



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월09일
(11) 등록번호 10-1998492
(24) 등록일자 2019년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01) C07K 16/36 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/28 (2013.01)
A61K 39/395 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7012653(분할)
(22) 출원일자(국제) 2009년12월09일
심사청구일자 2017년06월01일
(85) 번역문제출일자 2017년05월10일
(65) 공개번호 10-2017-0056025
(43) 공개일자 2017년05월22일
(62) 원출원 특허 10-2011-7015836
원출원일자(국제) 2009년12월09일
심사청구일자 2014년12월09일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2009/066755
(87) 국제공개번호 WO 2010/066803
국제공개일자 2010년06월17일
(30) 우선권주장
PA 2008 01744 2008년12월09일 덴마크(DK)
61/201,335 2008년12월09일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
WO2003029295 A1*
WO1998040408 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
젠렘 에이/에스
덴마크 1560 코펜하겐 브이 칼베보드 브뤼게 43
(72) 발명자
베르플로에젠, 산드라
네덜란드 엔엘-3431 프로프 디알 헤셀란 19
사틴, 데이빗, 피., 이.
네덜란드 엔엘-3438 엠디 니우웨가인 와이데호에
베 11
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 조직 인자에 대한 인간 항체

(57) 요약

인간 TF에 결합하는 단리된 인간 모노클로날 항체 및 관련 항체-기반 조성물 및 분자가 개시된다. 또한, 항체를 포함하는 제약 조성물, 및 항체를 사용하는 치료 및 진단 방법이 개시된다.

대표도

시열의 정렬

본 발명의 목적의 시열을 아래에 제시한다.
시열 번호는 시열의 우측에 괄호 내에 나열된다.
Name에 따른 CDR1, CDR2 및 CDR3은 강조되고; 이별릭 시열은 CDR1을 나타내고, 밑줄친 시열은 CDR2를 나타내고, 굵은 시열은 CDR3을 나타낸다.

VH: (-----CDR3-----)
EVQLQSGAEVKKPSQSLISCRQSGGGTGGGHWVQAFKGLKAWVSIIGDGGTTFYDSVKQFTISDRNSRNTLQNGSLAEETAVTTAAAGG-----YFLEGGQGLTVPS VHL15-
013 (11)
QVQLVSSGQVVKPSKSLSCAASTGGTGGGHWVQAFKGLKAWVSIIGDGGTTFYDSVKQFTISDRNSRNTLQNGSLAEETAVTTAAAGG-----YFLEGGQGLTVPS VHL15-
114 (5)
EVQLSSGGLVQPSKSLSCAASTGGTGGGHWVQAFKGLKAWVSIIGDGGTTFYDSVKQFTISDRNSRNTLQNGSLAEETAVTTAAAGG-----YFLEGGQGLTVPS VHL15-
013 (9)
EVQLSSGGLVQPSKSLSCAASTGGTGGGHWVQAFKGLKAWVSIIGDGGTTFYDSVKQFTISDRNSRNTLQNGSLAEETAVTTAAAGG-----YFLEGGQGLTVPS VHL15-
017 (13)
EVQLSSGGLVQPSKSLSCAASTGGTGGGHWVQAFKGLKAWVSIIGDGGTTFYDSVKQFTISDRNSRNTLQNGSLAEETAVTTAAAGG-----YFLEGGQGLTVPS VHL15-
012 (17)
EVQLSSGGLVQPSKSLSCAASTGGTGGGHWVQAFKGLKAWVSIIGDGGTTFYDSVKQFTISDRNSRNTLQNGSLAEETAVTTAAAGG-----YFLEGGQGLTVPS VHL15-
012 (21)
EVQLSSGGLVQPSKSLSCAASTGGTGGGHWVQAFKGLKAWVSIIGDGGTTFYDSVKQFTISDRNSRNTLQNGSLAEETAVTTAAAGG-----YFLEGGQGLTVPS VHL15-
101 (25)
QVQLVSSGAEVKKPSQSLISCRQSGGGTGGGHWVQAFKGLKAWVSIIGDGGTTFYDSVKQFTISDRNSRNTLQNGSLAEETAVTTAAAGG-----YFLEGGQGLTVPS VHL15-
003 (29)
QVQLVSSGQVVKPSKSLSCAASTGGTGGGHWVQAFKGLKAWVSIIGDGGTTFYDSVKQFTISDRNSRNTLQNGSLAEETAVTTAAAGG-----YFLEGGQGLTVPS VHL15-
025 (33)
QVQLVSSGQVVKPSKSLSCAASTGGTGGGHWVQAFKGLKAWVSIIGDGGTTFYDSVKQFTISDRNSRNTLQNGSLAEETAVTTAAAGG-----YFLEGGQGLTVPS VHL15-
109 (37)

(52) CPC특허분류

A61K 39/39533 (2013.01)

C07K 14/81 (2013.01)

C07K 16/36 (2013.01)

(72) 발명자

호엣, 레네, 엠., 에이

네덜란드 엔엘-3705 티비 자이스트 에겔린글란 45

파렌, 폴

네덜란드 엔엘-3984 피알 오딕 웨르도르페르워드 17

반 데 원켈, 잔

네덜란드 엔엘-3707 씨케이 자이스트 베르렌데 슬로틀란 80

브라인홀트, 비베케, 밀러

덴마크 디케이-2000 프레데릭스버그 부엔 8

에른루쓰, 에바

덴마크 디케이-2840 홀데 반게보베즈 20

마드스가르트, 올레

덴마크 디케이-2900 헬러웁 투보르그 선드파크 10

빙크, 톰

네덜란드 엔엘-2406 디비 알펜 안 덴 린 슈엠피만스트라트 25

블리커, 윌렘, 카렐

네덜란드 엔엘-1017 이브이 암스테르담 카이저스그라트 704

후트캄프, 미스차

네덜란드 엔엘-3991 제이지 후텐 로마이넨포르트 36

우드슈룬, 마로에스카

네덜란드 엔엘-3584 씨엠 우트렉트 알레란 60

데 중, 로브, 엔.

네덜란드 엔엘-3524 지엠 우트렉트 심플론반 110

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 34, 35 및 36의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 90, 91 및 92의 CDR1, CDR2 및 CDR3 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는, 인간 조직 인자에 결합하는 인간 항체.

청구항 2

제1항에 있어서,

조직 인자(TF)의 세포외 도메인에 0.50 nM 이하의 겔보기 친화도(EC_{50})로 결합하는 것,

조직 인자를 코딩하는 구축물로 형질감염된 A431 세포에 8 nM 이하의 겔보기 친화도(EC_{50})로 결합하는 것,

A431 세포에서 항체-의존성 세포성 세포독성을 유도할 수 있는 것,

확립된 MDA-MB-231 종양의 성장을 억제하고/하거나 확립된 BxPC3 종양의 성장을 억제하는데 효과적인 것,

조직 인자 유도된 혈액 응고를 10 nM 미만의 억제 농도 중앙값으로 억제하는 것,

MDA-MB-231 세포에 의한 FVIIa-유도 IL-8 방출을 40% 초과 억제의 최대 억제값으로 억제하는 것,

TF/FVIIa 복합체에 의한 FX의 FXa로의 전환을 1 내지 30% 범위로 억제하는 것,

C3c 및 C4c 침착을 유도할 수 있는 것,

인간 조직 인자에는 결합하지만 뮤린 조직 인자에는 결합하지 않고, 마우스 서열로 대체된 아미노산 85-122를 제외하고 조직 인자(TF)에 대한 인간 서열을 함유하는 서플 구축물 85-122 mm에 대해 인간 TF에 대한 결합에 비해 감소된 결합을 나타내는 것,

조직 인자에 대해 5 nM 미만의 친화도를 갖는 것,

확립된 BX-PC3 종양의 성장을 억제하는데 효과적인 것, 및

증식 억제, 종양 혈관신생의 억제, 종양 세포의 아포토시스 유도 및 선택적으로 스플라이싱된 조직 인자에 대한 결합 중 하나 이상의 특성

으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 특성을 갖는 항체.

청구항 3

제1항에 있어서, 서열번호 33의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열번호 89의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 전장 항체 또는 IgG1 항체인 항체.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 다른 모이어티에 접합된 항체.

청구항 6

제5항에 있어서, 다른 모이어티가 세포독성 모이어티, 방사성 동위원소 또는 약물인 항체.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 이펙터(effector) 기능-결여 항체인 항체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 이펙터 기능-결여 항-조직 인자 항체가 안정화된 인간 IgG4 항체인 항체.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 이펙터 기능-결여 항-조직 인자 항체가 인간 IgG4의 중쇄 불변 영역의 409번 위치의 아르기닌이 리신, 트레오닌, 메티오닌 또는 류신으로 치환되고/되거나 힌지 영역이 Cys-Pro-Pro-Cys 서열을 포함하는 항체인 항체.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 일가(monovalent)인 항체.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 일가 항체가

i) 상기 일가 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구축물을 제공하는 단계로서, 여기서 상기 구축물은 선택된 항원 특이적 항-TF 항체의 VL 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 Ig의 불변 CL 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 선택된 항원 특이적 항체의 VL 영역을 코딩하는 상기 뉴클레오티드 서열 및 Ig의 CL 영역을 코딩하는 상기 뉴클레오티드 서열은 함께 작동가능하게 연결되고, IgG1 아형의 경우, CL 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은, CL 영역이, 폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에 또는 동물 또는 인간에 투여될 때 CL 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와 디설피드 결합 또는 공유 결합을 형성할 수 있는 임의의 아미노산을 포함하지 않도록 변형된 것인 단계;

ii) 상기 일가 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구축물을 제공하는 단계로서, 여기서 상기 구축물은 선택된 항원 특이적 항체의 VH 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 인간 Ig의 불변 CH 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, CH 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은, 힌지 영역에 대응하는 영역, 및 CH 영역의 다른 영역이, 폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에 또는 동물 또는 인간에 투여될 때 인간 Ig의 CH 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와 디설피드 결합 또는 공유 또는 안정한 비-공유 중쇄간 결합의 형성에 참여하는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형된 것이고, 선택된 항원 특이적 항체의 VH 영역을 코딩하는 상기 뉴클레오티드 서열 및 상기 Ig의 CH 영역을 코딩하는 상기 뉴클레오티드 서열은 함께 작동가능하게 연결된 것인 단계;

iii) 상기 일가 항체를 생산하기 위한 세포 발현 시스템을 제공하는 단계;

iv) 상기 i) 및 ii) 단계의 핵산 구축물을 iii) 단계의 세포 발현 시스템의 세포에서 동시 발현시킴으로써 상기 일가 항체를 생산하는 단계

를 포함하는 방법에 의해 구축된 것인 항체.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 일가 항체가

(i) 제10항의 항체의 가변 영역 또는 상기 영역의 항원 결합 부분; 및

(ii) 면역글로불린 또는 그의 단편의 C_H2 및 C_H3 영역을 포함하는 C_H 영역이며, 여기서 C_H 영역 또는 그의 단편이 힌지 영역에 상응하도록 변형되고, 면역글로불린이 IgG4 아형이 아닌 경우, C_H 영역의 다른 영역은 폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에서 동일한 C_H 영역과 디설피드 결합을 형성하거나 또는 동일한 C_H 영역과 다른 공유 또는 안정한 비공유 중쇄간 결합을 형성할 수 있는 아미노산 잔기를 포함하지 않는 C_H 영역

을 포함하는 것인 항체.

청구항 13

제10항에 있어서, 힌지 전체가 결실되도록 중쇄가 변형된 항체.

청구항 14

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 및 제2 결합 특이성을 포함하는 이중특이적(bispecific) 분자.

청구항 15

제14항에 있어서, 제2 결합 특이성이 인간 이펙터 세포, 인간 Fc 수용체 또는 T 세포 수용체에 대한 결합 특이성인 이중특이적 분자.

청구항 16

서열번호 33 내지 36으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터.

청구항 17

제16항에 있어서, 인간 항체의 경쇄, 중쇄, 또는 경쇄 및 중쇄 양자 모두의 불변 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하는 발현 벡터.

청구항 18

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 항체를 생산하는 재조합 진핵 또는 원핵 숙주 세포.

청구항 19

- 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체를 생산하는 재조합 진핵 또는 원핵 숙주 세포를 배양하는 단계; 및
- 배양 배지로부터 항체를 정제하는 단계

를 포함하는, 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체의 제조 방법.

청구항 20

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 정의된 항체를 포함하는 암 진단용 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 암이 중추 신경계 종양, 두경부암, 폐암, 유방암, 식도암, 위암, 간 및 담도암, 췌장암, 결장직장암, 방광암, 신장암, 전립선암, 자궁내막암, 난소암, 악성 흑색종, 육종, 원발 부위 미상의 종양, 골수암, 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병 및 비-호지킨(Hodgkin) 림프종, 피부암, 신경아교종, 뇌, 자궁 및 직장의 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 22

샘플을 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 또는 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 및 제2 결합 특이성을 포함하는 이중특이적 분자와, 상기 항체 또는 이중특이적 분자와 조직 인자 간에 복합체가 형성되도록 하는 조건 하에서 접촉시키는 단계; 및

복합체가 형성되었는지 분석하는 단계

를 포함하는, 샘플에서 조직 인자의 존재를 검출하는 방법.

청구항 23

- 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 또는 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 항체 및 제2 결합 특이성을 포함하는 이중특이적 분자; 및

- 키트 사용을 위한 지시서

를 포함하는, 샘플에서 조직 인자의 존재를 검출하기 위한 키트.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 조직 인자, 특히 인간 조직 인자에 대한 항체 및 그러한 항체의 용도, 특히 암, 염증 및 혈관 질병의 치료에서 그들의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 조직 인자 (TF) (트롬보플라스틴, 인자 III 또는 CD142로도 불림)는 효소원 프로트롬빈으로부터 트롬빈 형성의 개시에 필요한 내피하 조직, 혈소판 및 백혈구 내에 존재하는 단백질이다. 트롬빈 형성은 궁극적으로 혈액의 응고를 일으킨다. 조직 인자는 세포가 혈액 응고 캐스케이드를 개시하도록 하고, 응고 인자 VII에 대한 고친화도 수용체로서 기능을 한다. 생성되는 복합체는 특이적 제한 단백질분해에 의한 응고 프로테아제 캐스케이드의 개시를 담당하는 촉매 사건을 제공한다. 비기능적 전구체로서 순환하는 이들 프로테아제 캐스케이드의 다른 보조인자와는 달리, 상기 인자는 세포 표면 상에서 발현될 때 완전히 기능적인 강력한 개시자이다.

[0003] 조직 인자는 세린 프로테아제 인자 VIIa (FVIIa)에 대한 세포 표면 수용체이다. 조직 인자에 대한 FVIIa 결합은 세포 내에서 신호전달 과정을 출발시키는 것으로 밝혀졌고, 상기 신호전달 기능은 혈관신생에 일정 역할을 한다. 혈관신생은 성장 및 발생에서 및 상처 치유에서 정상적인 과정이지만, 또한 잠복 상태에서 악성 상태로의 종양의 이행에서 근본 단계이고: 암세포가 혈관신생에 참여하는 단백질, 소위 혈관신생성 성장 인자를 생산하는 능력을 획득할 때, 이들 단백질은 종양에 의해 근처 조직 내로 방출되고, 새로운 혈관이 기존의 건강한 혈관으로부터 종양을 향해 그 내부로 발아하도록 자극한다. 일단 새로운 혈관이 종양으로 들어오면 급속하게 그의 크기를 팽창시키고 국소 조직 및 장기에 침입할 수 있다. 새로운 혈관을 통해, 암 세포는 추가로 순환계 내로 탈출하고 다른 장기에 정박하여 새로운 종양을 형성할 수 있다 (전이).

[0004] 추가로 TF는 염증에서 일정 역할을 한다. TF의 역할은 혈액 응고에 의해 매개되는 것으로 추정된다 (A. J. Chu: "Tissue factor mediates inflammation" in Archives of biochemistry and biophysics, 2005, vol. 440,

No. 2, pp. 123-132). 따라서, 예를 들어, 모노클로날 항-TF 항체에 의한 TF의 억제에는 소염뿐만 아니라 혈관 질병에 기여하는 응고-염증 사이클을 차단하는데 중요하다.

- [0005] TF 발현은 많은 종류의 암에서 관찰되고, 보다 공격적인 질병과 연관된다. 추가로, 인간 TF는 가용형의 선택적으로 스플라이싱된 (alternatively spliced) 형태인 asHTF로서 존재한다. 최근에 asHTF는 종양 성장을 촉진하는 것으로 밝혀졌다 (Hobbs et al. 2007 Thrombosis Res. 120(2) S13-S21).
- [0006] TF에 결합하는 항체는 선행 기술에 개시되어 있다:
- [0007] W098/40408에서는 인자 X가 TF 또는 상기 복합체에 결합하는 것을 효과적으로 방지하여, 혈액 응고를 감소시키는, 단독으로 또는 TF:VIIa 복합체로 존재하는, 천연 인간 TF에 결합할 수 있는 항체를 개시하고 있다. 항체가 동맥 또는 심장 수술과 같은 침습적 의학적 절차 이후 혈전증을 경감시키기 위해 또는 의학적 도구의 사용으로 인한 혈액 응고를 제거하기 위해 사용될 수 있음이 개시되어 있다. 천연 인간 TF의 생체내 진단 영상화를 포함한 생체내 진단 방법에서 사용될 추가의 항체가 개시되어 있다.
- [0008] W004/094475에서는 정상 혈장 대조군에 비해 인자 매개된 혈액 응고를 억제하지 않는, 인간 조직 인자에 결합할 수 있는 항체를 제공한다. 인간 항체는 설명되지 않는다. 항체는 암의 치료를 위해 사용될 수 있는 것으로 주장된다.
- [0009] W003/093422는 TF 단독보다 더 큰 친화도로 TF:VIIa 복합체에 결합하는 항체에 관한 것이다. 특정 질병, 예를 들어 폐혈증, 파종 혈관내 응고, 허혈성 뇌졸중, 혈전증, 급성 관상 증후군 및 진행암에서 응고병증의 치료에서 항응고제로서 항체의 용도가 제안된다.
- [0010] W001/27079에서는 비정상적인 세포 증식, 특히 내피 세포 증식, 예를 들어 암, 배아의 비정상적인 발생, 면역 반응의 기능장애, 및 신생혈관형성 및 종양 성장에 관련한 혈관신생을 억제하기 위한 조성물 및 방법을 개시하고 있다. 항체를 비롯한 많은 활성 물질이 제안되었지만, 특이적 항체는 개시되지 않았다.
- [0011] W003/037361은 아포토시스에 관련된 치료를 위한 TF 효능제 또는 길항제의 용도에 관한 것이다.
- [0012] W003/029295는 응고 인자 VIIa의 결합을 억제하기 위해 인간 TF와 면역반응하는 단리된 인간 항체에 관한 것이다. 그러나, 상기 출원은 이들 특성을 갖는 항체의 단일 예를 개시하지 않는다.
- [0013] 상이한 종양 종류를 치료하기 위해 많은 모노클로날 항체 요법, 예를 들어 베바시주맵 (아바스틴 (Avastin)®), 세툽시맵 (에르비투스 (Erbix)®), 파니투무맵 (벡티비스 (Vectibix)™) 및 트라스투주맵 (헤르셉틴 (Herceptin)®)이 승인되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] **발명의 개요**
- [0015] 많은 진전이 이루어졌지만, 치료 항체에 기초하여 심각한 질병을 치료하는 개선된 방법, 예를 들어 개선된 암의 치료법이 필요하다.
- [0016] 본 발명의 목적은 의학 용도를 위해 신규한, 고도로 특이적이고 효과적인 인간 항-TF 항체를 제공하는 것이다. 본 발명의 항체는 당업계에 설명된 항체와 상이한 TF 결합 특징을 나타낸다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 인간 조직 인자에 대해 높은 친화도를 갖고, 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 매개하고, TF에 대한 FVIIa 결합을 억제하고, FVIIa-유도된 ERK 인산화 및 IL8 방출을 억제하고, 응고를 억제하지 않거나 불량하게 억제한다.

과제의 해결 수단

- [0017] 정의
- [0018] 용어 "조직 인자", "TF", "CD142", "조직 인자 항원", "TF 항원" 및 "CD142 항원"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 달리 명시하지 않으면 세포에 의해 자연적으로 발현되거나 조직 인자 유전자로 형질감염된 세포 상에서 발현되는 인간 조직 인자의 임의의 변이체, 이소형 및 중 상동체를 포함한다.
- [0019] 용어 "면역글로불린"은 4개 모두가 디설피드 결합에 의해 상호연결될 수 있는 한 쌍의 저분자량 경쇄 (L) 및 한

쌍의 중쇄 (H)의 2쌍의 폴리펩티드 사슬로 구성되는 구조상 관련된 당단백질의 클래스를 나타낸다. 면역글로불린의 구조는 특징이 잘 결정되어 있다 (예를 들어 Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989) 참조). 간단히 설명하면, 각각의 중쇄는 대개 중쇄 가변 영역 (본원에서 V_H 또는 VH 로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 대개 3개의 도메인 C_{H1} , C_{H2} 및 C_{H3} 으로 구성된다. 각각의 경쇄는 대개 경쇄 가변 영역 (본원에서 V_L 또는 VL 로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 대개 1개의 도메인 C_L 로 구성된다. V_H 및 V_L 영역은 상보성 결정 영역 (CDR)으로도 불리는 초가변 영역 (또는 서열이 초가변성이고/이거나 구조적으로 규정된 루프를 형성할 수 있는 초가변 영역)으로 추가로 세분될 수 있고, 이들 영역에는 프레임워크 (framework) 영역 (FR)으로 불리는 보다 보존된 영역이 산재되어 있다. 각각의 V_H 및 V_L 은 대개 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되고, 이들은 아미노-말단에서 카르복시-말단으로 다음 순서로 배열되어 있다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (또한, 문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)] 참조). 일반적으로, 상기 영역 내에서 아미노산 잔기의 넘버링은 문헌에 따른다 [IMGT., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] (카바트 (Kabat)에서와 같은 또는 카바트에 따른 가변 도메인 잔기 넘버링과 같은 문구는 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대한 상기 넘버링 시스템을 의미한다). 상기 넘버링 시스템을 사용하여, 펩티드의 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축, 또는 그 내부로의 삽입에 대응하는 보다 적은 아미노산 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 V_H CDR2의 잔기 52 다음의 단일 아미노산 삽입체 (카바트에 따른 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 다음의 삽입 잔기 (예를 들어, 카바트에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 항체 서열을 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 상동성 영역에서 정렬함으로써 제시된 항체에 대해 결정될 수 있다.

[0020]

본 발명의 문맥에서 용어 "항체" (Ab)는 면역글로불린 분자, 면역글로불린 분자의 단편, 또는 이들의 유도체를 지칭하고, 이는 전형적인 생리학적 조건 하에 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 1시간, 적어도 약 2시간, 적어도 약 4시간, 적어도 약 8시간, 적어도 약 12시간, 약 24시간 또는 그 초과, 약 48시간 또는 그 초과, 약 3, 4, 5, 6, 7일 또는 그 초과 등과 같은 충분한 기간의 시간, 또는 임의의 기타 관련된 기능적으로 정의된 기간 (예를 들어, 항원에 대한 항체 결합과 관련된 생리학적 응답을 유도하고/하거나, 촉진하고/하거나, 증강시키고/시키거나 조정하는데 충분한 시간 및/또는 효과기 활성을 동원하는데 충분한 시간) 동안 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 갖는다. 면역글로불린 분자의 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체 (Ab)의 불변 영역은 면역글로불린이 면역계의 다양한 세포 (예컨대 효과기 세포) 및 보체계의 성분, 예를 들어 고전적인 보체 활성화 경로의 제1 성분 (C1q)이 포함되는 숙주 조직 또는 인자에 결합하는 것을 매개할 수 있다. 항-TF 항체는 이중특이적 항체, 디아바디 (diabody), 또는 유사 분자일 수 있다 (디아바디의 설명에 대해서는, 예를 들어 문헌 [PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993)] 참조). 실제로, 본 발명에 의해 제공되는 이중특이적 항체, 디아바디 등은 조직 인자 또는 조직 인자 FVIIa 복합체의 일부에 더하여 임의의 적합한 표적에 결합할 수 있다. 상기 나타낸 바와 같이, 본원에서 용어 항체는 달리 언급되거나 문맥적으로 명백하게 모순되지 않는 한, 항원에 특이적으로 결합하는 능력이 유지된 항체의 단편을 포함한다. 항체의 항원-결합 기능이 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 나타났다. 용어 "항체" 내에 포함되는 결합 단편의 예로는 하기의 것들이 포함된다: (i) V_L , V_H , C_L 및 C_{H1} 도메인으로 구성된 1가 단편인 Fab' 또는 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디설피드 다리에 의해 연결된 두 개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 $F(ab')_2$ 단편; (iii) V_H 및 C_{H1} 도메인으로 본질적으로 구성된 Fd 단편; (iv) V_L 및 V_H 도메인으로 본질적으로 구성된 Fv 단편; (v) V_H 도메인으로 본질적으로 구성되고 도메인 항체 (Holt et al., Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90)로도 불리는 dAb 단편 (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)); (vi) 카멜리드 (camelid) 또는 나노바디 (nanobody) (Revets et al., Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24) 및 (vii) 단리된 상보성 결정 영역 (CDR). 또한, Fv 단편의 두 도메인인 V_L 및 V_H 가 별개의 유전자에 의해 코딩되더라도, 재조합 방법을 사용하여, V_L 및 V_H 영역이 쌍을 이루어 1가 분자 (단일쇄 항체 또는 단일쇄 Fv (scFv)로 공지됨)를 형성하는 단일 단백질 사슬로 만들어지도록 할 수 있는 합성 링커에 의해 두 도메인을 연결할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)] 및 [Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)] 참조). 이와 같은 단일쇄 항체는 달리 언급되거나 문맥적으로 명백하게 지시되지 않는 한, 용어 항체 내에 포함된다. 상기 단편이 항체의 의미 내에 일반적으로 포함되지만, 이는 총괄적으로, 그리고 각각 독립적으로, 상이한 생물학적 특

성 및 용도를 나타내는 본 발명의 독특한 특징이다. 본 발명의 문맥 내의 상기 및 기타 유용한 항체 단편이 본원에서 추가로 논의된다. 달리 나타내지 않으면, 용어 항체에는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 (mAb), 항체-유사 폴리펩티드, 예컨대 키메라 항체 및 인간화 항체, 및 임의의 공지의 기술, 예를 들어 효소적 절단, 펩티드 합성, 및 재조합 기술에 의해 제공되는, 항원에 특이적으로 결합하는 능력이 유지된 항체 단편 (항원-결합 단편)이 또한 일반적으로 포함된다는 것을 이해하여야 한다. 생성된 항체는 임의의 이소형을 지닐 수 있다.

[0021] "항-TF 항체"는 항원 조직 인자에 특이적으로 결합하는 상기 설명된 바와 같은 항체이다.

[0022] 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하도록 의도된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관 내에서 또는 유전자 재배열 동안 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이 유발에 의해 또는 생체 내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 마우스와 같은 또 다른 포유동물 종의 생식계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그래프팅된 항체를 포함하도록 의도되지 않는다.

[0023] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 단리된다. 본원에 사용된 용어 "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 지칭하도록 의도된다 (예를 들어, 조직 인자에 특이적으로 결합하는 단리된 항체에는 조직 인자 이외의 다른 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없다). 그러나, 인간 조직 인자의 에피토프, 이소형 또는 변이체에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 다른 관련 항원, 예를 들어, 다른 종으로부터의 항원 (예컨대 조직 인자 종 상동체)에 대해 교차 반응성을 가질 수 있다. 또한, 단리된 항체에는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 상이한 항원-결합 특이성을 갖는 2 이상의 "단리된" 모노클로날 항체가 잘 정의된 조성으로 조합된다.

[0024] 2개 이상의 항체의 문맥에서 본원에서 사용될 때, 용어 "와 경쟁하다" 또는 "와 교차 경쟁하다"는 2개 이상의 항체가 TF에 대한 결합에 대해 경쟁, 예를 들어 본원의 실시예 6에서 설명되는 검정에서 TF 결합에 대해 경쟁함을 나타낸다. 몇몇 쌍의 항체에서, 실시예 6의 검정에서의 경쟁은 하나의 항체가 플레이트에 코팅되고 다른 항체는 경쟁을 위해 사용되거나 그 반대로 적용될 경우에만 관찰된다. 또한, 본원에서 사용될 때, 용어 "와 경쟁하다"는 상기 항체의 조합을 포함하는 것으로 의도된다.

[0025] 본원에 사용될 때, 용어 "모노클로날 항체" 또는 "모노클로날 항체 조성물"은 단일 분자 조성의 항체 분자의 제제를 지칭한다. 모노클로날 항체 조성물은 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 보인다. 따라서, 용어 "인간 모노클로날 항체"는 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는, 단일 결합 특이성을 나타내는 항체를 말한다. 인간 모노클로날 항체는 불멸화 세포에 융합된, 인간 중쇄 도입 유전자 및 경쇄 도입유전자를 포함하는 게놈을 갖는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모조멀 (transchromosomal) 비-인간 동물, 예컨대 트랜스제닉 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생성될 수 있다.

[0026] 본원에서 사용되는 바와 같이, 소정의 항원에 대한 항체의 결합이라는 맥락에서 용어 "결합"은 일반적으로 예를 들어 항원을 리간드로, 항체를 분석물로 사용하여 BIAcore 3000 기기에서 표면 플라즈몬 공명 (SPR) 기술에 의해 결정하는 경우 약 10^{-7} M 이하, 예컨대 약 10^{-8} M 이하, 예컨대 약 10^{-9} M 이하, 약 10^{-10} M 이하, 또는 약 10^{-11} M 이하의 K_D 에 상응하는 친화도의 결합이고, 소정의 항원 또는 밀접하게 관련된 항원 이외의 비-특이적 항원 (예를 들어, BSA, 카제인)에 대한 그의 결합 친화도보다 10배 이상 낮은, 예컨대 100배 이상 낮은, 예를 들어 1,000배 이상 낮은, 예컨대 10,000배 이상 낮은, 예컨대 100,000배 이상 낮은 K_D 에 상응하는 친화도로 소정의 항원에 결합한다. 친화도가 더 낮은 양은 항체의 K_D 에 의존적이기 때문에, 항체의 K_D 가 매우 낮으면 (즉, 항체가 고도로 특이적이면), 항원에 대한 친화도가 비-특이적 항원에 대한 친화도보다 더 낮은 양은 10,000배 이상일 수 있다.

[0027] 본원에 사용된 용어 " k_d " (sec^{-1})는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 속도 상수를 지칭한다. 상기 값은 k_{off} 값으로도 지칭된다.

[0028] 본원에 사용된 용어 " k_a " ($\text{M}^{-1} \times \text{sec}^{-1}$)는 특정 항체-항원 상호작용의 회합 속도 상수를 지칭한다.

[0029] 본원에 사용된 용어 " K_D " (M)는 특정 항체-항원 상호작용의 해리 평형 상수를 지칭한다.

- [0030] 본원에 사용된 용어 " K_A " (M^{-1})는 특정 항체-항원 상호작용의 회합 평형 상수를 지칭하고, k_d 를 k_d 로 나누어 수득된다.
- [0031] 또한, 본 발명은 예시된 항체의 V_L 영역, V_H 영역, 또는 하나 이상의 CDR의 기능적 변이체를 포함하는 항체를 제공한다. 항-TF 항체에 대해 사용되는 V_L , V_H , 또는 CDR의 기능적 변이체는 항체가 모 항체의 친화도/결합력 (avidity) 및/또는 특이성/선택성의 적어도 실질적인 비율 (적어도 약 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 초과)을 계속 보유할 수 있도록 하고, 일부 경우에 상기 항-TF 항체는 모 항체보다 더 큰 친화도, 선택성 및/또는 특이성과 연관될 수 있다.
- [0032] 상기 기능적 변이체는 일반적으로 모 항체에 대한 유의한 서열 동일성을 보유한다. 두 서열 간의 동일성 %는 두 서열의 최적 정렬을 위해 도입될 필요가 있는 갭 (gap)의 수 및 각각의 갭의 길이를 고려하여 서열에 의해 공유되는 동일한 위치의 수의 함수이다 (즉, % 상동성 = [동일한 위치의 #/위치의 총 #] x 100). 서열의 비교 및 두 서열 간의 동일성 %의 결정은 하기 비제한적인 예에 기재된 바와 같이 수학적 알고리즘을 이용하여 달성할 수 있다.
- [0033] 두 뉴클레오타이드 서열 간의 동일성 %는 NWSgapdna CMP 매트릭스 및 40, 50, 60, 70 또는 80의 갭 가중치, 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지 (<http://www.gcg.com>에서 이용가능함) 중의 GAP 프로그램으로 결정할 수 있다. 또한, 두 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 간의 동일성 %는 PAM120 가중치 잔기표, 12의 갭 길이 페널티 및 4의 갭 페널티를 사용하여, ALIGN 프로그램 (버전 2.0)에 포함된 마이어스 및 밀러의 알고리즘 (E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4:11-17 (1988))으로 결정할 수도 있다. 또한, 두 아미노산 서열 간의 동일성 %는 Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스, 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 가중치, 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 가중치를 사용하여, GCG 소프트웨어 패키지 (<http://www.gcg.com>에서 이용가능함) 중의 GAP 프로그램 내에 포함된 니들만 및 분쉬 (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)) 알고리즘으로 결정할 수 있다.
- [0034] CDR 변이체의 서열은 대부분 보존적 치환을 통해 모 항체 서열의 CDR 서열과 상이할 수 있고; 예를 들어 변이체 내의 적어도 약 35%, 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상 (예를 들어, 약 65-99%, 예를 들어 약 96%, 97% 또는 98%)의 치환이 보존적 아미노산 잔기 대체이다.
- [0035] CDR 변이체의 서열은 대부분 보존적 치환을 통해 모 항체 서열의 CDR 서열과 상이할 수 있고; 예를 들어 변이체 내의 적어도 10, 예를 들어 적어도 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 치환이 보존적 아미노산 잔기 대체이다.
- [0036] 본 발명의 측면에서, 보존적 치환은 다음 3개의 표 중의 하나 이상에서 반영되는 아미노산의 클래스 내에서의 치환에 의해 정의될 수 있다:
- [0037] 보존적 치환을 위한 아미노산 잔기 클래스

산성 잔기	Asp (D) 및 Glu (E)
염기성 잔기	Lys (K), Arg (R), 및 His (H)
친수성 비하전 잔기	Ser (S), Thr (T), Asn (N), 및 Gln (Q)
지방족 비하전 잔기	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), 및 Ile (I)
비극성 비하전 잔기	Cys (C), Met (M), 및 Pro (P)
방향족 잔기	Phe (F), Tyr (Y), 및 Trp (W)

[0038]

[0039] 다른 보존적 아미노산 잔기 치환 클래스

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

[0040]

[0041] 아미노산 잔기의 다른 물리적 및 기능적 분류

알콜기 함유 잔기	S 및 T
지방족 잔기	I, L, V, 및 M
시클로알케닐-회합 잔기	F, H, W, 및 Y
소수성 잔기	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, 및 Y
음하전 잔기	D 및 E
극성 잔기	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 및 T
양하전 잔기	H, K, 및 R
작은 잔기	A, C, D, G, N, P, S, T, 및 V
매우 작은 잔기	A, G, 및 S
턴(turn) 형성에 관련되는 잔기	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, 및 T
가요성 잔기	Q, T, K, S, G, P, D, E, 및 R

[0042]

[0043] 보다 보존적 치환군은 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린, 및 아스파라긴-글루타민을 포함한다.

[0044] 또한, 추가의 아미노산 기는 예를 들어 문헌 [Creighton (1984) Proteins: Structure and Molecular Properties (2d Ed. 1993), W. H. Freeman and Company]에 기재된 원칙을 사용하여 제조할 수 있다.

[0045] 본 발명의 하나의 실시양태에서, 친수도 (hydropathic)/친수성 특성 및 잔기 중량/크기의 측면에서의 보존은 예시된 항체의 CDR에 비해 변이체 CDR에서 또한 실질적으로 보유된다 (예를 들어, 서열의 중량 클래스, 친수도 스코어, 또는 둘 모두는 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 그 초과 (예를 들어, 약 65-99%)로 보유된다). 예를 들어, 보존적 잔기 치환은 또한 또는 별법으로 당업계에 공지된 강 또는 약 중량 (strong or weak based weight)에 기초한 보존기의 대체를 기초로 할 수 있다.

[0046] 유사한 잔기의 보유는 또한 또는 별법으로 BLAST 프로그램 (예를 들어, 표준 설정 BLOSUM62, 개방 갭 = 11 및 연장된 갭 = 1을 사용하여 NCBI를 통해 입수가 가능한 BLAST 2.2.8)의 사용에 의해 결정되는 유사성 스코어에 의해 측정될 수 있다. 적합한 변이체는 일반적으로 모 펩티드에 대해 적어도 약 45%, 예를 들어 적어도 약 55%, 적어도 약 65%, 적어도 약 75%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 그 초과 (예를 들어, 약 70-99%)의 유사성을 보인다.

[0047] 본원에서 사용되는 바와 같이, "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 면역글로불린 클래스 (예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, 또는 IgM)를 의미한다.

[0048] 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 결정인자를 의미한다. 에피토프는 대체로 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 표면기로 구성되고, 일반적으로 특이적인 3차원 구조 특성 및 특이적 전하 특성을 갖는다. 입체형태적 및 비-입체형태적 에피토프는 변성 용매의 존재 하에서 입체형태적 에피토프에 대한 결합은 손실되지만 비-입체형태적 에피토프에 대해서는 손실되지 않는다는 점에서 구별된다. 에피토프는 결합에 직접 관련되는 아미노산 잔기 (에피토프의 면역우성 성분으로도 칭해짐) 및 결합에 직접 관련되지 않는 기타 아미노산 잔기, 예컨대 특이적 항원 결합 펩티드에 의해 효과적으로 차단되는 아미노산 잔기 (즉, 아미노산 잔기가 특이적 항원 결합 펩티드의 풋프린트 (footprint) 내에 존재함)를 포함한다.

[0049] 본원에서 사용되는 바와 같이, 인간 항체는 예를 들어 인간 면역글로불린 유전자를 갖는 트랜스제닉 마우스를

면역화시킴으로써 또는 인간 면역글로불린 유전자 라이브러리를 스크리닝함으로써, 인간 면역글로불린 서열을 사용하는 시스템으로부터 항체가 수득된다면 특정 생식계열 서열"로부터 유래"된 것이고, 이때 선택된 인간 항체 V 도메인 서열은 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열에 대해 아미노산 서열에 대해 아미노산 V 도메인 서열이 적어도 90%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 또는 예를 들어 적어도 99% 동일하다. 일반적으로, 중쇄 CDR3 외부에서, 특정 인간 생식계열 서열로부터 유래된 인간 항체는 생식계열 면역글로불린 유전자에 의해 코딩되는 아미노산 서열과 20개 이하의 아미노산 차이, 예컨대 10개 이하의 아미노산 차이, 예컨대 9, 8, 7, 6 또는 5개 이하, 예를 들어 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 차이를 나타낼 것이다.

[0050] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "성장을 억제하다" (예를 들어, 세포, 예를 들어 종양 세포를 지칭하는 경우)는 항-TF 항체와 접촉되지 않은 동일한 세포의 성장과 비교하여 항-TF 항체와 접촉되었을 때 세포 성장의 임의의 측정가능한 감소, 예를 들어 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, 또는 100%의 세포 배양물의 성장 억제를 포함하도록 의도된다. 상기 세포 성장의 감소는 다양한 메카니즘, 예를 들어 효과기 세포 포식작용, ADCC, CDC, 및/또는 아폽토시스에 의해 발생할 수 있다.

[0051] 용어 "이중특이적 분자"는 2가지의 상이한 결합 특이성을 갖는 임의의 물질, 예컨대 단백질, 펩티드, 또는 단백질 또는 펩티드 복합체를 포함하도록 의도된다. 예를 들어, 분자는 (a) 세포 표면 항원 및 (b) 효과기 세포 표면 상의 Fc 수용체에 결합하거나 또는 이와 상호작용할 수 있다. 용어 "이중특이적 항체"는 이중특이적 분자인 임의의 항-TF 항체를 포함하도록 의도된다. 용어 "이중특이적 항체"에는 디아바디가 또한 포함된다. 디아바디는 V_H 및 V_L 도메인이 단일 폴리펩티드 사슬 상에 발현되지만, 동일한 사슬 상의 두 도메인 간에 쌍을 형성하기에는 너무 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인들이 또 다른 사슬의 상보적 도메인과 쌍을 이루게 되고 2개의 항원 결합 부위가 생성되는, 2개의 이중특이적 항체이다 (예를 들어, 문헌 [Holliger, P. et al., PNAS USA 90, 6444-6448 (1993)], [Poljak, R.J. et al., Structure 2, 1121-1123 (1994)] 참조).

[0052] "효과기 기능이 결여된 항체" 또는 "효과기-기능-결여 항체"는 하나 이상의 효과기 메카니즘, 예를 들어 보체 활성화 또는 Fc 수용체 결합을 활성화하는 능력이 유의하게 감소되거나 결여된 항체를 의미한다. 따라서, 효과기-기능 결여 항체는 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체-의존성 세포독성 (CDC)을 매개하는 능력이 유의하게 감소되거나 결여된다. 그러한 항체의 예는 IgG4이다.

[0053] 용어 "일가 항체"는 본 발명의 측면에서 항체 분자가 항원의 단일 분자에 결합할 수 있고, 따라서 항원에 가교 결합할 수 없음을 의미한다.

[0054] 용어 "안정화된 IgG4 항체"는 1/2-분자 교환을 감소시키기 위해 변형된 IgG4 항체를 의미한다 (문헌 [van der Neut Kolfshoten M et al. (2007) Science 14:317(5844)] 및 이의 참고문헌, 및 [Labriijn et al. (2009) Nature Biotechnology, 27, 767-771] 참조).

[0055] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "효과기 세포"는 면역 반응의 인지 및 활성화 단계와 대조적으로, 면역 반응의 효과기 단계에 수반되는 면역 세포를 지칭한다. 예시적인 면역 세포에는 골수 또는 림프 기원의 세포, 예를 들어 림프구 (예컨대, 세포용해성 T 세포 (CTL)가 포함되는 B 세포 및 T 세포), 킬러 (killer) 세포, 천연 킬러 세포, 대식세포, 단핵구, 호산구, 다형핵 세포, 예를 들어 호중구, 과립구, 비만 (mast) 세포 및 호염기구 (eosinophil)가 포함된다. 일부 효과기 세포는 특정 Fc 수용체를 발현하고, 특정 면역 기능을 수행한다. 일부 실시양태에서, 효과기 세포는 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 유도할 수 있고, 예컨대 천연 킬러 세포가 ADCC를 유도할 수 있다. 예를 들어, FcR을 발현시키는 단핵구, 대식세포는 표적 세포를 특이적으로 사멸시키는 것 및 항원을 면역계의 다른 성분에 제시하는 것, 또는 항원을 제시하는 세포에 결합하는 것에 관여한다. 일부 실시양태에서, 효과기 세포는 표적 항원 또는 표적 세포를 포식할 수 있다. 효과기 세포 상의 특정 FcR의 발현은 시토킨과 같은 체액성 인자에 의해 조절될 수 있다. 예를 들어, Fc γ RI의 발현은 인터페론 γ (IFN- γ) 및/또는 G-CSF에 의해 상향조절되는 것으로 밝혀졌다. 이러한 증강된 발현은 표적에 대한 Fc γ RI-보유 세포의 세포독성 활성을 증가시킨다. 효과기 세포는 표적 항원 또는 표적 서열을 포식하거나 용해시킬 수 있다.

