



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0031459
(43) 공개일자 2015년03월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 47/48 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7002807(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2006년03월02일
심사청구일자 2015년03월04일
- (62) 원출원 특허 10-2013-7015784
원출원일자(국제) 2006년03월02일
심사청구일자 2013년07월18일
- (85) 번역문제출일자 2015년02월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2006/007547
- (87) 국제공개번호 WO 2006/096487
국제공개일자 2006년09월14일
- (30) 우선권주장
60/659,339 2005년03월07일 미국(US)
- (71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
- (72) 발명자
아쉬케나지, 아비, 제이.
미국 94402 캘리포니아주 샌 마테오 테리타운 스트
리트 1456
매커, 해더
미국 94303 캘리포니아주 팔로 알토 로마 베르드
에비뉴 733 씨
- (74) 대리인
양영준, 이귀동

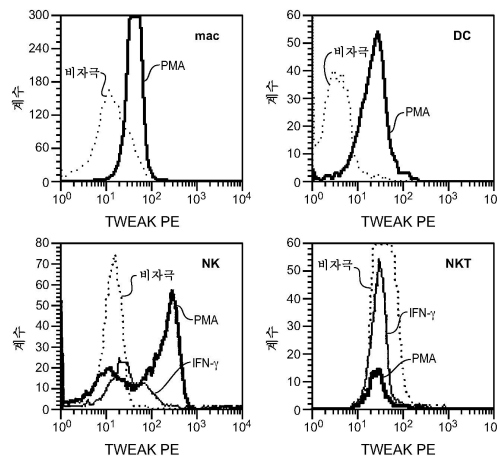
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 TWEAK 및 FN14 활성을 조절하는 방법 및 조성물

(57) 요약

TWEAK 및 TWEAK 수용체의 활성을 조절하는 효능제 및 길항제를 제공한다. 본 발명의 방법, 조성물 및 키트는 암 및 면역-관련 질환과 같은 질병 치료에 사용될 수 있다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

길항제 분자를 포함하는, 포유동물에서 암을 치료하기 위한 제약 조성물로서, 여기서 상기 길항제 분자는 항-TWEAK 항체, 항-TWEAK 수용체 항체 및 TWEAK 수용체 면역어드레신 중 1종 이상이고, 이때 TWEAK 수용체는 FN14 수용체이며,

상기 길항제 분자는 TWEAK 수용체의 세포내 신호전달을 차단하거나 방해하여 포유동물에서의 선천성 T_H1 반응 또는 활성을 증진시키고 암을 치료하는 것인 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 포유동물이 화학요법, 방사선, 프로드럭, 세포독성제, 또는 성장 저해제에 추가로 노출되는 것인 제약 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 TWEAK 수용체 면역어드레신이 면역글로불린의 Fc 영역에 융합된 TWEAK 수용체 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 TWEAK 수용체 서열이 FN14 수용체의 세포외 도메인 서열을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항-TWEAK 항체가 도 11 (서열 1)의 아미노산 94-249를 포함하는 인간 TWEAK 폴리펩티드에 결합하는 것인 제약 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 항-TWEAK 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체인 제약 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 항-TWEAK 수용체 항체가 도 12 (서열 2)의 아미노산 서열을 포함하는 인간 FN14 수용체 폴리펩티드에 결합하는 것인 제약 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 항-TWEAK 수용체 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체인 제약 조성물.

명세서

기술분야

관련출원

본 출원은 2005년 3월 7일 출원된 미국 가출원 번호 제60/659,339호에 대한 우선권을 주장하고, 그의 개시 내용은 본원에 참고로 인용한다.

본 발명은 TWEAK 및 TWEAK 수용체의 활성을 조절하는 효능제 및 길항제를 제공한다. 더욱 특히, 본 발명은 면역 세포상의 TWEAK 및/또는 TWEAK 수용체의 활성을 조절하기 위하여 사용될 수 있는 방법, 조성물 및 키트, 및 암과 같은 질병 및 면역-관련 질환의 치료를 위한 방법, 조성물 및 키트를 제공한다.

