세포내 작용 부위를 갖고, 원형질막을 쉽게 통과하지 않는다. 따라서, 항체-매개 내재화를 통한 이들 작용제의 세포 흡수는 이들의 세포독성 효과를 크게 증진시킨다.

[0227] 다른 세포독성제

[0228] 본 발명의 항체에 접합될 수 있는 다른 항종양제로는 BCNU, 스트렙토조신, 빈크리스틴 및 5-플루오로우라실, 미국 특허 번호 5,053,394, 5,770,710에 기재된, 집합적으로 LL-E33288 복합체로 공지된 물질의 패밀리, 및 에스페라미신 (미국 특허 번호 5,877,296)을 들 수 있다.

[0229] 사용할 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사로부터 유래됨), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 예를 들어, 1993년 10월 28일에 공개된 WO 93/21232를 참조한다.

[0230] 본 발명은 항체와 핵산분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예컨대 데옥시리보뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 면역접합체를 추가로 고려한다.

[0231] 종양의 선택적 파괴를 위해서, 항체는 고도의 방사성 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성동위원소가 방사성 접합된 항체의 생성을 위해 이용가능하다. 그 예는 At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212}, 및 Lu의 방사성동위원소를 포함한다. 접합체는 검출용으로 사용되는 경우에 섬광조영 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc^{99m} 또는 I^{123}을 포함하거나, 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, mri로도 공지됨)용 스핀 표지, 예를 들어 아이오딘-123, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산

소-17, 가돌리늄, 망가니즈 또는 철을 포함할 수 있다.

[0232] 방사성- 또는 다른 표지를 공지된 방법으로 접합체에 혼입시킬 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 생합성될 수도 있고, 또는 예를 들어 수소 대신에 플루오린-19를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 사용한 화학적 아미노산 합성에 의해 합성될 수도 있다. tc^{99m} 또는 I^{123}, $.Re^{186}$, Re^{188} 및 In^{111}과 같은 표지가 펩티드 내의 시스테인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 이트륨-90은 리신 잔기를 통해 부착될 수 있다. 아이오도겐(IODOGEN) 방법(문헌 [Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57])을 사용하여 아이오딘-123을 혼입시킬 수 있다. 문헌 ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal,CRC Press 1989)]에는 다른 방법이 상세히 기재되어 있다.

[0233] 각종 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올)프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스 (p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여, 항체와 세포독성제의 접합체를 만들 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 대한 방사성뉴클레오티드의 접합을 위한 예시적인 킬레이트화제이다. WO94/11026을 참조한다. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정성 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광분해성 링커, 디메틸 링커 또는 디술피드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0234] **본 발명의 화합물은 시판하는 (예를 들어 피어스 바이오테크놀로지, 인크.(Pierce Biotechnology, Inc.) (미국 일리노이주 록포드 소재)로부터의) 가교제 시약: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술폰)벤조에이트)를 사용하여 제조된 ADC를 명백하게 고려하지만, 이에 제한되지는 않는다. 문헌 [2003-2004 Applications Handbook and Catalog]의 467-498 페이지를 참조한다.**

[0235] **항체 약물 접합체의 제조**

[0236] **본 발명의 항체 약물 접합체 (ADC)에서, 항체 (Ab)는 링커 (L)를 통해 항체 당 하나 이상의 약물 모이어티 (D), 예를 들어 약 1 내지 약 20개의 약물 모이어티에 접합된다. 화학식 I의 ADC는 (1) 항체의 친핵성 기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통하여 Ab-L을 형성시킨 후, 이를 약물 모이어티 D와 반응시키고; (2) 약물 모이어티의 친핵성 기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통하여 D-L을 형성시킨 다음, 이를 항체의 친핵성 기와 반응시키는 것을 비롯한 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 사용하여 여러 경로에 의해 제조될 수 있다.**

[0237] <화학식 I>

[0238] $Ab-(L-D)_p$

[0239] 항체 상의 친핵성 기는 (i) N-말단 아민 기, (ii) 측쇄 아민 기, 예를 들어 리신, (iii) 측쇄 티올 기, 예를 들어 시스테인, 및 (iv) 항체가 글리코실화되는 당 히드록실 기 또는 아미노 기를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 아민, 티올 및 히드록실 기는 친핵성이고, 반응하여 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기, 예를 들어 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드 기와 공유 결합을 형성할 수 있다. 특정 항체는 환원가능한 쇄간 디술피드, 즉 시스테인 브릿지를 갖는다. 환원제, 예컨대 DTT (디티오트레이톨) 처리를 통해 항체를 링커 시약과의 접합에 반응성이 되도록 할 수 있다. 따라서, 각각의 시스테인 브릿지는 이론상 2개의 반응성 티올 친핵성 기를 형성할 것이다. 리신을 2-이미노티올란 (트라우트 시약)과 반응시켜서 아민을 티올로 전환시킴으로써 추가의 친핵성 기를 항체에 도입할 수 있다.

[0240] 본 발명의 항체 약물 접합체는 또한 링커 시약 또는 약물상의 친핵성 치환기와 반응할 수 있는 친전자성 부분

이 도입되도록 항체를 변형시켜 생성될 수도 있다. 글리코실화된 항체의 당을, 예를 들어 퍼아이오데이트 산화 시약으로 산화시켜서 링커 시약 또는 약물 모이어티의 아민 기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤 기를 형성할 수 있다. 생성되는 이민 쉬프 염기성 기는 안정적인 연결부를 형성할 수도 있거나, 또는 예를 들어 보로히드라이드 시약에 의해 환원되어 안정적인 아민 연결부를 형성할 수도 있다. 한 실시양태에서, 글리코실화된 항체의 탄수화물 부분을 갈락토스 옥시다제 또는 나트륨 메타-퍼아이오데이트와 반응시키면, 약물 상의 적절한 기와 반응할 수 있는 카르보닐 (알데히드 및 케톤)기가 단백질 내에 생성될 수 있다 (헤르만슨, 바이오컨쥬게이트 테크닉스(Hermanson, Bioconjugate Techniques)). 또 다른 실시양태에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 단백질을 나트륨 메타-퍼아이오데이트와 반응시키면, 제1 아미노산 대신에 알데히드가 생성될 수 있다 (문헌 [Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146]; US 5362852). 이러한 알데히드는 약물 모이어티 또는 링커 친핵체와 반응할 수 있다.

[0241] 마찬가지로, 약물 모이어티 상의 친핵성 기는 (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드; (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세트아미드; (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드기를 포함하는, 링커 모이어티 및 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있는, 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트, 및 아릴히드라지드 기를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0242] 대안적으로, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. DNA의 길이는 서로 인접하거나 접합체의 바람직한 특성을 파괴하지 않는 링커 펩티드를 코딩하는 영역에 의해 분리된, 접합체의 2개 부분을 코딩하는 각각의 영역을 포함할 수 있다.

[0243] 또 다른 실시양태에서, 항체를 종양 예비표적화에 활용하기 위해 "수용체" (상기, 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있고, 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 다음, 소거제를 사용하여 결합되지 않은 접합체를 순환계로부터 제거하고, 이어서 세포독성제 (예를 들어, 방사성 뉴클레오티드)에 접합된 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여한다.

[0244] 항체 유도체

[0245] 본 발명의 항체는 당업계에 공지되고 용이하게 입수가능한 추가적인 비단백질성 모이어티를 함유하도록 추가로 변형될 수 있다. 바람직하게는, 항체의 유도체화에 적합한 모이어티는 수용성 중합체이다. 수용성 중합체의 비제한적 예는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로스, 덱스트란, 폴리비닐 알콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레산 무수물 공중합체, 폴리아미노산 (단독중합체 또는 랜덤 공중합체), 및 덱스트란 또는 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 (예를 들어, 글리세롤), 폴리비닐 알콜, 및 이들의 혼합물을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데히드는 물에서의 안정성으로 인해 제조에 유리할 수 있다. 중합체는 임의의 분자량을 가질 수 있고, 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 항체에 부착된 중합체의 수는 변할 수 있고, 1개를 초과하는 중합체가 부착될 경우, 중합체들은 동일하거나 상이한 분자일 수 있다. 일반적으로, 유도체화에 사용되는 중합체의 수 및/또는 유형은 개선될 항체의 특정 특성 또는 기능, 항체 유도체가 규정된 조건하에 요법에서 사용될 것인지의 여부 등을 포함하지만 이에 제한되지는 않은 고려사항을 기초로 결정될 수 있다.

[0246] 제약 제제

[0247] 본 발명의 항체를 포함하는 치료 제제는 목적하는 정도의 순도를 갖는 항체를 선택적인 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)])와 혼합함으로써 보관을 위해 수용액, 동결건조 또는 다른 건조 제제의 형태로 제조된다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라진, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 덱스트린; 킬레이팅제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨;

염-형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 금속 복합체 (예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예컨대 트윈(TWEEN)™, 플루로닉스(PLURONICS)™, 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함할 수 있다.

[0248] 본원에서의 제제는 치료될 특정 적응증에 필요하다면 하나 초과의 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 역효과를 일으키지 않는 보완적인 활성이 있는 것들을 또한 함유할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

[0249] 활성 성분은 예를 들어 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀젼, 나노입자 및 나노캡슐) 내에, 또는 매크로에멀젼 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0250] 생체내 투여에 사용될 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.

[0251] 서방성 제제를 제조할 수 있다. 서방성 제제의 적합한 예는 본 발명의 이뮤노글로불린을 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 이러한 매트릭스는 성형 용품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 서방성 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 미소구), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일을 초과하여 분자를 방출할 수 있는 반면, 특정 히드로겔은 단백질을 더 짧은 기간 동안 방출한다. 캡슐화된 이뮤노글로불린이 오랜 시간 동안 신체 내에 유지되는 경우, 이들은 37℃에서 습기에 노출될 때 변성 또는 응집되어 생물학적 활성의 손실 및 면역원성의 가능한 변화가 야기될 수 있다. 수반된 메카니즘에 따라 안정화를 위한 합리적인 전략이 고안된다. 예를 들어, 응집 메카니즘이 티오-디술피드 상호교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 발견되면, 안정화는 술프히드릴 잔기의 변형, 산성 용액으로부터의 동결건조, 수분 함량의 제어, 적절한 첨가제의 사용 및 특정 중합체 매트릭스 조성물의 개발에 의해 달성될 수 있다.

[0252] 특정 실시양태에서, 세포독성제와 접합된 항체를 포함하는 면역접합체가 환자에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 면역접합체 및/또는 면역접합체가 결합되는 항원이 세포에 의해 내재화되어, 면역접합체가 결합하는 표적 세포를 사멸시키는 것에서의 면역접합체의 치료 효능의 증가가 초래된다. 한 실시양태에서, 세포독성제는 표적 세포 내의 핵산을 표적으로 하거나 방해한다. 이같은 세포독성제의 예로는 본원에서 언급된 임의의 화학요법제 (예컨대, 메이탄시노이드 또는 칼리케아미신), 방사성 동위원소, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제가 포함된다.

[0253] 본 발명의 항체는 요법에서 단독으로 또는 다른 조성물과 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 또 다른 항체, 화학요법제(들) (화학요법제의 칵테일 포함), 다른 세포독성제(들), 항혈관신생제(들), 시토카인 및/또는 성장 억제제(들)과 공동 투여될 수 있다. 본 발명의 항체가 종양 성장을 억제하는 것일 경우, 그것을 종양 성장을 또한 억제하는 하나 이상의 다른 치료제(들)와 조합하는 것이 특히 바람직할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 환자는 조합된 방사선 요법 (예를 들어, 외부 빔 조사 또는 방사성 표지된 작용제, 예컨대 항체에 의한 요법)을 받을 수도 있다. 상기 언급된 이러한 조합 요법에는 조합 투여 (이 경우에는 2종 이상의 작용제가 동일 또는 별도 제제에 포함됨) 및 별도 투여가 포함되고, 이 경우 본 발명 항체는 보조 요법 또는 요법들의 투여 전 및/또는 후에 투여될 수 있다.

[0254] 본 발명의 항체 (및 보조 치료제)는 비경구, 피하, 복강내, 폐내 및 비내, 및 경우에 따라 국소 치료용의 병변내 투여를 비롯한 임의의 적합한 수단에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 추가로, 항체는 특히 항체의 용량을 감소시킨 펄스 주입에 의해 적합하게 투여된다. 투여는 임의의 적합한 경로, 예를 들어 부분적으로는 투여가 단기인지 장기인지에 따라 정맥내 또는 피하 주사와 같은 주사에 의해 수행될 수 있다.

[0255] 본 발명의 항체 조성물은 우수한 의료 실무와 일치하는 방식으로 제제화되고, 용량에 따라 분배되고, 투여될 것이다. 이와 관련하여 고려할 인자에는 치료할 특정 장애, 치료받을 특정 포유동물, 개별 환자의 임상적 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의료 전문인에게 공지된 다른 인자가 포함된다. 반드시 그럴 필요는 없지만, 임의로, 항체는 문제의 장애를 예방 또는 치료하는데 현재 사용되는 하

나 이상의 작용제와 함께 제제화된다. 이같은 다른 작용제의 유효량은 제형 내에 존재하는 본 발명의 항체의 양, 장애 또는 치료의 유형, 및 다른 상기 논의된 인자에 좌우된다. 일반적으로, 이들은 이전에 사용되던 것과 동일한 투여량 및 투여 경로로 사용되거나, 이전에 사용되던 투여량의 약 1 내지 99%로 사용된다.

[0256] 질환을 예방 또는 치료하기 위한 본 발명의 항체의 적당한 투여량 (단독으로 사용되거나 또는 다른 작용제, 예를 들어 화학요법제와 병용해서 사용되는 경우)은 치료하고자 하는 질환의 유형, 항체의 유형, 항체가 예방 목적으로 투여되는지 아니면 치료 목적으로 투여되든지 간에 질환의 중증도 및 과정, 기존의 요법, 환자의 임상 병력 및 항체에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 의해 좌우될 것이다. 항체는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다. 한 가지 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 1 ㎍/kg 내지 100 mg/kg 이상의 범위일 수 있다 (예를 들어, 하나 이상의 독립적인 투여 또는 연속 주입에 의함). 수일 또는 그보다 오랜 기간에 걸친 반복 투여의 경우, 상태에 따라서 치료는 질환 증상이 원하는 수준으로 저해될 때까지 지속된다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 기술 및 검정에 의해 쉽게 모니터링된다.

[0257] 제조품

[0258] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기 언급된 장애의 치료, 예방 및/또는 진단에 유용한 물질을 함유하는 제조품이 제공된다. 제조품은 용기, 및 용기 상에 있거나 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지 등을 포함한다. 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 용기가 형성될 수 있다. 용기는 상기 질환을 치료, 예방 및/또는 진단하는 데에 유효한 조성물만을 보유하고 있거나, 또는 이러한 조성물을 상기와 같이 유효한 또 다른 조성물과 병용해서 보유하고 있고, 멸균성 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 상기 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액제 백 또는 바이알일 수 있다). 조성물 내의 적어도 한 가지 활성제는 본 발명의 항체이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물이 선택된 상태, 예컨대 암의 치료에 사용된다는 것을 표시한다. 또한, 제조품은 (a) 그 내부에 특정 조성물을 함유하고 있는 제1 용기 (여기서, 상기 조성물은 본 발명의 항체를 포함함); 및 (b) 그 내부에 특정 조성물을 함유하고 있는 제2 용기 (여기서, 상기 조성물은 추가의 세포독성제를 포함함)를 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 실시양태에서의 제조품은, 제1 및 제2 항체 조성물이 특정 상태, 예를 들어 암을 치료하기 위해 사용될 수 있음을 나타내는 포장 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 제조품은 제약상 허용되는 완충제, 예컨대 주사용 정균수 (BWFI), 포스페이트 완충 염수, 링거액 및 덱스트로스 용액을 포함하는 제2 (또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이것은 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질, 예를 들어 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 추가로 포함할 수 있다.

[0259] 다음은 본 발명의 방법 및 조성물의 예이다. 상기 나타낸 일반적인 설명을 기초로 하여 다양한 다른 실시양태를 실시할 수 있음이 이해된다.

[0260] 실시예

[0261] 물질 및 방법

[0262] 항체 파지 디스플레이: 합성 항체 라이브러리는 M13 파지 상에 2가 Fab 단편을 디스플레이하고, 다양성은 중쇄의 3개의 CDR에서 올리고-지시된 돌연변이유발의 사용에 의해 생성하였다. Fab 라이브러리의 상세한 내용은 이전에 기재되었다 (문헌 [Lee et al., 2004a]; [Lee et al., 2004b]). 넌크(Nunc) 96-웰 맥시소르프(Maxisorp) 이뮤노플레이트를 4℃에서 HGFA (10 ㎍/ml)로 밤새 코팅하고, 이어서 1시간 동안 실온에서 파지 차단 완충제 PBST (PBS, 1% (w/v) BSA, 0.05% (v/v) 트윈 20)로 차단하였다. 항체 파지 라이브러리를 HGFA-코팅된 플레이트에 첨가하고, 밤새 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBT (PBS, 0.05% (v/v) 트윈-20) 완충제로 세척하고, 결합된 파지를 50 mM HCl - 500 mM NaCl로 30분 동안 용리하고, 동일한 부피의 1 M 트리스-HCl, pH 7.5로 중화하였다. 회수된 파지를 이. 콜라이 XL-1 블루 세포에서 증폭시켰다. 연속적 선택 라운드 동안, 항원-코팅된 플레이트와 항체 파지의 인큐베이션은 2 내지 3시간으로 감소시키고, 플레이트 세척의 엄격성을 점차 증가시켰다.

[0263] Ab39의 친화도 성숙: Ab39는 선택 동안 잠재적 결합력 효과를 감소시키기 위해 2가 Fab 대신 1가 Fab를 사용하여 친화도 성숙시켰다. 친화도 성숙의 효율을 향상시키기 위해, 정지 코돈을 CDR-L3에 도입하였다. 3개의 상이한 CDR 조합 라이브러리, L1/L2/L3, L3/H1/H2 및 L3/H3은 선택된 위치가 시간의 50%만 성숙하도록 야생형 서열 바이어스를 유지하는 "소프트 랜덤화" 전략을 사용하는 랜덤화에 대해 표적화시켰다 (문헌 [Liang et al., 2007]). 친화도 성숙 클론을 선택하기 위해, 파지 라이브러리에 대해 이전에 기재된 바와 같이 첫번째 라운드 동안 플레이트 분류를 수행하고, 이어서 4 라운드의 용액 상 분류를 수행하였다 (문헌 [Liang et al.,

2007]). 증가된 엄격성은 4 라운드의 용액 상 분류 동안 비오티닐화된 HGFA의 양을 감소시킴으로써 사용되었다. 과량의 표지되지 않은 HGFA (500 내지 2000-배)를 선택의 마지막 2 라운드에 첨가하여 빠른 오프-레이트 결합제를 경쟁에서 제외시켰다. Ab39는 상대적으로 높은 결합 속도 상수 (k_{on})를 갖지만 상대적으로 빠른 해리 속도 상수 (k_{off})를 갖기 때문에 오프-레이트 선택 전략을 사용하였다 (표 1). 이후에, 항-HGFA Fab를 IgG에 대해 재구성하였다.