[0056] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "벡터"는 자신이 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하도록 의도된다. 벡터의 한 유형은 "플라스미드"이고, 이는 추가적인 DNA 분절이 내부에 라이게이션될 수 있는 환상의 이중 가닥 DNA 루프이다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이고, 이때 추가의 DNA 분절은 바이러스 게놈 내로 라이게이션될 수 있다. 특정 벡터는 자신이 도입된 숙주 세포 내에서 자가 복제될 수 있다 (예를 들어, 세균 복제 기점을 갖는 세균 벡터 및 에피솜형 포유동물 벡터). 기타 벡터 (예컨대 비-에피솜형 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로의 도입 시 숙주 세포의 게놈 내로 통합될 수 있고, 따라서 숙주 게놈과 함께 복제

된다. 또한, 특정 벡터는 벡터가 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" (또는 단순히 "발현 벡터")로 지칭된다. 일반적으로, 재조합 DNA 기술에서 사용되는 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 본 명세서에서, "플라스미드" 및 "벡터"는 플라스미드가 가장 통상적으로 사용되는 벡터의 형태이므로 상호 교환가능하게 사용할 수 있다. 그러나, 본 발명은 동등한 기능을 수행하는 다른 형태의 발현 벡터, 예컨대 바이러스 벡터 (예컨대, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-연관 바이러스)를 포함하도록 의도된다.

[0057] 본원에서 사용되는 용어 "재조합 숙주 세포" (또는 단순히 "숙주 세포")는 발현 벡터가 도입된 세포를 지칭하도록 의도된다. 상기 용어는 특정한 대상 세포뿐만 아니라 그 세포의 자손체도 지칭하도록 의도된다는 것을 이해하여야 한다. 돌연변이 또는 환경적인 영향으로 인해 후속 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문에, 상기 자손체가 실제로는 모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에 사용된 용어 "숙주 세포"의 범주 내에 여전히 포함된다. 재조합 숙주 세포는, 예를 들어, 트랜스펙토마 (transfectoma), 예컨대 CHO 세포, HEK293 세포, NS/O 세포, 및 림프구 세포를 포함한다.

[0058] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "트랜스펙토마"는 항체를 발현하는 재조합 진핵 숙주 세포, 예를 들어 CHO 세포, NS/O 세포, HEK293 세포, 식물 세포, 또는 진균, 예를 들어 효모 세포를 포함한다.

[0059] 용어 "트랜스제닉 비-인간 동물"은 1개 이상의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 도입유전자 또는 트랜스크로모솜 (동물의 천연 게놈 DNA 내로 통합되거나 통합되지 않음)을 포함하는 게놈을 갖고 완전한 인간 항체를 발현할 수 있는 비-인간 동물을 지칭한다. 예를 들어, 트랜스제닉 마우스는, TF 항원 및/또는 TF를 발현하는 세포로 면역화되는 경우 마우스가 인간 항-TF 항체를 생산하도록, 인간 경쇄 도입유전자, 및 인간 중쇄 도입유전자 또는 인간 중쇄 트랜스크로모솜을 가질 수 있다. 인간 중쇄 도입유전자는 트랜스제닉 마우스, 예를 들어 HuMAb 마우스, 예컨대 HCo7 또는 HCo12 마우스에서와 같이 마우스의 염색체 DNA 내로 통합될 수 있거나, 또는 인간 중쇄 도입유전자는 W002/43478에 기술된 트랜스크로모솜 KM 마우스에서와 같이 염색체 외부에 유지될 수 있다. 이같은 트랜스제닉 및 트랜스크로모솜 마우스 (본원에서 "트랜스제닉 마우스"로 총칭함)는 V-D-J 재조합 및 이소형 스위칭을 거침으로써 소정의 항원에 대한 다수의 이소형의 인간 모노클로날 항체 (예컨대 IgG, IgA, IgM, IgD 및/또는 IgE)를 생산할 수 있다. 또한, 트랜스제닉 비-인간 동물은 특정 항체를 코딩하는 유전자를 도입함으로써, 예를 들어, 이러한 유전자를 동물의 유액에서 발현되는 유전자에 작동가능하게 연결시킴으로써, 특정 항원에 대한 항체를 생산하는데 사용될 수 있다.

[0060] "치료"는 증상 또는 질병 상태의 진정, 개선, 정지 또는 근절 (치유)을 목적으로 유효량의 본 발명의 치료 활성 화합물을 투여하는 것을 의미한다.

[0061] "유효량"은 목적하는 치료 결과의 달성에 필요한 투약시에 필요한 시간 동안 효과적인 양을 의미한다. 항-TF 항체의 치료 유효량은 개체의 질병 상태, 연령, 성별, 및 체중, 및 개체에서 목적하는 반응을 유도하는 항-TF 항체의 능력과 같은 인자에 따라 상이할 수 있다. 또한, 치료 유효량은 항체 또는 항체 일부의 임의의 독성 또는 유해한 효과가 치료상 유익한 효과보다 크지 않은 양이다.

[0062] "항-개별특이형" (Id) 항체는 일반적으로 항체의 항원-결합 부위와 관련되는 특유한 결정인자를 인식하는 항체이다.

[0063] 본 발명의 추가의 측면 및 실시양태

[0064] 상기한 바와 같이, 제1 측면에서, 본 발명은 인간 조직 인자에 결합하는 인간 항체에 관한 것이다.

[0065] 하나의 실시양태에서, 항체는 실시예 13의 검정에서 설명된 바와 같이 결정될 때 3 nM 이하, 예를 들어 0.50 nM 이하, 예를 들어 0.35 nM 이하, 예를 들어 0.20 nM 이하, 예를 들어 0.1 nM 이하의 겔보기 친화도 (EC₅₀)로 조직 인자의 세포의 도메인에 결합한다.

[0066] 또 다른 실시양태에서, 항체는 실시예 14의 검정에서 설명된 바와 같이 결정될 때 바람직하게는 10 nM 이하, 예를 들어 8 nM 이하, 예를 들어 5 nM 이하, 예를 들어 2 nM 이하, 예를 들어 1 nM 이하, 예를 들어 0.5 nM 이하, 예를 들어 0.3 nM 이하의 겔보기 친화도 (EC₅₀)로, 조직 인자를 발현하는 포유동물 세포, 예를 들어 조직 인자를 코딩하는 구축물로 형질감염된 A431 세포에 결합한다.

[0067] 또 다른 실시양태에서, 항체는 실시예 20의 검정에서 설명된 바와 같이 결정될 때 바람직하게는 2 nM 이하, 예를 들어 1 nM 이하, 예를 들어 0.7 nM 이하 또는 0.3 nM 이하, 예를 들어 0.2 nM 이하, 또는 0.1 nM 이하, 또

는 0.05 nM 이하의 EC₅₀ 값으로 A431 세포에서 항체-의존성 세포성 세포독성을 유도할 수 있다.

- [0068] 또 다른 실시양태에서, 항체는 실시예 24의 검정에서 설명된 바와 같이 결정될 때 확립된 MDA-MB-231 종양의 성장 억제에 및/또는 실시예 26의 검정에서 설명된 바와 같이 결정될 때 확립된 BxPC3 종양의 성장 억제에 효과적이다.
- [0069] 또 다른 실시양태에서, 항체는 실시예 19의 검정에서 설명된 바와 같이 결정될 때 바람직하게는 10 nM 미만, 예를 들어 5 nM 미만, 예를 들어 2 nM 미만, 예를 들어 1 nM 미만의 억제 농도 중앙값으로 조직 인자 유도 혈액 응고를 억제한다.
- [0070] 또 다른 실시양태에서, 항체는 응고를 억제하지 않는다. 한 실시양태에서, 응고는 천연 수준에 비해 최대 30%, 예를 들어 25%, 예를 들어 20%, 예를 들어 15%, 예를 들어 10% 또는 예를 들어 5% 억제된다.
- [0071] 추가의 실시양태에서, 항체는 실시예 15의 검정에서 설명된 바와 같이 결정될 때 바람직하게는 80% 초과, 예를 들어 90% 초과 억제의 최대 억제값으로 조직 인자에 대한 FVIIa 결합을 억제한다.
- [0072] 추가의 실시양태에서, 항체는 실시예 17의 검정에서 설명된 바와 같이 결정될 때 바람직하게는 40% 초과, 예를 들어 50% 초과, 예를 들어 60% 초과 억제의 최대 억제값으로 MDA-MB-231 세포에 의한 FVIIa-유도 IL-8 방출을 억제한다.
- [0073] 추가의 실시양태에서, 항체는 실시예 18의 검정에서 설명된 바와 같이 결정될 때 TF/FVIIa 복합체에 의한 FX의 FXa로의 전환을, 바람직하게는 50% 미만, 예를 들어 40% 미만, 예를 들어 1-30% 범위로 억제한다.
- [0074] 추가의 실시양태에서, 항체는 서열 9의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 65의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와 조직 인자 결합에 대해 경쟁한다.
- [0075] 추가의 실시양태에서, 본 발명의 항체의 조직 인자에 대한 결합은 다음 잔기 3개 모두를 수반하지 않는다: 조직 인자의 위치 45의 W, 위치 46의 K 또는 위치 94의 Y. 추가의 실시양태에서, 결합은 임의의 다음 잔기를 수반하지 않는다: 위치 45의 W, 위치 46의 K 또는 위치 94의 Y (상기 숫자는 성숙 TF를 기준한 것이고, Genbank 지정 NP_001984의 동등한 위치는 77, 78 및 126이다).
- [0076] 본 발명의 항체의 또 다른 실시양태에서, 항체는 서열 37의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 93의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와 조직 인자 결합에 대해 경쟁한다.
- [0077] 추가의 실시양태에서, 항체는 실시예 16의 검정에서 설명된 바와 같이 결정될 때 바람직하게는 10 nM 미만, 예를 들어 5 nM 미만, 예를 들어 2 nM 미만의 억제 농도 중앙값으로 FVIIa 유도된 ERK 인산화를 억제한다.
- [0078] 추가의 실시양태에서, 항체는 실시예 16의 검정에서 설명된 바와 같이 결정될 때 바람직하게는 10 nM 미만, 예를 들어 5 nM 미만, 예를 들어 2 nM 미만의 억제 농도 중앙값으로 ERK 인산화를 억제하고, 실시예 17의 검정에서 설명된 FVII 유도 IL-8 방출을 최대 10% 초과로 억제하지 않는다.
- [0079] 추가의 실시양태에서, 항체는 C3c 및 C4c 침착을 유도할 수 있고, 바람직하게는 항체는 실시예 21에서 결정될 때 C3c 및 C4c 침착을 유도할 수 있다.
- [0080] 추가의 실시양태에서, 항체 Fab 단편은 실시예 28에 설명된 바와 같이 조직 인자의 세포외 도메인에 ELISA에 의해 측정될 때 0.1 µg/mL 미만, 예를 들어 0.05 µg/mL 미만, 예를 들어 0.04 µg/mL 미만의 EC50 값으로 결합한다.
- [0081] 추가의 실시양태에서, 항체 Fab 단편은 실시예 28에 설명된 바와 같이 조직 인자의 세포외 도메인에 ELISA에 의해 측정될 때 1.0 µg/mL 초과와 EC50 값으로 결합한다.
- [0082] 추가의 실시양태에서, 항체 Fab 단편은 실시예 28에 설명된 바와 같이 조직 인자의 세포외 도메인에 10 µg/mL 미만, 예를 들어 1 µg/mL 미만, 예를 들어 0.5 µg/mL 미만 또는 0.2 µg/mL 미만의 EC50 값으로 결합한다.
- [0083] 추가의 실시양태에서, 항체는 인간 조직 인자에는 결합하지만 무린 조직 인자에는 결합하지 않고, 실시예 27에서 설명되는 바와 같이 마우스 서열로 대체된 아미노산 42-84를 제외한, TF에 대한 인간 서열을 함유하는 서플 구축물 42-84 aa에 대해 인간 TF에 대한 결합에 비해 감소된 결합을 보인다.
- [0084] 추가의 실시양태에서, 항체는 인간 조직 인자에는 결합하지만 무린 조직 인자에는 결합하지 않고, 실시예 27에서 설명되는 바와 같이 마우스 서열로 대체된 아미노산 85-122를 제외한, TF에 대한 인간 서열을 함유하는 서플

구축물 85-122 mm에 대해 인간 TF에 대한 결합에 비해 감소된 결합을 보인다.

- [0085] 추가의 실시양태에서, 항체는 인간 조직 인자에는 결합하지만 무린 조직 인자에는 결합하지 않고, 실시예 27에서 설명되는 바와 같이 마우스 서열로 대체된 아미노산 123-137을 제외한, TF에 대한 인간 서열을 함유하는 서플 구축물 123-137 mm에 대해 인간 TF에 대한 결합에 비해 감소된 결합을 보인다.
- [0086] 추가의 실시양태에서, 항체는 인간 조직 인자에는 결합하지만 무린 조직 인자에는 결합하지 않고, 실시예 27에서 설명되는 바와 같이 마우스 서열로 대체된 아미노산 185-225를 제외한, TF에 대한 인간 서열을 함유하는 서플 구축물 185-225 mm에 대해 인간 TF에 대한 결합에 비해 감소된 결합을 보인다.
- [0087] 추가의 실시양태에서, 항체는 인간 조직 인자에는 결합하지만 무린 조직 인자에는 결합하지 않고, 실시예 27에서 설명되는 바와 같이 마우스 서열로 대체된 아미노산 226-250을 제외한, TF에 대한 인간 서열을 함유하는 서플 구축물 226-250 mm 모두에 대해 인간 TF에 대한 결합에 비해 감소된 결합을 보인다.
- [0088] 추가의 실시양태에서, 항체는 하나 초과와 서플 구축물에 대해 인간 TF에 대한 결합에 비해 감소된 결합을 보인다. 한 실시양태에서, 항체는 구축물 42-84 mm 및 85-122 mm에 대해 감소된 결합을 보인다. 한 실시양태에서, 항체는 123-137 mm 및 구축물 185-225 mm에 대해 감소된 결합을 보인다. 한 실시양태에서, 항체는 구축물 123-137 mm 및 구축물 185-225 mm 및 추가로 구축물 226-250 mm에 대해 감소된 결합을 보인다.
- [0089] 추가의 실시양태에서, 항체는 C3c 및 C4c 침착을 유도할 수 있고, 바람직하게는 항체는 실시예 21에서 결정될 때 C3c 및 C4c 침착을 유도할 수 있다.
- [0090] 본 발명의 항체의 하나의 실시양태에서, 상기 항체는
- [0091] - 서열 9의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 65의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와 조직 인자 결합에 대해 경쟁하고,
- [0092] - 서열 37의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 93의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와 조직 인자 결합에 대해 경쟁하지 않는다.
- [0093] 추가의 실시양태에서, 항체는
- [0094] a) - 서열 12,
- [0095] - 서열 16,
- [0096] - 서열 20,
- [0097] - 서열 24,
- [0098] - 서열 28에 제시된 서열, 또는
- [0099] b) 임의의 상기 서열의 변이체, 예를 들어 최대 1, 2, 3, 4 또는 5개의 아미노산 변형, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환을 갖는 변이체
- [0100] 를 갖는 VH CDR3 영역을 포함한다.
- [0101] 추가의 실시양태에서, 항체는 서열 12에 제시된 서열 또는 그의 변이체를 갖는 VH CDR3 영역을 포함하며, 여기서 변이체는 위치 2, 3, 6, 9 및 11 중의 하나 이상에서 변형을 포함하고, 바람직하게는 변형은 치환이고, 보다 바람직하게는 치환은
- [0102] a. 위치 2에서 R의 K로의 치환,
- [0103] b. 위치 3에서 S의 A 또는 T로의 치환,
- [0104] c. 위치 6에서 G의 T로의 치환,
- [0105] d. 위치 9에서 L의 F로의 치환, 및
- [0106] e. 위치 11에서 S의 Y로의 치환
- [0107] 으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0108] 또 다른 실시양태에서, 항체는

- [0109] a) 서열 10, 11 및 12의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 66, 67 및 68의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0110] b) 서열 14, 15 및 16의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 70, 71 및 72의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0111] c) 서열 18, 19, 20의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 74, 75 및 76의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0112] d) 서열 22, 23 및 24의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 78, 79 및 80의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0113] e) 서열 26, 27 및 28의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 82, 83 및 84의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역, 또는
- [0114] f) 임의의 상기 항체의 변이체
- [0115] 를 포함하며, 여기서 상기 변이체는 바람직하게는 상기 서열에 최대 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환을 갖는다.
- [0116] 추가의 실시양태에서, 항체는
- [0117] a) 서열 9, 13, 17, 21 및 25로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역 서열에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 또는 100% 동일성, 또는
- [0118] b) 서열 9, 13, 17, 21, 21 및 25로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역 서열에 비해 최대 20, 예를 들어 15, 또는 10, 또는 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환
- [0119] 을 갖는 VH를 포함한다.
- [0120] 추가의 실시양태에서, 항체는
- [0121] a) 서열 65, 69, 73, 77 및 81로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VL 영역 서열에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 또는 100% 동일성, 또는
- [0122] b) 서열 65, 69, 73, 77 및 81로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역 서열에 비해 최대 20, 예를 들어 15, 또는 10, 또는 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환
- [0123] 을 갖는 VL을 포함한다.
- [0124] 추가의 실시양태에서, 항체는
- [0125] a) 서열 9의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 65의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0126] b) 서열 13의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 69의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0127] c) 서열 17의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 73의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0128] d) 서열 21의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 77의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0129] e) 서열 25의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 81의 서열을 포함하는 VL 영역, 또는
- [0130] f) 임의의 상기 항체의 변이체
- [0131] 를 포함하며, 여기서 상기 변이체는 바람직하게는 상기 서열에 최대 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환을 갖는다.
- [0132] 추가의 실시양태에서, 항체는
- [0133] - 서열 9의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 65의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와 조직 인자 결합에 대해 경쟁하고,
- [0134] - 서열 37의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 93의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와 조직 인자 결

합에 대해 경쟁한다.

[0135] 추가의 실시양태에서, 항체는

[0136] a) - 서열 8,

[0137] - 서열 52에 제시된 서열, 또는

[0138] b) 임의의 상기 서열의 변이체, 예를 들어 최대 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환을 갖는 변이체

[0139] 를 갖는 VH CDR3 영역을 포함한다.

[0140] 추가의 실시양태에서, 항체는

[0141] a) 서열 6, 7 및 8의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 62, 63 및 64의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역,

[0142] b) 서열 50, 51 및 52의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 106, 107 및 108의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역, 또는

[0143] c) 임의의 상기 항체의 변이체

[0144] 를 포함하며, 여기서 상기 변이체는 바람직하게는 상기 서열에 최대 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환을 갖는다.

[0145] 추가의 실시양태에서, 항체는

[0146] a) 서열 5 및 49로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역 서열에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 또는 100% 동일성, 또는

[0147] b) 서열 5 및 49로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역 서열에 비해 최대 20, 예를 들어 15, 또는 10, 또는 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환

[0148] 을 갖는 VH를 포함한다.

[0149] 추가의 실시양태에서, 항체는

[0150] c) 서열 61 및 105로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VL 영역 서열에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 또는 100% 동일성, 또는

[0151] d) 서열 61 및 105로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역 서열에 비해 최대 20, 예를 들어 15, 또는 10, 또는 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환

[0152] 을 갖는 VL을 포함한다.

[0153] 추가의 실시양태에서, 항체는

[0154] a) 서열 5의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 61의 서열을 포함하는 VL 영역,

[0155] b) 서열 49의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 105의 서열을 포함하는 VL 영역, 또는

[0156] c) 임의의 상기 항체의 변이체

[0157] 를 포함하며, 여기서 상기 변이체는 바람직하게는 상기 서열에 최대 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환을 갖는다.

[0158] 추가의 실시양태에서, 항체는

[0159] - 서열 9의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 65의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와 조직 인자 결합에 대해 경쟁하지 않고,

[0160] - 서열 37의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 93의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와 조직 인자 결합에 대해 경쟁한다.

- [0161] 추가의 실시양태에서, 항체는
- [0162] a) - 서열 32,
- [0163] - 서열 36,
- [0164] - 서열 40,
- [0165] - 서열 56에 제시된 서열, 또는
- [0166] b) 임의의 상기 서열의 변이체, 예를 들어 최대 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환을 갖는 변이체
- [0167] 를 갖는 VH CDR3 영역을 포함한다.
- [0168] 추가의 실시양태에서, 항체는
- [0169] a) 서열 30, 31 및 32의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 86, 87 및 88의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0170] b) 서열 34, 35 및 36의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 90, 91 및 92의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0171] c) 서열 38, 39 및 40의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 94, 95 및 96의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0172] d) 서열 54, 55 및 56의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 110, 111 및 112의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역, 또는
- [0173] e) 임의의 상기 항체의 변이체
- [0174] 를 포함하며, 여기서 상기 변이체는 바람직하게는 상기 서열에 최대 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환을 갖는다.
- [0175] 추가의 실시양태에서, 항체는
- [0176] a) 서열 29, 33, 37 및 53으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역 서열에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 또는 100% 동일성, 또는
- [0177] b) 서열 29, 33, 37 및 53으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역 서열에 비해 최대 20, 예를 들어 15, 또는 10, 또는 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환
- [0178] 을 갖는 VH를 포함한다.
- [0179] 추가의 실시양태에서, 항체는
- [0180] a) 서열 85, 89, 93 및 109로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VL 영역 서열에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 또는 100% 동일성, 또는
- [0181] b) 서열 85, 89, 93 및 109로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역 서열에 비해 최대 20, 예를 들어 15, 또는 10, 또는 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환
- [0182] 을 갖는 VL을 포함한다.
- [0183] 추가의 실시양태에서, 항체는
- [0184] a) 서열 29의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 85의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0185] b) 서열 33의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 89의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0186] c) 서열 37의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 93의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0187] d) 서열 53의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 109의 서열을 포함하는 VL 영역, 또는

- [0188] e) 임의의 상기 항체의 변이체
- [0189] 를 포함하며, 여기서 상기 변이체는 바람직하게는 상기 서열에 최대 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환을 갖는다.
- [0190] 추가의 실시양태에서, 항체는 서열 41의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 97의 서열을 포함하는 VL 영역을 포함하는 항체와 조직 인자 결합에 대해 경쟁하는 항체를 포함한다.
- [0191] 추가의 실시양태에서, 항체는
- [0192] a) - 서열 4,
- [0193] - 서열 44,
- [0194] - 서열 48에 제시된 서열, 또는
- [0195] b) 임의의 상기 서열의 변이체, 예를 들어 최대 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환을 갖는 변이체
- [0196] 를 갖는 VH CDR3 영역을 포함한다.
- [0197] 추가의 실시양태에서, 항체는
- [0198] a) 서열 2, 3 및 4의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 58, 59 및 60의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0199] b) 서열 42, 43 및 44의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 98, 99 및 100의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0200] c) 서열 46, 47 및 48의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 102, 103 및 104의 CDR1, 2 및 3 서열을 포함하는 VL 영역, 또는
- [0201] d) 임의의 상기 항체의 변이체
- [0202] 를 포함하며, 여기서 상기 변이체는 바람직하게는 상기 서열에 최대 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환을 갖는다.
- [0203] 추가의 실시양태에서, 항체는
- [0204] a) 서열 1, 41 및 45로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역 서열에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 또는 100% 동일성, 또는
- [0205] b) 서열 1, 41 및 45로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역 서열에 비해 최대 20, 예를 들어 15, 또는 10, 또는 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환
- [0206] 을 갖는 VH를 포함한다.
- [0207] 추가의 실시양태에서, 항체는
- [0208] c) 서열 57, 97 및 101로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VL 영역 서열에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 또는 100% 동일성, 또는
- [0209] d) 서열 57, 97 및 101로 이루어지는 군으로부터 선택되는 VH 영역 서열에 비해 최대 20, 예를 들어 15, 또는 10, 또는 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환
- [0210] 을 갖는 VL을 포함한다.
- [0211] 추가의 실시양태에서, 항체는
- [0212] a) 서열 1의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 57의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0213] b) 서열 41의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 97의 서열을 포함하는 VL 영역,

- [0214] c) 서열 45의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 101의 서열을 포함하는 VL 영역, 또는
- [0215] d) 임의의 상기 항체의 변이체
- [0216] 를 포함하며, 여기서 상기 변이체는 바람직하게는 상기 서열에 최대 1, 2 또는 3개의 아미노산 변형, 보다 바람직하게는 아미노산 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환을 갖는다.
- [0217] 추가의 실시양태에서, 본 발명의 항체의 조직 인자에 대한 친화도는 본원의 실시예 22에서 설명되는 방법에 의해 결정될 때 5 nM 미만, 예를 들어 3.5 nM 미만, 예를 들어 2 nM 미만이다.
- [0218] 본 발명의 항체의 특히 흥미로운 군은 정상 또는 높은 결합력 및 높은 오프율 (off-rate) (kd)을 특징으로 하는, 조직 인자에 대한 결합을 보인다. 본원에서 입증되는 바와 같이, 상기 항체는 암 조직에는 결합하지만 건강한 조직에는 결합하지 않거나 덜 결합한다는 점에서 종양 특이적 결합을 보일 수 있다. 임의의 구체적인 이론에 매이지 않지만, 2가인 경우에만 결합이 효율적이기 때문에 상기 항체의 군만이 고수준의 TF를 발현하는 세포에 잘 결합한다고 가정된다. 이들 항체의 예는 본원에서 설명되는 항체 044, 098 및 111을 포함한다.
- [0219] 따라서, 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 본원의 실시예 22에서 설명되는 친화도 방법에 의해 결정될 때 10^{-3} sec^{-1} 초과와 kd, 및 본원의 실시예 22에서 설명되는 결합력 방법에 의해 결정될 때 5 nM 미만, 예를 들어 1 nM 미만, 예를 들어 0.2 nM 미만의 결합력을 갖는다.
- [0220] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 본원의 실시예 22에서 설명되는 친화도 방법에 의해 결정될 때 10^{-3} sec^{-1} 초과와 kd, 및/또는 본원의 실시예 22에서 설명되는 친화도 방법에 의해 결정될 때 $5 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 초과와 ka를 갖는다.
- [0221] 추가의 실시양태에서, 항체는 예를 들어 실시예 23의 검정에서 설명된 바와 같이 결정될 때 건강한 조직에 대한, 특히 인간 사구체에 대한 결합은 보이지 않지만, 예를 들어 본원의 실시예 23의 검정에서 설명된 바와 같이 결정될 때 췌장 종양에 대한 결합을 보인다.
- [0222] 또 추가의 실시양태에서, 항체는 본원의 실시예 26에서 설명되는 방법에 의해 결정될 때 확립된 BX-PC3 종양의 성장 억제에 효과적이다.
- [0223] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 다음 특성 중 하나 이상을 갖는다: 증식의 억제, 종양 혈관신생의 억제, 종양 세포의 아포토시스 유도, 선택적으로 스플라이싱된 조직 인자에 대한 결합.
- [0224] 추가의 실시양태에서, 본 발명의 항체는
- [0225] a) 서열 9의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 65의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0226] b) 서열 1의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 57의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0227] c) 서열 5의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 61의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0228] d) 서열 13의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 69의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0229] e) 서열 17의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 73의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0230] f) 서열 21의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 77의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0231] g) 서열 25의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 81의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0232] h) 서열 29의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 85의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0233] i) 서열 33의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 89의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0234] j) 서열 37의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 93의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0235] k) 서열 41의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 97의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0236] l) 서열 45의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 101의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0237] m) 서열 49의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 105의 서열을 포함하는 VL 영역, 또는
- [0238] n) 서열 53의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 109의 서열을 포함하는 VL 영역

- [0239] 을 포함하는 항체와 조직 인자 결합에 대해 경쟁한다.
- [0240] 추가의 실시양태에서, 본 발명의 항체는
- [0241] a) 서열 9의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 65의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0242] b) 서열 1의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 57의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0243] c) 서열 5의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 61의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0244] d) 서열 13의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 69의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0245] e) 서열 17의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 73의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0246] f) 서열 21의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 77의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0247] g) 서열 25의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 81의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0248] h) 서열 29의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 85의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0249] i) 서열 33의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 89의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0250] j) 서열 37의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 93의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0251] k) 서열 41의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 97의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0252] l) 서열 45의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 101의 서열을 포함하는 VL 영역,
- [0253] m) 서열 49의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 105의 서열을 포함하는 VL 영역, 또는
- [0254] n) 서열 53의 서열을 포함하는 VH 영역 및 서열 109의 서열을 포함하는 VL 영역
- [0255] 을 갖는 항체와 동일한 조직 인자 상의 에피토프에 결합한다.
- [0256] 추가의 실시양태에서, 본 발명의 항체는
- [0257] - IGHV1-18*01, IGHV3-23*01, IGHV3-30*01, IGHV3-33*01, IGHV3-33*03, IGHV1-69*02, IGHV1-69*04 및 IGHV5-51*01로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 생식계열 V_H 서열로부터 유래된 중쇄 가변 영역 및/또는
- [0258] - IGKV3-20*01, IGKV1-13*02, IGKV3-11*01, 및 IGKV1D-16*01로 이루어진 군으로부터 선택되는 인간 생식계열 V_K 서열 서열로부터 유래된 경쇄 가변 영역
- [0259] 을 포함한다.
- [0260] 추가의 측면에서, 본 발명은 서열 9, 1, 5, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49 또는 53에 제시된 서열을 갖는 VH 영역, 또는 임의의 상기 서열의 변이체, 예를 들어 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환을 갖는 변이체를 포함하는 모노클로날 항-TF 항체에 관한 것이다.
- [0261] 서열 9, 1, 5, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49 또는 53에 제시된 서열의 변이체는 임의의 상기 서열에 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성을 가질 수 있다.
- [0262] 본 발명의 한 측면에서, 단리된 모노클로날 항-TF 항체는 서열 65, 57, 61, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101, 또는 105에 제시된 VL 서열 또는 임의의 상기 서열의 변이체, 예를 들어 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환을 갖는 변이체를 포함한다.
- [0263] 서열 65, 57, 61, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101, 또는 105에 제시된 서열의 변이체는 임의의 상기 서열에 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성을 가질 수 있다.

- [0264] 또 다른 실시양태에서, 항체는
- [0265] a) 서열 65, 57, 61, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101, 또는 105로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 VL 영역 및 서열 9, 1, 5, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49 또는 53으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 갖는 VH 영역,
- [0266] b) 임의의 상기 서열의 변이체를
- [0267] 를 포함하며, 여기서 상기 변이체는 바람직하게는 상기 서열에 보존적 치환만을 갖는다.
- [0268] 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열 65에 제시된 서열을 갖는 VL 영역 및 서열 9에 제시된 서열을 갖는 VH 영역, 또는 임의의 상기 2개의 서열의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는
- [0269] a) 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환, 또는
- [0270] b) 각각 서열 9 또는 서열 65에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성
- [0271] 을 갖는다.
- [0272] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열 57에 제시된 서열을 갖는 VL 영역 및 서열 1에 제시된 서열을 갖는 VH 영역, 또는 임의의 상기 2개의 서열의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는
- [0273] a) 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환, 또는
- [0274] b) 각각 서열 1 또는 서열 57에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성
- [0275] 을 갖는다.
- [0276] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열 61에 제시된 서열을 갖는 VL 영역 및 서열 5에 제시된 서열을 갖는 VH 영역, 또는 임의의 상기 2개의 서열의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는
- [0277] a) 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환, 또는
- [0278] b) 각각 서열 5 또는 서열 61에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성
- [0279] 을 갖는다.
- [0280] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열 69에 제시된 서열을 갖는 VL 영역 및 서열 13에 제시된 서열을 갖는 VH 영역, 또는 임의의 상기 2개의 서열의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는
- [0281] a) 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환, 또는
- [0282] b) 각각 서열 13 또는 서열 69에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성
- [0283] 을 갖는다.
- [0284] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열 73에 제시된 서열을 갖는 VL 영역 및 서열 17에 제시된 서열을 갖는 VH 영역, 또는 임의의 상기 2개의 서열의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는
- [0285] a) 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는

치환, 예를 들어 보존적 치환, 또는

- [0286] b) 각각 서열 17 또는 서열 73에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성
- [0287] 을 갖는다.
- [0288] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열 77에 제시된 서열을 갖는 VL 영역 및 서열 21에 제시된 서열을 갖는 VH 영역, 또는 임의의 상기 2개의 서열의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는
- [0289] a) 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환, 또는
- [0290] b) 각각 서열 21 또는 서열 77에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성
- [0291] 을 갖는다.
- [0292] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열 81에 제시된 서열을 갖는 VL 영역 및 서열 25에 제시된 서열을 갖는 VH 영역, 또는 임의의 상기 2개의 서열의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는
- [0293] a) 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환, 또는
- [0294] b) 각각 서열 25 또는 서열 81에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성
- [0295] 을 갖는다.
- [0296] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열 85에 제시된 서열을 갖는 VL 영역 및 서열 29에 제시된 서열을 갖는 VH 영역, 또는 임의의 상기 2개의 서열의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는
- [0297] a) 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환, 또는
- [0298] b) 각각 서열 29 또는 서열 85에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성
- [0299] 을 갖는다.
- [0300] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열 89에 제시된 서열을 갖는 VL 영역 및 서열 33에 제시된 서열을 갖는 VH 영역, 또는 임의의 상기 2개의 서열의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는
- [0301] a) 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환, 또는
- [0302] b) 각각 서열 33 또는 서열 89에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성
- [0303] 을 갖는다.
- [0304] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열 93에 제시된 서열을 갖는 VL 영역 및 서열 37에 제시된 서열을 갖는 VH 영역, 또는 임의의 상기 2개의 서열의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는
- [0305] a) 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환, 또는
- [0306] b) 각각 서열 37 또는 서열 93에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는

95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성

[0307]

을 갖는다.

[0308]

또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열 97에 제시된 서열을 갖는 VL 영역 및 서열 41에 제시된 서열을 갖는 VH 영역, 또는 임의의 상기 2개의 서열의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는

[0309]

a) 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환, 또는

[0310]

b) 각각 서열 41 또는 서열 97에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성

[0311]

을 갖는다.

[0312]

또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열 101에 제시된 서열을 갖는 VL 영역 및 서열 45에 제시된 서열을 갖는 VH 영역, 또는 임의의 상기 2개의 서열의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는

[0313]

a) 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환, 또는

[0314]

b) 각각 서열 45 또는 서열 101에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성

[0315]

을 갖는다.

[0316]

또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열 105에 제시된 서열을 갖는 VL 영역 및 서열 49에 제시된 서열을 갖는 VH 영역, 또는 임의의 상기 2개의 서열의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는

[0317]

a) 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환, 또는

[0318]

b) 각각 서열 49 또는 서열 105에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성

[0319]

을 갖는다.

[0320]

또 다른 바람직한 실시양태에서, 항체는 서열 109에 제시된 서열을 갖는 VL 영역 및 서열 53에 제시된 서열을 갖는 VH 영역, 또는 임의의 상기 2개의 서열의 변이체를 포함하며, 여기서 상기 변이체는

[0321]

a) 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환, 또는

[0322]

b) 각각 서열 53 또는 서열 109에 대한 적어도 80% 동일성, 예를 들어 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성

[0323]

을 갖는다.

[0324]

본 발명의 모노클로날 항체는 예를 들어 문헌 [Kohler et al., Nature 256, 495 (1975)]에서 처음 설명된 하이브리도마 (hybridoma) 방법에 의해 생산될 수 있거나, 재조합 DNA 방법에 의해 생산될 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 예를 들어 문헌 ([Clackson et al., Nature 352, 624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991)])에 기재된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 모노클로날 항체는 임의의 적합한 공급원으로부터 입수할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 모노클로날 항체는 예를 들어 표면에 항원을 발현하는 세포 또는 관심있는 항원을 코딩하는 핵산 형태의 관심있는 항원으로 면역화시킨 마우스로부터 얻은 뮤린 비장 B 세포로부터 제조한 하이브리도마로부터 입수할 수 있다. 모노클로날 항체는 또한 면역화시킨 인간 또는 비-인간 포유동물, 예를 들어 래트, 토끼, 개, 영장류 등의 항체-발현 세포로부터 유래된 하이브리도마로부터 입수할 수 있다.

- [0325] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 인간 항체이다. 조직 인자에 대한 인간 모노클로날 항체는 마우스 시스템보다는 인간 면역계의 일부를 보유하는 트랜스제닉 또는 트랜스크로모솜 마우스를 사용하여 생성될 수 있다. 그러한 트랜스제닉 및 트랜스크로모솜 마우스는 본원에서 각각 HuMAb 마우스 및 KM 마우스로 언급되는 마우스를 포함하고, 본원에서 "트랜스제닉 마우스"로서 총칭한다.
- [0326] HuMAb 마우스는 재배열되지 않은 인간 중쇄 가변 및 불변 (μ 및 γ) 및 경쇄 가변 및 불변 (κ) 사슬 면역글로블린 서열을 코딩하는 인간 면역글로블린 유전자 미니로커스 (minilocus)를 내인성 μ 쇄 및 κ 사슬 로커스를 불활성화시키는 표적화 돌연변이와 함께 함유한다 [Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-859 (1994)]. 따라서, 마우스는 마우스 IgM 또는 κ 의 발현이 감소되고, 면역화에 반응하여, 도입된 인간 중쇄 및 경쇄 도입유전자에서는 클래스 전환 및 체세포 돌연변이가 일어나 고친화도 인간 IgG, κ 모노클로날 항체가 생성된다 (Lonberg, N. et al. (1994), 상기 문헌); [Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101 (1994)]에서 검토됨, [Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93 (1995)] 및 [Harding, F. and Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536-546 (1995)]. HuMAb 마우스의 제조는 문헌 [Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295 (1992)], [Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656 (1993)], [Tuailon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920 (1994)], [Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591 (1994)], [Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)]에 상세하게 설명되어 있다. 또한, US 5,545,806, US 5,569,825, US 5,625,126, US 5,633,425, US 5,789,650, US 5,877,397, US 5,661,016, US 5,814,318, US 5,874,299, US 5,770,429, US 5,545,807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 및 WO 01/09187을 참조한다.
- [0327] HCo7 마우스는 그의 내인성 경쇄 (카파) 유전자 내의 JKD 파괴 (문헌 [Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)]에 설명된 바와 같이), 그의 내인성 중쇄 유전자 내의 CMD 파괴 (WO 01/14424의 실시예 1에 설명된 바와 같이), KCo5 인간 카파 경쇄 도입유전자 (문헌 [Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)]에 설명된 바와 같이), 및 HCo7 인간 중쇄 도입유전자 (US 5,770,429에 설명된 바와 같이)를 갖는다.
- [0328] HCo12 마우스는 그의 내인성 경쇄 (카파) 유전자 내의 JKD 파괴 (문헌 [Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993)]에 설명된 바와 같이), 그의 내인성 중쇄 유전자 내의 CMD 파괴 (WO 01/14424의 실시예 1에 설명된 바와 같이), KCo5 인간 카파 경쇄 도입유전자 (문헌 [Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)]에 설명된 바와 같이), 및 HCo12 인간 중쇄 도입유전자 (WO 01/14424의 실시예 2에 설명된 바와 같이)를 갖는다.
- [0329] KM 마우스 주에서, 내인성 마우스 카파 경쇄 유전자는 문헌 [Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993)]에 설명된 바와 같이 동종접합 방식으로 파괴되고, 내인성 마우스 중쇄 유전자는 WO 01/09187의 실시예 1에 설명된 바와 같이 동종접합 방식으로 파괴되었다. 상기 마우스 주는 문헌 [Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996)]에 설명된 바와 같이 인간 카파 경쇄 도입유전자 KCo5를 보유한다. 또한, 상기 마우스 주는 WO 02/43478에 설명된 바와 같이 염색체 14 단편 hCF (SC20)으로 이루어진 인간 중쇄 트랜스크로모솜을 보유한다.
- [0330] 공지된 기술에 따라 인간 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 생성하기 위해서 상기 트랜스제닉 마우스의 비장 세포가 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 인간 모노클로날 또는 폴리클로날 항체, 또는 다른 종으로부터 기원하는 본 발명의 항체가, 관심있는 면역글로블린 중쇄 및 경쇄 서열에 대해 트랜스제닉인 또 다른 비-인간 포유동물 또는 식물의 생성 및 그로부터 회수가능한 형태의 항체의 제조를 통해 트랜스제닉 방식으로 생성될 수 있다. 포유동물에서의 트랜스제닉 생산과 관련하여, 항체는 염소, 소, 또는 다른 포유동물에서 생산되어 젖으로부터 회수될 수 있다. 예를 들어, US 5,827,690, US 5,756,687, US 5,750,172 및 US 5,741,957을 참조한다.
- [0331] 또한, 본 발명의 인간 항체 또는 다른 종으로부터의 본 발명의 항체는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 파지 디스플레이, 레트로바이러스 디스플레이, 리보솜 디스플레이, 및 다른 기술을 포함하고 이로 제한되지 않는 디스플레이-유형의 기술을 통해 생성될 수 있고, 생성되는 분자는 추가의 증진, 예를 들어 친화도 증진에 적용될 수 있고, 그러한 기술은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991)] (파지 디스플레이), [Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309 (1996)] (파지 디스플레이), [Hanes and Plutchau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997)] (리보솜 디스플레이), [Parmley and Smith, Gene 73, 305-318 (1988)] (파지 디스플레이), [Scott TIBS 17, 241-245 (1992)], [Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382 (1990)], [Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993)], [Hogenboom et al., Immunol.

Reviews 130, 43-68 (1992)], [Chiswell and McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992)], 및 US 5,733,743 참조). 인간 항체가 아닌 항체를 생산하기 위해 디스플레이 기술이 이용될 경우, 상기 항체는 인간화될 수 있다.

[0332] 본 발명의 항체는 임의의 이소형의 것일 수 있다. 이소형의 선택은 일반적으로 목적하는 효과기 기능, 예를 들어 ADCC 유도에 의해 결정될 것이다. 예시적인 이소형은 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4이다. 인간 경쇄 불변 영역, 카파 또는 람다가 사용될 수 있다. 필요한 경우, 본 발명의 항-TF 항체의 클래스는 공지의 방법에 의해 스위칭될 수 있다. 예를 들어, 원래 IgM인 본 발명의 항체는 본 발명의 IgG 항체로 클래스 스위칭될 수 있다. 또한, 한 IgG 서브클래스를 또 다른 서브클래스로, 예를 들어 IgG1을 IgG2로 전환하기 위해 클래스 스위칭 기술이 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체의 효과기 기능은 다양한 치료 용도를 위해, 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, 또는 IgM 항체로 이소형 스위칭에 의해 변경될 수 있다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 IgG1 항체, 예를 들어 IgG1, κ 이다.

[0333] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 전장 항체, 바람직하게는 IgG1 항체, 특히 IgG1, κ 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항체는 항체 단편 또는 단일쇄 항체이다.