배경기술

종양 괴사 인자 (TNF) 상위계열에 속한 다양한 리간드 및 수용체는 당업계에서 동정되었다. 상기 리간드에는

종양 괴사 인자-알파 ("TNF-알파"), 종양 괴사 인자-베타 ("TNF-베타" 또는 "림포톡신-알파"), 림포톡신-베타 ("LT-베타"), CD30 리간드, CD27 리간드, CD40 리간드, OX-40 리간드, 4-1BB 리간드, LIGHT, Apo-1 리간드 (Fas 리간드 또는 CD95 리간드로도 언급됨), Apo-2 리간드 (Apo2L 또는 TRAIL로도 언급됨), Apo-3 리간드 (TWEAK로도 언급됨), APRIL, OPG 리간드 (RANK 리간드, ODF, 또는 TRANCE로도 언급됨), 및 TALL-1 (BlyS, BAFF 또는 THANK로도 언급됨)이 있다 (예를 들면, [Ashkenazi, *Nature Review*, 2:420-430 (2002)]; [Ashkenazi and Dixit, *Science*, 281:1305-1308 (1998)]; [Ashkenazi and Dixit, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11:255-260 (2000)]; [Golstein, *Curr. Biol.*, 7:750-753 (1997)]; [Wallach, *Cytokine Reference*, Academic Press, 2000, pages 377-411]; [Locksley et al., *Cell*, 104:487-501 (2001)]; [Gruss and Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995)]; [Schmid et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83:1881 (1986)]; [Dealtry et al., *Eur. J. Immunol.*, 17:689 (1987)]; [Pitti et al., *J. Biol. Chem.*, 271:12687-12690 (1996)]; [Wiley et al., *Immunity*, 3:673-682 (1995)]; [Browning et al., *Cell*, 72:847-856 (1993)]; [Armitage et al. *Nature*, 357:80-82 (1992)], WO 97/01633 (1997년 1월 16일자로 공개됨); WO 97/25428 (1997년 7월 17일자로 공개됨); [Marsters et al., *Curr. Biol.*, 8:525-528 (1998)]; [Chicheportiche et al., *Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997)]; [Hahne et al., *J. Exp. Med.*, 188:1185-1190 (1998)]; WO 98/28426 (1998년 7월 2일자로 공개됨); WO 98/46751 (1998년 10월 22일자로 공개됨); WO 98/18921 (1998년 5월 7일자로 공개됨); [Moore et al., *Science*, 285:260-263 (1999)]; [Shu et al., *J. Leukocyte Biol.*, 65:680 (1999)]; [Schneider et al., *J. Exp. Med.*, 189:1747-1756 (1999)]; 및 [Mukhopadhyay et al., *J. Biol. Chem.*, 274:15978-15981 (1999)] 참조).

[0005]

상기 TNF 계열 리간드에 의해 매개되는 다양한 세포 반응의 유도는 전형적으로 특이적 세포 수용체와의 결합에 의해 개시된다. 현재까지 동정된 TNF 수용체 상위계열의 구성원은 TNFR1, TNFR2, TAC1, GITR, CD27, OX-40, CD30, CD40, HVEM, Fas (Apo-1 또는 CD95로도 언급됨), DR4 (TRAIL-R1로도 언급됨), DR5 (Apo-2 또는 TRAIL-R2로도 언급됨), DcR1, DcR2, 오스테오포테케린 (OPG), RANK 및 Apo-3 (DR3 또는 TRAMP로도 언급됨)이다 (예를 들면, [Ashkenazi, *Nature Reviews*, 2:420-430 (2002)]; [Ashkenazi and Dixit, *Science*, 281:1305-1308 (1998)]; [Ashkenazi and Dixit, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11:255-260 (2000)]; [Golstein, *Curr. Biol.*, 7:750-753 (1997)]; [Wallach, *Cytokine Reference*, Academic Press, 2000, pages 377-411]; [Locksley et al., *Cell*, 104:487-501 (2001)]; [Gruss and Dower, *Blood*, 85:3378-3404 (1995)]; [Hohman et al., *J. Biol. Chem.*, 264:14927-14934 (1989)]; [Brockhaus et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:3127-3131 (1990)]; 유럽 특허 제417,563호 (1991년 3월 20일자로 공개됨); [Loetscher et al., *Cell*, 61:351 (1990)]; [Schall et al., *Cell*, 61:361 (1990)]; [Smith et al., *Science*, 248:1019-1023 (1990)]; [Lewis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88:2830-2834 (1991)]; [Goodwin et al., *Mol. Cell. Biol.*, 11:3020-3026 (1991)]; [Stamenkovic et al., *EMBO J.*, 8:1403-1410 (1989)]; [Mallett et al., *EMBO J.*, 9:1063-1068 (1990)]; [Anderson et al., *Nature*, 390:175-179 (1997)]; [Chicheportiche et al., *J. Biol. Chem.*, 272:32401-32410 (1997)]; [Pan et al., *Science*, 276:111-113 (1997)]; [Pan et al., *Science*, 277:815-818 (1997)]; [Sheridan et al., *Science*, 277:818-821 (1997)]; [Degli-Esposti et al., *J. Exp. Med.*, 186:1165-1170 (1997)]; [Marsters et al., *Curr. Biol.*, 7:1003-1006 (1997)]; [Tsuda et al., *BBRC*, 234:137-142 (1997)]; [Nocentini et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94:6216-6221 (1997)]; [vonBulow et al., *Science*, 278:138-141 (1997)] 참조).

[0006]

이들 TNF 수용체 계열 구성원의 대부분은 세포외 영역, 막횡단 영역 및 세포내 영역을 비롯한 전형적인 구조의 세포 표면 수용체를 공유하는 반면, 다른 것은 천연에서 막횡단 도메인 및 세포내 도메인이 없는 가용성 단백질로서 발견된다. 전형적인 TNFR의 세포외 부분은 NH₂-말단에서 시작하여 다중 시스테인-풍부 도메인 (CRD)의 반복 아미노산 서열 패턴을 함유한다.

[0007]

몇몇 TNF 리간드 계열 구성원과 그와 관련된 수용체(들) 사이의 상호작용이 면역계내의 다양한 작용에 영향을 줄 수 있다. 상기 리간드/수용체의 상호작용의 일례로, 예를 들면, B 세포가 항체 생산 세포로 분화되는 것을 촉진시키는, CD40 수용체에 결합하는 CD40 리간드[Grewal et al., *Immunol. Res.*, 16:59-70 (1997)], 예를 들면, 모낭 수지상 세포의 분화 상태를 조절함으로써 체액 면역 반응에 영향을 주는, 림포톡신-베타 수용체에 결합하는 림포톡신-베타 리간드[Mackay and Browning, *Nature*, 395:26-27 (1998)], 및 예를 들면, T 세포 신호에 대한 B 세포의 반응을 조절하는, OX40 수용체에 결합하는 OX40 리간드[Flynn et al., *J. Exp. Med.*, 188:297-304 (1998)]를 포함한다. 면역계에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있는 다른 리간드/수용체 쌍은 TNF-알파/TNFR-1 및 Fas 리간드/Fas를 포함한다.