[0264] 항체 재구성 및 HGFA에 대한 해리 속도 상수의 결정: 항-HGFA Fab는 개별 클론의 V_L 및 V_H 영역을 각각 LPG3 및 LPG4 벡터에 클로닝함으로써 인간 IgG1로 재구성하였다 (문헌 [Liang et al., 2007]). 전장 항체를 차이니즈 햄스터 난소 세포에서 일시적으로 발현시키고, 단백질-A 칼럼 상에서 정제하였다. 재구성된 항-HGFA 항체의 결합 친화도를 결정하기 위해, 비아코어™-3000 기기 (지이 헬스케어(GE Health Care), NJ) 상에서 표면 플라즈몬 공명 측정을 수행하였다. 토끼 항-인간 IgG를 CM5 바이오센서 칩 상에 화학적으로 고정시키고 (아민-커플링), 항-HGFA 항체를 포획하여 대략 250 반응 단위 (RU)를 제공하였다. 동역학 측정을 위해, HGFA 또는 활성 부위-차단된 HGFA (0.9 nM 내지 250 nM)의 2-배 일련의 희석액을 25℃에서 30 ㎕/분의 유량으로 PBT 완충제에 주입하였다. HGFA-KQLR (서열 10에 개시된 "KQLR")은 HGFA를 2시간 동안 실온에서 2배 몰 과량의 Ac-KQLR-cmk (서열 10에 개시된 "KQLR")와 인큐베이션함으로써 생성시킨 후에, 크기 배제 크로마토그래피를 수행하여 비-혼입된 Ac-KQLR-cmk (서열 10에 개시된 "KQLR")를 제거하였다. 결합 속도 (k_{on}) 및 해리 속도 (k_{off})는 간단한 일-대-일 랭뮤어(Langmuir) 결합 모델 (BIAEvaluation)을 사용하여 수득하고, 평형 해리 상수 (K_D)를 계산하였다 (k_{off}/k_{on}). 포획된 항체 (Ab40.ΔTrp) 센서 칩 상에서 HGFA 또는 HGFA-KQLR (서열 10에 개시된 "KQLR")의 2-배 일련의 희석액 (1.5 nM 내지 3000 nM)의 보다 긴 주입 (5분)을 수행하여 최대 결합 (R_{max})을 달성하고, 항정 상태에 도달하였다. R_{eq} (R_{max}의 20-80%)의 값을 계산하고, BIAEvaluation 소프트웨어를 사용하여 C (HGFA 또는 HGFA-KQLR (서열 10에 개시된 "KQLR")의 농도)에 대해 개별적으로 플롯팅하여 항정 상태 분석에서 KD를 결정하였다.

[0265] HGFA 정제, 효소 동역학 검정 및 경쟁 ELISA: HGFA (Val373 - Ser655)는 바큘로바이러스 - 곤충 세포 발현 시스템을 사용하여 생성하고, Ni-NTA-아가로스 칼럼 상에서 정제한 후에, 문헌 [Kirchhofer et al., 2003]에 기재된 바와 같이 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. 활성 부위-적정된 HGFA를 사용한 프로-HGF 활성화 검정은 1 nM HGFA 및 25 ㎍/ml의 ^{125}I-프로-HGF와 인큐베이션된 항체의 일력의 희석액을 사용하여 본질적으로 문헌 [Kirchhofer et al., 2003]에 기재된 바와 같이 수행하였다. 크로모게닉스(Chromogenix) S-2266 (H-D-발릴-L-류실-L-아르기닌-파라니트로아닐리드) (디아파마(Diapharma), 오하이오주 웨스체스터)을 사용하는 발색 기질 검정의 경우, 5 nM HGFA는 TNCT 완충제 (20 mM 트리스, pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 0.01%-트리톤 X-100) 중 증가하는 농도의 항체와 40분 동안 96-웰 플레이트에서 인큐베이션하였다. S-2266 (0.24 mM ~ K_m)을 첨가한 후에, 405 nm에서의 흡광도의 증가의 선형 비가 동역학 마이크로플레이트 판독기 (스펙트라맥스(Spectramax)-M5, 몰레큘라 디바이시스(Molecular devices), 캘리포니아주 서니배일) 상에서 측정하였다. Ab39 및 Ab40에 대한 효소 동역학 측정은 다양한 항체 농도 (1 μM - 0.004 μM, 3-배 희석)로 인큐베이션된 3 nM HGFA를 사용하여 TNCT 완충제 중에서 40분 동안 수행하였다. 다양한 농도의 크로모게닉스 S-2266을 첨가하고, 405 nm에서의 흡광도 증가의 선형 비를 측정하였다. 수득한 데이터의 이디-호프스티 플롯 (v 대 v/[S])은 경쟁적 억제 메카니즘의 지표이다. 경쟁 ELISA 실험을 수행하여 HGFA에 대한 KD1 결합에 대한 Ab40의 효과를 평가하였다. HGFA (1 ㎍/ml)로 코팅된 96-웰 맥시소르프 플레이트를 PBST 완충제 중에서 2시간 동안 증가하는 농도의 Ab40과 인큐베이션한 후에, 15분 동안 1 nM 비오티닐화된 KD1을 첨가하였다. HGFA에 결합된 비오티닐화된 KD1을 스트렙타비딘-HRP 접합체에 의해 검출하였다.

[0266] 경쟁 HGFA 결합 ELISA 실험: 결합 특이성 측정을 위해, 96-웰 맥시소르프 플레이트를 2 ㎍/ml의 HGFA, 매트립타제, 우로키나제-유형 플라스미노겐 활성화제 또는 인자 XIIa로 코팅하고, PBST 완충제 중에서 10 ㎍/ml의 항-HGFA IgG와 1시간 이상 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBT 완충제로 세척하고, 결합된 항체를 PBST 완충제 중에 1:2500 희석된 항-인간 항체 HRP 접합체로 검출하고, 대략 5분 동안 TMB 기질로 발색시키고, 1M H_3PO_4로 켄칭하고, 흡광도를 450 nm에서 마이크로플레이트 판독기 상에서 측정하였다.

[0267] 결정학: Fab40 및 Fab40.ΔTrp를 이. 콜라이에서 발현시키고, 단백질-G 세파로스에 이어 양이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. Fab40 및 Fab40.ΔTrp는 도 1에 도시된 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 포함한다. (a) HGFA 프로테아제 도메인 (표 6)과 Fab40, (b) HGFA 프로테아제 도메인 (표 6)과 Fab40.ΔTrp, 또는

(c) HGFA 프로테아제 도메인 (표 6)-KQLR (서열 10)과 Fab40.ΔTrp 사이의 복합체를 1:2 몰 비로 혼합하여 형성하고, 크기 배제 크로마토그래피 (슈퍼덱스(Superdex) 200)에 의해 정제하였다. 복합체를 10 mM HEPES pH 7.2, 150 mM NaCl에서 10 mg/ml로 농축하였다. HGFA/Fab40 및 HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp 복합체 (서열 10에 개시된 "KQLR")는 14% PEG 10,000, 100 mM HEPES pH 7.2 하에 결정을 생성한 반면, HGFA/Fab40.ΔTrp는 10% PEG 10,000, 100 mM HEPES pH 7.5 하에 결정을 생성하였다. X선 데이터 수집을 위해, 결정을 14% PEG 10,000, 100 mM HEPES pH 7.2, 20% 글리세롤로 옮기고, 액체 질소에 침지시켰다. X선 데이터는 SSRL/SLAC에서의 빔라인 9-2 (HGFA/Fab40) 또는 ALS 빔라인 5.0.2 (HGFA/Fab40.ΔTrp 및 HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp (서열 10에 개시된 "KQLR"))에서 100K에서 수집하고, HKL2000을 사용하여 감소시켰다 (문헌 [Otwinowski and Minor, 1997]). 구조는 PHASER을 사용하는 분자 대체에 의해 해석하고 (문헌 [McCoy et al., 2005]), CNX (액셀리스(Accelrys))를 CCP4 슈트 (CCP4, 1994)(CCP4, 1994)의 요소와 함께 사용하여 정제하였다. 데이터 감소 및 모델 정제 통계를 표 2에 나타내었다. 분자 그래픽 도면은 PyMOL을 사용하여 제작하였다 (문헌 [DeLano, W.L. The PyMOL Molecular Graphics System, 2002]). 3가지 복합체의 좌표를 동시-계류 공동-소유의 미국 특허 가출원 번호 61/253,014 (2009년 10월 19일 출원)에 나타내고, RCSB 단백질 데이터 뱅크에 액세스 코드 3K2U, 2WUB, 및 2WUC로 나타내었다 (그의 내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨).

표 1

HGFA에 대한 항체 결합 (서열 10에 개시된 "KQLR")

	HGFA			**HGFA-KQLR 복합체**		
	k_{on} (x 10^5 M^{-1} s^{-1})	k_{off} (x 10^{-4} s^{-1})	K_D (nM)	k_{on} (x 10^5 M^{-1} s^{-1})	k_{off} (x 10^{-4} s^{-1})	K_D (nM)
Ab39	5.2 ± 0.5	53.0 ± 2.0	10.3 ± 1.3	*n.d.*	*n.d.*	*n.d.*
Ab40	10.8 ± 0.46	1.75 ± 0.08	0.16 ± 0.01	3.2 ± 0.14	4.3 ± 0.13	1.35 ± 0.1
[a]Ab40.ΔTrp	–	–	150 ± 9.1	–	–	161 ± 7.6

[n.d.] 결정되지 않음

[a] K_D 값은 항정 상태 친화도 측정을 사용하여 결정됨

일반적으로 본 출원 전반에 걸쳐, 항체의 IgG 형태는 접두어 Ab로 지칭되고, Fab 형태는 접두어 Fab로 지칭된다. 일반적으로, Fab의 아미노산은 문자-코드, 그 뒤에 잔기 번호, 그 뒤에 중쇄의 경우 H 및 경쇄의 경우 L로 표시된다.

[0268]

표 2

데이터 수집 및 정제 (서열 10에 개시된 "KQLR")

	HGFA/Fab40	HGFA/Fab40.ΔTrp	HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp
데이터 수집			
공간군	P1	$P2_1$	$C222_1$
셀			
치수			
a, b, c (Å)	*a*=38.94, *b*=48.93, *c*=96.03	*a*=72.36, *b*=89.53, *c*=118.47 β=91.08	*a*=80.36, *b*=147.89, *c*=146.37
α, β, γ (°)	α=98.10, β=95.01, γ=103.89		
해상도 (Å)	50 – 2.35 (2.43-2.35)	50 –2.90 (3.00-2.90)	50 – 2.70 (2.8-2.7)
Rsym[a,b]	0.050 (0.198)	0.094 (0.505)	0.143 (0.652)
I/σI[b]	15 (2.9)	14.0 (2.7)	15 (2.9)
완전성 (%)[b]	94.9 (86.9)	98.8 (98.3)	99.4 (97.3)
가외성	2.0 (1.9)	3.7 (3.6)	7.3 (7.4)
정제			
해상도 (Å)	20 – 2.35	20 – 2.90	20 – 2.70
반사수	25746	32630	23158
최종 R[c], R_{FREE}	0.237, 0.291	0.216, 0.275	0.227, 0.278
원자수			
단백질	5046	9927	5138
리간드	28	56	68
물	168	153	133
B-인자 (평균)	65.27	68.92	35.86
단백질	91.72	138.26	76.06
리간드	58.37	39.42	29.65
물			
R.m.s. 편차			
결합 길이 (Å)	0.008	0.008	0.007
결합 각 (°)	1.330	1.231	1.420

[0269]

[a] Rsym = Σ| |I| - |<I>| |/Σ|<I>|, 여기서 I는 단일 관찰의 강도이고, <I>는 대칭적 동등한 관찰에 대한 평균 강도이다.

[b] 괄호 안은, 최고 해상도 쉘에 대한 것임.

[c] R = Σ|Fo-Fc|/Σ|Fo|, 여기서 Fo 및 Fc는 각각 관찰된 및 계산된 구조 인자 진폭이다.

[0270]

표 3

HGFA와 Fab 잔기 사이의 접촉 거리 (서열 10에 개시된 "KQLR")

#	Fab 잔기	HGFA 잔기	접촉 거리 (Å)		
			HGFA/ Fab40	HGFA/ Fab40.ΔTrp	HGFA-KQL Fab40.ΔTrp
1	H:Tyr 52[OH]	Phe 59 [O]	3.3	3.4	>3.5
2	H:Tyr 52 [OH]	Ser 60b [Oγ]	2.6	3.0	2.5
3	H:Tyr 58 [OH]	Pro 90 [O]	2.7	2.6	2.7
4	H:Tyr 33 [OH]	Tyr 91 [O]	2.6	>3.5	>3.5
5	H:Trp 95 [Nε1]	Tyr 94 [O]	3.0	2.7	2.9
6	H:Lys 64 [Nζ]	Asp 240 [Oδ2]	3.4	>3.5	>3.5
7	H:Ala 53 [O]	Arg 61 [Nε]	3.5	3.2	3.1
8	H:Gly 54 [O]	Tyr 88 [N]	3.1	2.9	3.0
9	H:Gly 55 [O]	Lys 87 [Nζ]	2.9	2.9	2.9
10	H:Thr 57 [O]	Arg 241 [Nω']	2.5	2.3	2.3
11	H:Trp 96 [O]	Ser 95 [Oγ]	3.0	>3.5	>3.5
12	H:Trp 96 [O]	Val 96 [N]	3.2	>3.5	>3.5
13	H:Gly 31 [O]	Ser 60b [Oγ]	>3.5	3.5	>3.5
14	H:Pro 52a [O]	Arg 61 [Nω']	>3.5	3.5	3.5
15	H:Ala 97 [O]	Ser 95 [Oγ]	>3.5	>3.5	2.6
16	H:Ala 97 [O]	Phe 97 [N]	>3.5	>3.5	3.4
17	H:Ala 97 [O]	Val 96 [N]	>3.5	>3.5	3.5
18	L:Arg 93 [Nω]	Asn 179 [Oδ1]	2.7	>3.5	>3.5
19	L:Arg 93 [Nω']	Asn 179 [Oδ1]	2.7	>3.5	>3.5
20	L:Ala 94 [N]	Tyr 91 [OH]	2.9	2.6	2.9
21	L:Ser 91 [O]	His 101 [Nε2]	3.0	3.0	3.0
22	L:Asn 92 [Oδ1]	Asn 179 [Nδ2]	3.0	3.1	3.2
23	L:Arg 93 [Nω]	Asn 233 [O]	>3.5	>3.5	3.5
24	L:Arg 93 [Nω']	Asp 236 [Oδ2]	>3.5	>3.5	3.3

[0271]

표 4

HGFA (서열 19)

MGRWAWVPSP WPPPGLGPFL LLLLLLLLLP RGFQPQPGGN RTESPEPNAT
ATPAIPTILV TSVTSETPAT SAPEAEGPQS GGLPPPPRAV PSSSSPQAQA
LTEDGRPCRF PFRYGGRMLH ACTSEGSAHR KWCATTHNYD RDRAWGYCVE
ATPPPGGPAA LDPCASGPCL GSCSNTQD PQSYHCSCPR AFTGKDCGTE
KCFDETRYEY LEGGDRWARV RQGHVEQCEC GRTWCEGT RHTACLSSPC
LNGGTCHLIV ATGTTVCACP PGFAGRLCNI EPDERCFLGN GTGYRGVAST
SASGLSCLAW NSDLLYQELH VDSVGAAALL GLGPHAYCRN PDNDERPWCY
VKDSALSWE YCRLEACESL TRVQLSPDLL ATLPEPASPG RQACGRRHKK
RTFLRPRIIG GSSSLPGSHP WLAAIYIGDS FCAGSLVHTC WVVSAAHCFS
HSPPRDSVSV VLGQHFFNRT TDVTQTFGIE KYIPYTLYSV FNPSDHDLVL
IRLKKKGDRC ATRSQFVQPI CLPEPGSTFP AGHKCQIAGW GHLDENVSGY
SSSLREALVP LVADHKCSSP EVYGADISPN MLCAGYFDCK SDACQGDSGG
PLACEKNGVA YLYGIISWGD GCGRLHKPGV YTRVANYVDW INDRIRPPRR
LVAPS

[0272]

표 5

활성화된 HGFA (서열 20)

373 vqlspdll atlpepaspg rqacgrrhkk rtflrpriig
gssslpgshpwlaaiyigds fcagslvhtc wvvsaahcfs hspprdsvsv
vlgqhffnrt tdvtqtfgiekyipytlysv fnpsdhdlvl irlkkkgdrc
atrsqfvqpi clpepgstfp aghkcqiagwghldenvsgy ssslrealvp
lvadhkcssp evygadispn mlcagyfdck sdacqgdsggplaceknqva
ylygiiswgd gcgrlhkpgv ytrvanyvdw indrirpprr lvaps

[0273]

표 6

HGFA 세린 프로테아제 도메인(서열 21)

IIGGSSSLPGSHPWLAAIYIGDSFCAGSLVHTCWVVSAAHCFSHSPPRDSV
SVVLGQHFFNRTTDVTQTFGIEKYIPYTLYSVFNPSDHDLVLIRLKKKGDRCATRS
QFVQPICLPEPGSTFPAGHKCQIAGWGHLDENVSGYSSSLREALVPLVADHKCSSP
EVYGADISPNMLCAGYFDCKSDACQGDSGGPLACEKNGVAYLYGIISWGDGCGRLH
KPGVYTRVANYVDWINDRIR

[0274]

[0275] 결과

[0276] 항-HGFA 파지 항체의 생성

[0277] Ab39는 합성 $F(ab')_2$ 파지 디스플레이 라이브러리의 스크리닝에 의해 확인되었다 (문헌 [Wu et al., 2000]). 이후에, Ab39는 방법에 기재된 바와 같이 친화도 성숙시켰다. 표면 플라즈몬 공명 실험에 의해 측정된 결합 친화도의 향상은 64-배였으며 (표 1), 이는 CDR-L3의 서열에서의 4개의 변화 때문이다 (도 1). Ab39 및 Ab40 둘 모두의 결합 특이성을 ELISA를 사용하여 평가하여 구조적으로 관련된 프로테아제, 예컨대 가장 가까운 동족체 인자 XIIa 및 우로키나제에 대한 결합을 측정하였다 (문헌 [Miyazawa et al., 1993]). 결과는 인자 XIIa에 대한 결합의 완전한 결여를 입증하였으며, 이는 우수한 특이성을 시사한다 (도 9).

[0278] 효소 동역학 및 Ab40 결합에 의한 활성-부위 점유의 효과

[0279] Ab40은 프로-HGF가 그의 결합 친화도와 일치하는 효능으로 (표 1) HGFA에 의해 매개된 α/β-이종이량체로 절

단되는 것을 억제하였다 (도 2a). Ab40 및 Ab39의 억제 효과를 또한 합성 파라-니트로아닐리드 기질 크로모게닉스 S-2266 (H-D-Val-Leu-Arg-pNA)를 사용하는 효소 검정에서 평가하였다. HGFA의 효소 활성은 단지 Ab40에 의해 부분적으로 억제되었으며 (도 2b), 선택된 실험 조건 하에서 최대 억제는 약 60%였다. 이디-호프스티 플롯은 Ab40 (및 Ab39)이 K_m^{app}를 증가시키나 V_{max}^{app} 값은 증가시키지 않으므로 억제 메카니즘이 경쟁적이라는 것을 입증하였다 (도 2c, 9b). 부분적 억제에 따라, 기울기 ($-K_m^{app}$)는 높은 Ab40 농도에서 한정된 제한에 접근하였다. 유사한 결과를 부모 Ab39에서 수득하였으며 (데이터는 나타내지 않음), 이는 Ab39 및 Ab40이 HGFA의 부분적인 경쟁적 억제제임을 입증하였다. 항체 결합에 대한 활성 부위 점유의 영향을 분석하기 위해, 본 발명자들은 소분자 및 거대분자 억제제의 존재하에 HGFA에 대한 항체 결합을 측정하였다. 벤즈아미딘은 오직 트립신-유사 세린 프로테아제의 S1 포켓에서 결합하고, HGFA에 대한 Ab40의 결합을 방해하지 않았다 (데이터는 나타내지 않음). 워-헤드(war-head) 기에 커플링된 프로-HGF 절단 서열 (Ac-KQLR-cmk (서열 10에 개시된 "KQLR"))에 일치하는 펩티드성 억제제를 사용하여 활성 부위에서 S4-S1 하위부위를 점유하고 있는 HGFA를 공유결합적으로 변형시켰다. HGFA-KQLR 복합체 (서열 10에 개시된 "KQLR")를 사용하는 표면 플라즈몬 공명 연구는 비가역적으로 결합된 펩티드성 억제제가 Ab40의 결합을 방해한다는 것을 보여주었다 (도 3a-b). HGFA와 비교하여 HGFA-KQLR 복합체 (서열 10에 개시된 "KQLR")에 대한 Ab40 결합의 친화도의 8-배 감소가 관찰되었다 (표 1). 쿠니츠(Kunitz) 도메인 억제제 KD1은 확장된 활성-부위 영역과 상호작용하고 (문헌 [Shia et al., 2005]), 또한 표면 플라즈몬 공명 실험에서 Ab40 결합을 방해하였다 (도 3c). 이와 일치하게, 경쟁 ELISA는 Ab40에 의한 HGFA에 대한 KD1 결합을 중간 정도 억제하는 것을 보여주었다 (도 3d). 요약하여, HGFA에 대한 Ab40의 결합은 S2-S4를 포함하나 S1은 포함하지 않는 확장된 하위부위에서의 억제제 점유에 의해 영향을 받았다.