[0334] 항체 단편은 예를 들어 통상적인 기술을 사용한 단편화에 의해 얻을 수 있고, 단편은 전체 항체에 대해 본원에서 설명되는 바와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝될 수 있다. 예를 들어, F(ab')₂ 단편은 항체를 펩신으로 처리함으로써 생성될 수 있다. 생성되는 F(ab')₂ 단편은 Fab' 단편을 생성하기 위해 디설피드 다리를 환원하도록 처리될 수 있다. Fab 단편은 IgG 항체를 파파인으로 처리함으로써 얻을 수 있고; Fab' 단편은 IgG 항체의 펩신 소화에 의해 얻을 수 있다. 또한, F(ab') 단편은 아래에서 설명되는 Fab'를 티오에테르 결합 또는 디설피드 결합을 통해 결합시킴으로써 생성될 수 있다. Fab' 단편은 F(ab')₂의 힌지 영역의 디설피드 결합의 절단에 의해 얻은 항체 단편이다. Fab' 단편은 F(ab')₂ 단편을 환원제, 예를 들어 디티오프레이톨로 처리함으로써 얻을 수 있다. 또한, 항체 단편은 재조합 세포에서 상기 단편을 코딩하는 핵산의 발현에 의해 생성될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)] 참조). 예를 들어, F(ab')₂ 단편의 일부를 코딩하는 키메라 유전자는 CH1 도메인을 코딩하는 DNA 서열 및 H쇄의 힌지 영역, 이어서 상기 말단절단된 항체 단편 분자를 생성하기 위한 번역 정지 코돈을 포함할 수 있다.

[0335] 하나의 실시양태에서, 항-TF 항체는 일가 항체, 바람직하게는 W02007059782 (젠맵 (Genmab)) (본원에 참고로 포함됨)에 설명된 바와 같이 힌지 영역이 결실된 일가 항체이다. 따라서, 하나의 실시양태에서, 항체는 일가 항체이고, 상기 항-TF 항체는

[0336] i) 상기 일가 항체의 경쇄를 코딩하는 핵산 구축물을 제공하고, 여기서 상기 구축물은 선택된 항원 특이적 항-TF 항체의 VL 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 Ig의 불변 CL 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 선택된 항원 특이적 항체의 VL 영역을 코딩하는 상기 뉴클레오타이드 서열 및 Ig의 CL 영역을 코딩하는 상기 뉴클레오타이드 서열은 함께 작동가능하게 연결되고, IgG1 아형의 경우, CL 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은, CL 영역이, 폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에 또는 동물 또는 인간에 투여될 때 CL 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와 디설피드 결합 또는 공유 결합을 형성할 수 있는 임의의 아미노산을 포함하지 않도록 변형된 것이고;

[0337] ii) 상기 일가 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산 구축물을 제공하고, 여기서 상기 구축물은 선택된 항원 특이적 항체의 VH 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 및 인간 Ig의 불변 CH 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, CH 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은, 힌지 영역에 대응하는 영역, 및 Ig 아형에 의해 필요한 경우, CH 영역의 다른 영역, 예를 들어 CH3 영역이, 폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에 또는 동물 또는 인간에 투여될 때 인간 Ig의 CH 영역의 동일한 아미노산 서열을 포함하는 다른 펩티드와 디설피드 결합 또는 공유 또는 안정한 비-공유 중쇄간 결합의 형성에 참여하는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형된 것이고, 선택된 항원 특이적 항체의 VH 영역을 코딩하는 상기 뉴클레오타이드 서열 및 상기 Ig의 CH 영역을 코딩하는 상기 뉴클레오타이드 서열은 함께 작동가능하게 연결되고;

[0338] iii) 상기 일가 항체를 생산하기 위한 세포 발현 시스템을 제공하고;

[0339] iv) (i) 및 (ii)의 핵산 구축물을 (iii)의 세포 발현 시스템의 세포에서 동시 발현시킴으로써 상기 일가 항체를 생산하는 것

[0340] 을 포함하는 방법에 의해 제조된다.

- [0341] 유사하게, 하나의 실시양태에서, 항-TF 항체는 일가 항체이고,
- [0342] (i) 본원에서 설명되는 바와 같은 본 발명의 항체의 가변 영역 또는 상기 영역의 항원 결합 부분, 및
- [0343] (ii) 면역글로불린의 C_H 영역 또는 C_H2 및 C_H3 영역을 포함하는 그의 단편
- [0344] 을 포함하며, 여기서 C_H 영역 또는 그의 단편은, 힌지 영역에 대응하는 영역, 및 면역글로불린이 IgG4 아형이 아닌 경우 C_H 영역의 다른 영역, 예를 들어 C_H3 영역이, 폴리클로날 인간 IgG의 존재 하에 동일한 C_H 영역과 디설피드 결합 또는 동일한 C_H 영역과 다른 공유 또는 안정한 비-공유 중쇄간 결합을 형성할 수 있는 임의의 아미노산 잔기를 포함하지 않도록 변형된다.
- [0345] 추가의 실시양태에서, 일가 항-TF 항체의 중쇄는 전체 힌지가 결실되도록 변형된 것이다.
- [0346] 추가의 실시양태에서, 상기 일가 항체는 IgG4 아형 (서열 113의 힌지 불포함 변이체인 서열 114 참조)이지만, C_H3 영역은 다음 아미노산 치환 중 하나 이상이 이루어지도록 변형되었다: 위치 234에서 Thr (T)은 Ala (A)로 대체되고; 위치 236의 Leu (L)은 Ala (A)로 대체되고; 위치 236의 Leu (L)은 Val (V)로 대체되고; 위치 273의 Phe (F)는 Ala (A)로 대체되고; 위치 273의 Phe (F)는 Leu (L)로 대체되고; 위치 275의 Tyr (Y)은 Ala (A)로 대체된다.
- [0347] 또 다른 추가의 실시양태에서, 상기 일가 항체의 서열은 N-연결된 글리코실화를 위한 임의의 수용자 (acceptor) 부위를 포함하지 않도록 변형된다.
- [0348] 본 발명의 항-TF 항체는 또한 단일쇄 항체를 포함한다. 단일쇄 항체는 중쇄 및 경쇄 Fv 영역이 연결된 펩티드이다. 하나의 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 항-TF 항체의 Fv 내의 중쇄 및 경쇄가 단일 펩티드 사슬에서 가요성 펩티드 링커 (일반적으로 약 10, 12, 15 또는 그 초과 아미노산 잔기의)로 연결된 단일쇄 Fv (scFv)를 제공한다. 상기 항체의 제조 방법은 예를 들어 US 4,946,778, 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)], [Bird et al., Science 242, 423-426 (1988)], [Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)] 및 [McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990)]에 기재되어 있다. 단일쇄 항체는 단지 단일 V_H 및 V_L이 사용될 경우에는 일가, 2개의 V_H 및 V_L이 사용될 경우에는 2가, 또는 2 초과 V_H 및 V_L이 사용될 경우에는 다가일 수 있다.
- [0349] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-TF 항체는 효과기 기능-결여 항체이다. 그러한 항체는 항체가 TF의 억제 효과의 차단을 통해 면역계의 자극에 사용하기 위한 것일 때 특히 유용하다. 이러한 용도를 위해, 바람직하지 않은 세포독성을 야기할 수 있기 때문에 효과기 기능, 예를 들어 ADCC를 항체가 갖지 않는 것이 유리할 수 있다.
- [0350] 하나의 실시양태에서, 효과기 기능-결여 항-TF 항체는 안정화된 IgG4 항체이다. 적합한 안정화된 IgG4 항체의 예는 카바트 등에서와 같이 EU 인덱스 (index)에 표시된 인간 IgG4의 중쇄 불변 영역 내의 위치 409의 아르기닌이 리신, 트레오닌, 메티오닌, 또는 류신, 바람직하게는 리신으로 치환되고/되거나 (WO2006033386 (기린 (Kirin))에 설명됨) 힌지 영역이 Cys-Pro-Pro-Cys 서열을 포함하는 항체이다.
- [0351] 추가의 실시양태에서, 안정화된 IgG4 항-TF 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 IgG4 항체이고, 여기서 상기 중쇄는 409에 대응하는 위치에 Lys, Ala, Thr, Met 및 Leu으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 및/또는 405에 대응하는 위치에 Ala, Val, Gly, Ile 및 Leu으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기를 갖는 인간 IgG4 불변 영역을 포함하고, 상기 항체는 임의로 하나 이상의 추가의 치환, 결실 및/또는 삽입을 포함하지만, 힌지 영역에 Cys-Pro-Pro-Cys 서열을 포함하지 않는다. 바람직하게는, 상기 항체는 409에 대응하는 위치에 Lys 또는 Ala 잔기를 포함하거나 또는 항체의 CH3 영역은 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG3의 CH3 영역으로 대체된 것이다.
- [0352] 추가의 실시양태에서, 안정화된 IgG4 항-TF 항체는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 IgG4 항체이고, 여기서 상기 중쇄는 409에 대응하는 위치에 Lys, Ala, Thr, Met 및 Leu으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기 및/또는 405에 대응하는 위치에 Ala, Val, Gly, Ile 및 Leu으로 이루어진 군으로부터 선택되는 잔기를 갖는 인간 IgG4 불변 영역을 포함하고, 상기 항체는 임의로 하나 이상의 추가의 치환, 결실 및/또는 삽입을 포함하고, 상기 항체는 힌지 영역에 Cys-Pro-Pro-Cys 서열을 포함한다. 바람직하게는, 상기 항체는 409에 대응하는 위치에 Lys 또는 Ala 잔기를 포함하거나 또는 항체의 CH3 영역은 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG3의 CH3 영역으로 대체된 것이다.

다.

- [0353] 추가의 실시양태에서, 효과기 기능-결여 항-TF 항체는 효과기 기능, 예를 들어 ADCC를 매개하는 능력이 감소되거나 심지어 제거되도록 돌연변이된, 비-IgG4 유형, 예를 들어 IgG1, IgG2 또는 IgG3의 항체이다. 상기 돌연변이는 예를 들어 문헌 [Dall'Acqua WF et al., J Immunol. 177(2):1129-1138 (2006)] 및 [Hezareh M, J Virol.;75(24):12161-12168 (2001)]에 기재되어 있다.
- [0354] 추가의 실시양태에서, 본 발명의 항체는 또 다른 모이어티 (moiety), 예를 들어 세포독성 모이어티, 방사성 동위원소 또는 약물에 접합된다. 상기 항체는 다른 모이어티를 항-TF 항체 또는 그의 단편 (예를 들어, 항-TF 항체 H쇄, L쇄, 또는 그의 항-TF 특이적/선택적 단편)의 N-말단 또는 C-말단에 화학적으로 접합시킴으로써 생산될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Antibody Engineering Handbook, edited by Osamu Kanemitsu, published by Chijin Shokan (1994)] 참조). 또한, 상기 접합된 항체 유도체는 적절한 경우 내부 잔기 또는 당에 접합시킴으로써 생성될 수 있다.
- [0355] 일반적으로, 본원에 기재된 항-TF 항체는 임의의 적합한 수의 상기 변형된 아미노산의 도입 및/또는 상기 접합된 치환체와의 회합에 의해 변형될 수 있다. 이와 관련하여 적합성은 비-유도체화된 모 항-TF 항체와 관련된 TF 선택성 및/또는 특이성을 적어도 실질적으로 보유하는 능력에 의해 일반적으로 결정된다. 하나 이상의 변형된 아미노산의 도입은 예를 들어 폴리펩티드 혈청 반감기를 증가시키거나, 폴리펩티드 항원성을 감소시키거나, 폴리펩티드 저장 안정성을 증가시키는데 유익할 수 있다. 아미노산(들)은 예를 들어 재조합 생산 동안 동시 번역에 의해 또는 번역 후에 변형되거나 (예를 들어, 포유동물 세포에서 발현 동안 N-X-S/T 모티프에서의 N-연결된 글리코실화) 또는 합성 수단에 의해 변형된다. 변형된 아미노산의 비제한적인 예는 글리코실화 아미노산, 황산화 아미노산, 프레닐화 (예를 들어, 파르네실화, 게라닐게라닐화) 아미노산, 아세틸화 아미노산, 아실화 아미노산, PEG화 아미노산, 비오틴화 아미노산, 카르복실화 아미노산, 인산화된 아미노산 등을 포함한다. 아미노산의 변형시에 당업자의 안내에 적절한 참고문헌은 본원 전체에서 충분히 제시되어 있다. 프로토콜의 예는 문헌 [Walker (1998) Protein Protocols On Cd-Rom, Humana Press, Towata, NJ]에 볼 수 있다. 변형된 아미노산은 예를 들어 글리코실화 아미노산, PEG화 아미노산, 파르네실화 아미노산, 아세틸화 아미노산, 비오틴화 아미노산, 지질 모이어티에 접합된 아미노산, 또는 유기 유도체화제에 접합된 아미노산으로부터 선택될 수 있다.
- [0356] 항-TF 항체는 또한 예를 들어 그들의 순환 반감기를 증가시키기 위해 중합체에 대한 공유 접합에 의해 화학적으로 변형될 수 있다. 예시적인 중합체 및 이들을 펩티드에 부착시키는 방법은 예를 들어 US 4,766,106, US 4,179,337, US 4,495,285 및 US 4,609,546에 예시되어 있다. 추가의 예시적인 중합체는 폴리옥시에틸화 폴리올 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) (예를 들어, 분자량이 약 1,000 내지 약 40,000, 예를 들어 약 2,000 내지 약 20,000, 예를 들어, 약 3,000-12,000 g/mol인 PEG)을 포함한다.
- [0357] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 방사성 핵종, 효소, 효소 기질, 보조인자, 형광 마커, 화학발광 마커, 펩티드 태그 (tag), 또는 자성 입자 중에서 선택되는 제2 분자에 접합된 항-TF 항체를 제공한다. 하나의 실시양태에서, 항-TF 항체는 하나 이상의 항체 단편, 핵산 (올리고뉴클레오타이드), 뉴클레아제, 호르몬, 면역조정제, 킬레이터 (chelator), 붕소 화합물, 광활성제, 염료 등에 접합될 수 있다. 이들 및 다른 적합한 물질은 본 발명의 항-TF 항체에 직접 또는 간접적으로 커플링될 수 있다. 제2 물질의 간접적인 커플링의 하나의 예는 스페이서 모이어티에 의한 커플링이다. 이들 스페이서는 다시 불용성 또는 가용성일 수 있고 (예를 들어, 문헌 [Diener et al., Science 231, 148 (1986)] 참조), 항-TF 항체로부터 표적 부위에서 및/또는 특정 조건 하에서 약물을 방출할 수 있도록 선택될 수 있다. 항-TF 항체에 커플링될 수 있는 물질의 추가의 예는 렉틴 및 형광 펩티드를 포함한다.
- [0358] 하나의 실시양태에서, 하나 이상의 방사선 표지된 아미노산을 포함하는 항-TF 항체가 제공된다. 방사선 표지된 항-TF 항체는 진단 및 치료 목적 모두를 위해 사용될 수 있다 (방사선 표지된 분자에 대한 접합이 또 다른 가능한 특징이다). 폴리펩티드에 대한 표지의 비제한적인 예는 ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, 및 ¹²⁵I, ¹³¹I, 및 ¹⁸⁶Re를 포함하고 이로 제한되지 않는다. 방사선 표지된 아미노산 및 관련 펩티드 유도체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Junghans et al., in Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2d edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven (1996))] 및 US 4,681,581, US 4,735,210, US 5,101,827, US 5,102,990 (US RE35,500), US 5,648,471 및 US 5,697,902) 참조). 예를 들어, 방사성 동위원소는 클로라민 T 방법에 의해 접합될 수 있다.
- [0359] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-TF 항체는 접합된 핵산 또는 핵산-회합 분자를 포함한다. 상기 본 발명의

한 측면에서, 접합된 핵산은 세포독성 리보뉴클레아제이다. 하나의 실시양태에서, 접합된 핵산 안티센스 핵산이다 (예를 들어, 또한 본 발명의 조합 조성물 또는 조합 투여 방법에서 독립적인 성분일 수 있는 S100A10 표적화 안티센스 분자 - 예를 들어 문헌 [Zhang et al., J Biol Chem. 279(3), 2053-62 (2004)] 참조). 하나의 실시양태에서, 접합된 핵산은 억제성 RNA 분자 (예를 들어, siRNA 분자)이다. 하나의 실시양태에서, 접합된 핵산은 면역자극성 핵산 (예를 들어, 면역자극성 CpG 모티프-함유 DNA 분자)이다. 하나의 실시양태에서, 접합된 핵산은 종양 서프레스 유전자, 항암 백신, 항암 시토킨, 또는 아폴토시스 작용제의 발현을 코딩하는 발현 카세트이다. 또한, 상기 유도체는 하나 이상의 세포독성 단백질, 예를 들어 식물 및 세균 독소의 발현을 코딩하는 핵산의 접합체를 포함할 수 있다.

[0360] 하나의 실시양태에서, 항-TF 항체는 기능적 핵산 분자에 접합된다. 기능적 핵산은 안티센스 분자, 간섭 핵산 분자 (예를 들어, siRNA 분자), 앵타머 (aptamer), 리보자임, 삼중체 형성 분자, 및 외부 가이드 (guide) 서열을 포함한다. 기능적 핵산 분자는 표적 분자가 갖는 특이적 활성의 효과기, 억제제, 조정물질 및 자극물질로서 작용할 수 있거나, 또는 기능적 핵산 분자는 임의의 다른 분자와 무관하게 새로운 (de novo) 활성을 보유할 수 있다.

[0361] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 항-TF 항체는 앵타머에 접합된다.

[0362] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 리보자임에 접합된 항-TF 항체를 제공한다.

[0363] 항-TF 항체를 접합되는 분자(들), 예를 들어 상기 설명된 것에 접합하기 위해, 문헌 [Hunter et al., Nature 144, 945 (1962)], [David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974)], [Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981)] 및 [Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982)]에 기재된 방법을 포함하는 당업계에 공지된 임의의 방법이 사용될 수 있다. 수많은 종류의 세포독성 화합물은 세포독성 화합물 상의 반응기의 사용을 통해 또는 가교결합제의 사용을 통해 단백질에 연결될 수 있다. 생체 내에서 아민과 안정한 공유 결합을 형성할 통상적인 반응기는 이소티오시아네이트이다 (Means et al., Chemical modifications of proteins (Holden-Day, San Francisco 1971) pp. 105-110). 상기 기는 리신의 ε-아민기와 우선적으로 반응한다. 말레이미드는 시스테인 상의 술폰히드릴기와 안정한 생체내 공유 결합을 형성하기 위해 통상적으로 사용되는 반응기이다 (Ji., Methods Enzymol 91, 580-609 (1983)). 모노클로날 항체는 일반적으로 방사성 금속 이온과 공유 결합을 형성할 수 없지만, 항체에 공유 연결된 킬레이팅제의 사용을 통해 간접적으로 항체에 부착될 수 있다. 킬레이팅제는 아미노산 잔기의 아민 (Meares et al., Anal. Biochem. 142, 68-78 (1984)) 및 술폰히드릴기 (Koyama, Chem. Abstr. 120, 217262t (1994)) 및 또한 탄수화물기 ([Rodwell et al., PNAS USA 83, 2632-2636 (1986)], [Quadri et al., Nucl. Med. Biol. 20, 559-570 (1993)])를 통해 부착될 수 있다. 상기 킬레이팅제는, 하나는 금속 이온에 결합하고 다른 하나는 킬레이트를 항체에 연결하는 2 종류의 관능기를 포함하기 때문에, 이들은 통상 이기능적 킬레이팅제로 언급된다 (Sundberg et al., Nature 250, 587-588 (1974)).

[0364] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 치료 모이어티, 예를 들어 세포독소, 화학요법 약물, 면역억제제 또는 방사성 동위원소에 접합된 항-TF 항체, 예를 들어 인간 항-TF 항체를 제공한다. 상기 접합체는 본원에서 "면역접합체"로 언급된다. 하나 이상의 세포독소를 포함하는 면역접합체는 "면역독소"로 언급된다.

[0365] 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한 (예를 들어, 치사시키는) 임의의 물질을 포함한다. 당업계에 잘 공지되어 있는 이들 클래스의 약물 및 그의 작용 메커니즘의 상세한 설명에 대해서는 문헌 [Goodman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics, 8th Ed., Macmillan Publishing Co., 1990]을 참조한다. 항체 면역독소의 제조에 관한 추가의 기술은 예를 들어 문헌 [Vitetta, Immunol. Today 14, 252 (1993)] 및 US 5,194,594에 제시되어 있다.

[0366] 본 발명의 면역접합체를 형성하기 위한 적합한 치료제는 탁솔, 시토킨 B, 그라미시딘 D, 에티뮬브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디히드로록시 안트라신 디온, 미톡산트론, 미트라마이신, 악티노마이신 D, 1-데히드로-테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤 및 푸로마이신, 항대사물질 (예를 들어, 메토폰트렉레이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 플루다라빈, 5-플루오로우라실, 데카르바진, 히드록시우레아, 아스파라기나제, 겐시타빈, 클라드리빈), 알킬화제 (예를 들어, 메클로레타민, 티오에프, 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU), 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 다카르바진 (DTIC), 프로카르바진, 미토마이신 C, 시스플라틴 및 다른 백금 유도체, 예를 들어 카르보플라틴), 항생제 (예를 들어, 닥티노마이신 (이전의 악티노마이신), 블레오마이신, 다우노루비신 (이전의 다우노마이신), 독소루비신, 이다루비신, 미트라마이신, 미토마이신, 미톡산트론, 플리카마이신, 안트라마이신 (AMC)), 디프테

리아 독소 및 관련 분자 (예를 들어, 디프테리아 A 사슬 및 그의 활성 단편 및 혼성체 (hybrid) 분자), 리신 독소 (예를 들어, 리신 A 또는 탈글리코실화 리신 A 사슬 독소), 콜레라 독소, 시가 (Shiga)-유사 독소 (SLT-I, SLT-II, SLT-IIV), LT 독소, C3 독소, 시가 독소, 백일해 독소, 과상풍 독소, 대두 보우만-버크 (Bowman-Birk) 프로테아제 억제제, 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 외독소, 알로린, 사포린, 모데신, 젤라닌, 아브린 A 사슬, 모데신 A 사슬, 알파-사르신, 알류리테스 포르디이 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나 (*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사포나리아 오피시날리스 (*saponaria officinalis*) 억제제, 젤로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신 및 에노마이신 독소를 포함한다. 다른 적합한 접합된 분자는 리보뉴클레아제 (RNase), DNase I, 스타필로코커스 (*Staphylococcal*) 장독소-A, 역새폴 항바이러스 단백질, 디프테린 독소, 및 슈도모나스 내독소를 포함한다. 예를 들어, 문헌 ([Pastan et al., Cell 47, 641 (1986)] 및 [Goldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994)])을 참조한다. 또한, 본원에서 설명되는 본 발명의 항-TF 항체와 조합으로 투여될 수 있는 치료제는 본 발명의 항-TF 항체에 접합하기 위해 유용한 치료 모이어티에 대한 후보일 수 있다.

- [0367] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-TF 항체는 방사성 동위원소에 대한 항체의 접합을 허용하는 킬레이터 링커, 예를 들어 티옥세탄에 부착된다.
- [0368] 추가의 측면에서, 본 발명은 상기 본원에서 설명되는 본 발명의 항-TF 항체 및 제2 결합 특이성, 예를 들어 인간 효과기 세포, 인간 Fc 수용체 또는 T 세포 수용체에 대한 결합 특이성, 또는 TF의 또 다른 에피토프에 대한 결합 특이성을 포함하는 이중특이적 분자에 관한 것이다.
- [0369] 본 발명의 이중특이적 분자는 항-TF 결합 특이성 및 인간 효과기 세포, 인간 Fc 수용체 또는 T 세포 수용체에 대한 결합 특이성에 추가로 제3 결합 특이성을 추가로 포함할 수 있다.
- [0370] 본 발명의 예시적인 이중특이적 항체 분자는 (i) 2개의 항체 (TF에 특이성을 갖는 하나 및 함께 접합되는 제2 표적에 특이성을 갖는 다른 것), (ii) TF에 특이적인 하나의 사슬 및 제2 분자에 특이적인 제2 사슬을 갖는 단일 항체, 및 (iii) TF 및 제2 분자에 특이성을 갖는 단일쇄 항체를 포함한다. 대개, 제2 표적/제2 분자는 TF 이외의 분자이다. 하나의 실시양태에서, 제2 분자는 암 항원/종양-연관 항원, 예를 들어 암배아 항원 (CEA), 전립선 특이적 항원 (PSA), RAGE (신장 항원), α -태아단백질, CAMEL (흑색종 상의 CTL-인식된 항원), CT 항원 (예를 들어, MAGE-B5, -B6, -C2, -C3 및 D; Mage-12; CT10; NY-ESO-1, SSX-2, GAGE, BAGE, MAGE 및 SAGE), 뮤신 항원 (예를 들어, MUC1, 뮤신-CA125 등), 강글리오시드 항원, 티로시나제, gp75, C-myc, Mart1, MelanA, MUM-1, MUM-2, MUM-3, HLA-B7, 및 Ep-CAM이다. 하나의 실시양태에서, 제2 분자는 암-연관 인테그린, 예를 들어 $\alpha 5 \beta 3$ 인테그린이다. 하나의 실시양태에서, 제2 분자는 혈관신생 인자 또는 다른 암-연관 성장 인자, 예를 들어 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 섬유모세포 성장 인자 (FGF), 표피 성장 인자 (EGF), 표피 성장 인자 수용체 (EGFR), 안지오킨, 및 그의 수용체, 특히 암 진행과 연관된 수용체 (예를 들어, HER1-HER4 수용체 중 하나, c-met 또는 RON)이다. 본원에서 논의된 다른 암 진행-연관 단백질이 또한 적합한 제2 분자일 수 있다.
- [0371] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 이중특이적 항체는 디아바디이다. 이중특이적 항체는 또한 가교결합된 또는 "이중접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이중접합체 내의 항체 중 하나는 아비딘에 커플링되고 다른 것은 비오틴에 커플링될 수 있다. 그러한 항체는 예를 들어, 면역계 세포를 원치않는 세포에 표적화시키는 것으로 제안되었다 (예를 들어 US 4,676,980 참조). 이중접합체 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0372] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항체를 코딩하는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0373] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 발현 벡터는 서열 1-112로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0374] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 발현 벡터는 서열 9, 1, 5, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49 및 53으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 VH 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0375] 특정 실시양태에서, 본 발명의 발현 벡터는 서열 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52 및 56으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 VH CDR3 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0376] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 발현 벡터는 서열 65, 57, 61, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101

및 105로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 VL 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0377] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 발현 벡터는 서열 60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104 및 108로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 VL CDR3 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0378] 특정 실시양태에서, 본 발명의 발현 벡터는 하나 이상의 상기 아미노산 서열의 변이체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서, 상기 변이체는 최대 25개의 아미노산 변형, 예를 들어 20, 예를 들어 최대 15, 14, 13, 12 또는 11개의 아미노산 변형, 예를 들어 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입, 바람직하게는 치환, 예를 들어 보존적 치환 또는 임의의 상기 서열에 적어도 80% 동일성, 예를 들어 임의의 상기 언급된 아미노산 서열에 적어도 85% 동일성 또는 90% 동일성 또는 95% 동일성, 예를 들어 96% 동일성 또는 97% 동일성 또는 98% 동일성 또는 99% 동일성을 갖는다.

[0379] 추가의 실시양태에서, 발현 벡터는 항체, 예를 들어 인간 항체의 경쇄 또는 중쇄, 또는 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 불변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함한다.

[0380] 그러한 발현 벡터는 본 발명의 항체의 재조합 생산을 위해 사용될 수 있다.

[0381] 본 발명의 문맥에서 발현 벡터는 임의의 적합한 벡터, 예를 들어 염색체, 비-염색체, 및 합성 핵산 벡터 (적합한 세트의 발현 제어 요소를 포함하는 핵산 서열)일 수 있다. 그러한 벡터의 예는 SV40의 유도체, 세균 플라스미드, 파지 DNA, 바큇로바이러스, 효모 플라스미드, 플라스미드와 파지 DNA의 조합물로부터 유래된 벡터, 및 바이러스 핵산 (RNA 또는 DNA) 벡터를 포함한다. 하나의 실시양태에서, 항-TF 항체-코딩 핵산은 네이키드 (naked) DNA 또는 RNA 벡터, 예를 들어, 선형 발현 요소 (예를 들어, 문헌 [Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)]에 설명된 바와 같이), 압축형 (compacted) 핵산 벡터 (예를 들어, US 6,077,835 및/또는 WO 00/70087에 설명된 바와 같이), 플라스미드 벡터, 예를 들어 pBR322, pUC 19/18, 또는 pUC 118/119, "미지 (midgie)" 최소 크기의 핵산 벡터 내에 (예를 들어 문헌 [Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)]에 설명된 바와 같이), 또는 침전된 핵산 벡터 구축물, 예를 들어 CaPO₄-침전된 구축물로서 (예를 들어 WO 00/46147, [Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986)], [Wigler et al., Cell 14, 725 (1978)] 및 [Coraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)]에 설명된 바와 같이) 포함된다. 그러한 핵산 벡터 및 그의 용도는 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어 US 5,589,466 및 US 5,973,972 참조).

[0382] 하나의 실시양태에서, 벡터는 세균 세포 내에서 항-TF 항체의 발현을 위해 적합하다. 상기 벡터의 예는 발현 벡터, 예를 들어 BlueScript (스트라타젠 (Stratagene)), pIN 벡터 (Van Heeke & Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)), pET 벡터 (노바젠 (Novagen, 미국 위스콘신주 매디슨))을 포함한다.

[0383] 발현 벡터는 또한 또는 별법으로 효모 시스템 내의 발현을 위해 적합한 벡터일 수 있다. 효모 시스템 내의 발현을 위해 적합한 임의의 벡터가 사용될 수 있다. 적합한 벡터는 예를 들어, 알파 인자, 알콜 옥시다제 및 PGH와 같은 구성적 또는 유도가능 프로모터를 포함하는 벡터를 포함한다 (문헌 [F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987)], 및 [Grant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)]에서 검토됨).

[0384] 핵산 및/또는 벡터는 폴리펩티드, 예를 들어 발생 (nascent) 폴리펩티드 사슬을 주변세포질 공간에 또는 세포 배양 배지 내로 표적화할 수 있는 분비/국재화 (localization) 서열을 코딩하는 핵산 서열을 또한 포함할 수 있다. 그러한 서열은 당업계에 공지되어 있고, 분비 리더 (leader) 또는 신호 펩티드, 소기관 표적화 서열 (예를 들어, 핵 국재화 서열, ER 체류 신호, 미토콘드리아 수송 서열, 엽록체 수송 서열), 막 국재화/앵커 서열 (예를 들어, 이동 종결 (stop transfer) 서열, GPI 앵커 서열) 등을 포함한다.

[0385] 본 발명의 발현 벡터에서, 항-TF 항체-코딩 핵산은 임의의 적합한 프로모터, 인핸서, 및 다른 발현-촉진 요소를 포함하거나 그와 회합될 수 있다. 그러한 요소의 예는 강한 발현 프로모터 (예를 들어, 인간 CMV IE 프로모터/인핸서 및 RSV, SV40, SL3-3, MMTV 및 HIV LTR 프로모터), 효과적인 폴리(A) 종결 서열, 이. 콜라이 (*E. coli*) 내에서 플라스미드 생성물에 대한 복제 기점, 선택가능 마커로서 항생제 내성 유전자, 및/또는 편리한 클로닝 부위 (예를 들어, 폴리링커)를 포함한다. 핵산은 또한 CMV IE와 같은 구성적 프로모터에 반대되는 유도가능 프로모터를 또한 포함할 수 있다 (당업자는 그러한 용어가 특정 조건 하에 유전자 발현 정도의 실제 서술어임을 알 것이다).

[0386] 하나의 실시양태에서, 항-TF-항체-코딩 발현 벡터는 바이러스 벡터를 통해 숙주 세포 또는 숙주 동물 내에 배치

되고/되거나 전달될 수 있다.

- [0387] 또한 추가의 측면에서, 본 발명은 본원에서 정의되는 본 발명의 항체 또는 본원에서 정의되는 본 발명의 이중특이적 분자를 생산하는 재조합 진핵 또는 원핵 숙주 세포, 예를 들어 트랜스펙토마에 관한 것이다. 숙주 세포의 예는 효모, 세균 및 포유동물 세포, 예를 들어 CHO 또는 HEK 세포를 포함한다. 예를 들어, 하나의 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 항-TF 항체의 발현을 코딩하는 서열을 포함하는 세포 계능 내로 안정하게 통합된 핵산을 포함하는 세포를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 항-TF 항체의 발현을 코딩하는 서열을 포함하는, 비-통합된 핵산, 예를 들어 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 또는 선형 발현 요소를 포함하는 세포를 제공한다.
- [0388] 추가의 측면에서, 본 발명은 본원에서 정의되는 본 발명의 항체를 생산하는 하이브리도마에 관한 것이다. 또한 추가의 측면에서, 본 발명은 인간 중쇄 및 인간 경쇄를 코딩하는 핵산을 포함하는 트랜스제닉 비-인간 동물에 관한 것이고, 여기서 동물 또는 식물은 본 발명의 항체를 생산한다. 그러한 하이브리도마 및 트랜스제닉 동물의 생성은 상기 설명되었다.
- [0389] 추가의 측면에서, 본 발명은
- [0390] a) 상기 본원에서 설명되는 본 발명의 하이브리도마 또는 숙주 세포를 배양하고,
- [0391] b) 배양 배지로부터 본 발명의 항체를 정제하는 단계
- [0392] 를 포함하는, 본 발명의 항-TF 항체의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0393] 추가의 주요 측면, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 본원에서 정의되는 항-TF 항체 또는 본원에서 정의되는 이중특이적 분자에 관한 것이다.
- [0394] 또한 추가의 측면에서, 본 발명은
- [0395] - 본원에서 정의되는 항-TF 항체 또는 본원에서 정의되는 이중특이적 분자, 및
- [0396] - 제약상 허용되는 담체
- [0397] 를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.
- [0398] 제약 조성물은 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995]에 개시된 것과 같은 통상적인 기술에 따라 제약상 허용되는 담체 또는 희석제 및 임의의 다른 공지된 보조제 및 부형제를 사용하여 제형화될 수 있다.
- [0399] 제약상 허용되는 담체 또는 희석제 및 임의의 다른 공지된 보조제 및 부형제는 본 발명의 선택된 화합물 및 선택된 투여 방식에 적합해야 한다. 제약 조성물의 담체 및 다른 성분에 대한 적합성은 항원 결합에 대한 본 발명의 선택된 화합물 또는 제약 조성물의 목적하는 생물학적 특성에 대한 유의한 부정적인 영향의 결여 (예를 들어, 실질적이지 않은 영향 (10% 이하의 상대적인 억제, 5% 이하의 상대적인 억제 등))에 기초하여 결정된다.
- [0400] 본 발명의 제약 조성물은 희석제, 충전제, 염, 버퍼, 세제 (예를 들어, 비이온성 세제, 예를 들어 트윈 (Tween)-20 또는 트윈-80), 안정화제 (예를 들어, 당 또는 단백질-유리 아미노산), 보존제, 조직 고정제, 가용화제 및/또는 제약 조성물에 포함시키기 적합한 다른 물질을 또한 포함할 수 있다.
- [0401] 암 세포, 예를 들어 인간 결장직장암 세포에서, TF 발현은 MEK/유사분열촉진물질-활성화된 단백질 키나제 (MAPK) 및 포스포티로시닐 3'-키나제 (PI3K)에 의존적인 방식으로 질병 진행을 일으키는 2가지 주요 전환 사건 (K-ras 종양유전자의 활성화 및 p53 종양 서프레서의 불활성화)의 제어 하에 있는 것으로 보고되었다 (Yu et al. (2005) Blood 105: 1734).
- [0402] TF를 과다발현하는 암 세포는 세포당 보다 많은 항체가 결합할 수 있으므로 본 발명의 항-TF 항체에 대한 특히 우수한 표적일 수 있다. 따라서, 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-TF 항체로 치료할 암 환자는 그들의 종양 세포 내에서 K-Ras에서 하나 이상의 돌연변이 및/또는 p53에서 하나 이상의 돌연변이가 있는 것으로 진단된 환자, 예를 들어 췌장암, 폐암 또는 결장직장암 환자이다.
- [0403] 별도의 실시양태에서, 본 발명의 항-TF 항체로 치료할 환자는 K-Ras에서 돌연변이를 갖지 않는 환자, 예를 들어 췌장암, 폐암 또는 결장직장암 환자이다. 임의의 특정한 이론에 매이지는 않지만, 세포내 신호전달 메커니즘에 대한 항-TF 항체의 효과가 K-Ras가 활성화되는 세포 내에서 덜 효과적일 수 있으므로 K-Ras 활성화를 가진 일부

종양 세포는 항-TF 항체 치료에 대해 덜 감수성인 것이 가능하다.

- [0404] 본 발명의 제약 조성물 내의 활성 성분의 실제 투여량 수준은 환자에게 독성이 없으면서 특정 환자, 조성물, 및 투여 방식에 대해 목적하는 치료 반응을 달성하기 위해 효과적인 활성 성분의 양을 얻을 수 있기 위해 변화될 수 있다. 선택된 투여량 수준은 사용되는 본 발명의 특정 조성물 또는 그의 아미드의 활성, 투여 경로, 투여의 시간, 사용되는 특정 화합물의 배출 속도, 치료 지속 기간, 사용되는 특정 조성물과 조합으로 사용되는 다른 약물, 화합물 및/또는 물질, 치료받는 환자의 연령, 성별, 체중, 상태, 전반적인 건강 및 사전 의료력, 및 의학 분야에 잘 공지된 기타 인자와 같은 다양한 약동학 인자에 따라 결정될 것이다.
- [0405] 제약 조성물은 임의의 적합한 경로 및 방식으로 투여될 수 있다. 생체 내에서 및 시험관 내에서 본 발명의 화합물을 투여하는 적합한 경로는 당업계에 공지되어 있고, 당업자가 선택할 수 있다.
- [0406] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물은 비경구로 투여된다.
- [0407] 문구 "비경구 투여" 및 "비경구로 투여되는"은 본원에서 사용될 때 장관 및 국소 투여 이외의 투여 방식, 대체로 주사에 의한 것을 의미하고, 표피, 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 낭내, 안와내, 심장내, 피부내, 복강내, 건내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 낭하, 거미막하, 척수내, 두개내, 흉곽내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 포함한다.
- [0408] 하나의 실시양태에서, 제약 조성물은 정맥내 또는 피하 주사 또는 주입에 의해 투여된다.
- [0409] 제약상 허용되는 담체는 본 발명의 화합물과 생리학상 상용성인 임의의 모든 적합한 용매, 분산 매질, 코팅, 향균 및 항진균제, 등장화제, 항산화제 및 흡수 지연제 등을 포함한다.
- [0410] 본 발명의 제약 조성물에 사용될 수 있는 적합한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 염수, 포스페이트 완충 염수, 에탄올, 텍스트로스, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로판디올, 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 그의 적합한 혼합물, 식물유, 예를 들어 올리브유, 옥수수유, 땅콩유, 면실유 및 참기름, 카르복시메틸 셀룰로스 콜로이드 용액, 트라가칸트 겜 및 주사가 가능한 유기 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트, 및/또는 다양한 버퍼를 포함한다. 다른 담체는 제약 분야에 잘 공지되어 있다.
- [0411] 제약상 허용되는 담체는 멸균 수용액 또는 분산액, 및 멸균 주사가 가능 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 제약 활성 물질에 대한 그러한 매질 및 물질의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 물질이 활성 화합물에 부적합한 경우를 제외하고는, 본 발명의 제약 조성물 내에서 그의 사용이 고려된다.
- [0412] 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질의 사용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0413] 또한, 본 발명의 제약 조성물은 제약상 허용되는 항산화제, 예를 들어 (1) 수용성 항산화제, 예를 들어 아스코르브산, 시스테인 염산염, 중황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 아황산나트륨 등; (2) 지용성 항산화제, 예를 들어 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔 (BHT), 레시틴, 프로파일 갈레이트, 알파-토코페롤 등; 및 (3) 금속 킬레이팅제, 예를 들어 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산 (EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등을 또한 포함할 수 있다.
- [0414] 본 발명의 제약 조성물은 조성물 내에 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예를 들어 만니톨, 소르비톨, 글리세롤 또는 염화나트륨을 또한 포함할 수 있다.
- [0415] 본 발명의 제약 조성물은 제약 조성물의 저장 수명 또는 유효성을 향상시킬 수 있는, 선택된 투여 경로에 적절한 하나 이상의 보조제, 예를 들어 보존제, 습윤제, 유화제, 분산제, 보존제 또는 버퍼를 또한 함유할 수 있다. 본 발명의 화합물은 임플란트, 경피 패치 및 미세캡슐화된 전달계를 포함한 제어 방출 제형과 같은, 신속한 방출에 대해 화합물을 보호할 담체를 사용하여 제조할 수 있다. 그러한 담체는 젤라틴, 글리세릴 모노스테아레이트, 글리세릴 디스테아레이트, 생분해성의 생체적합성 중합체, 예를 들어 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안히드라이드 (polyanhydride), 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르쏘에스테르, 및 폴리락트산을 단독으로 또는 왁스와 함께, 또는 당업계에 공지된 다른 물질을 포함할 수 있다. 그러한 제형의 제조 방법은 당업자에게 일반적으로 공지되어 있다 (예를 들어, [Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978] 참조).
- [0416] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 생체 내에서 적합한 분포를 보장하도록 제형화될 수 있다. 비경구

투여를 위한 제약상 허용되는 담체는 멸균 수용액 또는 분산액, 및 멸균 주사가능 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 제약 활성 물질에 대한 그러한 매질 및 물질의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 물질이 활성 화합물에 부적합한 경우를 제외하고는, 본 발명의 제약 조성물 내에서 그의 사용이 고려된다. 보충적인 활성 화합물이 또한 조성물 내로 포함될 수 있다.

[0417] 주사용 제약 조성물은 대개 무균성이고 제조 및 저장 조건 하에 안정해야 한다. 조성물은 용액, 마이크로에멀전, 리포솜, 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 규칙 구조 (ordered structure)로서 제형화될 수 있다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리에올 (예를 들어, 글리세롤, 프로판디올, 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 그의 적합한 혼합물, 식물유, 예를 들어 올리브유, 및 주사가능한 유기 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트를 함유하는 수성 또는 비수성 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적합한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에, 등장제, 예를 들어, 당, 폴리알콜, 예를 들어 글리세롤, 만니톨, 소르비톨 또는 염화나트륨을 조성물 내에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사가능한 조성물의 지속 흡수는 조성물 내에 흡수를 지연시키는 물질, 예를 들어, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함시킴으로써 일어날 수 있다. 멸균 주사가능 용액은 요구되는 양의 활성 화합물을 적절한 용매 내에 요구되는 경우에 상기 열거된 성분 중 하나 또는 그의 조합물과 함께 포함시킨 후 멸균 미세여과하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것 중의 요구되는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내에 포함시켜 제조한다. 멸균 주사가능 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 제조 방법의 예는 미리 멸균-여과시킨 그의 용액으로부터 활성 성분 + 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 생성시키는 진공 건조 및 동결-건조 (동결건조)이다.

[0418] 멸균 주사가능 용액은 요구되는 양의 활성 화합물을 적절한 용매 내에, 요구되는 경우에 상기 열거된 성분 중 하나 또는 그의 조합물과 함께 혼합한 후 멸균 미세여과하여 제조할 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 기본 분산 매질 및 상기 열거된 것 중의 요구되는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내에 포함시켜 제조한다. 멸균 주사가능 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 제조 방법의 예는 미리 멸균-여과시킨 그의 용액으로부터 활성 성분 + 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 생성시키는 진공 건조 및 동결-건조 (동결건조)이다.

