



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년07월05일
(11) 등록번호 10-1136262
(24) 등록일자 2012년04월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2009-7021652
(22) 출원일자(국제) 2008년04월17일
심사청구일자 2009년10월16일
(85) 번역문제출일자 2009년10월16일
(65) 공개번호 10-2009-0130382
(43) 공개일자 2009년12월23일
(86) 국제출원번호 PCT/US2008/005137
(87) 국제공개번호 WO 2008/130704
국제공개일자 2008년10월30일
- (30) 우선권주장
60/923,979 2007년04월17일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
Journal of Biological Chemistry vol. 272, No.
52, Pages 33037-33044(1997.12.26.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자
임클론 엘엘씨
미국 뉴욕 (우편번호: 10016) 뉴욕 이스트 29쓰
스트리트 450
- (72) 발명자
주, 쟈평
미국 07436 뉴저지주 오크랜드 볼더 런 9
웬, 주쿤
미국 11355 뉴욕주 플러싱 아파트먼트 에프3 플
룩스 플레이스 42-66
- (74) 대리인
김영, 양영준

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 PDGFR β -특이적 길항제

(57) 요약

본 발명은 신규한 PDGFR β -특이적 길항제에 관한 것이다. 길항제는 항체를 포함하고, 이는 이중특이적일 수 있다. 항체는 종양 성장을 감소시키거나 억제하고/하거나 혈관신생 질병을 치료하기 위해 사용된다. 본 발명은 또한 PDGFR β -특이적 길항제와 그러한 치료를 위한 VEGFR 길항제와의 조합물을 포함한다. 길항제는 추가로 다른 항-혈관신생 또는 항-신생물질 약물과 조합으로 투여될 수 있다.

대표도 - 도17

2CS 의 서열 정보:

2CS VH 의 DNA:

CAGGTGCGAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCCTG
CAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTTGGACAAG
GGCTTGAAGTGGAGGATCATCCCTATCTTGGTATAGCAAACTACGCACAGAGTTCAG
GGCAGATCAGATTACCGGACAAATCCAGCAGACACCTACATGAGCTGAGCAGCTCAG
ATCTGAGGACACGGCCCTCTATTACTGTGCGAGAGATATGGGTCAAGGAATTATTATTACTTCT
ACTGGGGCCAGGGAACCTGTGTCACCTCTCAAGC

2CS VH 의 단백질:

QVQLVQSGAEVKKFQSSVKVSKCAAGGTFSSVAISWVRQAPQGLEWMGRITPILGIANIYAKQKFG
GRVTTITADKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARDMGSRNYYFFYWGQGLTVTVSS

2CS VL 의 DNA:

GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGCCACCTCTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTC
CTGCAGAGGCAGTCAAGTGTGGCAGGTACTTACCTGGTACCAAGAACTGGCCAGGCTC
CCAGGCTCTCTATATGGTGCATCCAGAGGCCACTGGCATCCCAAGGTTCAAGTGGCAGT
GGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCTAGAGCCTGAAGATTTCAGTTTATTA
CTGTCCAGCAGCTAGCAACTGGCTCTCACTTTCCGCGAGGGACCAAGGTGAGATCAAA

2CS VL 의 단백질:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAGQSVGRVLAHWYQQKPGQAPRLLIYGASNRATGIPARFSGS
GSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQRNWLTFGGGTKVEIK

특허청구의 범위

청구항 1

서열 SYAIS (서열 20)를 갖는 CDRH1, 서열 RIIPILGIANYAQKFQG (서열 22)를 갖는 CDRH2, 서열 DMGSRNYYFY (서열 24)를 갖는 CDRH3, 서열 RASQSVGRYLA (서열 28)를 갖는 CDRL1, 서열 GASNRAT (서열 30)를 갖는 CDRL2, 및 서열 QQRSNWPLT (서열 32)를 갖는 CDRL3을 포함하는, 인간 혈소판 유래 성장 인자 수용체- β (PDGFR β)에 결합하는 항체 또는, 단일쇄 항체, Fab 및 F(ab')₂ 단편, 단일쇄 Fv, 및 단일 도메인 항체로부터 선택되는 그의 기능적 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열 26의 아미노산 서열 및 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는, 단일쇄 항체, Fab 및 F(ab')₂ 단편, 단일쇄 Fv, 및 단일 도메인 항체로부터 선택되는 그의 기능적 단편.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 인간 γ 1 중쇄 불변 구역 및 인간 κ 경쇄 불변 구역을 함유하는 항체 또는, 단일쇄 항체, Fab 및 F(ab')₂ 단편, 단일쇄 Fv, 및 단일 도메인 항체로부터 선택되는 그의 기능적 단편.

청구항 4

제1항 또는 제2항의 항체를 포함하는, 암 치료용 제약 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 암이 난소암, 비소세포폐암(NSCLC), 췌장암, 대장암 또는 아교모세포종인 제약 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

명세서

[0001] <관련 출원에 대한 교차 참조>

[0002] 본원은 그 개시 내용이 본원에 참고로 포함된, 2007년 4월 17일 출원된 미국 특허 가출원 60/923,979를 기초로 한 우선권을 주장한다.

기술 분야

[0003] 본 발명은 혈관 신생과 종양 성장을 억제하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 혈관 신생에 대한 혈소판 유래 성장 인자 수용체-베타 (PDGFR β)의 특이적 억제의 효과를 입증하고, PDGFR β 특이적 길항제를 단독으로 또는 VEGF 수용체의 억제제와 조합으로 사용하는 혈관 신생의 치료를 제공한다. 특이적 억제제는 항체 또는 그의 항원 결합 단편일 수 있다. 또한, 억제제는 이중특이적일 수 있다.

배경 기술

[0004] 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF)는 거의 모든 중간엽-유래 세포에 대한 강력한 미토겐의 패밀리아. 4개의 PDGF 이소형, 즉, A, B, C 및 D가 존재하고, 이들은 5개의 상이한 디설피드-연결된 이량체 단백질, 즉, PDGF-AA, -BB, -AB, -CC, 및 -DD를 형성한다. 이들 성장 인자는 2개의 구조상 관련된 티로신 키나제 수용체, 즉 PDGF 수용체 α (PDGFR α)와 PDGF 수용체 β (PDGFR β)를 통해 그들의 세포성 효과를 발휘한다 ([Sandy, J.R., 1998, Br. J. Orthod. 25:269-74]; [Betsholtz, C. et al., 2001, Bioessays 23:494-507]).

[0005] PDGFR α 및 PDGFR β 는 구조상 유사하고, 동종이량체뿐만 아니라 이종이량체를 형성할 수 있다. PDGF-BB 및 PDGF-DD는 $\beta\beta$ 동종이량체성 수용체의 주된 활성화제이다. PDGF-AA는 $\alpha\alpha$ 수용체 이량체만을 활성화시키는 반면, PDGF-AB, PDGF-BB 및 PDGF-CC는 $\alpha\alpha$ 및 $\alpha\beta$ 수용체 이량체를 활성화시킨다. 이량체 리간드 분자는 2개의 수용체 단백질에 동시에 결합하고, 수용체 이량체화, 수용체의 세포질 도메인 내에서 특이적 잔기의 자가인산화, 및 세포내 신호전달을 유도한다. 궁극적으로, PDGFR β 신호전달 경로의 활성화는 세포 증식 및 이동을 포함한 다양한 세포성 반응을 유도한다.

[0006] 혈관 신생은 종양 성장과 전이 모두에 필수적인 것으로 생각된다. 혈관계의 발생, 또는 혈관형성에는 2개의 주요 세포 종류, 즉, 내피세포 (EC) 및 혈관주위세포/혈관 평활근 세포 (SMC)의 성숙 혈관으로의 발달을 필요로 한다. 혈관형성에서 PDGF-B/PDGFR β 신호전달 경로의 관련은 PDGF-B 및 PDGFR β 녹아웃 (knockout) 마우스에 의해 제안된다. PDGF-B 및 PDGFR β 녹아웃 표현형은 혈관에서 혈관주위세포 및 평활근 세포의 덮임률 (coverage)의 손실로 인해 마우스가 출혈을 나타낸다는 점에서 실질적으로 동일하다. 연구에서는 PDGFR β 가 모세관으로 혈관주위세포의 동원 및 혈관에서 평활근 세포의 발달에 관여함을 나타낸다. 발생기 혈관을 회복하기 위한 혈관주위세포의 동원은 혈관망의 안정화 및 추가의 확립을 위해 필수적이다. 적절한 혈관주위세포의 덮임이 없는 혈관은 잘 확립된 성숙 혈관보다 VEGF 억제를 받기가 더 쉽다.

[0007] 항종양제로서 개발 중인 많은 티로신 키나제 억제제는 PDGFR β 를 억제하는 것으로 밝혀졌다. 그러나, 이들 화합물은 다수의 티로신 키나제 표적을 갖는다. 예를 들어, 이마티닙 메실레이트 (글리벡 (Gleevec)[®]/ST571)는 아벨슨 (Abelson) (Abl) 티로신 키나제 억제제로서 개발되었고, c-kit, PDGFR α 및 PDGFR β 를 또한 억제한다. 수니티닙 말레이트 (수텐트 (Sutent)[®]/SU 11248)는 VEGFR, PDGFR, c-KIT 및 FLT-3에 대한 활성을 갖는 광범위의 경구로 이용가능한 다중표적화 (multitargeted) 티로신 키나제 억제제이다. CP-673,451은 PDGFR α 및 PDGFR β 모두의 억제제이다. 이들 소분자 길항제는 이들 수용체에 특이적이지 않으므로, 종양 연관 혈관 신생, 종양 자극 및 성장을 포함한 혈관 신생에 대한 PDGFR β 신호전달의 기여, 또는 다수의 수용체의 불필요한 표적화로 인한 것일 수 있는, 상기 화합물의 투여와 연관된 독성을 구분하는 것이 불가능하다.

- [0008] 따라서, 본 발명은 PDGFR β -특이적 길항제를 제공하고, 종양 성장 및 생존을 지지하는 혈관 신생을 포함하는 혈관 신생에서 PDGFR β 의 역할을 증명하고, 종양 및 혈관신생 질병을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 PDGFR β 및 VEGFR을 통한 신호전달을 동시에 억제하는 잇점을 추가로 증명한다.
- [0009] <발명의 개요>
- [0010] 본 발명은 PDGFR β 매개 신호전달의 PDGFR β -특이적 길항제를 제공한다. 본 발명의 실시태양에서, PDGFR β -특이적 길항제는 혈소판 유래 성장 인자 수용체- β (PDGFR β)에 특이적으로 결합하는 항체이다. 상기 항체의 하나는 CDRH1에서 서열 20에 대해; CDRH2에서 서열 22에 대해; CDRH3에서 서열 24에 대해; CDRL1에서 서열 28에 대해; CDRL2에서 서열 30에 대해; 및 CDRL3에서 서열 32에 대해 적어도 약 90% 상동성이거나 약 90% 동일한 상보성 결정 구역을 갖는다. 다른 상기 항체는 서열 18의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열과 서열 26의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함한다. 상기 항체의 다른 실시태양은 CDRH1에서 서열 4에 대해; CDRH2에서 서열 6에 대해; CDRH3에서 서열 8에 대해; CDRL1에서 서열 12에 대해; CDRL2에서 서열 14에 대해; 및 CDRL3에서 서열 16에 대해 적어도 약 90% 상동성이거나 약 90% 동일한 상보성 결정 구역을 갖는다. 또다른 상기 항체는 서열 2의 중쇄 가변 도메인 아미노산 서열과 서열 10의 경쇄 가변 도메인 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명은 상기 언급된 항체 중 하나와 동일하거나 겹치는 에피토프에 결합하는 PDGFR β -특이적 항체를 추가로 포함한다.
- [0011] 본 발명의 항체는 키메라 (chimera), 인간화 또는 인간 항체일 수 있다. 본 발명의 항체는 또한 항원 결합 단편, 예를 들어, 단일쇄 항체, Fab 및 F(ab')₂ 단편, 단일쇄 Fv, 및 단일 도메인 항체일 수 있다. 항체는 또한 디아바디 (diabody) 및 트리아바디 (triabody)를 포함한다. 또한, 항체는 이중특이적일 수 있다.
- [0012] 본 발명은 상기 항체를 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드, 발현 벡터, 및 항체를 생산하는 숙주 세포를 추가로 제공한다.
- [0013] 본 발명은 포유동물에게 유효량의 혈소판 유래 성장 인자 수용체- β (PDGFR β)-특이적 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 PDGFR β 의 활성을 조정하는 방법을 제공한다. 본 발명의 한 실시태양에서, 유효량의 PDGFR β -특이적 길항제는 포유동물에서 혈관 신생을 억제하기 위해 사용된다. 또다른 실시태양에서, 유효량의 PDGFR β -특이적 길항제는 포유동물에서 종양 성장을 감소시키기 위해 사용된다. PDGFR β -특이적 길항제는 PDGFR β 에 결합하는 항체, 또는 PDGFR β 또는 PDGFR β 리간드에 결합하고 PDGFR β -매개 신호전달을 감소 또는 차단하는 임의의 다른 물질일 수 있다. 치료 방법은 VEGFR 길항제의 병용 투여를 추가로 포함할 수 있다. 별법으로, 치료 방법은 PDGFR β -특이적 길항제이면서 동시에 VEGFR 길항제인 물질, 예를 들어 이중특이적 항체를 사용할 수 있다.
- [0014] 본 발명에 따라, 종양 및 혈관신생 병태의 치료는 항신생물질제, 예를 들어 화학요법제 또는 방사선의 투여를 추가로 포함할 수 있다.

발명의 상세한 설명

- [0032] 본 발명은 PDGFR β 에 특이적인 항체 또는 그의 단편을 제공한다. 본 발명의 항체는 PDGFR β 의 도메인 1 및 2에 특이적으로 결합하는 것을 포함한다. 본 발명의 항체는 2C5 및 1B3을 포함한다.
- [0033] 본 발명은 또한 상기 설명된 항체를 사용하는, 및 항-PDGFR β 길항제를 VEGFR 길항제와 조합으로 사용하는, 종양 및 혈관신생 질병의 치료를 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 특히, 본 발명은 항-종양 및 항-혈관 신생 메커니즘에 의한 암 치료를 위한 PDGF-B/PDGFR β 신호전달 경로의 특이적 표적화를 제공한다. 또한, 본 발명은 혈관신생 질병의 치료를 제공한다.
- [0034] 따라서, 본 발명은 PDGFR β 에 특이적인 혈소판 유래 성장 인자 수용체- β (PDGFR β) 길항제를 제공한다. PDGFR β -특이적 길항제는 PDGFR β 매개 신호전달을 우선적으로 억제하는 생물학적 분자이다. 본 발명에 따라, PDGFR β -특이적 길항제는 PDGFR α 의 억제보다 적어도 3x, 또는 적어도 5x, 또는 적어도 10x 더 큰 PDGFR β 매개 신호전달의 억제를 매개한다. PDGFR β -특이적 억제를 결정하는 하나의 방법은 PDGFR β 를 발현하지만 PDGFR α 를 발현하지 않도록 공학처리된 세포의 PDGF-유도된 활성화의 억제를, PDGFR α 를 발현하지만 PDGFR β 를 발현하지 않도록 공학처리된 세포의 PDGF-유도된 활성화의 억제와 비교하는 것이다. 또다른 방법은 PDGFR β 를 우선적으로 활성화시키는 PDGF (예를 들어, PDGF-DD) 및 PDGFR α 를 우선적으로 활성화시키는 PDGF (예를 들어, PDGF-AA)를 사용하여 PDGF-유도된 활성화의 억제를 비교하는 것이다. 본 발명의 실시태양에서, PDGFR β -특이적 길항제는 PDGFR β 에 결합하는 항체이다. 본 발명의 또다른 실시태양에서, PDGFR β -특

이적 길항제는 소분자이다.

- [0035] VEGF 수용체를 표적화하는 항-혈관신생 방법은 항-종양 요법에 효과적인 것으로 점차 인정되고 있다. 예를 들어, 항-VEGF 항체는 특정 종양의 치료를 위해 승인되었다. 또한, 항-마우스 VEGFR2 항체는 무린 이중이식편 모델에서 VEGF/VEGFR2 상호작용을 차단하고, 혈관 내피세포의 VEGF-자극된 증식 및 생존을 억제하였다. 그러나, 항-VEGFR2 항체를 사용하는 치료가 마우스에 이식시킨 다양한 종양의 성장을 유의하게 지연시켰지만, 종양 퇴행은 드물었다. 또한, 장기적인 치료기간 동안 일부 종양이 VEGFR2 차단에 대해 덜 감수성으로 (또는 심지어 내성을 얻게) 될 수 있음을 제안하는 증거가 축적되고 있다.
- [0036] 본 발명에 따르면, PDGFR β -특이적 억제제는 VEGFR 길항제의 항-혈관신생 및 항종양 활성 모두를 유의하게 향상시킨다. 따라서, 본 발명은 PDGFR β -특이적 길항제 및 임의로 VEGFR 길항제를 투여함으로써, 혈관 신생을 억제하고 종양 성장을 감소 또는 억제하는 개선된 방법을 제공한다. 길항제는 수용체 티로신 키나제 (즉, PDGFR β 또는 VEGFR)에 의해 매개된 신호전달을 차단, 조정 또는 방해하는 분자이고, 항체, 소분자, 단백질, 폴리펩티드, 리간드 모방체 (mimetic), 안티센스 올리고데옥시뉴클레오티드, 안티센스 RNA, 작은 억제 RNA, 삼중나선 형성 핵산, 우성 음성 돌연변이체, 및 가용형 수용체 발현을 포함하나 이로 제한되지 않는다. 또한, PDGFR β -특이적 길항제 및 VEGFR 길항제는 비제한적으로 이중특이적 항체와 같은 단일 화합물로 결합될 수 있다.
- [0037] PDGFR β 및 VEGF 수용체는 동일한 패밀리의 키나제 삽입체 도메인 함유 수용체로 분류된다. 그러나, VEGF 수용체는 PDGFR α 및 PDGFR β 에서의 5개와는 달리, 그의 세포외 도메인에 7개의 면역글로불린-유사 루프 (loop)를 갖는다. 또한, VEGF 수용체는 보다 긴 키나제 삽입체를 갖는다. 인간 및 다른 포유동물의 PDGFR β 및 VEGFR의 아미노산 서열 및 이를 코딩하는 핵산 서열은 당업계에 잘 공지되어 있다. 인간 PDGFR β 서열의 비제한적인 예는 GenBank 기탁 번호 NM_002609로 제공된다. 뉴클레오티드 서열은 절단가능한 신호 서열을 갖는 단백질을 코딩한다. 성숙 단백질은 약 499개의 아미노산을 함유하는 세포외 부분, 23개 아미노산의 막횡단 구역, 및 약 552개 아미노산의 세포내 부분을 포함한다. VEGFR 서열의 비제한적인 예는 NM_002019 (인간 VEGFR1/Flt1), NM_002253 (인간 VEGFR2/KDR/Flk1), 및 NM_182925 (인간 VEGFR3/Flt4)를 포함한다. 각각의 이들 수용체의 세포외 도메인의 Ig 유사 도메인 구조, 막횡단 도메인의 위치, 및 티로신 키나제 도메인을 포함한 세포내 구역은 당업계에 잘 공지되어 있다.
- [0038] 본 발명의 항체는 PDGFR β 에 결합한다. 본원에서 사용될 때 "항체"는 면역글로불린 (Ig) 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학상 활성인 부분 또는 변이체를 나타낸다. 항체는 항원에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항원 결합 부위를 함유한다. 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 키메라, 및 인간화 항체를 포함하나 이로 제한되지 않는다. 면역학상 활성인 부분은 일가 및 이가 단편, 예를 들어 Fv, 단일쇄 Fv (scFv), 단일 가변 도메인 (sVD), Fab, Fab' 및 F(ab')₂ 단편을 포함한다. 면역학상 활성인 부분은 디아바디, 트리아바디 등과 같은 다가 형태 내로 도입될 수 있다. 항체는 파지 상에 디스플레이되는 항원 결합 단편, 및 항체 컨쥬게이트를 추가로 포함한다.
- [0039] "단리된 항체"는 (1) 성분들의 혼합물로부터 부분적으로, 실질적으로 또는 완전히 정제되었거나; (2) 그의 자연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리되고/되거나 회수되었거나; (3) 모노클로날이거나; (4) 동일한 종으로부터의 다른 단백질이 존재하지 않거나; (5) 상이한 종으로부터의 세포에 의해 발현되거나; (6) 자연에서 발생하지 않는 항체이다. 그의 자연 환경의 오염 성분은 항체에 대한 진단 또는 치료 용도를 저해하는 물질이고, 효소, 호르몬, 및 다른 단백질성 또는 비-단백질성 용질을 포함할 수 있다. 단리된 항체의 예는 PDGFR β 를 사용하여 친화도 정제된 항-PDGFR β 항체, 시험관 내에서 하이브리도마 또는 다른 세포주에 의해 제조된 항-PDGFR β 항체, 파지 라이브러리 및 같은 라이브러리로부터 단리된 인간 항-PDGFR β , 및 트랜스제닉 (transgenic) 마우스로부터 유도된 인간 항-PDGFR β 항체를 포함한다.
- [0040] 일반적으로, 자연 발생하는 항체 분자는 2개의 동일한 중쇄와 2개의 경쇄로 이루어진다. 각각의 경쇄는 보통 사슬간 디설피드 결합에 의해 중쇄에 공유 연결되고, 2개의 중쇄는 힌지 구역에서 다수의 디설피드 결합에 의해 서로 추가로 연결된다. 개개의 사슬은 유사한 크기 (약 110-125개 아미노산) 및 구조를 갖지만 기능이 상이한 도메인으로 폴딩된다. 경쇄는 하나의 가변 도메인 (V_L)과 하나의 불변 도메인 (C_L)을 포함한다. 중쇄는 하나의 가변 도메인 (V_H)과 항체의 클래스 또는 이소형에 따라 3 또는 4개의 불변 도메인 (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} 및 C_{H4})을 포함한다. 마우스 및 인간에서, 이소형은 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이고, IgA 및 IgG는 서브클래스 또는 아형으로 추가로 분류된다. V_L 및 V_H 도메인으로 이루어진 항체의 부분은 "Fv"로 명명하고, 항원-결합

부위를 구성한다. 단일쇄 Fv (scFv)는 하나의 폴리펩티드 사슬 상에 V_L 도메인 및 V_H 도메인을 함유하는 공학 처리된 단백질이고, 여기서 하나의 도메인의 N 말단과 다른 도메인의 C 말단은 가요성 링커에 의해 연결된다. "Fab"는 V_L - C_L (즉, 경쇄) 및 V_H - C_H1 (또한 "Fd"로서 명명함)으로 이루어지는 항체의 부분을 나타낸다.

[0041] 본 발명의 항체는 단일 가변 도메인 (sVD) 및 sVD를 포함하는 항원 결합 단백질을 포함한다. sVD 결합 부위는 항원 특이적 Fv 구역 (V_H 및 V_L 도메인을 모두 포함함)으로부터 얻을 수 있다. 종종, Fv 구역의 결합 친화도 및 특이성은 주로 가변 도메인 중의 하나에 의해 제시되는 것으로 보일 수 있다. 별법으로, scFv는 직접 얻을 수 있다. sVD의 직접 공급원은 V_H 도메인만을 함유하는 항체를 천연적으로 발현하는 포유동물 (예를 들어, 카멜리드)을 포함한다. 또한, 파지 디스플레이 라이브러리는 단일 가변 도메인만을 발현하도록 제조될 수 있다. 예를 들어, 인간 도메인 항체 파지 디스플레이 라이브러리는 도만티스 (Domantis, 영국 캠브리지)로부터 상업적으로 입수가능하다.