[0280] HGFA/Fab40 복합체의 구조는 '알로스테릭 스위치'를 밝힌다

[0281] HGFA/Fab40 복합체의 2.35 Å 해상도 구조는 Fab40이 모든 6개 CDR 루프를 사용하여, 60-루프 (예를 들어, 본래 번호 451-454; 키모트립신 번호 60A-D) 및 99-루프 (예를 들어, 본래 번호 490-493; 키모트립신 번호 96, 97, 98, 및 99a) (도 4a-b)를 포함하는 기질 결합 클레프트 주변에서 플랫 에피토프에 결합한다는 것을 보여준다. 촉매 삼작용기 (His-57, Asp-102 및 Ser-195)의 입체형태는 HGFA의 다른 공지된 구조와 비교하여 유의하게 변하지 않았고 (도 4b), 기질 하위부위 S1-S4는 점유되지 않았다 (도 5a). Fab40의 가장 가까운 원자는 활성 부위 Ser195 잔기로부터 >15 Å이고, 이는 억제의 알로스테릭 모드를 나타낸다. HGFA/Fab40 복합체의 핵심적인 특징은 99-루프에서의 큰 입체형태적 변화이다 (도 4b 및 도 10, 전자 밀도 맵의 품질을 설명함). HGFA 구조에서 다른 유의한 변화가 관찰되지 않았고, 이는 이것이 항체 유도된 억제의 원인임을 시사한다. 99-루프의 입체형태로 구체화된 '알로스테릭 스위치'는 HGFA의 다른 구조와 HGFA/Fab40 구조의 비교로 분명해졌으며 (문헌 [Shia et al., 2005]; [Wu et al., 2007]), 여기서 99-루프는 '컴피턴트' 입체형태 (HGFA의 촉매 활성 형태) 상태이다. 새로운 입체형태 ('비-컴피턴트' 입체형태, HGFA의 촉매 불활성 형태)에서 99-루프의 Phe97은 Fab40의 경쇄 (Tyr49L, Ser50L 및 Phe53L) 및 중쇄 (Trp98H 및 Pro99H)의 인터페이스에서 형성된 소수성 그루브에 묻힌다 (도 4c). 에피토프는 돌출된 99-루프의 Leu-93 상에서 중앙에 위치하고 (도 5a, b), CDR 루프 L3과 H3 사이의 클레프트에 샌드위치된다. 99-루프 및 60-루프는 대부분 중쇄 CDR 잔기와의 밀접한 접촉과 관련된다. 중쇄 및 경쇄는 각각 복합체에 묻힌 표면 영역의 65% 및 35%를 제공한다 (도 5c). Fab40 결합시 묻힌 HGFA의 총 용매-접근가능한 표면 영역은 약 1030 $Å^2$이다. 이와 함께, 18개 수소 결합 및 하나의 정전기적 상호작용 (Asp241-Lys64H)이 HGFA와 Fab40 사이에 형성된다 (표 3). 여러 소수성 잔기, 예컨대 Trp95H, Trp96H, Trp98H 및 Tyr33H, Tyr52H, Tyr58H는 60- 및 99-루프의 뒷면에서 작은 포켓에 결합한다 (도 4c). HGFA 상의 Fab40 에피토프는 트롬빈에서 엑소사이트 II에 상응하는 영역인 트롬빈 조절제와 상호작용하는 양전기 영역과 유의하게 중첩된다 (도 5b). 그러나, 자연에서 주로 정전기적인 응고 프로테아제에서의 엑소사이트 II 상호작용과 달리 (문헌 [Bock et al., 2007]), HGFA에 대한 Fab40의 결합은 주로 수소 결합 및 반 데르 발스(van der Waals) 상호작용과 관련된다.

[0282] '알로스테릭 스위치' 플립핑: 알로스테릭 억제 활성을 제거하기 위한 Ab40 조작

[0283] Fab40의 CDR-H3 루프는 파라토프의 코어를 형성하는 3개의 트립토판 잔기 (Trp95H, Trp96H 및 Trp98H)를 함유한다 (도 5c). Trp96H는 HGFA의 Ala56, Pro90, Tyr88, Val96, Val105 및 Ile107에 의해 형성된 깊은 소수성 포켓에 그의 큰 인돌 측쇄를 도킹시킴으로써 99-루프에서 관찰된 입체형태 변화의 중심에 있다 (도 6a). Val96의 주쇄 뿐만 아니라 측쇄 입체형태에서의 작은 이동이 99-루프 잔기의 나머지 (Val96-Asp100)를 통해 전달되어, 궁극적으로 C_α (99-루프)에서 >1Å rmsd 이동시킨다 (도 6c, d). 입체형태 변화에서의 Trp96H의

역할 및 관련된 알로스테릭 억제 활성을 조사하기 위해, 본 발명자들은 이 잔기를 결실시켜 (Fab40.ΔTrp) CDR-H3 루프를 단축시켰다 (도 1). Fab40.ΔTrp와 HGFA의 복합체는 야생형 항체에 대해 기재된 바와 같이 결정화시켰다.

[0284] HGFA/Fab40.ΔTrp (2.90 Å)의 전체적 구조는 HGFA/Fab40의 구조와 매우 유사하였다. 변화는 매우 적은 수준이고, CDR-H3 루프에서 잔기 Ala97H 및 Trp98H로 한정된다 (도 6e-f). Tyr33H의 측쇄는 그의 χ_1 비틀림각 주위로 플립핑되고, HGFA/Fab40 구조에서 Trp96H에 의해 점유된 깊은 소수성 포켓을 부분적으로 채운다 (도 6b). 이 소수성 포켓의 크기는 이제 이 포켓을 라이닝하는 잔기, 대체로 HGFA의 Ser60, Pro90 및 Tyr94의 이동으로 인해 감소된다. 현저하게 99-루프는 HGFA의 다른 구조에서 관찰된 바와 같이 '컴피턴트' 상태로 복귀된다 (도 6e-f). Ab40.ΔTrp는 효소 검정에 의해 결정된 바와 같이 더 이상 HGFA의 억제제가 아니었다 (도 2b). 이러한 미묘한 변화가 친화도는 훨씬 감소된다고 하더라도 결합을 유지하면서 억제 활성을 제거하기에 충분하다는 것은 놀라운 것이었다 (표 1). 또한, Ab40과 달리, HGFA 활성 부위에서 KQLR (서열 10) 억제제의 존재는 HGFA 또는 HGFA-KQLR 복합체 (서열 10에 개시된 "KQLR")에 대한 유사한 K_D 값에 의해 나타난 바와 같이 Ab40.ΔTrp 결합에 영향을 미치지 않았다 (도 3e, f). 따라서, 데이터는 Ab40에 의한 알로스테릭 억제 활성의 메카니즘이 주로 99-루프 입체형태의 유의한 변화에 의해 작동한다는 본 발명자들의 가설을 뒷받침한다.

[0285] 억제의 알로스테릭 메카니즘을 위한 구조적 결정자

[0286] HGFA의 99-루프는 기질 잔기 P2 및 P4와의 상호작용에 기여함으로써, 중요한 기질 특이성 결정자이다. 따라서, 99-루프의 Ab40-유도된 이동이 이들 기질 하위부위 상호작용에 어떻게 영향을 미치는지 자세히 이해하기 위해, 본 발명자들은 HGFA-KQLR 복합체 (서열 10에 개시된 "KQLR")의 구조를 결정하고자 하였다. KQLR 서열 (서열 10)은 천연 HGFA 기질 프로-HGF의 P4-P1 잔기에 상응한다. 불행히도, 이들 시도는 결정화 상태를 최적화하기 위한 여러 시도에도 불구하고 충분한 회절 품질의 결정을 생성하는데 성공적이지 못하였다. 대안적 접근법으로, 본 발명자들은 이후에 본 발명자들의 관심을 용이하게 결정화되는 복합체 Fab40.ΔTrp에서 HGFA-KQLR (서열 10에 개시된 "KQLR")의 구조를 푸는데 집중시켰다.

[0287] 펩티드성 억제제, Ac-KQLR-cmk (서열 10에 개시된 "KQLR")에 대한 전자 밀도는 이 2.70 Å 해상도 구조에서 분명하였다. 펩티드성 억제제는 활성 부위 그루브에 꼬인 반대-평행 입체형태로 정렬되어 P1-Arg와 Ser214 사이에 및 P3-Gln과 Gly216 사이에 특징적인 주쇄간 수소 결합을 형성한다 (도 11). 억제제는 촉매성 Ser195 및 His57에 공유 결합에 의해 연결되고, S4-S1 하위부위에서의 결합 모드는 또 다른 S1A 프로테아제 패밀리 구성원인 헵신과 KQLR (서열 10)의 복합체에서 관찰된 것과 매우 유사하였다 (문헌 [Herter et al., 2005]). 염 브릿지 상호작용은 펩티드성 억제제의 P1-Arg가 S1 하위부위에서 Asp189와 쌍을 이루도록 하였다. S2 하위부위는 잔기 Pro99a, Ser99, Trp215 및 His57에 의해 형성된 작은 소수성 포켓이기 때문에 P2 위치에서 류신에 대해 강한 선호도를 갖는 것으로 나타났다. P2-Leu 측쇄는 Pro99a에 대해 단단하게 패킹되고, 이는 Pro99a의 입체형태의 약간의 변화가 P2 특이성에 대해 주요 영향을 미칠 수 있다는 것을 시사한다 (도 7a). 따라서, S2 하위부위에서 HGFA에 대한 특이성이 다수의 응고 프로테아제에 대한 경우인 것과 같이 구별되는 특징인 것으로 나타났다. P3 잔기에 대한 선택성은 효소-기질 상호작용이 P3 측쇄의 용매 노출로 인해 제한되므로 거의 모든 S1 펩티다제에서 부족하였다. P3-Glu 포인트는 활성 부위의 용매 노출된 영역의 외부를 향한다. P4 잔기에 대해 부족한 선택성을 보유하는 대부분의 S1 펩티다제와 달리, HGFA에서 Ser99와의 수소 결합은 P4-Lys를 안정화시킨다 (도 7a). 추가로, P4-Lys의 측쇄에 대한 소수성 안정화는 HGFA의 Trp215에 의해 제공된다. N-말단 아세틸기로부터의 카르보닐 산소는 수소 결합을 통해 HGFA의 Asp217과 상호작용한다.

[0288] HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp 복합체 (서열 10에 개시된 "KQLR")에서 HGFA의 프로테아제 도메인의 구조는 0.39Å의 rmsd (모든 원자에 대한 것임)를 갖는 HGFA/Fab40.ΔTrp 복합체와 매우 유사하였다 (도 12). HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp (서열 10에 개시된 "KQLR") 구조에서 99-루프의 입체형태는 HGFA/Fab40.ΔTrp 및 HGFA의 다른 구조에서 발견되는 바와 같이 '컴피턴트' 상태이다. 따라서, HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp (서열 10에 개시된 "KQLR")는 HGFA-KQLR (서열 10에 개시된 "KQLR") 구조의 부재하에 HGFA에서 기질 결합 하위부위를 규정하기 위한 우수한 대안이다. HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp (서열 10에 개시된 "KQLR")와 HGFA/Fab40 구조의 중첩은 알로스테릭 억제에 대해 타당한 원인을 밝혔다. 99-루프의 이동은 하위부위 S2의 부분적 붕괴, 및 하위부위 S4의 재조직화를 초래하여, 기질 잔기 P2 및 P4와의 상호작용에 혼란을 일으킨다. 첫째, S2 포켓의 일부인 99-루프 잔기 Pro99a 및 Ser99의 이동은 이들을 P2-Leu에 너무 가까이 위치시켜 (도 7b), 입체적 충돌이 발생한다. 둘째, S4 잔기 Ser99의 재배치된 히드록실 측쇄는 더 이상 P4-Lys와 수소 결합을 형성할 수 없고 (도 7a, b), P2-Leu에 너무 가까이 위치한다. 또한, S2 포켓 잔기 Pro99a의 이동은 Ab40에 의한 HGFA에 대한 KD1 결합의 억제의 알로스테릭 특성을 규정하는데 핵심적인 역할도 수행한다. HGFA/Fab40 및 HGFA/KD1 (문헌 [Shia et

al., 2005]) 복합체의 중첩은 KD1- 및 Fab40 에피토프 사이에 중첩이 없다는 것을 보여주었다 (도 13). HGFA/Fab40/KD1의 모델은 Pro99a가 S2 하위부위에서 KD1의 Cys38 및 Leu39와 입체적으로 충돌할 가능성을 예측한다.

[0289] 논의

[0290] 정의에 의하면 효소의 알로스테릭 조절은 멀리 떨어진 이펙터 상호작용 부위로부터 유래되는 변경된 촉매 활성과 관련된다 (문헌 [Tsai et al., 2009]). 신호를 생성할 수 있는 소분자 또는 거대분자의 결합, 인산화 등을 비롯한 다양한 이펙터는 단백질의 특정 기능을 활성화 또는 억제할 수 있는 신호를 생성한다 (문헌 [Swain and Gierasch, 2006]). 극소수의 이러한 시스템은 이펙터 상호작용 부위 및 변경된 활성의 부위의 지식이 이해되지 않는다. 아미노산이 알로스테릭 효과를 전달하는 정확한 경로는 일반적으로 거의 잘 알려져 있지 않다. 최근 연구는 효소 활성 부위를 표적화하는 항체에 의한 프로테아제 억제의 구조적 기반에 대한 새로운 관점을 제시하였다 (문헌 [Farady et al., 2008]; [Wu et al., 2007]). 대조적으로, 알로스테릭 항체가 효소 촉매작용을 방해하는 정확한 분자 메카니즘은 여전히 파악되지 않았다. 포괄적인 구조 및 동역학 연구로부터 유래된 본원에 제시된 발견은 이제 알로스테릭 항체가 프로테아제 촉매작용을 어떻게 억제하는지에 대한 상세한 관점을 제공한다. 효소 동역학 분석은 파지 디스플레이-유래된 Ab40이 HGFA의 경쟁적 억제제라는 것을 입증하였다. 그러나, Ab40은 이것이 활성 부위로부터 떨어져 있는 에피토프에 결합하므로 '고전적인' 입체 장애에 의해 억제되지 않았으며, 이에 따라 자연에서 알로스테릭인 경쟁적 억제 메카니즘을 규정하였다. 가장 중요하게는, Fab40/HGFA 복합체의 구조는 근본적인 입체형태 변화, 즉 99-루프의 이동을 밝혔으며, 이에 의해 에피토프와 활성 부위 사이의 기능적 연결통로에 대한 구조적 근거를 확립하였다.

[0291] 관찰된 99-루프 가요성은 여러 본질적으로 이동성인 표면 루프를 포함하는 소위 '활성화 도메인'의 일부가 아니기 때문에 트립신-유사 세린 프로테아제의 패밀리에서 일반적이지 않았다 (문헌 [Huber and Bode, 1978]). 입체형태 가요성의 공지된 예는 세린 프로테아제 프로스타신에서 관찰된다 (문헌 [Spraggon et al., 1990]).

[0292] Ab40 결합은 99-루프 이동 이외의 임의의 주요 구조적 변화를 동반하지 않았으며, 이는 이것이 효소 억제의 원인임을 강하게 나타낸다. 이 가설을 시험하기 위해, 본 발명자들은 Ab40/HGFA 인터페이스에서 핵심적인 상호작용 중 하나, 즉 HGFA의 Trp96H와 Val96 사이의 소수성 접촉을 제거하였다. HGFA와 복합체를 형성한 생성된 Trp96H-결실 돌연변이체 Ab40.ΔTrp의 구조는 99-루프가 기능적으로 '컴피턴트' 상태로 다시 플립핑되었다는 것을 보여주었으며, 이는 Ab40.ΔTrp/HGFA 복합체가 효소적으로 활성이라는 것을 보여주는 검정 결과와 일치하였다. 따라서, 99-루프 이동은 효소 활성을 조절하는 '알로스테릭 스위치'로 여겨질 수 있으며, '알로스테릭 스위치'는 Ab40 결합시 99-루프의 '비-컴피턴트' 입체형태로의 고정을 턴 온(ON)시키는 반면, 항체 Ab40.ΔTrp 돌연변이체의 제거 또는 결합은 99-루프가 '컴피턴트' 입체형태를 채택하도록 '알로스테릭 스위치'를 턴 오프(OFF)시킨다.

[0293] '비-컴피턴트' 99-루프 입체형태가 촉매 기전을 정확하게 어떻게 방해하는지에 대한 질문이 제기되었다. 즉, Ab40이 결합할 때 어떤 아미노산이 변화하고, 이들 변화가 왜 효소 활성을 변경시키는가? 99-루프는 S1 특이성 포켓의 형성에 기여하지 않고, 결합 실험은 S1-P1 상호작용이 Ab40 결합에 의해 영향을 받지 않았다는 것을 확인하였다. 그러나, Ab40 에피토프와 관련하여 99-루프의 '전방' 측면은 중요한 기질 하위부위을 형성하는데 참여하고, 이는 방해물이 발생할 가능성이 있는 영역이다. 비가역적으로 결합된 KQLR 펩티드 (서열 10)를 갖는 HGFA의 구조는 타당한 대답을 제공하였다. KQLR 펩티드 (서열 10)는 천연 기질 프로-HGF의 P4-P1 서열을 구성하고, 또한 본 발명자들의 효소 검정에 사용된 합성 pNA 기질 S-2266의 P2-P1 잔기, 즉 LR을 함유한다.