[0419] 본 발명의 제약 조성물은 본 발명의 하나의 화합물 또는 본 발명의 화합물들의 조합물을 함유할 수 있다.

[0420] 상기한 바와 같이, 또 다른 측면에서, 본 발명은 의약으로서 사용하기 위한 본원에서 정의되는 본 발명의 항체 또는 본원에서 정의되는 본 발명의 이중특이적 분자에 관한 것이다.

[0421] 본 발명의 항-TF 항체는 많은 목적으로 사용될 수 있다. 특히, 본 발명의 항체는 다양한 형태의 암의 치료를 위해 사용될 수 있다. 한 측면에서, 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 중추 신경계의 종양, 두경부암, 폐암 (예를 들어, 비-소세포 폐암), 유방암, 식도암, 위암, 간 및 담도암, 췌장암, 결장직장암, 방광암, 신장암, 전립선암, 자궁내막암, 난소암, 악성 흑색종, 육종 (연조직, 예를 들어 뼈 및 근육), 원발 부위 미상의 종양 (즉, 미지의 원발 종양), 백혈병, 골수암 (예를 들어, 다발 골수종), 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병 및 비-호지킨 (Hodgkin) 림프종, 피부암, 신경아교종, 뇌, 자궁 및 직장의 암과 같은 다양한 고형암 종류의 치료를 위해 사용된다.

[0422] 추가의 자가면역 염증, 예를 들어 근병증 또는 다발 경색증이 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체로 표적화될 수 있다.

[0423] 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 지혈의 치료를 위해 또한 유용할 수 있다.

[0424] 암 관련 지혈 장애가 또한 본 발명에 의해 표적화될 수 있다.

[0425] 염증이 있는 추가의 질병, 예를 들어 근병증, 류마티스 관절염, 골관절염, 강직 척추염, 통풍, 척추관절병증, 강직 척추염, 라이터 (Reiter) 증후군, 건선 관절병증, 장병성 척추염, 연소성 관절병증, 반응성 관절병증, 감염 또는 감염후 관절염, 결핵 관절염, 바이러스 관절염, 진균 관절염, 매독 관절염, 사구체신염, 말기 신장 질병, 전신 홍반 루푸스, 크론병 (mb. Crohn), 궤양 대장염, 염증성 잘 질병, 낭성 섬유증, 만성 폐쇄성 폐 질병 (COPD), 천식, 알러지성 천식, 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 특발성 폐 섬유증, 또는 다발 경색증이 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체로 표적화될 수 있다.

[0426] 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 지혈의 치료를 위해 또한 유용할 수 있다.

[0427] 암 관련 지혈 장애가 또한 본 발명에 의해 표적화될 수 있다.

- [0428] 또한 비제한적으로 습식 AMD를 포함한, 혈관 재협착증, 심근 혈관 질병, 뇌 혈관 질병, 망막병증 및 황반 변성과 같은 혈관 질병이 항-TF 모노클로날 항체로 치료될 수 있다.
- [0429] 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 비제한적으로 급성 심근 경색, 뇌졸중을 포함한, 죽상경화증, 고혈압, 당뇨병, 이상지질혈증 및 급성 관상 증후군과 같은 심혈관 위험이 있는 환자의 치료를 위해 또한 유용할 수 있다.
- [0430] 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 DVT, 신장 색전증, 폐 색전증, 동맥 혈전증과 같은 혈전증의 억제를 위해, 또는 동맥 수술, 말초 혈관 우회로 이식술 또는 관상 동맥 우회로 이식술, 동맥-정맥 셉트 (shunt); 스텐트 (stent) 또는 카테터 (catheter)와 같은 설치물의 제거 후 발생하는 혈전증을 치료하기 위해 또한 유용할 수 있다.
- [0431] 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 신장 허혈성 재관류 손상의 억제를 위해 또한 유용할 수 있다.
- [0432] 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 고지질단백혈증, 부갑상선기능항진증의 치료를 위해 또한 유용할 수 있다.
- [0433] 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 혈관염, ANCA-양성 혈관염, 베체트 (Behcet) 질병의 치료를 위해 또한 유용할 수 있다.
- [0434] 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 또한 외상-유도된 호흡기 부전증, 예를 들어 급성 호흡 곤란 증후군, 급성 폐 손상을 차단하기 위해 유용할 수 있다.
- [0435] 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 감염-유도된 장기 기능장애, 예를 들어 신 부전증, 급성 호흡 곤란 증후군, 급성 폐 손상을 차단하기 위해 또한 유용할 수 있다.
- [0436] 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 혈관성형술, 심근 경색, 불안정 협심증 및 관상 동맥 협착증으로부터 발생할 수 있는 다양한 혈전색전성 질환을 치료하기 위해 또한 유용할 수 있다.
- [0437] 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 폐혈증 또는 폐렴과 같은 전신 감염에 대한 TF-매개 합병증을 치료하기 위해 예방 상황에서 또한 유용할 수 있다.
- [0438] 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 혈전증 위험이 있는 죽상경화성 혈관이 있는 환자의 예방 치료로서 또한 유용할 수 있다.
- [0439] 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 또한 이식편 대 숙주 질병의 치료를 위해 유용할 수 있다.
- [0440] 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 또한 체도 이식에서 베타 세포 생착을 증가시키기 위해, 심장 동종이식 혈관병증 (CAV)을 예방하기 위해, 또는 급성 이식 거부를 예방하기 위해 유용할 수 있다.
- [0441] 본 발명의 항-TF 모노클로날 항체는 비제한적으로 혈관 혈전증, II형 당뇨병, AMI, 폐 동맥 고혈압과 같은, 순환 조직-인자 노출 미세입자가 존재하는 질병의 치료를 위해 또한 유용할 수 있다.
- [0442] 유사하게, 본 발명은 그를 필요로 하는 개체에게 본 발명의 항체 또는 이중특이적 분자를 투여하는 것을 포함하는, TF를 발현하는 종양 세포의 성장 및/또는 증식의 억제 방법에 관한 것이다. 하나의 실시양태에서, 상기 종양 세포는 암, 예를 들어 전립선암, 폐암 (예를 들어, 비-소세포 폐암), 유방암, 결장직장암 (예를 들어, 전이 결장직장암), 췌장암, 자궁내막암, 난소암, 피부 흑색종, 백혈병 골수암 (예를 들어, 다발 골수종), 급성 림프모구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병 및 비-호지킨 림프종, 피부암, 전립선암, 신경아교종, 뇌, 신장, 자궁, 방광 및 직장의 암에 연관된다.
- [0443] 또한, 본 발명은 상기 언급된 특정한 암 적응증 중 하나와 같은 암 치료용 의약의 제조를 위한 인간 TF에 결합하는 모노클로날 항체의 용도에 관한 것이다.
- [0444] 한 실시양태에서, 항-TF 항체를 사용하여 치료할 환자의 선택은 그들의 소변 및/또는 혈액 내에 조직 인자 (TF)의 수준에 기초한다. 특정 실시양태에서, 치료할 환자는 소변 및/또는 혈액 내에 비교적 높은 수준의 TF를 갖는다. 예를 들어, 치료할 환자는 소변 내의 TF 수준이 20 ng/ml 초과, 예를 들어 40 ng/ml 초과, 예를 들어 100 ng/ml 초과, 예를 들어 200 ng/ml 초과일 수 있다. 별법으로 또는 또한, 환자의 혈청 내의 TF 수준은 100 pg/ml 초과, 예를 들어 200 pg/ml 초과일 수 있다. 이는 예를 들어 ELISA를 이용하여 결정할 수 있다.
- [0445] 본 발명의 치료 방법의 추가의 실시양태에서, 치료의 효능을 치료 동안, 예를 들어 소정의 시점에 모니터링한다. 하나의 실시양태에서, 효능을 예를 들어 ELISA에 의해 소변 또는 혈액 내의 TF 수준을 측정함으로써 모니터링할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 효능을 질병 영역의 시각화에 의해, 예를 들어 본 발명의 표

지된 항-TF 항체와 같은 표지된 항-TF 항체를 예를 들어 사용하여 하나 이상의 PET-CT 스캔 (scan)을 수행함으로써 결정할 수 있다. 또한, 본 발명의 표지된 항-TF 항체와 같은 표지된 항-TF 항체는 예를 들어 PET-CT 스캔을 이용하여 TF-생산 종양을 검출하기 위해 사용될 수 있다.

[0446] 상기 치료 및 사용 방법에서 투여 요법은 최적의 목적하는 반응 (예를 들어, 치료 반응)을 제공하기 위해 조정된다. 예를 들어, 단일 볼러스를 투여할 수 있거나, 몇몇 분할 용량을 시간 경과에 따라 투여할 수 있거나, 치료 상황의 응급성에 따라 용량을 비례적으로 감소 또는 증가시킬 수 있다. 비경구 조성물은 투여의 용이성과 투여량의 균일성을 위해 단위 투여 형태로 제형화할 수 있다. 본원에서 사용되는 단위 투여 형태는 치료할 대상체에 대한 단일 투여량으로서 적합한 물리학적 구분되는 단위를 나타내고; 각각의 단위는 요구되는 제약상 담체와 공동으로 목적하는 치료 효과를 생산하기 위해 계산된 소정량의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 단위 투여 형태에 대한 상세내역은 (a) 활성 화합물의 특유한 특징 및 달성할 특정 치료 효과, 및 (b) 개체에서 감수성의 치료를 위한 그러한 활성 화합물을 화합하는 분야에 고유한 한계에 의해 지시되고 그에 직접 의존한다.

[0447] 항-TF 항체에 대한 효율적인 투여량 및 투여 요법은 치료할 질병 또는 병태에 의존적이고 담당자가 결정할 수 있다. 본 발명의 화합물의 치료 유효량에 대한 예시적인 비-제한적 범위는 약 0.1-100 mg/kg, 예를 들어 약 0.1-50 mg/kg, 예를 들어 약 0.1-20 mg/kg, 예를 들어 약 0.1-10 mg/kg, 예를 들어 약 0.5, 예를 들어 약 0.3, 약 1 또는 약 3 mg/kg이다.

[0448] 당업계의 통상의 기술을 가진 의사 또는 수의사는 요구되는 제약 조성물의 유효량을 쉽게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 의사 또는 수의사는 제약 조성물에서 사용되는 항-TF 항체의 용량을 목적하는 치료 효과를 달성하기 위해 요구되는 것보다 더 낮은 수준에서 시작하여 목적하는 효과가 달성될 때까지 투여량을 점차 증가시킬 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 조성물의 적합한 일일 용량은 치료 효과를 생성하기 위해 효과적인 최저 용량인 화합물의 양일 것이다. 그러한 유효 용량은 일반적으로 상기 설명된 인자에 따라 결정될 것이다. 투여는 예를 들어 정맥내, 근육내, 복강내, 또는 피하 투여될 수 있고, 예를 들어 표적의 부위에 근접하게 투여된다. 원하는 경우에, 제약 조성물의 효과적인 일일 용량은 따로 투여되는 2, 3, 4, 5, 6 이상의 하위-용량으로서 하루 내내 적절한 간격으로 임의로 단위 투여형으로 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물을 단독으로 투여하는 것이 가능하지만, 화합물을 상기 설명된 바와 같은 제약 조성물로서 투여하는 것이 바람직하다.

[0449] 하나의 실시양태에서, 항-TF 항체는 10 내지 500 mg/m², 예를 들어 200 내지 400 mg/m²의 매주 투여량으로 주입에 의해 투여할 수 있다. 그러한 투여는 예를 들어, 1 내지 8회, 예를 들어 3 내지 5회 반복할 수 있다. 투여는 2 내지 24시간, 예를 들어 2 내지 12시간의 기간에 걸쳐 연속 주입에 의해 수행할 수 있다.

[0450] 하나의 실시양태에서, 항-TF 항체는 독성 부작용을 감소시키기 위해 장기간, 예를 들어 24시간 초과에 걸쳐 느린 연속 주입에 의해 투여할 수 있다.

[0451] 하나의 실시양태에서, 항-TF 항체는 250 mg 내지 2000 mg, 예를 들어 300 mg, 500 mg, 700 mg, 1000 mg, 1500 mg 또는 2000 mg의 매주 투여량으로 8회까지, 예를 들어 4 내지 6회 투여할 수 있다. 투여는 2 내지 24시간, 예를 들어 2 내지 12시간의 기간에 걸쳐 연속 주입에 의해 수행할 수 있다. 그러한 요법은 필요한 경우에 예를 들어, 6개월 또는 12개월 후에 1회 이상 반복될 수 있다. 투여량은 예를 들어, 생물학적 샘플을 취하고 본 발명의 항-TF 항체의 항원 결합 영역을 표적으로 하는 항-개별특이형 항체를 사용함으로써, 투여 시에 혈액 내의 본 발명의 화합물의 양을 측정함으로써 결정되거나 조정될 수 있다.

[0452] 하나의 실시양태에서, 항-TF 항체는 예를 들어, 6개월 이상의 기간 동안 매주 1회와 같은 유지 요법에 의해 투여될 수 있다.

[0453] 하나의 실시양태에서, 항-TF 항체는 본 발명의 항-TF 항체의 1회 주입에 이어 방사성 동위원소에 접합된 본 발명의 항-TF 항체의 주입을 포함하는 요법에 의해 투여될 수 있다. 요법은 예를 들어 7 내지 9일 후에 반복될 수 있다.

[0454] 비제한적인 예로서, 본 발명에 따른 치료는 매일 약 0.1-100 mg/kg, 예를 들어 0.5, 0.9, 1.0, 1.1, 1.5, 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, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 mg/kg의 양으로, 치료 개시의 제1, 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, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 40일 후 중 적어도 하나에 또는 별법으로 제1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20주 후에 또는 이들의 임의의 조합 중 적어도 하나에 24, 12, 8, 6, 4, 또는 2시간마다 단일 또는 분할 용량 또는 이들의 임의의 조합을 이용하는 본 발명의 화합물의 일일 투여량으로서

제공될 수 있다.

- [0455] 종양 치료를 위한 "유효량"은 또한 질병의 진행을 안정화시키는 그의 능력에 의해 측정할 수 있다. 암을 억제하는 화합물의 능력은 인간 종양에서 효능을 예측하는 동물 모델 시스템에서 평가할 수 있다. 별법으로, 조성물의 상기 특성은 당업자에게 공지된 시험관내 검정에 의해 세포 성장을 억제하거나 아포토시스를 유도하는 화합물의 능력을 검사함으로써 평가할 수 있다. 치료 화합물의 치료 유효량은 종양 크기를 감소시키거나 그렇지 않으면 대상체에서 증상을 개선할 수 있다. 당업자는 대상체의 크기, 대상체의 증상의 심도, 및 선택된 특정 조성물 또는 투여 경로와 같은 인자에 기초하여 그러한 양을 결정할 수 있을 것이다.
- [0456] 항-TF 항체는 또한 암 발병 위험을 감소시키고/시키거나, 암 진행에서 사건 발현의 발생을 지연시키고/시키거나 암이 관해 상태일 때 재발 위험을 감소시키기 위해 예방을 위해 투여될 수 있다. 이것은 다른 생물학적 요인으로 인해 존재하는 것으로 알려진 종양의 위치 결정이 어려운 환자에서 특히 유용할 수 있다.
- [0457] 항-TF 항체는 또한 조합 요법으로, 즉, 치료할 질병 또는 병태에 관련된 다른 치료제와 조합으로 투여될 수 있다. 따라서, 하나의 실시양태에서, 항체-함유 의약은 하나 이상의 추가의 치료제, 예를 들어 세포독성, 화학요법 또는 항-혈관신생제와 조합하기 위한 것이다.
- [0458] 그러한 조합 투여는 동시, 별개 또는 순차적일 수 있다. 동시 투여를 위해, 물질들은 하나의 조성물로서 또는 별개의 조성물로서 적절하게 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 아래 설명된 바와 같은 하나 이상의 추가의 치료제와 조합된 본 발명의 항-TF 항체를 투여하는 것을 포함하는, 상기 설명된 바와 같은 TF를 발현하는 세포에 연관된 질환의 치료 방법을 제공한다.
- [0459] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 본 발명의 항-TF 항체 및 적어도 하나의 화학요법제를 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 TF를 발현하는 세포에 연관된 질환의 치료 방법을 제공한다.
- [0460] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 본 발명의 항-TF 항체 및 적어도 하나의 화학요법제를 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0461] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 암 치료용의 적어도 하나의 화학요법제와 함께 투여할 제약 조성물의 제조를 위한 본 발명의 항-TF 항체의 용도를 제공한다.
- [0462] 하나의 실시양태에서, 상기 화학요법제는 항대사물질, 예를 들어 메토크세이트, 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 플루다라빈, 5-플루오로우라실, 데카르바진, 히드록시우레아, 아스파라기나제, 겐시타빈, 클라드리빈 및 유사한 물질 중에서 선택될 수 있다.
- [0463] 하나의 실시양태에서, 상기 화학요법제는 알킬화제, 예를 들어 메클로레타민, 티오에프, 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BSNU), 로무스틴 (CCNU), 시클로포스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 다카르바진 (DTIC), 프로카르바진, 미토마이신 C, 시스플라틴 및 다른 백금 유도체, 예를 들어 카르보플라틴 및 유사한 물질 중에서 선택될 수 있다.
- [0464] 하나의 실시양태에서, 상기 화학요법제는 항유사분열제, 예를 들어 탁산, 예를 들어 도세탁셀 및 파클리탁셀, 및 빈카 알칼로이드, 예를 들어 빈데신, 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 비노렐빈 중에서 선택될 수 있다.
- [0465] 하나의 실시양태에서, 상기 화학요법제는 토포이소머라제 억제제, 예를 들어 토포테칸 또는 이리노테칸 중에서 선택될 수 있다.
- [0466] 하나의 실시양태에서, 상기 화학요법제는 세포증식억제 약물, 예를 들어 에토포시드 및 테니포시드 중에서 선택될 수 있다.
- [0467] 하나의 실시양태에서, 상기 화학요법제는 성장 인자 억제제, 예를 들어 ErbB1 (EGFR)의 억제제 (예를 들어, 이레사 (Iressa), 에르비투스 (세툽시맵), 타르세마 및 유사한 물질), ErbB2 (Her2/neu)의 억제제 (예를 들어, 헤르셉틴 및 유사한 물질) 및 유사한 물질 중에서 선택될 수 있다.
- [0468] 하나의 실시양태에서, 상기 화학요법제는 티로신 키나제 억제제, 예를 들어 이마티닙 (글리벡 (Glivec), 글리벡 (Gleevec) STI571), 라파티닙, PTK787/ZK222584 및 유사한 물질 중에서 선택될 수 있다.
- [0469] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 본 발명의 항-TF 항체, 및 혈관신생, 신생혈관화, 및/또는 다른 혈관화의 적어도 하나의 억제제를 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 TF를 발현

하는 세포에 연관된 질환의 치료 방법을 제공한다.

[0470] 상기 혈관신생 억제제의 예는 유로키나제 억제제, 매트릭스 메탈로프로테아제 억제제 (예를 들어, 마리마스타트, 네오바스타트, BAY 12-9566, AG 3340, BMS-275291 및 유사한 물질), 내피 세포 이동 및 증식의 억제제 (예를 들어, TNP-470, 스쿠알라민, 2-메톡시에스트라디올, 콤브레타스타틴, 엔도스타틴, 안지오테틴, 페니실라민, SCH66336 (쉐링-플라우 코프. (Schering-Plough Corp, 미국 뉴저지주 매디슨)), R115777 (얀센 파마슈티칼스, 인크 (Janssen Pharmaceutica, Inc, 미국 뉴저지주 티터스빌)) 및 유사한 물질), 혈관신생 성장 인자의 길항제 (예를 들어, ZD6474, SU6668; 혈관신생제 및/또는 그들의 수용체 (예를 들어, VEGF, bFGF, 및 안지오테틴-1)에 대해 작용성인 항체; 탈리도마이드, 탈리도마이드 유사체 (예를 들어, CC-5013), Sugen 5416, SU5402, 항혈관신생 리보자임 (예를 들어, 안지오아임), 인터페론 α (예를 들어, 인터페론 α 2a), 수라민 및 유사한 물질), VEGF-R 키나제 억제제 및 다른 항-혈관신생성 티로신 키나제 억제제 (예를 들어, SU011248), 내피-특이적 인테그린/생존 신호전달의 억제제 (예를 들어, 비탁신 및 유사한 물질), 구리 길항제/킬레이터 (예를 들어, 테트라티오폐리브레이트, 캡토프릴 및 유사한 물질), 카르복시아미도-트리아졸 (CAI), ABT-627, CM101, 인터루킨-12 (IL-12), IM862, PNU145156E 및 혈관신생을 억제하는 뉴클레오티드 분자 (예를 들어, 안티센스-VEGF-cDNA, 안지오테틴을 코딩하는 cDNA, p53을 코딩하는 cDNA 및 결여 VEGF 수용체-2를 코딩하는 cDNA) 및 유사한 물질이다.

[0471] 혈관신생, 신생혈관화, 및/또는 다른 혈관화의 그러한 억제제의 다른 예는 항-혈관신생성 헤파린 유도체 및 관련 분자 (예를 들어, 헤파리나제 III), 테모졸로미드, NK4, 대식세포 이동 억제 인자 (MIF), 시클로옥시게나제-2 억제제, 저산소증-유도가능 인자 1의 억제제, 항-혈관신생성 대두 이소플라본, 울티프라즈, 푸마길린 및 그의 유사체, 소마토스타틴 유사체, 펜토산 폴리술페이트, 테코갈란 나트륨, 달테파린, 톨스타틴, 트롬보스폰딘, NM-3, 콤브레타스타틴, 칸스타틴, 아바스타틴, 다른 관련 표적에 대해 작용성인 항체 (예를 들어, 항-알파-v/베타-3 인테그린 및 항-키니노스타틴 mAb) 및 유사한 물질이다.

[0472] 하나의 실시양태에서, 상기 설명된 바와 같은 질환을 치료하기 위해 항-TF 항체와 조합으로 사용하기 위한 치료제는 항암 면역원, 예를 들어 암 항원/종양-연관 항원 (예를 들어, 상피 세포 부착 분자 (EpCAM/TACSTD1), 뮤신 1 (MUC1), 암배아 항원 (CEA), 종양-연관 당단백질 72 (TAG-72), gp100, Melan-A, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, 암-연관 바이러스 백신 (예를 들어, 인간 유두종바이러스 백신), 종양-유래 열 충격 단백질, 및 유사한 물질)일 수 있다. 본원에서 다른 곳에서 설명되는 많은 다른 적합한 암 항원/종양-연관 항원 및 당단백질에 공지된 유사한 분자가 또한 또는 별법으로 그러한 실시양태에서 사용될 수 있다. 항암 면역원성 펩티드는 또한 항-개별특이형 "백신", 예를 들어 BEC2 항-개별특이형 항체, 미투모맵 (Mitumomab), CeaVac 및 관련 항-개별특이형 항체, MG7 항체에 대한 항-개별특이형 항체, 및 다른 항암 항-개별특이형 항체를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Birebent et al., Vaccine. 21(15), 1601-12 (2003)], [Li et al., Chin Med J (Engl). 114(9), 962-6 (2001)], [Schmitt et al., Hybridoma. 13(5), 389-96 (1994)], [Maloney et al., Hybridoma. 4(3), 191-209 (1985)], [Raychardhuri et al., J Immunol. 137(5), 1743-9 (1986)], [Pohl et al., Int J Cancer. 50(6), 958-67 (1992)], [Bohlen et al., Cytokines Mol Ther. 2(4), 231-8 (1996)] 및 [Maruyama, J Immunol Methods. 264(1-2), 121-33 (2002)] 참조). 그러한 항-개별특이형 Ab는 임의로 담체에 접합될 수 있고, 상기 담체는 합성 (대개 불활성) 분자 담체, 단백질 (예를 들어, 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH) (예를 들어, [Ochi et al., Eur J Immunol. 17(11), 1645-8 (1987)] 참조), 또는 세포 (예를 들어 적혈구, 예를 들어, 문헌 [Wi et al., J Immunol Methods. 122(2), 227-34 (1989)] 참조)일 수 있다.

[0473] 하나의 실시양태에서, 상기 설명된 바와 같은 질환을 치료하기 위해 항-TF 항체와 조합으로 사용하기 위한 치료제는 항암 시토킨, 케모킨 또는 그의 조합물일 수 있다. 적합한 시토킨 및 성장 인자의 예는 IFN γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, IFN α (예를 들어, INF α 2b), IFN β , GM-CSF, CD40L, Flt3 리간드, 줄기 세포 인자, 안세스틴 및 TNF α 를 포함한다. 적합한 케모킨은 Glu-Leu-Arg (ELR)-음성 케모킨, 예를 들어 IP-10, MCP-3, MIG, 및 SDF-1 α (인간 CXCL12 및 C-C 케모킨 패밀리로부터)를 포함할 수 있다. 적합한 시토킨은 시토킨 유도체, 시토킨 변이체, 시토킨 단편 및 시토킨 융합 단백질을 포함한다. 본원에서 천연 발생하는 펩티드-코딩 핵산을 포함하는 이들 및 다른 방법 또는 용도는 별법으로 또는 추가로 US 5,968,502, US 6,063,630 및 US 6,187,305 및 EP 0505500에 설명된 바와 같은 "유전자 활성화" 및 상동성 재조합 유전자 상향조절 기술에 의해 수행될 수 있다.

[0474] 하나의 실시양태에서, 상기 설명된 바와 같은 질환을 치료하기 위해 항-TF 항체와 조합으로 사용하기 위한 치료제는 세포 주기 제어/아포토시스 조절물질 (또는 "조절제")일 수 있다. 세포 주기 제어/아포토시스 조절물질은 세포 주기 제어/아포토시스 조절물질, 예를 들어 (i) cdc-25 (예를 들어, NSC 663284), (ii) 세포 주기를 과다

자극하는 사이클린-의존성 키나제 (예를 들어, 플라보피리돌 (L868275, HMR1275), 7-히드록시스타우로스포린 (UCN-01, KW-2401), 및 로스코비틴 (R-로스코비틴, CYC202)), 및 (iii) 텔로머라제 (telomerase) 조정물질 (예를 들어, BIBR1532, SOT-095, GRN163 및 예를 들어 US 6,440,735 및 US 6,713,055에 기재된 조성물)을 표적으로 하여 조정하는 분자를 포함할 수 있다. 아폽토시스 경로를 저해하는 분자의 비제한적인 예는 TNF-관련 아폽토시스-유도 리간드 (TRAIL)/아폽토시스-2 리간드 (Apo-2L), TRAIL 수용체를 활성화하는 항체, IFN 및 안티센스 Bcl-2를 포함한다.

[0475] 하나의 실시양태에서, 상기 설명된 바와 같은 질환을 치료하기 위해 항-TF 항체와 조합으로 사용하기 위한 치료제는 호르몬 조절제, 예를 들어 항-안드로겐 및 항-에스트로겐 요법에 유용한 물질일 수 있다. 그러한 호르몬 조절제의 예는 타목시펜, 이독시펜, 풀베스트란트, 드롤록시펜, 토레미펜, 팔록시펜, 디에틸stil베스트롤, 에티닐 에스트라디올/에스티닐, 항안드로겐 (예를 들어, 플루타민드/에우렉신), 프로게스틴 (예를 들어, 히드록시프로게스테론 카프로에이트, 메드록시-프로게스테론/프로베라, 메게스트롤 아세페이트/메게이스), 아드레노코르티코스테로이드 (예를 들어, 히드로코티손, 프레드니손), 황체형성 호르몬-방출 호르몬 (및 그의 유사체 및 다른 LHRH 효능제, 예를 들어 부세렐린 및 고세렐린), 아로마타제 억제제 (예를 들어, 아나스트라졸/아리미텍스, 아미노글루테티미드/사이트라텐, 엑세메스탄), 호르몬 억제제 (예를 들어, 옥트레오티드/산도스타틴) 및 유사한 물질이다.

[0476] 하나의 실시양태에서, 상기 설명된 바와 같은 질환을 치료하기 위해 항-TF 항체와 조합으로 사용하기 위한 치료제는 항-무력화제 (예를 들어 종양 및 암 항원에 대한 내성을 파괴하는 소분자 화합물, 단백질, 당단백질, 또는 항체)일 수 있다. 그러한 화합물의 예는 CTLA-4, 예를 들어 MDX-010 (이필리무맙)의 활성을 차단하는 분자이다 (Phan et al., PNAS USA 100, 8372 (2003)).

[0477] 하나의 실시양태에서, 상기 설명된 바와 같은 질환을 치료하기 위해 항-TF 항체와 조합으로 사용하기 위한 치료제는 종양 서프레스 유전자-함유 핵산 또는 벡터, 예를 들어 인간 재조합 야생형 p53/SCH58500를 코딩하는 복제-결여 아데노바이러스 등; 발암유전자, 돌연변이된, 또는 탈조절된 유전자에 표적화된 안티센스 핵산; 또는 돌연변이된 또는 탈조절된 유전자에 표적화된 siRNA일 수 있다. 종양 서프레스 표적의 예는 예를 들어, BRCA1, RB1, BRCA2, DPC4 (Smad4), MSH2, MLH1 및 DCC를 포함한다.

[0478] 하나의 실시양태에서, 상기 설명된 바와 같은 질환을 치료하기 위해 항-TF 항체와 조합으로 사용하기 위한 치료제는 항암 핵산, 예를 들어 게나센스 (오그메로센/G3139), LY900003 (ISIS 3521), ISIS 2503, OGX-011 (ISIS 112989), LE-AON/LEraf-AON (리포좀 캡슐화된 c-raf 안티센스 올리고뉴클레오티드/ISIS-5132), MG98; 및 PKC α , 클루스테린, IGFBP, 단백질 키나제 A, 사이클린 D1, 또는 Bcl-2h를 표적화하는 다른 안티센스 화합물 핵산일 수 있다.

[0479] 하나의 실시양태에서, 상기 설명된 바와 같은 질환을 치료하기 위해 항-TF 항체와 조합으로 사용하기 위한 치료제는 항암 억제성 RNA 분자일 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Lin et al., Curr Cancer Drug Targets. 1(3), 241-7 (2001)], [Erratum in: Curr Cancer Drug Targets. 3(3), 237 (2003)], [Lima et al., Cancer Gene Ther. 11(5), 309-16 (2004)], [Grzmil et al., Int J Oncol. 4(1), 97-105 (2004)], [Collis et al., Int J Radiat Oncol Biol Phys. 57(2 Suppl), S144 (2003)], [Yang et al., Oncogene. 22(36), 5694-701 (2003)] 및 [Zhang et al., Biochem Biophys Res Commun. 303(4), 1169-78 (2003)] 참조).

[0480] 본 발명의 조성물 및 조합 투여 방법은 또한 핵산 백신, 예를 들어 그러한 암 항원/종양-연관 항원을 코딩하는 네이키드 DNA 백신의 투여를 포함한다 (예를 들어 US 5,589,466, US 5,593,972, US 5,703,057, US 5,879,687, US 6,235,523 및 US 6,387,888 참조). 하나의 실시양태에서, 조합 투여 방법 및/또는 조합 조성물은 자가 백신 조성물을 포함한다. 하나의 실시양태에서, 조합 조성물 및/또는 조합 투여 방법은 전체 세포 백신 또는 시토킨-발현 세포 (예를 들어, 재조합 IL-2 발현 섬유모세포, 재조합 시토킨-발현 수지상 세포 등)를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Kowalczyk et al., Acta Biochim Pol. 50(3), 613-24 (2003)], [Reilly et al., Methods Mol Med. 69, 233-57 (2002)] 및 [Tirapu et al., Curr Gene Ther. 2(1), 79-89 (2002)] 참조). 본 발명의 조합 방법에서 유용할 수 있는 그러한 자가 세포 방안의 또 다른 예는 마이박스 (MyVax)® 맞춤형 면역치료 방법 (이전에 GTOP-99로 언급됨) (제니토프 코퍼레이션 (Genitope Corporation, 미국 캘리포니아주 레드우드 시티))이다.

[0481] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 항-TF 항체가 바이러스, 바이러스 단백질 등과 조합되거나 동시투여되는 조합 조성물 및 조합 투여 방법을 제공한다. 일반적으로 생체 내에서 1회 또는 단지 수 라운드의 복제만 할 수 있고 종양 세포에 표적화되는 복제-결여 바이러스가 예를 들어 그러한 조성물 및 방법의 유용한 성분일 수 있다. 그

러한 바이러스 물질은 면역자극제, 예를 들어 GM-CSF 및/또는 IL-2를 코딩하는 핵산을 포함하거나 그와 회합될 수 있다. 천연 암용해성 및 그러한 재조합 암용해성 바이러스 (예를 들어 HSV-1 바이러스, 레트로바이러스, 복제-결여 및 복제-감수성 아데노바이러스 등)가 그러한 방법 및 조성물의 유용한 성분일 수 있다. 따라서, 하나의 실시양태에서, 본 발명은 항-TF 항체가 암용해성 바이러스와 조합되거나 동시-투여되는 조합 조성물 및 조합 투여 방법을 제공한다. 그러한 바이러스의 예는 암용해성 아데노바이러스 및 헤르페스 바이러스를 포함하고, 변형 바이러스일 수 있거나 그렇지 않을 수 있다 (예를 들어, 문헌 ([Shah et al., J Neurooncol. 65(3), 203-26 (2003)], [Stiles et al., Surgery. 134(2), 357-64 (2003)], [Sunarmura et al., Pancreas. 28(3), 326-9 (2004)], [Teshigahara et al., J Surg Oncol. 85(1), 42-7 (2004)], [Varghese et al., Cancer Gene Ther. 9(12), 967-78 (2002)], [Wildner et al., Cancer Res. 59(2), 410-3 (1999)], [Yamanaka, Int J Oncol. 24(4), 919-23 (2004)] 및 [Zwiebel et al., Semin Oncol. 28(4), 336-43 (2001)]) 참조).

[0482] 본 발명의 조합 조성물 및 조합 투여 방법은 또한 "전체 세포" 및 "입양 (adoptive)" 면역치료 방법을 포함할 수 있다. 예를 들어, 그러한 방법은 면역계 세포 (예를 들어, 종양-침윤 림프구 (TIL), 예를 들어 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포 (예를 들어, 종양-특이적 항원 및/또는 유전자 항상으로 팽창시킨 T 세포), 항체-발현 B 세포 또는 다른 항체 생산/제시 세포, 수지상 세포 (예를 들어, 항-시토킨 발현 재조합 수지상 세포, DC-팽창제, 예를 들어 GM-CSF 및/또는 Flt3-L과 함께 배양된 수지상 세포, 및/또는 종양-연관 항원-로딩된 수지상 세포), 항-종양 NK 세포, 소위 혼성체 세포, 또는 그의 조합물의 주입 또는 재-주입을 포함할 수 있다. 세포 용해물이 또한 그러한 방법 및 조성물에서 유용할 수 있다. 그러한 측면에서 유용할 수 있는 임상 시험에서 세포성 "백신"은 칸박신 (Canvaxin)TM, APC-8015 (덴드레온 (Dendreon)), HSPPC-96 (안티제닉스 (Antigenics)), 및 멜라신 (Melacine)[®] 세포 용해물을 포함한다. 임의로 명반과 같은 어쥬번트 (adjuvant)와 혼합된, 암세포로부터 흘러나온 항원 및 그의 혼합물 (예를 들어, 문헌 [Bystryk et al., Clinical Cancer Research Vol. 7, 1882-1887, July 2001])이 또한 그러한 방법 및 조합 조성물 내의 성분일 수 있다.

[0483] 하나의 실시양태에서, 항-TF 항체는 내부 백신접종 (internal vaccination) 방법의 적용과 함께 환자에게 전달될 수 있다. 내부 백신접종은 대개 (i) 전체로서 종양 세포 또는 (ii) (a) 분비형 단백질, 당단백질 또는 다른 생성물, (b) 막-회합 단백질 또는 당단백질 또는 막과 회합되거나 막 내에 삽입된 다른 성분, 및/또는 (c) 세포 내 단백질 또는 다른 세포 내 성분을 포함하는 종양 세포의 일부를 향해 작용하는 면역 반응을 유발시키는, 환자에서 유도된 종양 또는 암세포 사멸, 예를 들어 종양 세포의 약물-유도된 또는 방사선-유도된 세포 사멸을 나타낸다. 내부 백신접종-유도된 면역 반응은 체액성 (즉, 항체-보체 매개된) 또는 세포-매개성 (예를 들어, 내부에서 치사시킨 종양 세포 또는 그의 일부를 인식하는 내인성 세포독성 T 림프구의 발달 및/또는 증가)일 수 있다. 방사선요법에 추가로, 상기 종양 세포-사멸 및 내부 백신접종을 유도하기 위해 사용될 수 있는 약물 및 물질의 비제한적인 예는 통상적인 화학요법제, 세포-주기 억제제, 항-혈관신생 약물, 모노클로날 항체, 아포토시스-유도제, 및 신호 전달 억제제이다.

[0484] 상기 설명된 바와 같은 질환을 치료하기 위해 항-TF 항체와 조합으로 사용하기 위한 치료제로서 관련될 수 있는 다른 항암제의 예는 분화 유도제, 레티노산 유사체 (예를 들어, 모든 트랜스 레티노산, 13-시스 레티노산 및 유사한 물질), 비타민 D 유사체 (예를 들어, 세오칼시톨 및 유사한 물질); ErbB3, ErbB4, IGF-1R, 인슐린 수용체, PDGFR α , PDGFR β , Flk2, Flt4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, TRKA, TRKC, c-met, Ron, Sea, Tie, Tie2, Eph, Ret, Ros, Alk, LTK, PTK7의 억제제 및 유사한 물질이다.

[0485] 상기 설명된 바와 같은 질환을 치료하기 위해 항-TF 항체와 조합으로 사용하기 위한 치료제로서 관련될 수 있는 다른 항암제의 예는 카텝신 B, 카텝신 D 데히드로게나제 활성의 조절물질, 글루타티온-S-트랜스퍼라제 (예를 들어, 글루타실시스테인 신테타제 및 락테이트 데히드로게나제), 및 유사한 물질이다.

[0486] 상기 설명된 바와 같은 질환을 치료하기 위해 항-TF 항체와 조합으로 사용하기 위한 치료제로서 관련될 수 있는 다른 항암제의 예는 에스트라무스틴 및 에피루비신이다.

[0487] 상기 설명된 바와 같은 질환을 치료하기 위해 항-TF 항체와 조합으로 사용하기 위한 치료제로서 관련될 수 있는 다른 항암제의 예는 HSP90 억제제 유사 17-알릴 아미노 겔드-아나마이신, PSA, CA125, KSA 등과 같은 종양 항원에 대해 작용성인 항체, 인테그린 유사 인테그린 β 1, VCAM의 억제제 및 유사한 물질이다.

[0488] 상기 설명된 바와 같은 질환을 치료하기 위해 항-TF 항체와 조합으로 사용하기 위한 치료제로서 관련될 수 있는 다른 항암제의 예는 칼시뉴린-억제제 (예를 들어, 발스포다르, PSC 833 및 다른 MDR-1 또는 p-당단백질 억제제), TOR-억제제 (예를 들어, 시로리무스, 에베로리무스 및 라파마이신) 및 "림프구 호밍 (homing)" 메커니즘의 억제제 (예를 들어, FTY720), 및 세포 신호전달에 대해 효과가 있는 물질, 예를 들어 어드레신 분자 억제제 (예

를 들어 항-LFA 등)이다.

- [0489] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-TF 항체는 하나 이상의 다른 치료 항체, 예를 들어 베바시주맵 (아바스틴®), 잘루투무맵, 세록시맵 (에르비투스®), 파니투무맵 (백티빅스™), 오푸투무맵, 자놀리무맵, 다라 투무맵, 라니비주맵 (루센티스 (Lucentis)®), 제나팍스 (Zenapax), 시물렉트 (Simulect), 레미케이드 (Remicade), 휴미라 (Humira), 타이사브리 (Tysabri), 솔레어 (Xolair), 랩티마, 니모투주맵, 리톡시맵 및/또는 트라스투주맵 (헤르셉틴®)와 조합으로 사용하기 위한 것이다. 본 발명의 항체와 조합으로 사용될 수 있는 다른 치료 항체는 W098/40408 (천연 인간 TF에 결합할 수 있는 항체), W004/094475 (인간 조직 인자에 결합할 수 있는 항체, 이는 정상 혈장 대조군에 비해 인자 매개된 혈액 응고를 억제하지 않음), W003/093422 (TF 단독 보다 TF:VIIa 복합체에 더 큰 친화도로 결합하는 항체), 또는 W003/037361 (아포토시스에 관련된 치료를 위한 TF 효능제 또는 길항제)에 개시된 것이다.
- [0490] 또 다른 실시양태에서, 본원에서 설명되는 본 발명의 2개 이상의 상이한 항체가 질병의 치료를 위해 조합으로 사용된다. 특히 흥미로운 조합물은 2개 이상의 비-경쟁 항체를 포함한다. 따라서, 하나의 실시양태에서, 환자는 본원에서 정의되는 교차-차단군 I의 항체와 본원에서 정의되는 제II군 또는 제III군의 항체의 조합물로 치료 받는다. 또 다른 실시양태에서, 환자는 본원에서 아래에서 정의되는 제II군의 항체와 제III군의 항체의 조합물로 치료받는다. 그러한 조합 치료는 세포당 증가된 수의 항체 분자의 결합을 일으킬 수 있고, 이는 예를 들어 보체-매개 용해의 활성화를 통해 효능을 증가시킬 수 있다.
- [0491] 하나의 실시양태에서, 항-TF 항체는 종양의 내부에 항-TF 항체 또는 조합 조성물의 접근을 촉진하는 하나 이상의 물질의 전달과 함께 투여될 수 있다. 그러한 방법은 예를 들어 종양을 이완시킬 수 있는 (예를 들어 US 6,719,977 참조) 킬렉신의 전달과 연관하여 수행할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-TF 항체는 세포 투과 펩티드 (CPP)에 결합될 수 있다. 세포 투과 펩티드 및 관련 펩티드 (예를 들어, 공학처리된 세포 투과 항체)는 예를 들어 문헌 ([Zhao et al., J Immunol Methods. 254(1-2), 137-45 (2001)], [Hong et al., Cancer Res. 60(23), 6551-6 (2000)], [Lindgren et al., Biochem J. 377(Pt 1), 69-76 (2004)], [Buerger et al., J Cancer Res Clin Oncol. 129(12), 669-75 (2003)], [Pooga et al., FASEB J. 12(1), 67-77 (1998)] 및 [Tseng et al., Mol Pharmacol. 62(4), 864-72 (2002)])에 기재되어 있다.
- [0492] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 항-TF 항체 및 적어도 하나의 소염제를 그를 필요로 하는 대상 체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 TF를 발현하는 세포에 연관된 질환의 치료 방법을 제공한다.
- [0493] 하나의 실시양태에서, 그러한 소염제는 아스피린 및 다른 살리실레이트, Cox-2 억제제 (예를 들어, 로페콕시브 및 세레콕시브), NSAID (예를 들어, 이부프로펜, 페노프로펜, 나프록센, 숄린닥, 디클로페낙, 피록시캅, 케토프로펜, 디플루니살, 나부메톤, 에토돌락, 옥사프로진, 및 인도메타신), 항-IL6R 항체, 항-IL8 항체 (예를 들어 W02004058797에 기재된 항체, 예를 들어 10F8), 항-IL15 항체 (예를 들어 W003017935 및 W02004076620에 기재된 항체), 항-IL15R 항체, 항-CD4 항체 (예를 들어, 자놀리무맵), 항-CD11a 항체 (예를 들어, 에팔리주맵), 항-알파-4/베타-1 인테그린 (VLA4) 항체 (예를 들어 나탈리주맵), 염증성 질병의 치료를 위한 CTLA4-Ig, 프레드니솔론, 프레드니손, 질병 변형 항류마티스 약물 (DMARD), 예를 들어 메토크세이트, 히드록시클로로퀸, 숄파살라진, 피리미딘 합성 억제제 (예를 들어, 레플루노마이드), IL-1 수용체 차단제 (예를 들어, 아나킨라), TNF- α 차단제 (예를 들어, 에타네르셉트, 인플릭시맵 및 아달리무맵) 및 유사한 물질 중에서 선택될 수 있다.
- [0494] 하나의 실시양태에서, 그러한 면역억제 및/또는 면역조절제는 시클로스포린, 아자티오프린, 미코페놀산, 미코페놀레이트 모페틸, 코르티코스테로이드, 예를 들어 프레드니손, 메토크세이트, 금염, 숄파살라진, 항말라리아제, 브레퀴나르, 레플루노마이드, 미조리빈, 15-데옥시시페르구알린, 6-머캅토피린, 시클로포스파미드, 라파마이신, 타크로리무스 (FK-506), OKT3, 항-흉선세포 글로불린, 티모펜틴, 티모신- α 및 유사한 물질 중에서 선택될 수 있다.
- [0495] 하나의 실시양태에서, 그러한 면역억제 및/또는 면역조절제는 면역억제 항체, 예를 들어 IL-2 수용체의 p75에 결합하는 항체, CD25에 대해 작용성인 항체 (예를 들어 W02004045512에 기재된 것, 예를 들어 AB1, AB7, AB11 및 AB12), 또는 예를 들어 MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6R, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a 또는 CD58에 결합하는 항체, 또는 그들의 리간드에 결합하는 항체 중에서 선택될 수 있다.
- [0496] 하나의 실시양태에서, 그러한 면역억제 및/또는 면역조절제는 가용형 IL-15R, IL-10, B7 분자 (B7-1, B7-2, 그 변이체 및 그의 단편), ICOS 및 OX40, 음성 T 세포 조절인자의 억제제 (예를 들어, CTLA4에 대해 작용성인

항체) 및 유사한 물질 중에서 선택될 수 있다.