[0042] 항체 가변 도메인은 특히 항원 결합 부위의 위치에서 한 항체로부터 다음 항체까지 상당한 아미노산 서열 가변성을 보인다. "상보성 결정 구역" (CDR)으로 불리는 3개의 구역이 각각의 V_L 및 V_H 에서 발견된다. 항체의 CDR은 종종 "초가변 구역"으로 언급된다.

[0043] "Fc"는 쌍을 이룬 중쇄 불변 도메인을 포함하는 항체의 부분에 대한 명칭이다. IgG₁ 항체에서, 예를 들어, Fc는 C_H2 및 C_H3 도메인을 포함한다. IgA 또는 IgM 항체의 Fc는 추가로 C_H4 도메인을 포함한다. Fc는 Fc 수용체 결합, 보체-매개 세포독성 및 항체-의존 세포독성의 활성화와 연관된다. 다수의 IgG 유사 단백질의 복합체인 IgA 및 IgM과 같은 천연 항체의 경우에, 복합체 형성에는 Fc 불변 도메인을 필요로 한다.

[0044] 마지막으로, "힌지" 구역은 항체의 Fab 및 Fc 부분을 분리하여, 서로에 대한 및 Fc에 대한 Fab의 이동성을 제공하고, 2개의 중쇄의 공유 연결을 위한 다수의 디설피드 결합을 포함한다. 따라서, 본 발명의 항체는 항원에 특이적으로 결합하는 자연 발생하는 항체, 2가 단편, 예를 들어 (Fab')₂, 일가 단편, 예를 들어 Fab, 단일쇄 항체, 단일쇄 Fv (scFv), 단일 도메인 항체, 다가 단일쇄 항체, 디아바디, 트리아바디 등을 포함하나 이로 제한되지 않는다. 또한, 항체 단편은 본 발명의 항체의 가변 또는 초가변 구역의 아미노산 서열과 실질적으로 유사한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 실질적으로 동일한 아미노산 서열은 본원에서 문헌 [Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55:2444-2448 (1988)]에 따른 FASTA 탐색 방법에 의해 결정할 때 비교되는 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99% 상동성 또는 동일성을 갖는 서열로서 규정된다.

[0045] 본 발명은 "키메라" 항체를 포함한다. 상기 항체는 일반적으로 하나의 항체의 가변 도메인과 상이한 항체의 불변 도메인을 포함한다. 전형적으로, 항체에 대한 숙주 면역 반응을 최소화하고 항체 효과기 기능을 보유함으로써 항체 표적에 대한 숙주 반응을 향상시키기 위해서, 키메라 항체의 불변 도메인은 키메라 항체가 투여될 동일한 종으로부터 유래된다.

[0046] 본 발명은 또한 "인간화" 항체를 포함한다. 비-인간 기원의 하나 이상의 상보성 결정 구역 (CDR)을 포함하는 아미노산 서열이 인간 프레임워크 구역 (FR)에 그래프팅된 (grafted) 인간화 가변 도메인이 제조되었다 (예를 들어, 문헌 [Jones, P. T. et al., 1996, Nature 321, 522-25]; [Riechman, L. et al., 1988, Nature 332, 323-27]; 및 미국 특허 5,530,101 (Queen et al.) 참조). 인간화 구성체는 예를 들어 비-인간 공급원으로부터의 항원 결합 도메인이 인간의 치료를 위해 사용될 것이 요구되는 경우에, 유해한 면역원성 특성의 제거를 위해 특히 유용하다. 가변 도메인은 고도의 구조적 상동성을 갖고, 이는 CDR 및 FR에 대응하는 가변 도메인 내의 아미노산 잔기의 확인을 용이하게 한다 (예를 들어, 문헌 [Kabat, E.A., et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, Bethesda, MD] 참조). 따라서, 항원 결합에 직접 참여할 가능성이 있는 아미노산이 쉽게 확인된다. 또한, 그래프팅된 CDR을 포함하는 인간화 결합 도메인의 항원에 대한 친화도를 보존하거나 향상시키는 방법이 개발되었다. 하나의 방법은 CDR 구역의 입체형태에 영향을 주는 외래 프레임워크 잔기를 수용체 가변 도메인에 포함시키는 것이다. 두번째 방법은 외래 CDR을 외래 가변 구역에 가장 가까운 상동성을 갖는 인간 가변 도메인 상에 그래프팅시키는 것이다 (Queen, C. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-33). CDR은 목적하는 CDR 서열을 포함하는 겹치는 프라이머를 사용하여 개별 FR 서열을 먼저 증폭시키고, 생성되는 유전자 세그먼트를 후속 증폭 반응에서 연결함으로써 상이한 FR 상으로 가장 쉽게 그래프팅된다. 상이한 가변 도메인 상으로 CDR의 그래프팅은 아미노산 서열 내의 CDR에 인접하거나 CDR의 입체형태에 영향을 주는 폴딩된 가변 도메인 구조체 내의 CDR에 대해 채워진 아미노산 잔기의 치환을 추가로 수반할

수 있다. 따라서, 본 발명의 인간화 가변 도메인은 하나 이상의 비-인간 CDR을 포함하는 인간 도메인뿐만 아니라 결합 특성을 보존 또는 향상시키기 위해 추가의 치환 또는 교체가 이루어진 그러한 도메인을 포함한다.

[0047] 본 발명의 항체는 또한 항체가 면역계에 자신으로 보이도록 하기 위해 표면-노출 잔기를 교체함으로써 덜 면역원성으로 된 가변 도메인을 사용할 수 있다 (Padlan, E.A., 1991, Mol. Immunol. 28, 489-98). 항체는 친화도 손실 없이 상기 과정에 의해 변형될 수 있다 (Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 969-973). 항원 결합 부위 부근에서 아미노산 잔기의 내부 충전이 변하지 않고 유지되기 때문에, 친화도가 보존된다. 면역원성 감소를 위한 본 발명에 따른 표면-노출 잔기의 치환은 결합 특성에 영향을 미치는 CDR 잔기 또는 인접한 잔기의 치환을 의미하지 않는다.

[0048] 본질적으로 인간인 가변 도메인을 사용하는 것이 종종 바람직하다. 인간 항체는 인간 V_H 및 V_L 프레임워크 구역 (FW)뿐만 아니라 인간 상보성 결정 구역 (CDR)을 포함한다. 바람직하게는, 전체 V_H 및 V_L 가변 도메인은 인간 도메인이거나 인간 서열로부터 유래한다. 항체는 예를 들어 인간 하이브리도마를 생성시킴으로써 인간 세포로부터 직접 얻을 수 있다.

[0049] 별법으로, 인간 항체는 재정렬되지 않은 인간 Ig 유전자 세그먼트가 도입되고, 내인성 마우스 Ig 유전자가 불활성화된 트랜스제닉 동물로부터 얻을 수 있다 (문헌 [Brueggemann and Taussig, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8, 455-58]에서 검토됨). 바람직한 트랜스제닉 동물은 크기가 1 Mb를 초과하는 매우 큰 인접한 Ig 유전자 단편을 함유하지만 (Mendez et al., 1997, Nature Genet. 15, 146-56), 중정도 친화도의 인간 Mab는 보다 작은 유전자 로커스를 함유하는 트랜스제닉 동물로부터 생성될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Wagner et al., 1994, Eur. J. Immunol. 42, 2672-81]; [Green et al., 1994, Nature Genet. 7, 13-21] 참조).

[0050] 인간 항체는 또한 항체 V_H 및/또는 V_L 도메인의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 가변 도메인 라이브러리는 인간 게놈 서열로부터, 또는 재정렬된 가변 구역 유전자를 생산적으로 발현하는 말초혈 림프구로부터 얻을 수 있다. 또한, 인간 유전자 라이브러리는 합성될 수 있다. 하나의 실시태양에서, 랜덤 또는 부분 랜덤 서열을 포함하도록 합성된 하나 이상의 CDR을 갖는 인간 프레임워크 구역을 포함하는 가변 도메인 라이브러리가 생성될 수 있다. 예를 들어, 멤버가 인간 V_H 유전자 세그먼트 및 CDR3H 구역에 대한 합성 서열 (즉, 합성 D_H-J_H 유전자 세그먼트)에 의해 코딩되는 인간 V_H 가변 도메인 라이브러리가 생성될 수 있다. 마찬가지로, 인간 V_L 가변 도메인은 인간 V_L 유전자 세그먼트 및 CDR3L 구역에 대한 합성 서열 (즉, 합성 J_L 유전자 세그먼트)에 의해 코딩될 수 있다. 또다른 실시태양에서, 공지의 인간 항체 서열 또는 인간 서열의 하위 군으로부터 유래된 컨센서스 서열을 갖는 점에서 인간 프레임워크는 합성된 것일 수 있다. 또다른 별법에서, 하나 이상의 CDR은 재정렬된 가변 도메인을 발현하는 인간 림프구로부터의 증폭에 의해 얻어진 후, 특정 인간 프레임워크 내로 재조합된다.

[0051] 가변 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해, 인간 중쇄 및 경쇄 가변 도메인의 조합물이 필라멘트성 파지의 표면 상에 디스플레이되는 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하는 것이 일반적이다 (예를 들어, 문헌 [McCafferty et al., 1990, Nature 348, 552-54]; [Aujame et al., 1997, Human Antibodies 8, 155-68] 참조). 가변 도메인의 조합물은 전형적으로 Fab 또는 scFv의 형태로 필라멘트성 파지 상에 디스플레이된다. 라이브러리는 요구되는 항원 결합 특성을 갖는 가변 도메인의 조합을 보유하는 파지에 대해 스크리닝된다. 바람직한 단일 도메인 및 가변 도메인 조합물은 선택된 항원에 대해 높은 친화도를 나타내고, 다른 관련 항원에 대해 교차-반응성이 거의 없다. 항체 단편의 매우 큰 레파토리를 스크리닝함으로써 (예를 들어, [Griffiths et al., 1994, EMBO J. 13, 3245-60]), 우수한 다양성의 고친화도 결합 도메인이 단리되고, 많은 것이 요구되는 항원에 대한 나노몰 미만의 친화도를 갖는 것으로 예상된다.

[0052] 생리학적 면역 반응에서, 발현된 항체 유전자의 돌연변이 및 선택을 통해 그의 표적 항원에 대한 높은 친화도를 갖는 항체를 생산할 수 있다. 본 발명의 항체 내에 포함된 V_H 및 V_L 도메인은 친화도 및/또는 특이성을 변형시키기 위해 유사하게 시험관 내 또는 생체 내 돌연변이 및 스크리닝 절차에 적용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 결합 도메인은 직접 돌연변이, 친화도 성숙의 방법, 또는 사슬 서플링에 의해 CDR 및/또는 FW 구역을 돌연변이시킴으로써 결합 특성이 개선된 것을 포함한다. 단일 도메인 항체의 결합의 주된 결정자인 아미노산 잔기는 카바트 (Kabat)에 의해 규정된 CDR 내에 존재할 수 있지만 다른 잔기를 또한 포함할 수 있는 것으로 이해된다. sVD의 경우, 항원 결합에 중요한 잔기는 잠재적으로 V_H-V_L 이중이량체의 계면에 위치할 수도 있는 아미노산을 또한 포함할 수 있다. 전형적으로, 파지 디스플레이를 사용하여 요구되는 결합 특성을 갖는 돌연변이체를 확인하기 위해 그러한 돌연변이체를 스크리닝한다 (예를 들어, 문헌 [Yang et al., J. Mol Biol.,

254: 392-403 (1995)] 참조). 돌연변이는 다양한 방식으로 유도할 수 있다. 하나의 방법은 그렇지 않으면 동일한 서열의 집단 내에서, 20개의 모든 아미노산 또는 그의 하위 세트가 특정 위치에서 발견되도록 개별 잔기 또는 잔기들의 조합물을 랜덤화하는 것이다. 별법으로, 돌연변이는 오류 유발 (error prone) PCR 방법에 의해 CDR 잔기의 범위에 걸쳐 유도될 수 있다 (예를 들어, [Hawkins et al., J. Mol. Biol, 226: 889-896 (1992)] 참조). 예를 들어, 중쇄 및 경쇄 가변 구역 유전자를 함유하는 파지 디스플레이 벡터를 이. 콜라이 (*E. coli*)의 돌연변이체 균주 내에서 증식시킬 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Low et al., J. Mol. Biol, 250: 359-368 (1996)] 참조). 이들 돌연변이 유발 방법은 당업자에게 공지된 많은 방법의 예시이다.

[0053] 본 발명은 또한 비-면역글로불린 스캐폴드 (scaffold)로부터 공학처리된 항원 결합 단백질을 포함한다. 예를 들어, 에스. 아우레우스 (*S. aureus*) 단백질 A의 면역글로불린-결합 도메인으로부터 유래되는 애피바디 (affibody)는 디설피드 결합을 갖지 않고, 가역적인 폴딩을 보인다. 다른 예는 피브로넥틴이고, 이는 항체-유사 구조를 갖고, CDR-유사 루프를 보인다. 항체와 반대로, 피브로넥틴 도메인 구조는 디설피드 결합에 의존하지 않고, 게다가 높은 열역학적 안정성을 보인다. 결합 부위는 예를 들어, 코돈을 특정한 위치에서 다양화시키고, 목적하는 항원에 대한 결합에 대해 스크리닝함으로써 그러한 스캐폴드 내로 공학처리될 수 있다. 코돈은 루프, 평평한 표면, 캐비티 (cavity), 또는 상기 위치들의 조합 내에 랜덤화될 수 있다. 또한, 펩티드 서열은 대체로 루프 내에 삽입될 수 있다. 생성되는 라이브러리의 표적-결합 변이체는 당업계에 공지되고 파지 디스플레이, 리보솜 디스플레이, 세균 또는 효모 표면 디스플레이 등에 제한되지 않는 스크리닝 기술의 선택을 이용하여 단리할 수 있다.

[0054] 치료를 목적으로 하는 항원 결합 단백질에 대해, 잠재적인 면역원성을 최소화하기 위해 다양한 방법이 이용 가능하다. 인간 스캐폴드가 사용될 수 있고, 면역원성은 예를 들어, PEG화 또는 T-세포 에피토프 공학처리에 의해 (즉, T-세포 반응성 서열을 최소화함으로써) 최소화될 수 있다.

[0055] 비-면역글로불린 스캐폴드로부터의 항원 결합 단백질은 종종 면역글로불린형 단백질보다 더 경제적으로 생산될 수 있다. 예를 들어, 디설피드 결합 또는 유리 시스테인의 부재는 세균 세포질의 환원 환경 내에서 기능적 분자의 발현을 허용하고, 이는 대체로 주변세포질 발현보다 더 높은 수율을 제공하고, 시험관 내 재폴딩보다 더 간편하다. 문헌 [Binz, H.K. et al., Nat. Biotech. 23: 1257-68, 2005]에서는 다양한 그러한 항원-특이적 결합 단백질 및 그의 개발을 위한 기술을 개시한다.

[0056] 상기한 바와 같이, 이중특이적 항체가 병용 투여에 대한 대안으로서 제공될 수 있다. 다양한 바람직한 특성을 포함하도록 고안된 다양한 이중특이적 항체가 존재한다. 예를 들어, 이중특이적 디아바디는 최소 크기를 갖는다. 4개의 항원 결합 부위 (각각의 결합 특이성에 대해 2개)를 갖는 이중특이적 항체는 상응하는 천연 항체와 유사한 각각의 표적에 대한 결합력을 갖는다. 특정 이중특이적 항체는 Fc 구역을 포함하고, 따라서 천연 항체의 효과기 기능 (예를 들어, 보체 의존 세포독성 (CDC) 및 항체 의존 세포독성 (ADCC))을 보유한다. WO 01/90192에서는 IgG-유사 4가 항체를 설명한다. WO2006/020258에서는 2개의 디아바디를 포함하고 효과기 기능을 보유하는 4가 항체를 설명한다. 이중특이적 항체의 항원 결합 부위를 위해 다양한 항원-결합 항체 단편이 사용될 수 있다. 이들은 Fv, scFv, 및 sVd를 포함하나 이로 제한되지 않는다.

[0057] PDGFR β -매개된 신호전달을 차단하는 다른 수단은 PDGFR β -특이적 소분자 억제제를 통한 것이다. 소분자는 작은 유기 화합물, 예를 들어 헤테로사이클, 펩티드, 당류, 스테로이드 등을 나타낸다. 소분자 조정제는 바람직하게는 분자량이 약 2000 달톤 미만, 바람직하게는 약 1000 달톤 미만, 보다 바람직하게는 약 500 달톤 미만이다. 화합물은 효능, 안정성, 약제학적 적합성 등을 향상시키도록 변형될 수 있다. 소분자 억제제는 ATP 결합 도메인, 기질 결합 도메인, 또는 수용체 티로신 키나제의 키나제 도메인을 차단하는 소분자를 포함하나 이로 제한되지 않는다. 또다른 실시태양에서, 소분자 억제제는 PDGFR β 의 리간드 결합 도메인에 결합하고, PDGFR β 리간드에 의한 수용체 활성화를 차단한다. 소분자 라이브러리는 고효율 생화학적, 효소적, 또는 세포 기반 분석을 이용하여 억제 활성화에 대해 스크리닝될 수 있다. 분석은 PDGFR α 가 아니라 PDGFR β 를 억제하는 시험 화합물의 능력을 검출하도록 개발될 수 있다.

[0058] 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드, 안티센스 RNA 및 소분자 억제성 RNA (siRNA)는 mRNA의 표적화된 분해를 제공하여, 단백질의 번역을 방지한다. 따라서, PDGFR β 의 발현이 억제될 수 있다. 유전자 발현을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 능력은 지금으로부터 25년도 더 오래된 시기에 발견되었다 (Zamecnik and Stephenson, Proc. Natl. Acad. Sci USA. 75:280-284 (1978)). 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 mRNA 및 프리 (pre)-mRNA와 염기쌍을 형성하고, 잠재적으로 스플라이싱 (splicing), 폴리아데닐화, 유출, 안정성 및 단백질 번역을 포함한 몇몇 단계의 RNA 프로세싱 및 메시지 번역을 저해할 수 있다 (Sazani and Kole, J. Clin. Invest. 112:481-486 (2003)). 그러나, 2개의 가장 강력하고 널리 사용되는 안티센스 방법은 RNaseH를 통한

mRNA 또는 프리-mRNA의 분해, 및 이상 스플라이스 연결부를 표적화하는 것을 통한 스플라이싱의 변경이다. RNaseH는 DNA/RNA 이중이중체를 인식하고, RNA를 DNA 올리고뉴클레오타이드의 5' 및 3' 사이의 대략 중간에서 절단한다.

[0059] 선천적인 RNA-매개 메카니즘은 mRNA 안정성, 메시지 번역, 및 염색질 구조화 (organization)를 조절할 수 있다 (Mello and Conte, Nature. 431:338-342, 2004). 또한, 외부에서 도입된 긴 이중가닥 RNA (dsRNA)는 다양한 하등 유기체에서 유전자 침묵을 위한 효과적인 도구이다. 그러나, 포유동물에서, 긴 dsRNA는 바이러스 감염 및 인터페론 생산의 효과에 관련되는 고도의 독성 반응을 나타낸다 (Williams, Biochem. Soc. Trans. 25:509-513, 1997). 이를 피하기 위해, 엘바셔 (Elbashir)와 동료들 (Elbashir et al., Nature 411:494-498, 2001)은 세포 내로 도입 시에 표적화된 mRNA를 선택적으로 분해시키는, 각각의 가닥 상에 5' 포스페이트 및 2 염기의 3' 오버행 (overhang)을 갖는 19-mer 이중체로 이루어진 siRNA의 사용을 시작하였다.

[0060] 포유동물에서 간접 dsRNA의 작용은 대체로 2개의 효소적 단계를 수반한다. 먼저, Dicer (RNase III형 효소)가 dsRNA를 21-23-mer siRNA 세그먼트로 절단한다. 이어서, RNA-유도된 침묵 복합체 (RISC)가 RNA 이중체를 풀고, 하나의 가닥을 동족 (cognate) mRNA 내의 상보성 구역과 짝을 형성시키고, siRNA 가닥의 5' 단부의 상류 10개의 뉴클레오타이드 부위에서 절단을 시작한다 (Harmon, Nature. 418:244-251, 2002). 19-22 mer 범위의 짧은 화학적으로 합성된 siRNA는 Dicer 단계를 필요로 하지 않고, RISC 방식에 직접 들어갈 수 있다. RNA 이중체의 각 가닥은 잠재적으로 RISC 복합체 상으로 로딩될 수 있지만, 올리고뉴클레오타이드의 조성은 가닥의 선택에 영향을 미칠 수 있음을 알아야 한다. 따라서, 특정 mRNA 표적의 선택적인 분해를 위해, 이중체는 그의 5' 단부에서 비교적 약한 염기쌍을 형성함으로써 안티센스 가닥 성분의 로딩을 우선적으로 실시해야 한다 (Khvorova, Cell. 115:209-216, 2003). 외인성 siRNA는 합성된 올리고뉴클레오타이드로서 제공되거나, 플라스미드 또는 바이러스 벡터로부터 발현될 수 있다 (Paddison and Hannon, Curr. Opin. Mol. Ther. 5:217-224, 2003). 후자의 경우에, 전구체 분자는 대체로 4-8개 뉴클레오타이드의 루프와 19-30개 뉴클레오타이드의 기둥을 함유하는 짧은 헤어핀 (hairpin) RNA (shRNA)로서 발현되고; 이어서 이들은 Dicer에 의해 절단되어 기능적 siRNA를 형성한다.

[0061] PDGFR β -매개된 신호전달을 억제하는 다른 수단은 수용체에 결합하지만 활성화시키지는 않는 PDGF 모방체, 및 PDGFR β 수준 또는 활성을 감소시키는 유전자 또는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 삼중 나선 억제제 및 우성 음성 PDGFR β 돌연변이체의 발현을 포함하나 이로 제한되지 않는다.

[0062] 본 발명에 따라 사용될 RTK 길항제 (즉, PDGFR β -특이적 길항제, VEGFR 길항제)는 다음의 특성 중 하나 이상을 보인다:

[0063] 1) 길항제는 RTK (즉, PDGFR β , VEGFR)의 외부 도메인에 결합하고, 리간드 결합을 억제한다. 억제는 예를 들어, 정제형 또는 막 결합형 수용체를 사용하는 직접 결합 분석에 의해 결정할 수 있다.

[0064] 2) 길항제는 수용체를 중화시킨다. 외부의 세포의 도메인에 대한 리간드의 결합 (예를 들어, PDGFR β 에 대한 PDGF-BB 또는 PDGF-DD; VEGFR에 대한 VEGF 또는 PlGF)은 수용체 및 하류 신호전달 분자, 예를 들어 MAPK, Akt 및 IRS-I의 자가인산화를 자극한다. 수용체의 중화는 정상적으로 신호전달과 연관되는 하나 이상의 이들 활성의 억제, 감소, 불활성화 및/또는 붕괴를 포함한다. 중화는 예를 들어 조직, 배양된 세포, 또는 정제된 세포 성분을 사용하여 생체 내에서, 생체 외에서 또는 시험관 내에서 결정될 수 있다. 따라서, PDGFR β 및/또는 VEGFR을 중화시키는 것은 성장 (증식 및 분화), 혈관 신생 (혈관 동원, 침습, 및 전이), 및 세포 이동 및 전이 (세포 부착 및 침습성)의 억제, 감소, 불활성화 및/또는 붕괴를 포함한 다양한 효과를 갖는다.