[0008] "TWEAK" 또는 "Apo-3 리간드"로도 언급되는 TNF 계열 리간드는 문헌에 기재되어 있다 (예를 들면, WO98/05783; WO98/35061; WO99/19490; US2002/0015703 참조). 문헌에서 TWEAK 리간드는 형질전환된 세포주에서의 상대적으로 약한 아포프토시스 유도자로서 보고되었다([Chicheportiche et al., J. Biol. Chem., 272:32401-32410 (1997)]; [Marsters et al., Curr. Biol., 8:525-528 (1998)]). 정제된 가용성 TWEAK 단백질을 사용하여 HT29 샘암종 세포, HeLa 자궁경부 암종 세포, 및 A375 흑색종 세포를 비롯한 일부 종양 세포의 분화 및/또는 사멸을 유도하였다. TWEAK 는 또한 HT29 및 A375 세포주가 케모카인 IL-8을 분비하도록 유도하였고, 섬유모세포 세포주, WI-38에도 동일한 효과를 나타내었다 [Chicheportiche et al., J. Biol. Chem., 272:32401-32410 (1997)]. 추가로, TWEAK는 다양한 정상 내피 세포주의 증식 및 래트의 혈관 형성을 유도함으로써 행해지는 혈관형성 조절과 관련성을 갖는다 ([Lynch et al., J. Interferon Cytokine Res. 18: A-46 (1998)]); [Jakubowski et al., J. Cell. Sci., 115:267-274 (2002)]; [Lynch et al., J. Biol. Chem., 274:8455-8459 (1999)]).

[0009] 마우스 및 인간 조직, 예로서, 심장, 뇌, 폐, 간에서, 다른 조직, 및 림프관 기관, 예로서, 지라, 및 림프절 중에서의 TWEAK mRNA의 발현은 기재된 바 있다. TWEAK는 또한 인간 말초 혈액 단핵구상에서 발현되고, 그의 발현은 이후의 IFN-감마 자극을 증가시킨다 [Nakayama et al., J. Exp. Med., 192:1373-1380 (2000)].

[0010] TWEAK에 대한 추정적 수용체는 앞서 문헌에 기재되어 있다 [Marsters et al., Curr. Biol. 8: 525-528 (1998)]. TRAMP, Apo-3, WSL-1, DR3, 또는 LARD로서도 언급되는 이러한 수용체는 TNFR 계열의 구성원이다. TRAMP의 활성화가 캐스파제-의존성 세포 사멸 신호 경로, 또는 NF- κ B 신호 경로를 통한 세포 활성화를 사용함으로써 아포프토시스를 유도한다고 보고된 바 있다. [Ashkenazi and Dixit, Science, 281:1305-1308 (1998)]. 현재는, TRAMP/Apo-3/DR3이 실제로는 TWEAK에 대하여 생리학상의 고친화성 수용체일 수는 없다고 여겨지고 있다.

[0011] TWEAK와 결합하는 또다른 수용체로서 일명 Fn-14 또한 동정되었다. Fn-14는 섬유모세포 성장 인자-유도성의 14-kDa 단백질이고 [Wiley et al., Immunity, 15:837-846 (2001)], 이는 세포내 도메인중의 TRAF 결합 모티프와 함께 세포외 도메인중의 오직 하나의 시스템이 풍부한 도메인을 포함하는, 간접적으로 관련되어 있는 TNFR 계열의 구성원이다. 이러한 수용체를 통해 작용하는 TWEAK는 NF-KB2 p100 과정 및 장기간 지속되는 NF-KB 활성화를 유도한다 [Saitoh et al., J. Biol. Chem., 278:36005-36012 (2003)].

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] **발명의 요약**

[0013] TNF 리간드 계열의 구성원인 TWEAK는 전염증성 사이토카인으로서 작용하는 것으로 여겨지고 있다. 하기 실시예에 나타난 바와 같이, TWEAK는 선천적 염증 반응 뿐만 아니라, 선천 면역으로부터 T_H1 적응 면역으로의 전이를 단축시키는 데에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 효능적 또는 길항적 방식으로 상기 활성(들)을 조절함으로써, 다양한 질병, 예로서, 암 또는 면역 관련 용태를 치료할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 TWEAK 및/또는 TWEAK 수용체와 결합하고, 예를 들면, 효능적 또는 길항적 방식으로 TWEAK 및/또는 TWEAK 수용체의 활성을 조절하는 조성물을 제공한다. 예로서, TWEAK 및/또는 TWEAK 수용체의 활성을 차단시키거나 중화시키기 위하여 TWEAK 또는 TWEAK 수용체 길항제가 사용될 수 있다. 상기 조성물, 및 상기 조성물을 사용하는 방법은 암 및 자가면역 질병을 비롯한 다양한 질병을 치료하기 위하여 사용될 수 있다. 일례로, 과도한 선천성 및/또는 적응 면역계 질병과 관련된 병증을 저해하는, 포유동물내의 자연 살해(NK) 세포의 효능 및 갯수를 증진시키기 위하여 면역 세포상의 TWEAK와 결합하고, TWEAK의 활성을 중화시키거나 차단시키는 길항적 항체가 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 TWEAK 및/또는 TWEAK 수용체와 결합하는 단클론 항체, 가용성 TWEAK-수용체-Ig 융합 단백질, 또는 TWEAK 및/또는 TWEAK 수용체의 활성에 대하여 길항작용을 할 수 있는 기타 분자들을 포함한다.