- [0497] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 항-TF 항체 및 항-C3b(i) 항체를 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 TF를 발현하는 세포에 연관된 질환의 치료 방법을 제공한다.
- [0498] 하나의 실시양태에서, 상기 설명된 바와 같은 질환을 치료하기 위해 항-TF 항체와 조합으로 사용하기 위한 치료제는 히스톤 데아세틸라제 억제제 (예를 들어 페닐부티레이트) 및/또는 DNA 복원제 (예를 들어 DNA 복원 효소 및 관련 조성물, 예를 들어 디메리신) 중에서 선택될 수 있다.
- [0499] 치료 유효량의 항-TF 항체의 투여를 포함하는 상기 설명된 바와 같은 질환의 치료를 위한 본 발명의 방법은 또한 항암 지향 광역학 요법 (예를 들어 항암 레이저 요법 (이는 임의로 광감작제의 사용과 함께 실시될 수 있다), 예를 들어, 문헌 [Zhang et al., J Control Release. 93(2), 141-50 (2003)] 참조), 항암 음파 및 쇼크파 (shock-wave) 요법 (예를 들어, 문헌 [Kambe et al., Hum Cell. 10(1), 87-94 (1997)] 참조), 및/또는 항암 기능식품 (nutraceutical) 요법 (예를 들어, 문헌 ([Roudebush et al., Vet Clin North Am Small Anim Pract. 34(1), 249-69, viii (2004)] 및 [Rafi, Nutrition. 20(1), 78-82 (2004)]) 참조)을 포함할 수 있다. 이와 유사하게, 항-TF 항체는 항암 지향 광역학 요법 (예를 들어 항암 레이저 요법 (이는 임의로 광감작제의 사용과 함께 실시될 수 있다), 항암 음파 및 쇼크파 요법, 및/또는 항암 기능식품 요법과 함께 투여될, 상기 설명된 바와 같은 질환 치료용 제약 조성물의 제조를 위해 사용될 수 있다.
- [0500] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 항-TF 항체, 예를 들어 본 발명의 항-TF 항체 및 방사선요법을 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 TF를 발현하는 세포에 연관된 질환의 치료 방법을 제공한다.
- [0501] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 항-TF 항체, 예를 들어 본 발명의 항-TF 항체 및 방사선요법을 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.
- [0502] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 방사선요법과 조합으로 투여할, 암 치료용 제약 조성물의 제조를 위한 항-TF 항체, 예를 들어 본 발명의 항-TF 항체의 용도를 제공한다.
- [0503] 방사선요법은 방사선을 포함할 수 있거나, 환자에 대한 방사선약품의 연관된 투여가 제공된다. 방사선 공급원은 치료받는 환자의 외부 또는 내부에 존재할 수 있다 (방사선 치료는 예를 들어, 체외 방사선 치료 (EBRT) 또는 근접치료 (BT) 형태일 수 있다). 그러한 방법을 실시하는데 사용될 수 있는 방사성 원소는 예를 들어, 라듐, 세슘-137, 이리듐-192, 아메리슘-241, 금-198, 코발트-57, 구리-67, 테크네튬-99, 요오다이드-123, 요오다이드-131, 및 인듐-111을 포함한다.
- [0504] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 그를 필요로 하는 대상체에게 치료 유효량의 항-TF 항체, 예를 들어 본 발명의 항-TF 항체를 수술과 조합으로 투여하는 것을 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0505] 상기한 바와 같이, 본 발명의 제약 조성물은 조합 요법으로, 즉, 치료할 질병 또는 병태에 관련된 하나 이상의 물질과 조합으로, 별개의 제약 조성물로서 또는 본 발명의 화합물을 상기한 바와 같은 하나 이상의 추가의 치료제와 동시제형화하여 투여될 수 있다. 그러한 조합 치료는 본 발명의 화합물 및/또는 동시-투여된 물질의 보다 적은 투여량을 요구할 수 있고, 따라서 다양한 단계요법과 연관된 가능한 독성 또는 합병증을 피할 수 있다.
- [0506] 상기한 것에 추가로, 다른 흥미로운 조합 치료는 다음을 포함한다:
- [0507] · 췌장암의 치료를 위해, 항대사물질, 예를 들어 5-플루오로우라실 및/또는 겐시타빈과 조합되고, 가능하게는 90Y-hPAM4, ARC-100, ARQ-197, AZD-6244, 바르독솔론 메틸, 식수투무맙, (IMC-A12), 폴리텍소린 칼슘, GVAX, 이필리무맙, KRX-0601, 메르바론, MGCD-0103, MORAb-009, PX-12, Rh-Apo2L, TLN-4601, 트라베데르센, 볼로식시맙 (M200), WX-671, 페메트렉세드, 루비테칸, 익사베필론, OXC-0191Vion, 216586-46-8, 라파티닙, 마투주맙, 이마티닙, 소라피닙, 트라스투주맙, 엑사베필론, 에를로티닙, 아바스틴 및 세툽시맙 중에서 선택된 하나 이상의 화합물과 조합된 항-TF 항체.
- [0508] · 결장직장암의 치료를 위해, 겐시타빈, 베바시주맙, FOLFOX, FOLFIRI, XELOX, IFL, 옥살리플라틴, 이리노테칸, 5-FU/LV, 카페시타빈, UFT, EGFR 표적화제, 예를 들어 세툽시맙, 파니투무맙, 잘루투무맙, 니모투주맙; VEGF 억제제, 또는 티로신 키나제 억제제, 예를 들어 수니티닙 중에서 선택된 하나 이상의 화합물과 조합된 항-TF 항체.
- [0509] · 유방암의 치료를 위해, 항대사물질, 안트라사이클린, 타산, 알킬화제, 에포틸론 항-호르몬제 (페마르, 타목

시펜 등), ErbB2 (Her2/neu)의 억제제 (예를 들어, 헤르셉틴 및 유사한 물질), CAF/FAC (시클로포스파미드, 독소루비신, 5FU) AC (시클로, 독소), CMF (시클로, 메토틱세이트, 5FU), 도세탁셀 + 카페시타빈, GT (파클리탁셀, 겐시타빈) FEC (시클로, 에피, 5FU) (헤르셉틴과 조합한): 파클리탁셀 +/- 카르보플라틴, 비노렐빈, 도세탁셀, CT (라파티닙과 조합한); 카페시타빈 중에서 선택된 하나 이상의 화합물과 조합된 항-TF 항체.

[0510] · 방광의 치료를 위해, 항대사물질 (겐시타빈, 알립타, 메토틱세이트), 백금 유사체 (시스플라틴, 카르보플라틴), EGFR 억제제 (예를 들어, 세특시맙 또는 잘루투무맙), VEGF 억제제 (예를 들어, 아바스틴), 독소루비신, 티로신 키나제 억제제, 예를 들어 게피티닙, 트라스투주맙, 항-유사분열제, 예를 들어 탁산, 예를 들어 파클리탁셀, 및 빈카 알칼로이드, 예를 들어 빈블라스틴 중에서 선택된 하나 이상의 화합물과 조합된 항-TF 항체.

[0511] · 전립선암의 치료를 위해, 호르몬/항호르몬 요법; 예를 들어 항안드로겐, 황체형성 호르몬 방출 호르몬 (LHRH) 효능제, 및 화학요법제, 예를 들어 탁산, 미톡산트론, 에스트라무스틴, 5FU, 빈블라스틴, 익사베필론 중에서 선택된 하나 이상의 화합물과 조합된 항-TF 항체.

[0512] · 난소암의 치료를 위해, 항-유사분열제, 예를 들어 탁산, 및 빈카 알칼로이드, 카엘릭스, 토포테칸 중에서 선택된 하나 이상의 화합물과 조합된 항-TF 항체.

[0513] 진단 용도

[0514] 본 발명의 항-TF 항체는 또한 진단 목적을 위해 사용될 수 있다. 따라서, 추가의 측면에서, 본 발명은 본원에서 정의되는 항-TF 항체를 포함하는 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0515] 하나의 실시양태에서, 본 발명의 항-TF 항체는 TF의 수준, 또는 그들의 막 표면 상에 TF를 함유하는 세포의 수준을 검출함으로써, TF를 발현하는 활성화된 세포가 발병기전에서 능동적인 역할을 하는 질병을 진단하기 위해 생체 내에서 또는 시험관 내에서 사용될 수 있다. 이것은 예를 들어, 시험할 샘플을 임의로 대조군 샘플과 함께 항-TF 항체와, 항체와 TF 사이에 복합체의 형성을 허용하는 조건 하에 접촉시킴으로써 달성할 수 있다. 이어서, 복합체 형성을 검출한다 (예를 들어, ELISA를 이용하여). 대조군 샘플을 시험 샘플과 함께 사용할 때, 복합체는 두 샘플 모두에서 검출되고, 샘플들 사이에서 복합체 형성의 임의의 통계상 유의한 차이는 시험 샘플 내의 TF의 존재를 표시한다.

[0516] 따라서, 추가의 측면에서, 본 발명은

[0517] - 샘플을 본 발명의 항-TF 항체 또는 본 발명의 이중특이적 분자와, 항체와 TF 사이에 복합체의 형성을 허용하는 조건 하에 접촉시키고;

[0518] - 복합체가 형성되었는지 검정하는 것

[0519] 을 포함하는, 샘플 내의 TF 항원, 또는 TF를 발현하는 세포의 존재를 검출하는 방법에 관한 것이다. 하나의 실시양태에서, 방법은 시험관 내에서 수행된다.

[0520] 보다 구체적으로, 본 발명은 침습적인 세포 및 조직, 및 본 발명의 항-TF 항체에 의해 표적화된 다른 세포의 확인 및 진단을 위한, 및 치료 치료의 진행, 치료 후의 상태, 암의 발병 위험, 암 진행 등의 모니터링을 위한 방법을 제공한다.

[0521] 그러한 진단 검정의 한 예에서, 본 발명은 항-TF 항체 및 잠재적인 TF-함유 조직 사이에 면역복합체를 형성시키고, 면역복합체의 형성을 검출하는 것을 포함하는, 조직 내의 침습적인 세포의 수준을 진단하는 방법을 제공하고, 여기서 면역복합체의 형성은 조직 내의 침습적인 세포의 존재와 상호관련된다. 접촉은 표지된 단리된 항체 및 표준 영상화 기술을 이용하여 생체 내에서 수행할 수 있거나, 조직 샘플 상에서 시험관 내에서 수행할 수 있다.

[0522] 항-TF 항체는 임의의 적합한 기술에 의해 임의의 적합한 생물학적 샘플 내에서 TF-함유 펩티드 및 펩티드 단편을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명에서 제공되는 통상적인 면역검정의 예는 비제한적으로 항-TF 항체를 사용하는 ELISA, RIA, FACS 검정, 플라스몬 공명 검정, 크로마토그래피 검정, 조직 면역조직화학, 웨스턴 블롯 (Western blot), 및/또는 면역침전을 포함한다. 본 발명의 항-TF 항체는 인간으로부터 TF 및 TF-단편을 검출하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 기술에서 사용되는 항-TF 항체 및/또는 2차 항체에 대한 적합한 표지는 비제한적으로 다양한 효소, 보결기 (prosthetic group), 형광 물질, 발광 물질, 및 방사성 물질을 포함한다. 적합한 효소의 예는 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β -갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제를 포함하고; 적합한 보결기 복합체의 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함하고; 적합한 형광

물질의 예는 움벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드 또는 피로에리쓰린을 포함하고; 발광 물질의 예는 루미놀을 포함하고; 적합한 방사성 물질의 예는 ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S 및 ^3H 를 포함한다.

[0523] 항-TF 항체는 또한 검출가능한 물질로 표지된 TF 펩티드 표준물 및 비표지된 항-TF 항체를 사용하는 경쟁 면역 검정에 의해 생물학적 샘플 내에서 검정될 수 있다. 그러한 검정에서, 생물학적 샘플, 표지된 TF 펩티드 표준물(들) 및 항-TF 항체는 조합되고, 비표지된 항-TF 항체에 결합된 표지된 TF 표준물의 양이 결정된다. 생물학적 샘플 내의 TF 펩티드의 양은 항-TF 항체에 결합된 표지된 TF 표준물의 양에 역비례한다.

[0524] 항-TF 항체는 종양의 생체내 영상화에서 특히 유용하다. TF와 연관된 종양의 생체내 영상화는 임의의 적합한 기술에 의해 수행할 수 있다. 예를 들어, 종양 내의 항-TF 항체 또는 종양으로부터 2차 표지된 (예를 들어, FITC 표지된) 항-TF 항체:TF 복합체를 표지하기 위해 ^{99}Tc -표지화 또는 또 다른 감마선 방출 동위원소를 사용한 표지화가 이용되고, 대개 저-에너지 고해상 조건기 (collimator) 또는 저-에너지 다목적 조건기를 사용하여 감마 섬광 카메라 (예를 들어, Elscint Apex 409ECT 장치)로 영상화할 수 있다. 이어서, 염색된 조직을 종양 내의 TF-연관 펩티드의 양의 표시자로서 방사능 계수에 대해 평가할 수 있다. 그러한 기술을 사용하여 얻어진 영상은 예를 들어 침습적인 암 세포의 존재에 대한 생체마커로서 TF 또는 TF-단편을 사용하는 맥락에서 환자, 포유동물, 또는 조직 내에서 TF의 생체분포를 평가하기 위해 사용될 수 있다. 상기 기술에 대한 변동은 감마 카메라 기술에 비해 영상화를 개선하기 위해 자기 공명 영상화 (MRI)의 사용을 포함할 수 있다. 유사한 면역신티 그라피 (immunoscintigraphy) 방법 및 원칙은 예를 들어 문헌 [Srivastava (ed.), Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy (Plenum Press 1988)], [Chase, "Medical Applications of Radioisotopes," in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Gennaro et al., (eds.), pp. 624-652 (Mack Publishing Co., 1990)] 및 [Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," in Biotechnology And Pharmacy 227-49, Pezzuto et al., (eds.) (Chapman & Hall 1993)]에 기재되어 있다. 그러한 영상은 또한 다른 항암제의 표적화 전달을 위해 사용될 수 있고, 그 예는 본원에서 설명된다 (예를 들어, 아포토시스 작용제, 독소, 또는 CHOP 화학요법 조성물). 또한, 그러한 영상은 또한 또는 별법으로 종양을 제거하기 위한 수술 기술에 대한 기초로서 역할을 할 수 있다. 또한, 그러한 생체내 영상화 기술은 환자가 종양이 있는 것으로 확인되지만 (다른 생체마커, 전이 등의 존재로 인한), 전통적인 검정 기술에 의해 종양이 확인될 수 없는 상황에서 종양의 확인 및 위치 결정을 허용할 수 있다. 모든 이들 방법은 본 발명의 특색이다.

[0525] 본 발명에서 제공되는 생체내 영상화 및 다른 진단 방법은 인간 환자 (예를 들어, 이전에 암으로 진단되지 않은 환자 또는 암으로부터 회복/관해 기간의 환자)에서 미소전이의 검출에서 특히 유용하다. 예를 들어, 모든 암세포의 90%까지 구성할 수 있는 암종 암세포는 항-TF 항체 접합체 조성물로 매우 잘 염색되는 것으로 입증되었다. 본원에서 설명되는 모노클로날 항-TF 항체를 사용한 검출은 공격성/침습성인 암종의 존재를 표시할 수 있고, 추가로 또는 별법으로 그러한 미소전이에 대항한 관련 모노클로날 항-TF 항체의 실행성에 대한 표시를 제공한다.

[0526] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 생체내 영상화 방법을 제공하고, 여기서 본 발명의 항-TF 항체를 검출-촉진 방사선-비투과제 (radio-opaque agent)에 접합하고, 접합된 항체를 예를 들어 혈류 내로 주사에 의해 숙주에 투여하고, 숙주 내의 표지된 항체의 존재 및 위치를 분석한다. 상기 기술 및 본원에서 제공되는 임의의 다른 진단 방법을 통해, 본 발명은 인간 환자 또는 인간 환자로부터 취한 생물학적 샘플 내에서 질병-관련 세포의 존재를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0527] 진단 영상화를 위해, 방사성 동위원소는 직접적으로 또는 중재 관능기를 사용함으로써 간접적으로 항-TF 항체에 결합될 수 있다. 유용한 중재 관능기는 킬레이터, 예를 들어 에틸렌디아민테트라아세트산 및 디에틸렌트리아민 펜타아세트산을 포함한다 (예를 들어 US 5,057,313 참조).

[0528] 방사성 동위원소 및 방사선 비투과제에 추가로, 진단 방법은 염료 (예를 들어, 비오틴-스트렙타비딘 복합체 사용), 조영제, 형광 화합물 또는 분자 및 자기 공명 영상화 (MRI)를 위한 증진제 (예를 들어 상자성 이온)에 접합된 항-TF 항체를 사용하여 수행할 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 6,331,175 참조, MRI 기술 및 MRI 증진제에 접합된 항체의 제조를 설명함). 상기 진단/검출제는 자기 공명 영상화에 사용하기 위한 물질, 및 형광 화합물 중에서 선택될 수 있다. 항-TF 항체를 방사성 금속 또는 상자성 이온으로 로딩하기 위해, 이를 이온에 결합하기 위한 다수의 킬레이팅기가 부착되는 긴 꼬리를 갖는 시약과 반응시키는 것이 필요할 수 있다. 그러한 꼬리는 중합체, 예를 들어 폴리리신, 다당류, 또는 펜던트기 (여기에 킬레이팅기, 예를 들어, 포르피린, 폴리아민, 크라운 (crown) 에테르, 비스티오세미카르바존, 폴리옥심 및 상기 목적에 유용한 것으로 알려진 유사한 기가 결합할 수 있음)를 갖는 다른 유도체화된 또는 유도체화가능한 사슬일 수 있다. 킬레이트는 표준 화학을 이용한

여 항-TF 항체에 커플링될 수 있다.

- [0529] 따라서, 본 발명은 진단적 항-TF 항체 접합체를 제공하고, 여기서 항-TF 항체는 조영제 (예를 들어, 자기 공명 영상화, 컴퓨터 단층촬영을 위한, 또는 초음파 조영 증강제) 또는 방사성 핵종 (예를 들어, 감마-, 베타-, 알파-, Auger 전자-, 또는 양전자-방출 동위원소일 수 있음)에 접합된다.
- [0530] 추가의 측면에서, 본 발명은
- [0531] - 본 발명의 항-TF 항체 또는 본 발명의 이중특이적 분자; 및
- [0532] - 키트의 사용 지시서
- [0533] 를 포함하는, 샘플 내의 TF 항원, 또는 TF를 발현하는 세포의 존재를 검출하기 위한 키트에 관한 것이다.
- [0534] 하나의 실시양태에서, 본 발명은 항-TF 항체, 및 TF 펩티드에 대한 항-TF 항체의 결합을 검출하기 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 용기를 포함하는, 암의 진단을 위한 키트를 제공한다. 시약은 예를 들어, 형광 태그, 효소 태그, 또는 다른 검출가능한 태그를 포함할 수 있다. 시약은 효소 반응을 위한 2차 또는 3차 항체 또는 시약을 또한 포함할 수 있고, 여기서 효소 반응은 시각화될 수 있는 생성물을 생산한다. 하나의 실시양태에서, 본 발명은 적합한 용기(들) 내에 표지된 또는 비표지된 형태의 본 발명의 하나 이상의 항-TF 항체, 간접적 검정을 위한 인큐베이션을 위한 시약, 및 표지의 성질에 따라 그러한 검정에서 검출을 위한 기질 또는 유도체화제를 포함하는 진단 키트를 제공한다. 대조 시약(들) 및 사용 지시서가 또한 포함될 수 있다.
- [0535] 진단 키트는 또한 세포 활성의 검출을 위해 또는 조직 샘플 또는 숙주 내에서 TF 펩티드의 존재를 검출하기 위해 항-TF 항체, 예를 들어 접합된/표지된 항-TF 항체와 함께 사용하기 위해 공급될 수 있다. 그러한 진단 키트에서 및 본원에서 다른 곳에서 설명되는 치료 용도를 위한 키트에서, 항-TF 항체는 대개 단독으로 또는 표적 세포 또는 펩티드에 특이적인 추가의 항체와 함께 용기 내에 동결건조된 형태로 제공될 수 있다. 일반적으로, 제약상 허용되는 담체 (예를 들어, 불활성 희석제) 및/또는 그의 성분, 예를 들어 Tris, 포스페이트 또는 카르보네이트 버퍼, 안정화제, 보존제, 살생물제, 살생물제, 불활성 단백질, 예를 들어, 혈청 알부민 등 (대개 혼합을 위해 별개의 용기 내에) 및 추가의 시약 (또한 대개 별개의 용기(들) 내에)이 또한 포함된다. 특정 키트에서, 항-TF 항체 (대개 별개의 용기 내에 존재하는)에 결합할 수 있는 2차 항체가 또한 포함된다. 제2 항체는 대개 표지에 접합되고 본 발명의 항-TF 항체와 유사한 방식으로 제형화된다. 상기 및 본원의 다른 곳에서 설명되는 방법을 이용하여, 항-TF 항체는 암/종양 세포의 서브세트를 정의하고 그러한 세포 및 관련 조직/성장을 특성 결정하기 위해 사용될 수 있다.
- [0536] 계내 검출은 환자로부터 조직학적 시료를 제거하고, 본 발명의 표지된 항-TF 항체의 조합물을 그러한 시료에 제공함으로써 달성할 수 있다. 본 발명의 항-TF 항체는 본 발명의 표지된 항-TF 항체를 생물학적 샘플에 적용함으로써 또는 덮음으로써 제공될 수 있다. 그러한 절차를 사용함으로써, TF 또는 TF-단편의 존재뿐만 아니라 검사된 조직 내에 그러한 펩티드의 분포를 결정하는 것이 가능하다 (예를 들어, 암세포의 확산을 평가하는 맥락에서). 본 발명을 이용하여, 당업자는 임의의 매우 다양한 조직학적 방법 (예를 들어, 염색 절차)이 그러한 계내 검출을 달성하기 위해 변형될 수 있음을 쉽게 알 것이다.
- [0537] 추가의 측면에서, 본 발명은 본원에서 설명되는 본 발명의 항-TF 항체에 결합하는 항-개별특이형 항체에 관한 것이다.
- [0538] 항-개별특이형 (Id) 항체는 일반적으로 항체의 항원-결합 부위와 회합된 특유한 결정인자를 인식하는 항체이다. Id 항체는 항-TF mAb의 공급원과 동일한 종 및 유전자형의 동물을 그에 대해 항-Id가 제조되는 mAb로 면역화시킴으로써 제조할 수 있다. 면역화된 동물은 대개 이들 개별특이형 결정인자에 대한 항체 (항-Id 항체)를 생산함으로써 면역화 항체의 개별특이형 결정인자를 인식하고 반응할 수 있다. 그러한 항체는 예를 들어 US 4,699,880에 설명되어 있다. 그러한 항체는 본 발명의 추가의 특색이다.
- [0539] 항-Id 항체는 소위 항-항-Id 항체를 생산하도록 또 다른 동물에서 면역 반응을 유도하기 위해 "면역원"으로서 또한 사용될 수 있다. 항-항-Id는 항-Id를 유도하는 원래의 mAb에 에피토프가 동일할 수 있다. 따라서, mAb의 개별특이형 결정인자에 대한 항체를 사용함으로써, 동일한 특이성의 항체를 발현하는 다른 클론을 확인하는 것이 가능하다. 항-Id 항체는 본 발명의 항-TF 항체에 관하여 본원에의 다른 곳에서 설명되는 것과 같은 임의의 적합한 기술에 의해 변화되고/되거나 (그에 의해 항-Id 항체 변이체를 생산함) 유도체화될 수 있다. 예를 들어, 항-Id mAb는 키크 림펫 헤모시아닌 (KLH)과 같은 담체에 커플링되고, BALB/c 마우스를 면역화시키기 위해 사용될 수 있다. 이들 마우스로부터의 혈청은 대개 원래의/모 TF 항체와 동일하지 않으면 유사한 결합 특성을

갖는 항-항-Id 항체를 함유할 것이다.

[0540] 본 발명은 다음 실시예에 의해 더욱 예시되고, 본 발명이 이에 의해 추가로 제한되는 것으로 해석되지 않아야 한다.

발명의 효과

[0541] 본 발명의 목적은 의학 용도를 위해 신규한, 고도로 특이적이고 효과적인 인간 항-TF 항체를 제공하는 것이다. 본 발명의 항체는 당업계에서 설명된 항체와 상이한 TF 결합 특징을 나타낸다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항체는 인간 조직 인자에 대해 높은 친화도를 갖고, 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 매개하고, TF에 대한 FVIIa 결합을 억제하고, FVIIa-유도된 ERK 인산화 및 IL8 방출을 억제하고, 응고를 억제하지 않거나 불량하게 억제한다.

도면의 간단한 설명

[0542] 도 1: 본 발명의 항체의 서열의 정렬.
IMGT에 따른 CDR1, CDR2 및 CDR3이 강조되고: 이탤릭체 서열은 CDR1 영역을 나타내고, 밑줄친 서열은 CDR2 영역을 나타내고, 굵은 서열은 CDR3 영역을 나타낸다.

도 2: IgG4 서열 (서열 113-114)
서열 113: 인간 IgG4의 야생형 CH 영역의 아미노산 서열. 이탤릭체 서열은 CH1 영역을 나타내고, 강조된 서열은 힌지 영역을 나타내고, 보통의 서열은 CH2 영역을 나타내고, 밑줄친 서열은 CH3 영역을 나타낸다.
서열 114: 인간 IgG4의 힌지가 없는 CH 영역의 아미노산 서열.

도 3: TF의 세포외 도메인에 대한 항-TF HuMab의 결합.
도 4: 막 결합형 TF에 대한 항-TF HuMab의 결합.
도 5: TF에 대한 FVIIa 결합의 억제.
도 6a: FVIIa 유도된 ERK 인산화의 억제
도 6b: FVIIa 유도된 ERK 인산화의 억제
도 7: FVIIa 유도된 IL-8 방출의 억제.
도 8: FXa 생성의 억제.
도 9: 혈액 응고의 억제.
도 10: TF-HuMab는 ADCC에 의한 Bx-PC3 세포의 용해를 유도한다.
도 11: 표적 세포에 대한 보체 성분 C3c 및 C4c의 침착.
도 12: 사구체에 대한 TF-HuMab의 결합의 면역조직화학 분석.
도 13: 췌장 종양에 대한 TF-HuMab의 결합의 면역조직화학 분석.
도 14: 확립된 MDA-MB-231 종양 이종이식편에서 TF-HuMab의 생체내 효능.
도 15: TF-특이적 HuMab 011의 정맥내 주사 시에 시노몰구스 (cynomolgus) 원숭이에서 결정된 출혈 시간. 항체를 제1일 (0 mg/kg), 제8일 (1 mg/kg), 제15일 (10 mg/kg) 및 제22일 (100 mg/kg)에 투여하였다.
도 16: 예방 및 확립된 BX-PC3 종양 이종이식편에서 TF-HuMab의 생체내 효능.
도 17: 셔플 (shuffle) 구축물 및 TF 도메인.
도 18: TF 셔플 구축물에 대한 항-TF 항체의 결합.
도 19: TF의 세포외 도메인에 대한 HuMab-TF Fab 단편의 결합 (ELISA)
도 20: TF의 세포외 도메인에 대한 HuMab-TF Fab 단편의 결합 (FACS)
도 21: 발현된 TF 분자의 수에 의존적인 항-TF HuMab의 결합 프로파일.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0543] 실시예
- [0544] 실시예 1
- [0545] 조직 인자 (TF)에 대한 발현 구축물
- [0546] HEK, NSO 또는 CHO 세포에서 TF 또는 그의 세포의 도메인의 발현을 위한 완전히 코돈-최적화된 구축물을 생성하였다. 이들 구축물에 의해 코딩되는 단백질은 TF에 대한 Genbank 기탁 번호 NP_001984와 동일하다. 구축물은 클로닝을 위한 적합한 제한 부위 및 최적 코작 (Kozak) 서열 (Kozak, 1987)를 함유하였다. 구축물을 포유동물 발현 벡터 pEE13.4 (론자 바이올로지스 (Lonza Biologies)) 내에서 클로닝시켜 (Bebington, Renner et al. 1992), pEE13.4TF를 얻었다. PCR을 이용하여, 6개의 His 잔기를 함유하는 C-말단 His 태그 (TFECDHis)를 첨가하는 합성 구축물로부터 TF의 세포의 도메인 (ECD) (아미노산 1-251)을 코딩하는 부분을 증폭하였다. 구축물을 pEE13.4 내에서 클로닝하고, 완전히 서열 결정하여 구축물의 정확성을 확인하였다.
- [0547] 실시예 2
- [0548] HEK-293F 세포 내에서의 일시적인 발현
- [0549] 프리스타일 (Freestyle)TM 293-F (현탁 성장 및 화학적으로 정의된 프리스타일 배지에 적합한 HEK-293 서브클론 (HEK-293F)) 세포를 인비트로겐으로부터 입수하고, 제조자의 지시에 따라 293fectin (인비트로겐)을 이용하여 적절한 플라스미드 DNA로 형질감염시켰다. 항체 발현의 경우에, 실시예 10에 설명된 바와 같은 적절한 중쇄 및 경쇄 벡터를 동시-발현시켰다.
- [0550] 실시예 3
- [0551] NSO 세포 내에서의 반-안정한 발현
- [0552] pEE13.4TF를 NSO 세포 내에 안정하게 형질감염시키고, 안정한 클론을 글루타민의 부재 하에 및 7.5 μ M의 메틸 술폰시민 (MSX)의 존재 하에 성장에 대해 선택하였다. 클론의 풀 (pool)을 선택 압력을 유지하면서 현탁 배양 내에서 성장시켰다. 풀을 FACS 분석에 의해 TF 발현에 대해 시험하고, 추가의 사용을 위해 확보하였다.
- [0553] 실시예 4
- [0554] CHO 세포 내에서의 안정한 발현
- [0555] pEE13.4TF를 CHO-K1SV (론자 바이올로지스) 세포 내에서 안정하게 형질감염시키고, 안정한 클론을 글루타민의 부재 하에 및 50 μ M MSX의 존재 하에 성장에 대해 선택하였다. 단일 클론을 집어 팽창시키고, 아래 설명된 바와 같이 FACS 분석에 의해 TF 발현에 대해 시험하였다. 고발현 클론을 선택하고 추가의 사용을 위해 확보하였다.
- [0556] 실시예 5
- [0557] His-태깅된 TF의 정제
- [0558] TFECDHis를 HEK-293F 세포 내에서 발현시켰다. TFECDHis 내의 his-태그로 인해 고정된 금속 친화도 크로마토그래피를 이용한 정제가 가능하다. 상기 공정에서, 크로마토그래피 수지 상에 고정된 킬레이터를 Co^{2+} 양이온으로 채운다. TFECDHis-함유 상등액을 수지와 함께 배치 (batch) 방식 (즉, 용액)으로 인큐베이팅한다. His-태깅된 단백질은 수지 비드 (bead)에 강하게 결합하는 반면, 배양 상등액 내에 존재하는 다른 단백질은 강하게 결합하지 않는다. 인큐베이션 후에, 비드를 상등액으로부터 회수하고, 컬럼 내로 채웠다. 약하게 결합된 단백질을 제거하기 위해 컬럼을 세척한다. 이어서, 강하게 결합된 TFECDHis 단백질을 Co^{2+} 에 대한 His의 결합과 경쟁하는 이미다졸을 함유하는 버퍼를 사용하여 용출시킨다. 용출액을 탈염 컬럼 상에서 버퍼 교환에 의해 단백질로부터 제거한다.
- [0559] 실시예 6
- [0560] 트랜스제닉 마우스의 면역화 절차
- [0561] HuMab 마우스를 5×10^6 개의 반-안정한 형질감염된 NSO-TF 세포 또는 20 μ g의 TFECDHis 단백질로 교대로 2주마다

면역화시켰다. 4회의 복강내 (IP) 및 꼬리 기부에서 4회의 피하 (SC) 면역화를 비롯한 총 8회의 면역화를 수행하였다. 세포를 사용한 제1 면역화는 완전 프로인트 어쥬번트 (adjuvant) (CFA; 디프코 레보라토리스 (Difco Laboratories, 미국 미시건주 디트로이트)) 내에서 이루어졌다. 다른 모든 면역화를 위해, 세포를 PBS 내에서 IP 주사하고, TFECDHis를 불완전 프로인트 어쥬번트 (IFA; 디프코 레보라토리스, 미국 미시건주 디트로이트)를 사용하여 SC 주사하였다. 혈청 역가가 충분한 것으로 밝혀졌을 때 (1/50 또는 그보다 낮은 혈청의 희석액은 적어도 2회의 순차적인, 격주 스크리닝 사건에서 실시예 7에 설명된 바와 같은 항원 특이적 스크리닝 검정에서 양성으로 밝혀졌다), 마우스에게 추가로 100 μ l PBS 내의 10 μ g TFECDHis 단백질을 용합 4 및 3일 전에 2회 정맥내 (IV) 추가 접종하였다. 세포를 사용한 제1 면역화는 CFA 내에서 이루어졌고, 다른 모든 (7) 면역화를 위해 세포를 PBS 내에서 IP 주사하였다. 혈청 역가가 충분한 것으로 밝혀졌을 때, 마우스에게 추가로 100 μ l PBS 중의 1×10^6 개의 일시적으로 반-안정하게 형질감염된 NSO-TF 세포를 용합 4 및 3일 전에 2회 IV 추가 접종하였다.

[0562] 혈청 역가가 충분한 것으로 밝혀졌을 때 (상기 규정된), 마우스에게 추가로 100 μ l PBS 중의 10 μ g TFECDHis 단백질을 용합 4 및 3일 전에 2회 정맥내 (IV) 추가 접종하였다.

[0563] 실시예 7

[0564] 균질 항원 특이적 스크리닝 검정

[0565] 면역화시킨 마우스의 혈청 또는 HuMab (인간 모노클로날 항체) 하이브리도마 또는 트랜스펙토마 배양 상등액 내의 항-TF 항체의 존재를 형광측정 미세부피 검정 기술 (FMAT; 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems, 미국 캘리포니아주 포스터시티))을 이용하는 균질 항원 특이적 스크리닝 검정 (4개의 4분원)에 의해 결정하였다.

[0566] 이를 위해, 3개의 세포 기반 검정 및 1개의 비드 기반 검정의 조합을 이용하였다. 세포 기반 검정에서, TH1015-TF (TF를 일시적으로 발현하는 HEK-293F 세포; 상기 설명된 바와 같이 생산된) 및 A431 (세포 표면에서 TF를 발현함)뿐만 아니라 HEK293 야생형 세포 (TF를 발현하지 않음, 음성 대조군)에 대한 결합을 결정하였다. 비드 기반 검정에서, 스트렙타비딘 비드에 커플링된 비오틴화 TF (SB1015-TF)에 대한 결합을 결정하였다.

[0567] 샘플을 세포/비드에 첨가하여 TF에 결합시켰다. 후속적으로, HuMab의 결합을 형광 접합체 (염소 항-인간 IgG-Cy5; 잭슨 이뮤노리서치 (Jackson ImmunoResearch))를 사용하여 검출하였다. 마우스 항-인간 TF 항체 (ERL; 젠맵에서 Alexa-647에 커플링시킴)를 양성 대조군으로서 사용하고, HuMab-마우스에서 모은 혈청 및 마우스-크롬 퓨어 (chrompure)-Alexa647 항체를 음성 대조군으로서 사용하였다. 샘플을 어플라이드 바이오시스템즈 8200 세포 검출 시스템 (Cellular Detection System) (8200 CDS)을 이용하여 스캐닝하고, '계수 x 형광'을 판독치 (read-out)로서 사용하였다.

[0568] 실시예 8

[0569] HuMab 하이브리도마 생성

[0570] 충분한 항원-특이적 역가 발달 (상기 규정되는 바와 같이)을 갖는 HuMab 마우스를 안락사시키고, 복부 대동맥 및 대정맥에 측면이 접하는 비장 및 림프절을 수집하였다. 마우스 골수종 세포주에 대한 비장세포 및 림프절 세포의 용합은 본질적으로 제조자의 지시에 따라 CEEF 50 전기융합 시스템 (사이토 펄스 사이언스즈 (Cyto Pulse Sciences, 미국 메릴랜드주 글렌 버니))를 이용하는 전기융합에 의해 수행하였다. 생성되는 HuMab 하이브리도마의 선택 및 배양은 표준 프로토콜에 기초하여 이루어졌다 (예를 들어, 문헌[Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006]에 설명된 바와 같이).

[0571] 실시예 9

[0572] 정제된 항체의 질량 분광법

[0573] 6-웰 또는 하이퍼플라스크 (Hyperflask) 스테이지로부터 0.8 ml 항체 함유 상등액의 적은 분취액을 사이클론 (Sciclone) ALH 3000 워크스테이션 (캘리퍼 라이프사이언스즈 (Caliper Lifesciences, 미국 홉킨턴)) 상에서 단백질 G 수지를 함유하는 PhyTip 컬럼 (파이넥서스 인크. (PhyNexus Inc., 미국 산 호세))을 사용하여 정제하였다. PhyTip 컬럼을 제조자의 지시에 따라 사용하지만, 버퍼를 결합 버퍼 PBS (비.브라운 (B.Braun), 메디컬 비.브이. (Medical B.V.), 네덜란드 오쓰) 및 용출 버퍼 0.1M 글리신-HCl (pH 2.7) (플루카 리이델-드 헨

(Fluka Riedel-de Haen, 독일 부크스))로 대체하였다. 정제 후에, 샘플을 2M Tris-HCl (pH 9.0) (시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich, 네덜란드 즈빈드레흐))로 중화시켰다. 별법으로, 일부 경우에, 보다 큰 부피의 배양 상등액을 단백질 A 친화도 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

[0574] 정제 후에, 샘플을 384-웰 플레이트 (워터스 (Waters), 100 μ l 사각웰 플레이트, part# 186002631)에 넣었다. 샘플을 N-글리코시다제 F (로슈 (Roche) cat no 11365177001)로 37°C에서 밤새 탈글리코실화하였다. DTT (15 mg/ml)를 첨가하고 (1 μ l/웰), 1 h 동안 37°C에서 인큐베이팅하였다. 샘플 (5 또는 6 μ l)을 60°C에서 BEH300 C18, 1.7 μ m, 2.1 x 50 mm 컬럼을 사용하여 Acquity UPLC™ (워터스, 미국 밀포드) 상에서 탈염시켰다. MQ 물 및 LC-MS 등급 아세트니트릴 (바이오솔브 (Biosolve), cat no 01204101, 네덜란드 볼켄스바르트)을 둘 모두 0.1% 포름산 (플루카, cat no 56302, 독일 부크스)과 함께 각각 용출매 A 및 B로서 사용하였다. 경과시간 (time-of-flight) 전자분무 이온화 질량 스펙트럼을 양이온 방식으로 작동하는 microTOF™ 질량 분광기 (브루커 (Bruker, 독일 브레멘)) 상에서 온-라인 (on-line)으로 기록하였다. 분석에 앞서, 900-3000 m/z 스케일을 ES 튜닝 믹스 (tuning mix) (애질런트 테크놀로지스 (Agilent Technologies, 미국 산타 클라라))를 사용하여 보정하였다. 질량 스펙트럼을 5 내지 80 kDa의 분자량을 탐색하는 최대 엔트로피 (Maximal Entropy) 알고리즘을 이용한 데이터어널리시스 (DataAnalysis)™ 소프트웨어 v. 3.4 (브루커)로 디컨볼루션 (deconvolution)하였다.

[0575] 디컨볼루션 후에, 중복 항체를 발견하기 위해 모든 샘플에 대해 생성되는 중쇄 및 경쇄 질량을 비교하였다. 중쇄의 비교에서, C-말단 리신 변이체의 가능한 존재를 고려하였다. 이것은 특유한 항체의 목록을 생성시키고, 여기서 "특유한"은 중쇄 및 경쇄의 특유한 조합으로서 정의된다. 중복 항체가 발견된 경우에, 다른 시험으로부터의 결과를 사용하여 어떠한 물질이 실험을 계속하기 위해 사용되는 최상의 물질인지 결정하였다.

[0576] 118개의 TF 특이적 하이브리도마의 중쇄 및 경쇄의 분자량의 MS 분석으로 70개의 특유한 항체 (특유한 중쇄/경쇄 조합)를 생성시켰다. 이들을 많은 기능적 검정에서 특성 결정하였고, 여기서 14개의 선도 후보, TF 특이적 항체를 확인한다.

[0577] 실시예 10

[0578] 항-TF HuMab 가변 도메인의 서열 분석 및 발현 벡터 내에서 클로닝

[0579] 5×10^6 개의 하이브리도마 세포로부터 항-TF HuMab의 총 RNA를 제조하고, 제조자의 지시에 따라 SMART RACE cDNA 증폭 키트 (클론테크 (Clontech))를 사용하여 100 ng의 총 RNA로부터 5'-RACE-상보성 DNA (cDNA)를 제조하였다. VH (중쇄의 가변 영역) 및 VL (경쇄의 가변 영역) 코딩 영역을 PCR에 의해 증폭시키고, Zero Blunt PCR 클로닝 키트 (인비트로젠)를 사용하여 pCR-Blunt II-TOPO 벡터 (인비트로젠) 내로 클로닝하였다. 각각의 HuMab에 대해, 16개의 VL 클론 및 8개의 VH 클론을 서열 결정하였다. 서열을 본원에서 서열 목록 및 도 1에 제시한다.