[0294] 구조적 분석은 99-루프의 '비-컴피턴트' 입체형태가 P2-Leu와 S2 하위부위 (Pro99a 및 Ser99) 사이의 입체적 충돌 및 P4-Lys와 S4 하위부위 사이의 상호작용 안정화의 손실로 인해 기질이 S2 및 S4 하위부위로 접근하는 것을 방해한다는 것을 보여주었다. Ser99 잔기의 히드록실 측쇄는 2가지 상이한 입체형태를 채택하고, 이에 따라 S2 하위부위에서 핵심적인 특이성 결정자로서 작용하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 관찰은 응고 인자 IX1의 Tyr99에서 관찰된 입체형태 변화와 유사하였다 (문헌 [Hopfner et al., 1999]). '컴피턴트' 입체형태에서, 소수성 S2 포켓은 이상적으로 형성되어 P2 잔기로서 Leu를 인식하고, 이는 천연 기질 프로-HGF 및 프로-MSP 뿐만 아니라 합성 S-2266 기질에서 P2-Leu의 존재와 일치한다. 따라서, Ab40 결합에 의한 S2 하위부위의 부분적 충돌은 거대분자 및 합성 기질 둘 모두에 대한 효소 촉매작용의 억제를 유발하기에 충분할 수 있다. 이 구조적 해석과 관련된 단서는 결정화에 실패하였던 HGFA-KQLR (서열 10에 개시된 "KQLR")을 사용하는 것에 대한 대안으로 본 발명자들이 HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp (서열 10에 개시된 "KQLR") 구조를 사용한 것이다. 그러나, HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp (서열 10에 개시된 "KQLR") 구조에서 99-루프는 '컴피턴트' 입체형

태를 채택하고, 이에 따라 본 발명자들은 이 구조를 채택하여 기질과의 S4-S1 상호작용의 매우 우수한 근사치를 제공하였다. 이 견해는 KQLR 펩티드 (서열 10)의 입체형태가 관련된 KQLR-헵신 복합체 (서열 10에 개시된 "KQLR")에서의 입체형태와 사실상 동일하다는 관찰에 의해 뒷받침된다 (문헌 [Herter et al. 2005]). 본 발명자들은 본 발명자들의 결과의 해석에 대한 분자간 접촉의 영향을 철저하게 평가하였다. 촉매 삼작용기 (H57-D102-S195)는 3가지 구조 중 어디에서도 결정 접촉에 관련되지 않는다. 추가로, 99-루프는 HGFA/Fab40 또는 HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp (서열 10에 개시된 "KQLR")의 구조에서 촉매 접촉에 관련되지 않는다. 그러나, 99-루프는 HGFA/Fab40.ΔTrp의 경우에 대칭적 관련 분자에 의해 안정화된다 (두 분자 모두 비대칭 유닛에 있음). HGFA-KQLR/Fab40.ΔTrp (서열 10에 개시된 "KQLR")에서 99-루프의 입체형태는 HGFA/Fab40.ΔTrp에서와 유사하므로, 본 발명자들은 결정 접촉으로부터의 충격을 무시할 수 있는 것으로 간주하였다.

[0295] 99-루프의 스위치는 억제제 (즉, Ab40) 결합 부위를 기질 결합 부위와 연결시키는 이동성 연결통로로 간주할 수 있다. 이러한 견해는 또한 효소 검정에서 결정된 경쟁적 억제 모드를 이해하기 위해 적합한 프레임워크를 제공할 것이다. 억제제 및 기질은 둘 모두 반대 방향일지라도 99-루프 상에 힘을 가할 수 있고, 기질 결합 ('비-컴피턴트' 상태) 또는 억제제 결합 ('컴피턴트' 상태)에 차선인 99-루프 입체형태를 생성한다. 구조적 모델은 입체적 충돌이 두 상황 모두에서, 즉 '비-컴피턴트' 상태에서 99-루프와 기질의 P2-Leu 사이 (도 7c) 및 '컴피턴트' 상태에서 99-루프와 Fab40의 CDR-H3에서의 Trp96H, Ala97H 및 Trp98H 사이 (도 14)에서 일어난다는 것을 나타낸다. 고전적인 효소 동역학에 기초하여, 경쟁적 억제의 여러 모델, 이들 중에서 세겔(Segel)에 의해 설명된 바와 같이 알로스테릭 모델이 제안되었다 (문헌 [Segel, 1993]). 설명된 알로스테릭 메카니즘은 세겔에 의한 모델-5의 정제이고, 이는 억제제 결합 부위와 활성 부위 사이의 분자 연결의 구조적 근거를 제공한다. 도 8의 모델은 컴피턴트 상태를 선호하는 평형상태에서 효소의 촉매적 컴피턴트 및 억제된 상태를 보여준다. 이 모델에서, 일시적인 '비-컴피턴트' 상태 (알로스테릭 부위*)에 대한 Ab40의 결합은 평형상태를 기능적 활성 상태로부터 멀어지도록 이동시켜, 효소 분자의 다수의 집단을 '알로스테릭 스위치' "오프" 상태로부터 "온" 상태로 유도한다. 모델은 또한 HGFA 억제의 경쟁적 특성을 설명하고, 여기서, 기질 농도의 증가가 평형상태를 왼쪽으로, 즉 HGFA의 '컴피턴트' 상태로 이동시켜 촉매작용을 진행시킬 것이다. 돌연변이된 Ab40.ΔTrp는 촉매작용을 지연시키지 못하였는데, 이는 이것이 오직 '알로스테릭 스위치'가 오프된 '컴피턴트' 상태에 결합하기 때문이다. 이 해석은 이펙터 결합이 단백질 입체형태의 앙상블에서 이동을 유발하여, 특정 상태의 관련 집단을 변경시킨다는 일반적으로 허용되는 알로스테릭 효과 견해와 일치한다. HGFA에 대한 Ab40 결합은 효과적으로 '컴피턴트'로부터 '비-컴피턴트' 상태로, 이에 따라 기능적으로 손상된 효소로의 이동/재분포를 발생시킨다. 이러한 견해를 Ab40.ΔTrp로 확장시키면, 이는 또한 오직 결합 부위에 대해 작거나 또는 무시할 수 있는 효과를 부과하는 알로스테릭 효과로 여겨질 수 있으며, 이에 의해 '컴피턴트' 효소 입체형태가 샘플링된다.

[0296] '알로스테릭 스위치'는 비교적 간단한 알로스테릭 메카니즘이다. 이는 알로스테릭 이펙터 결합 부위를 활성 부위와 직접 연결시키는 오직 하나의 이동성 표면 루프를 포함한다. 이는 다른 보다 더 복잡하고 덜 이해된 알로스테릭 메카니즘, 예컨대 보조인자-유도된 효소 활성화 (문헌 [Olsen and Persson, 2008]) 또는 HtrA1 패밀리 구성원의 PDZ-도메인 매개된 억제/활성화 (문헌 [Sohn et al., 2007]) (여기서, 이펙터 결합은 다수의, 짧은- 및 긴-범위 입체형태 변화와 관련됨)와 대조적이다. 그럼에도 그의 상대적인 단순함에도 불구하고, 이는 아직 알려지지 않은 이펙터 분자에 의해 HGFA 활성의 자연 발생 알로스테릭 조절 메카니즘을 복제할 수 있다. 특히, Ab40 결합 부위는 트롬빈의 엑소사이트 II 및 응고 인자 IX 및 X의 상응하는 영역 (다양한 알로스테릭 이펙터에 대한 도킹 부위, 헤파린 포함)과 상당히 중첩된다. 그러나, HGFA의 상응하는 영역은 응고 인자에서 엑소사이트-헤파린 상호작용을 매개하는 Arg 및 Lys 잔기의 돌출된 클러스터가 HGFA에서 최소로 나타나기 때문에 헤파린에 결합하기에 부적합한 것으로 나타났다.

[0297] 알로스테릭 억제제에 대한 연구는 다른 것 중에서 키나제 (문헌 [Vajpai et al., 2008]) 및 GPCR (문헌 [Raddatz et al., 2007])에 대해 활발하게 추구되었다. Ab40에 의한 알로스테릭 억제의 메카니즘이 다른 공지된 알로스테릭 소분자 억제제 중 일부와 유사하고, 어떠한 경우이든, 알로스테릭 억제제는 효소 활성 부위에서 입체형태 가용성을 제한함으로써 작용한다는 언급은 흥미로운 것이었다 (문헌 [Goodey and Benkovic, 2008]; [Lee and Craik, 2009]).

[0298] 알로스테릭 항-프로테아제 항체는 이들이 강력하고 고도로 특이적이며, 이들의 표적 프로테아제에 의한 임의의 의도하지 않은 프로세싱으로부터 보호되기 때문에 매우 큰 치료적 잠재성을 가질 수 있다. 그러나, 치료제로서의 이들의 용도는 최근 세포외 프로테아제로 제한되는 반면, 세포내 프로테아제는 주로 오르토스테릭 소분자 억제제에 의해 표적화된다. 이와 관련하여, 본 발명자들의 발견은 알로스테릭 작용 펩티드성 또는 소

분자 억제제의 구조-기반 설계를 가능하게 할 수 있는 알로스테릭 '핫 스팟'을 확인하기 위한 새로운 접근법은 제안할 수 있다 (문헌 [Hardy and Wells, 2004]). 구체적으로, 큰 소수성 포켓 ('핫 스팟')과 Trp96H의 본원에 기재된 상호작용은 비-컴피턴트 99-루프 입체형태의 안정화에 중요하나, 아직 이 포켓의 존재는 다른 HGFA 구조로부터 예측된 적이 없다. 따라서, Fab/프로테아제 구조 결정과 병행되는 Fab 파지 디스플레이 라이브러리의 대규모 스크리닝은 유망한 알로스테릭 '핫 스팟'을 확인할 수 있다. 이러한 접근법은 또한 Fab의 내인성 특성으로부터 이익을 얻어 단백질의 결정화를 용이하게 해야 한다 (문헌 [Tereshko et al., 2008]).

[0299] 본 발명자들의 연구의 또 다른 측면은 HGFA의 역할을 병리학적 경로에서 실험적으로 다루기 위한 항-HGFA 항체의 잠재적 유용성이다. 예를 들어, HGFA가 프로-HGF를 효율적으로 프로세싱하고, 결과적으로 HGF/Met 신호 전달 경로를 자극하는 능력은 암 성장에 기여할 수 있을 것으로 제안되었다 (문헌 [Kataoka et al., 2003a]). Ab40은 인간 HGFA와 동등하게 마우스 HGFA에 잘 결합하고 차단하여 (데이터는 나타내지 않음), 마우스 종양 모델에서 HGFA의 기능을 추가로 조사하기 위해 이상적인 시약이 되었다.

[0300] 부분 참고문헌 목록

Adams, G.P., and Weiner, L.M. (2005). Monoclonal antibody therapy of cancer. Nat Biotech 23, 1147-1157.

Barrett, A.J., Rawlings, N.D., and Woessner, J.F. (1998). Handbook of Proteolytic Enzymes. (San Diego: Academic Press).

Bjelke, J.R., Olsen, O.H., Fodje, M., Svensson, L.A., Bang, S., Bolt, G., Kragelund, B.B., and Persson, E. (2008). Mechanism of the Ca2+-induced Enhancement of the Intrinsic Factor VIIa Activity. J Biol Chem 283, 25863-25870.

[0301]

Bock, P.E., Panizzi, P., and Verhamme, I.M. (2007). Exosites in the substrate specificity of blood coagulation reactions. J Thromb Haemost 5 Suppl 1, 81-94.

CCP4 (1994). The CCP4 suite: Programs for protein crystallography. Acta Crystallogr D50, 760-763.

Changeux, J.P., and Edelstein, S.J. (2005). Allosteric mechanisms of signal transduction. Science 308, 1424-1428.

del Sol, A., Tsai, C.J., Ma, B., and Nussinov, R. (2009). The origin of allosteric functional modulation: multiple pre-existing pathways. Structure 17, 1042-1050.

Di Cera, E. (2006). A structural perspective on enzymes activated by monovalent cations. J Biol Chem 281, 1305-1308.

Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nature Rev. Cancer 2, 161-174.

Eigenbrot, C., and Kirchhofer, D. (2002). New Insight into How Tissue Factor Allosterically Regulates Factor VIIa. Trends in Cardiovascular Medicine 12, 19-26.

Farady, C.J., Egea, P.F., Schneider, E.L., Darragh, M.R., and Craik, C.S. (2008). Structure of an Fab-Protease Complex Reveals a Highly Specific Non-canonical Mechanism of Inhibition. Journal of Molecular Biology 380, 351-360.

Fenton, A.W. (2008). Allostery: an illustrated definition for the 'second secret of life'. Trends in biochemical sciences 33, 420-425.

Friedrich, R., Panizzi, P., Fuentes-Prior, P., Richter, K., Verhamme, I., Anderson, P.J., Kawabata, S.-I., Huber, R., Bode, W., and Bock, P.E. (2003). Staphylocoagulase is a prototype for the mechanism of cofactor-induced zymogen activation. Nature 425, 535-539.

Goodey, N.M., and Benkovic, S.J. (2008). Allosteric regulation and catalysis emerge via a common route. Nature chemical biology 4, 474-482.

Gunasekaran, K., Ma, B., and Nussinov, R. (2004). Is allostery an intrinsic property of all dynamic proteins? Proteins 57, 433-443.

Hardy, J.A., Lam, J., Nguyen, J.T., O'Brien, T., and Wells, J.A. (2004). Discovery of an allosteric site in the caspases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101, 12461-12466.

Hardy, J.A., and Wells, J.A. (2004). Searching for new allosteric sites in enzymes. Current opinion in structural biology 14, 706-715.

[0302]

Hardy, J.A., and Wells, J.A. (2009). Dissecting an allosteric switch in caspase-7 using chemical and mutational probes. J Biol Chem.

Hauske, P., Ottmann, C., Meltzer, M., Ehrmann, M., and Kaiser, M. (2008). Allosteric regulation of proteases. Chembiochem 9, 2920-2928.

Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. Chemical reviews 102, 4501-4524.

Herter, S., Piper, D.E., Aaron, W., Gabriele, T., Cutler, G., Cao, P., Bhatt, A.S., Choe, Y., Craik, C.S., Walker, N., et al. (2005). Hepatocyte growth factor is a preferred in vitro substrate for human hepsin, a membrane-anchored serine protease implicated in prostate and ovarian cancers. Biochem J 390, 125-136.

Hooper, N.M. (2002). Proteases in Biology and Medicine. In Essays in Biochemistry (London: Portland Press).

Hopfner, K.P., Lang, A., Karcher, A., Sichler, K., Kopetzki, E., Brandstetter, H., Huber, R., Bode, W., and Engh, R.A. (1999). Coagulation factor IXa: the relaxed conformation of Tyr99 blocks substrate binding. Structure 7, 989-996.

Huber, R., and Bode, W. (1978). Structural basis of the activation and action of trypsin. Acc. Chem. Res. 11, 114-122.

Huntington, J.A. (2008). How Na+ activates thrombin--a review of the functional and structural data. Biological chemistry 389, 1025-1035.

Kabat, E.A., Wu, T.T., Perry, H.M., Gottesman, K.S., and Foeller, C. (1991). Sequences of proteins of immunological interest, fifth edition. (National Institutes of Health, Bethesda Maryland).

Kataoka, H., Miyata, S., Uchinokura, S., and Itoh, H. (2003a). Roles of hepatocyte growth factor (HGF) activator and HGF activator inhibitor in the pericellular activation of HGF/scatter factor. Cancer and Metastasis Reviews 22, 223-236.

Kataoka, H., Miyata, S., Uchinokura, S., and Itoh, H. (2003b). Roles of hepatocyte growth factor (HGF) activator and HGF activator inhibitor in the pericellular activation of HGF/scatter factor. Cancer metastasis reviews 22, 223-236.

Kawaguchi, M., Orikawa, H., Baba, T., Fukushima, T., and Kataoka, H. (2009). Hepatocyte growth factor activator is a serum activator of single-chain precursor macrophage-stimulating protein. The FEBS journal 276, 3481-3490.

Kirchhofer, D., Peek, M., Li, W., Stamos, J., Eigenbrot, C., Kadkhodayan, S., Elliott, J.M., Corpuz, R.T., Lazarus, R.A., and Moran, P. (2003). Tissue

[0303]

expression, protease specificity, and Kunitz domain functions of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B), a new splice variant of HAI-1. J Biol Chem 278, 36341-36349.

Krauss, G. (2003). Biochemistry of Signal Transduction and Regulation. G. Krauss, ed. (New York: Wiley and Sons), pp. 89-114.

Lee, C.V., Liang, W.C., Dennis, M.S., Eigenbrot, C., Sidhu, S.S., and Fuh, G. (2004a). High-affinity human antibodies from phage-displayed synthetic Fab libraries with a single framework scaffold. J Mol Biol 340, 1073-1093.

Lee, C.V., Sidhu, S.S., and Fuh, G. (2004b). Bivalent antibody phage display mimics natural immunoglobulin. J Immunol Methods 284, 119-132.

Lee, G.M., and Craik, C.S. (2009). Trapping moving targets with small molecules. Science 324, 213-215.

Liang, W.C., Dennis, M.S., Stawicki, S., Chanthery, Y., Pan, Q., Chen, Y., Eigenbrot, C., Yin, J., Koch, A.W., Wu, X., et al. (2007). Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library. J Mol Biol 366, 815-829.

Luttun, A., Dewerchin, M., Collen, D., and Carmeliet, P. (2000). The role of proteinases in angiogenesis, heart development, restenosis, atherosclerosis, myocardial ischemia, and stroke: insights from genetic studies. Curr. Atheroscler. Rep. 2, 407-416.

McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Storoni, L.C., and Read, R.J. (2005). Likelihood-enhanced fast translation functions. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 61, 458-464.

Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y., and Kitamura, N. (1993). Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease reponsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. J Biol Chem 268, 10024-10028.

Monod, J. (1977). Chance and Necessity: Essay on the Natural Philosophy of Modern Biology (Penguin Books).

Olsen, O., and Persson, E. (2008). Cofactor-induced and mutational activity enhancement of coagulation factor VIIa. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS) 65, 953-963.

[0304]

Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. In: Macromolecular Crystallography Part A. Methods in Enzymol. 276, 307-326.

Parr, C., and Jiang, W.G. (2001). Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor, its activator, inhibitors and the c-Met receptor in human cancer cells. International journal of oncology 19, 857-863.

Pellicena, P., and Kuriyan, J. (2006). Protein-protein interactions in the allosteric regulation of protein kinases. Current opinion in structural biology 16, 702-709.

Perutz, M.F. (1970). Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. Nature 228, 726-739.

Peterson, J.R., and Golemis, E.A. (2004). Autoinhibited proteins as promising drug targets. J Cell Biochem 93, 68-73.

Raddatz, R., Schaffhauser, H., and Marino, M.J. (2007). Allosteric approaches to the targeting of G-protein-coupled receptors for novel drug discovery: a critical assessment. Biochemical pharmacology 74, 383-391.

Rawlings, N.D., Morton, F.R., Kok, C.Y., Kong, J., and Barrett, A.J. (2008). MEROPS: the peptidase database. Nucleic Acids Res 36, D320-325.

Segel, I. (1993). Enzyme Kinetics: Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems, Vol pp 161–226 (New York: Wiley).

Shia, S., Stamos, J., Kirchhofer, D., Fan, B., Wu, J., Corpuz, R.T., Santell, L., Lazarus, R.A., and Eigenbrot, C. (2005). Conformational lability in serine protease active sites: structures of hepatocyte growth factor activator (HGFA) alone and with the inhibitory domain from HGFA inhibitor-1B. J Mol Biol 346, 1335-1349.

Shimomura, T., Miyazawa, K., Komiyama, Y., Hiraoka, H., Naka, D., Morimoto, Y., and Kitamura, N. (1995). Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor XIIa and hepatocyte growth factor activator. Eur J Biochem 229, 257-261.

Sohn, J., Grant, R.A., and Sauer, R.T. (2007). Allosteric Activation of DegS, a Stress Sensor PDZ Protease. Cell 131, 572-583.

[0305] Spraggon, G., Hornsby, M., Shipway, A., Tully, D.C., Bursulaya, B., Danahay, H., Harris, J.L., and Lesley, S.A. (2009). Active site conformational

changes of prostasin provide a new mechanism of protease regulation by divalent cations. Protein Sci 18, 1081-1094.

Swain, J.F., and Gierasch, L.M. (2006). The changing landscape of protein allostery. Current opinion in structural biology 16, 102-108.

Tereshko, V., Uysal, S., Koide, A., Margalef, K., Koide, S., and Kossiakoff, A.A. (2008). Toward chaperone-assisted crystallography: protein engineering enhancement of crystal packing and X-ray phasing capabilities of a camelid single-domain antibody (VHH) scaffold. Protein Sci 17, 1175-1187.

Tsai, C.J., Del Sol, A., and Nussinov, R. (2009). Protein allostery, signal transmission and dynamics: a classification scheme of allosteric mechanisms. Molecular bioSystems 5, 207-216.

Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. Nature reviews 5, 785-799.

Vajpai, N., Strauss, A., Fendrich, G., Cowan-Jacob, S.W., Manley, P.W., Grzesiek, S., and Jahnke, W. (2008). Solution conformations and dynamics of ABL kinase-inhibitor complexes determined by NMR substantiate the different binding modes of imatinib/nilotinib and dasatinib. J Biol Chem 283, 18292-18302.

Wells, C.M., and Di Cera, E. (1992). Thrombin is a Na(+)-activated enzyme. Biochemistry 31, 11721-11730.

Wu, Y., Eigenbrot, C., Liang, W.-C., Stawicki, S., Shia, S., Fan, B., Ganesan, R., Lipari, M.T., and Kirchhofer, D. (2007). Structural insight into distinct mechanisms of protease inhibition by antibodies. Proceedings of the National Academy of Sciences 104, 19784-19789.

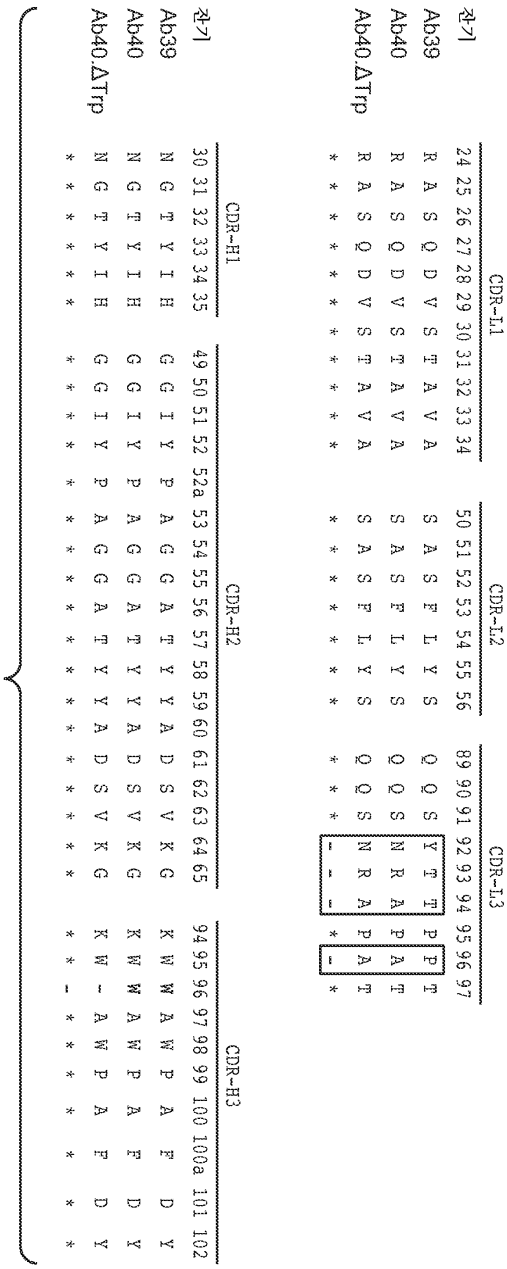
Xu, Z., Horwich, A.L., and Sigler, P.B. (1997). The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)7 chaperonin complex. Nature 388, 741-750.

Yu, E.W., and Koshland, D.E., Jr. (2001). Propagating conformational changes over long (and short) distances in proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 9517-9520.

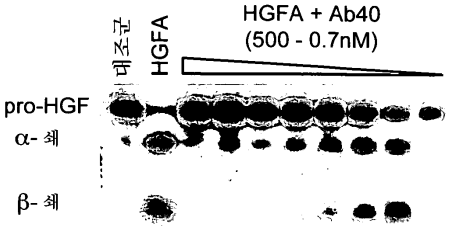
[0306]

도면

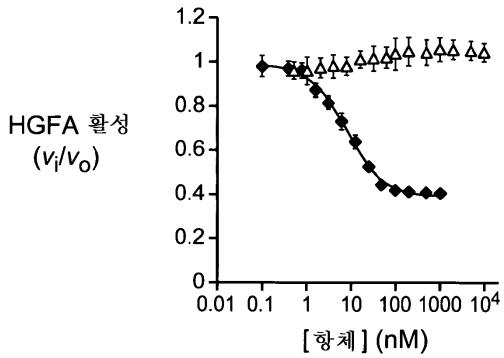
도면1


CDR-L1
CDR-L2
CDR-L3
CDR-H1
CDR-H2
CDR-H3
24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 50 51 52 53 54 55 56 89 90 91 92 93 94 95 96 97 30 31 32 33 34 49 50 51 52 52a 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 94 95 96 97 98 99 100 100a 101 102
잔기 R A S Q D V S T A V A S A S F L Y S Q Q S Y T T P P T N G T Y I H G G I Y P A G G A T Y Y A D S V K G K W - A W P A F D Y
Ab39 R A S Q D V S T A V A S A S F L Y S Q Q S Y T T P P T N G T Y I H G G I Y P A G G A T Y Y A D S V K G K W W A W P A F D Y
Ab40 R A S Q D V S T A V A S A S F L Y S Q Q S N R A P A T N G T Y I H G G I Y P A G G A T Y Y A D S V K G K W W A W P A F D Y
Ab40.ΔTrp R A S Q D V S T A V A S A S F L Y S Q Q S N R A P A T N G T Y I H G G I Y P A G G A T Y Y A D S V K G K W W A W P A F D Y

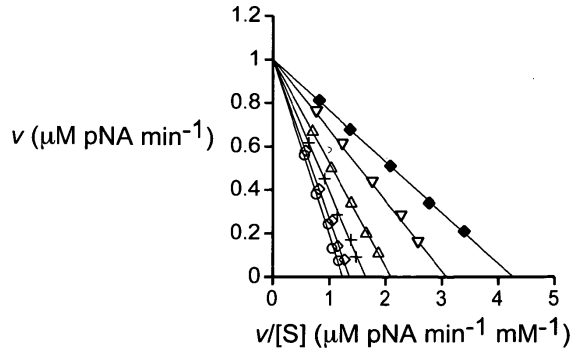
도면2a


HGFA + Ab40
(500 - 0.7nM)
HGFA
관조대
pro-HGF
α-쇄
β-쇄

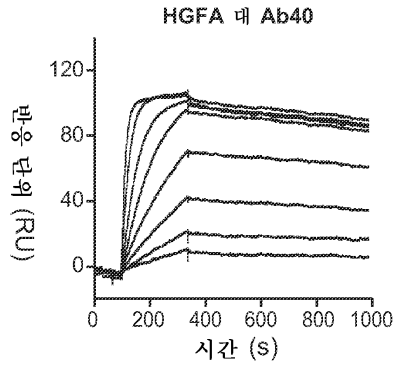
도면2b



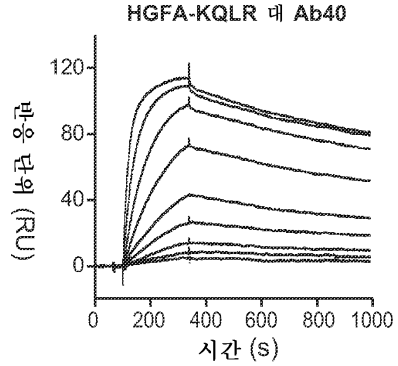
도면2c



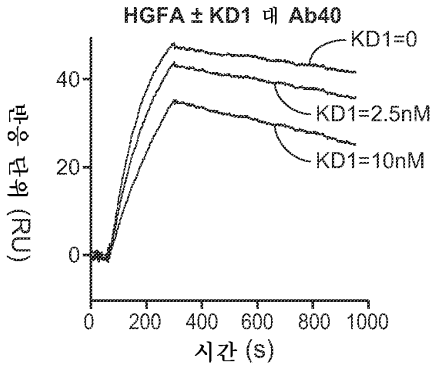
도면3a



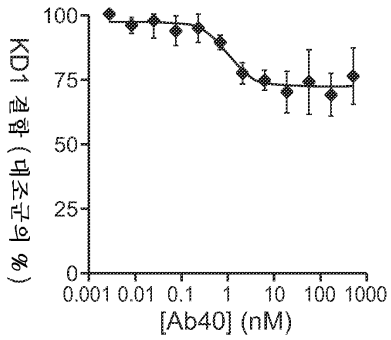
도면3b



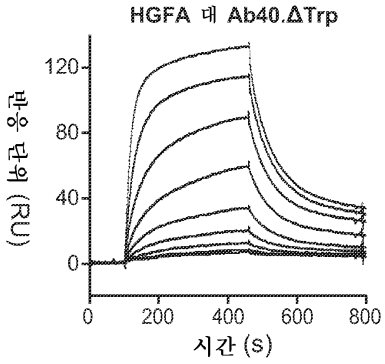
도면3c



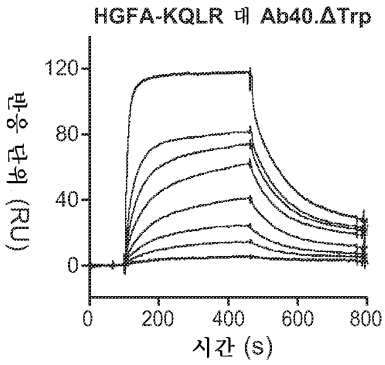
도면3d



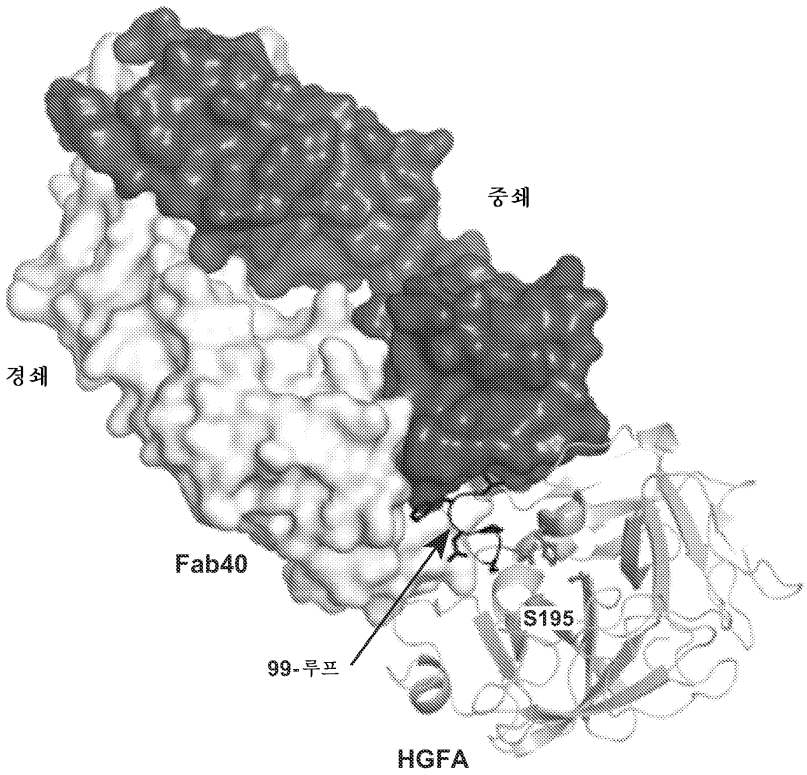
도면3e



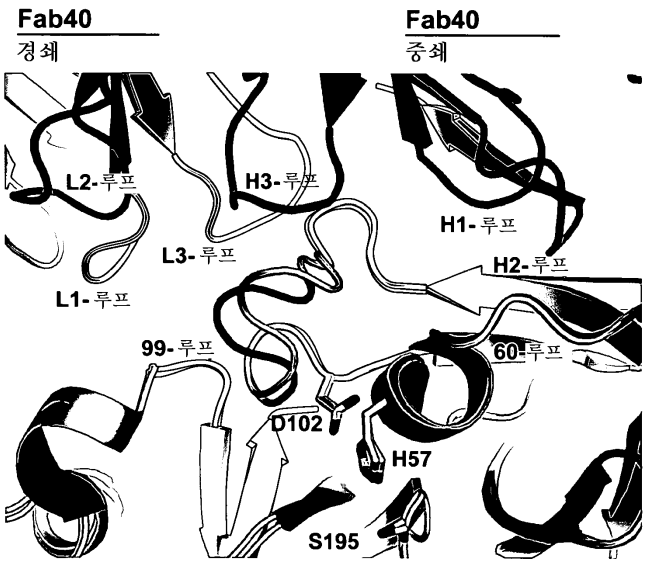
도면3f



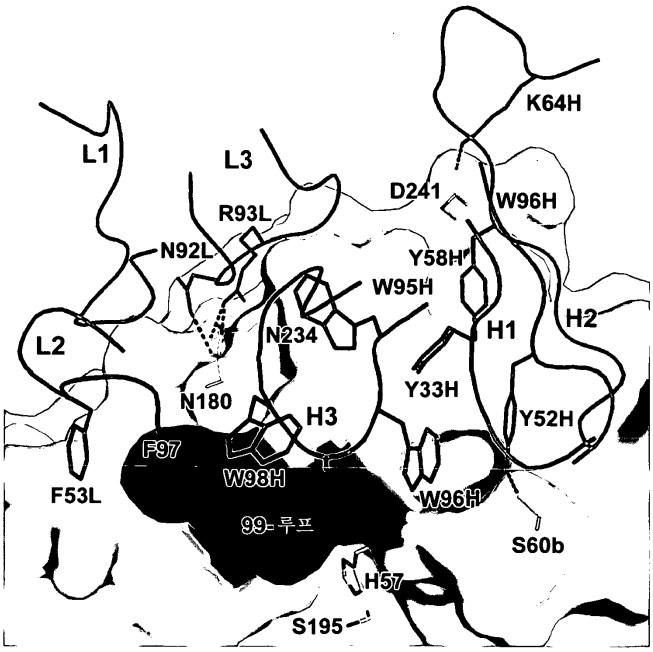
도면4a


중쇄
경쇄
Fab40
S195
99-루프
HGFA

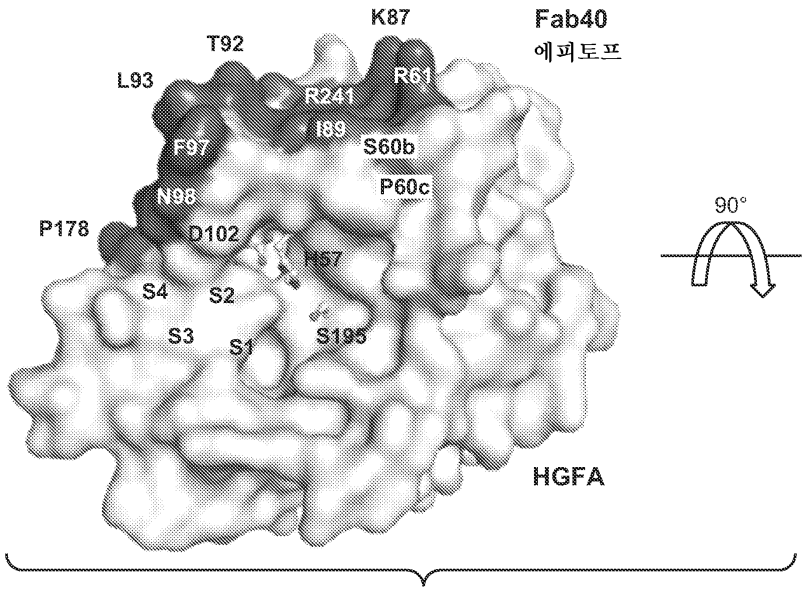
도면4b


Fab40
경쇄
Fab40
중쇄
L2-루프
H3-루프
H1-루프
L3-루프
H2-루프
L1-루프
99-루프
60-루프
D102
H57
S195

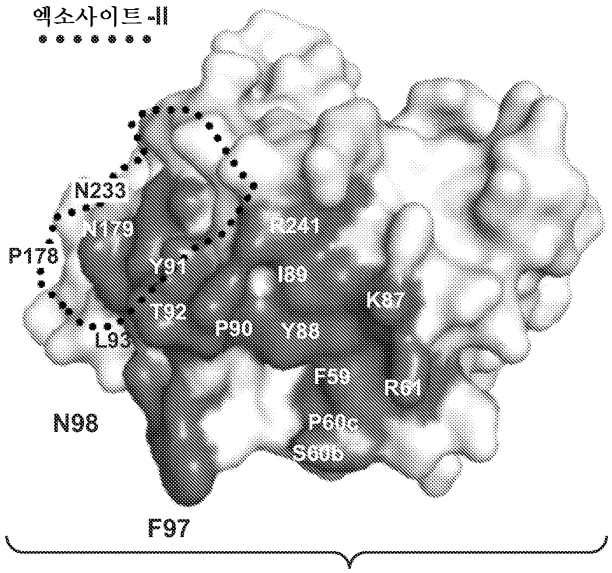
도면4c


K64H
L1
L3
D241
W96H
R93L
N92L
Y58H
W95H
H2
H1
L2
N234
Y33H
N180
H3
Y52H
F97
W98H
W96H
F53L
99-루프
S60b
H57
S195

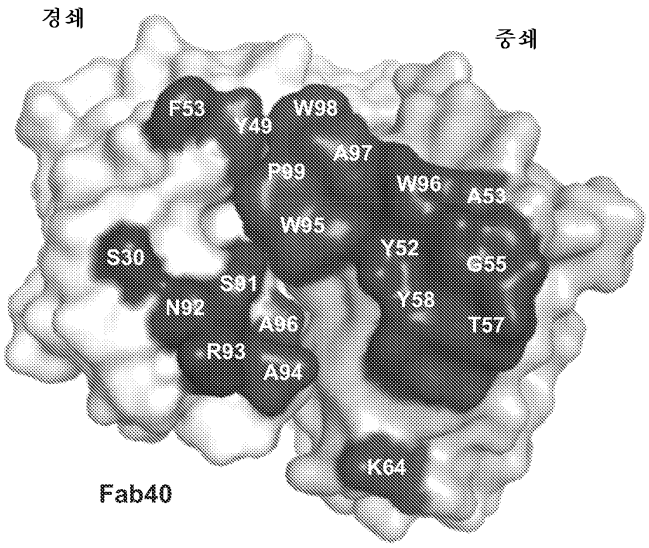
도면5a


K87
Fab40
에피토프
T92
L93
R61
R241
I89
F97
S60b
P60c
N98
P178
D102
H57
S4
S2
S3
S1
S195
90°
HGFA