[0015] 본 발명은 치료학적 유효량의 TWEAK 길항제 및 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 예로서, 암 또는 감염을 비롯한 질병을 치료하는 방법을 제공한다. TWEAK 길항제는 TWEAK 리간드에 대한 항체; TWEAK 수용체에 대한 항체; TWEAK 리간드와 TWEAK 수용체의 결합을 변화시키는 제제; 및 TWEAK 수용체의 세포내 신호전달을 방해할 수 있는 제제를 포함한다. 바람직한 실시태양에서, 항체는 단클론 항체이다. 더욱 바람직한

실시태양에서, 단클론 항체는 TWEAK 리간드에 대한 것이다. TWEAK 길항제는 TWEAK 리간드에 선택적으로 결합할 수 있는 리간드 결합 도메인을 갖는 가용성 TWEAK 수용체일 수 있다. 하나의 실시태양에서, 가용성 TWEAK 수용체는 인간 면역글로불린 IgG 도메인을 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명은 추가로, 유효량의 TWEAK 길항제, 및 임의로 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 선천성 T_H1 반응 또는 활성을 증진시키는 방법을 포함한다.

[0017] 본 발명은 추가로, 유효량의 TWEAK 길항제, 및 임의로 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 NK 세포 활성을 증진시키는 방법을 포함한다.

[0018] 추가의 실시태양에서, 예로서, TWEAK 및/또는 TWEAK 수용체의 활성을 자극시키거나 증진시키기 위하여 TWEAK 또는 TWEAK 수용체 효능제가 사용될 수 있다. 본 발명은 TWEAK 및/또는 TWEAK 수용체와 결합하고, TWEAK 및/또는 TWEAK 수용체의 활성을 자극시키거나 증진시키는 조성물을 제공한다. 상기 조성물, 및 상기 조성물을 사용하는 방법은 면역-관련 질환, 예로서, 자가 면역 질환을 비롯한 다양한 질병을 치료하기 위하여 사용될 수 있다. 일례로, T_H1-유도 자가 면역 질환, 예로서, 크론병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 및 관절염을 호전시키기 위해 TWEAK 수용체와 결합하고, TWEAK 수용체의 활성을 자극시키거나 증진시키는 효능적 항체가 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명은 치료학적 유효량의 TWEAK 또는 TWEAK 수용체 효능제 및 허용가능한 담체를 포함하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 면역-관련 용태를 치료하는 방법을 제공한다. TWEAK 효능제는 TWEAK 수용체에 대한 항체일 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 항체는 단클론 항체이다. 더욱 바람직한 실시태양에서, 단클론 항체는 TWEAK 수용체에 대한 것이다.

[0020] 하기의 예시적인 청구범위에 의해 추가의 실시태양을 설명하지만, 그로써 제한하고자 하는 것은 아니다:

[0021] 1. 포유동물의 암 세포를 유효량의 길항제 분자에 노출시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 길항제는

[0022] a) 항-TWEAK 항체;

[0023] b) 항-TWEAK 수용체 항체;

[0024] c) TWEAK 수용체 면역어드헤신; 및

[0025] d) TWEAK 수용체의 세포내 신호전달을 차단하거나 방해하는 작용제 또는 분자로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 암을 치료하는 방법.

[0026] 2. 제1항에 있어서, 상기 TWEAK 수용체 면역어드헤신이 면역글로불린의 Fc 영역에 융합된 TWEAK 수용체 서열을 포함하는 것인 방법.

[0027] 3. 제2항에 있어서, 상기 TWEAK 수용체 서열이 FN14 수용체의 세포외 도메인 서열을 포함하는 것인 방법.

[0028] 4. 제1항에 있어서, 상기 항-TWEAK 항체가 도 11의 아미노산 94-249를 포함하는 인간 TWEAK 폴리펩티드에 결합하는 것인 방법.

[0029] 5. 제4항에 있어서, 상기 항-TWEAK 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체인 방법.

[0030] 6. 제1항에 있어서, 상기 항-TWEAK 수용체 항체가 도 12의 아미노산 서열을 포함하는 인간 FN14 수용체 폴리펩티드에 결합하는 것인 방법.

[0031] 7. 제6항에 있어서, 상기 항-TWEAK 수용체 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체인 방법.

[0032] 8. 제1항에 있어서, 상기 포유동물의 암 세포를 추가로 화학요법, 방사선, 프로드럭, 세포독성제, 또는 성장 저해제에 노출시키는 방법.

[0033] 9. 유효량의 길항제 분자를 포유동물에 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 길항제는

[0034] e) 항-TWEAK 항체;

[0035] f) 항-TWEAK 수용체 항체;

[0036] g) TWEAK 수용체 면역어드헤신; 및

[0037] h) TWEAK 수용체의 세포내 신호전달을 차단하거나 방해하는 작용제 또는 분자로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 포유동물에서 NK 세포 활성을 증진시키는 방법.