[0580] 표 1A 및 표 1B (아래)는 항체 서열 정보 및 가장 상동성인 생식계열 서열의 개요를 제공한다.

[0581] <표 1A>

중쇄 상동성

Ab	V-유전자 및 대립유전자	V-영역 동일성, %	J-유전자 및 대립유전자	D-유전자 및 대립유전자	CDR-IMG ⁺ 길이
003	IGHV1-69*02, 또는 IGHV1-69*04	97.57% (281/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD6-13*01	[8,8,11]
098	IGHV1-69*04	95.49% (275/288 nt)	IGHJ3*02	IGHD2-21*02	[8,8,11]
011	IGHV3-23*01	96.53% (278/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD1-26*01	[8,8,11]
017	IGHV3-23*01	98.26% (283/288 nt)	IGHJ2*01	IGHD2-15*01	[8,8,13]
092	IGHV3-23*01	97.92% (282/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,11]
101	IGHV3-23*01	95.83% (276/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,11]
025	IGHV3-30-3*01	97.57% (281/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,13]
109	IGHV3-30-3*01	96.18% (277/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,13]
111	IGHV3-30-3*01	97.57% (281/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD3-10*01	[8,8,13]
114	IGHV3-33*01, 또는 IGHV3-33*03	94.44% (272/288 nt)	IGHJ6*02	IGHD3-10*01	[8,8,12]
013	IGHV5-51*01	99.65% (287/288 nt)	IGHJ3*02	IGHD6-13*01	[8,8,19]

[0582]

[0583] <표 1B>

정쇄 상동성			J- 유전자 및 대립유전자	CDR-IMGT 길이
Ab	V- 유전자 및 대립유전자	V-영역 동일성, % (nt)		
003	IGKV1-13*02	99.28% (277/279 nt)	IGKJ4*01	[6.3.9]
011	IGKV1D-16*01	98.57% (275/279 nt)	IGKJ2*01	[6.3.9]
013	IGKV1D-16*01	98.57% (275/279 nt)	IGKJ5*01	[6.3.9]
092	IGKV1D-16*01	99.28% (277/279 nt)	IGKJ2*01	[6.3.10]
098	IGKV1D-16*01	100.00% (279/279 nt)	IGKJ2*01	[6.3.9]
101	IGKV1D-16*01	100.00% (279/279 nt)	IGKJ2*01	[6.3.10]
025	IGKV3-11*01	100.00% (279/279 nt)	IGKJ4*01	[6.3.9]
109	IGKV3-11*01	99.64% (278/279 nt)	IGKJ4*01	[6.3.9]
017	IGKV3-20*01	99.29% (280/282 nt)	IGKJ1*01	[7.3.9]
114	IGKV3-20*01	99.65% (281/282 nt)	IGKJ4*01	[7.3.8]

[0584]

[0585] 서열 목록에 대한 참조:

VH-영역	
서열 1	VH 013
서열 2	VH 013 , CDR1

[0586]

서열 3	VH 013 , CDR2
서열 4	VH 013 , CDR3
서열 5	VH 114
서열 6	VH 114 , CDR1
서열 7	VH 114 , CDR2
서열 8	VH 114 , CDR3
서열 9	VH 011
서열 10	VH 011 , CDR1
서열 11	VH 011 , CDR2
서열 12	VH 011 , CDR3
서열 13	VH 017-D12
서열 14	VH 017-D12 , CDR1
서열 15	VH 017-D12 , CDR2
서열 16	VH 017-D12 , CDR3
서열 17	VH 042
서열 18	VH 042 , CDR1
서열 19	VH 042 , CDR2
서열 20	VH 042 , CDR3
서열 21	VH 092-A09
서열 22	VH 092-A09, CDR1
서열 23	VH 092-A09, CDR2
서열 24	VH 092-A09, CDR3
서열 25	VH 101
서열 26	VH 101 , CDR1
서열 27	VH 101 , CDR2
서열 28	VH 101 , CDR3
서열 29	VH 003
서열 30	VH 003 , CDR1
서열 31	VH 003 , CDR2

[0587]

서열 32	VH 003 , CDR3
서열 33	VH 025
서열 34	VH 025 , CDR1
서열 35	VH 025 , CDR2
서열 36	VH 025 , CDR3
서열 37	VH 109
서열 38	VH 109 , CDR1
서열 39	VH 109 , CDR2
서열 40	VH 109 , CDR3
서열 41	VH 044
서열 42	VH 044 , CDR1
서열 43	VH 044 , CDR2
서열 44	VH 044 , CDR3
서열 45	VH 087-Lg6
서열 46	VH 087-Lg6, CDR1
서열 47	VH 087-Lg6, CDR2
서열 48	VH 087-Lg6, CDR3
서열 49	VH 098
서열 50	VH 098 , CDR1
서열 51	VH 098 , CDR2
서열 52	VH 098 , CDR3
서열 53	VH 111
서열 54	VH 111 , CDR1
서열 55	VH 111 , CDR2
서열 56	VH 111 , CDR3

VL-영역	
서열 57	VL 013
서열 58	VL 013 , CDR1
서열 59	VL 013 , CDR2

[0588]

서열 60	VL 013 , CDR3
서열 61	VL 114
서열 62	VL 114 , CDR1
서열 63	VL 114 , CDR2
서열 64	VL 114 , CDR3
서열 65	VL 011
서열 66	VL 011 , CDR1
서열 67	VL 011 , CDR2
서열 68	VL 011 , CDR3
서열 69	VL 017-D12
서열 70	VL 017-D12 , CDR1
서열 71	VL 017-D12 , CDR2
서열 72	VL 017-D12 , CDR3
서열 73	VL 042
서열 74	VL 042 , CDR1
서열 75	VL 042 , CDR2
서열 76	VL 042 , CDR3
서열 77	VL 092-A09
서열 78	VL 092-A09, CDR1
서열 79	VL 092-A09, CDR2
서열 80	VL 092-A09, CDR3
서열 81	VL 101
서열 82	VL 101 , CDR1
서열 83	VL 101 , CDR2
서열 84	VL 101 , CDR3
서열 85	VL 003
서열 86	VL 003 , CDR1
서열 87	VL 003 , CDR2
서열 88	VL 003 , CDR3

[0589]

서열 89	VL 025
서열 90	VL 025 , CDR1
서열 91	VL 025 , CDR2
서열 92	VL 025 , CDR3
서열 93	VL 109
서열 94	VL 109 , CDR1
서열 95	VL 109 , CDR2
서열 96	VL 109 , CDR3
서열 97	VL 044
서열 98	VL 044 , CDR1
서열 99	VL 044 , CDR2
서열 100	VL 044 , CDR3
서열 101	VL 087
서열 102	VL 087 , CDR1
서열 103	VL 087 , CDR2
서열 104	VL 087 , CDR3
서열 105	VL 098
서열 106	VL 098 , CDR1
서열 107	VL 098 , CDR2
서열 108	VL 098 , CDR3
서열 109	VL 111
서열 110	VL 111 , CDR1
서열 111	VL 111 , CDR2
서열 112	VL 111 , CDR3

[0590]

[0591]

실시예 11

[0592]

항체의 정제

[0593]

배양 상등액을 0.2 μ m 전량 (dead-end) 필터 위에서 여과하고, 5 ml 단백질 A 컬럼 (rProtein A FF, 아머삼 바이오사이언스 (Amersham Bioscience)) 상에 로딩하고, 0.1 M 시트르산-NaOH (pH 3)로 용출시킨다. 용출액을 2M Tris-HCl (pH 9)로 즉시 중화시키고, 12.6 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl (pH 7.4) (비.브라운)로 밤새 투석하였다. 투석 후에, 샘플을 0.2 μ m 전량 필터 위에서 멸균 여과시켰다. 순도는 SDS-PAGE에 의해 결정하고, 농도는 비탁법 및 280 nm에서 흡광도에 의해 측정하였다. 정제된 항체를 분취하고 -80℃에서 저장하였다. 일단 해동 되면, 정제된 항체 분취액을 4℃에서 유지하였다. 실시예 9에 설명된 바와 같이 하이브리도마에 의해 발현된 항체 증쇄 및 경쇄의 분자 질량을 확인하기 위해 질량 분광법을 수행하였다.

[0594]

실시예 12

[0595]

샌드위치 (sandwich)-ELISA를 이용하는 항체 교차-경쟁 연구

[0596]

ELISA 플레이트 웰을 PBS 중에 희석시킨 각각의 항-TF HuMab (0.5 또는 2 μ g/ml 100 μ l/웰)로 +4℃에서 밤새 코팅하였다. ELISA 웰을 PBS로 세척하고, 1시간 동안 실온에서 PBS 중의 2% (v/v) 닭 혈청 (깁코 (Gibco, 스코틀랜드 페이즐리))으로 차단하고, PBS로 다시 세척하였다. 후속적으로, 50 μ l 항-TF HuMab (10 μ g/mL)에 이어 50 μ l TFECDHis (0.5 또는 1 μ g/ml) (젠맵에서 생성시킴; 실시예 5)을 첨가하고, 1시간 동안 RT에서 (진탕하면서) 인큐베이팅하였다. 플레이트를 PBST (PBS + 0.05% 트윈)로 3회 세척하고, 1:2000 희석시킨 항-his 비오틴 BAM050과 함께 1시간 동안 RT에서 (진탕하면서) 인큐베이팅하였다. 플레이트를 세척하고 스트렙타비딘-폴리-HRP (상킨 (Sanquin, 네덜란드 암스테르담))과 함께 20분 동안 RT에서 인큐베이팅하고, 다시 세척하였다. 반응액을 암소에서 RT에서 ABTS (로슈 다이아그노스틱스 (Roche Diagnostics))로 더욱 발색시키고, 2% (w/v) 옥살산을 첨가하여 15분 후에 중지시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0597]

표 2는 3개의 교차-차단군 (TFECDHis 결합에 대해 서로 경쟁하는 항체의 군)이 확인될 수 있음을 보여주고, 여

기서 항체 013, 044 및 087-Lg6은 하나의 교차-차단군 (제I군)에 속하고, 항체 011, 017-D12, 42, 092-A09 및 101은 또 다른 교차-차단군 (제II군)에 속하고, 항체 003, 025, 109 및 111은 제3의 교차-차단군 (제III군)에 속한다. 항체 114는 TFECDDHis 결합에 대해 교차-차단군 II 및 III 모두로부터의 항체와 경쟁하는 것으로 밝혀졌다. TFECDDHis에 대한 항체 098 결합은 교차-차단군 II 및 III 모두로부터의 항체에 의해 경쟁될 수 있다.

표 2

	I			II				
	0.5 ug 코트	2 ug 코트	2 ug 코트	0.5 ug 코트	0.5 ug 코트	0.5 ug 코트	0.5 ug 코트	0.5 ug 코트
경쟁자 항체 (10 ug/ml)	13	44	067-Lg6	11	017-D12	42	092-A09	101
13	19	5	28	101	100	98	110	98
44	93	40	29	109	96	96	103	109
067-Lg6	91	54	41	103	93	95	109	93
11	96	143	929	20	34	35	21	23
017-D12	97	143	995	14	25	20	8	12
42	99	143	931	18	28	27	10	17
092-A09	95	143	995	22	37	37	32	24
101	96	100	714	10	15	15	10	12
114	101	143	995	21	34	34	19	22
98	95	143	995	90	93	97	91	86
9	84	118	770	100	95	91	96	88
25	102	143	995	117	96	108	111	100
109	96	143	995	101	100	101	99	102
111	89	143	995	110	93	102	95	108

	II/III		III			
	0.5 ug 코트	2 ug 코트	0.5 ug 코트	0.5 ug 코트	0.5 ug 코트	2 ug 코트
경쟁자 항체 (10 ug/ml)	114	98	9	29	109	111
13	105	320	85	89	110	175
44	105	330	80	108	94	175
067-Lg6	107	210	88	105	103	115
11	19	9	103	104	109	175
017-D12	9	9	100	108	97	175
42	24	8	98	93	111	155
092-A09	22	10	103	108	101	175
101	11	7	96	108	106	118
114	13	9	100	47	26	9
98	94	24	103	94	86	35
9	102	10	33	22	10	6
25	28	10	48	34	11	6
109	44	9	62	51	17	6
111	99	37	89	104	93	43

TFECDDHis에 대한 결합을 위한 항-TF 항체의 경쟁

[0598]

[0599]

백색 상자는 결합에 대한 경쟁이 없음을 나타내고, 연회색 상자는 결합에 대해 부분적인 경쟁을 나타내고, 암회색 상자는 TFECDDHis에 대한 결합에 대한 경쟁을 나타낸다.

[0600]

실시예 13

[0601]

ELISA에서 TF의 세포외 도메인에 대한 항-TF HuMab의 결합

[0602]

수득된 항-TF HuMab의 특이성을 ELISA에 의해 평가하였다. ELISA 플레이트 (마이크로론 (Microton); 그라이너 바이오-원 (Greiner Bio-One))를 +4℃에서 PBS (pH 7.4) 중 0.5 µg/mL의 TFECDDHis로 밤새 코팅하였다. 코팅된 ELISA 플레이트를 비우고 1시간 동안 실온에서 PBS 중의 2% (v/v) 닭 혈청 (킵코, 스코틀랜드 페이즐리)으로 차단하고, 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS (PBST)로 세척하였다. 후속적으로, HuMab (PBSTC (2% (v/v) 닭 혈청 및 0.05% (v/v) 트윈-20이 보충된 PBS) 내에 연속 희석시킴)을 1 hr 동안 RT에서 진탕 조건 (300 rpm) 하에 인큐베이팅하였다. 결합된 HuMab를 PBSTC 중에 1:5,000으로 희석시킨 HRP-접합된 염소-항-인간 IgG 항체 (잭슨 이뮤노리서치)를 사용하여 검출하고, 이를 1 hr 동안 RT에서 진탕 조건 (300 rpm) 하에 인큐베이팅하였다. 반응액을 암소에서 RT에서 ABTS (로슈 다이아그노스틱스)로 더욱 발색시키고, 2% (w/v) 옥살산을 첨가하여 15-30분 후에 중지시킨 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. HuMab-KLH (KLH (키홀 림펫 헤모시아닌)에 대해 작용성인 인간 모노클로날 항체)를 음성 대조군으로서 사용하였다. 마우스 항-인간 TF (ERL)를 양성 대조군으로서 사용하였다 (접합체로서 HRP 표지된 항-마우스 IgG). 결합 곡선을 GraphPad Prism V4.03 소프트웨어를 이용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자상 용량-반응)를 이용하여 검정하였다.

[0603] 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 모든 항-TF 항체는 TFECdHis에 결합하였다. HuMab에 대한 EC₅₀ 값은 3개의 실험의 평균이고, 0.09 내지 0.46 nM로 변화였다 (아래 표 3).

표 3

군	HuMab TF	EC50 nM
I	13	0.24
I	44	0.14
I	87-Lg6	0.09
II	11	0.16
II	017-D12	0.25
II	42	0.23
II	092-A09	0.18
II	101	0.28
II/III	98	0.13
II/III	114	0.17
III	3	0.46
III	25	0.34
III	109	0.27
III	111	0.11

[0604]

[0605] 실시예 14

[0606] 막 결합형 TF에 대한 항-TF HuMab의 결합

[0607] 막 결합형 TF에 대한 항-TF HuMab의 결합을 TF 형질감염된 CHO 세포, 또는 TF 발현 종양 세포주 MDA-MB-231, (루시페라제 형질감염된) A431 및 Bx-PC3을 사용하여 FACS 분석에 의해 결정하였다.

[0608] 세포를 PBS (2×10^6 세포/ml) 내에 재현탁시키고 96-웰 V자형 바닥 플레이트 (50 μ l/웰)에 넣었다. FACS 버퍼 (0.1% BSA 및 0.02% Na-아지드를 보충한 PBS) 중의 50 μ l의 연속 희석된 HuMab을 세포에 첨가하고, 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이팅하였다. FACS 버퍼로 3회 세척한 후, 50 μ l의 피코에리스틴 (PE)-접합된 염소 항-인간 IgGfc (잭슨 면역노리서치) (FACS 버퍼 중에 1:100으로 희석시킴)을 첨가하였다. 얼음 상에서 30분 후에 (암소에서), 세포를 3회 세척하고, HuMab의 특이적 결합을 FACSCalibur (비디 바이오사이언시즈 (BD Biosciences)) 상에서 유동 세포측정법에 의해 검출하였다. HuMab-KLH를 음성 대조군으로서 사용하였다. 마우스 항-TF에 이어 PE-접합된 항-마우스 IgGfc를 양성 대조군으로서 사용하였다. 결합 곡선을 GraphPad Prism V4.03 소프트웨어 (그래패드 소프트웨어 (GraphPad Software, 미국 캘리포니아주 샌디에고))를 이용하여 비-선형 회귀 (가변 기울기를 갖는 S자상 용량-반응)를 이용하여 검정하였다.

[0609] 도 4는 MDA-MB-231 세포에 대한 TF-특이적 HuMab의 결합 곡선의 예를 보여준다.

[0610] 표 4는 TF 형질감염된 CHO 세포 (S1015-TF), MDA-MB-231, A431 및 Bx-PC3 세포에 대한 TF-특이적 HuMab의 결합의 EC₅₀ 값의 개요를 제공한다.

표 4

군	항-TF HuMab	MDA-MB-231		Bx-PC3		A431		S1015-TF-012	
		EC50	Max MFI	EC50	Max MFI	EC50	Max MFI	EC50	Max MFI
I	13	1.58	2451	1.86	1305	8.04	3622	1.07	5207
I	44	0.87	1881	1.88	1136	1.45	2646	2.13	5021
I	87-Lg6	8.28	1107	7.19	1030	nt	nt	nt	nt
II	11	0.47	2143	1.01	1280	0.20	2606	1.32	5654
II	017-D12	1.33	2401	1.61	1422	1.24	3296	1.21	5792
II	42	0.25	1518	2.45	1701	nt	nt	nt	nt
II	092-A09	0.53	2290	0.84	1262	0.83	3137	1.32	5409
II	101	0.85	2071	2.25	1220	3.16	2934	1.77	5859
II/III	98	0.99	1956	1.38	1151	1.40	2755	0.96	5229
II/III	114	0.47	2438	0.80	1407	0.90	3433	1.72	6095
III	3	3.20	1798	4.98	1106	6.94	2530	2.06	4247
III	25	0.69	2254	0.88	1320	5.19	3170	0.73	5808
III	109	2.16	2052	4.04	1324	1.74	3124	0.92	5629
III	111	1.03	1774	1.83	1128	2.88	3043	0.55	5353

상이한 세포 종류에 대한 TF-특이적 HuMab의 결합의 FACS 분석에 의해 결정된 EC₅₀ 및 최대 평균 형광 지수 (최대 MFI) 값의 개요

[0611]

[0612] EC50 값은 nM 단위이다. MDA-MB-231, BxPC3 및 A431 세포에 대한 최대 MFI는 30 $\mu\text{g/mL}$ 항체에서, S1015-TF에 대한 것은 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 항체에서 관찰되었다.

[0613] 실시예 15

[0614] **TF에 대한 FVIIa 결합의 억제**

[0615] TF-HuMab에 의한 TFECDDHis에 대한 FVIIa의 결합의 억제를 ELISA에 의해 측정하였다. ELISA 플레이트를 TFECDDHis (0.5 $\mu\text{g/mL}$, 100 μL /웰)로 밤새 코팅하였다. 플레이트를 비우고, 2% (v/v) 닭 혈청을 함유하는 PBS로 차단하고 (1시간, RT), 다시 비웠다. TF-HuMab 또는 HuMab-KLH (음성 대조군)의 4-배 연속 희석액을 웰에 첨가한 후, FVIIa를 EC50 농도 (100 nM)에서 첨가하고, 플레이트를 1시간 동안 RT에서 (진탕하면서, 300 rpm) 인큐베이팅하였다. 플레이트를 세척하고 위에서와 같이 토끼-항-FVIIa (2.5 $\mu\text{g/mL}$; 앱캠 (Abcam))와 함께 인큐베이팅하였다. 플레이트를 세척하고 돼지-항-토끼 IgG-HRP 항체 (1:2,500; 다코 (DAKO))와 함께 인큐베이팅하였다. 세척 후에, 면역 복합체를 기질로서 ABTS를 사용하여 시각화하였다. 2% v/v 옥살산의 첨가에 의해 반응을 중지시킨 후, ELISA 판독기를 사용하여 405 nm에서 광학 밀도를 측정하였다. 50% 억제를 얻기 위해 필요한 항체의 농도 (IC50)를 GraphPad 프리즘 (비-선형 회귀 분석)을 이용하여 계산하였다.

[0616] 도 5는 교차-차단군 II 및 III으로부터의 항체는 TF에 대한 FVIIa 결합을 효율적으로 억제한 반면, 교차-차단군 I로부터의 항체는 FVIIa 결합을 억제하지 않았음 (또는 훨씬 더 적은 정도로 억제하였음)을 보여준다.

[0617] 표 5는 TF-특이적 HuMab에 의한 TF에 대한 FVIIa 결합의 억제의 IC50 값 및 최대 억제값 (백분율)을 보여준다.

표 5

군	HuMab TF	IC50 nM	최대 억제
I	13	19.3	27
	44	0.8	54
	87-Lg6	na	35
II	11	1.1	91
	017-D12	1.9	90
	42	2.7	88
	092-A09	1.5	90
	101	0.6	84
II/III	98	0.8	85
	114	1.3	90
III	3	1.9	89
	25	2.1	90
	109	1.7	90
	111	1.7	79

TF-특이적 HuMab에 의한 TF에 대한 FVIIa 결합의 억제의 IC50 값 및 최대 억제값 (백분율)

[0618]

[0619] 실시예 16

[0620] **FVIIa 유도된 ERK 인산화의 억제**

[0621] TF에 대한 응고 인자 VIIa (FVIIa)의 결합 시에, 유사분열촉진물질 활성화된 키나제 (p42 및 p44 MAPK 또는 ERK1 및 ERK2)의 인산화가 촉발된다. 표피양 암종 세포주 A431은 고수준의 TF를 발현하고, FVIIa로 자극한 후, 알파스크린 (AlphaScreen) 슈어파이어 (Surefire) ERK 검정 (퍼킨 엘머 (Perkin Elmer))를 이용하여 측정된 최적 (3 내지 5배) ERK 인산화 (ERK-P)가 10분 내에 유도된다.

[0622] A431 세포 (30,000 세포/웰)를 96 웰 TC 플레이트 내에 접종하고, 혈청-비함유 배지 (20% HSA 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 RPMI) 내에서 O/N (37°C, 5% CO₂, 85% 습도) 배양하였다. 이어서, 배지를 DMEM (첨가제 미함유)으로 교체하고, 세포를 1.5시간 동안 인큐베이팅하였다. TF-HuMab 또는 HuMab-KLH의 3배 연속 희석액을 첨가하고, 세포를 0.5시간 동안 인큐베이팅하였다. 이어서, 세포를 FVIIa로 EC80 농도 (50 nM; 10분; 37°C, 5% CO₂, 85% 습도)에서 자극하였다. 세포를 PBS로 1회 세척하고, 25 μL 용해 버퍼 (퍼킨 엘머, 슈어파이어 키트)를 사용하여 용해시켰다. 용해물을 원심분리하였다 (3분, 330 x g, RT). 4 μL 의 상등액을 384 웰 프록시플레이트 (Proxiplate) (퍼킨 엘머)에 옮겼다. 7 μL 반응 버퍼/활성화 버퍼 믹스 함유 알파스크린 비드 (퍼킨 엘머 슈어파이어 키트)를 첨가하고, 플레이트를 암소에서 2시간 동안 RT에서 인큐베이팅하였다. 엔비전 테크놀로지 (EnVision technology)의 "슈어파이어 플러스 (Surefire Plus)" 프로토콜을 사용하여 플레이트를 판독하였다.

[0623] 도 6a는 알파스크린 슈어파이어 ERK 검정을 이용하여 측정될 때, 항체 013은 FVIIa 유도된 ERK 인산화를 억제하지 않고, 044 및 111은 ERK 인산화를 중정도로 차단하고, 다른 모든 항체는 ERK 인산화를 효율적으로 차단함을 보여준다.

[0624] 표 6은 알파스크린 슈어파이어 ERK 검정을 이용하여 측정된, TF-특이적 HuMab에 의한 FVIIa 유도된 ERK 인산화의 억제 IC50 값 및 최대 억제값 (백분율)을 보여준다.

표 6

군	HuMab ID	IC50 nM	% 최대 억제
I	13	9.11	26
	44	> 66.6	45
	87-Lg6	nt	nt
II	11	0.79	69
	017-D12	2.01	65
	42	nt	nt
	092-A09	1.27	68
	101	1.05	57
II/III	98	1.89	64
	114	1.08	68
III	3	7.99	63
	25	2.16	66
	109	2.42	72
	111	> 66.6	52

TF-특이적 HuMab에 의한 (알파스크린 슈어파이어 ERK 분석을 이용하여 측정된) FVIIa 유도된 ERK 인산화의 억제 IC50 값 및 최대 억제값 (백분율).

[0625]

[0626] 알파스크린 슈어파이어 ERK 검정에서 얻어진 결과를 HaCaT 및 BxPC3 세포주를 사용하여 웨스턴 블롯 분석에 의해 확인하였다. 30,000 세포/웰을 최소 농도의 혈청을 함유하는 DMEM (결핍 배지) 내에 접종하고 밤새 배양하였다. 세포를 혈청이 없는 DMEM 내에서 2시간 동안 추가로 배양하고, 배양의 최종 30분 동안 항-TF 항체를 첨가하였다. 세포를 0, 10 또는 50 nM FVIIa로 10분 (37°C) 동안 자극하고, 후속적으로 세포 용해 버퍼 (50 µl 용해 버퍼/웰, 진탕 조건 하에 30-60분 용해, RT) 내에서 용해시켰다. 25 µl SDS 함유 샘플 버퍼를 각각의 샘플 플레이트에 첨가하였다. 샘플을 SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고, 웨스턴 블로팅에 대한 표준 절차를 이용하여 진행시키고 블로팅하였다. 블롯을 5% 비관련 단백질 (ELK)을 함유하는 TBST1x로 1시간 동안 RT에서 차단하였다. 블롯을 토끼 항-ERK-P 항체와 함께 인큐베이팅하였다 (O/N, 4°C). 블롯을 TBST1x 세척하고, 항-토끼 IgG HRP와 함께 인큐베이팅하고 (1시간, RT), 세척하고, HRP 기질을 이용하여 발색시키고, Optigo Ultima 영상화 시스템 (이소겐 라이프 사이언시즈 (Isogen Life Sciences))을 이용하여 영상화하였다.

[0627] 도 6b는 BxPC3 세포에서 하위-패널의 항체에 대한 결과를 보여준다. 10 nM의 FVIIa에 의해 유도된 ERK 인산화는 항체 013에 의해 억제되지 않았지만, 항체 111, 044 및 025에 의해 효율적으로 억제되었다 (후자는 본원에 기재된 다른 모든 TF-특이적 HuMab에 대한 예로서). 보다 강한 유도된 ERK 인산화 (50 nM FVIIa)는 항체 013, 111 및 044에 의해 억제되지 않지만, 항체 025에 의해 억제되었다.

[0628] 실시예 17

[0629] FVIIa 유도된 IL-8 방출의 억제

[0630] FVIIa 유도된 IL-8 방출을 억제하는 TF 특이적 HuMab의 능력을 MDA-MB-231 세포를 사용하여 시험하였다. 세포를 96 웰 플레이트 (60,000 세포/웰)에 접종하고, CS, 피루브산나트륨, I-글루타민, MEM NEAA 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 내에서 배양하였다 (O/N, 37°C, 5% CO₂). 조직 배양 배지를 제거하고, 세포를 혈청 비함유 고칼슘 배지 (페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 DMEM) 내에서 2회 세척하고, 상기 배지 내에서 추가 105분 동안 배양하였다. 항체의 연속 희석액을 첨가하고, 세포를 15분 동안 배양하였다. FVIIa (노보 노디스크 (Novo Nordisk); 최종 농도 10 nM)를 첨가하고 세포를 5시간 동안 배양하였다. 상등액을 제거하고 원심분리하였다 (300 x g, RT). 상등액 내의 IL-8 농도를 제조자의 프로토콜 (상킨 (Sanquin))에 따라 IL-8 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다.

[0631] 도 7은 교차-차단군 III으로부터의 항체 111을 제외한, 교차-차단군 II 및 III으로부터의 항체가 MDA-MB-231 세포에 의한 FVIIa 유도된 IL-8 방출을 효율적으로 억제하였음을 보여준다. 교차-차단군 I로부터의 항체 (013, 044 및 87-Lg6)는 모두 FVIIa 유도된 IL-8 방출을 억제하지 않았다.

[0632] 표 7은 TF-특이적 HuMab에 의한 FVIIa 유도된 IL-8 방출의 억제 IC50 값 및 최대 억제값 (백분율)을 보여준다.

표 7

군	HuMab TF	IC50 nM	최대 억제
I	13	na	-0.3
I	44	74.6	17.2
I	87-Lg6	na	4.3
II	11	9.4	61.7
II	017-D12	9.0	65.8
II	42	14.9	53.7
II	092-A09	28.2	66.6
II	101	22.7	74.9
II/III	98	9.3	59.0
II/III	114	9.2	71.5
III	3	23.7	76.2
III	25	23.1	75.6
III	109	13.6	70.4
III	111	>200	40.1

[0633] TF-특이적 HuMab에 의한 FVIIa 유도된 IL-8 방출의 억제 IC50 값 및 최대 억제값 (백분율)

[0634] 실시예 18

[0635] FXa 생성의 억제

[0636] FXa 생성을 억제하는 TF 특이적 HuMab의 능력을 비색 FXa 특이적 기질을 사용하여 TF/FVIIa 복합체에 의한 FX의 FXa로의 전환을 측정하는 검정에서 시험하였다. TF (인노빈 (Innovin))를 TF 특이적 HuMab, 양성 대조군 (마우스 항-TF), 음성 대조군 (HuMab-KLH) (모두 3 mM CaCl₂를 함유하는 Hepes 버퍼 내에 희석됨)의 연속 희석액과 함께 평저 96 웰 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 30분 동안 RT에서 인큐베이팅하고, FVIIa (최종 농도 1 nM) 및 FX (ERL; 최종 농도 200 nM)를 첨가하였다. 플레이트를 30분 동안 37℃에서 인큐베이팅하였다. 각각의 웰로부터 50 µl을 중지 버퍼 (100 ml Hepes 버퍼 중 5 mM EDTA)를 담은 96 웰 플레이트 (예비-가열됨, 37℃)에 옮겼다. FXa 특이적 기질인 크로모게닉스 (Chromogenix)-2765 (인스트루메이션 레보라토리 컴퍼니 (Instrumentation Laboratory Company))를 첨가하고, 플레이트를 60분 동안 37℃에서 인큐베이팅하고, 37℃에서 OD405 nm를 측정하였다.

[0637] 도 8은 항체 017-D12는 FXa 생성을 강하게 억제하고, 013은 중등도 억제를 나타내고, 다른 항체는 FXa 생성의 낮은 억제를 보이거나 억제하지 않음을 보여준다.

[0638] 표 8은 TF-특이적 HuMab에 의한 FXa 생성의 억제 IC50 값 및 최대 억제값 (백분율)을 보여준다.

표 8

군	HuMab TF	IC50 nM	% 최대 억제
I	13	0.05	31
I	44	NA	3
I	87-Lg6	nt	nt
II	11	0.05	26
II	017-D12	0.28	84
II	42	nt	nt
II	092-A09	0.30	21
II	101	nt	nt
II/III	98	0.43	14
II/III	114	0.24	21
III	3	0.07	21
III	25	0.30	19
III	109	0.09	18
III	111	0.07	7

[0639] TF-특이적 HuMab에 의한 FXa 생성의 억제 IC50 값 및 최대 억제값 (백분율)

[0640] 실시예 19

[0641] 혈액 응고의 억제

[0642] TF-HuMab에 의한 혈액 응고의 억제를 TF 유도된 응고 시간을 결정하는 검정에서 측정하였다. 17 μ l의 100 mM CaCl₂ (최종 농도 17 mM), 10 μ l의 1:100 인노빈 (최종 농도 1:1000), 23 μ l의 1x HEPES-버퍼 및 50 μ l의 연속 희석된 항체의 혼합물을 96 웰 플레이트에서 제조하였다. 50 μ l의 모은 인간 혈장을 이물론 (Immulon) 2B 플레이트 (써모 일렉트론 (Thermo Electron))의 웰에 첨가하였다. 50 μ l의 제조된 항체 혼합물을 이물론 2B 플레이트에 첨가하고, 동역학 플레이트 판독기를 사용하여 405 nm에서 응고 발생을 25분 동안 15초 마다 측정하였다. 광학 밀도의 증가를 시간에 맞게 플로팅하고, 응고 시간 ($t_{1/2}$)을 계산하였다. 응고 시간을 항체 농도에 대해 플로팅하였다. GraphPad Prism을 이용하여 비-선형 회귀 분석에 의해 그로부터 항체 유도된 응고 억제의 IC₅₀을 계산하였다.

[0643] 도 9는 항체 044, 087 및 111은 TF 유도된 혈액 응고를 억제하지 않은 한편, 다른 모든 항체는 억제하였음을 보여준다.

[0644] 표 9는 TF-특이적 HuMab에 의한 혈액 응고의 억제의 IC₅₀ 값을 보여준다.

표 9

군	HuMab TF	IC ₅₀ nM
I	13	0.6
	44	NA
	87-Lg6	NA
II	11	1.6
	017-D12	2.6
	42	1.5
	092-A09	0.2
	101	0.7
	98	1.1
II/III	114	0.4
	3	7.3
III	25	2.3
	109	7.6
	111	NA

[0645] TF-특이적 HuMab에 의한 혈액 응고의 억제의 IC₅₀ 값.

[0646] 실시예 20

[0647] 항체-의존성 세포-매개 세포독성

[0648] 표적 세포의 제조:

[0649] TF 발현 표적 세포 (5x10⁶ Bx-PC3 세포, MDA-MB-231 세포 또는 A431 세포)를 수거하고, 세척하고 (PBS 중에 2회, 1500 rpm, 5 min), 코스믹 (Cosmic) 송아지 혈청, 피루브산나트륨, L-글루타민, MEM NEAA 및 페니실린/스트렙토마이신을 보충한 1 ml RPMI 1640 배양 배지 내에 수집하고, 여기에 100 μ Ci ⁵¹Cr (크롬-51; 아머샴 바이오사이언시즈 유럽 게엠베하 (Amersham Biosciences Europe GmbH, 네덜란드 루센달))를 첨가하였다. 혼합물을 진탕 수조 내에서 1 hr 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 세포의 세척 후에 (PBS 중에서 2회, 1500 rpm, 5 min), 세포를 배양 배지 내에 재현탁시키고, 생활가능 세포를 트리판 블루 배제에 의해 계수하였다. 생활가능 세포를 1x10⁵ 세포/ml의 농도로 하였다.

[0650] 효과기 세포의 제조:

[0651] 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 제조자의 지시에 따라 표준 피콜 (Ficoll) 밀도 원심분리를 이용하여 신선한 백혈구 연층 (buffy coat) (상킨, 네덜란드 암스테르담)으로부터 분리하였다 (림프구 분리 배지; 룬자 (Lonza, 프랑스 베르비에)). 세포를 배양 배지 내에 재현탁시킨 후에, 세포를 트리판 블루 배제에 의해 계수하고, 1x10⁷ 세포/ml의 농도로 하였다.

[0652] ADCC 설정:

[0653] 50 μ l의 ⁵¹Cr-표지된 표적 세포를 미량역가 웰에 옮기고, 50 μ l의 연속 희석된 항체를 첨가하였다 (배양 배지 내에 희석됨). 세포를 인큐베이션하고 (RT, 15 min), 50 μ l의 효과기 세포를 첨가하여, 효과기 대 표적 비율

100:1로 하였다. 최대 용해 수준을 결정하기 위해, 효과기 세포 대신에 100 μ l 5% Triton-X100을 첨가하고; 자발적 용해 수준을 결정하기 위해, 100 μ l 배양 배지를 첨가하고; 항체 비의존적 용해 수준을 결정하기 위해, 50 μ l 효과기 세포 및 50 μ l 배양 배지를 첨가하였다. 후속적으로, 세포를 37℃ 및 5% CO₂에서 0/N 인큐베이팅하였다. 세포를 원심분리한 후 (1200 rpm, 3 min), 75 μ l의 상등액을 마이크로닉 (micronic) 튜브에 옮겼다. 방출된 ⁵¹Cr을 감마 계수기에서 계수하고, 항체 매개된 용해의 백분율을 다음과 같이 계산하였다:

[(cpm 샘플 - cpm 항체 비의존적 용해)/(cpm 최대 용해 - cpm 자발적 용해)] x 100%

여기서, cpm은 분당 계수이다.

도 10은 시험된 모든 TF-HuMab가 상이한 효력 (EC50)이기는 하지만 ADCC에 의한 Bx-PC3 세포의 용해를 유도하였음을 보여준다.

표 10은 TF-특이적 HuMab에 의한 상이한 세포주의 ADCC의 EC50 값 (nM)을 보여준다.

표 10

군	HuMab TF	MDA-MB-231	Bx-PC3	A431
		EC50	EC50	EC50
I	13	0.06	0.07	0.11
I	44	0.08	0.12	0.19
I	87-Lg6	nt	nt	nt
II	11	0.07	0.22	0.06
II	017-D12	0.14	0.13	0.18
II	42	nt	nt	nt
II	092-A09	0.11	0.13	0.22
II	101	0.10	0.09	0.01
II/III	98	0.15	0.02	0.07
II/III	114	0.07	0.07	0.08
III	3	0.29	0.17	0.58
III	25	0.24	0.15	0.16
III	109	0.12	0.06	0.13
III	111	0.84	0.22	1.56

TF-특이적 HuMab에 의한 상이한 세포주의 ADCC의 EC50 값 (nM)

실시예 21

보체 침착

TF-HuMab 인큐베이팅한 표적 세포에 대한 보체 단편 C3c 및 C4c의 침착을 FACS 분석에 의해 측정하였다. TF 발현 표적 세포 (Bx-PC3 또는 MDA-MB-231 세포)를 1% BSA를 함유하는 RPMI 내에서 96 웰 환저 플레이트 (1x10e5 세포/웰) 내에 플레이팅하였다. 항체 (30 μ g/mL)를 첨가하고, 세포를 RT에서 15분 동안 인큐베이팅하였다. 25 μ l의 모은 인간 혈청을 보체의 공급원으로서 첨가하고, 열 불활성화된 인간 혈청을 이용하여 자발적인 보체 결합을 결정하였다. 세포를 37℃에서 45분 동안 인큐베이팅하였다. 세포를 1회 세척하고, FACS 버퍼 내에서 항-인간 C3c FITC 또는 항-인간 C4c FITC (다코)와 함께 인큐베이팅하고, 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이팅하였다. 샘플을 FACS Canto를 이용하여 분석하였다.

도 11은 교차-차단군 I로부터의 항체가 BxPC3 또는 MDA-MB-231 세포 상에서 C3c 또는 C4c 침착을 유도하지 않았음을 보여준다. 교차-차단군 II로부터의 시험된 모든 항체는 C3c 및 C4c 침착을 유도하였고, 교차-차단군 III으로부터의 항체는 항체 003을 제외하고는 그러하였다.

실시예 22:

결합력/친화도 연구

친화도의 결정:

TF에 대한 항체 결합을 BIAcore 3000 (지이 헬쓰케어)에서 표면 플라즈몬 공명에 의해 분석하였다. TFECDHis를 분석을 위해 사용하였다. HuMab 항체 (500 공명 단위)를 제조자가 권장하는 절차에 따라 CM-5 센서 칩 상에 고정시켰다. 간단히 설명하면, EDC에 의한 표면 활성화 후에 NHS HuMab 항체를 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.0 내

지 5.5) 내에서 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 로 활성화된 CM-5 표면 위로 주입한 후, 탈활성화를 위해 1 M 에탄올아민을 주입하였다. HBS-EP 버퍼 중의 TFECDis의 농도 시리즈를 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유속으로 180초 동안 고정된 항체 위로 주사하였다. 10 mM 글리신-HCl (pH 2.0) 또는 10 mM 아세트산나트륨 (pH 3.0)의 주사에 의해 HuMab 표면 재생을 수행하였다. 이중 참조 삭감 (subtraction) 및 모델 1:1 (랭뮤어 (langmuir)) 결합 분석을 이용하여 동역학 분석을 수행하였다.

[0667] 표 11은 대부분의 HuMab에 대해, 결정된 친화도를 (서브)나노몰 범위로 보여준다. 모든 항체로부터 동역학 파라미터가 결정될 수는 없었다. 044는 오프율 (kd)에서 높은 변이를 제공하고 높은 잔류물 (residual)을 가졌고, 이것은 곡선의 피팅 (fitting)이 잘 맞지 않았음을 의미한다. 098, 111 및 087-Lg6는 측정하기에는 Biacore 3000에 대해 너무 높은 오프율을 가졌다.

표 11

군	HuMab ID	친화도 nM	ka (1/sec)	kd (1/sec)
I	13	2.78	5.67E+05	1.57E-03
	44	n.a.	8.77E+04	가변적
	87-Lg6	n.a.	5.91E+05	n.a.
II	11	3.15	2.86E+05	9.02E-04
	017-D12	2.55	1.02E+05	2.59E-04
	42	4.22	1.64E+05	6.90E-04
	092-A09	14.1	1.42E+05	2.00E-03
	101	3.4	3.18E+05	1.07E-03
II/III	98	n.a.	2.90E+05	n.a.
	114	11	1.77E+05	1.95E-03
III	3	4.51	2.33E+05	1.26E-03
	25	1.97	3.29E+05	6.50E-04
	109	4.75	1.65E+05	7.77E-04
	111	n.a.	2.13E+05	n.a.

n.a. 평가가능하지 않음 = $> 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$

TFECDis와의 반응성에 대한 TF-HuMab의 동역학 상수 - 친화도 측정치

[0668]

[0669] 결합력의 결정:

[0670] TF-특이적 HuMab에 대한 TF (TFECDis) 결합을 본질적으로 상기 설명된 바와 같이 결정하였고, 여기서 TFECDis는 CM-5 센서 칩 (300 공명 단위) 상에 고정되고, Humab 항체의 농도 시리즈가 동역학 분석을 위해 사용되었다. 이중 참조 삭감 및 모델 1:1 (랭뮤어) 결합 분석을 이용하여 동역학 분석을 수행하였다.

[0671] 표 12는 항체 11, 98, 109 및 111에 대한 결합력 측정치를 보여준다. 98 및 111에 대한 친화도 측정치는 높은 오프율을 나타낸 반면 (Biacore에 의한 결정 한계를 넘는 (즉, $>10^{-3}$)), 결합력 결정을 통해 나노몰 범위의 상호작용이 밝혀졌다.

표 12

군	HuMab ID	결합력 nM
II	11	0.47
II/III	98	4.85
III	109	0.01
III	111	0.11

TF-HuMab와의 반응성에 대한 TFECDis의 동역학 상수 - 결합력 측정치.