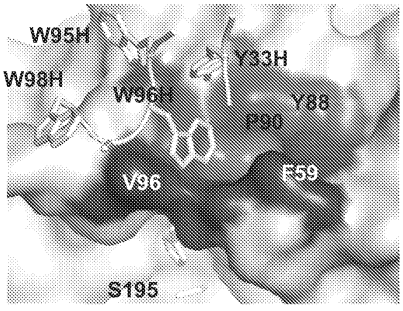
도면5b



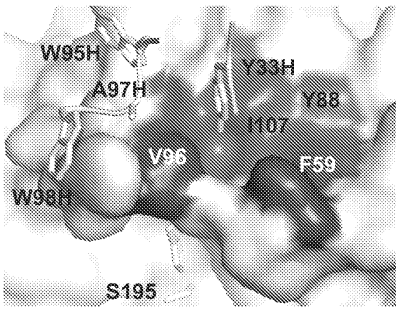
도면5c



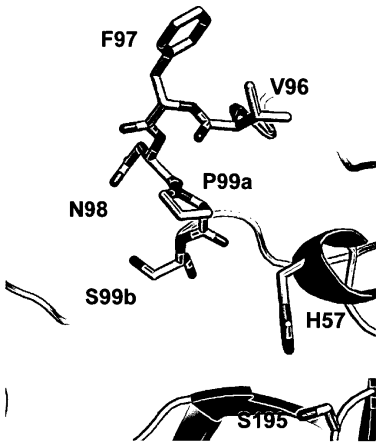
도면6a



도면6b

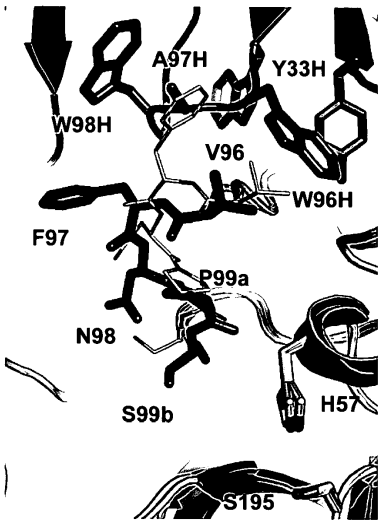


도면6c



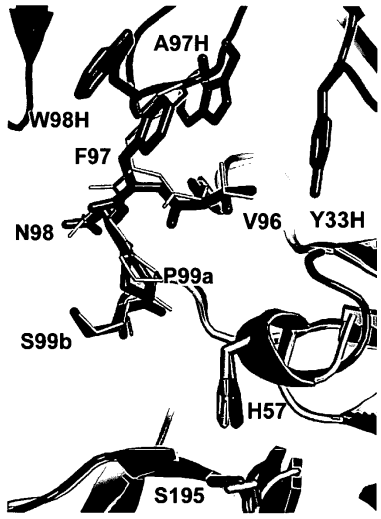
스위치 "오프" (컴피턴트 상태)

도면6d



스위치 "온" (비-컴피턴트 상태)

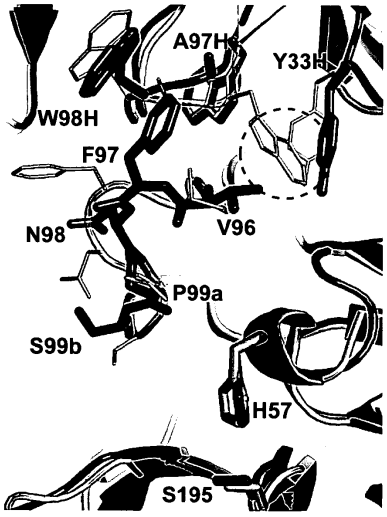
도면6e



HGFA/Fab40.ΔTrp

스위치 "오프" (컴피턴트 상태)

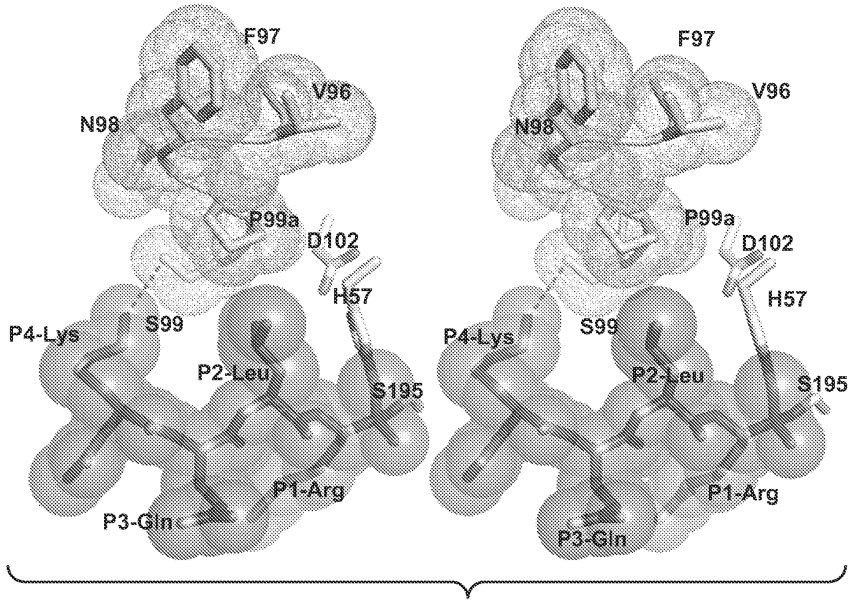
도면6f



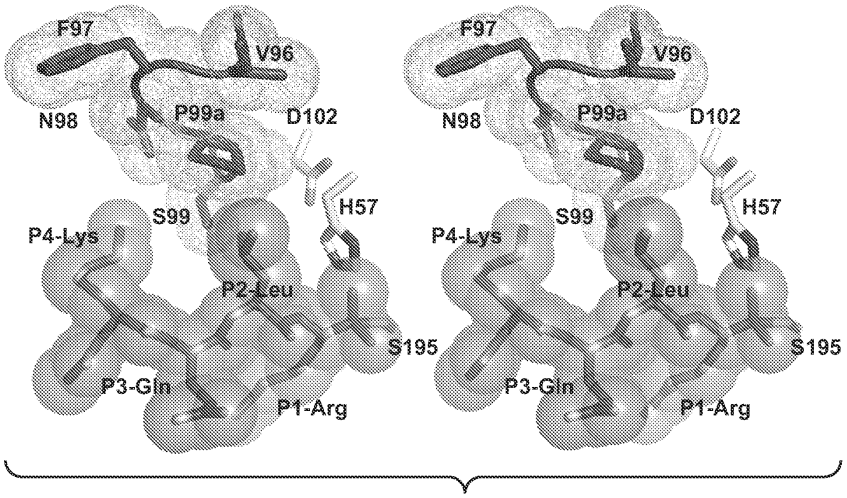
HGFA/Fab40.ΔTrp

스위치 "오프" (컴피턴트 상태)

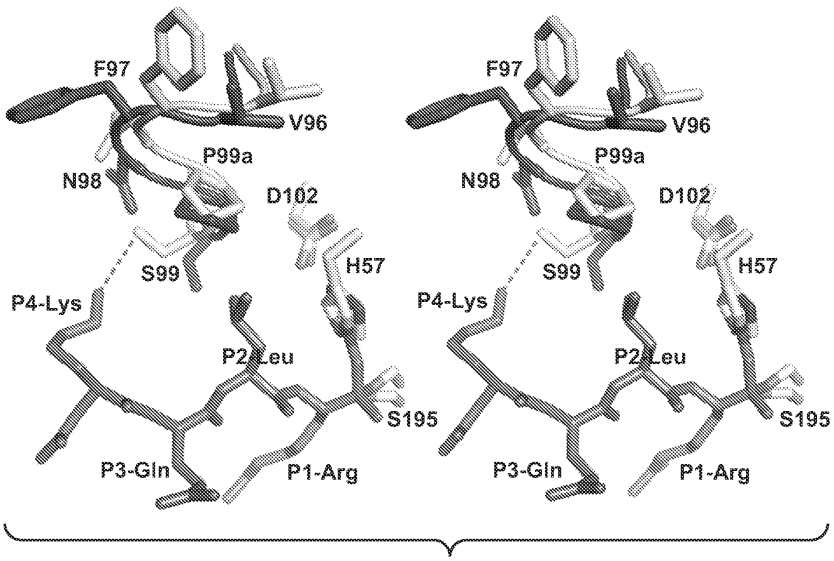
도면7a


F97
V96
N98
P99a
D102
H57
S99
P4-Lys
P2-Leu
S195
P1-Arg
P3-Gln
F97
V96
N98
P99a
D102
H57
S99
P4-Lys
P2-Leu
S195
P1-Arg
P3-Gln

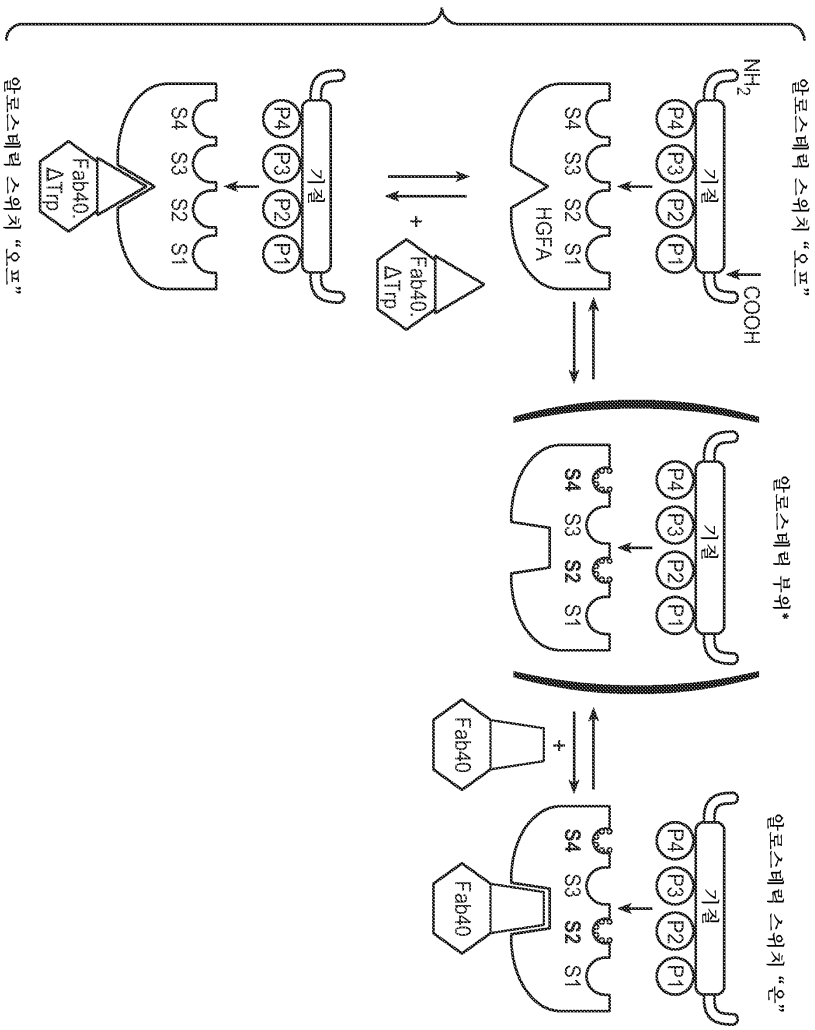
도면7b


F97
V96
N98
P99a
D102
H57
S99
P4-Lys
P2-Leu
S195
P3-Gln
P1-Arg
F97
V96
N98
P99a
D102
H57
S99
P4-Lys
P2-Leu
S195
P3-Gln
P1-Arg

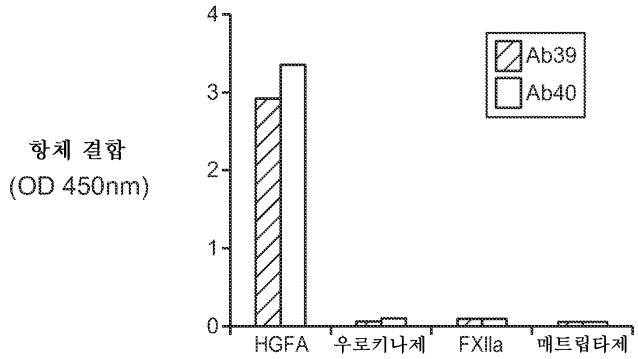
도면7c


F97
V96
P99a
N98
D102
S99
H57
P4-Lys
P2-Leu
S195
P3-Gln
P1-Arg
F97
V96
P99a
N98
D102
S99
H57
P4-Lys
P2-Leu
S195
P3-Gln
P1-Arg

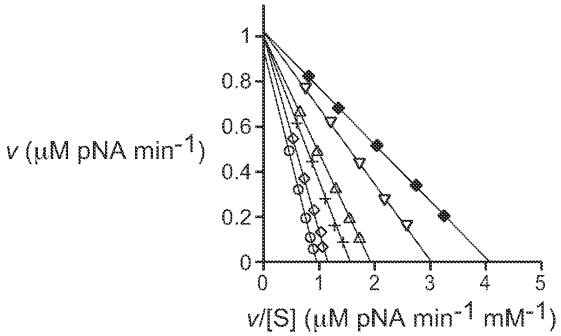
도면8


알로스테릭 스위치 "오프"
NH2
P4
P3
P2
P1
기질
COOH
S4
S3
S2
S1
HGFA
+
Fab40
ΔTrp
알로스테릭 부위*
Fab40
알로스테릭 스위치 "온"

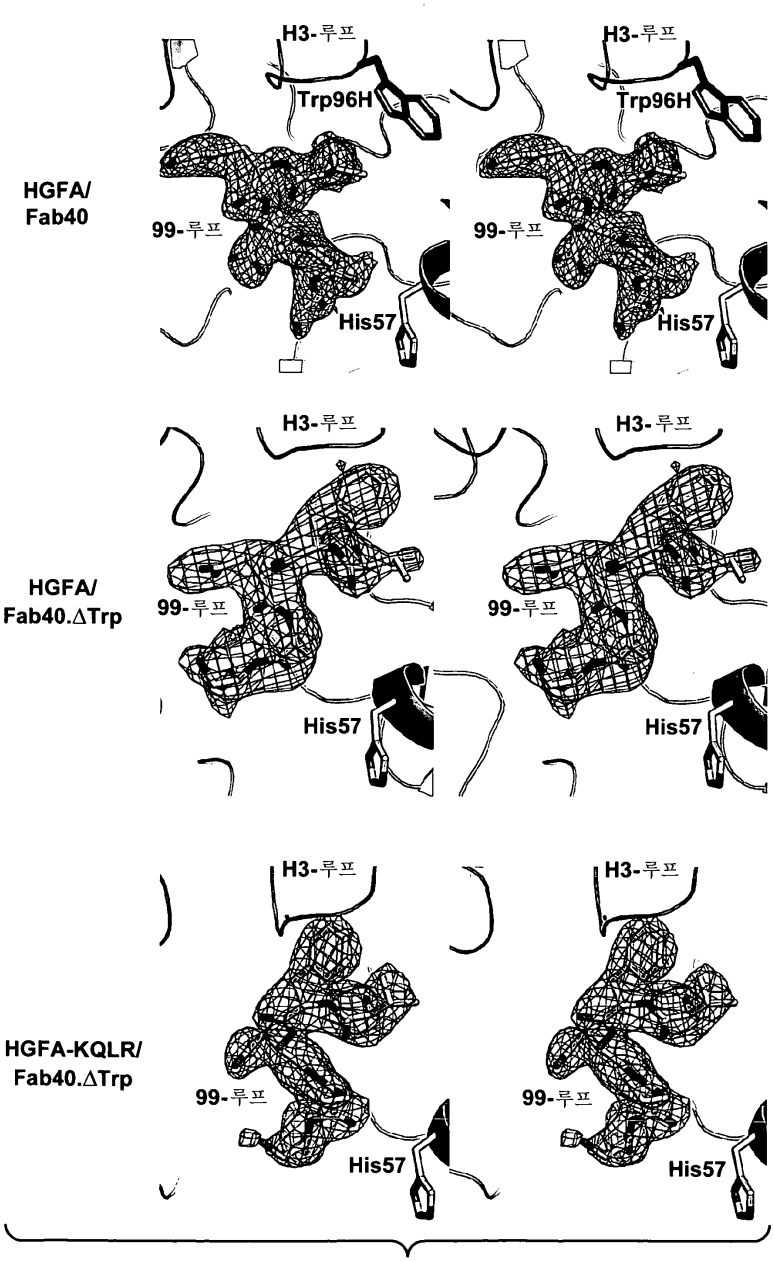
도면9a


항체 결합
(OD 450nm)
Ab39
Ab40
HGFA
우로키나제
FXIIa
매트립타제

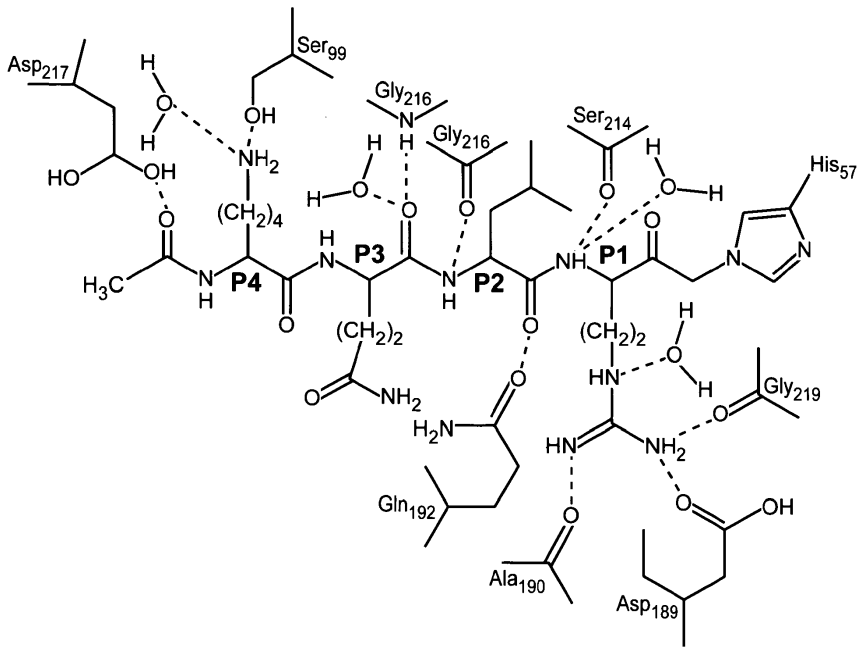
도면9b


v (μM pNA min-1)
v/[S] (μM pNA min-1 mM-1)

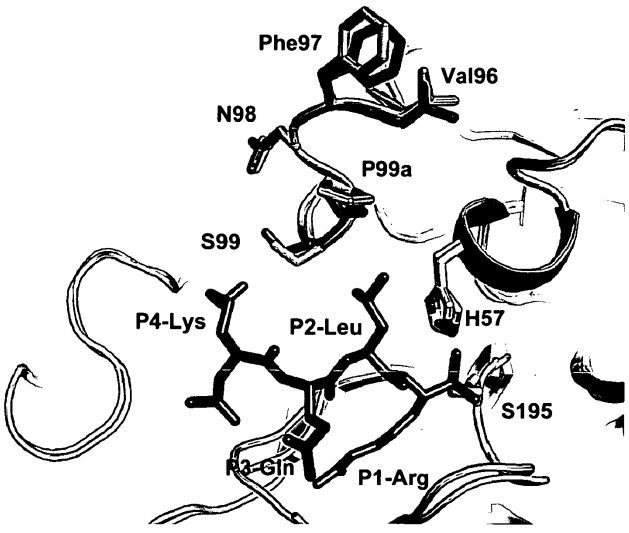
도면10


HGFA/
Fab40
H3-루프
Trp96H
99-루프
His57
H3-루프
Trp96H
99-루프
His57
HGFA/
Fab40.ΔTrp
H3-루프
99-루프
His57
H3-루프
99-루프
His57
HGFA-KQLR/
Fab40.ΔTrp
H3-루프
99-루프
His57
H3-루프
99-루프
His57