- [0038] 10. 제9항에 있어서, 상기 TWEAK 수용체 면역어드헤신이 면역글로불린의 Fc 영역에 융합된 TWEAK 수용체 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0039] 11. 제10항에 있어서, 상기 TWEAK 수용체 서열이 FN14 수용체의 세포외 도메인 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0040] 12. 제9항에 있어서, 상기 항-TWEAK 항체가 도 11의 아미노산 94-249를 포함하는 인간 TWEAK 폴리펩티드에 결합하는 것인 방법.
- [0041] 13. 제12항에 있어서, 상기 항-TWEAK 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체인 방법.
- [0042] 14. 제9항에 있어서, 상기 항-TWEAK 수용체 항체가 도 12의 아미노산 서열을 포함하는 인간 FN14 수용체 폴리펩티드에 결합하는 것인 방법.
- [0043] 15. 제14항에 있어서, 상기 항-TWEAK 수용체 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체인 방법.
- [0044] 16. 유효량의 길항제 분자를 포유동물에 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 길항제는
- [0045] i) 항-TWEAK 항체;
- [0046] j) 항-TWEAK 수용체 항체;
- [0047] k) TWEAK 수용체 면역어드헤신; 및
- [0048] l) TWEAK 수용체의 세포내 신호전달을 차단하거나 방해하는 작용제 또는 분자로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 포유동물에서 선천성 T_H1 반응 또는 활성을 증진시키는 방법.
- [0049] 17. 제16항에 있어서, 상기 TWEAK 수용체 면역어드헤신이 면역글로불린의 Fc 영역에 융합된 TWEAK 수용체 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0050] 18. 제17항에 있어서, 상기 TWEAK 수용체 서열이 FN14 수용체의 세포외 도메인 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0051] 19. 제16항에 있어서, 상기 항-TWEAK 항체가 도 11의 아미노산 94-249를 포함하는 인간 TWEAK 폴리펩티드에 결합하는 것인 방법.
- [0052] 20. 제19항에 있어서, 상기 항-TWEAK 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체인 방법.
- [0053] 21. 제16항에 있어서, 상기 항-TWEAK 수용체 항체가 도 12의 아미노산 서열을 포함하는 인간 FN14 수용체 폴리펩티드에 결합하는 것인 방법.
- [0054] 22. 제21항에 있어서, 상기 항-TWEAK 수용체 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체인 방법.
- [0055] 23. 유효량의 길항제 분자를 포유동물에 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 길항제는
- [0056] m) 항-TWEAK 항체;
- [0057] n) 항-TWEAK 수용체 항체;
- [0058] o) TWEAK 수용체 면역어드헤신; 및
- [0059] p) TWEAK 수용체의 세포내 신호전달을 차단하거나 방해하는 작용제 또는 분자로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 포유동물에서 T_H2 매개 질병을 치료하는 방법.
- [0060] 24. 제23항에 있어서, 상기 TWEAK 수용체 면역어드헤신이 면역글로불린의 Fc 영역에 융합된 TWEAK 수용체 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0061] 25. 제24항에 있어서, 상기 TWEAK 수용체 서열이 FN14 수용체의 세포외 도메인 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0062] 26. 제23항에 있어서, 상기 항-TWEAK 항체가 도 11의 아미노산 94-249를 포함하는 인간 TWEAK 폴리펩티드에 결합하는 것인 방법.
- [0063] 27. 제26항에 있어서, 상기 항-TWEAK 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체인 방법.
- [0064] 28. 제23항에 있어서, 상기 항-TWEAK 수용체 항체가 도 12의 아미노산 서열을 포함하는 인간 FN14 수용체 폴리펩티드에 결합하는 것인 방법.