[0065] 수용체 중화의 하나의 척도는 수용체의 티로신 키나제 활성의 억제이다. 티로신 키나제 억제는 잘 공지된 방법을 이용하여, 예를 들어, 재조합 키나제 수용체의 자가인산화 수준, 및/또는 천연 또는 합성 기질의 인산화를 측정함으로써 결정할 수 있다. 따라서, 인산화 분석은 본 발명의 문맥에서 중화 항체를 결정하는데 있어서 유용하다. 인산화는 예를 들어, ELISA 분석에서 또는 웨스턴 블롯 상에서 포스포티로신에 특이적인 항체를 사용하여 검출할 수 있다. 티로신 키나제 활성에 대한 일부 분석은 문헌 ([Panek et al., J Pharmacol Exp Ther. 283: 1433-44 (1997)] 및 [Batley et al., Life Sci. 62: 143-50 (1998)])에 기재되어 있다. 본 발명의 항체는 리간드에 반응하는 세포에서 적어도 약 30%, 적어도 약 50%, 적어도 약 75%, 바람직하게는 적어도 약 85%, 보다 바람직하게는 적어도 약 90%로 PDGFR β 의 티로신 인산화의 감소를 일으킨다.

[0066] 수용체 중화의 다른 척도는 수용체 또는 다른 신호전달 성분의 하류 기질의 인산화의 억제이다. 따라서, MAPK, Akt, IRS-I 및 다른 세포 성분의 인산화 수준을 측정할 수 있다. 인산화의 감소는 적어도 약 40%이고, 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 80%일 수 있다.

- [0067] 또한, 단백질 발현의 검출을 위한 방법을 사용하여 수용체 중화를 결정할 수 있고, 여기서 측정되는 단백질은 수용체 티로신 키나제 활성화에 의해 조절된다. 이들 방법은 단백질 발현의 검출을 위한 면역조직화학 (IHC), 유전자 증폭의 검출을 위한 형광 계내 혼성화 (FISH), 경쟁적 방사성 리간드 결합 분석, 고체 매트릭스 블로팅 기술, 예를 들어 노던 (Northern) 및 서던 (Southern) 블롯, 역전사효소 중합효소 연쇄 반응 (RT-PCR) 및 ELISA를 포함한다 (예를 들어, 문헌 ([Grandis et al., Cancer, 78:1284-92 (1996)]; [Shimizu et al., Japan J Cancer Res, 85:567-71 (1994)]; [Sauter et al., Am J Path., 148:1047-53 (1996)]; [Collins, Glia 15:289-96 (1995)]; [Radinsky et al., Clin Cancer Res. 1:19-31 (1995)]; [Petrides et al., Cancer Res. 50:3934-39 (1990)]; [Hoffmann et al., Anticancer Res 17:4419-26 (1997)]; [Wikstrand et al., Cancer Res. 55:3140-48 (1995)]) 참조). 수용체 중화를 결정하기 위해 생체의 분석을 또한 이용할 수 있다. 예를 들어, 수용체 티로신 키나제 억제제는 억제제의 존재 및 부재 하에 수용체 리간드로 자극된 세포주를 사용하는 분열촉진 (mitogenic) 분석에 의해 관찰할 수 있다. 다른 방법은 PDGFR β 를 발현하도록 형질감염된 RTK-발현 종양 세포 또는 세포주의 성장의 억제에 대해 시험하는 것을 포함한다. 억제는 또한 종양 모델, 예를 들어, 마우스에 주사된 인간 종양 세포를 사용하여 관찰할 수 있다.
- [0068] 본 발명의 길항제는 임의의 특정 수용체 중화 메커니즘에 의해 제한되지 않는다. 본 발명의 길항제는 세포 표면 수용체에 외부에 결합하고, 리간드의 결합, 및 수용체-회합된 티로신 키나제를 통해 매개된 후속 신호전달을 차단하고, PDGFR β 및 신호전달 캐스케이드에서 다른 하류 단백질의 인산화를 방지할 수 있다.
- [0069] 3) 길항제는 수용체를 하향 조절한다. 세포의 표면 상에 존재하는 RTK의 양은 수용체 단백질 생산, 내재화, 및 분해에 따라 결정된다. 세포의 표면 상에 존재하는 수용체의 양은 수용체 또는 수용체에 결합된 분자의 내재화를 검출함으로써 간접적으로 측정할 수 있다. 예를 들어, 수용체 내재화는 세포를 수용체-특이적 표지된 항체에 접촉시킴으로써 측정할 수 있다. 이어서, 막-결합된 항체를 떼어내고, 수집하고, 계수한다. 내재화된 항체는 세포를 용해시키고, 용해물 내의 표지를 검출함으로써 결정한다.
- [0070] 또다른 방법은 예를 들어, RTK의 표면 발현에 대해 염색된 세포의 형광-활성화된 세포 분류 분석에 의해, 항-RTK 항체 또는 다른 물질로 처리한 후 세포 상에 존재하는 수용체의 양을 직접 측정하는 것이다. 염색된 세포를 37°C에서 인큐베이션하고, 형광 강도를 시간 경과에 따라 측정한다. 대조군으로서, 염색된 집단의 일부를 4°C (수용체 내재화가 중지되는 조건)에서 인큐베이션할 수 있다.
- [0071] 세포 표면 RTK는 PDGFR β 에 특이적이고 시험되는 항체의 결합을 차단하거나 결합과 경쟁하지 않는 상이한 항체를 사용하여 검출하고 측정할 수 있다. 특정 실시태양에서, 세포 표면 RTK의 감소는 RTK 길항제를 사용한 처리에 반응하여 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 90%이다. 유의한 감소는 대체로 4 시간 정도의 적은 시간 내에 관찰될 수 있다.
- [0072] 하향-조절의 다른 척도는 세포 내에 존재하는 총 수용체 단백질의 감소이고, 내부 수용체의 분해를 반영한다. 따라서, 본 발명의 항체로 세포 (특히 암 세포)를 처리하면 총 세포성 RTK를 감소시킨다. 특정 실시태양에서, 세포 표면 RTK의 감소는 RTK 길항제를 사용한 처리에 반응하여 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 75%, 또는 적어도 약 90%이다.
- [0073] 항체 특이성은 항원의 특정 에피토프에 대한 항체의 선택적인 인식을 나타낸다. 예를 들어, 천연 항체는 단일특이적이다. 이중특이적 항체 (BsAb)는 2개의 상이한 항원-결합 특이성 또는 부위를 갖는 항체이다. 항원-결합 단백질이 하나 초과 특이성을 갖는 경우에, 인식된 에피토프는 단일 항원 또는 하나 초과 항원과 연관될 수 있다.
- [0074] 바람직하게는, 본 발명의 항체는 수용체에 적어도 천연 리간드가 그 수용체에 결합하는 것만큼 강하게 결합한다. 친화도 (항원과 항체의 해리에 대한 평형 상수 (K_d)로 표현됨)는 항원성 결정자와 항체 결합 부위 사이의 결합 강도를 측정한다. 결합력은 항체와 그의 항원 사이의 결합의 강도의 측정치이다. 결합력은 에피토프와 항체 상의 그의 항원 결합 부위 사이의 친화도, 및 항체의 결합가 모두에 관련된다. 결합가는 면역글로불린이 특정 에피토프에 대해 갖는 항원 결합 부위의 수를 나타낸다. 예를 들어, 일가 항체는 특정 에피토프에 대해 하나의 결합 부위를 갖는다. 항원성 결정자, 또는 에피토프는 제시된 항체가 결합하는 항원 상의 부위이다. 전형적인 K 값은 10^5 내지 10^7 리터/몰이다. 10^4 리터/몰 미만의 임의의 K는 비특이적인 결합을 나타내는 것으로 간주된다. K의 역수는 K_d 로서 명명된다. (K_d 는 또한 해리 상수로서 언급될 수 있다). K_d 의 값이 더 작을수록, 항원성 결정자와 항체 결합 부위 사이의 결합 강도는 더 강하다.
- [0075] 본 발명의 항체는 PDGFR β 에 특이적으로 결합하고 수용체 매개된 신호전달을 감소 또는 억제하는 임의의 항체

를 포함한다. 특정 실시태양에서, 항체는 그의 각각의 수용체에 약 10^{-8} M^{-1} 미만, 또는 약 10^{-9} M^{-1} 미만, 또는 약 $3 \times 10^{-10} \text{ M}^{-1}$ 미만의 K_d 로 결합한다. 특정 PDGFR β -특이적 항체의 비제한적인 예는 본원에 개시되고/되거나 예시된다. 본 발명의 2개의 특정 항체, 즉 1B3 및 2C5의 핵산 및 아미노산 서열을 표 1에 제시한다.

[0076] 바람직한 실시태양에서, 항체의 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 모든 상보성 결정 구역 (CDR)은 1B3의 임의의 하나의 CDR 중에서 선택된 서열을 갖는다. 별도로 바람직한 실시태양에서, 항체의 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 모든 상보성 결정 구역 (CDR)은 2C5의 임의의 하나의 CDR로 이루어진 군 중에서 선택된 서열을 갖는다.

[0077] 다른 바람직한 실시태양에서, 본 발명의 항체는 1B3 또는 2C5의 중쇄 가변 구역에 실질적으로 동일한 중쇄 가변 구역 서열, 및/또는 1B3 또는 2C5의 경쇄 가변 구역에 실질적으로 동일한 경쇄 가변 구역 서열을 갖는다. "실질적으로 동일한"은 아미노산 서열이 참조 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 99% 동일한 것을 의미한다.

[0078] 본 발명의 실시태양에서, PDGFR β -특이적 항체는 서열 18의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열 26의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 본 발명의 또다른 실시태양에서, PDGFR β -특이적 항체는 서열 2의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 도메인, 및 서열 10의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 본 발명의 PDGFR β -특이적 항체는 상기 언급된 항체와 경쟁하는 (즉, 동일하거나 겹치는 에피토프에 결합하는) 것을 추가로 포함한다.

[0079] 본 발명은 또한 상기 언급된 항체의 가변 또는 초가변 구역의 아미노산 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함한다. 실질적으로 동일한 아미노산 서열은 본원에서 문헌 [Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 55:2444-2448 (1988)]에 따라 FASTA 탐색 방법에 의해 결정할 때, 다른 아미노산 서열과 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90%, 또는 적어도 약 95%의 상동성 또는 동일성을 갖는 서열로서 규정된다. 특히 생체 내 돌연변이 및 선택으로부터 생성되는 것으로 관찰되는 프레임워크 구역 내의 빈번한 돌연변이에 비추어, 프레임워크 구역 내에서 다양한 치환이 이루어질 수 있음이 예상될 것이다. 그러나, 특정 CDR 위치에서 돌연변이는 또한 허용되지 않을 것임이 또한 예상된다. 예를 들어, 모든 CDR 아미노산이 항원과 직접 접촉하지는 않는다. 비-접촉 CDR 위치에서 아미노산 변화, 특히 보존적 변화는 결합을 모두 폐지하기보다는 잠재적으로 보다 우수하게 결합 친화도에 영향을 미치는 것으로 예상된다. 현재의 기술에서 당업자는 계획에 의해 또는 무작위로 서열 변이를 쉽게 이루고 그 결과를 시험할 수 있다. 보존적 아미노산 치환은 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 또는 그의 단편의 하나 또는 수개의 아미노산을 변화시킴에 의한 아미노산 조성의 변화로서 규정된다. 치환은 치환이 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질 특성 (예를 들어, 전하, 등전점, 친화도, 결합력, 입체형태, 용해도) 또는 활성을 실질적으로 변경시키지 않도록 일반적으로 유사한 특성 (예를 들어, 산성, 염기성, 방향성, 크기, 양전하 또는 음전하의, 극성, 비극성)을 갖는 아미노산의 치환이다. 그러한 보존적 아미노산 치환을 위해 수행될 수 있는 대표적인 치환은 다음과 같은 아미노산의 군 중에서 이루어질 수 있다:

[0080] 글라이신 (G), 알라닌 (A), 발린 (V), 류신 (L) 및 이소류신 (I);

[0081] 아스파르트산 (D) 및 글루탐산 (E);

[0082] 알라닌 (A), 세린 (S) 및 트레오닌 (T);

[0083] 히스티딘 (H), 라이신 (K) 및 아르기닌 (R);

[0084] 아스파라긴 (N) 및 글루타민 (Q);

[0085] 페닐알라닌 (F), 티로신 (Y) 및 트립토판 (W)

[0086] 본 발명에 따라, PDGFR β -특이적 항체는 단독으로 또는 항-VEGFR 항체와 함께 투여될 수 있거나, PDGFR β 및 VEGFR 모두에 결합하는 이중특이적 항체일 수 있다. VEGFR-특이적 항체의 예를 또한 제공한다. PDGFR β -특이적 항체에 관하여 상기 논의한 바와 같이, 개시된 VEGFR 항체는 비제한적인 예이다.

[0087] 본 발명은 또한 PDGFR β 의 특정 도메인에 결합하는 항체를 제공한다. PDGFR β 의 도메인 1과 2에 결합하는 항체, 도메인 1에 결합하는 항체, 및 도메인 2에 결합하는 항체가 본 발명의 범위에 포함된다. 2C5는 PDGFR β 의 도메인 2, 및 도메인 1과 2에 결합하는 항체의 예이다.

[0088] 본 발명의 항체의 각각의 가변 도메인은 완전한 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인일 수 있거나, 자연 발생하는 도메인의 기능상 동등물 또는 돌연변이체 또는 유도체, 또는 예를 들어, WO 93/11236 (메디칼 리서

치 카운설 (Medical Research Council)/Griffiths et al.)에 기재된 것과 같은 기술을 이용하여 시험관 내에서 제작된 합성 도메인일 수 있다. 돌연변이가 항원-결합 활성을 보유하는 단백질 또는 단백질 단편을 제공하도록, 예를 들어 아미노산 치환, 결실, 부가, 아미노 말단 절단 (truncation) 및 카르복시 말단 절단을 포함하는 항체 가변 도메인에 상응하는 도메인을 포함시키는 것이 가능하다. 중요한 특성부여 특징은 상보성 가변 도메인과 회합하여 항원 결합 부위를 형성하는 각각의 가변 도메인의 능력이다.

[0089] 본 발명의 항체 및 단편은 추가의 아미노산 잔기에 연결 또는 융합될 수 있다. 그러한 아미노산 잔기는 아마도 단리를 용이하게 하는 펩티드 태그 (tag)일 수 있다. 특이적 장기 또는 조직에 대한 항체의 귀환 (homing)을 위한 다른 아미노산 잔기가 또한 고려된다.

[0090] 본 발명의 또다른 측면에서, 항체 또는 항체 단편은 특히 항체가 내재화될 때 항종양제 또는 검출가능한 신호 생성제에 화학적으로 또는 생합성적으로 연결된다. 항체에 연결된 항종양제는 항체가 결합된 세포의 환경에서 또는 항체가 결합된 종양을 파괴 또는 손상시키는 임의의 물질을 포함한다. 예를 들어, 항종양제는 독성제, 예를 들어 화학치료제 또는 방사성 동위원소이다. 적합한 화학치료제는 당업자에게 공지되어 있고, 안트라사이클린 (예를 들어, 다우노마이신 및 독소루비신), 메토틱렉세이트, 빈데신, 네오크지노스타틴, 시스-백금, 클로람부실, 시토신 아라비노시드, 5-플루오로우리딘, 멜팔란, 리신 및 칼리케아미신을 포함한다. 화학치료제는 종래의 방법을 사용하여 항체에 컨쥬게이팅된다 (예를 들어, 문헌 [Hermentin and Seiler, Behring Inst. Mitt. 52:197-215(1988)] 참조).

[0091] 검출가능한 신호 생성제는 진단 목적을 위해 생체 내에서 및 시험관 내에서 유용하다. 신호 생성제는 외부 수단, 대체로 전자기 방사선의 측정에 의해 검출가능한 측정가능 신호를 생성한다. 대체로, 신호 생성제는 효소 또는 발색단이거나, 형광, 인광 또는 화학발광에 의해 광을 방출한다. 발색단은 자외선 또는 가시광 구역에서 광을 흡수하는 염료를 포함하고, 효소 촉매된 반응의 기질 또는 분해 생성물일 수 있다.

[0092] 본 발명은 표적 또는 리포터 모이어티 (moiety)가 연결되는 항체를 추가로 고려한다. 표적 모이어티는 결합 쌍의 제1 멤버이다. 항종양제는 예를 들어 그러한 쌍의 제2 멤버에 컨쥬게이팅되어, 항원-결합 단백질이 결합되는 부위로 유도된다. 그러한 결합쌍의 통상적인 예는 아비딘과 비오틴이다. 바람직한 실시태양에서, 비오틴은 본 발명의 항원-결합 단백질에 컨쥬게이팅되어, 아비딘 또는 스트렙타비딘에 컨쥬게이팅된 항종양제 또는 다른 모이어티에 대한 표적을 제공한다. 별법으로, 비오틴 또는 다른 그러한 모이어티는 본 발명의 항원-결합 단백질에 연결되고, 예를 들어 검출가능한 신호 생성제가 아비딘 또는 스트렙타비딘에 컨쥬게이팅되는 진단 시스템에서 리포터로서 사용된다.

[0093] 항종양제로서 사용하기 위해 적합한 방사성 동위원소는 또한 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, ^{131}I 또는 ^{211}At 가 사용된다. 이들 동위원소는 종래의 기술을 이용하여 항체에 부착된다 (예를 들어, [Pedley et al, Br. J. Cancer 68:69-73 (1993)] 참조). 별법으로, 항체에 부착되는 항종양제는 전구약물을 활성화시키는 효소이다. 상기 방식에서, 전구약물이 투여되고, 이는 종양 부위에 도달할 때까지 불활성형으로 남아있고, 종양 부위에서 그의 세포독소형으로 전환되어, 항체 복합체가 투여된다. 실제에서, 항체-효소 컨쥬게이트가 환자에게 투여되고, 치료할 조직의 구역 내에 국재화된다. 이어서, 전구약물이 환자에게 투여되어, 세포독성 약물로의 전환이 치료할 조직의 구역 내에서 일어나도록 한다. 별법으로, 항체에 컨쥬게이팅된 항종양제는 시토킨, 예를 들어 인터류킨-2 (IL-2), 인터류킨-4 (IL-4) 또는 종양 괴사 인자 알파 (TNF- α)이다. 항체는 시토킨을 종양에 표적화시켜, 시토킨이 다른 조직에 영향을 미치지 않으면서 종양의 손상 또는 파괴를 매개하도록 한다. 시토킨은 종래의 재조합 DNA 기술을 이용하여 DNA 수준에서 항체에 융합된다.

[0094] 본 발명은 또한 앞서 설명된 항체 또는 그의 단편을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 본 발명은 표 1에 기재된 1, 2, 3, 4, 5 및/또는 6개의 모든 CDR을 포함하는 PDGFR β -특이적 항체 및 항원 결합 단편을 코딩하는 서열을 갖는 핵산을 포함한다.

[0095] 따라서, 본 발명은 엄격한 혼성화 조건 하에 서열 1, 서열 9, 서열 17 및 서열 25에 특이적으로 혼성화하는 (또는 특이적으로 결합하는) 핵산을 제공한다. 핵산 코드의 다의성 (degeneracy)이 없으면 상기 언급된 서열에 특이적으로 결합할 핵산도 고려된다. 핵산은 완전 단백질 (예를 들어, 완전 V_H 또는 V_L) 또는 그의 단편을 코딩하기에 충분한 길이일 수 있다.

[0096] 엄격한 조건 하의 혼성화는 프로브가 그의 표적 하위 서열에 우선적으로 혼성화하고, 다른 서열에는 더 적은 정도로 혼성화하거나 전혀 혼성화하지 않을 조건을 나타낸다. 핵산 혼성화 실험, 예를 들어 서던 및 노던 혼성화의 문맥에서 엄격한 혼성화 및 엄격한 혼성화 세척 조건은 서열 의존적이고, 상이한 환경 파라미터 하에 상이함이 또한 이해될 것이다. 엄격한 혼성화 조건이 얻어지도록 혼성화 및 세척 용액 함량 및 온도를 조정

하는 것이 당업계에 공지되어 있다. 엄격성은 사용되는 프로브의 크기 및 뉴클레오티드 함량과 같은 파라미터에 따라 결정된다. 일반적인 설명과 예에 대해서는 문헌 [Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY] 및 다른 출처를 참조한다. 핵산의 혼성화에 대한 다른 지침은 문헌 [Tijssen, 1993, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Acid Probes, part I, chapter 2, Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays, Elsevier, N.Y]에서 발견된다.

[0097] 바람직한 엄격한 조건은 프로브가 프로브에 약 90% 초과로 상보성인 서열에 혼성화하고 약 70% 미만으로 상보성인 서열에는 혼성화하지 않도록 하는 것이다. 일반적으로, 고도로 엄격한 혼성화 및 세척 조건은 규정된 이온 강도 및 pH에서 특이적 서열에 대한 열융점 (T_m)보다 약 5°C 더 낮도록 선택된다. T_m 은 (규정된 이온 강도 및 pH에서) 표적 서열의 50%가 정확하게 매칭된 프로브에 혼성화하는 온도이다. 매우 엄격한 조건은 특정 프로브에 대한 T_m 에 동일하도록 선택된다.

[0098] 서던 또는 노던 블롯에서 필터 상에서 100개 초과 상보성 잔기를 갖는 상보성 핵산의 혼성화에 대한 엄격한 혼성화 조건의 예는 42°C에서 1 mg의 해파린이 존재하는 50% 포름아미드이고, 여기서 혼성화는 밤새 수행된다. 고도로 엄격한 세척 조건의 예는 72°C에서 약 15분 동안 0.15 M NaCl이다. 엄격한 세척 조건의 예는 65°C에서 15분 동안 0.2 x SSC 세척이다 (Sambrook et al., 1989). 종종, 배경 프로브 신호를 제거하기 위해 고엄격성 세척 전에 저엄격성 세척을 수행한다. 예를 들어, 100개 초과 뉴클레오티드의 이중체에 대한 중간 엄격성 세척의 예는 45°C에서 15분 동안 1 x SSC이다. 예를 들어, 100개 초과 뉴클레오티드의 이중체에 대한 저엄격성 세척의 예는 40°C에서 15분 동안 4-6 x SSC이다. 일반적으로, 특정 혼성화 분석에서 비관련 프로브에 대해 관찰된 것의 2배 (또는 그 이상)인 신호 대 노이즈비는 특이적 혼성화의 검출을 나타낸다.

[0099] 엄격한 조건 하에 서로에 혼성화하지 않는 핵산은 그들이 코딩하는 폴리펩티드가 실질적으로 동일하면 여전히 실질적으로 동일하다. 이는 예를 들어, 유전자 코드에 의해 허용되는 최대 코돈 다의성을 이용하여 핵산이 생성되는 경우에 발생한다. 따라서, 본 발명의 뉴클레오티드 서열은 서열 1, 서열 9, 서열 17, 또는 서열 25에 적어도 약 70%, 바람직하게는 적어도 약 80%, 보다 바람직하게는 적어도 약 90% 동일한 뉴클레오티드의 서열을 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 핵산을 함유하는 재조합 벡터를 제공한다. 벡터는 발현 벡터일 수 있고, 여기서 핵산은 제어 서열, 예를 들어 프로모터 및 임의로 인핸서 서열에 작동가능하게 연결된다. 효모 및 포유동물 세포 배양 시스템을 포함하나 이로 제한되지 않는 원핵세포 및 진핵세포 시스템에서 항체 폴리펩티드의 효율적인 합성을 위한 다양한 발현 벡터가 개발되었다.