[0672]

[0673] 실시예 23:

[0674] 정상 인간 조직 및 체장 종양에 대한 결합의 면역조직화학 분석

[0675] TF를 발현하는 것으로 알려진 다양한 인간 조직 (결장, 심장, 신장, 피부, 폐 및 뇌)에 대한 TF-HuMab의 결합을 면역조직화학 (IHC)에 의해 결정하였다.

[0676] 동결된 조직에 대한 IHC

[0677] 동결된 조직 절편을 절단하고 (4-6 μm 두께) 아세톤 내에 고정하였다. 내인성 조직 퍼옥시다제 (PO)를 차단하

고, 내인성 Fc 수용체에 대한 나중엔 적용된 항체의 비특이적 결합을 방지하기 위해 조직 슬라이드를 정상 인간 혈청과 함께 예비-인큐베이팅하였다. 인간 TF에 대해 작용성인 마우스-Ab (및 음성 대조군 마우스 Ab)를 최적 희석에서 조직에 적용하고, 후속적으로 Powervision-P0 (염소 항-마우스/-토끼 IgG)-P0로 검출하였다. TF-특이적 HuMab를 Fab' 염소 항-인간 IgG (Fc)-FITC에 커플링시키고, 그 후 소정의 최적 희석을 비롯한 3개의 희석에서 동결된 조직 슬라이드에 적용하였다. 후속적으로, HuMab - Fab-FITC 복합체를 토끼 항-FITC 및 Powervision-P0에 의해 검출하였다. P0 활성화는 기질로서 AEC를 사용하여 시각화하고, 핵은 헤마톡실린을 사용하여 시각화하였다. 염색을 명시야 현미경에 의해 검정하였다.

[0678] 포르말린 고정시키고 파라핀 포매시킨 (FFPE) 조직에 대한 마우스 Ab를 사용한 IHC

[0679] FFPE 조직 생검을 4 μ m로 절단하고, 파라핀 제거하고, 내인성 조직 퍼옥시다제에 대해 차단하고, 항원 회수 절차 (pH 6, 시트레이트 버퍼)에 적용하였다. 마우스-Ab와 함께 인큐베이팅하기 전에, 내인성 Fc 수용체에 대한 비특이적 결합을 방지하기 위해 조직 슬라이드를 정상 인간 혈청 내에서 예비-인큐베이팅하였다. 인간 TF에 대해 작용성인 마우스 Ab (및 음성 대조군 마우스 Ab)를 최적 희석액으로 조직 슬라이드에 적용하고, 후속적으로 Powervision-P0 (염소 항-마우스/-토끼 IgG)-P0를 사용하여 검출하였다. P0 활성화는 기질로서 AEC를 사용하여 시각화하고, 핵은 헤마톡실린을 사용하여 시각화하였다. 염색을 명시야 현미경에 의해 검정하였다.

[0680] 도 12는 신장 사구체에 대한 항체 013 (양성 염색), 011 (양성 염색), 114 (양성 염색) 및 111 (중간 염색)의 결합의 예를 보여준다. 항체 098 및 044는 사구체에 결합하지 않았다.

[0681] 표 13은 검사한 모든 인간 신장 조직에서 모든 TF-HuMab에 대한 염색 결과의 개요를 제공한다.

표 13

군	HuMab TF	IHC 인간 사구체
I	13	+
I	44	-
I	87-Lg6	nt
II	11	+
II	017-D12	+
II	42	nt
II	092-A09	nt
II	101	+
II/III	98	-
II/III	114	+
III	3	+
III	25	nt
III	109	+
III	111	+/-

인간 사구체의 IHC 염색

[0682]

[0683] 표 14는 인간 신장, 결장, 심장, 대뇌 및 피부에서 및 인간 췌장 종양에서 선택된 TF-특이적 HuMab의 염색 결과의 개요를 제공한다.

표 14

군	Hu 신장	Hu 결장	Hu 심장	Hu 대뇌	Hu 피부	췌장 종양
13	신소체 (renal corpuscle) +	기저막 ++	-	+	표피 +	+++
114	신소체 ++	기저막 ++	-	++	표피 ++	++++
11	신소체 +	기저막 ++	-	++	n.a. (+)	+++
44	-	기저막 +	-	+/-	n.a.	++
98	-	기저막 +	-	+/-	n.a. (+)	+++
111	신소체 +/-	기저막 +	-	+	n.a.	+++

[0684] 정상 인간 조직 및 췌장 종양의 IHC 염색.

[0685] 인간 췌장 종양에 대한 TF-HuMab의 결합의 IHC 분석을 통해 모든 TF-HuMab에 대한 양성 염색이 밝혀졌다 (도 13에 예시됨).

[0686] 실시예 24:

- [0687] SCID 마우스의 유방 지방 패드 (fat pad)에서 확립된 MDA-MB-231 종양 이종이식편의 치료
- [0688] TF-HuMab의 생체내 효능을 SCID 마우스에서 확립된 동소 (orthotopic) MDA-MB-231 이종이식편 종양에서 결정하였다. PBS 중 2×10^6 개의 종양 세포를 암컷 SCID 마우스의 제2 유방 지방 패드에 s.c. 주사한 후, 종양 크기가 측정가능해진 시점에 시작하여 TF-HuMab 또는 대조 mAb (HuMab-KLH)로 치료하였다. 항체를 제21일 ($260 \mu\text{g}$ /마우스), 제28일 ($130 \mu\text{g}$ /마우스) 및 제42일 ($130 \mu\text{g}$ /마우스)에 주사하였다. 종양 부피를 적어도 주 2회 결정하였다. 부피 (mm^3)는 캘리퍼스 (PLEXX) 측정치로부터 $0.52 \times (\text{길이}) \times (\text{폭})^2$ 으로서 계산하였다.
- [0689] 도 14는 항체 114, 111, 013, 098, 011 및 044가 확립된 동소 MDA-MB-231 종양의 성장을 억제하는데 모두 효과적이었음을 보여준다.
- [0690] **실시예 25:**
- [0691] **시노물구스 원숭이에서 TF-특이적 HuMab의 파일럿 (pilot) 반복 투약**
- [0692] 응고 캐스케이드를 저해하고 따라서 노출된 동물에서 출혈 위험을 잠재적으로 증가시키는 항체의 능력 평가를 비롯한 TF-특이적 HuMab의 독성학에 대한 초기 정보를 얻기 위해, 시노물구스 원숭이에서 파일럿 반복 투약 연구를 수행하였다.
- [0693] 2마리의 수컷 및 2마리의 암컷 시노물구스 원숭이 (마카카 파시쿨라리스 (*Macaca fascicularis*)) (약 2년령)에 게 항체 011을 정맥내 주사하였다:
- [0694] - 연구의 제1일: 0 mg/kg (비히클 단독)
- [0695] - 제8일: 1 mg/kg; 1 mL/분
- [0696] - 제15일: 10 mg/kg; 1 mL/분
- [0697] - 제22일: 100 mg/kg; 1 mL/분
- [0698] 동물을 제27일까지 추적하고, 이 시점에 검시 및 장기의 조직학적 평가를 위해 동물을 안락사시켰다.
- [0699] 연구의 주요 종점은 다음과 같았다:
- [0700] - 임상 관찰: 매일 결정함, 잇몸, 눈으로부터 출혈의 징후.
- [0701] - 기능적 출혈 시간 및 혈액 손실: 제1일, 제8일, 제15일 및 제22일 (투약 후 1, 24 및 120 h)에 및 2개의 예비-시험 시점에 결정함.
- [0702] - 혈액/혈액의 혼적/혈병: 모든 조직의 HE 염색 (최종 희생 시에 얻은 조직에서 결정함)
- [0703] - 소변, 대변, 토사물 내의 혈액: 매일/매주 결정함.
- [0704] 항체 011의 반복된 증가하는 투약의 명백한 독성이 관찰되지 않았다. 동물은 임상 징후를 보이지 않았고, 시토킨 방출의 표시는 없었다. 또한, 손상된 응고 시스템 또는 전신 출혈의 명백한 임상 징후가 없었다. 투여 시점의 1 h 후에, 제22일의 평균 출혈 시간은 제1일에 보인 것보다 유의하게 더 높았다 ($p=0.012$). 제1일에 비해 제8일, 제15일 및 제22일 사이에서 다른 통계상 유의한 차이가 없었다. 또한, 주요 장기에 대한 명백한 독성이 없고 이상 혈액학적 효과가 없는 것으로 밝혀졌다. 본 연구로부터의 조직의 조직학적 평가에 대한 예비 결론은 4마리의 처리된 동물에서 시험 항목을 사용한 처리에 기인하는 조직학 발견이 없다는 것이다.
- [0705] 도 15는 각각의 동물 (중복 샘플)에 대한 개별 데이터 지점을 시간의 함수로서 보여준다. 4마리의 동물에 대한 출혈 시간을 제1, 8, 15 및 22일 (1, 24 및 120 h)에 및 2개의 예비-시험 시점에 결정하였다.
- [0706] **실시예 26**
- [0707] **SCID 마우스에서 BxPC3 종양 이종이식편의 예방 및 치료적 처치**
- [0708] SCID 마우스에서 BxPC3 세포 이종이식편의 예방 또는 치료적 처치에서 TF-HuMab의 생체내 효능을 결정하였다. PBS 중의 10×10^6 개의 BxPC3 종양 세포를 암컷 SCID 마우스에 s.c. 주사한 후, TF-HuMab 또는 대조 mAb (HuMab-KLH)로 처치하였다. 예방적 처치를 위해, 항체 ($400 \mu\text{g}$ /마우스)를 종양 유도 1시간 후에 i.p. 주사하였다. 치료적 처치를 위해, 항체 주사 ($300 \mu\text{g}$ /마우스)를 종양 유도 후 제8일에 시작한 후, 매주 항체를 주사하였다

(150 μg /마우스). 종양 부피를 적어도 주 2회 결정하였다. 부피 (mm^3)는 캘리퍼스 (PLEXX) 측정치로부터 $0.52 \times (\text{길이}) \times (\text{폭})^2$ 으로서 계산하였다.

도 16은 TF-특이적 HuMab가 BxPC3 이종이식편 종양의 예방적 및 치료적으로 처치할 수 있음을 보여준다.

실시예 27

항-TF HuMab의 결합에 중요한 도메인을 결정하기 위해 무린 및 인간 TF 사이의 DNA 셔플링

인간 TF에 대한 항-TF HuMab의 결합에 중요한 도메인을 결정하기 위해, 인간 및 무린 TF 사이에서 DNA 셔플링을 수행하였다. 셔플 구축물은 인간 TF를 코딩하는 DNA로부터 인간 도메인을 무린 도메인으로 교체함으로써 및 무린 TF를 코딩하는 DNA로부터 무린 도메인을 인간 도메인으로 교체함으로써 제조하였다. 인간 TF 내의 도메인이 항-TF HuMab의 결합을 위해 중요하면, 그 도메인을 무린 도메인으로 교체 시에 결합이 손실될 것이다. 인간 및 무린 TF는 단백질 수준에서 57% 상동성이다. 도 17a 및 17b는 무린 TF 도메인을 함유하는 인간 TF (TFmm 도메인을 함유하는 TFhs) 및 인간 TF 도메인을 함유하는 무린 TF에 대한 구축물을 보여준다. HEK293F 세포를 구축물로 또는 벡터 단독으로 (pcDNA3.3SP; 대조군) 일시적으로 형질감염시켰다. FACS 분석을 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 정제된 모 물질을 사용하여 본질적으로 상기 설명된 바와 같이 수행하였다. HuMab-KLH를 대조군 Ab로서 사용하였다.

도 17은 하나를 제외한 모든 항-TF HuMab가 전적으로 인간 TF에 결합하고 무린 TF에 결합하지 않음을 보여준다. HuMab-TF-003은 무린 TF에 대한 일부 결합을 보인다.

도 18a 내지 18o는 HEK293F 세포 상에서 발현된 구축물에 대한 상이한 항-TF HuMab의 결합에 대한 결과를 보여준다. 이들 결과를 표 15에 요약한다. 본 표에서, 항-TF HuMab는 이들 HuMab의 결합을 위해 중요한 인간 TF 상의 도메인에 기초하여 군으로 분류된다.

표 15

셔플 구축물: TFhs-	감소된 결합을 보이는 HuMab
1-41 mm	없음
42-84 mm	11, 17, 42, 92, 98, 101, 111
85-122 mm	25, 42, 98, 109, 111
123-137 mm	44, 114
185-225 mm	13, 27, 44, 87
226-250 mm	44
셔플 구축물에 대한 결합에 기초한 군	군 내의 HuMab
1. 42-84	11, 17, 92, 101
2. 42-84 + 85-122	42, 98, 111
3. 85-122	25, 109
4. 123-137	114
5. 185-225	13, 27, 87
6. 123-137 + 185-225 + 226-250	44

실시예 28

ELISA에 의해 결정된 TF의 세포의 도메인에 대한, 및 FACS에 의해 결정된 BxPC3 세포 상의 세포성 TF에 대한 항-TF HuMab의 Fab 단편의 결합

TF에 대한 항-TF HuMab의 Fab 단편의 결합을 ELISA에 의해 (TF의 코딩된 세포의 도메인) 및 FACS에 의해 (BxPC3 세포 상의 TF) 측정하였다. ELISA를 본질적으로 상기 설명된 바와 같이 수행하였다. 결합된 Fab 단편은 HRP-접합된 당나귀-항 인간 H+L을 이용하여 검출하였다. FACS 분석을 본질적으로 상기 설명된 바와 같이 수행하였다. FITC-접합된 염소 항-인간 IgG (H+L) (잭슨 (Jackson))을 사용하여 결합된 선도 후보를 검출하였다. 형광을 FACSCantoII 상에서 측정하였다. 결합 곡선을 GraphPad Prism 5 소프트웨어를 이용하여 상기 설명된 바와 같이 분석하였다.

- [0719] 도 19는 ELISA에 의해 측정된, -011 Fab 단편에 비해 TF의 세포외 도메인에 대한 HuMab-TF-098 및 -111 Fab 단편의 보다 적은 결합을 보여준다.
- [0720] 도 20은 BxPC3 세포 상에서 FACS에 의해 측정된, -011 Fab 단편에 비해 세포성 TF에 대한 HuMab-TF-098 및 -111 Fab 단편의 보다 적은 결합을 보여준다.
- [0721] 표 16은 ELISA에 의한 TF의 세포외 도메인에 대한, 및 BxPC3 세포 상에서 FACS에 의한 세포성 TF에 대한 결합에 대한 HuMab-TF Fab 단편의 EC50 값을 보여준다.

표 16

HuMab-TF	EC50 (ELISA)	EC50 (FACS)
011	0.04	0.132
013	0.03	0.301
044	0.59	8.040
098	1.98	n.a.
109	0.02	0.143
111	3.14	na

ELISA에 의해 결정된 TF의 세포외 도메인에 대한, 및 FACS에 의해 결정된 BxPC3 세포 상의 세포성 TF에 대한 HuMab-TF Fab 단편의 결합에 대한 EC50 값의 개요.

EC50 값은 $\mu\text{g/mL}$ 단위이다.

na - 계산될 수 없음.

[0722]

[0723] 실시예 29

[0724] 상당한 수준의 TF를 발현하는 세포주에 대한 항-TF HuMab의 결합

[0725] 상당한 수준의 TF를 발현하는 세포주 상에서 막 결합형 TF에 대한 항-TF HuMab의 결합을 본질적으로 상기 설명된 바와 같이 FACS 분석에 의해 결정하였다. 마우스 항-TF 항체, 이어서 PE-접합된 항-마우스 IgGf를 양성 대조군으로서 사용하였다. 형광을 FACSCantoII 상에서 측정하였다. 결합 곡선을 GraphPad Prism 5 소프트웨어를 이용하여 본질적으로 상기 설명된 바와 같이 분석하였다. 세포주 상의 TF 분자의 양을 제조자의 지시에 따라 Qifi 키트 (다코, 덴마크 글로스트럽)에 의해 결정하였다. SW480 세포는 세포당 ~20,000 분자의 TF를 발현하고, SK-OV-3 세포는 세포당 ~60,000 분자를 발현하고, AsPC-1 세포는 세포당 ~175,000 분자를 발현하고, MDA-MB-231 세포는 세포당 ~900,000 분자를 발현하는 것으로 결정되었다.

[0726] 도 21: HuMab-TF-98 및 -111은 고 TF 발현 세포주 MDA-MD-231에서 HuMab-TF-11, -13 및 109와 유사한 결합 특징을 나타낸다. 세포당 보다 적은 TF 분자를 갖는 세포주, 예를 들어 SK-OV-3 및 SW480 세포주에서, HuMab-TF-98 및 111은 다른 HuMab-TF 항체에 비해 상당한 결합 특징을 나타낸다.

서열의 정렬

본 발명의 항체의 서열을 아래에 제시한다.

서열 번호는 서열의 위치에 괄호 내에 나타낸다.

Kabat에 따른 CDR1, CDR2 및 CDR3은 강조되고: 이탤릭체 서열은 CDR1을 나타내고, 밑줄 친 서열은 CDR2를 나타내고, 굵은 서열은 CDR3을 나타낸다.

VH:

```

--CDR1--|          |--CDR2--|          |-----CDR3-----|
EQVLVDSGAEVKKPQGSFLKLISCKGSGGFSTFYIGWVRQMPGKGLEWNGILYSGSDSTSPSPFGQVTTISADKSISTMYLQWNSLKASDTAMYCANIIRGAGSSNFGAFDIWGQGTAVTVSS  VH1015-
013 (1)
QVQLVDSGGGVVQPSGSLRLSCAASGFTISVMDQHWYRQAPGKGLEWVALLWYDSVNQYADSVKGRFTISRDKSKNTLYLQWNSLRAEDTAVYCAARRPC-----FGLDVWGQGTAVTVSS  VH1015-
114 (5)
EQVLDSGGGGLVQPSGSLRLSCAASGFTISVMDQHWYRQAPGKLEWVSLSSGSDSTYTTDSVKGRFTISRDKSKNTLYLQWNSLRAEDTAVYCAASPMG-----YYDSWGQGTAVTVSS  VH1015-
011 (9)
EQVLDSGGGGLVQPSGSLRLSCAASGFTISVMDQHWYRQAPGKLEWVSLSSGSDSTYTTDSVKGRFTISRDKSKNTLYLQWNSLRAEDTAVYCAAKAPFT-----WYEDLVWGRGTLVTVSS  VH1015-
017 13)
EQVLDSGGGGLVQPSGSLRLSCAASGFTISVMDQHWYRQAPGKLEWVSLSSGSDSTYTTDSVKGRFTISRDKSKNTLYLQWNSLRAEDTAVYCAAKAPFT-----WYEDLVWGRGTLVTVSS  VH1015-
042 (17)
EQVLDSGGGGLVQPSGSLRLSCAASGFTISVMDQHWYRQAPGKLEWVSLSSGSDSTYTTDSVKGRFTISRDKSKNTLYLQWNSLRAEDTAVYCAAKAPFT-----WYEDLVWGRGTLVTVSS  VH1015-
092 (21)
EQVLDSGGGGLVQPSGSLRLSCAASGFTISVMDQHWYRQAPGKLEWVSLSSGSDSTYTTDSVKGRFTISRDKSKNTLYLQWNSLRAEDTAVYCAAKAPFT-----WYEDLVWGRGTLVTVSS  VH1015-
101 (25)
QVQLVDSGAEVKKPQGSFLKLISCKAASGFTISVMDQHWYRQAPGKLEWNGILYSGSDSTSPSPFGQVTTISADKSISTMYLQWNSLKASDTAMYCANIIRGAGSSNFGAFDIWGQGTAVTVSS  VH1015-
003 (29)
QVQLVDSGGGVVQPSGSLRLSCAASGFTISVMDQHWYRQAPGKLEWVALLWYDSVNQYADSVKGRFTISRDKSKNTLYLQWNSLRAEDTAVYCAARRPC-----FGLDVWGQGTAVTVSS  VH1015-
025 (33)
QVQLVDSGGGVVQPSGSLRLSCAASGFTISVMDQHWYRQAPGKLEWVALLWYDSVNQYADSVKGRFTISRDKSKNTLYLQWNSLRAEDTAVYCAARRPC-----FGLDVWGQGTAVTVSS  VH1015-
109 (37)
```

도면

도면1a

도면1b

QVQLVSGGSGVVPFGNSLTLSCHASGFTISD~~TE~~HHWVROAHFGKLEWNAVL~~YKQDNR~~YADSVKGRFTISRDNEKHTLYLQNNSLRAEDTAVYCA~~AE~~DMG~~-----~~AT~~-----~~LSYVYWGQALVTSS VHI015-
044 (41)
EYQLVDSGAEVKKRPGESLKISCKSG~~ASFTSC~~QWVRQMPGKLENGIL~~YKQDNR~~KDPSFOGVTLANKSISTAYLQNNSLRAEDTAVYCA~~AE~~HL~~QAMD~~~~-----~~AFD~~-----~~WGQGVTVSS VHI015-
087 (45)
QVQLVDSGAEVRRPGSSVYVSCASG~~GSFTN~~ELFWVRQAPGGFEMGR~~ELDLS~~ITVAQKFOGKNTITADKSTAYWEI~~NS~~ASEDTAVYCA~~AG~~GD~~-----~~LD~~-----~~AFD~~-----~~WGQGVTVSS VHI015-
098 (49)
QVQLVDSGSGVVPFGNSLTLSCHASG~~FTN~~ELFWVRQAPGGLDWAV~~YKQDNR~~YADSVKGRFTISRDNEKHTLYLQNNSLRAEDTAVYCA~~AE~~DTAV~~-----~~RAED~~-----~~WGQGVTVSS VHI015-
111 (53)

도면1c

VL:

```

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISR-WLAMYQKPEKAPKSLIYASISLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSDP-ITFGQGTWEIK VL1015-013 (57)
EIVLTQSPFSLASVGRVITTCRASQGISR-WLAMYQKPEKAPKSLIYASISLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSDP-ITFGQGTWEIK VL1015-114 (61)
DIQMTQSPFSLASVGRVITTCRASQGISR-WLAMYQKPEKAPKSLIYASISLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSDP-ITFGQGTWEIK VL1015-011 (65)
EIVLTQSPFSLASVGRVITTCRASQGISR-WLAMYQKPEKAPKSLIYASISLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSDP-ITFGQGTWEIK VL1015-017 (69)
DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISR-WLAMYQKPEKAPKSLIYASISLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSDP-ITFGQGTWEIK VL1015-042 (73)
EIVLTQSPFSLASVGRVITTCRASQGISR-WLAMYQKPEKAPKSLIYASISLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSDP-ITFGQGTWEIK VL1015-092 (77)
DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISR-WLAMYQKPEKAPKSLIYASISLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSDP-ITFGQGTWEIK VL1015-101 (81)
EIVLTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISR-WLAMYQKPEKAPKSLIYASISLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSDP-ITFGQGTWEIK VL1015-003 (85)
A1QITQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISR-WLAMYQKPEKAPKSLIYASISLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSDP-ITFGQGTWEIK VL1015-025 (89)
EIVLTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISR-WLAMYQKPEKAPKSLIYASISLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSDP-ITFGQGTWEIK VL1015-109 (93)
A1QITQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISR-WLAMYQKPEKAPKSLIYASISLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSDP-ITFGQGTWEIK VL1015-044 (97)
DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISR-WLAMYQKPEKAPKSLIYASISLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSDP-ITFGQGTWEIK VL1015-087 (101)
DIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISR-WLAMYQKPEKAPKSLIYASISLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSDP-ITFGQGTWEIK VL1015-098 (105)
EIVLTQSPSSLSASVGRVITTCRASQGISR-WLAMYQKPEKAPKSLIYASISLQSGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOQSDP-ITFGQGTWEIK VL1015-111 (109)

```

도면2

서열 113: 인간 IgG4의 야생형 C_H 영역의 아미노산 서열.

```

1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
101 KYGPPCPSCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED
151 PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
201 CKVSNKGLPS SIEKTISKAK QQPREPQVYT LPPSQEEMTK NOVSLTCLVK
251 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLD SDFSFLYSRL TVDKSRWQEG
301 NVFSCSVMH EALHNHYTQKS LSLSLGK

```

이테릭체 서열은 CH1 영역을 나타내고, 강조된 서열은 힌지 영역을 나타내고, 보통의 서열은 CH2 영역을 나타내고, 밑줄친 서열은 CH3 영역을 나타낸다.

서열 114: 인간 IgG4의 힌지가 없는 C_H 영역의 아미노산 서열.

```

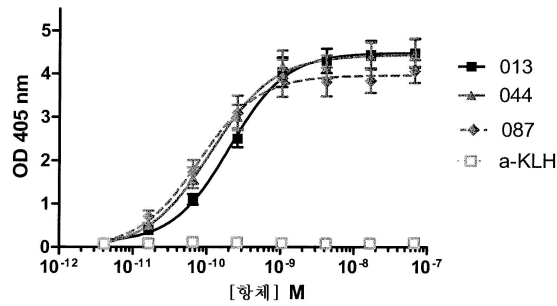
1 ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
51 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVAP
101 EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSQEDPE VQFNWYVDGV
151 EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPSSI
201 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
251 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMH EAL
301 HNHYTQKSL SLSLGLK

```

도면3

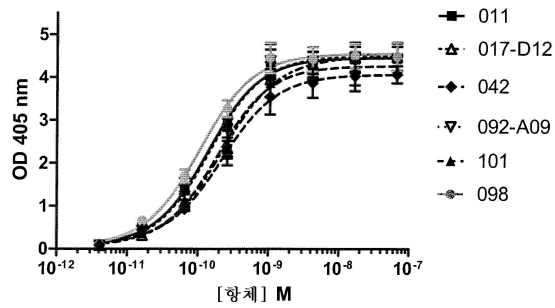
ELISA TFECDhis

교차차단군 I



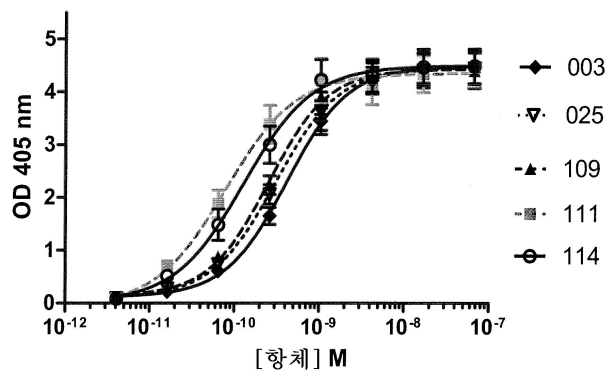
ELISA TFECDhis

교차차단군 II



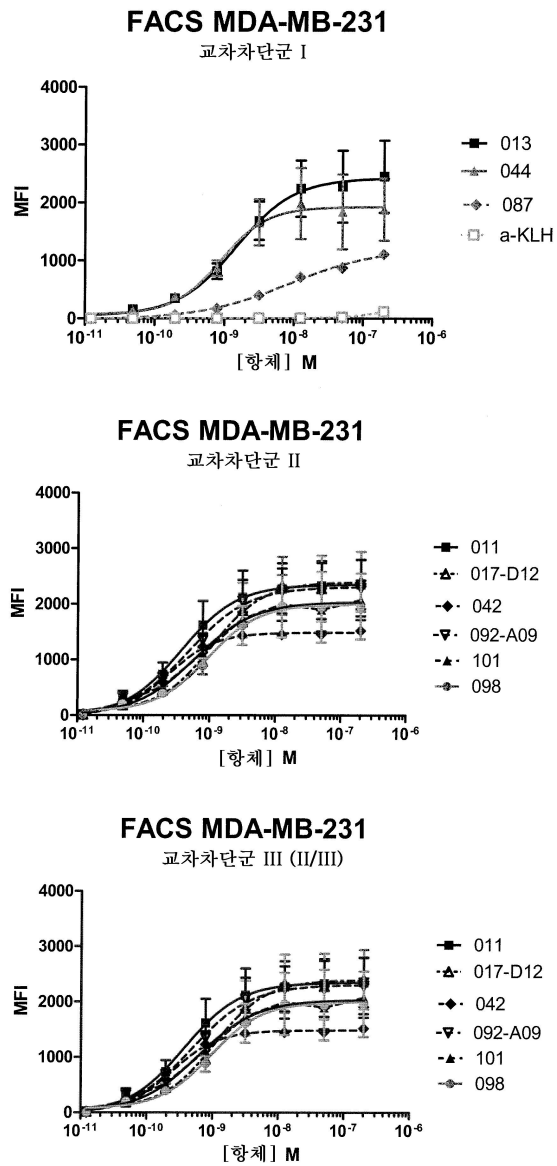
ELISA TFECDhis

교차차단군 III (II/III)



ELISA_결합에서 TF의 세포의 도메인에 대한 항-TF HuMab의 결합을 ELISA에 의해 결정하였다.

도면4

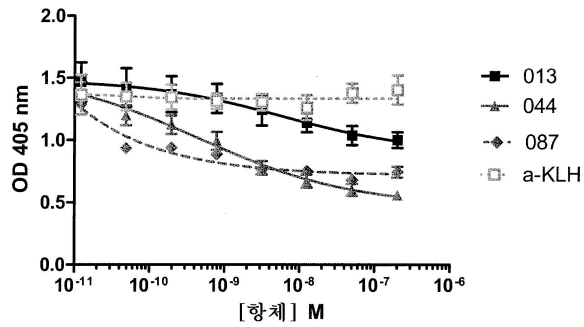


MDA-MD-231 세포 상에서 막 결합형 TF에 대한 항-TF HuMab의 결합. 결합을 FACS 분석에 의해 결정하였다.

도면5

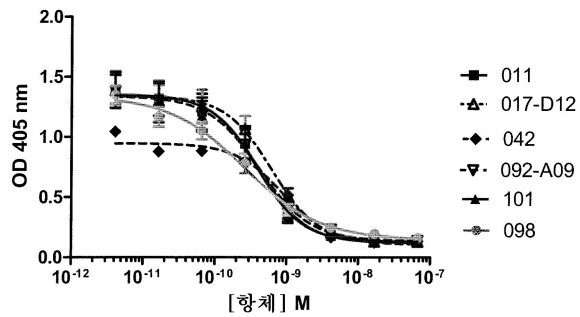
FVIIa 억제 ELISA

교차차단군 I



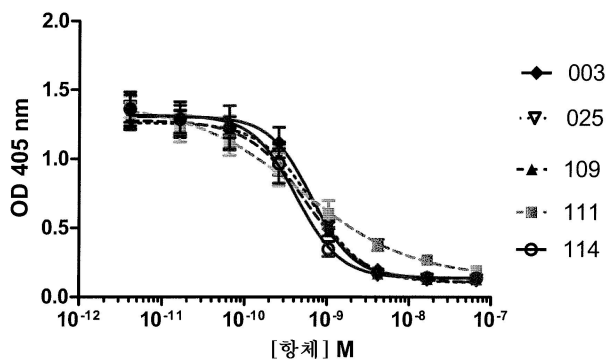
FVIIa 억제 ELISA

교차차단군 II



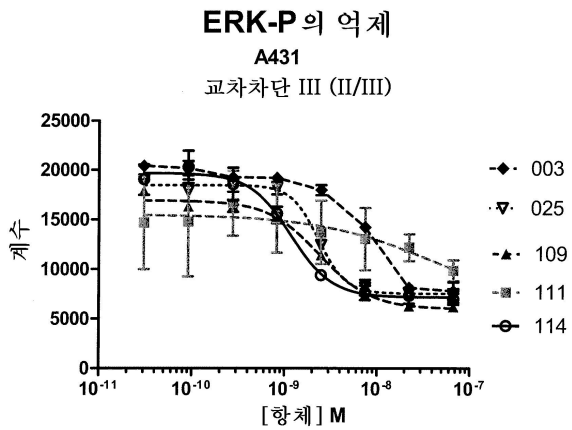
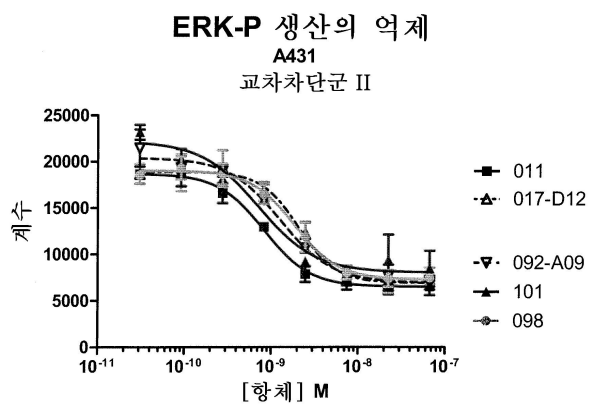
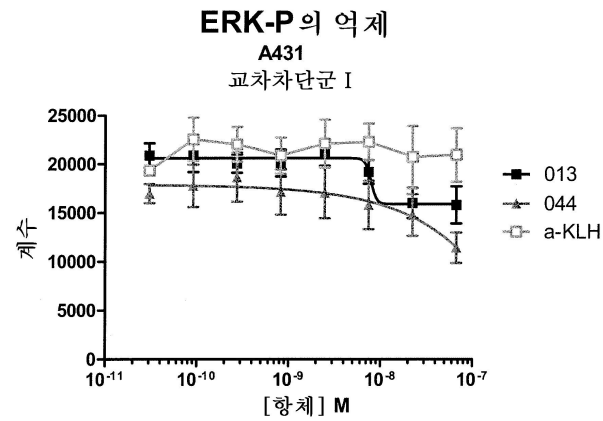
FVIIa 억제 ELISA

교차차단군 III (III/III)



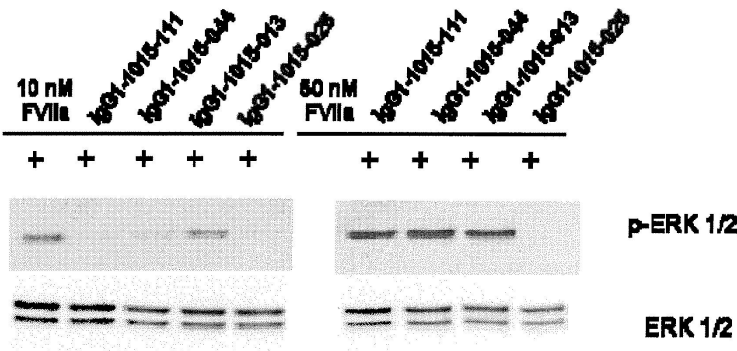
TF에 대한 FVIIa 결합의 억제, FVIIa 결합, 및 상기 결합의 TF 특이적 HuMab에 의한 억제를 ELISA에 의해 측정하였다.

도면6a



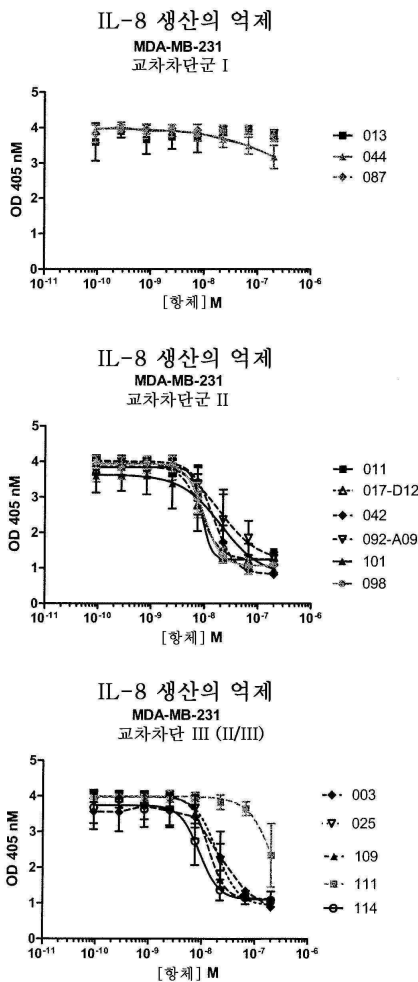
FVIIa 유도된 ERK 인산화의 억제

도면6b



웨스턴 블롯 분석을 이용하는, FVIIa 유도된 ERK 인산화의 억제

도면7

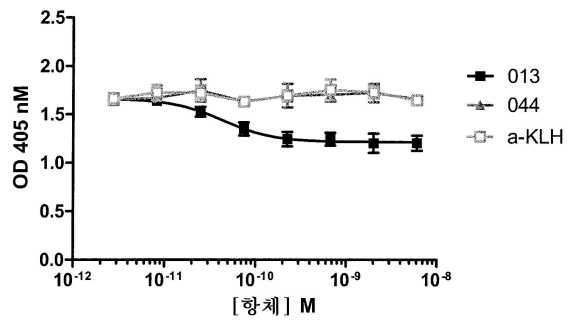


FVIIa 유도된 IL-8 방출의 억제. MDA-MB-231을 무혈청 배지 내에서 배양하고, TF 특이적 항체 및 FVIIa를 첨가하였다. FVIIa 유도된 IL-8을 ELISA에 의해 측정하였다.

도면8

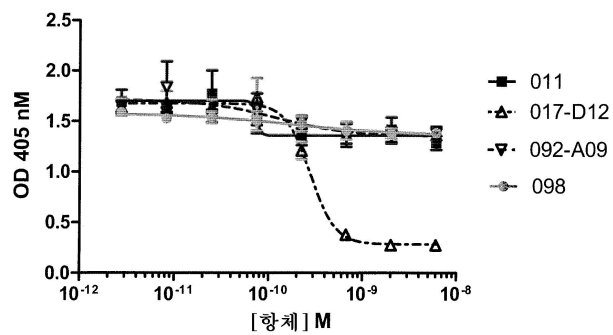
FXa 생성의 억제

교차차단군 I



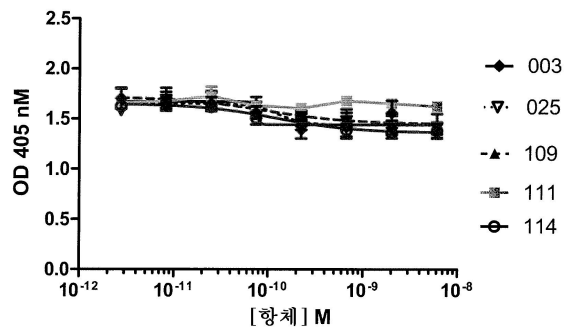
FXa 생성의 억제

교차차단군 II



FXa 생성의 억제

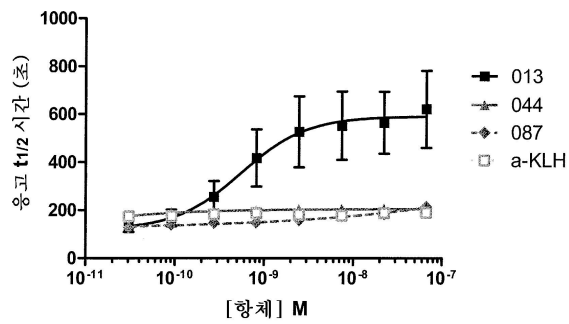
교차차단 III (II/III)



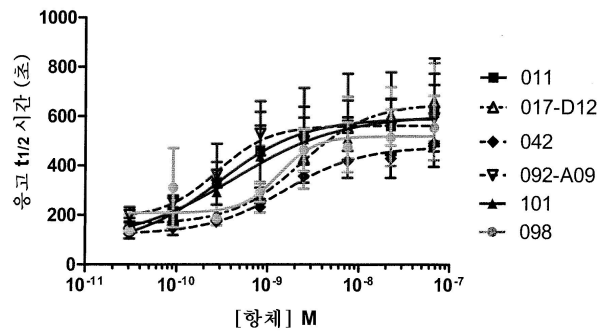
FXa 생성의 억제. FXa 생성을 억제하는 TF 특이적 HuMab의 능력을 TF/FVIIa 복합체에 의한 FX의 FXa로의 전환을 비색 FXa 특이적 기질을 사용하여 측정하는 분석으로 시험하였다.

도면9

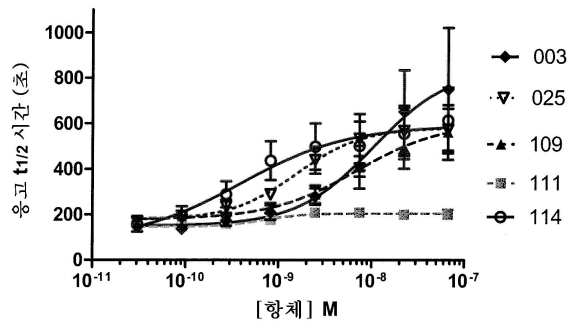
응고 시간
교차차단군 I



응고 시간
교차차단군 II



응고 시간
교차차단 III (II/III)

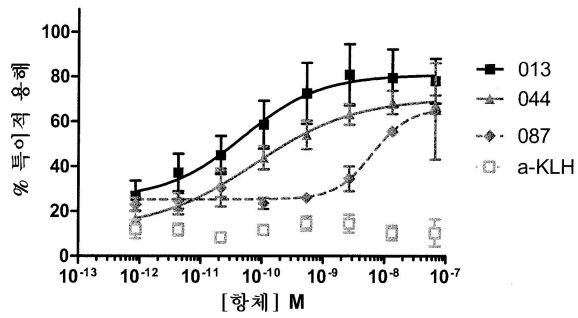


혈액 응고의 억제. TF-HuMab에 의한 혈액 응고의 억제를 TF 유도된 응고 시간을 결정하는 검정으로 측정하였다.