- [0065] 29. 제28항에 있어서, 상기 항-TWEAK 수용체 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체인 방법.
- [0066] 30. 제23항에 있어서, 상기 T_H2 매개 질병이 알레르기 또는 천식인 방법.
- [0067] 31. 유효량의 효능제 분자를 포유동물에 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 효능제는
- [0068] a) 항-TWEAK 수용체 항체;
- [0069] b) TWEAK 폴리펩티드; 및
- [0070] c) TWEAK 폴리펩티드 변이체로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 면역-관련 질병을 치료하는 방법.
- [0071] 32. 제31항에 있어서, 상기 항-TWEAK 수용체 항체가 도 12의 아미노산 서열을 포함하는 인간 FN14 수용체 폴리펩티드에 결합하는 것인 방법.
- [0072] 33. 제32항에 있어서, 상기 항-TWEAK 항체가 키메라 항체, 인간화된 항체 또는 인간 항체인 방법.
- [0073] 34. 제31항에 있어서, 상기 면역-관련 질병이 자가-면역 질환인 방법.
- [0074] 35. 제34항에 있어서, 상기 자가-면역 질환이 크론병, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 또는 관절염인 방법.
- [0075] 본원에 설명되거나 참조된 기술 및 절차는 당업자에게 일반적으로 잘 이해되고, 통상적인 방법, 예를 들면, [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]에 기재된 바와 같은 널리 이용되는 분자 클로닝 방법을 사용하여 적용된다. 적절한 경우, 상업적으로 이용가능한 키트 및 시약의 사용을 포함하는 과정은 달리 언급되지 않는 한, 제조사에 의해 규정된 프로토콜 및/또는 파라미터에 따라 일반적으로 수행된다.
- [0076] 본 발명의 방법 및 분석법을 설명하기 전에, 본 발명은 물론 변할 수 있는 것으로, 기술된 본원은 특정 방법, 프로토콜, 세포주, 동물 종 또는 속, 구성체 및 시약으로 제한되지 않음을 이해하여야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정 실시태양을 설명하기 위한 것으로서 단지 첨부되는 청구의 범위에 의해서만 제한되는 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아님을 이해하여야 한다.
- [0077] 본원 및 첨부되는 청구의 범위에서 사용되는 바, 단수 형태 "하나", "한" 및 "그"는 문맥에서 달리 분명하게 언급되지 않으면 복수 형태를 포함함을 알아야 한다. 따라서, 예를 들면, "유전적 변형"에 대한 언급은 복수개의 상기 변형을 포함하고, "프로브"에 대한 언급은 하나 이상의 프로브 및 당업계의 당업자에게 공지되어 있는 그의 등가물에 대한 언급 등을 포함한다.
- [0078] 본원에서 언급되는 모든 간행물은 그 간행물이 그와 관련하여 언급되는 방법 및/또는 물질을 개시하고 설명하기 위해 본원에 참고로 포함된다. 본원에서 언급되는 간행물은 본원의 출원일 이전의 그의 개시 내용에 대해 인용된다. 여기서, 그 어느 것도 본 발명자들이 본 발명의 최우선일 또는 우선일에 의해 간행물보다 선행한다고 말하는 것이 아님을 이해하여야 한다. 또한, 실제 공개일은 제시된 것과 상이할 수 있고, 별도의 동정을 필요로 할 수 있다.
- [0079] **I. 정의**
- [0080] 용어 "TWEAK" 또는 "TWEAK 리간드"는 도 11의 아미노산 잔기 1-249, 도 11의 47-249, 또는 도 11의 94-249를 포함하는 폴리펩티드 서열, 및 상기 서열의 생물학적으로 활성인 단편, 결실, 삽입 또는 치환 변이체를 언급하기 위해 본원에서 사용된다. 하나의 실시태양에서, 폴리펩티드 서열은 도 11의 잔기 47-249를 포함하고, 임의로, 도 11의 잔기 94-249로 구성된다. 하나의 실시태양에서, 단편 또는 변이체는 생물학적으로 활성이고, 상기 열거한 서열중 임의의 하나와 적어도 약 80% 아미노산 서열 일치성, 더욱 바람직하게는 적어도 약 90% 서열 일치성, 더욱더 바람직하게는 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 일치성을 갖는다. 임의로, TWEAK 폴리펩티드는 엄격한 조건하에서 TWEAK를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된다. 상기 정의는 또한 TWEAK 공급원으로부터 단리되거나 또는 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조된 천연 서열 TWEAK를 포함한다. TWEAK 서열에서 언급되는 아미노산 잔기의 모든 번호화는 달리 구체적으로 언급되지 않는다면 도 1에 따른 번호화를 사용한다.
- [0081] 용어 "세포외 도메인" 또는 "ECD"는 본질적으로 막횡단 도메인 및 세포질 도메인이 존재하지 않는 TWEAK와 같은 단백질의 형태를 언급한다. 통상적으로, ECD는 1% 미만의 상기 막횡단 도메인 및 세포질 도메인을 가질 것이고, 바람직하게는 0.5% 미만의 상기 도메인을 가질 것이다. 본 발명의 폴리펩티드에 대해 동정된 임의의 막횡단 도메인(들)은 소수성 도메인 종류를 동정하기 위해 당업계에서 통상 사용되는 기준에 따라 동정하는 것으로

이해될 것이다. 막형단 도메인의 정확한 경계는 상이할 수 있지만, 가장 가능하게는 초기에 동정된 도메인의 어느 한 말단에 약 5개 이하의 아미노산만큼 상이할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, ECD는 막형단 도메인 및 세포질 또는 세포내 도메인이 존재하지 않는 (및 막 결합되지 않은) 폴리펩티드의 가용성 세포외 도메인 서열로 이루어질 것이다. TWEAK의 특정 세포외 도메인 서열은 [Marsters et. al., Curr. Biol., 8:525-528 (1998), Chicheportiche et al., JBC, 272:32401-32410 (1997)]에 기재되어 있다.

[0082] 용어 "TWEAK 리간드" 또는 "TWEAK"는 임의의 TWEAK 단량체, 다량체, 또는 헤테로머 복합체 또는 그의 유도체를 언급한다.

[0083] "TWEAK 수용체"는 상기 기술된 TWEAK 리간드와 결합할 수 있는, 하나 이상의 수용체를 언급한다. 본원에서 "TWEAK 수용체"는 "Fn14" 또는 "FN14," 및 도 12에 나타낸 아미노산 1-120을 포함하는 그의 폴리펩티드 서열로서 당업계에 언급되는 수용체를 포함한다. Fn14 수용체는 또한 [Wiley et al., Immunity, 15:837-846 (2001)]에 기재되어 있다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "TWEAK 수용체"는 천연 서열 수용체 및 수용체 변이체를 포함한다. 이러한 용어는 인간을 비롯한 다양한 포유동물에서 발견되는 TWEAK 수용체를 포함한다. TWEAK 수용체는 다양한 인간 조직 계통에서 자연 발생하는 바와 같이 내인성으로 발견될 수 있거나, 재조합 또는 합성 방법에 의해 발견될 수 있다. "천연 서열 TWEAK 수용체"는 자연으로부터 유래된 TWEAK 수용체와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 따라서, 천연 서열 TWEAK 수용체는 임의의 포유동물로부터의 자연 발생 TWEAK 수용체의 아미노산 서열을 가질 수 있다. 상기 천연 서열 TWEAK 수용체는 자연으로부터 단리될 수 있거나, 재조합 또는 합성 수단에 의해 생산될 수 있다. 용어 "천연 서열 TWEAK 수용체"는 구체적으로 수용체의 자연-발생적 말단 절단 또는 분비 형태 (예를 들면, 세포외 도메인 서열을 포함하는 가용성 형태), 자연-발생적 변이체 형태 (예를 들면, 교대 스플라이싱된 형태) 및 자연-발생적 대립유전자 변이체를 포함한다. 수용체 변이체는 천연 서열 TWEAK 수용체의 단편 또는 결실 돌연변이체를 포함할 수 있다.