[0100] 임의의 적합한 발현 벡터가 사용될 수 있다. 본 발명에서 유용한 발현 벡터는 발현시킬 DNA 서열 또는 단편에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 발현 제어 서열을 함유한다. 제어 서열은 클로닝된 DNA 서열의 발현을 제어하고 조절하기 위해 벡터 내에 삽입된다. 유용한 발현 제어 서열의 예는 lac 시스템, trp 시스템, tac 시스템, trc 시스템, 파지 램다의 주요 오퍼레이터 및 프로모터 구역, fd 코트 단백질의 제어 구역, 효모의 당분해 프로모터, 예를 들어, 3-포스포글리세레이트 키나제에 대한 프로모터, 효모 산 포스파타제의 프로모터, 예를 들어, Pho5, 효모 알파-교배 인자의 프로모터, 및 폴리오마, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 및 원숭이 바이러스로부터 유래된 프로모터, 예를 들어, SV40의 초기 및 후기 프로모터, 및 원핵세포 또는 진핵세포 및 그들의 바이러스 또는 그의 조합의 유전자의 발현을 제어하는 것으로 공지된 다른 서열이다.

[0101] 선택가능 마커는 선택적 배양 배지 내에서 성장시키는 형질전환된 숙주 세포의 생존 또는 성장에 필수적인 단백질을 코딩하는 유전자이다. 전형적인 선택가능 마커는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토틱세이트 또는 테트라사이클린에 대한 저항성을 부여하거나, (b) 자가영양 결핍을 보충하거나, (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요 영양분을 보충하는 단백질을 코딩하고, 예를 들어 바실러스 (*Bacillus*)에 대해 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자가 있다. 특히 유용한 선택가능 마커는 메토틱세이트에 대한 저항성을 부여한다. 예를 들어, DHFR 선택 유전자로 형질전환된 세포는 먼저 모든 형질전환체를 DHFR의 경쟁적 길항제인 메토틱세이트 (Mtx)를 함유하는 배양 배지 내에서 배양함으로써 확인한다. 야생형 DHFR이 사용될 때 적절한 숙주 세포는 문헌 [Urlaub and Chasin (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216]에 설명된 바와 같이 제조되고 증식된 DHFR 활성이 결핍되는 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포주이다. 이어서, 형질전환된 세포를 증가된 수준의 메토틱세이트에 노출시킨다. 이는 다수의 카피의 DHFR 유전자, 및 동시에 발현 벡터를 포함한 다수의 카피의 다른 DNA, 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 DNA의 합성을 일으킨다.

- [0102] 효모 내에서 유전자 구성체를 발현하는 것이 요구되는 경우에, 효모에서 사용하기 위한 적합한 선택 유전자의 예는 효모 플라스미드 YRp7 내에 존재하는 *trp1* 유전자이다 ([Stinchcomb et al. (1979) Nature, 282, 39]; [Kingsman et al. (1979) Gene 7, 141]). *trp1* 유전자는 트립토판에서 성장하는 능력이 결여되는 효모의 돌연변이체 균주, 예를 들어, ATCC No. 44076 또는 PEP4-1에 대한 선택 마커를 제공한다 (Jones (1977) Genetics 85, 12). 이어서, 효모 숙주 세포 계능 내의 *trp1* 손상의 존재는 트립토판의 부재 하에 성장시킴으로써 형질전환을 검출하기 위한 효과적인 환경을 제공한다. 유사하게, *Leu2*-결핍 효모 균주 (ATCC 20,622 또는 38,626)는 *Leu2* 유전자를 보유하는 공지의 플라스미드에 의해 보충된다. 효모에서 유용한 벡터의 예는 2 μ 플라스미드이다.
- [0103] 원핵세포 클로닝 벡터의 예는 이. 콜라이로부터의 플라스미드, 예를 들어 *colE1*, *pCR1*, *pBR322*, *pMB9*, *pUC*, *pKSM* 및 *RP4*를 포함한다. 원핵세포 벡터는 또한 파지 DNA의 유도체, 예를 들어 M13 및 다른 필라멘트성 단일 가닥 DNA 파지를 포함한다. 특정 항체는 각각의 폴리펩티드 사슬의 개시에서 세균 분비 신호 서열을 포함하는 DNA 구성체를 사용하여 이. 콜라이 내에서 편리하게 생산된다. 다양한 세균 신호 서열이 당업계에 공지되어 있다. 바람직한 신호 서열은 어위니아 카로토보라 (*Erwinia carotovora*)의 *pelB* 유전자로부터의 것이다.
- [0104] 포유동물 세포에서 발현을 위한 적합한 벡터는 SV40의 잘 공지된 유도체, 아테노바이러스, 레트로바이러스-유래된 DNA 서열, 및 기능적 포유동물 벡터의 조합물로부터 유래된 서열 벡터, 예를 들어 상기 설명된 것, 및 기능적 플라스미드 및 파지 DNA를 포함한다. 항체를 코딩하는 DNA 단편은 예를 들어, 포유동물 세포에서 고수준 발현을 위해 인간 사이토메갈로바이러스 (HCMV) 프로모터 및 인핸서를 사용하는 벡터 내로 클로닝될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 5,840,299 (Bendig, et al.); [Maeda, et al (1991) Hum. Antibod. Hybridomas 2, 124-34]; [P.J. Southern and P. Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1:327-41 (1982)]; [Subramani et al., Mol. Cell. Biol. 1: 854-64 (1981)]; [Kaufmann and Sharp, "Amplification And Expression of Sequences Cotransfected with a Modular Dihydro folate Reductase Complementary DNA Gene," J. Mol. Biol. 159: 601-21 (1982)]; [Kaufmann and Sharp, Mol. Cell. Biol. 159: 601-64 (1982)]; [Scahill et al., "Expression And Characterization Of The Product Of A Human Immune Interferon DNA Gene In Chinese Hamster Ovary Cells," Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 80, 4654-59 (1983)]; [Urlaub and Chasin, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77: 4216-20 (1980)] 참조).
- [0105] 본 발명은 또한 앞서 설명된 재조합 또는 발현 벡터를 함유하는 재조합 숙주 세포를 제공한다. 특히 바람직한 세포주는 고수준의 발현, 관심있는 단백질의 구성적 발현 및 숙주 단백질로부터 최소 오염을 기초로 하여 선택된다. 유용한 원핵세포 숙주는 예를 들어 이. 콜라이, 예를 들어 이. 콜라이 SG-936, 이. 콜라이 HB 101, 이. 콜라이 W3110, 이. 콜라이 X1776, 이. 콜라이 X2282, 이. 콜라이 DHI 및 이. 콜라이 MRC1, 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 바실러스, 예를 들어 바실러스 섭틸리스 (*Bacillus subtilis*), 및 스트렙토마이세스 (*Streptomyces*)를 포함한다. 발현을 위한 숙주로서 이용가능한 포유동물 세포주는 당업계에 잘 공지되어 있고, 많은 불멸화 세포주, 예를 들어 비제한적으로 COS-7 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 베이비 햄스터 신장 (BHK) 세포, PER.C6 세포, 및 림프종, 골수종, 또는 하이브리도마 세포와 같은 림프계 기원의 세포주를 포함한 많은 다른 것을 포함한다. 적합한 추가의 진핵세포는 효모 및 다른 진균을 포함한다.
- [0106] 형질전환된 숙주 세포는 동화가능한 탄소 공급원, 예를 들어 탄수화물, 예를 들어 글루코스 또는 락토스, 질소, 예를 들어 아미노산, 펩티드, 단백질 또는 그들의 분해 생성물, 예를 들어 펩톤, 암모늄염 등과 무기 염, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 마그네슘 및 칼슘의 황산염, 인산염 및/또는 탄산염을 함유하는 액체 배지 내에서 당업계에 공지된 방법에 의해 배양된다. 배지는 추가로 예를 들어, 성장 촉진 물질, 예를 들어 미량 원소, 예를 들어 철, 아연, 망간 등을 함유한다.
- [0107] 본 발명은 또한 상기 숙주 세포를 항체의 발현을 허용하는 조건 하에 배양하는 것을 포함하는, 항체를 생산하는 방법을 제공한다. 적합한 배지 내에 유지된 숙주 세포 내에서 발현 후, 항체는 당업계에 공지된 방법에 의해 배지로부터 단리하고 정제할 수 있다.
- [0108] 본 발명은 본 발명의 항체, 핵산, 벡터 또는 숙주 세포와 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 추가로 제공한다.
- [0109] 본 발명은 또한 PDGFR β -특이적 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 종양을 치료하거나 종양의 성장을 억제하거나, 포유동물에서 혈관 신생-의존 병태 (예를 들어, 종양 성장)를 치료 또는 억제하거나, 혈관신생 질병을 치료하기 위한 방법에 관한 것이다. 하나의 실시태양에서, 길항제는 종양 세포의 PDGFR β -매개된 자극을 차단한다. 또다른 실시태양에서, 길항제는 혈관 신생을 억제 또는 예방하여, 혈관 신생-의존 병태를 치료 또는

억제하는 기능을 한다. 일반적으로, 혈관 내피는 다른 공급원 (예를 들어, 종양 세포)로부터의 성장 인자에 의해 측분비 방식으로 자극된다. 따라서, PDGFR β 길항제는 혈관화된 종양 또는 신생물을 갖는 대상을 치료하기 위해 효과적이다.

- [0110] 질병을 "치료하는"은 (1) 질병에 소인이 있을 수 있지만 아직 질병의 증상을 경험하거나 나타내지 않는 포유 동물에서 질병이 발생하는 것을 방지하는; 예를 들어, 임상 증상의 발생을 예방하거나; (2) 질병을 억제하는, 예를 들어, 그의 발달을 정지 또는 지체시키거나; (3) 질병을 경감시키는, 예를 들어, 질병의 증상의 퇴행을 일으키는 것을 포함한다.
- [0111] 치료될 수 있는 종양은 원발 종양 및 전이성 종양뿐만 아니라 불응성 종양을 포함한다. 불응성 종양은 화학 치료제 단독, 항체 단독, 방사선 단독 또는 그의 조합을 사용하는 치료에 반응하지 못하거나 저항성인 종양을 포함한다. 불응성 종양은 또한 상기 물질을 사용한 치료에 의해 억제되는 것으로 보이지만, 치료를 중단한 후 5년까지, 때때로 10년 이상까지 재발하는 종양을 포함한다.
- [0112] PDGFR β -특이적 길항제는 표적 수용체 또는 그의 리간드를 실질적으로 포화시키기 위해 충분한 용량 및 투여 빈도로 투여된다. 실질적인 포화는 표적화된 수용체의 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 95% 포화이다. PDGFR β -특이적 길항제는 투여량 사이의 간격의 적어도 약 50%, 또는 적어도 약 70%, 또는 적어도 약 90% 동안 실질적인 포화를 유지하기 위해 충분한 빈도로 투여된다. 본 발명의 실시태양에서, PDGFR β -특이적 길항제는 항체이다. 치료를 위해, 투여량은 약 5 mg/m² 내지 약 700 mg/m²이다. 또다른 실시태양에서, 투여량은 약 10 mg/m² 내지 약 250 mg/m²이다. 적절한 투여량 및 일정은 예를 들어 시험관 내에서 수용체 포화 또는 중화를 달성하기 위해 요구되는 농도를 이용하여, 또는 길항제의 혈청 농도의 분석에 의해 당업자가 쉽게 결정할 수 있다.
- [0113] 본 발명의 실시태양에서, PDGFR β -특이적 길항제는 화학치료제와 함께 투여된다. 당업계에 공지되거나 평가되고 있는 화학치료제는 그의 표적 또는 작용 방식에 기초하여 분류될 수 있다. 예를 들어, 알킬화제는 시스플라틴, 시클로포스파미드, 멜팔란 및 다카르바진을 포함하나 이로 제한되지 않는다. 항-대사물질의 예는 독소루비신, 다우노루비신 및 파클리탁셀, 잼시타빈, 및 토포이소머라제 억제제 이리노테칸 (CPT-11), 아미노캅토테신, 캅토테신, DX-8951f, 및 토포테칸 (토포이소머라제 I) 및 에토포시드 (VP-16) 및 테니포시드 (VM-26) (토포이소머라제 II)를 포함하나 이로 제한되지 않는다. 다른 적합한 화학치료제는 당업자에게 공지되어 있고, 메토트렉세이트, 빈테신, 네오크리노스타틴, 클로람부실, 시토신 아라비노시드, 5-플루오로우리딘, 멜팔란, 리신 및 칼리케아미신을 포함한다. PDGFR β 길항제 및 화학치료제는 혈관 신생을 억제하고/하거나 종양 성장을 감소시키기 위해 효과적인 양으로 환자에게 투여된다. PDGFR β 길항제는 또한 다른 치료 요법, 예를 들어, 방사선 요법과 같은 치료와 조합으로 투여될 수 있다. 방사선에 대해, 공급원은 치료되는 환자에 대해 외부 (외부 빔 방사선 요법 - EBRT) 또는 내부 (근접요법 - BT)일 수 있다.
- [0114] 투여되는 항-신생물제의 투여량은 예를 들어 물질의 종류, 치료되는 종양의 종류와 심도 및 물질의 투여 경로를 포함한 수많은 인자에 따라 결정된다. 그러나, 본 발명은 임의의 특정 투여량에 제한되지 않음이 강조되어야 한다.
- [0115] 본 발명의 실시태양에서, PDGFR β -특이적 길항제는 VEGFR 길항제와 조합으로 투여된다. VEGFR 길항제의 예는 VEGFR2/KDR에 결합하는 항체, 예를 들어 IMC-2C6 (V_H의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열: 서열 33 및 34; V_L의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열: 서열 35 및 36) (WO 03/075840 참조) 및 IMC-1121 (V_H의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열: 서열 33 및 34; V_L의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열: 서열 37 및 38) (WO 03/075840 참조)을 포함한다. VEGFR1/Flt-1에 결합하는 항체의 예는 6.12 (V_H의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열: 서열 39 및 40; V_L의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열: 서열 41 및 42) 및 IMC-18F1 (V_H의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열: 서열 43 및 44; V_L의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열: 서열 45 및 46)을 포함한다. VEGF에 특이적인 항체의 예는 아바스틴 (Avastin)[®]이다.
- [0116] PDGFR β -특이적 항체에 대해 상기 개시된 바와 같이, VEGFR 길항제는 VEGF 수용체에 의해 매개된 신호전달을 감소 또는 억제한다. 억제 메커니즘은 리간드 차단, 수용체 이량체 또는 다량체 형성, 수용체 내재화, 효소적 활성 (예를 들어, 자가인산화, 수용체 기질의 변형)의 억제 등을 포함하나 이로 제한되지 않는다.
- [0117] 특정 실시태양에서, 본 발명의 항체는 이중 특이성을 갖고, 2개의 상이한 항원에 동시에 결합할 수 있다. 상

이한 항원은 상이한 세포 또는 동일한 세포 상에 위치할 수 있다. 항원의 가교결합은 예를 들어, 제1 항원이 결합된 고체 지지체를 제공하고, 제1 항원에 특이적인 이중특이적 항체를 첨가하고, 결합 단백질이 또한 특이적인 제2 항원을 첨가하고, 결합된 제2 항원의 존재를 검출함으로써 시험관 내에서 확인할 수 있다.

[0118] 본 발명의 바람직한 항체는 2개의 수용체와 그들의 각각의 리간드 사이의 상호작용을 차단할 수 있다. 예를 들어, PDGFR β 및 KDR에 특이적인 항체는 PDGF-BB 유도된 세포 활성화 및 VEGF 또는 PlGF 유도된 세포 이동을 억제한다. 단일특이적인 항체에 비해, 이중특이적 항체는 세포 기능의 보다 강력한 억제제일 수 있다.

[0119] 본 발명의 한 측면에서, PDGFR β 길항제는 VEGFR 길항제와 병용투여된다. 방법은 고형 또는 비-고형 종양, 예를 들어 혈관화되지 않거나 아직 실질적으로 혈관화되지 않은 종양을 치료하기 위해 효과적이다.

[0120] PDGFR β 길항제를 단독으로 또는 VEGFR 길항제와 조합으로 사용하여 치료될 수 있는 종양 및 신생물은 예를 들어 악성 종양 및 신생물, 예를 들어 모세포종, 암종 또는 육종, 및 고도의 혈관성 종양 및 신생물을 포함한다. 본 발명의 방법에 의해 치료될 수 있는 암은 뇌, 비뇨생식관, 림프계, 위, 신장, 결장, 후두 및 폐와 뼈의 암을 포함한다. 비제한적인 예는 표피양 종양, 편평세포 종양, 예를 들어 두경부 종양, 결장직장 종양, 전립선 종양, 유방 종양, 폐 종양, 예를 들어 폐 선암종 및 소세포 및 비-소세포 폐 종양, 췌장 종양, 갑상선 종양, 난소 종양 및 간 종양을 추가로 포함한다. 조성물은 혈관화된 피부암, 예를 들어 편평세포 암종, 기저 세포 암종과, 악성 각질세포, 예를 들어 인간 악성 각질세포의 성장 억제에 의해 치료될 수 있는 피부암의 치료에 사용될 수 있다. 치료될 수 있는 다른 암은 카포시 (Kaposi) 육종, CNS 신생물 (신경모세포종, 모세혈관 모세포종, 수막종 및 뇌 전이암), 흑색종, 위장 및 신장 암종 및 육종, 횡문근육종, 아교모세포종, 예를 들어 다형성 아교모세포종, 및 평활근육종을 포함한다.

[0121] 비-고형 종양의 예는 백혈병, 다발성 골수종 및 림프종을 포함한다. 백혈병의 일부 예는 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 림프성 백혈병 (ALL), 만성 림프성 백혈병 (CLL), 적혈구성 백혈병 또는 단핵구성 백혈병을 포함한다. 림프종의 일부 예는 호지킨 (Hodgkin) 및 비-호지킨 림프종을 포함한다.

[0122] 본 발명의 조성물은 또한 예를 들어 혈관화 및/또는 염증을 수반하는 과다 혈관 신생을 특징으로 하는 병태, 예를 들어 죽상경화증, 류마티스 관절염 (RA), 신생혈관 녹내장, 증식성 망막병증, 예를 들어 증식성 당뇨병 망막병증, 황반 변성, 혈관종, 혈관섬유종 및 건선의 치료 또는 예방을 위해 사용될 수 있다. 비-신생물성 혈관신생 질병의 다른 비제한적인 예는 미숙아의 망막병증 (수정체후부 섬유증성증), 각막 이식 거부, 인슐린-의존성 당뇨병, 다발 경화증, 중증 근무력증, 크론 (Chron) 병, 자가면역성 신장염, 원발성 담즙성 경화, 급성 췌장염, 동종이식 거부, 알레르기 염증, 접촉 피부염 및 지연형 과민 반응, 염증성 장 질환, 패혈성 쇼크, 골다공증, 골관절염, 뉴런 염증에 의해 유발되는 인지 능력 저하, 오슬러-웨버 (Osler-Weber) 증후군, 재협착, 및 진균, 기생충 및 바이러스 감염, 예를 들어 사이토메갈로바이러스 감염이다.

[0123] 그러한 질병의 확인은 당업자의 능력과 지식으로 수행할 수 있다. 예를 들어, 임상학상 유의한 신생물성 또는 혈관신생 질병으로 고통받거나 임상학상 유의한 증상을 발병할 위험이 있는 인간 개체가 임의로 VEGFR 길항제와 조합한 PDGFR β 길항제의 투여에 적합하다. 숙련된 임상학자는 예를 들어, 임상 시험, 신체 검사 및 의료력/가족력을 이용하여 개체가 그러한 치료에 대한 후보인지 쉽게 결정할 수 있다.

[0124] 본 발명의 길항제 조성물은 종양 또는 혈관 신생이 연관된 병태로 고통받는 환자에 대한 치료 처치를 위해 종양 또는 병태의 진행을 예방, 억제 또는 감소시키기 위해 충분한 양으로 투여될 수 있다. 진행은 예를 들어 종양 또는 병태의 성장, 침습성, 전이 및/또는 재발을 포함한다. 이들 달성하기 위해 적절한 양은 치료 유효 투여량으로 규정된다. 상기 용도를 위해 효과적인 양은 질병의 심도 및 환자 자신의 면역계의 전반적인 상태에 따라 결정될 것이다. 투여 일정은 또한 질병 상태와 환자의 상태에 따라 변할 것이고, 일반적으로 단일 볼러스 (bolus) 용량 또는 연속 주입 내지 매일 다수의 투여 (예를 들어, 4-6시간마다)의 범위, 또는 치료 담당의와 환자의 병태에 의해 지시되는 범위일 것이다. 그러나, 본 발명은 임의의 특정 투여량에 제한되지 않음을 알아야 한다.

[0125] 포유동물에 대한 투여 방법은 예를 들어 경구, 정맥내, 복강내, 피하 또는 근육내 투여를 포함한다.

[0126] PDGFR β -특이적 및 VEGFR-특이적 항체는 질병의 치료를 위해 다른 물질, 예를 들어 항신생물질 또는 항-혈관 신생제에 화학적으로 또는 생합성 방식으로 컨주게이팅될 수 있다. 항체에 연결된 항종양제는 항체가 결합된 세포의 환경에서 또는 항체가 결합된 종양을 파괴 또는 손상시키는 임의의 물질을 포함한다. 예를 들어, 항종양제는 독성제, 예를 들어 화학치료제 또는 방사성 동위원소이다. 화학치료제는 펩티드 및 비-펩티드 링커를 포함한 종래의 방법을 사용하여 항체에 컨주게이팅된다 (예를 들어, 문헌 [Hermentin and Seiler (1988)]

Behring Inst. Mitt. 82, 197-215] 참조).