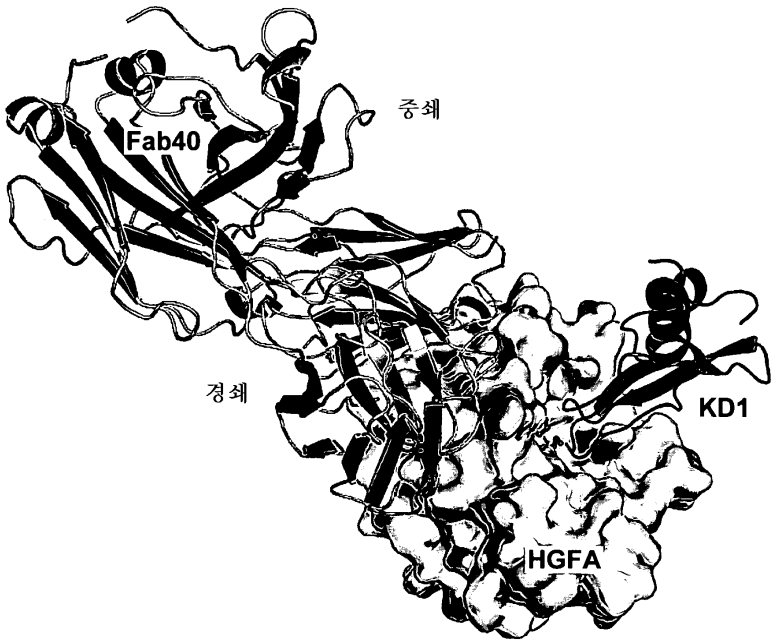
도면11


Asp217
Ser99
Gly216
Gly216
Ser214
His57
Gly219
P4
P3
P2
P1
Gln192
Ala190
Asp189

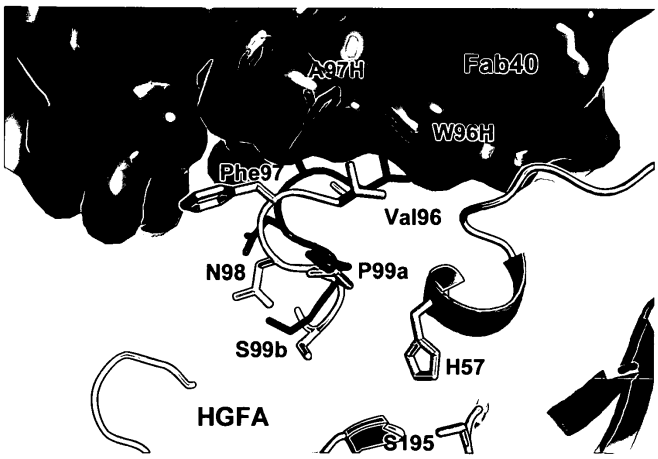
도면12


Phe97
Val96
N98
P99a
S99
P4-Lys
P2-Leu
H57
S195
P3-Gln
P1-Arg

도면13


중쇄
Fab40
경쇄
KD1
HGFA

도면14

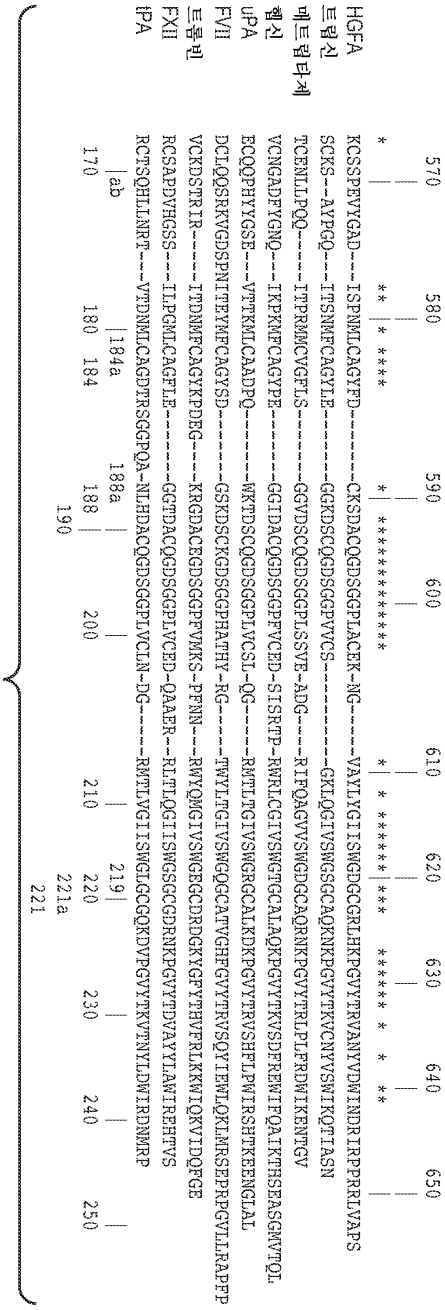

A97H
Fab40
W96H
Phe97
Val96
N98
P99a
S99b
H57
HGFA
S195

도면15aa

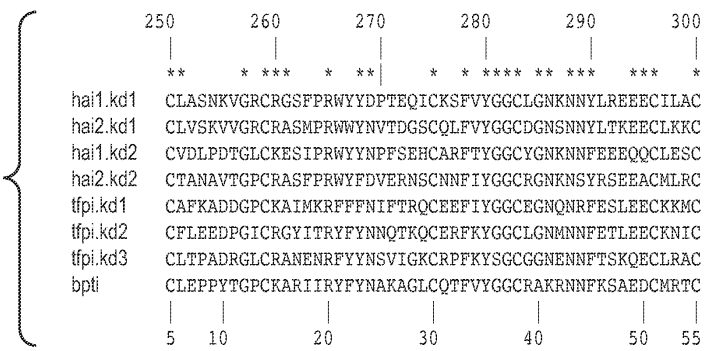
```
          410       420         430          440       450            460       470        480
           |         |           |            |         |              |         |          |
          ****     *  **** *     |       ******  |** ******|              * **      |     **   *|  * *  *
HGFA      IIGGSSSLPGSHPWLAAIYI-G--DS------FCAGSLVHTCWVVSAAHCFS-HSPP------RDSVSVVLGQHF-FNRTTDV--TQTFGIEKYIPYTLY
트립신    IVGGYTCGANTVPYQVSLNS-GYH--------FCGGSLINSQWVVSAAHCY--K----------SGIQVRLGEDN-INVVEGN--EQFISASKSIVHPSY
매트립타제 VVGGTDADEGEWPWQVSLHA-LGQGH------ICGASLISPNWLVSAAHCYI-DDRGFRYSD-PTQWTAFLGLHD-QSQRSAPG-VQERRLKRIISHPFF
헵신      IVGGRDTSLGRWPWQVSLRY-DGAH-------LCGGSLLSGDWVLTAAHCFP-ERNRV-----LSRWRVFAGAVA-QASPH----GLQLGVQAVVYHGGY
uPA       IIGGEFTTIENQPWFAAIYR-RHRGGSVTY--VCGGSLISPCWVISATHCFI-DYPK------KEDYIVYLGRSR-LNSNTQG--EMKFEVENLILHKDY
FVII      IVGGKVCPKGECPWQVLLLV-NGAQ-------LCGGTLINTIWVVSAAHCFD-KIKN------WRNLIAVLGEHD-LSEHDGD--EQSRRVAQVIIPSTY
트롬빈    IVEGSDAEIGMSPWQVMLFR-KSPQEL-----LCGASLISDRWVLTAAHCLL-YPPWDKNFT-ENDLLVRIGKHS-RTRYERNI-EKISMLEKIYIHPRY
FXII      VVGGLVALRGAHPYIAALYW-GHS--------FCAGSLIAPCWVLTAAHCLQ-DRPA------PEDLTVVLGQER-RNHSCEP--CQTLAVRSYRLHEAF
tPA       IKGGLFADIASHPWQAAIFA-KHRRSPGERF-LCGGILISSCWILSAAHCFQ-ERFP------PHHLTVILGRTY-RVVPGEE--EQKFEVEKYIVHKEF
           |   |         |         |             |          | abcd              |          |        |
          16   20        30        40            50         60                70         80       90
                                37- 루프                       60- 루프

          490            500         510       520       530          540       550        560
           |              |           |         |         |            |         |          |
           | *         ****** *       |*  *   * *|***     | *       * * ***        *      *   *|
HGFA      S-VFNP------SDHDLVLIRLK-KKGDR--CATRSQFVQPICLPE-PGSTFPAG----HKCQIAGWG-HLDENVSGYS---SSLREALVPLVADH----
트립신    N-SNT-------LNNDIMLIKLK-S-------AASLNSRVASISLPT-SC--ASAG----TQCLISGWG-NTKSSGTSYP---DVLKCLKAPILSDS----
매트립타제 N-DFT-------FDYDIALLELE-K-------PAEYSSMVRPICLPD-ASHVFPAG----KAIWVTGWG-HTQYGGTGA----LILQKGEIRVINQT----
헵신      L-PFRDPNSEE-NSNDIALVHLS-S-------PLPLTEYIQPVCLPA-AGQALVDG----KICTVTGWG-NTQYYGQQA----GVLQEARVPIISND----
uPA       S-ADTLA-----HHNDIALLKIR-SKEGR--CAQPSRTIQTICLPS-MYNDPQFG----TSCEITGFG-KENSTDYLYP---EQLKMTVVKLISHR----
FVII      V-PGT-------TNHDIALLRLH-Q-------PVVLTDHVVPLCLPE-RTFSERTLAFV-RFSLVSGWG-QLLDRGATA----LELMVLNVPRLMTQ----
트롬빈    N-WREN------LDRDIALMKLK-K-------PVAFSDYIHPVCLPD-RETAASLLQAG-YKGRVTGWG-NLKETWTANVGK-GQPSVLQVVNLPIVERP-
FXII      S-PVS-------YQHDLALLRLQ-EDADGS-CALLSPYVQPVCLPS-GAARPSET----TLCQVAGWG-HQFEGAEEYA---SFLQEAQVPFLSLE----
tPA       D-DDT-------YDNDIALLQLK-SDSSR--CAQESSVVRTVCLPP-ADLQLPDW----TECELSGYG-KHEALSPFYS---ERLKEAHVRLYPSS----
              99a    99|          | abc  d       |         |            |         |          |
                    100         110          120       130          140       150        160
          99- 루프                                                        140- 루프
```

도면15ab



도면15b



도면16a

경쇄 가변 도메인 서열

카바트 - CDR L1 (24–34); 코티아 - CDR L1 (24–34); 접촉 - CDR L1 (30–36)

카바트#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Ab40	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	-	-	-	-	-	-	D	V	S	T	A	V	A	W	Y
Ab40.ΔTrp	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	-	-	-	-	-	-	D	V	S	T	A	V	A	W	Y

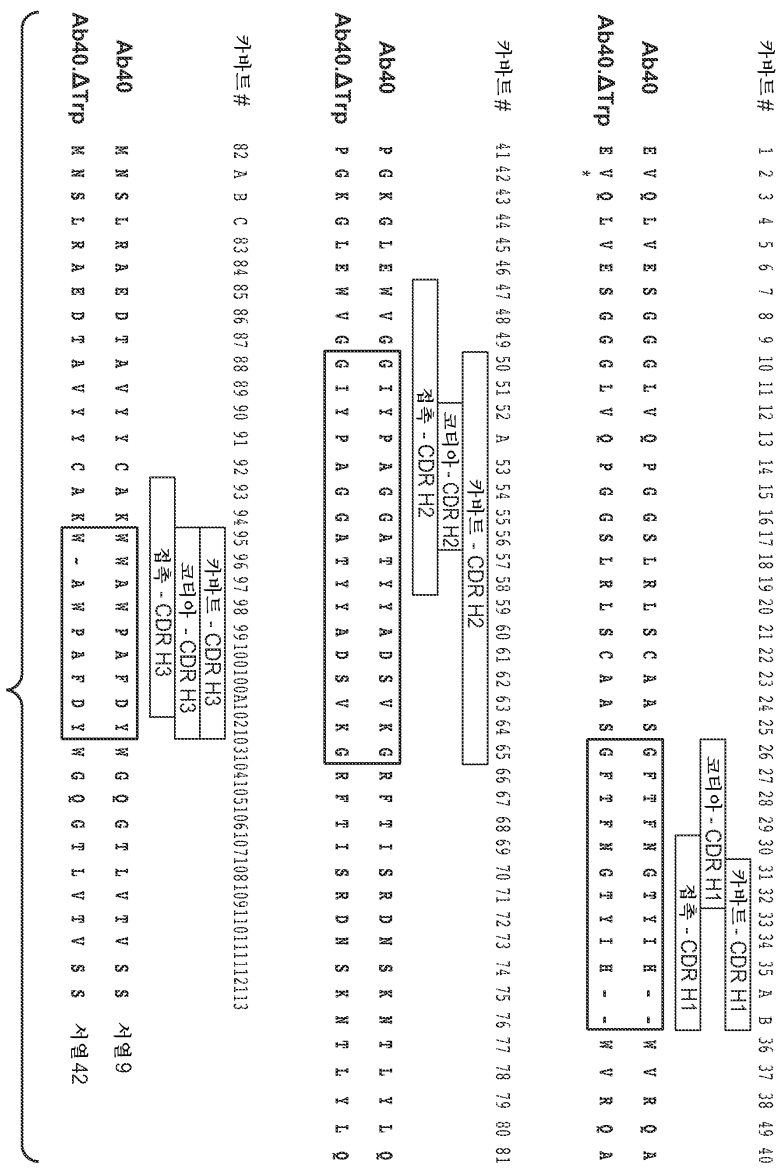
카바트 - CDR L2 (50–56); 코티아 - CDR L2 (50–56); 접촉 - CDR L2 (46–55)

카바트#	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
Ab40	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L
Ab40.ΔTrp	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	S	A	S	F	L	Y	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L

카바트 - CDR L3 (89–97); 코티아 - CDR L3 (89–97); 접촉 - CDR L3 (89–96)

카바트#	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	
Ab40	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	N	R	A	P	A	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열8
Ab40.ΔTrp	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	N	R	A	P	A	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	서열8

도면16b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC. et al.

<120> MODULATORS OF HEPATOCYTE GROWTH FACTOR ACTIVATOR

<130> P4334R1-WO

<140><141><150> 61/252,973

<151> 2009-10-19

<160> 47

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 1

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 2

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 3

Gln Gln Ser Asn Arg Ala Pro Ala Thr

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 4

Gly Thr Tyr Ile His

1 5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 5

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

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 9

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 6

Trp Trp Ala Trp Pro Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 7

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 8

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Arg Ala Pro Ala
85 90 95

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

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Gly Thr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Lys Trp Trp Ala Trp Pro Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 10

Lys Gln Leu Arg

1

<210> 11

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

1 5 10

<210> 13

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<

400> 14

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 19

<211> 650

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

Gly Pro Phe Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Arg Gly
20 25 30

Phe Gln Pro Gln Pro Gly Gly Asn Arg Thr Glu Ser Pro Glu Pro Asn
35 40 45

Ala Thr Ala Thr Pro Ala Ile Pro Thr Ile Leu Val Thr Ser Val Thr
50 55 60

Ser Glu Thr Pro Ala Thr Ser Ala Pro Glu Ala Glu Gly Pro Gln Ser
65 70 75 80
Gly Gly Leu Pro Pro Pro Pro Arg Ala Val Pro Ser Ser Ser Ser Pro
85 90 95
Gln Ala Gln Ala Leu Thr Glu Asp Gly Arg Pro Cys Arg Phe Pro Phe
100 105 110
Arg Tyr Gly Gly Arg Met Leu His Ala Cys Thr Ser Glu Gly Ser Ala
115 120 125

His Arg Lys Trp Cys Ala Thr Thr His Asn Tyr Asp Arg Asp Arg Ala
130 135 140
Trp Gly Tyr Cys Val Glu Ala Thr Pro Pro Pro Gly Gly Pro Ala Ala
145 150 155 160
Leu Asp Pro Cys Ala Ser Gly Pro Cys Leu Gly Ser Cys Ser Asn Thr
165 170 175
Gln Asp Pro Gln Ser Tyr His Cys Ser Cys Pro Arg Ala Phe Thr Gly
180 185 190

Lys Asp Cys Gly Thr Glu Lys Cys Phe Asp Glu Thr Arg Tyr Glu Tyr
195 200 205
Leu Glu Gly Gly Asp Arg Trp Ala Arg Val Arg Gln Gly His Val Glu
210 215 220
Gln Cys Glu Cys Gly Arg Thr Trp Cys Glu Gly Thr Arg His Thr Ala
225 230 235 240
Cys Leu Ser Ser Pro Cys Leu Asn Gly Gly Thr Cys His Leu Ile Val
245 250 255

Ala Thr Gly Thr Thr Val Cys Ala Cys Pro Pro Gly Phe Ala Gly Arg
260 265 270
Leu Cys Asn Ile Glu Pro Asp Glu Arg Cys Phe Leu Gly Asn Gly Thr
275 280 285
Gly Tyr Arg Gly Val Ala Ser Thr Ser Ala Ser Gly Leu Ser Cys Leu
290 295 300
Ala Trp Asn Ser Asp Leu Leu Tyr Gln Glu Leu His Val Asp Ser Val

305 310 315 320

Gly Ala Ala Ala Leu Leu Gly Leu Gly Pro His Ala Tyr Cys Arg Asn
325 330 335
Pro Asp Asn Asp Glu Arg Pro Trp Cys Tyr Val Lys Asp Ser Ala Leu
340 345 350
Ser Trp Glu Tyr Cys Arg Leu Glu Ala Cys Glu Ser Leu Thr Arg Val
355 360 365
Gln Leu Ser Pro Asp Leu Leu Ala Thr Leu Pro Glu Pro Ala Ser Pro
370 375 380

Gly Arg Gln Ala Cys Gly Arg Arg His Lys Lys Arg Thr Phe Leu Arg
385 390 395 400
Pro Arg Ile Ile Gly Gly Ser Ser Ser Leu Pro Gly Ser His Pro Trp
405 410 415
Leu Ala Ala Ile Tyr Ile Gly Asp Ser Phe Cys Ala Gly Ser Leu Val
420 425 430
His Thr Cys Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Ser His Ser Pro
435 440 445

Pro Arg Asp Ser Val Ser Val Val Leu Gly Gln His Phe Phe Asn Arg
450 455 460
Thr Thr Asp Val Thr Gln Thr Phe Gly Ile Glu Lys Tyr Ile Pro Tyr
465 470 475 480
Thr Leu Tyr Ser Val Phe Asn Pro Ser Asp His Asp Leu Val Leu Ile
485 490 495
Arg Leu Lys Lys Lys Gly Asp Arg Cys Ala Thr Arg Ser Gln Phe Val
500 505 510

Gln Pro Ile Cys Leu Pro Glu Pro Gly Ser Thr Phe Pro Ala Gly His
515 520 525
Lys Cys Gln Ile Ala Gly Trp Gly His Leu Asp Glu Asn Val Ser Gly
530 535 540
Tyr Ser Ser Ser Leu Arg Glu Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Asp His
545 550 555 560

Lys Cys Ser Ser Pro Glu Val Tyr Gly Ala Asp Ile Ser Pro Asn Met
565 570 575

Leu Cys Ala Gly Tyr Phe Asp Cys Lys Ser Asp Ala Cys Gln Gly Asp
580 585 590
Ser Gly Gly Pro Leu Ala Cys Glu Lys Asn Gly Val Ala Tyr Leu Tyr
595 600 605
Gly Ile Ile Ser Trp Gly Asp Gly Cys Gly Arg Leu His Lys Pro Gly
610 615 620
Val Tyr Thr Arg Val Ala Asn Tyr Val Asp Trp Ile Asn Asp Arg Ile
625 630 635 640

Arg Pro Pro Arg Arg Leu Val Ala Pro Ser
645 650

<210> 20
<211> 283
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 20
Val Gln Leu Ser Pro Asp Leu Leu Ala Thr Leu Pro Glu Pro Ala Ser
1 5 10 15
Pro Gly Arg Gln Ala Cys Gly Arg Arg His Lys Lys Arg Thr Phe Leu
20 25 30
Arg Pro Arg Ile Ile Gly Gly Ser Ser Ser Leu Pro Gly Ser His Pro
35 40 45

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

Tyr Thr Leu Tyr Ser Val Phe Asn Pro Ser Asp His Asp Leu Val Leu
115 120 125

Ile Arg Leu Lys Lys Lys Gly Asp Arg Cys Ala Thr Arg Ser Gln Phe
130 135 140

Val Gln Pro Ile Cys Leu Pro Glu Pro Gly Ser Thr Phe Pro Ala Gly
145 150 155 160

His Lys Cys Gln Ile Ala Gly Trp Gly His Leu Asp Glu Asn Val Ser
165 170 175

Gly Tyr Ser Ser Ser Leu Arg Glu Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Asp
180 185 190