[0084] 용어 "항-TWEAK 항체"는 TWEAK 리간드의 적어도 하나의 에피토프에 결합하는 임의의 항체를 언급한다. 임의로 TWEAK 항체는 이중 서열 또는 분자에 융합되거나 연결된다. 바람직하게는, 이중 서열은 항체가 보다 고차원의 또는 올리고머 형태의 복합체를 형성하는 것을 허용하거나 돕는다. 임의로, TWEAK 항체는 TWEAK에 결합하지만, 임의의 추가의 TNF 계열 리간드 (예로서, Fas 리간드, Apo2L/TRAIL, TNF-알파 등)에는 결합하지 않거나 교차반응하지 않는다. 임의로는, 항체는 TWEAK 및/또는 TWEAK 수용체 활성의 효능제 또는 길항제이다.

[0085] 임의로, 본 발명의 TWEAK 항체는 BIAcore 결합 분석법으로 측정되는 바, 약 0.1nM 내지 약 20mM의 농도 범위에서 TWEAK 리간드에 결합한다. 임의로, 본 발명의 TWEAK 항체는 BIAcore 결합 분석법으로 측정되는 바, 약 0.6nM 내지 약 18mM의 IC50 값을 보인다.

[0086] 용어 "항-TWEAK 수용체 항체"는 TWEAK 수용체의 적어도 하나의 에피토프에 결합하는 임의의 항체를 언급한다. 임의로 TWEAK 수용체 항체는 이중 서열 또는 분자에 융합되거나 연결된다. 바람직하게는, 이중 서열은 항체가 보다 고차원의 또는 올리고머 형태의 복합체를 형성하는 것을 허용하거나 돕는다. 임의로, TWEAK 수용체 항체는 TWEAK 수용체에 결합하지만, 임의의 추가의 TNF 계열 수용체(예로서 FAS, DR4, DR5, TNFRI, TNFRII 등)에는 결합하지 않거나 교차반응하지 않는다. 임의로는, 항체는 TWEAK 수용체 활성의 효능제 또는 길항제이다.

[0087] 임의로, 본 발명의 TWEAK 수용체 항체는 BIAcore 결합 분석법으로 측정되는 바, 약 0.1nM 내지 약 20mM의 농도 범위에서 TWEAK 수용체에 결합한다. 임의로, 본 발명의 TWEAK 수용체 항체는 BIAcore 결합 분석법으로 측정되는 바, 약 0.6nM 내지 약 18mM의 IC50 값을 보인다.

[0088] 용어 "길항제"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 시험관내에서, 계내에서(in situ) 또는 생체내에서 TWEAK 또는 TWEAK 수용체의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 차단하거나, 저해하거나 중화시키는 임의의 분자를 포함한다. TWEAK 또는 TWEAK 수용체의 상기과 같은 생물학적 활성의 일례로는 TWEAK와 TWEAK 수용체의 결합, NF- κ B 인산화의 활성화 또는 STAT-1 인산화의 저해, IL-8의 생산, IFN- γ 및 IL-12 분비의 저해, NK 세포 AICD의 촉진, 혈관신생 촉진, 또는 종양 성장 촉진을 포함한다. 길항제는 직접적 또는 간접적인 방식으로 작용할 수 있다. 예를 들면, 길항제는 시험관내에서, 계내에서 또는 생체내에서 TWEAK와 TWEAK 수용체의 직접 결합의 결과로서 TWEAK 또는 TWEAK 수용체의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 차단하거나, 저해하거나 중화시키는 작용을 할 수 있다. 길항제는 또한 시험관내에서, 계내에서 또는 생체내에서 예로서, 또다른 이펙터 분자를 차단하거나 저해하는 것의 결과로서 TWEAK 또는 TWEAK 수용체의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 차단하거나, 저해하거나 중화시키는 작용을 할 수 있다. 길항제 분자는, TWEAK 및 TWEAK 수용체, 양자 모두의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 차단하거나, 저해하거나 중화시킬 수 있는 "이중" 길항제 활성을 포함할 수 있다.