- [0127] 본 발명의 PDGFR β -특이적 항체는 또한 진단 목적을 위해 생체 내에서 및 시험관 내에서 유용한 검출가능 신호 생성체에 연결될 수 있다. 신호 생성체는 외부 수단, 대체로 전자기 방사선의 측정에 의해 검출가능한 측정가능 신호를 생성한다. 대체로, 신호 생성체는 효소 또는 발색단이거나, 형광, 인광 또는 화학발광에 의해 광을 방출한다. 발색단은 자외선 또는 가시광 구역에서 광을 흡수하는 염료를 포함하고, 효소 촉매된 반응의 기질 또는 분해 생성물일 수 있다.
- [0128] 본 발명은 제2 시약 내로 혼입된 치료제 또는 진단제와 상기 항체의 용도를 추가로 고려한다. 예를 들어, 결합쌍의 하나의 멤버가 본 발명의 항체에 연결된다. 항-신생물제는 예를 들어 상기 쌍의 제2 멤버에 컨쥬게이팅되어, 항체가 결합되는 부위로 유도된다. 바람직한 실시태양에서, 비오틴이 본 발명의 항체에 컨쥬게이팅되어, 아비딘 또는 스트렙타비딘에 컨쥬게이팅된 항-신생물제 또는 다른 모이어티에 대한 표적을 제공한다. 별법으로, 비오틴 또는 다른 그러한 모이어티는 본 발명의 항체에 연결되어, 예를 들어 검출가능 신호 생성체가 아비딘 또는 스트렙타비딘에 컨쥬게이팅되는 진단 시스템에서 리포터로서 사용된다.
- [0129] 임의로 VEGFR 길항제와 조합된 본 발명의 PDGFR β 길항제는 하나 이상의 적합한 어쥬반트 (adjuvant), 예를 들어 시토킨 (예를 들어 IL-10 및 IL-13) 또는 다른 면역 자극인자, 예를 들어 비제한적으로 케모킨, 종양 연관 항원 및 펩티드와 조합으로 투여될 수 있다. 그러나, 항체의 단독 투여가 치료상 효과적인 방법으로 종양의 진행을 예방, 억제 또는 감소시키기에 충분함을 알아야 한다.
- [0130] 특정 실시태양에서, RTK에 결합하고 리간드 결합을 차단하는 본 발명의 항체를 리간드에 결합하는 다른 항원-결합 단백질과 조합으로 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 리간드 결합 항체는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 항-VEGF (아바스틴®; 베바시주맵)을 포함한다.
- [0131] 본 발명에 따라, PDGFR β -특이적 길항제 및 VEGFR 길항제의 병용 투여는 항신생물질제, 예를 들어 화학치료제 또는 방사성 동위원소의 투여를 동반할 수 있다. 유용한 항-신생물제의 예는 PDGFR β -특이적 길항제와의 병용 투여에 대해 상기한 것을 포함한다.
- [0132] 조합 요법에서, PDGFR β 길항제 및 VEGFR 길항제는 상이한 일정의 동일 일에 따로 또는 함께 병용투여될 수 있다. 임의로, 길항제는 단일 용량 내로 조합될 수 있다. 임의로, 길항제는 단일 활성 엔티티 (entity) (예를 들어, 이중특이적 항체)로 조합될 수 있다. PDGFR β 길항제/VEGFR 길항제 요법은 다른 물질을 사용한 요법을 시작하기 전에, 사용하는 동안 또는 시작한 후에 뿐만 아니라 그의 임의의 조합으로, 즉, 항-신생물제를 사용한 요법을 시작하기 전에 및 사용하는 동안, 시작하기 전에 및 시작한 후에, 사용하는 동안 및 시작한 후에, 또는 시작하기 전에, 사용하는 동안 및 시작한 후에 투여된다. 예를 들어, 종양 또는 신생물성 질병의 치료를 위해, PDGFR β 길항제/VEGFR 길항제 요법은 방사선 요법을 시작하기 1 내지 30일 전, 바람직하게는 3 내지 20일 전, 보다 바람직하게는 5 내지 12일 전에 투여될 수 있다. 본 발명에 따라, 화학요법 또는 방사선 요법은 PDGFR β 길항제/VEGFR 길항제 요법과 동시에, 그 전에, 또는 그 다음에 투여된다.
- [0133] 본 발명에서, 본 발명의 항체를 투여하기 위해 및 임의로 항-신생물제, 수용체 길항제, 또는 다른 제약 조성물을 병용투여하기 위해 임의의 적합한 방법 또는 경로를 이용할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 항신생물질제 요법은 환자의 신생물질 병태의 치료를 위해 최적으로 적합한 것으로 생각되는 임의의 요법을 포함한다. 상이한 악성물질이 특이적 항-종양 항체 및 특이적 항-신생물제의 사용을 필요로 할 수 있고, 이는 환자 개개인에 기초하여 결정될 것이다. 투여 경로는 예를 들어, 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 또는 근육내 투여를 포함한다. 투여되는 항-신생물제의 투여량은 예를 들어 항신생물제의 종류, 치료되는 종양의 종류와 심도 및 항신생물제의 투여 경로를 포함한 수많은 인자에 따라 결정된다. 그러나, 본 발명은 임의의 특정 방법 또는 투여 경로에 제한되지 않음이 강조되어야 한다.
- [0134] 본 발명의 항체는 예방 또는 치료의 목적으로 포유동물에서 사용되는 경우에 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함하는 조성물의 형태로 투여될 것으로 생각된다. 적합한 제약상 허용되는 담체는 예를 들어 물, 염수, 포스페이트 완충 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등과 이들의 조합물 중 하나 이상을 포함한다. 제약상 허용되는 담체는 소량의 보조제 물질, 예를 들어 습윤제 또는 유화제, 방부제 또는 버퍼를 추가로 포함할 수 있고, 이들은 결합 단백질의 저장 수명 또는 유효성을 향상시킨다. 주사 조성물은 당업계에 공지된 바와 같이, 포유동물에 투여한 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연 방출을 제공하도록 제제화될 수 있다.
- [0135] 본 발명은 또한 치료 유효량의 본 발명의 PDGFR β -특이적 길항제를 포함하는, 종양 성장 및/또는 혈관 신생을 억제하기 위한 키트를 포함한다. 본 발명의 실시태양에서, 키트는 VEGFR 길항제 (예를 들어, VEGF, PlGF,

VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/Flk-1/KDR, 또는 VEGFR3/Flt-4의 길항제)를 추가로 포함한다. VEGF 길항제는 예를 들어 소분자, 리간드-결합 수용체 단편, 또는 항체일 수 있다. 인간에게 투여되는 길항제가 항체인 경우에, 인간, 인간화, 또는 키메라 항체가 바람직하다. 키트는 예를 들어, 종양 발생 또는 혈관 신생에 관여하는 다른 성장 인자 수용체 (예를 들어, 상기한 바와 같은 EGFR, IGFR, NGFR, FGFR 등)의 임의의 적합한 길항제를 추가로 함유할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 본 발명의 키트는 항-신생물제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 문맥에서 적합한 항-신생물제의 예는 본원에 제공된다. 본 발명의 키트는 어췌버트를 추가로 포함할 수 있고; 그 예는 또한 상기 설명되어 있다.

[0136] 당업계에서 잘 공지된 조사 또는 진단 방법을 위한 생체 내에서 및 시험관 내에서 본 발명의 항체의 사용이 본 발명의 범위 내에 또한 포함된다. 진단 방법은 본 발명의 항체를 함유하는 키트를 포함한다.

[0137] 따라서, 본 발명의 수용체 결합 항체는 당업계에서 잘 공지된 조사, 진단, 예방, 또는 치료 방법을 위해 생체 내에서 및 시험관 내에서 사용될 수 있다. 물론, 본원에 개시된 본 발명의 원칙의 변동이 당업자에 의해 이루어질 수 있음을 이해하고 예상해야 하고, 그러한 변형은 본 발명의 범위 내에 포함되는 것으로 의도된다.

[0138] 본원에 언급된 모든 참조문은 그 전문이 참고로 포함된다.

실시예

[0139] 다음 실시예는 본 발명을 추가로 예시하지만, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 생각되지 않아야 한다. 벡터 및 플라스미드의 제작, 상기 벡터 및 플라스미드 내로 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 삽입, 숙주 세포 내로 플라스미드의 도입, 및 유전자 및 유전자 산물의 발현 및 그의 결정에서 사용되는 것과 같은 종래의 방법에 대한 상세한 설명은 문헌 ([Sambrook, J. et al., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press]; 및 [Coligan, J. et al. (1994) Current Protocols in Immunology, Wiley & Sons, Incorporated]을 포함한 수많은 문헌으로부터 얻을 수 있다.

[0140] *파지 디스플레이 라이브러리*. 3.7×10^{10} 클론을 함유하는 인간 Fab 파지 디스플레이 라이브러리 (de Haard, H.J. et al., 1999, J. Biol. Chem. 274: 18218-30)를 사용하여, 고정된 mPDGFR β -Fc를 사용하여 문헌에 기재된 절차 ([Lu, D. et al., 2002, Int. J. Cancer 97:393-9]; [Zhu, Z. et al., 1998, Cancer Res. 58:3209-14])에 따라 항-mPDGFR β 항체를 스크리닝하였다. 제2 및 제3 라운드의 선택 후에 회수한 개별 파지 클론을 ELISA에 의해 고정된 mPDGFR β -Fc에 대한 결합에 대해 조사하였다. 가용형 Fab를 생성하기 위해, 개별 결합 물질 (binder)의 플라스미드를 사용하여 비억제제포인 이. 콜라이 숙주 HB2151을 형질전환시켰다. 가용형 Fab 단백질을 제조사의 프로토콜에 따라 단백질 G 컬럼 (아머삼 파마시아 바이오테크 (Amersham Pharmacia Biotech, 미국 뉴저지주 피스카타웨이))을 사용하여 친화도 크로마토그래피에 의해 주변세포질 추출물로부터 정제하였다.

[0141] *정량적 수용체 결합 및 차단 분석*. 결합 분석에서, 다양한 양의 1B3 IgG 또는 Fab를 mPDGFR β -코팅된 플레이트에 첨가하고 (1 μ g/ml으로 50 μ l), RT에서 1 h 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 PBST로 3회 세척하였다. 이어서, 플레이트를 RT에서 추가로 1 h 동안 염소 항-인간- κ 항체-호스 래디시 퍼옥시다제 (HRP) 컨쥬게이트 (잭슨 이뮤노리써치 (Jackson ImmunoResearch, 미국 펜실베이니아주 웨스트 그로브))와 함께 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고 문헌에 설명된 바와 같이 발색시켰다 ([Lu, D. et al., 2002]; [Zhu, Z. et al., 1998]). 차단 분석에서, 다양한 양의 정제된 항체를 먼저 고정량의 mPDGFR β (0.5 μ g/ml으로 50 ng)와 혼합하고, RT에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 혼합물을 PDGF-BB (0.5 μ g/ml)로 예비코팅된 96-웰 플레이트에 옮기고, RT에서 1 h 동안 인큐베이션하였다. PBST로 3회 세척한 후, 플레이트를 염소 항-인간 Fc 항체-HRP 컨쥬게이트 (잭슨 이뮤노리써치)와 함께 1 h 동안 인큐베이션하고, 문헌에 설명된 바와 같이 발색시켰다 ([Lu, D. et al., 2002]; [Zhu, Z. et al., 1998]; [Loizos, N. et al., 2005]). IC₅₀ (그의 리간드에 결합하는 mPDGFR β 를 50% 차단하는 항체 농도)을 결정하였다.

[0142] *항체 친화도 결정*. mPDGFR β 에 대한 다양한 Fab 및 IgG의 결합 동역학은 BIAcore 3000 바이오센서 (비야코어, 인크. (BIAcore, Inc., 스웨덴 우살라))를 사용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, mPDGFR β 를 센서 칩 상에 고정시키고, 가용형 항체를 1.5 nM 내지 100 nM의 농도로 주사하였다. 각각의 농도에서 센서그램 (sensorgram)을 얻고, 프로그램 BIA Evaluation 2.0을 사용하여 평가하였다. 친화도 상수인 K_d는 해리 속도 (k_{off})/회합 속도 (k_{on})의 비로부터 계산하였다 ([Lu, D. et al., 2002]; [Zhu, Z. et al., 1998]; [Loizos, N. et al., 2005]).

[0143] 인간 항-*mPDGFRβ* 항체의 선택. 총 제2 라운드로부터 190개의 클론과 제3 라운드로부터 95개의 클론을 무작위로 선택하고, 파지 ELISA 및 가용형 Fab ELISA 모두에 의해 *mPDGFRβ* 결합 및 차단 활성에 대해 시험하였다. 제2 라운드로부터의 72% 초과와 제3 라운드로부터의 98% 초과 클론이 *mPDGFRβ*에 특이적으로 결합하는 것으로 밝혀졌고, 이것은 선택 과정의 높은 효율을 시사한다. 리간드 차단 분석에서는, 약 2.5%의 결합물질이 또한 *mPDGFRβ*가 그의 리간드 PDGF-BB에 결합하는 것을 차단함을 보여주었다.

[0144] 7개의 모든 Fab 단편이 *mPDGFRβ*에 특이적으로 결합하고, *mPDGFRβ*가 그의 리간드 PDGF-BB에 결합하는 것을 상이한 효능으로 차단하였다. IC₅₀ 값 (즉, PDGFRβ/PDGF-BB 상호작용의 50%를 차단하기 위해 필요한 항체 농도)은 약 4 nM 내지 >33 nM이었다 (도 1B). 가장 우수한 수용체 결합 효율 및 수용체/리간드 차단 효능을 갖는 클론인 클론 1B3 (표 1)을 추가의 연구를 위해 선택하였다.

표 1

항체 가변 도메인 및 CDR에 대한 서열 번호 (뉴클레오타이드/아미노산)								
항체 명칭	VH	CDRH1	CDRH2	CDRH3	VL	CDRL1	CDRL2	CDRL3
1B3	1/2	3/4	5/6	7/8	9/10	11/12	13/14	15/16
2C5	17/18	19/20	21/22	23/24	25/26	27/28	29/30	32/32

[0145]

[0146] 전장 IgG 항체 클로닝 및 발현. 선도 클론인 1B3의 중쇄 및 경쇄 유전자를 코딩하는 DNA 서열을 PCR에 의해 증폭시키고, 인간 κ 경쇄 불변 구역 및 인간 γ1 중쇄 불변 구역을 함유하는 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 발현 벡터를 NSO 골수종 세포 내로 형질감염시키고, 1B3-발현 세포의 안정한 클론을 선택하였다. 세포를 혈청 비함유 배지에서 성장시키고, 전장 1B3 IgG를 단백질 A 친화도 크로마토그래피 (Poros A, 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems, 미국 캘리포니아주 포스터 시티))에 의해 세포 배양 상등액으로부터 정제하였다.

[0147] 예상한 바와 같이, 1B3 IgG는 그의 Fab 단편보다 고정된 *mPDGFRβ*에 훨씬 더 우수한 결합 효율을 보여주었다. IC₅₀ 값은 1B3 IgG에 대해 0.34 nM이고, 1B3 Fab에 대해 1.3 nM이었다 (도 1A). BIAcore 기기를 사용한 표면 플라즈몬 공명에 의한 결합 동역학 분석에서는 *mPDGFRβ*에 대한 결합을 위한 1B3의 친화도가 그의 Fab 형태보다 약 57배 증가하였음을 보여주었다 (Fab에 대해 5.1 nM 및 IgG에 대해 0.09 nM). 1B3 항체를 인간 종양 세포주 상의 가용형 재조합 단백질로서 또는 세포-표면 발현된 수용체로서 인간 PDGFRβ에 대한 결합에 대해 시험할 때 어떠한 교차 반응성도 관찰되지 않았다. 또한, 1B3은 인간 및 마우스 PDGFRα에 결합하지 않았다 (데이터 비제시). 차단 분석에서, 1B3은 *mPDGFRβ*가 그의 리간드 PDGF-BB에 결합하는 것을 1.2 nM의 IC₅₀으로 억제한 반면, 그의 Fab의 IC₅₀은 4.1 nM이었다 (도 1B).

[0148] 1B3은 세포 기반 분석에서 PDGF-BB-자극된 수용체 인산화 및 하류 신호전달을 억제한다. 몇몇 마우스 세포주, 예를 들어 NIH/3T3 (섬유모세포), D122 (루이스 폐 암종), 4T1 (유방암), B16 (흑색종) 및 H5V (PmT-형질전환된 내피세포)를 시험제로서 1B3을 사용하여 FACS 분석에 의해 PDGFRβ 발현에 대해 시험하였다. 세포를 96-웰 플레이트의 웰 내로 약 1x10⁶/웰로 분취하고, 1B3 (10 μg/ml)과 함께 4°C에서 1 h 동안 인큐베이션한 후, 항-인간 Fc 항체-FITC 컨쥬게이트 (잭슨 면역노리썬)와 함께 추가로 1시간 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 냉 PBS로 수회 세척한 후, 세포를 FACSyantage SE 유동 세포측정기 (비디 바이오사이언시스 (BD Biosciences, 미국 캘리포니아주 산호세))를 사용하여 분석하였다. R&D의 항-*mPDGFRβ* 항체를 양성 대조군으로서 사용하였다 (데이터 비제시). FACS 결과 (도 2A)는 NIH/3T3 및 D122가 PDGFRβ를 중등 수준으로 발현하고, 4T1 및 B16이 수용체를 낮은 수준으로 발현하고, H5V는 임의의 염색을 나타내지 않았음을 보여준다.

[0149] NIH/3T3 및 D122 세포에 대해 수용체 인산화를 결정하였다. 세포를 6 cm 디쉬 상에 플레이팅하고, 70-80% 전면성장률 (confluence)로 성장시킨 후, 세포를 PBS 내에 2회 세척하고 혈청 비함유 배지에서 밤새 배양하였다. 세포를 먼저 다양한 항체와 함께 RT에서 30분 동안 인큐베이션한 후, PDGF-BB로 37°C에서 15분 동안 자극하였다. 세포를 용해 버퍼 (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1% TritonX-100, 1 mM EDTA, 1 mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드, 0.5 mM Na₃VO₄, 1 μg/ml 류펩틴, 1 μg/ml 펩스타틴, 및 1 μg/ml 아프로티닌) 중에서 1 h 동안 용해시킨 후, 용해물을 12,000 rpm에서 10 min 동안 4°C에서 원심분리하였다. 수용체를 항-

mPDGFR β 항체 (알앤디 시스템즈 인크 (R&D Systems Inc))에 의해 세포 용해물 상등액으로부터 면역침전시킨 후, 20 μ l의 ProA/G-세파로스 비드를 첨가하였다. 침전된 수용체 단백질을 4-12% NuPAGE Bis-Tris 겔 상에서 용해시키고, 폴리비닐리덴 디플루오라이드막으로 이송하였다. 항-포스포-티로신 항체-HRP 컨쥬게이트 (산타 크루즈 바이오테크 (Santa Cruz Biotech, 미국 캘리포니아주 산타크루즈))를 사용하여 포스포-mPDGFR β 단백질을 블롯 상에서 검출하였다. 겔 상에 로딩된 총 수용체 단백질은 mPDGFR β 에 대한 항체를 사용하여 분석하였다.

[0150] 하류 신호전달을 연구하기 위해, 상기 처리로부터의 세포 용해물을 4-12% NuPAGE Bis-Tris 겔에 의해 용해시켰다. 인산화된 Akt 및 p44/42 미토젠-활성화된 단백질 키나제 (MAPK)를 각각 항-포스포-Akt 및 항-포스포-p44/p42 MAPK 및 p44/p42 MAPK (이바이오사이언스 (eBioscience, 미국 캘리포니아주 샌디에고))를 사용하여 검출하였다.

[0151] 1B3은 NIH/3T3 및 D122 세포 모두에서 PDGF-BB-자극된 수용체 인산화를 용량 의존 방식으로 억제하였다 (도 2B 및 2C). 항체는 또한 D122 세포에서 Akt 및 p44/42 MAP 키나제 모두의 PDGF-BB-자극된 인산화를 강하게 억제하였다 (도 2D).

[0152] 종양 이종이식편 모델에서 항-mPDGFR β 항체의 항종양 활성. 3개의 난소 암종 (SK-OV-3, OV-CAR-5 및 OV-CAR-8), 1개의 췌장 암종 (BxPC3), 1개의 폐 암종 (NCI-H460) 및 1개의 신장 암종 (Caki-1)을 포함하는 6개의 인간 이종이식편 종양 모델을 사용하여 생체 내에서 1B3의 항종양 활성을 평가하였다. 무흉선 (nu/nu) 마우스 (암컷, 7-8주령)를 이종이식편 이식 전에 7-10일 동안 수용하였다. 각각의 마우스에게 SK-OV-3, OV-CAR-5, OV-CAR-8, Caki-1, BxPC3 또는 NCI-H460 종양 세포의 3×10^6 세포를 피하 주사하였다. 종양이 약 250-300 mm³에 도달했을 때, 마우스를 각각 10 내지 12마리 동물의 군으로 무작위로 분류하고, 1B3, DC101 또는 1B3을 DC101과 조합하여 매주 2 내지 3회 복강내 주사에 의해 처리하였다. 인간 IgG 및/또는 USP 염수를 대조군으로서 사용하였다. 종양 크기 및 마우스 체중을 매주 2회 측정하였다. 종양 부피는 식 $\pi/6 \times (\text{길이} \times \text{폭}^2)$ 을 사용하여 계산하였고, 여기서 길이는 최장 직경이고, 폭은 길이에 수직인 직경이다. 처리군의 평균 종양 부피 대 대조군의 평균 종양 부피의 비 (T/C%)를 계산하였다. 통계 분석은 스튜던트 (Student) t-검정에 의해 수행하였다.

[0153] 항-PDGFR β 항체를 사용한 단계요법의 항종양 효과를 연구하기 위해, 마우스를 1B3, 정상 인간 IgG, 또는 염수로 매주 2회 복강내 주사에 의해 처리하였다. SK-OV-3 모델에서, 종양-보유 마우스에게 1B3을 6, 20, 또는 60 mg/kg 투여량으로 투여하였다. 2가지의 보다 적은 투여량의 1B3으로 처리된 마우스에서 종양 성장 억제가 관찰되지 않았다 (도 3A). 60 mg/kg에서, 1B3은 처리 개시 후 29일까지 종양 성장을 완전히 차단하였고 (P=0.0028), 그 후 종양은 연속적인 항체 처리에도 불구하고 인간 IgG-처리된 대조군과 유사한 속도로 빠르게 성장하기 시작하였다 (도 3A). 1B3 (60 mg/kg 투여량에서)은 또한 OV-CAR-8 및 NCI-H460 이종이식편 모델 모두에서 유의한 항종양 활성을 보였다: 1B3은 처리 과정 동안 OV-CAR-8 종양의 성장을 거의 완전히 차단하였고 (도 3B) (P=0.0022), NCI-H460 종양의 성장을 유의하게 느리게 하였다 (도 3F) (P<0.05). 그 반면에, 1B3 (40 mg/kg로 매주 3회 또는 60 mg/kg로 매주 2회)는 BxPC3, OV-CAR-5 및 Caki-1 이종이식편 모델에서 임의의 항종양 활성을 보이지 않았다 (도 3C, 3D 및 3E). 1B3 처리는 검사된 6개의 모든 모델에서 체중 및 동물 행동의 변화를 포함하여 임의의 명백한 독성을 야기하지 않았다.

[0154] 종양 이종이식편 모델에서 1B3에 의한 항-VEGFR2 항체인 DC101의 항종양 및 항-혈관신생 활성의 향상. 항-VEGFR2 항체의 항종양 및 항-혈관신생 활성은 다수의 동물 모델에서 입증되었다 (Prewett, M. et al., 1999, Cancer Res. 59:5209-18). 본 실시예에서는 2개의 이종이식편 모델, 즉, BxPC-3 (췌장 암종) 및 NCI-H460 (비-소세포 폐 암종)을 사용하여 1B3이 DC101의 항종양 및 항-혈관신생 활성을 향상시킬 수 있음을 입증한다. 300-350 mm³ 크기의 이종이식된 종양을 보유하는 무흉선 누드 마우스를 무작위로 분류하고 4개의 처리군 (n=12/군)으로 나누고, 염수, 1B3 (40 mg/kg), DC101 (40 mg/kg), 또는 1B3 (40 mg/kg) + DC101 (40 mg/kg)로 매주 3회 복강내 주사에 의해 처리하였다. 예상한 바와 같이, DC101 처리는 BxPC3 및 NCI-H460 이종이식편 모두의 성장을 유의하게 억제하였다 (각각 P=0.0001 및 <0.0001) (도 4A 및 4B). 1B3을 사용한 단계요법은 NCI-H460 모델에서 적당한 항종양 활성을 나타냈지만 (처리 후 22일에 T/C% = 66%, P=0.0062), BxPC3 이종이식편에서 임의의 항종양 활성을 보이지 않았다. 1B3 및 DC101의 조합은 BxPC3 모델에서 종양 억제를 유의하게 향상시켰고, 요법의 끝에서 T/C%는 항체 조합물을 투여한 마우스에서 27.3%이었고, 이는 DC101 단독으로 처리한 마우스에서의 38.7%와 비교되었다 (P=0.0346). 또한, 항체 조합군에서 12마리 중 7마리의 마우스 (58.3%)에서 종양 퇴행이 관찰되었고, 이는 DC101 단독 처리군에서 11마리 중 2마리의 마우스 (18.2%)와 비

교되었고, 1B3 단독을 투여한 마우스에서는 퇴행이 관찰되지 않았다. NCI-H460 모델에서, 1B3 + DC101은 또한 1B3 또는 DC101 단독보다 훨씬 더 강한 종양 억제 활성을 보였고, 처리 후 22일에, T/C%는 1B3 + DC101군에서 22%이었고, 이는 1B3군에서의 66%와 비교되었고 ($P < 0.0001$); 연구의 끝에 (처리 후 50일), 항체 조합군에서 평균 종양 부피는 DC101 단독 처리군보다 2배 더 작았다 ($813.9 \pm 127.8 \text{ mm}^3$ 대 $1660.9 \pm 554.4 \text{ mm}^3$) ($P = 0.025$). 항체 조합군에서는 사망이 없었지만, DC101군에서는 12마리 중 2마리의 마우스가 연구 동안 사망하였다 (1마리는 22일에, 다른 1마리는 43일에).