His Lys Cys Ser Ser Pro Glu Val Tyr Gly Ala Asp Ile Ser Pro Asn
195 200 205

Met Leu Cys Ala Gly Tyr Phe Asp Cys Lys Ser Asp Ala Cys Gln Gly
210 215 220

Asp Ser Gly Gly Pro Leu Ala Cys Glu Lys Asn Gly Val Ala Tyr Leu
225 230 235 240

Tyr Gly Ile Ile Ser Trp Gly Asp Gly Cys Gly Arg Leu His Lys Pro
245 250 255

Gly Val Tyr Thr Arg Val Ala Asn Tyr Val Asp Trp Ile Asn Asp Arg
260 265 270

Ile Arg Pro Pro Arg Arg Leu Val Ala Pro Ser
275 280

<210> 21

<211> 239

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Ile Ile Gly Gly Ser Ser Ser Leu Pro Gly Ser His Pro Trp Leu Ala
1 5 10 15

Ala Ile Tyr Ile Gly Asp Ser Phe Cys Ala Gly Ser Leu Val His Thr
20 25 30

Cys Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Ser His Ser Pro Pro Arg

35 40 45

Asp Ser Val Ser Val Val Leu Gly Gln His Phe Phe Asn Arg Thr Thr

50 55 60

Asp Val Thr Gln Thr Phe Gly Ile Glu Lys Tyr Ile Pro Tyr Thr Leu

65 70 75 80

Tyr Ser Val Phe Asn Pro Ser Asp His Asp Leu Val Leu Ile Arg Leu

85 90 95

Lys Lys Lys Gly Asp Arg Cys Ala Thr Arg Ser Gln Phe Val Gln Pro

100 105 110

Ile Cys Leu Pro Glu Pro Gly Ser Thr Phe Pro Ala Gly His Lys Cys

115 120 125

Gln Ile Ala Gly Trp Gly His Leu Asp Glu Asn Val Ser Gly Tyr Ser

130 135 140

Ser Ser Leu Arg Glu Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Asp His Lys Cys

145 150 155 160

Ser Ser Pro Glu Val Tyr Gly Ala Asp Ile Ser Pro Asn Met Leu Cys

165 170 175

Ala Gly Tyr Phe Asp Cys Lys Ser Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly

180 185 190

Gly Pro Leu Ala Cys Glu Lys Asn Gly Val Ala Tyr Leu Tyr Gly Ile

195 200 205

Ile Ser Trp Gly Asp Gly Cys Gly Arg Leu His Lys Pro Gly Val Tyr

210 215 220

Thr Arg Val Ala Asn Tyr Val Asp Trp Ile Asn Asp Arg Ile Arg

225 230 235

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 22

Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro Thr

1 5

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 23

Asn Gly Thr Tyr Ile His

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 24

Lys Trp Ala Trp Pro Ala Phe Asp Tyr

1 5

<210> 25

<211> 248

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Ile Ile Gly Gly Ser Ser Ser Leu Pro Gly Ser His Pro Trp Leu Ala

1 5 10 15

Ala Ile Tyr Ile Gly Asp Ser Phe Cys Ala Gly Ser Leu Val His Thr

20 25 30

Cys Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Ser His Ser Pro Pro Arg

35 40 45

Asp Ser Val Ser Val Val Leu Gly Gln His Phe Phe Asn Arg Thr Thr
50 55 60

Asp Val Thr Gln Thr Phe Gly Ile Glu Lys Tyr Ile Pro Tyr Thr Leu
65 70 75 80
Tyr Ser Val Phe Asn Pro Ser Asp His Asp Leu Val Leu Ile Arg Leu
85 90 95
Lys Lys Lys Gly Asp Arg Cys Ala Thr Arg Ser Gln Phe Val Gln Pro
100 105 110
Ile Cys Leu Pro Glu Pro Gly Ser Thr Phe Pro Ala Gly His Lys Cys
115 120 125

Gln Ile Ala Gly Trp Gly His Leu Asp Glu Asn Val Ser Gly Tyr Ser
130 135 140
Ser Ser Leu Arg Glu Ala Leu Val Pro Leu Val Ala Asp His Lys Cys
145 150 155 160
Ser Ser Pro Glu Val Tyr Gly Ala Asp Ile Ser Pro Asn Met Leu Cys
165 170 175
Ala Gly Tyr Phe Asp Cys Lys Ser Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly
180 185 190

Gly Pro Leu Ala Cys Glu Lys Asn Gly Val Ala Tyr Leu Tyr Gly Ile
195 200 205
Ile Ser Trp Gly Asp Gly Cys Gly Arg Leu His Lys Pro Gly Val Tyr
210 215 220
Thr Arg Val Ala Asn Tyr Val Asp Trp Ile Asn Asp Arg Ile Arg Pro
225 230 235 240
Pro Arg Arg Leu Val Ala Pro Ser
245

<210> 26

<211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ile Val Gly Gly Tyr Thr Cys Gly Ala Asn Thr Val Pro Tyr Gln Val
1 5 10 15
Ser Leu Asn Ser Gly Tyr His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Ile Asn Ser
20 25 30
Gln Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Tyr Lys Ser Gly Ile Gln Val
35 40 45
Arg Leu Gly Glu Asp Asn Ile Asn Val Val Glu Gly Asn Glu Gln Phe
50 55 60

Ile Ser Ala Ser Lys Ser Ile Val His Pro Ser Tyr Asn Ser Asn Thr
65 70 75 80
Leu Asn Asn Asp Ile Met Leu Ile Lys Leu Lys Ser Ala Ala Ser Leu
85 90 95
Asn Ser Arg Val Ala Ser Ile Ser Leu Pro Thr Ser Cys Ala Ser Ala
100 105 110
Gly Thr Gln Cys Leu Ile Ser Gly Trp Gly Asn Thr Lys Ser Ser Gly
115 120 125

Thr Ser Tyr Pro Asp Val Leu Lys Cys Leu Lys Ala Pro Ile Leu Ser
130 135 140
Asp Ser Ser Cys Lys Ser Ala Tyr Pro Gly Gln Ile Thr Ser Asn Met
145 150 155 160
Phe Cys Ala Gly Tyr Leu Glu Gly Gly Lys Asp Ser Cys Gln Gly Asp
165 170 175
Ser Gly Gly Pro Val Val Cys Ser Gly Lys Leu Gln Gly Ile Val Ser
180 185 190

Trp Gly Ser Gly Cys Ala Gln Lys Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys
195 200 205
Val Cys Asn Tyr Val Ser Trp Ile Lys Gln Thr Ile Ala Ser Asn
210 215 220
<210> 27
<211> 241
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Val Val Gly Gly Thr Asp Ala Asp Glu Gly Glu Trp Pro Trp Gln Val
1 5 10 15
Ser Leu His Ala Leu Gly Gln Gly His Ile Cys Gly Ala Ser Leu Ile

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

85 90 95
Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Glu Lys Pro Ala Glu Tyr Ser Ser Met
100 105 110
Val Arg Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ala Ser His Val Phe Pro Ala Gly
115 120 125
Lys Ala Ile Trp Val Thr Gly Trp Gly His Thr Gln Tyr Gly Gly Thr
130 135 140
Gly Ala Leu Ile Leu Gln Lys Gly Glu Ile Arg Val Ile Asn Gln Thr

145 150 155 160
Thr Cys Glu Asn Leu Leu Pro Gln Gln Ile Thr Pro Arg Met Met Cys
165 170 175
Val Gly Phe Leu Ser Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly
180 185 190
Gly Pro Leu Ser Ser Val Glu Ala Asp Gly Arg Ile Phe Gln Ala Gly
195 200 205
Val Val Ser Trp Gly Asp Gly Cys Ala Gln Arg Asn Lys Pro Gly Val

210 215 220
Tyr Thr Arg Leu Pro Leu Phe Arg Asp Trp Ile Lys Glu Asn Thr Gly
225 230 235 240

Val

<210> 28

<211> 255

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

Ser Leu Arg Tyr Asp Gly Ala His Leu Cys Gly Gly Ser Leu Leu Ser
20 25 30

Gly Asp Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Pro Glu Arg Asn Arg
35 40 45

Val Leu Ser Arg Trp Arg Val Phe Ala Gly Ala Val Ala Gln Ala Ser
50 55 60

Pro His Gly Leu Gln Leu Gly Val Gln Ala Val Val Tyr His Gly Gly
65 70 75 80

Tyr Leu Pro Phe Arg Asp Pro Asn Ser Glu Glu Asn Ser Asn Asp Ile
85 90 95

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

Pro Val Cys Leu Pro Ala Ala Gly Gln Ala Leu Val Asp Gly Lys Ile
115 120 125

Cys Thr Val Thr Gly Trp Gly Asn Thr Gln Tyr Tyr Gly Gln Gln Ala
130 135 140

Gly Val Leu Gln Glu Ala Arg Val Pro Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys
145 150 155 160

Asn Gly Ala Asp Phe Tyr Gly Asn Gln Ile Lys Pro Lys Met Phe Cys
165 170 175

Ala Gly Tyr Pro Glu Gly Gly Ile Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly
180 185 190

Gly Pro Phe Val Cys Glu Asp Ser Ile Ser Arg Thr Pro Arg Trp Arg

195 200 205

Leu Cys Gly Ile Val Ser Trp Gly Thr Gly Cys Ala Leu Ala Gln Lys

210 215 220

Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Asp Phe Arg Glu Trp Ile Phe Gln

225 230 235 240

Ala Ile Lys Thr His Ser Glu Ala Ser Gly Met Val Thr Gln Leu

245 250 255

<210> 29

<211> 253

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Ile Ile Gly Gly Glu Phe Thr Thr Ile Glu Asn Gln Pro Trp Phe Ala

1 5 10 15

Ala Ile Tyr Arg Arg His Arg Gly Gly Ser Val Thr Tyr Val Cys Gly

20 25 30

Gly Ser Leu Ile Ser Pro Cys Trp Val Ile Ser Ala Thr His Cys Phe

35 40 45

Ile Asp Tyr Pro Lys Lys Glu Asp Tyr Ile Val Tyr Leu Gly Arg Ser

50 55 60

Arg Leu Asn Ser Asn Thr Gln Gly Glu Met Lys Phe Glu Val Glu Asn

65 70 75 80

Leu Ile Leu His Lys Asp Tyr Ser Ala Asp Thr Leu Ala His His Asn

85 90 95

Asp Ile Ala Leu Leu Lys Ile Arg Ser Lys Glu Gly Arg Cys Ala Gln

100 105 110

Pro Ser Arg Thr Ile Gln Thr Ile Cys Leu Pro Ser Met Tyr Asn Asp

115 120 125

Pro Gln Phe Gly Thr Ser Cys Glu Ile Thr Gly Phe Gly Lys Glu Asn

130 135 140

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

145 150 155 160

Leu Ile Ser His Arg Glu Cys Gln Gln Pro His Tyr Tyr Gly Ser Glu

165 170 175

Val Thr Thr Lys Met Leu Cys Ala Ala Asp Pro Gln Trp Lys Thr Asp

180 185 190

Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Ser Leu Gln Gly

195 200 205

Arg Met Thr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Arg Gly Cys Ala Leu

210 215 220

Lys Asp Lys Pro Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser His Phe Leu Pro Trp

225 230 235 240

Ile Arg Ser His Thr Lys Glu Glu Asn Gly Leu Ala Leu

245 250

<210> 30

<211> 254

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val

1 5 10 15

Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn

20 25 30

Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn

35 40 45

Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His

50 55 60

Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser

65 70 75 80

Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu

85 90 95

His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro

100 105 110

Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu
115 120 125
Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu
130 135 140
Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln

145 150 155 160
Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe
165 170 175
Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser
180 185 190
Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly
195 200 205
Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val

210 215 220
Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg
225 230 235 240
Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
245 250

<210> 31
<211> 259
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 31
Ile Val Glu Gly Ser Asp Ala Glu Ile Gly Met Ser Pro Trp Gln Val
1 5 10 15

Met Leu Phe Arg Lys Ser Pro Gln Glu Leu Leu Cys Gly Ala Ser Leu
20 25 30
Ile Ser Asp Arg Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Leu Tyr Pro
35 40 45
Pro Trp Asp Lys Asn Phe Thr Glu Asn Asp Leu Leu Val Arg Ile Gly
50 55 60
Lys His Ser Arg Thr Arg Tyr Glu Arg Asn Ile Glu Lys Ile Ser Met

65 70 75 80

Leu Glu Lys Ile Tyr Ile His Pro Arg Tyr Asn Trp Arg Glu Asn Leu
85 90 95
Asp Arg Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Lys Lys Pro Val Ala Phe Ser
100 105 110
Asp Tyr Ile His Pro Val Cys Leu Pro Asp Arg Glu Thr Ala Ala Ser
115 120 125
Leu Leu Gln Ala Gly Tyr Lys Gly Arg Val Thr Gly Trp Gly Asn Leu
130 135 140

Lys Glu Thr Trp Thr Ala Asn Val Gly Lys Gly Gln Pro Ser Val Leu
145 150 155 160
Gln Val Val Asn Leu Pro Ile Val Glu Arg Pro Val Cys Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Arg Ile Arg Ile Thr Asp Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Lys Pro
180 185 190
Asp Glu Gly Lys Arg Gly Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro
195 200 205

Phe Val Met Lys Ser Pro Phe Asn Asn Arg Trp Tyr Gln Met Gly Ile
210 215 220
Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Asp Arg Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Tyr
225 230 235 240
Thr His Val Phe Arg Leu Lys Lys Trp Ile Gln Lys Val Ile Asp Gln
245 250 255
Phe Gly Glu

<210> 32
<211> 243
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 32
Val Val Gly Gly Leu Val Ala Leu Arg Gly Ala His Pro Tyr Ile Ala

1 5 10 15

Ala Leu Tyr Trp Gly His Ser Phe Cys Ala Gly Ser Leu Ile Ala Pro

20 25 30

Cys Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Gln Asp Arg Pro Ala Pro

35 40 45

Glu Asp Leu Thr Val Val Leu Gly Gln Glu Arg Arg Asn His Ser Cys

50 55 60

Glu Pro Cys Gln Thr Leu Ala Val Arg Ser Tyr Arg Leu His Glu Ala

65 70 75 80

Phe Ser Pro Val Ser Tyr Gln His Asp Leu Ala Leu Leu Arg Leu Gln

85 90 95

Glu Asp Ala Asp Gly Ser Cys Ala Leu Leu Ser Pro Tyr Val Gln Pro

100 105 110

Val Cys Leu Pro Ser Gly Ala Ala Arg Pro Ser Glu Thr Thr Leu Cys

115 120 125

Gln Val Ala Gly Trp Gly His Gln Phe Glu Gly Ala Glu Glu Tyr Ala

130 135 140

Ser Phe Leu Gln Glu Ala Gln Val Pro Phe Leu Ser Leu Glu Arg Cys

145 150 155 160

Ser Ala Pro Asp Val His Gly Ser Ser Ile Leu Pro Gly Met Leu Cys

165 170 175

Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Thr Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly

180 185 190

Gly Pro Leu Val Cys Glu Asp Gln Ala Ala Glu Arg Arg Leu Thr Leu

195 200 205

Gln Gly Ile Ile Ser Trp Gly Ser Gly Cys Gly Asp Arg Asn Lys Pro

210 215 220

Gly Val Tyr Thr Asp Val Ala Tyr Tyr Leu Ala Trp Ile Arg Glu His

225 230 235 240

Thr Val Ser

<210> 33

<211> 252

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

Ile Lys Gly Gly Leu Phe Ala Asp Ile Ala Ser His Pro Trp Gln Ala
1 5 10 15

Ala Ile Phe Ala Lys His Arg Arg Ser Pro Gly Glu Arg Phe Leu Cys
20 25 30

Gly Gly Ile Leu Ile Ser Ser Cys Trp Ile Leu Ser Ala Ala His Cys
35 40 45

Phe Gln Glu Arg Phe Pro Pro His His Leu Thr Val Ile Leu Gly Arg
50 55 60

Thr Tyr Arg Val Val Pro Gly Glu Glu Glu Gln Lys Phe Glu Val Glu
65 70 75 80

Lys Tyr Ile Val His Lys Glu Phe Asp Asp Asp Thr Tyr Asp Asn Asp
85 90 95

Ile Ala Leu Leu Gln Leu Lys Ser Asp Ser Ser Arg Cys Ala Gln Glu
100 105 110

Ser Ser Val Val Arg Thr Val Cys Leu Pro Pro Ala Asp Leu Gln Leu
115 120 125

Pro Asp Trp Thr Glu Cys Glu Leu Ser Gly Tyr Gly Lys His Glu Ala
130 135 140

Leu Ser Pro Phe Tyr Ser Glu Arg Leu Lys Glu Ala His Val Arg Leu
145 150 155 160

Tyr Pro Ser Ser Arg Cys Thr Ser Gln His Leu Leu Asn Arg Thr Val
165 170 175

Thr Asp Asn Met Leu Cys Ala Gly Asp Thr Arg Ser Gly Gly Pro Gln
180 185 190

Ala Asn Leu His Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val
195 200 205

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

210 215 220

Leu Gly Cys Gly Gln Lys Asp Val Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Thr

225 230 235 240

Asn Tyr Leu Asp Trp Ile Arg Asp Asn Met Arg Pro

245 250

<210> 34

<211> 51

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Cys Leu Ala Ser Asn Lys Val Gly Arg Cys Arg Gly Ser Phe Pro Arg

1 5 10 15

Trp Tyr Tyr Asp Pro Thr Glu Gln Ile Cys Lys Ser Phe Val Tyr Gly

20 25 30

Gly Cys Leu Gly Asn Lys Asn Asn Tyr Leu Arg Glu Glu Glu Cys Ile

35 40 45

Leu Ala Cys

50

<210> 35

<211> 51

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Cys Leu Val Ser Lys Val Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met Pro Arg

1 5 10 15

Trp Trp Tyr Asn Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val Tyr Gly

20 25 30

Gly Cys Asp Gly Asn Ser Asn Asn Tyr Leu Thr Lys Glu Glu Cys Leu

35 40 45

Lys Lys Cys

50

<210> 36

<211> 51

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Cys Val Asp Leu Pro Asp Thr Gly Leu Cys Lys Glu Ser Ile Pro Arg
1 5 10 15

Trp Tyr Tyr Asn Pro Phe Ser Glu His Cys Ala Arg Phe Thr Tyr Gly
20 25 30

Gly Cys Tyr Gly Asn Lys Asn Asn Phe Glu Glu Glu Gln Gln Cys Leu
35 40 45

Glu Ser Cys
50

<210> 37

<211> 51

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

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

Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile Tyr Gly
20 25 30

Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala Cys Met
35 40 45

Leu Arg Cys
50

<210> 38

<211> 51

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg
1 5 10 15

Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly
20 25 30

Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys
35 40 45

Lys Met Cys

50

<210> 39

<211> 51

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg

1 5 10 15

Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly

20 25 30

Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys

35 40 45

Asn Ile Cys

50

<210> 40

<211> 51

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg

1 5 10 15

Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser

20 25 30

Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu

35 40 45

Arg Ala Cys

50

<210> 41

<211> 51

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala Arg Ile Ile Arg
1 5 10 15

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

Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala Glu Asp Cys Met
35 40 45

Arg Thr Cys
50

<210> 42

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 42

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

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

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

Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Lys Trp Ala Trp Pro Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210

> 43

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 43

Asn Gly Thr Tyr Ile His

1 5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 44

Gly Phe Thr Phe Asn Gly Thr Tyr Ile His

1 5 10

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 45

Gly Gly Ile Tyr Pro Ala Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr

1 5 10

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 46

Lys Trp Trp Ala Trp Pro Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 47

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 47

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

Lys Gly