도면10

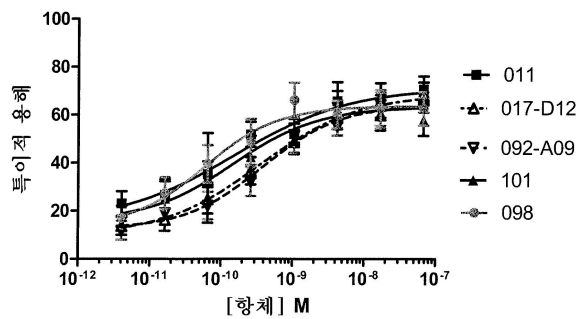
ADCC Bx-PC3 세포

교차차단군 I



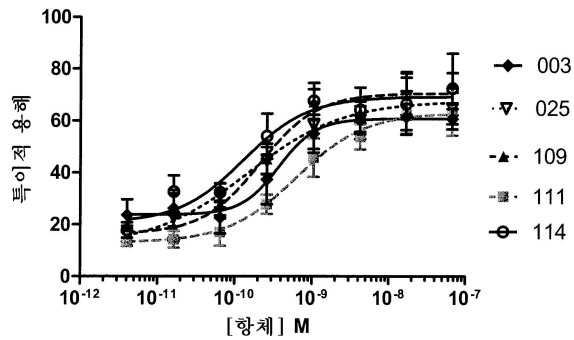
ADCC Bx-PC3 세포

교차차단군 II



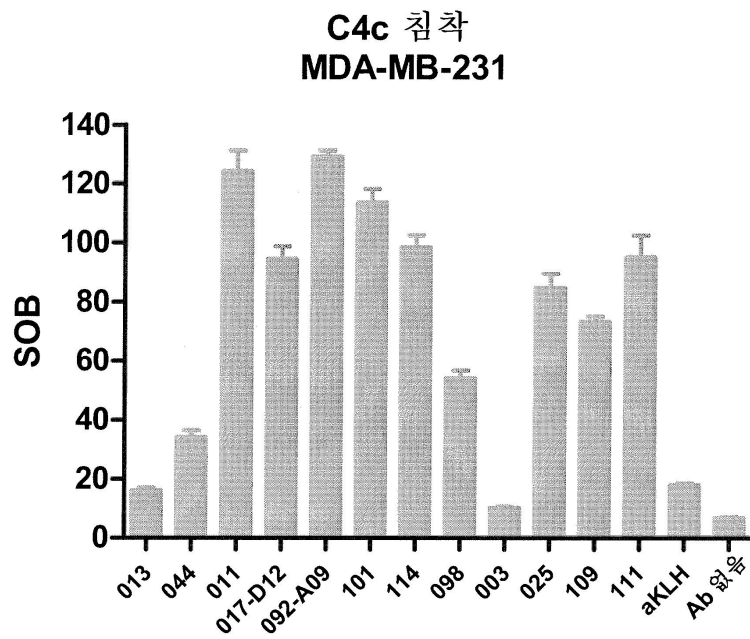
ADCC Bx-PC3 세포

교차차단군 III (II/III)

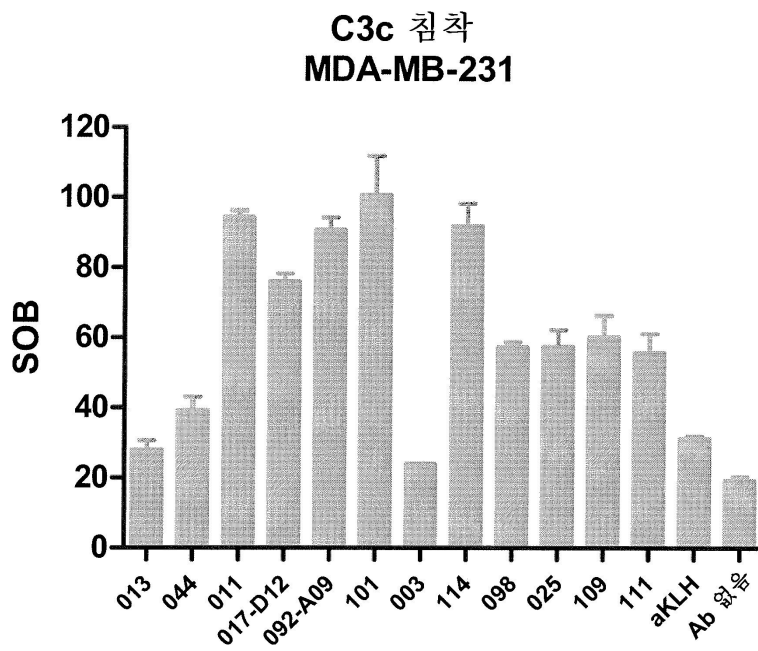


TF-HuMab는 ADCC에 의한 Bx-PC3 세포의 용해를 유도하였다.

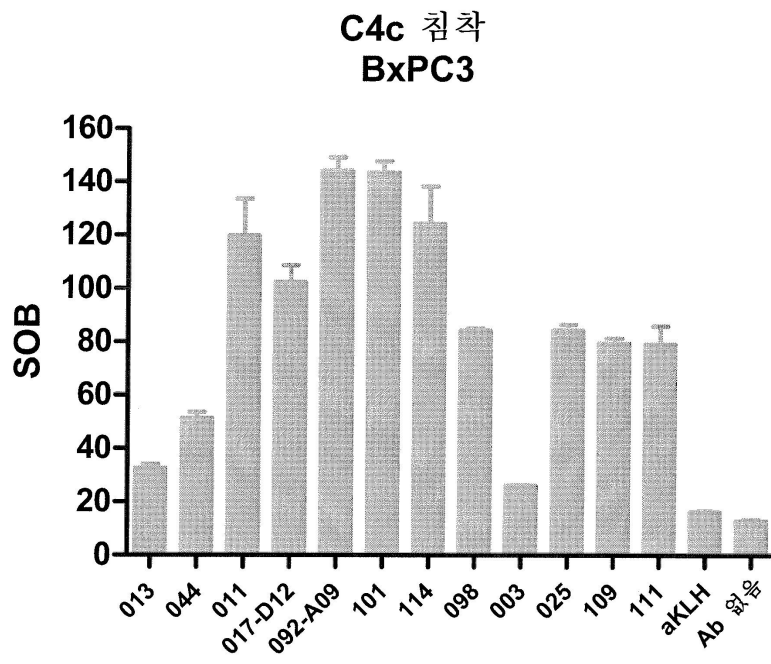
도면11a



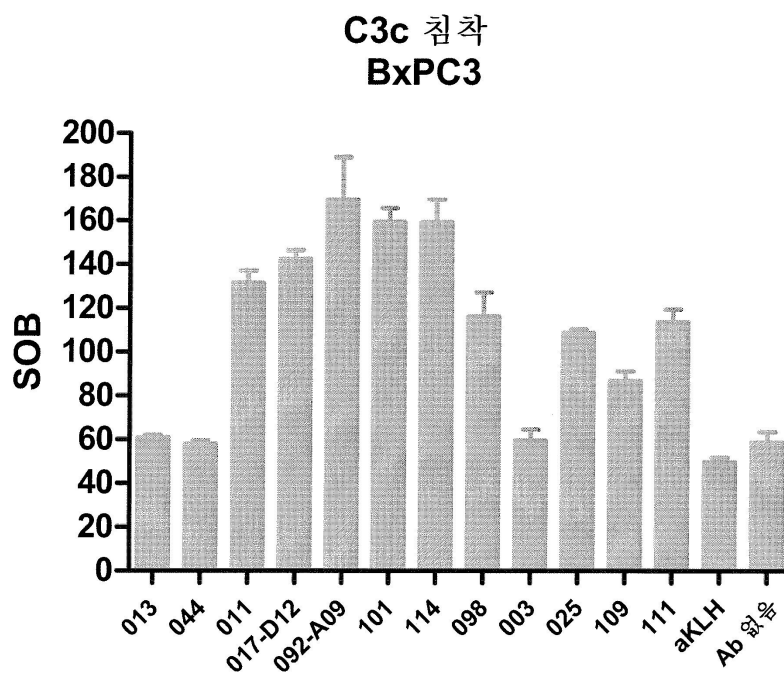
도면11b



도면11c

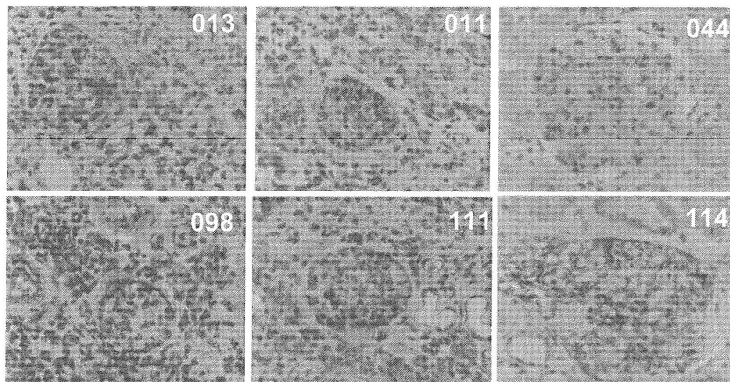


도면11d



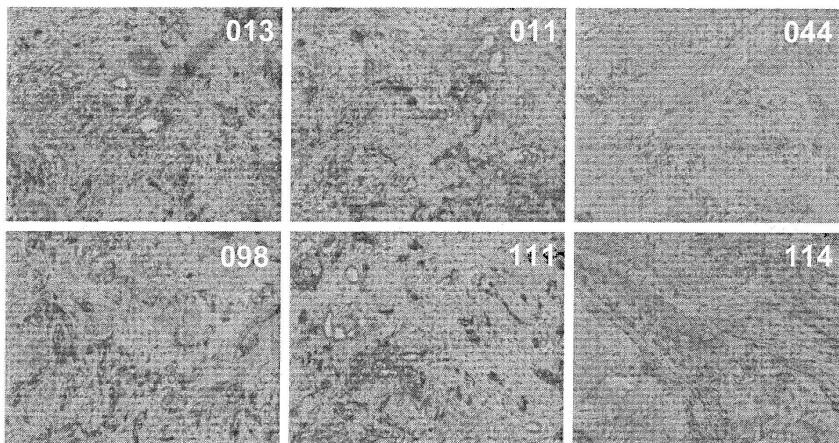
보체 침착

도면12



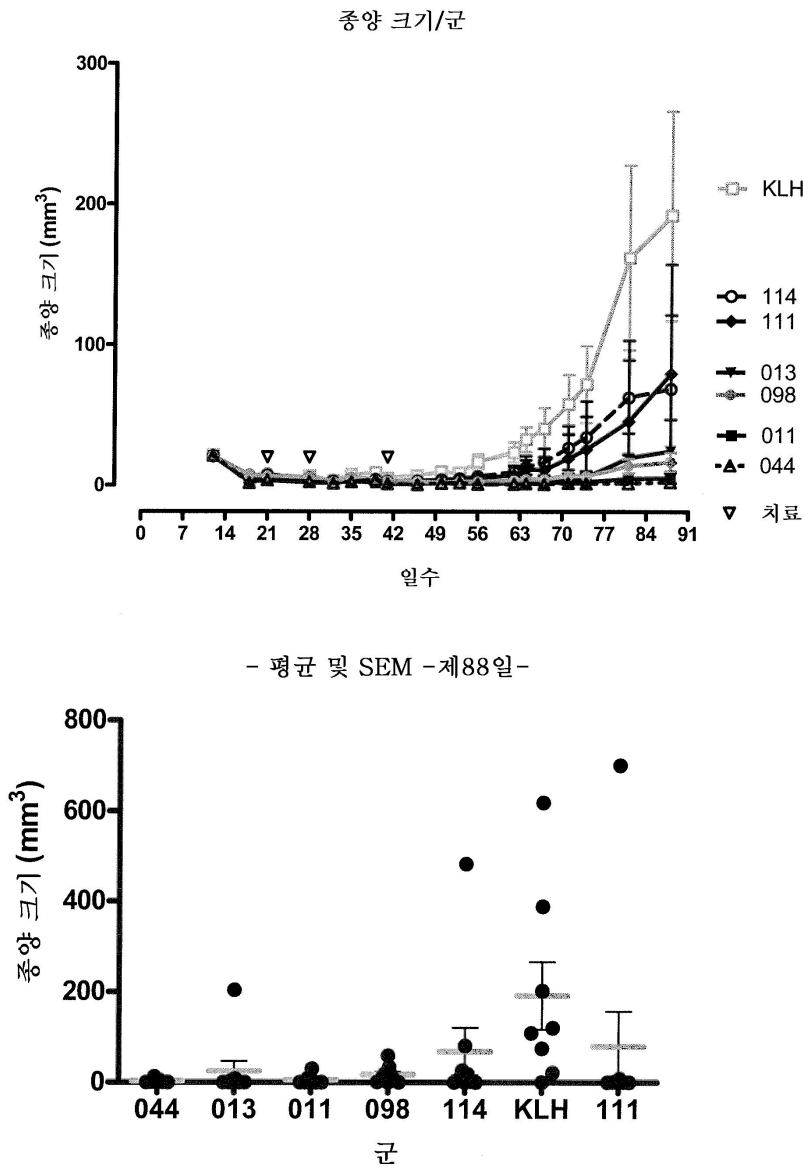
정상 인간 신장에 대한 TF-HuMab의 결합의 면역조직화학 분석

도면13



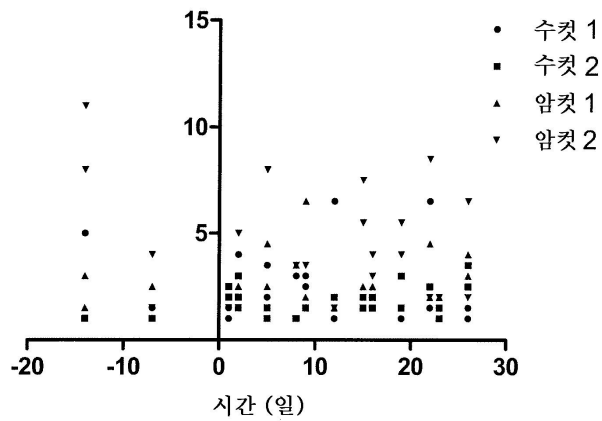
뇌장 종양에 대한 TF-HuMab의 결합의 면역조직화학 분석.

도면14



SCID 마우스의 유방 지방 패드에서 확립된 MDA-MB-231 종양 이종이식편에서 TF-HuMab의 생체내 효능.

도면15

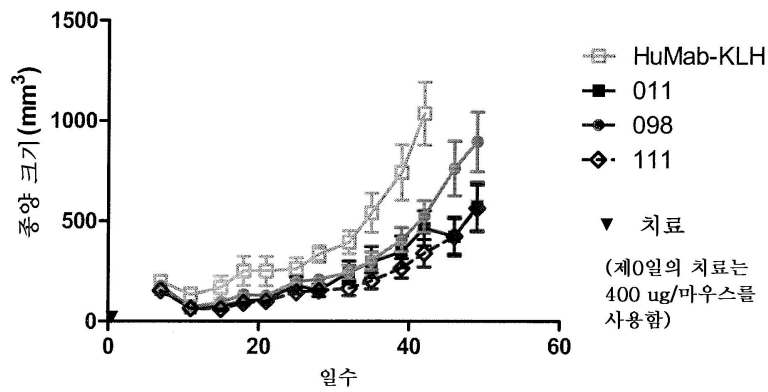


TF-특이적 HuMab 011의 정맥내 주사 시에 시노몰구스 원숭이에서 결정된 출혈 시간 (분). 항체를 제1일 (0 mg/kg), 제8일 (1 mg/kg), 제15일 (10 mg/kg) 및 제22일 (100 mg/kg)에 투여하였다. 기능적 출혈 시간 및 혈액 손실을 투여의 1, 24 및 120시간 후에 결정하였다.

도면16

BxPC3 예방적 치료

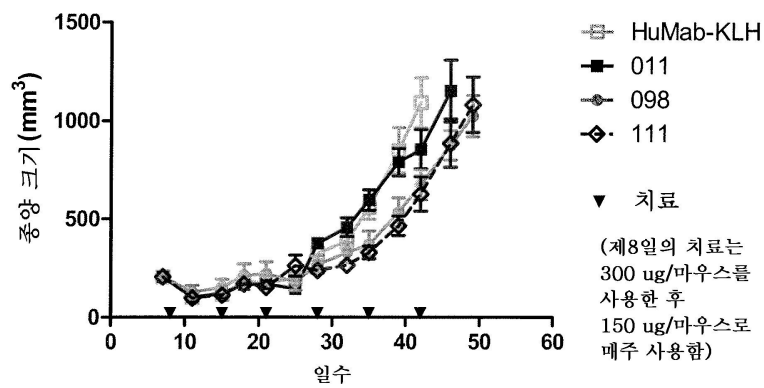
-평균 & SEM-



반복된 측정 2-웨이 ANOVA에 이은 본페로니 (Bonferroni) 포스트훅 (posthoc) 시험:
111 vs KLH: d28 온워드 (onward)로부터: $p < 0.05$, d32 온워드로부터: $p < 0.01$.

BxPC3 치료적 치료

-평균 & SEM-



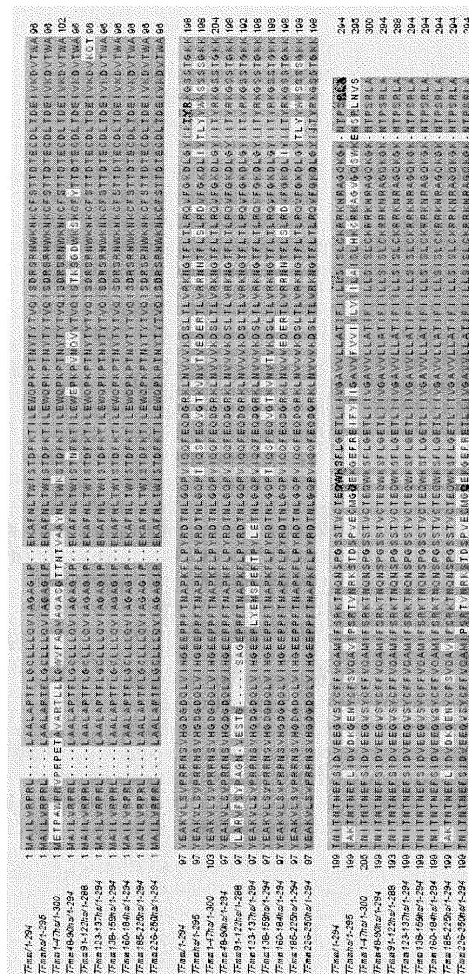
반복된 측정 2-웨이 ANOVA에 이은 본페로니 포스트훅 시험:
111 vs KLH: d32 온워드로부터: $p < 0.05$.

도면17a

[illegible]

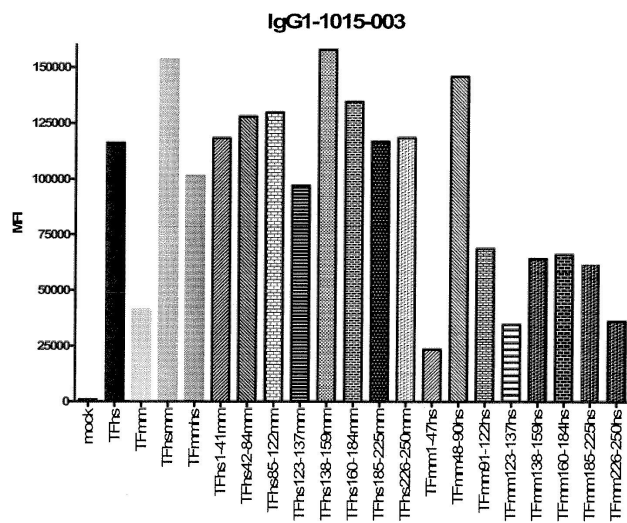
TFmm 도메인을 함유하는 TFhs 서플 구축물

도면17b

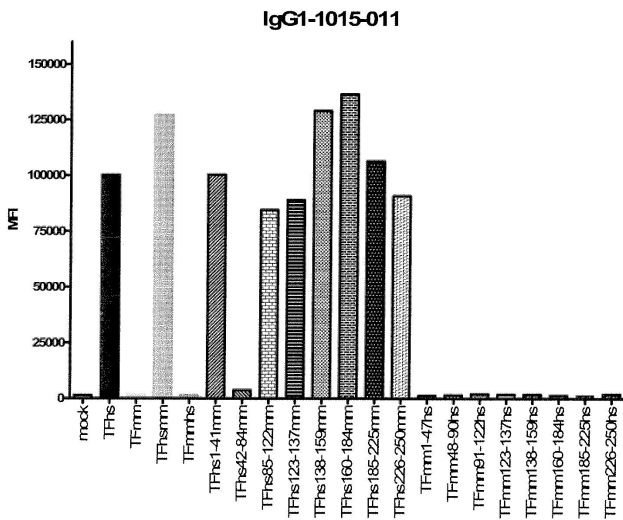


TFhs 도메인을 함유하는 TFmm 서플 구축물

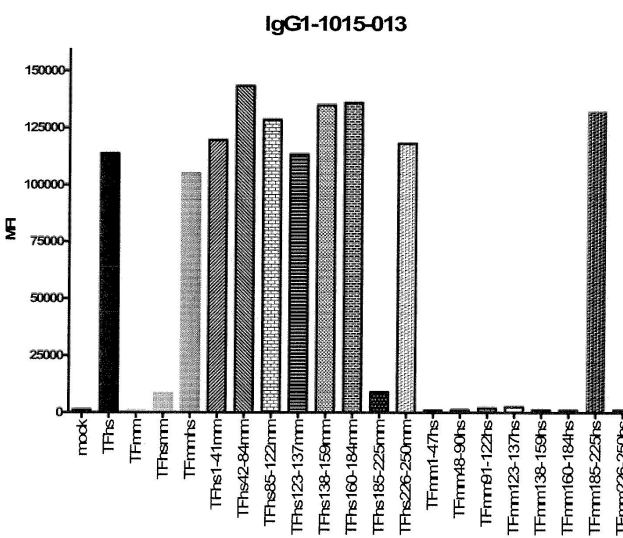
도면18a



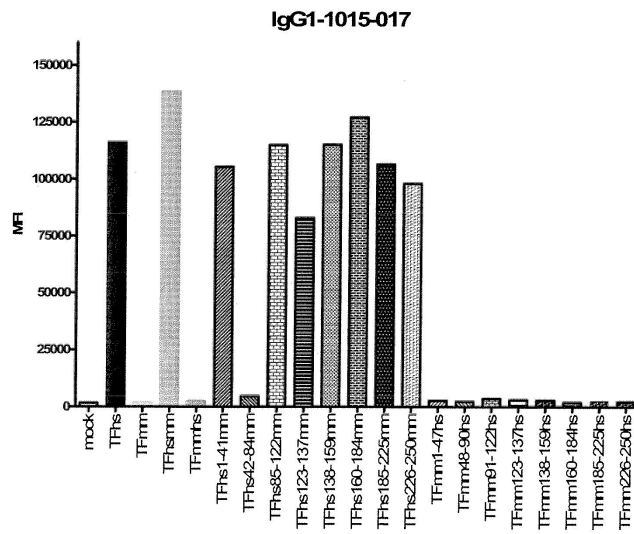
도면18b



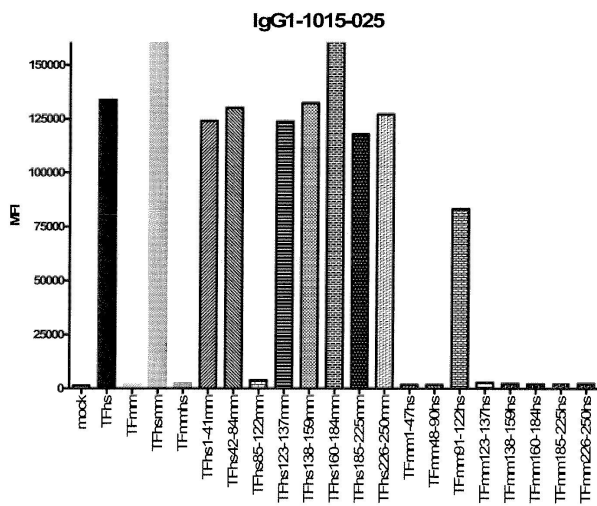
도면18c



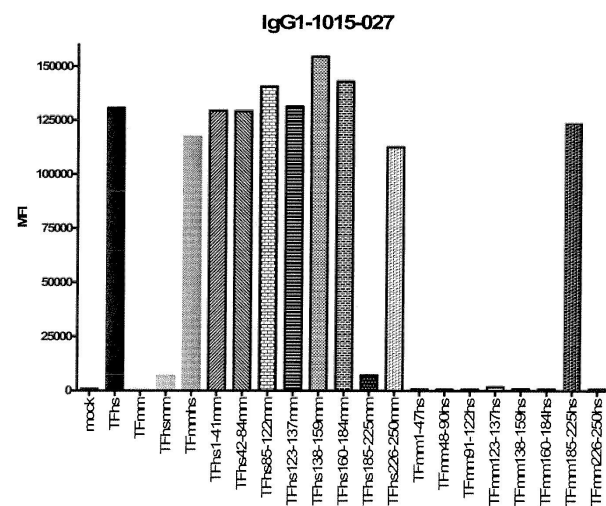
도면18d



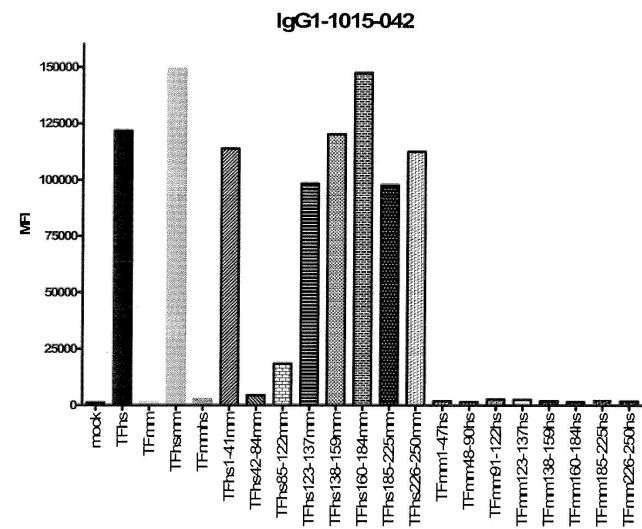
도면18e



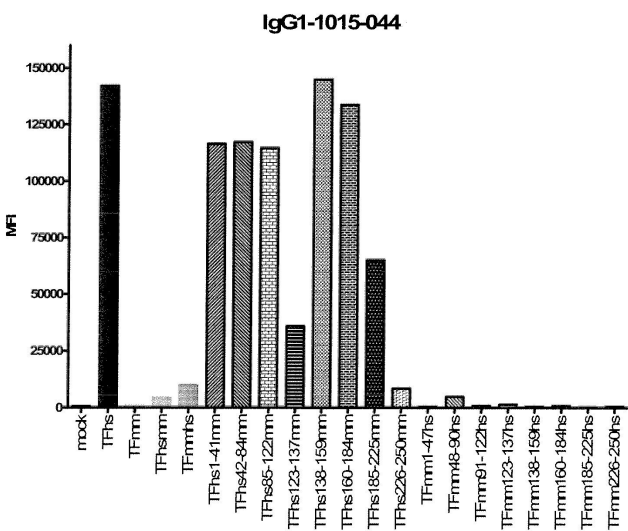
도면18f



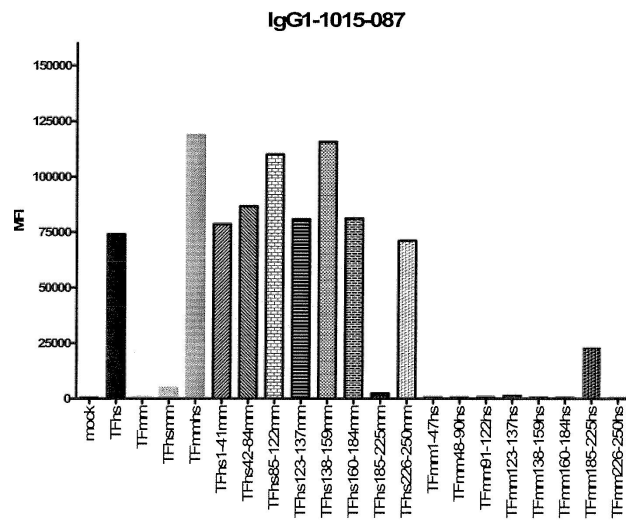
도면18g



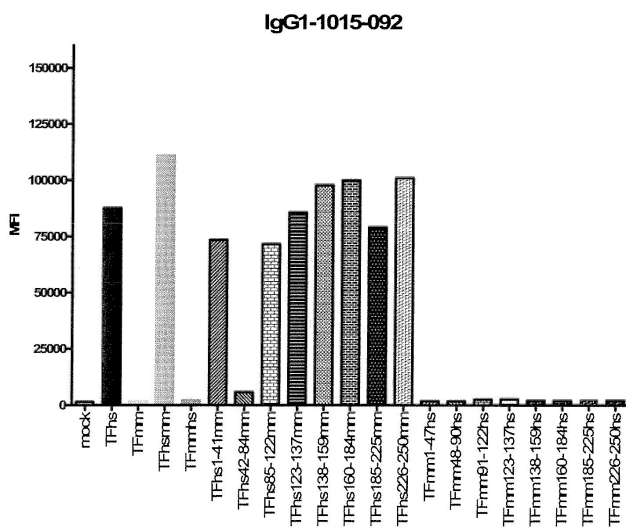
도면18h



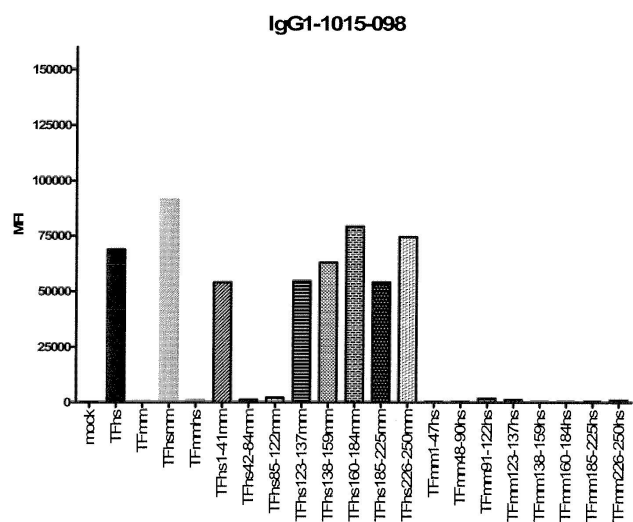
도면18i



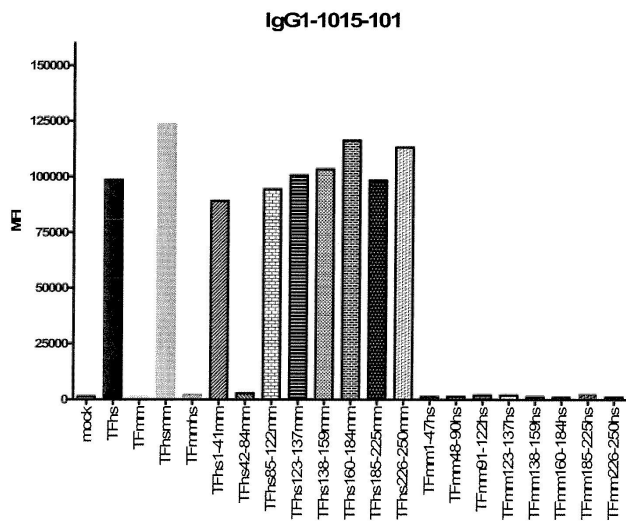
도면18j



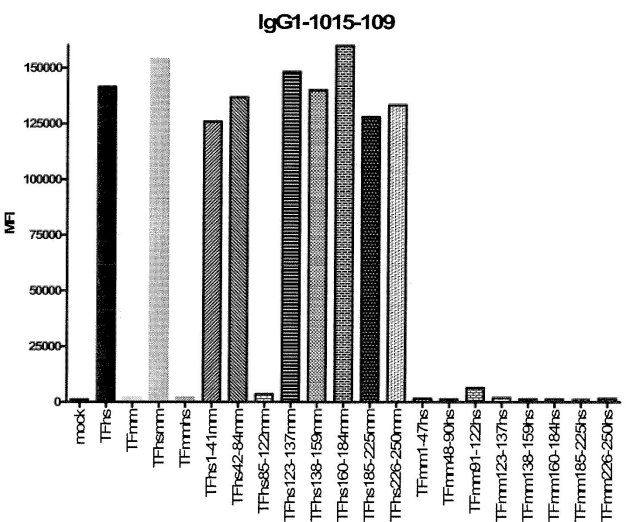
도면18k



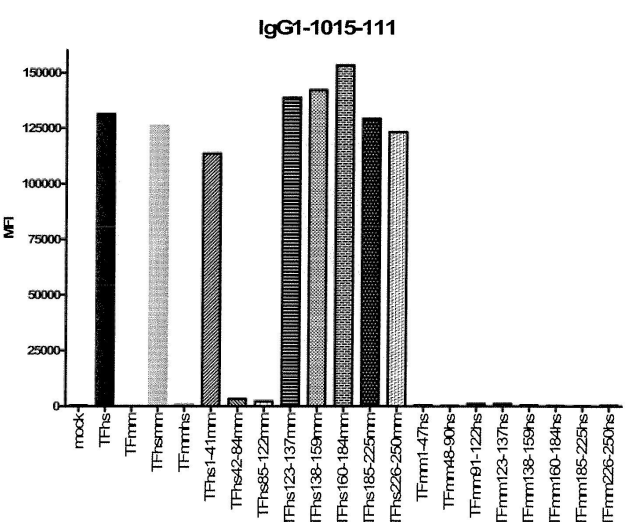
도면18l



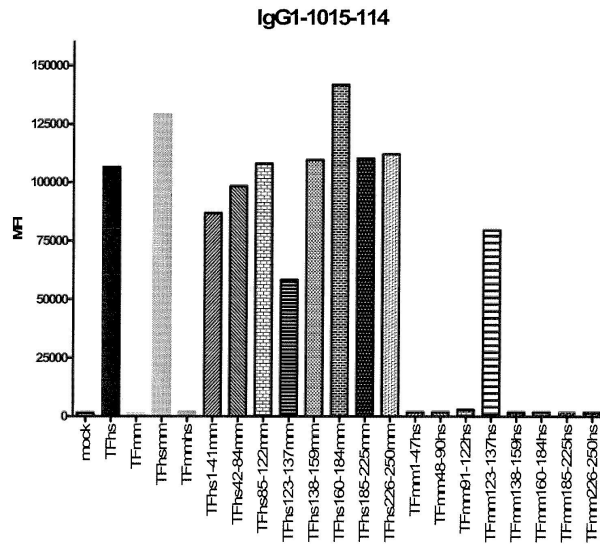
도면18m



도면18n

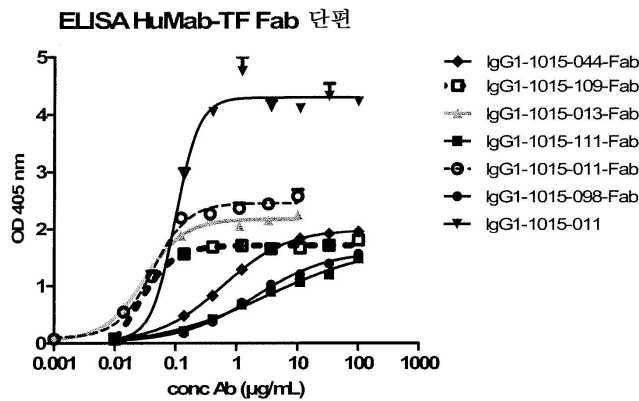


도면18o



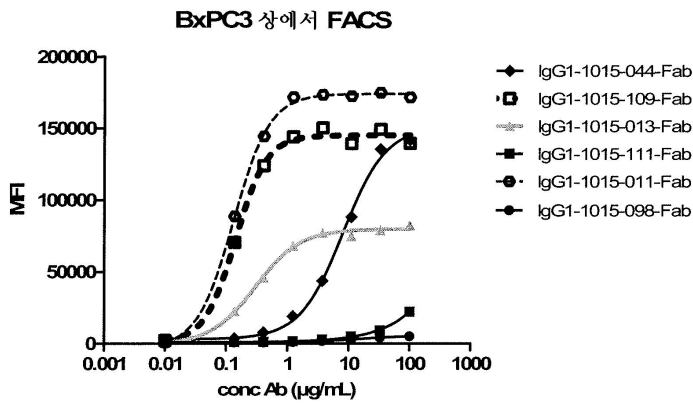
HEK293F 세포 상에서 발현된 TF 서플 구축물에 대한 항-TF MuMab의 결합. FACS에 의해 측정된, HEK293F 세포 상에서 발현된 다양한 TF 서플 구축물에 대한 항-TF HuMab의 결합 프로파일을 제시한다. 각각의 패널은 하나의 선도 클론으로부터의 데이터를 보여준다. x-축 상에, 다양한 구축물을 도시한다: mock, TFhs, TFmm, TFhsmm, TFmmhs, TFhs1-41mm, TFhs42-84mm, TFhs85-122mm, TFhs123-137mm, TFhs138-159mm, TFhs160-184mm, TFhs185-225mm, TFhs226-250mm, TFmm1-47hs, TFmm48-90hs, TFmm91-122hs, TFmm123-137hs, TFmm138-159hs, TFmm160-184hs, TFmm185-225hs, TFmm226-250hs.

도면19



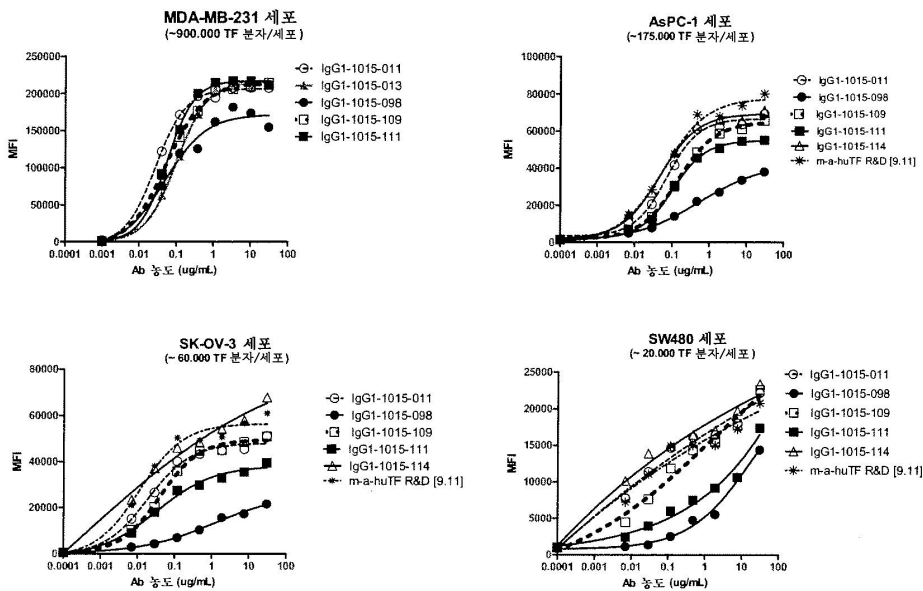
ELISA에 의해 결정된, TF의 세포의 도메인에 대한 HuMab-TF Fab 단편의 결합

도면20



BxPC3 세포 상에서 FACS에 의해 결정된, 세포성 TF에 대한 HuMab-TF Fab 단편의 결합

도면21



항-TF HuMab의 결합 프로파일은 발현된 TF 분자의 수에 의존적이다.

상이한 수준의 TF를 발현하는 세포주에 대한 항-TF HuMab의 결합을 FACS에 의해 결정하였다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Genmab

<120> Tissue factor

<130> P57

<160> 112

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 126

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ile His Arg Gly Ala Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Pro Gly Ala

100 105 110

Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr

1 5

<210> 4

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Arg Ile His Arg Gly Ala Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Pro Gly Ala

1 5 10 15

Phe Asp Ile

<210> 5

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Val Asn Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Arg Pro Gly Thr Phe Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Gly Phe Thr Val Ser Asn Asp Gly

1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ile Trp Tyr Asp Gly Val Asn Lys

1 5

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ala Arg Arg Pro Gly Thr Phe Tyr Gly Leu Asp Val

1 5 10

<210> 9

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val

50 55 60

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

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala

1 5

<210> 11

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Thr

1 5

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ala Arg Ser Pro Trp Gly Tyr Tyr Leu Asp Ser

1 5 10

<210> 13

 $\langle 211 \rangle$ 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Asp Ser Thr Asn 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 Asp Gly Tyr Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 15

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Ser Thr

1 5

<210> 16

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Ala Lys Asp Gly Tyr Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Asp Leu

1 5 10

<210> 17

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr 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 Ala Pro Trp Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly

1 5

<210> 19

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr

1 5

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Ala Lys Ala Pro Trp Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 21

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg 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 Phe

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

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala

1

5

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr

1

5

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1

5

10

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Leu Val Ala Val Ser Ser

115

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala

1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ile Ser Gly Ser Gly Val Thr Thr

1 5

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10
 <210> 29
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 29
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Pro Arg Gly Thr Phe Ser Tyr Tyr
 20 25 30
 Thr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 30
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 Arg Gly Thr Phe Ser Tyr Tyr Thr
 1 5
 <210> 31
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala

1 5

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Ala Arg Glu Gly Asp Arg Arg Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 33

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Ile Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Asp Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Ala

1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Ile Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Asp

1 5

<210> 36

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 37

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Pro Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Ala Val Val Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95
Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

 100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

 115 120

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Ala

1 5

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Val Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Lys

1 5

<210> 40

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 41

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Glu Asp Trp Gly Leu Glu Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ala

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala

1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Ile Pro Tyr Asp Gly Asp Asn Lys

1 5

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Ala Arg Glu Asp Trp Gly Leu Glu Val Asp Tyr

1 5 10

<210> 45

<211> 121

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Cys

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg His Lys Leu Gly Met Asp His Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 46

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Cys Trp

1 5
 <210> 47
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 47
 Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr

1 5
 <210> 48
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 48
 Ala Arg His Lys Leu Gly Met Asp His Asp Ala Phe Asp Ile

1 5 10
 <210> 49
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 49
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Arg Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe Asn Asn Tyr
 20 25 30

Pro Ile Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Gly Gly Asp Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

Met Val Ser Val Ser Ser

115

<210> 50

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gly Gly Ser Phe Asn Asn Tyr Pro

1

5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Thr

1

5

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Ala Gly Gly Asp Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile

1

5

10

<210> 53

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

1

5

10

15

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

20

25

30

Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Asn Asp Gly Ile Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Asp His Thr Met Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Gly Phe Thr Phe Asn Arg Tyr Ala

1 5

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Ile Ser Asn Asp Gly Ile Asn Lys

1 5

<210> 56

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Ala Arg Asp His Thr Met Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 57

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Ser Asp Pro Ile

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 58

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Gln Gly Ile Ser Arg Trp

1 5

<210> 59

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Ala Ala Ser

1

<210> 60

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Gln Gln Tyr Asp Ser Asp Pro Ile Thr

1 5

<210> 61

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1 5

<210> 63

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Gly Ala Ser

1

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr

1 5

<210> 65

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Arg

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100

105

<210> 66

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

Gln Gly Ile Ser Ser Arg

1

5

<210> 67

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Ala Ala Ser

1

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1

5

<210> 69

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Ser Ser

20

25

30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95
 Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr

1 5

<210> 71

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

Gly Ala Ser

1

<210> 72

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr

1 5

<210> 73

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ser Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105

<210> 74

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Gln Ser Val Gly Ser Ser Ser

1 5

<210> 75

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Gly Ala Ser

1

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr

1 5

<210> 77

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Arg

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Gln Gly Ile Ser Ser Arg

1 5

<210> 79

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Ala Ala Ser

1

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 81

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 82

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Gln Gly Ile Ser Ser Trp

1 5

<210> 83

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Ala Ala Ser

1

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Tyr Thr

1 5 10

<210> 85

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ile Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Leu

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100

105

<210> 86

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 86

Gln Asp Ile Ser Ser Ala

1 5

<210> 87

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 87

Asp Ala Ser

1

<210> 88

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 88

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 89

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 89

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

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

20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

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

<210> 90
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 90
 Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5
 <210> 91
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 91

Asp Ala Ser
 1
 <210> 92
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 92

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 93

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 93

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Ile Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 94

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 94

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5

<210> 95

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 95

Asp Ala Ser

1

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 96

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1 5

<210> 97

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 97

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Ser Ala

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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 Phe Asn Ser Tyr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 98

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 98

Gln Gly Ile Asn Ser Ala

1 5

<210> 99

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 99

Asp Ala Ser

1

<210> 100

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 100

Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 101

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 101

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Thr Val Glu Val Lys

100 105

<210> 102

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 102

Gln Gly Ile Ser Ser Trp

1 5

<210> 103

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 103

Ala Ala Ser

1

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 104

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr

1 5

<210> 105

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 105

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 106
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 106
 Gln Gly Ile Ser Ser Trp

1 5
 <210> 107
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 107

Ala Ala Ser
 1
 <210> 108
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 108

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 109
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 109

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu

85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 110

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 110

Gln Ser Val Ser Ser Tyr

1 5

<210> 111

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 111

Asp Ala Ser

1

<210> 112

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 112

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr

1

5