[0155] 종양 절편의 면역조직화학. 항체-처리 마우스로부터의 종양 이종이식편을 혈관 밀도 및 혈관 상의 혈관주위세포 덮임률 모두에 대해 면역조직화학 염색에 의해 검사하였다. 처리 후 34일 (BxPC3 모델) 또는 50일 (NCI-H460 모델)에, DC101 단체요법군 및 DC101/1B3 조합 요법군으로부터 각각 6마리 마우스를 안락사시켰다. 종양을 제거하고, 10% 중성 완충 포르말린 내에 4°C에서 밤새 고정시키고, 파라핀 포매시켰다. 고정된 종양을 Leica RM2135 마이크로톰 (microtome)으로 6 μm 두께의 절편으로 만든 후, 혈관 및 혈관주위세포/SMC 덮임률 모두에 대해 이중 염색하였다.

[0156] 종양 절편을 항-CD31 항체 (혈관 염색을 위해) 및 항- α -평활근 액틴 (α -SMA) 항체 (혈관주위세포 염색을 위해) 모두로 염색하였다. 절편을 먼저 래트 항-마우스 PECAM-1 (항-CD31 항체, 파밍겐 (Pharmingen, 미국 캘리포니아주 샌 디에고))와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 비오틴-SP-표지된 원숭이 항-래트 IgG 항체, 이어서 스트렙타비딘-Cy3 컨쥬게이트 (모두 잭슨 이뮤노리서치 제품)과 함께 인큐베이션하였다. 절편을 항- α -SMA 항체-FITC 컨쥬게이트 (시그마 (Sigma))로 추가로 염색하였다. 마지막으로, 절편을 ToPro (몰레큘라 프로브 (Molecular Probe, 네덜란드 레이덴))로 RT에서 5분 동안 역염색하였다.

[0157] 면역형광 영상 (200x 배율)을 공초점 현미경에 연결된 디지털 카메라 (Nikon Eclipse TE2000U)를 통해 EZ-C1 2.20 소프트웨어를 사용하여 획득하였다. 컴퓨터 보조 형태학적 정량은 Image Pro Plus 소프트웨어 (메디카 사이버네틱스 (MediaCybernetics, 미국 메릴랜드주 실버 스프링))를 사용하여 수행하고, 각각의 절편으로부터 분석하였다.

[0158] 각각의 절편으로부터 종양 주변부 및 종양 중심부의 5개의 디지털 영상을 총 CD31^+ 혈관, α -SMA $^+$ 혈관, 성숙 혈관 (이중 CD31^+ 및 α -SMA $^+$), 및 총 CD31^+ 혈관에 대한 이중 $\text{CD31}^+/\alpha$ -SMA $^+$ 의 백분율에 대해 계수하였다. 개별 종양 절편의 혈관분포도를 측정하기 위해 2가지 상이한 정량 방법을 사용하였다: 혈관 밀도 (혈관의 수/ mm^3) 및 혈관 면적의 백분율 (총 종양 면적에 대한 혈관 면적 %). 컴퓨터 보조 형태학적 정량은 Image Pro Plus 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 통계 분석을 위해, 2-웨이 ANOVA에 이은 피셔 LSD 방법을 다중 비교를 위해 사용하였다 (시그마 스타트 3.1 시스템 소프트웨어, 인크.).

[0159] DC101 처리는 BxPC3 종양 이종이식편에서 CD31^+ 혈관 밀도를 주로 종양 중심부 내에서 유의하게 감소시켰지만 (도 5A), α -SMA $^+$ 혈관 밀도에 대해서는 단지 약한 효과만을 보였다 (도 5B). DC101에 1B3를 추가하면 종양 중심부에서 혈관분포를 추가로 감소시키지 않았지만, 종양의 주변부에서 혈관 밀도의 감소를 유의하게 증가시켰다 (도 5A). 1B3 단독은 전체 종양 혈관 밀도에 대해 유의한 효과를 보이지 않았지만 (도 5A), 종양 주변부에서 α -SMA 염색을 감소시켰고 (도 5B), 이는 $\text{CD31}/\alpha$ -SMA 이중 양성 (성숙) 혈관의 백분율을 감소시켰다 (도 5C). 이것은 종양에서 PDGFR β -양성 혈관주위세포가 선택적으로 억제되었음을 나타낸다. 흥미롭게도, DC101 단독 및 DC101 + 1B3 처리된 종양 모두에서, CD31^+ 혈관의 감소도는 종양 중심부 및 주변부 모두에서 α -SMA $^+$ 혈관주위세포 덮임률의 감소와 직접적인 상관관계가 있다 (도 5A 및 B). 그 결과, 종양 주변부 및 중심부 모두에서 성숙 혈관의 백분율, 즉, 총 CD31^+ 혈관에 대한 이중 $\text{CD31}^+/\alpha$ -SMA $^+$ 혈관의 비율은 염수, DC101 단독, 또는 DC101 + 1B3으로 처리한 마우스로부터의 종양 사이에서 유의하게 상이한 것으로 보이지 않았다 (도 5C). NCI-H460 종양 이종이식편에서 또한 유사한 현상이 관찰되었다 (도 5D-F). 마지막으로, 총 종양 면적에 대한 혈관 면적의 백분율을 측정하는 대체 스코어링 방법을 사용하여 종양 혈관분포도를 결정할 때 두 종양 이종이식편 모두에서 거의 동일한 관찰이 얻어졌다 (제시하지 않음).

[0160] 인간 항-hPDGFR β 항체의 선택. 상기 설명된 파지 디스플레이 라이브러리를 인간 PDGFR β 에 결합하는 파지-Fab에 대해 스크리닝하였다. 1B3에 대해 상기 설명된 바와 같이, 선도 hPDGFR β -결합 클론인 2C5 (표 1)의 중쇄 및 경쇄 유전자를 코딩하는 DNA 서열을 PCR에 의해 증폭시키고, 인간 κ 경쇄 불변 구역 및 인간 $\gamma 1$ 중쇄 불변 구역을 함유하는 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 발현 벡터를 NS0 골수종 세포 내로 형질감염시키고,

2C5 항체를 발현하는 안정한 클론을 선택하였다.

[0161] BIAcore 분석에 의해 결정할 때, 2C5는 1B3이 mPDGFR β 에 결합하는 것과 유사한 결합 특성으로 hPDGFR β 에 결합한다. 1B3과 마찬가지로, 2C5는 PDGFR β 에 특이적이고, hPDGFR α 에 결합하지 않는다. 그러나, 1B3은 무린 PDGFR β 에 결합하지만 인간 PDGFR β 에 결합하지 않는 반면, 2C5는 두 단백질 모두에 결합한다 (도 6). 하나의 실험에서, 표면 플라즈몬 공명에 의해 결정된 2C5에 대한 K_d 값은 hPDGFR β 에 대해 1.36×10^{-11} M 및 mPDGFR β 에 대해 6.05×10^{-11} M이었다. hPDGFR β 에의 1B3 결합에 대한 K_d 는 4.17×10^{-11} M이었다.

[0162] 2C5는 또한 도 6에서 보이는 바와 같이 인간 및 마우스 PDGFR β 모두에 대한 PDGF-BB의 결합을 차단한다. IC_{50} 값은 hPDGFR β 에 대해 0.55 nM 및 mPDGFR β 에 대해 0.35 nM이었다.

[0163] 2C5는 세포 기반 분석에서 PDGF-BB-자극된 수용체 인산화 및 하류 신호전달을 억제한다. PDGFR β 인산화를 차단하는 2C5의 능력을 인간 Caki-1 종양 세포 (도 7) 및 마우스 NIH/3T3 및 D122 세포주 (도 8)에 대해 결정하였다. 2C5는 시험된 낮은 농도에서도 수용체 인산화를 차단하였다 ($IC_{50} \ll 1.8 \mu\text{g/ml}$). 2C5는 또한 Caki-1 세포 (도 7) 및 D122 세포 (도 8)에서 Akt 및 p44/42 MAP 키나제의 PDGF-BB-자극된 인산화를 강하게 억제하였다.

[0164] 종양 이종이식편 모델에서 항-PDGFR β 항체의 항종양 활성. 상기 설명된 5개의 인간 이종이식편 종양 모델 (OVCAR-5 및 OVCAR-8, BxPC3, NCI-H460, 및 Caki-1)을 사용하여 생체 내에서 2C5의 항종양 활성을 평가하였다. 종양의 인간 PDGFR β 수용체 및 혈관계의 마우스 수용체에 결합하여 억제하는 2C5를 마우스 혈관계에만 결합하는 1B3과 비교하였다. SKOV-3, OVCAR-8, 및 NCI-H460 모델에서 종양 성장의 중등도 감소가 관찰되었지만, OVCAR-5, BxPC3 및 Caki-1 모델에서는 관찰되지 않았다 (도 9; 표 2).

표 2

항-PDGFR β 항체 단제요법					
이종이식편	종양 부피				MFI
	1B3		2C5		(FACS)
	T/C%	P 값	T/C%	P 값	
SKOV-3 (29일)	57	0.0028	-	-	2
BxPC3	100	>0.05	100	>0.05	1
OVCAR-5	92	0.7	84	0.06	1
Caki-1	65	0.1004	91 49	0.6303 0.0733	10
OVCAR-8	43	0.0022	39	0.0014	5
NCI-H460	60	0.0235	60	0.0115	2

[0165]

[0166] 종양 이종이식편 모델에서 항-PDGFR β (2C5)/항-mVEGFR 2 (DC101) 항체 조합물의 항종양 활성. 인간 및 마우스 PDGFR β 수용체 (즉, 무린 숙주 내의 인간 이종이식편의 종양 및 혈관계 상의 PDGFR β 수용체)에 결합하는 2C5를 또한 마우스 VEGFR2에 특이적인 항체 (DC101)와 조합하여 종양 성장의 억제에 대해 시험하였다. 이종이식편 세포주는 BxPC-3, MIA-PaCa-2, Detroit-562, HCT-8, NCI-H460, NCI-H292, 및 HCT-116이었다. 2C5 및 DC101의 병용투여는 두 항체를 단독으로 사용한 것보다 종양 성장의 유의하게 더 큰 억제를 일으켰다 (도 10 및 표 3).

표 3

항-VEGFR2 항체와 조합한 항-PDGFRβ 항체				
항체	이종이식편	종양 모델	종양 부피 (조합 / DC101 %)	P 값
1B3 + DC101	BxPC-3	췌장	65	0.0346
	NCI-H460	NSCLC	48	0.1088
2C5 + DC101	Detriot562	편평 세포	65 (40일) 40 (74일)	0.1146
	BxPC-3	췌장	31	<0.0001
	MIA-PaCa2	췌장	49	0.1078
	MIA-PaCa2	췌장	75	0.4164
	MIA-PaCa LP (동소이식)	췌장	200 (무계)	0.1975
	HCT-8	결장	48 (30일) 121 (41일) 36 (49일)	- 0.001 -
	HCT-116	결장	80	0.001
	NCI-H460	NSCLC	61	<0.0001
	NCI-H292	NSCLC	73	0.3832

2C5는 세포 기반 이동 분석에서 PDGF-BB-자극된 세포 이동을 억제한다. 2-챔버 (chamber) 기술을 사용하여, NCI-H460, OVCAR8, WS-I 및 U-118 세포주를 사용한 세포 이동에서 2C5의 억제 능력을 결정하였다. 콜라겐 (100 µg/ml)을 상부 챔버 (100 µl) 및 하부 챔버 (150 µl)에 첨가하고, 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 챔버를 PBS로 2회 세척한 후, 100 µl의 영양 결핍 세포 (혈청 비함유 배지 내에 추정 0.5-1x10⁶/ml)를 상부 챔버에 첨가하고, 150 µl의 혈청 비함유 배지를 하부 챔버에 첨가한 후, 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. PDGF-BB 자극을 위해, PDGF-BB를 하부 챔버에 100 ng/ml의 최종 농도로 첨가하였다. 2C5 웰에서, 2C5를 상부 챔버에 30 µg/ml의 최종 농도로 첨가하였다. 상부 챔버 내의 이동하지 않은 세포를 막으로부터 스크래핑하였다. PBS로 3회 세척한 후, 하부 챔버 측면의 막 상의 이동한 세포를 4% 포르말린으로 고정시키고, Hoechst (4 µg/ml)로 염색하였다. 결과를 포획하고, 세포를 형광 현미경 하에 계수하였다. 30 µg/ml의 농도에서, 2C5는 분석에 사용된 4개의 모든 세포주에서 PDGF-BB-자극된 세포 이동을 완전히 억제하였다 (도 11).

종양 이종이식편 모델에서 항-PDGFRβ (2C5)/chemo 또는 항-PDGFRβ (2C5)/chemo/항-mVEGFR 2 (DC101) 항체 조합물의 항종양 활성. 항-PDGFRβ 항체 2C5를 또한 화학요법 (겔시타빈) 또는 화학요법 (겔시타빈, 파클리탁셀 또는 옥살리플라틴) + 항-VEGFR2 항체 (DC101)과 조합하여 종양 성장의 억제에 대해 시험하였다. 이종이식편 세포주는 NCI-H292, MIA-PaCa-2, NCI-H460 및 GEO이었다. 2C5 및 겔시타빈의 병용투여는 2C5 또는 겔시타빈 단독보다 종양 성장을 더 크게 억제하였다. 2C5, chemo 및 DC101의 병용투여는 chemo/DC101의 조합보다 종양 성장을 더 크게 억제하였다. (도 12 및 표 4).

표 4

Chemo 및 DC101/ Chemo와 조합한 항 - PDGFRβ 항체				
조합 (ref-ctl)	이종이식편	종양 모델	종양 부피 (조합 / ref-ctl %)	P 값
겔시타빈	NCI-H292	NSCLC	63	0.1753
DC101 + 겔시타빈	NCI-H292	NSCLC	90	0.5976
DC101 + 옥살리플라틴	GEO	결장	90	0.1759
DC101 + 파클리탁셀	NCI-H460	NSCLC	78	0.2692
DC101 + 겔시타빈	MIA-PaCa2	췌장	52	0.2399

종양 이종이식편 모델에서 항-PDGFRβ (2C5)/항-PDGFRα (hPDGFRα에 특이적인 3G3, 또는 mPDGFRα에 특이적인 IE10) 항체 조합물의 항종양 활성. 항-PDGFRβ 항체 2C5를 또한 항-PDGFRα 항체와 조합하여 종양 성장의 억제에 대해 시험하였다. 이종이식편 세포주는 Caki-1, HPAC 및 U-118MG이었다. 2C5 및 3G3의 병용투여는 두 항체를 단독으로 사용한 것보다 종양 성장을 유의하게 더 크게 억제하였다 (도 13 및 표 5).

표 5

항-PDGFR α 항체와 조합한 항-PDGFR β 항체				
조합 (ref-ctl)	이종이식편	종양 모델	종양 부피 (조합 / ref-ctl %)	P 값
1E10 (항-mPDGFR α)	Caki-1	신장	104	0.9037
	HPAC	췌장	56	0.0052
3G3 (항-hPDGFR α)	U-118MG	아교모세포종	45	0.0024
	U-118MG	아교모세포종	61	0.1346

PDGFR β , PDGF-BB 및 VEGF 발현에 대한 2C5 항체의 효과. NCI-H460 세포 현탁액 (5×10^5 세포/마우스)를 암컷 무흉선 마우스에 피하 주사하였다. 종양이 약 250 mm³에 도달했을 때, 마우스를 무작위로 분류하고, 4개의 처리군 (USP 염수, 2C5, DC101 및 2C5 + DC101에 대해 각각 n=35)으로 나누었다. -43일, 7일 및 14일에, 각각의 군으로부터 6마리 동물을 희생시키고, 그들의 종양을 수거하였다. 종양 용해물을 사용하여 ELISA 분석을 수행하여 PDGFR β , PDGF-BB, mVEGFR2, mVEGF, hVEGF, FGF 및 HIF-1 α 의 수준을 평가하였다 (도 14).

2C5는 PDGFR β 의 도메인 1 (D1) 및 도메인 2 (D2)에 결합한다. PDGFR β 및 PDGFR α 의 다양한 키메라 구성체를 먼저 N-말단에서 시작하여 C-말단까지 도메인 스와핑 (swapping)에 의해 제조하였고, PDGFR β 도메인(들)이 PDGFR α 도메인(들)을 대체하였다. PDGFR β / α 키메라를 2C5 결합 능력에 대해 시험하였다. 이어서, PDGFR β 상의 2C5 결합 도메인을 확인하기 위해 D1D2, D2D3 및 D1D2D3을 포함한 PDGFR β 의 보다 짧은 버전을 제조하였다. 결과는 2C5가 수용체의 D1 및 D2 모두를 통해 PDGFR β 에 결합함을 나타낸다 (도 15 및 표 6).

표 6

항 - PDGFR β 항체의 에피토프 매핑 (mapping)												
	1 β 4 α	2 β 3 α	3 β 2 α	4 β 1 α	h5 β	m5 β	h5 α	h2 β / α	m2 β / α	β 1-2	β 1-3	β 2-3
2C5	X	✓	✓	✓	✓	✓	X	X	X	✓	✓	X
PDGF-AA	✓	✓ (약한)	X	X	X	X	✓	✓ (약한)	✓ (약한)	X	X	X
PDGF-BB	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓ (약한)	✓ (약한)	X	✓	X

도면의 간단한 설명

도 1은 항-PDGFR β 항체인 1B3에 대한 정량적 수용체 결합 및 차단 분석을 도시한 것이다. (A) 정제된 Fab 단편 또는 전장 1B3 IgG를 mPDGFR β /Fc-코팅된 플레이트에 첨가하고 (1 μ g/ml), RT에서 1 h 동안 인큐베이션하였다. 플레이트-결합된 항체를 염소 항-인간- κ 항체-HRP를 사용하여 검출하였다. (B) 1B3 항체 또는 Fab를 먼저 고정량의 mPDGFR β /Fc (50 ng)와 혼합하고, RT에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 혼합물을 PDGF-BB로 예비코팅된 플레이트로 옮기고 (0.5 μ g/ml), RT에서 1 h 동안 인큐베이션하였다. 플레이트-결합된 mPDGFR β /Fc를 염소 항-인간 Fc 항체-HRP 컨쥬게이트를 사용하여 검출하였다. IMC-1121은 인간 VEGFR2에 대해 생성된 항체이다. 데이터는 삼중 샘플의 평균 \pm SD를 나타낸다.

도 2는 항체 1B3이 세포 표면 PDGFR β 에 결합함으로써 야기되는, PDGF-BB-유도된 수용체 인산화 및 하류 신호 전달 분자인 MAPK 및 Akt의 억제를 도시한 것이다. (A) 항-PDGFR β 항체 1B3 및 항-인간 Fc 항체-FITC 컨쥬게이트와 함께 인큐베이션한, NIH/3T3 (섬유모세포), D122 (루이스 (Lewis) 폐 암종), 4T1 (유방암), B16 (흑색종) 및 H5V (PmT-형질전환된 내피세포) 세포의 FACS 분석. (B) NIH-3T3 세포에서 PDGF-BB-유도된 수용체 인산화의 억제. (C) D122 세포에서 PDGF-BB-유도된 수용체 인산화의 억제. (D) D122 세포에서 AKT 및 p44/42 MAP 키나제의 PDGF-BB-자극된 인산화의 억제.

도 3은 생체 내에서 인간 이종이식편 종양의 성장에 대한, 항-mPDGFR β 항체인 1B3을 사용한 처리의 효과를 보여준다. 6개의 이종이식편 모델, 즉 SK-OV-3, OV-CAR-8, BxPC-3, OV-CAR-5, Caki-1 및 NCI-H460 (각각 A 내지 F)를 사용하여 무흉선 누드 마우스에서 이종이식편 종양에 대한 1B3의 효과를 검사하였다. 확립된 종양 (약 250-300 mm³)을 갖는 마우스를 무작위로 분류하고, 표시된 투여량에서 복강내 주사에 의해 매주 2회 (마우스를 매주 3회 처리한 BxPC-3 모델 제외) 1B3, 정상 인간 IgG, 또는 염수로 처리하였다. 종양 부피를 매주

2회 측정하고, 평균±SEM으로 제시한다. *1은 중병으로 인한 마우스 1마리의 손실을 나타낸다. 1B3은 마우스 PDGFRβ에는 결합하지만 인간 PDGFRβ에는 결합하지 않는다. 따라서, 처리에 대해 관찰된 반응은 숙주 세포의 자극의 억제로 인한 것이다.

[0018] 도 4는 생체 내에서 인간 이종이식편 종양의 성장에 대한, 항-mPDGFRβ 항체인 1B3, 및 항-mVEGFR2 항체인 DC101을 사용한 조합 처리의 효과를 보여준다. BxPC-3 (A) 또는 5×10^6 NCI-H460 (B)의 피하 이종이식편을 암컷 무흉선 (nu/nu) 마우스 내에 확립하였다. 종양이 약 300-350 mm³에 도달했을 때, 마우스를 무작위로 분류하고, 4개의 군 (n = 12)으로 나누고, USP 염수, 40 mg/kg의 1B3, 40 mg/kg의 DC101 또는 40 mg/kg 1B3 + 40 mg/kg DC101로 매주 3회 처리하였다. 종양 부피를 매주 2회 측정하고, 평균±SEM으로 제시한다. *1은 중병으로 인한 마우스 1마리의 손실을 나타낸다. 1B3은 마우스 PDGFRβ에는 결합하지만 인간 PDGFRβ에는 결합하지 않는다. DC101은 마우스 VEGFR2에는 결합하지만 인간 VEGFR2에는 결합하지 않는다. 따라서, 처리에 대해 관찰된 반응은 숙주 세포의 자극의 억제로 인한 것이다.

[0019] 도 5는 1B3, DC101, 또는 DC101 + 1B3으로 처리한 후 인간 이종이식편의 면역조직화학 분석의 결과를 나타낸다. 처리 후 34일 (BxPC3 모델, 패널 A 내지 C) 또는 50일 (NCI-H460 모델, 패널 D 내지 F)에, 각각의 군으로부터 6마리 마우스를 희생시키고, 종양을 IHC 분석을 위해 처리하였다. 종양을 절편으로 만들고, 혈관 (항-CD31) 및 혈관주위세포/SMC 염입물 (α-SMA, 패널 B 및 E) 모두에 대해 이중 염색하였다. 각각의 절편으로부터 종양 주변부 및 종양 중심부의 5개의 디지털 면역형광 영상을 획득하고, 총 CD31⁺ 혈관 (패널 A 및 D), α-SMA⁺ 혈관 (패널 B 및 E), 및 총 CD31⁺ 혈관에 대한 이중 CD31⁺/α-SMA⁺의 백분율 (패널 C 및 F)에 대해 정량하였다. 개별 종양 절편의 혈관분포도를 측정하기 위해 2가지의 상이한 정량 방법을 사용하였다: 혈관 밀도 (혈관의 수/mm³) 및 혈관 면적의 백분율 (총 종양 면적에 대한 혈관 면적 %). 통계 분석을 위해, 2-웨이 ANOVA에 이은 피셔 (Fisher) LSD 방법을 다중 비교를 위해 사용하였다 (시그마 스타트 3.1 시스타트 소프트웨어, 인크. (Sigma Stat 3.1 Systat Software, Inc., 미국 캘리포니아주 포인트 리치먼드)). * 염수군에 비해 P < 0.05. 빈 막대, 종양 주변부; 속이 찬 막대, 종양 중심부.

[0020] 도 6은 PDGFRβ-특이적 인간 항체 2C5에 의한, 인간 PDGFRβ 및 뮤린 PDGFRβ에 대한 수용체 결합 및 리간드 (PDGF-BB)의 차단을 도시한 것이다. 결합 및 리간드 차단을 뮤린 PDGFRβ에만 결합하는 PDGFRβ-특이적 항체 1B3과 비교한다.

[0021] 도 7은 항-PDGFRβ 항체 2C5에 의한, 인간 Caki-1 종양 세포에서 PDGFRβ의 리간드 (PDGF-BB) 유도된 인산화의 억제를 입증하는 웨스턴 블롯 (Western blot)이다. 항체는 Akt 및 P44/42의 인산화를 또한 억제한다.

[0022] 도 8은 항-PDGFRβ 항체 2C5에 의한, 마우스 NIH-3T3 및 D122 세포주에서 PDGFRβ의 리간드 (PDGF-BB) 유도된 인산화의 억제를 입증하는 웨스턴 블롯을 보여준다.

[0023] 도 9는 항-PDGFRβ 항체 1B3 (뮤린 PDGFRβ에 특이적) 및/또는 2C5 (인간 및 뮤린 PDGFRβ 모두에 결합함)로 처리한 누드 마우스 내에서 6개의 피하 인간 이종이식편 종양의 성장을 도시한 것이다.

[0024] 도 10은 항-PDGFRβ 항체 2C5 (인간 및 뮤린 PDGFRβ 모두에 결합함) 및 뮤린 VEGFR-2 특이적 항체 (DC101)로 처리한 누드 마우스 내에서 6개의 피하 인간 이종이식편 종양의 성장을 도시한 것이다.

[0025] 도 11은 2C5가 PDGF-BB-자극된 세포 이동을 억제하는 것을 입증하는, 세포 기반 이동 분석의 결과를 보여준다.

[0026] 도 12는 종양 이종이식편 모델에서 2C5/화학요법 조합 및 2C5/화학요법/DC101 요법의 항종양 활성을 보여준다.

[0027] 도 13은 종양 이종이식편 모델에서 2C5/3G3 및 2C5/1E10 조합 요법의 항종양 활성을 보여준다.

[0028] 도 14는 PDGFRβ, PDGF-BB, VEGF 및 FGF 발현에 대한 2C5의 효과를 보여준다.

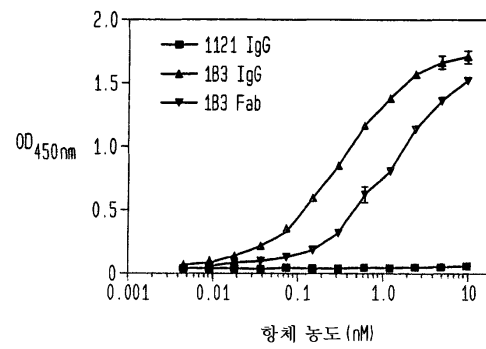
[0029] 도 15는 PDGFRβ 도메인에 대한 2C5의 결합을 보여준다.

[0030] 도 16은 CDR을 밑줄로 표시한 1B3의 가변 중쇄 및 가변 경쇄의 DNA 및 아미노산 서열을 보여준다.

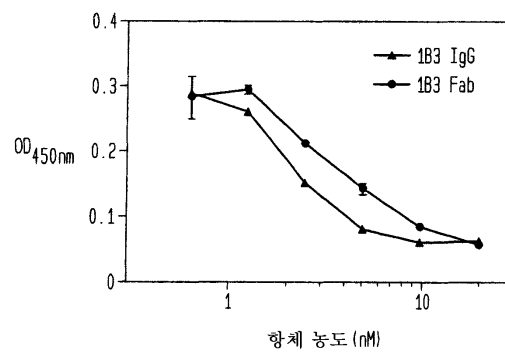
[0031] 도 17은 CDR을 밑줄로 표시한 2C5의 가변 중쇄 및 가변 경쇄의 DNA 및 아미노산 서열을 보여준다.

도면

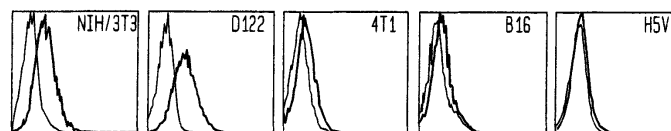
도면1A



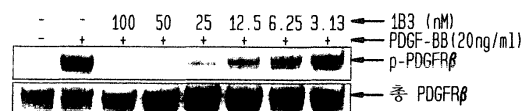
도면1B



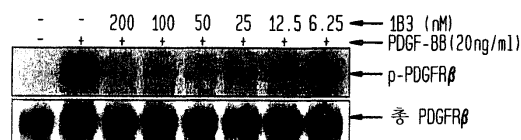
도면2A



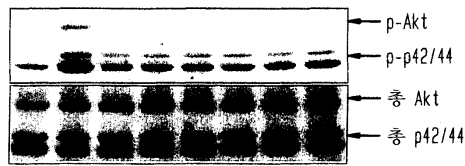
도면2B



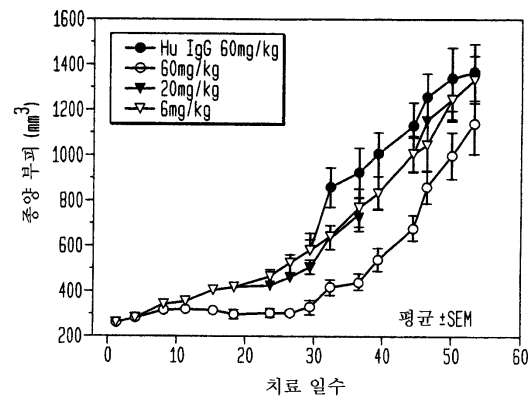
도면2C



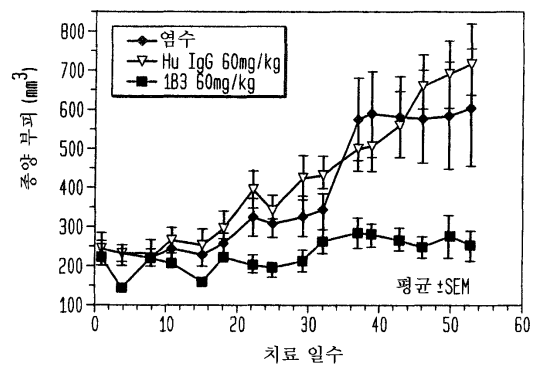
도면2D



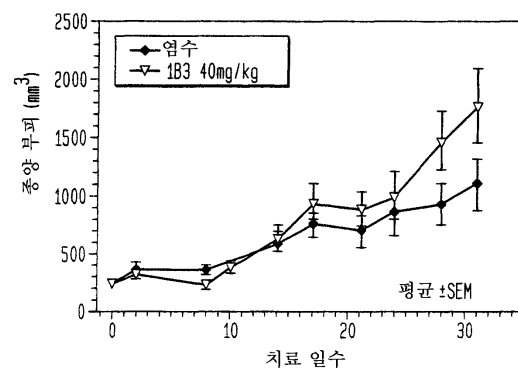
도면3A



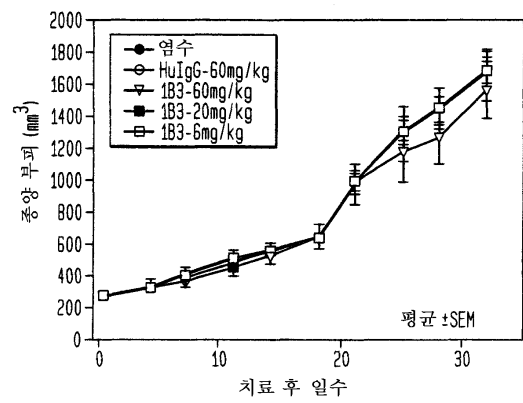
도면3B



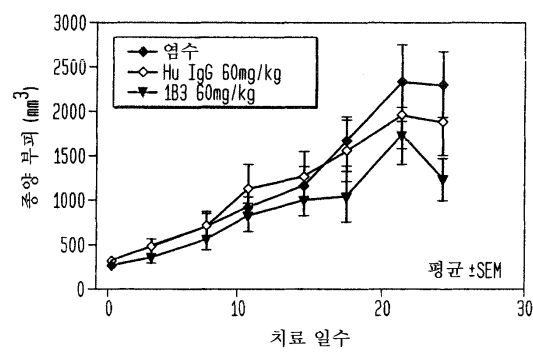
도면3C



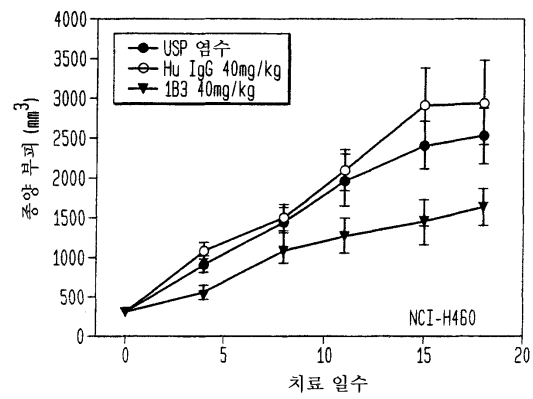
도면3D



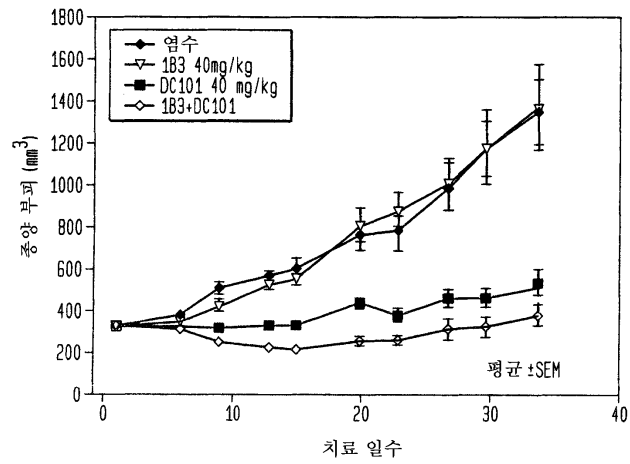
도면3E



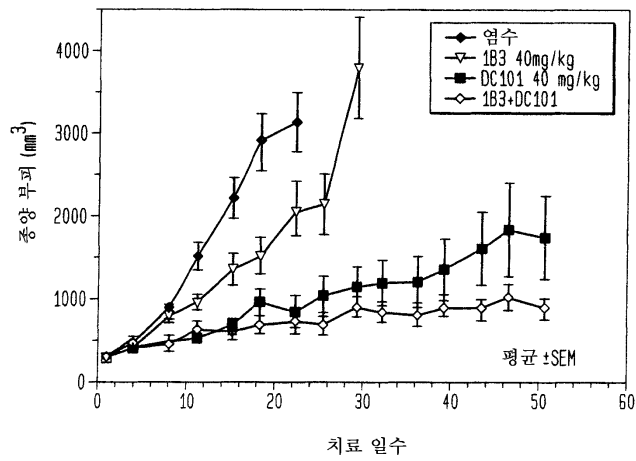
도면3F



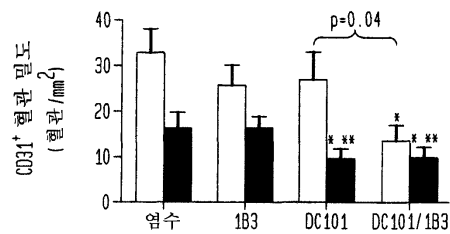
도면4A



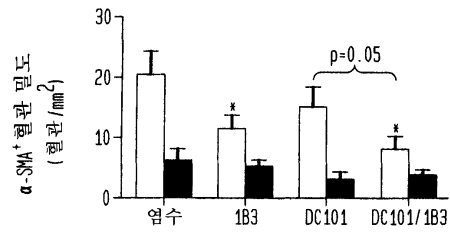
도면4B



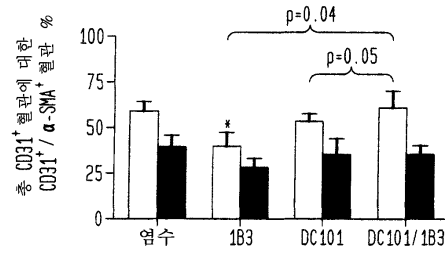
도면5A



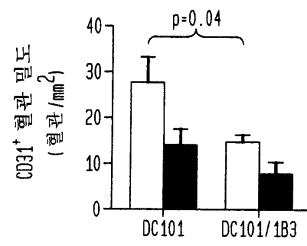
도면5B



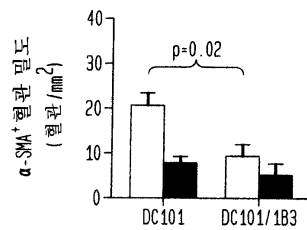
도면5C



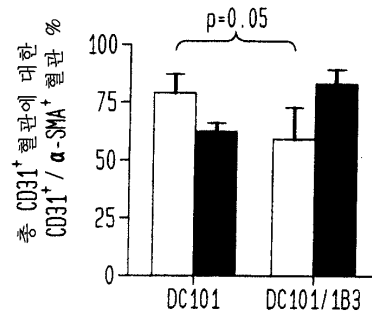
도면5D



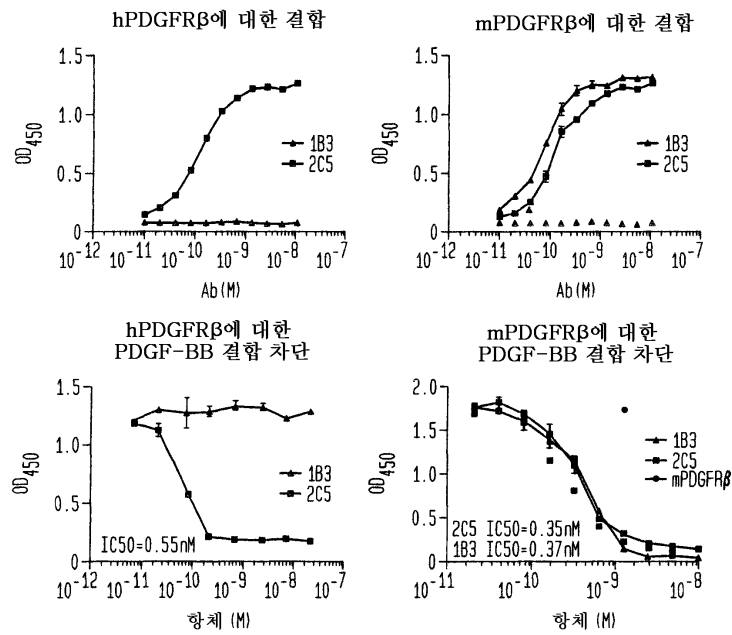
도면5E



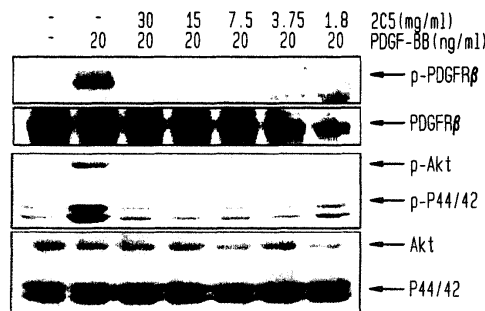
도면5F



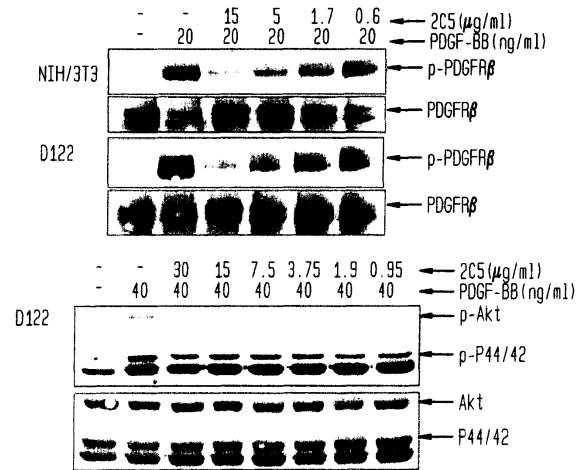
도면6



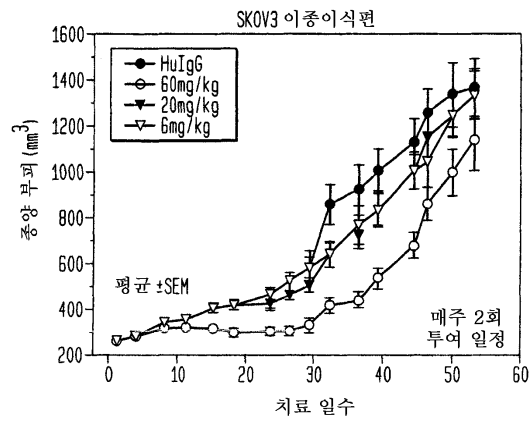
도면7



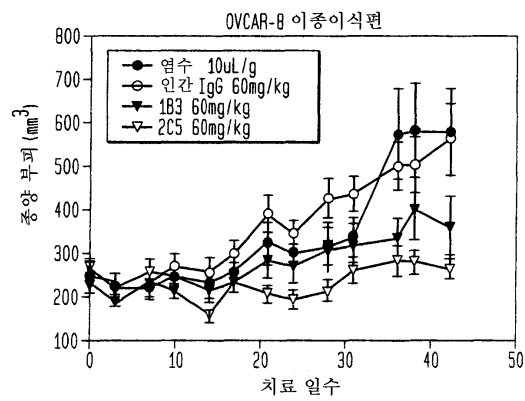
도면8



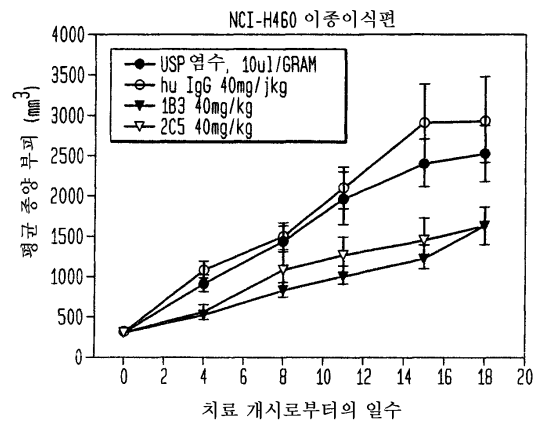
도면9A



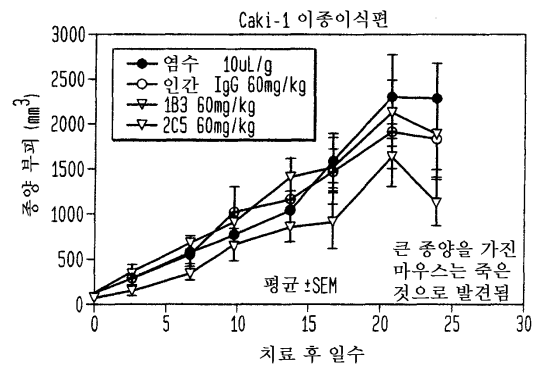
도면9B



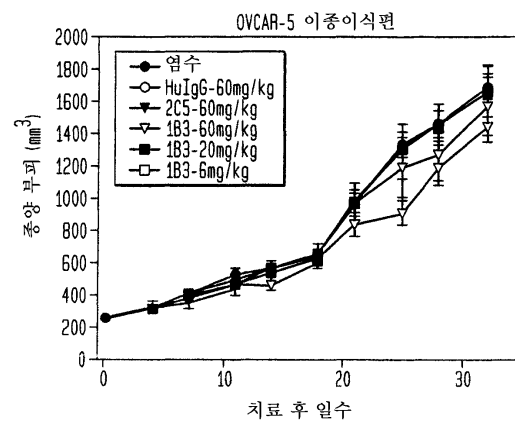
도면9C



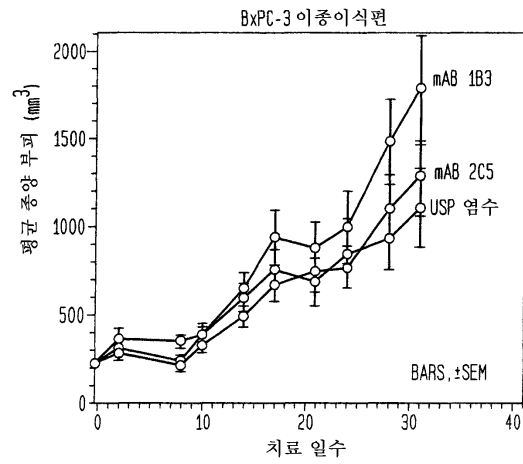
도면9D



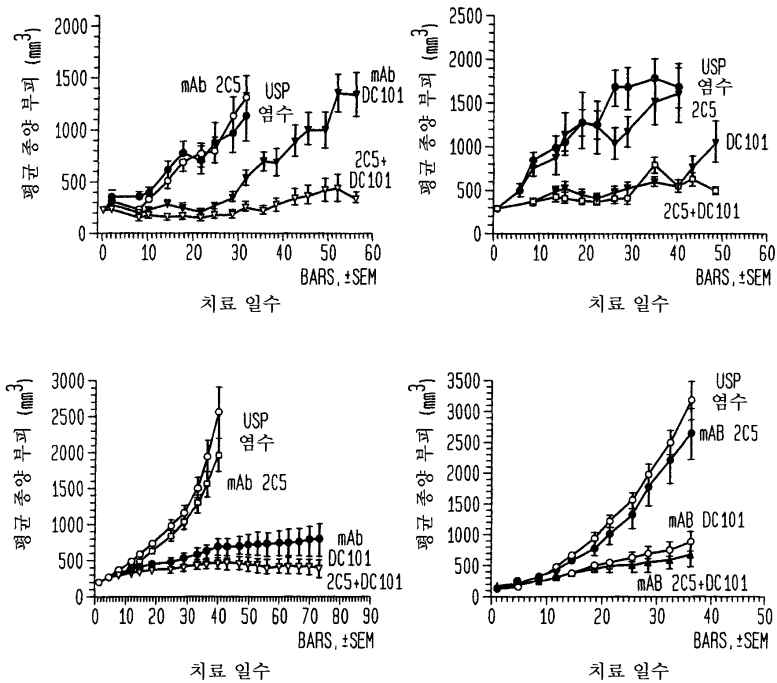
도면9E



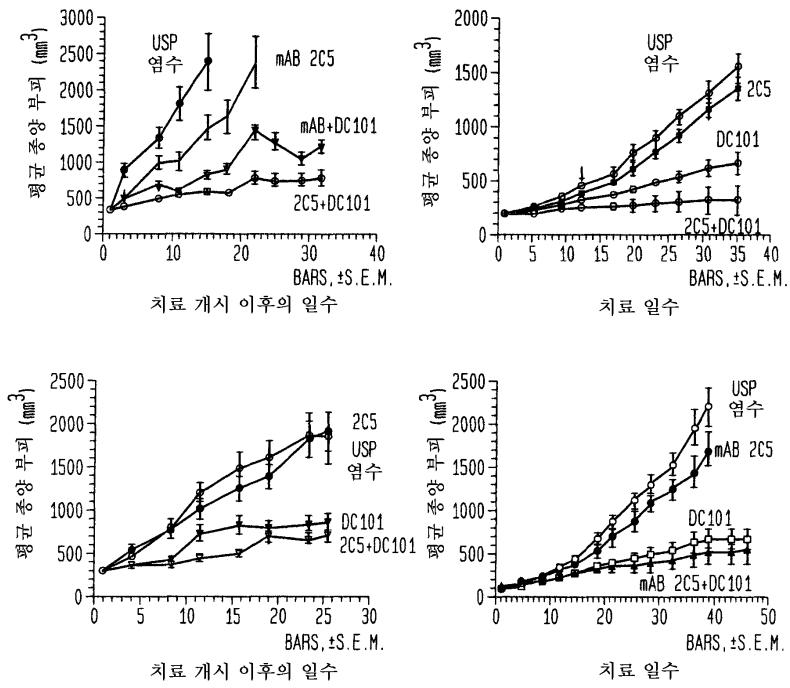
도면9F



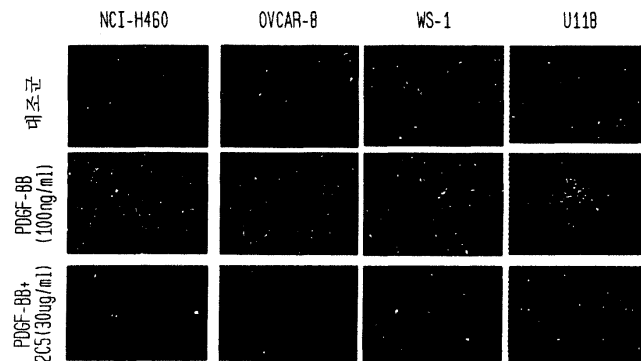
도면10A



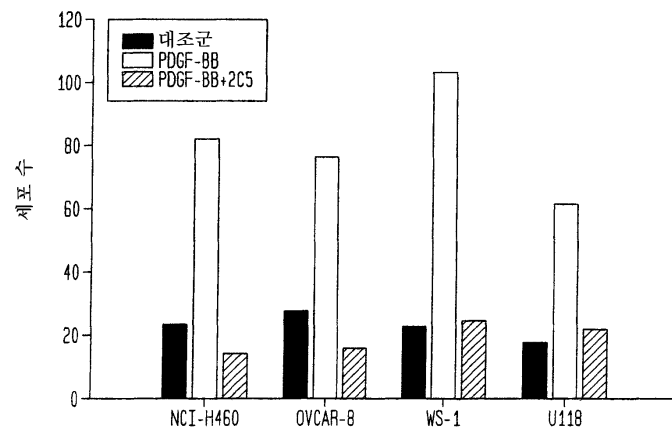
도면10B



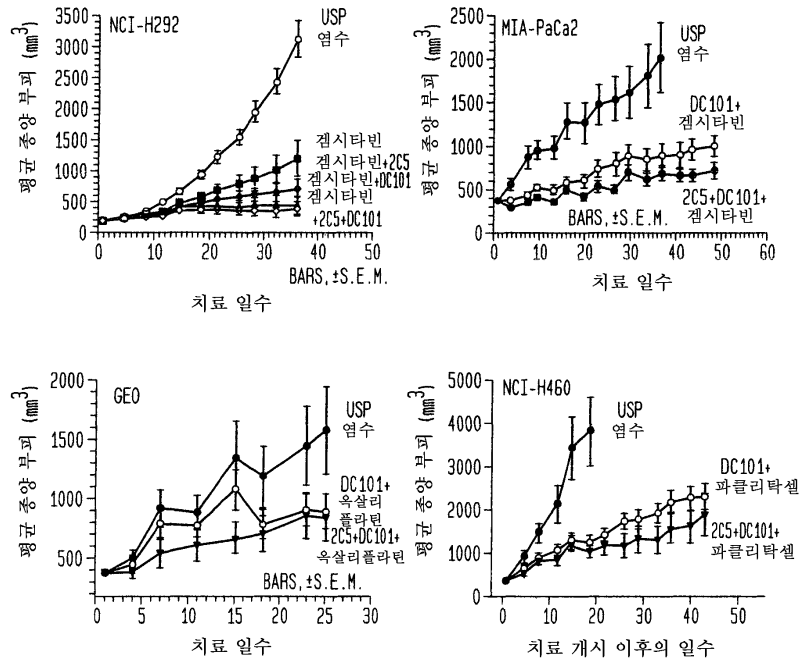
도면11



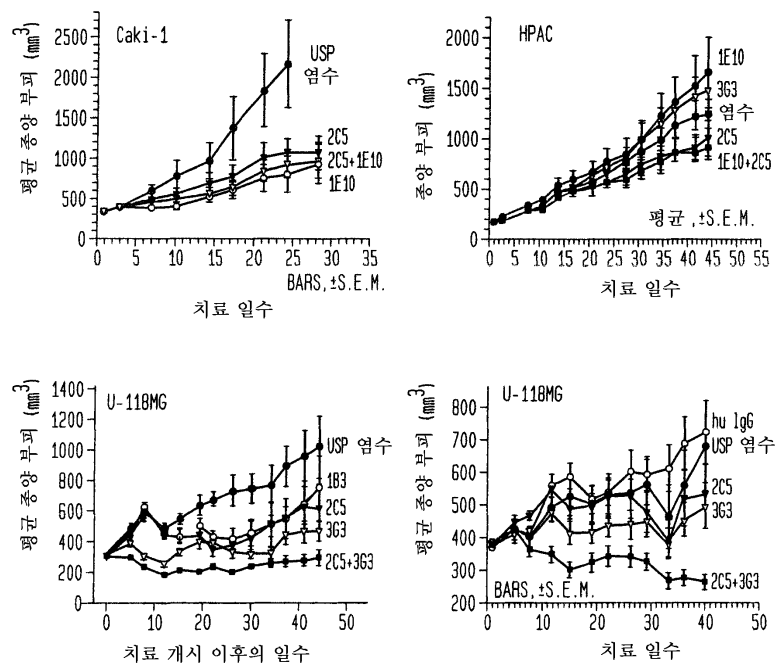
2C5는 PDGF-BB에 의해 자극된 세포 이동을 억제한다



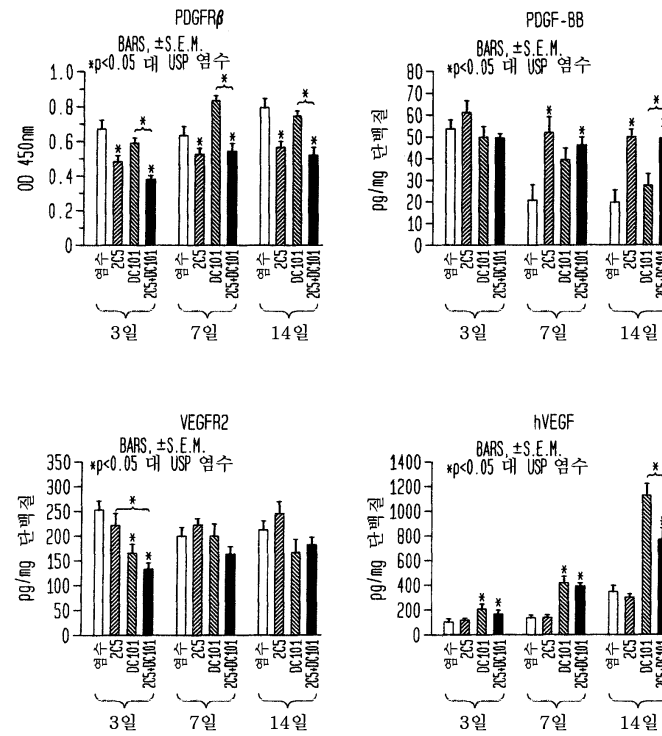
도면12



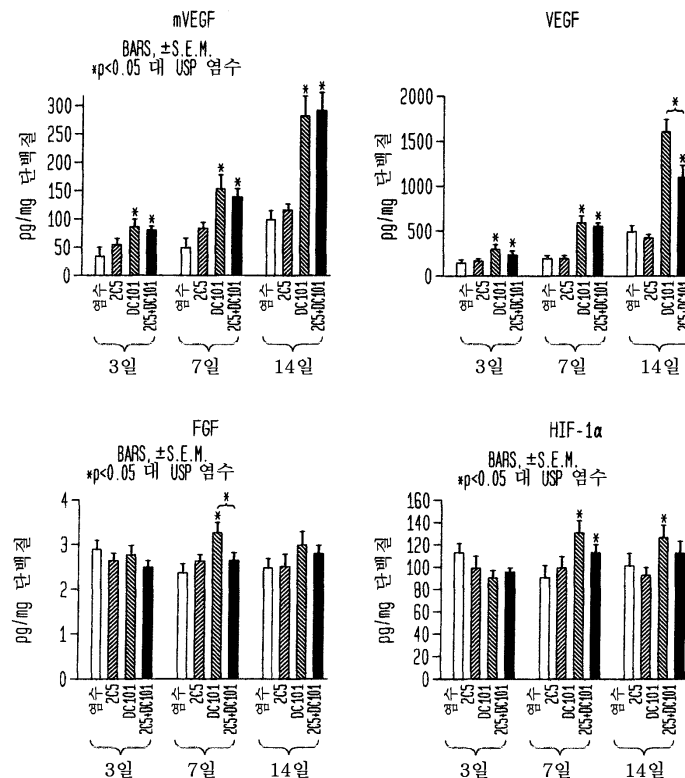
도면13



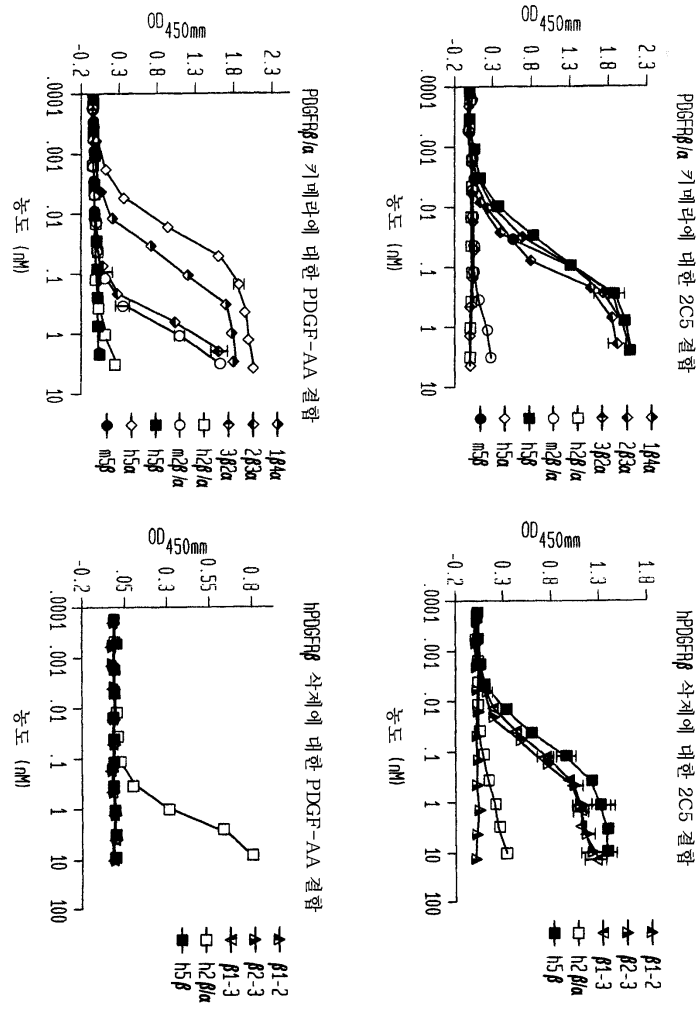
도면14A



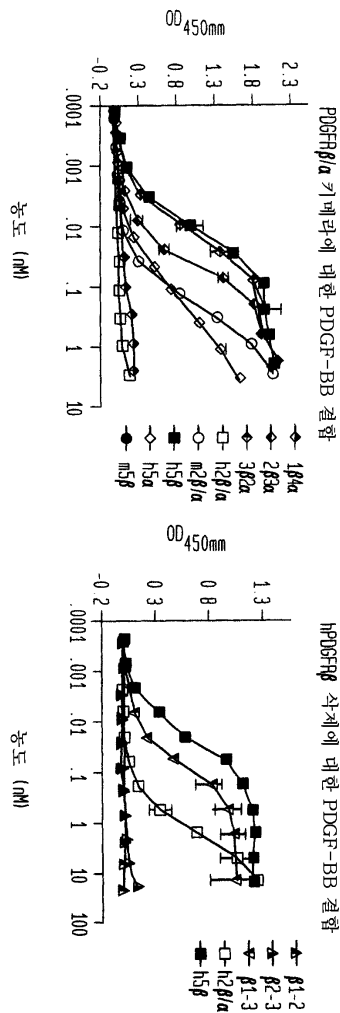
도면14B



도면15A



도면15B



도면16

183의 서열 정보:

183 VH의 DNA:

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGGGAGGCCCTGGTCAAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCT
GTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCATGAAGTGGGTCGCCAGGCTCCAGGGAA
GGGGCTGGAGTGGGTCTCATCATTAGTAGTAGTACATATACACGAGACTCCGTG
AAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGCAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCC
TGAGAGCCGAGGACACGGCGTGTATTACTGTGCGAAAGGGGGGCGCCGCTCCTAGTCTTTGA
CTTCTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCAAGC

183 VH의 단백질:

QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSNNVVRQAPGKLEWVSSTSSSSSYTY
YADSVKGRFTISRDNKNTLYQMNSLRVEDTAVYYCAKGGPPLLVFDFWGGGLTVTVSS

183 VL의 DNA:

GAAATTGTGATGACACAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGGCCACCTCT
CCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCA
GGCTCCAGGGCTCCTCATCTATGATGCATCCAAGAGGGCCACCGCATCCAGCCAGGTTCACT
GGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCACCTAGAGTCTGAAGATTCTGCAG
TTTATTACTGTCAACAACGTGGCTACTGCGCTCCATCACCTTCGGCCAAGGACACGACTGGA
GATTAACGA

183 VL의 단백질:

EIVMTQSPGTLSPGERATLSCRASQSYSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASKRATGI
PARFSGSGSGDFLTITSTLESDSAVYYCQPGYMPPLTFGGGTLEIKR

도면17

2C5 의 서열 정보:

2C5 VH 의 DNA:

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGTCTCCTG
CAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAG
GGCTTGAGTGGATGGGAAGGATCATCCCTATCCTTGGTATAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCAG
GGCAGAGTCACGATTACCGCGGACAAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAG
ATCTGAGGACACGGCCGTCTATTACTGTGCGAGAGATATGGGTTCAAGGAATTATTATTACTTCT
ACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCAAGC

2C5 VH 의 단백질:

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGDTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGIANYAQKFQ
GRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDMGSRNYYFYWGQGLTVTVSS

2C5 VL 의 DNA:

GAAATTGTGCTGACTCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTC
CTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCAGGTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTC
CCAGGCTCCTCATCTATGGTGCAATCCAACAGGGCCACTGGCATCCAGCCAGGTTTCACTGGCAGT
GGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTA
CTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

2C5 VL 의 단백질:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGRYLANVQKPGQAPRLLIYGASNRTGIPARFSGS
GSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIK

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ImClone LLC
Zhu, Zhenping

<120> PDGFR-beta-Specific Antibody

<130> 11245/55301

<160> 46

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 354

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<400> 1

cag gtg cag ctg cag gag tcg ggg gga ggc ctg gtc aag cct ggg ggg 48

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

1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca tcc att agt agt agt agt agt tac ata tac tac gca gac tcc gtg 192
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gcc gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aaa ggg ggg cgc ccg ctc cta gtc ttt gac ttc tgg ggc cag gga 336
Ala Lys Gly Gly Arg Pro Leu Leu Val Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

acc ctg gtc acc gtc tca 354
Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 2
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile 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 Gly Gly Arg Pro Leu Leu Val Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 3
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(15)

<400> 3
agc tat agc atg aac
Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

15

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 5
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(51)

<400> 5
tcc att agt agt agt agt tac ata tac tac gca gac tcc gtg aag 48
Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

ggc 51
Gly

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(30)

<400> 7

ggg ggg cgc ccg ctc cta gtc ttt gac ttc 30
Gly Gly Arg Pro Leu Leu Val Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Gly Arg Pro Leu Leu Val Phe Asp Phe
1 5 10

<210> 9

<211> 330

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(330)

<400> 9

gaa att gtg atg aca cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

atc tat gat gca tcc aag agg gcc acc ggc atc cca gcc agg ttc agt 192
Ile Tyr Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc acc cta gag 240

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Thr Leu Glu
65 70 75 80

tct gaa gat tct gca gtt tat tac tgt cag caa cgt ggc tac tgg cct 288
Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Gly Tyr Trp Pro
85 90 95

ccc atc acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa cga 330
Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 10
<211> 110
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Glu Ile Val Met 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 Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Thr Leu Glu
65 70 75 80

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Gly Tyr Trp Pro
85 90 95

Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 11
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(36)

<400> 11
 agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc tac tta gcc 36
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 12
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12

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

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(21)

<400> 13
 gat gca tcc aag agg gcc acc 21
 Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr
 1 5

<210> 14
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Asp Ala Ser Lys Arg Ala Thr
1 5

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(30)

<400> 15

cag caa cgt ggc tac tgg cct ccc atc acc 30
Gln Gln Arg Gly Tyr Trp Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Gln Gln Arg Gly Tyr Trp Pro Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 17

<211> 360

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 17

cag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc 48
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1	5	10	15	
tcg gtg aag gtc tcc tgc aag gct tct gga ggc acc ttc agc agc tat				96
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr				
	20	25	30	
gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg				144
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met				
	35	40	45	
gga agg atc atc cct atc ctt ggt ata gca aac tac gca cag aag ttc				192
Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe				
	50	55	60	
cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac aaa tcc acg agc aca gcc tac				240
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr				
	65	70	75	80
atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtc tat tac tgt				288
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys				
	85	90	95	
gcg aga gat atg ggt tca agg aat tat tat tac ttc tac tgg ggc cag				336
Ala Arg Asp Met Gly Ser Arg Asn Tyr Tyr Tyr Phe Tyr Trp Gly Gln				
	100	105	110	
gga acc ctg gtc acc gtc tca agc				360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser				
	115	120		

<210> 18
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18

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 Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr			
	20	25	30

Ala 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 Ile 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 Asp Met Gly Ser Arg Asn Tyr Tyr Tyr Phe Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 19
<211> 15
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(15)

<400> 19
agc tat gct atc agc
Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

15

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 21
<211> 51
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(51)

<400> 21
agg atc atc cct atc ctt ggt ata gca aac tac gca cag aag ttc cag 48
Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

ggc 51
Gly

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 23
<211> 33
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(33)

<400> 23
gat atg ggt tca agg aat tat tat tac ttc tac 33
Asp Met Gly Ser Arg Asn Tyr Tyr Tyr Phe Tyr
1 5 10

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Asp Met Gly Ser Arg Asn Tyr Tyr Tyr Phe Tyr
1 5 10

<210> 25
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 25
gaa att gtg ctg act cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt ggc agg tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Arg Tyr
20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

tat ggt gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc 192
Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240

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

gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg cct ctc 288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 26
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

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 Gly Arg Tyr
20 25 30

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

Tyr Gly 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> 27
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(33)

<400> 27
 agg gcc agt cag agt gtt ggc agg tac tta gcc 33
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Arg Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

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

<210> 29
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(21)

<400> 29
 ggt gca tcc aac agg gcc act 21
 Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
 1 5

<210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 31
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(27)

<400> 31
cag cag cgt agc aac tgg cct ctc act 27
Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 33
<211> 348
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(348)

<400> 33
gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggc ctg gtc aag cct ggg ggg 48

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

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc agt agc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

agc atg aac tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg gtc 144
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca tcc att agt agt agt agt agt tac ata tac tac gca gac tca gtg 192
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac tca ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aga gtc aca gat gct ttt gat atc tgg ggc caa ggg aca atg gtc 336
Ala Arg Val Thr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

acc gtc tca agc 348
Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

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

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Val Thr Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 35
gaa att gtg atg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc 144
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

tat gat tca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc aga ttc agt ggc 192
Tyr Asp Ser Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tat tac tgt cta cag cat aac act ttt cct ccg 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Thr Phe Pro Pro
85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 36
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Glu Ile Val Met 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 Ser 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 Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Thr Phe Pro Pro
- 58 -

85

90

95

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

<210> 37
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)

<400> 37
gac atc cag atg acc cag tct cca tct tcc gtg tct gca tct ata gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15

gac aga gtc acc atc act tgt cgg gcg agt cag ggt att gac aac tgg 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asp Asn Trp
20 25 30

tta ggc tgg tat cag cag aaa cct ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc 144
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tac gat gca tcc aat ttg gac aca ggg gtc cca tca agg ttc agt gga 192
Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Asp Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca tat ttt act ctc acc atc agt agc ctg caa gct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

gaa gat ttt gca gtt tat ttc tgt caa cag gct aaa gct ttt cct ccc 288
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ala Lys Ala Phe Pro Pro
85 90 95

act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gac atc aaa 321
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 38
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 38

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ala Lys Ala Phe Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105

<210> 39
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(348)

<400> 39

cag gtc aaa ctg cag cag tct ggg gca gag ctt gtc aag cca ggg gcc 48
Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca gtc aag ttg tcc tgc aca gct tct ggc ttc aac att aaa gac acc 96
Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

tat ata cac tgg gtg aag cag agc cct gaa cag ggc ctg gag tgg att 144
Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Ser Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

gga agg atc gat cct ccg aat gat aat act aaa tat gac ccg aag ttc 192
Gly Arg Ile Asp Pro Pro Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

cag ggc aag gcc act ata aca gca gac aca tcc tcc aat aca gcc tac 240
Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

atg cag ctc cgc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc tat tac tgt 288
Met Gln Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcc ctc cca ccg ttc tac ttt gac tac tgg ggc cat ggc acc acg gtc 336
Ala Leu Pro Pro Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Thr Val
100 105 110

acc gtc tcc tca 348
Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 40

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

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

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

Gly Arg Ile Asp Pro Pro Asn Asp Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Leu Pro Pro Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 41
<211> 327
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(327)

<400> 41
gac atc gag ctc act cag tct cca aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

gac agg gtc agc gtc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg gat act aat 96
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn
20 25 30

gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa gca ctg att 144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile

35	40	45														
tac tcg gca tcc tac cgg tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc																192
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly																
50 55 60																
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc aat gtg cag tct																240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser																
65 70 75 80																
gaa gac ttg gca gag tat ttc tgt cag caa tat aac agc ttt cct tac																288
Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Tyr																
85 90 95																
acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg gcg																327
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala																
100 105																
<210> 42																
<211> 109																
<212> PRT																
<213> Mus musculus																
<400> 42																
Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly																
1 5 10 15																
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Asp Thr Asn																
20 25 30																
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile																
35 40 45																
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly																
50 55 60																
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser																
65 70 75 80																

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
100 105

<210> 43
<211> 378
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(378)

<400> 43
cag gcg cag gtg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag tct ggg agg 48
Gln Ala Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Ser Gly Arg
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc gcc ttc agt agc tac 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca gtt ata tgg tat gat gga agt aat aaa tac tat gca gac tcc gtg 192
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

agg ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc gag aac acg ctg tat 240
Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acc gct gtg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcc aga gat cac tat ggt tcg ggg gtg cac cac tat ttc tac tac ggt 336
Ala Arg Asp His Tyr Gly Ser Gly Val His His Tyr Phe Tyr Tyr Gly
100 105 110

ctg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc tca 378
 Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 44
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

Gln Ala Gln Val Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Ser Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Glu 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 Tyr Gly Ser Gly Val His His Tyr Phe Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 45
 <211> 324

<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 45
gaa att gtg ttg acg cag tct cca ggc acc ctg tct ttg tct cca ggg 48
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc agc 96
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

tac tta gcc tgg tac cag cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc 144
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

atc tat ggt gca tcc agc agg gcc act ggc atc cca gac agg ttc agt 192
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc aga ctg gag 240
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

cct gaa gat ttt gca gtg tat tac tgt cag cag tat ggt agc tca ccg 288
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

ctc act ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag atc aaa 324
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 46
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
- 66 -

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 Pro			
	85	90	95
Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	