- [0089] 용어 "TWEAK 길항제"는 TWEAK 또는 TWEAK 수용체 각각, 또는 TWEAK 및 TWEAK 수용체, 양자 모두의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 차단하거나, 저해하거나 증화시킬 수 있는 임의의 분자를 언급하고, 제한하는 것은 아니지만, TWEAK 수용체의 가용성 형태, 예로서, TWEAK 수용체의 세포의 도메인 서열, TWEAK 수용체 면역 어드헤신, TWEAK 수용체 융합 단백질, TWEAK 수용체의 공유 변형된 형태, TWEAK 수용체 항체, 및 TWEAK 항체를 포함한다. TWEAK 또는 TWEAK 수용체의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 차단하거나, 저해하거나 증화시키는지 여부를 측정하기 위하여, 길항제 분자의 효과(들)가 예를 들면, TWEAK와 TWEAK 수용체의 결합, 또는 NF- κ B 인산화의 활성화 또는 STAT-1 인산화의 저해, IFN- γ 또는 IL-12의 생산의 저해, 또는 세포 사멸의 활성화에 미치는 영향을 평가함으로써 분석법을 수행할 수 있다. 상기 분석법은 공지된 시험관내 또는 생체내 포맷으로, 예를 들면, NK 세포, 대식세포 및 수지상 세포에서 수행될 수 있다. 하나의 실시태양에서, TWEAK 길항제는 단클론 항체 또는 가용성 TWEAK 수용체 ECD-Fc 융합 단백질을 포함할 것이다.
- [0090] 용어 "효능제"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 시험관내에서, 계내에서 또는 생체내에서 TWEAK 또는 TWEAK 수용체의 하나 이상의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 자극하거나, 증진시키거나 유도하는 임의의 분자를 포함한다. TWEAK 또는 TWEAK 수용체의 상기와 같은 생물학적 활성의 일례로는 TWEAK와 TWEAK 수용체의 결합, NF- κ B 인산화의 활성화 또는 STAT-1 인산화의 저해, IFN- γ 또는 IL-12의 생산의 저해, 또는 세포 사멸의 활성화를 포함한다. 효능제는 직접적 또는 간접적인 방식으로 작용할 수 있다. 효능제는 직접적 또는 간접적인 방식으로 작용할 수 있다. 예를 들면, 효능제 분자는 TWEAK 및 TWEAK 수용체, 양자 모두의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 자극하거나, 증진시키거나 유도할 수 있는 "이중" 효능제 활성을 포함할 수 있다.
- [0091] 용어 "TWEAK 효능제"는 TWEAK 또는 TWEAK 수용체 각각, 또는 TWEAK 및 TWEAK 수용체, 양자 모두의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 자극하거나, 증진시키거나 유도할 수 있는 임의의 분자를 언급하고, 제한하는 것은 아니지만, TWEAK 폴리펩티드 및 그의 변이체, 및 TWEAK 수용체 항체를 포함한다. TWEAK 효능제 분자가 TWEAK 또는 TWEAK 수용체의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 전체적으로 자극하거나, 증진시키거나 유도하는지 여부를 측정하기 위하여, 효능제 분자의 효과(들)가 예를 들면, IL-8 생산, NF- κ B 인산화, 또는 IFN- γ 또는 IL-12의 생산의 저해에 미치는 영향을 평가함으로써 분석법을 수행할 수 있다. 상기 분석법은 공지된 시험관내 또는 생체내 포맷으로, 예를 들면, ELISA, 세포내 사이토카인 생산, 또는 리포터 분석법으로 수행될 수 있다. 하나의 실시태양에서, TWEAK 효능제는 단클론 항체 또는 가용성 TWEAK 수용체 ECD-Fc 융합 단백질을 포함할 것이다.
- [0092] 본원에서 사용되는 바, 용어 "포유동물"은 인간, 소, 말, 개 및 고양이를 비롯한 포유동물로 분류된 임의의 포유동물을 나타낸다. 본 발명의 바람직한 실시태양에서, 포유동물은 인간이다.
- [0093] "핵산"은 임의의 DNA 또는 RNA를 포함하는 것으로 의미된다. 예를 들면, 조직 샘플내 존재하는 염색체, 미토콘드리아, 바이러스성 및 세균성 핵산을 의미한다. 용어 "핵산"은 더블 스트랜드 핵산 분자의 스트랜드들중 어느 하나 또는 양자 모두를 포함하고, 무순상 핵산 분자의 임의의 단편 또는 일부분을 포함한다.
- [0094] "유전자"는 단백질을 코딩하거나 전사시키거나, 다른 유전자 발현을 조절하는 작용상의 역할을 하는 임의의 핵산 서열 또는 그의 일부분으로서 의미된다. 유전자는 작용 단백질을 코딩하는 것을 담당하는 핵산 모두, 또는 단백질을 코딩하거나 발현시키는 것을 담당하는 핵산중의 일부분만으로 구성될 수 있다. 핵산 서열은 엑손, 인트론, 개시 또는 종결 영역, 프로모터 서열, 기타 조절 서열 또는 상기 유전자에 인접하고 있는 특유의 영역내 유전자 이상을 포함할 수 있다.
- [0095] 본원에서 사용되는 바, 용어 "표지"는 직접 또는 간접적으로 시약, 예를 들면 핵산 프로브 또는 항체에 접합되거나 융합되고, 접합되거나 융합된 시약의 검출을 용이하게 하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 표지는 그 자체가 검출될 수 있거나 (예로서, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 효소 표지의 경우에, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매할 수 있다.
- [0096] 본원에서 사용된 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로는 무순상 단클론 항체, 다클론 항체, 적어도 2개 이상의 무순상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들면, 이중특이성 항체), 및 항체 단편 (단, 원하는 생물학적 활성을 보이는 경우에 한함)을 포괄한다.
- [0097] "항체 단편"은 무순상 항체의 일부분을 포함하며, 바람직하게는 그의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디(diabody); 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이성 항체가 있다.
- [0098] "천연 항체"는 일반적으로 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 구성된, 약 150,000 달톤의 이중

사랑체 당단백질이다. 각각의 경쇄는 하나의 공유 디설파이드 결합으로 중쇄에 연결되어 있으며, 디설파이드 연결의 수는 면역글로불린 이소형이 다른 중쇄들 사이에서 달라진다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇠 내부의 디설파이드 가교(bridge)를 갖는다. 각 중쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (VH)을 갖고, 그 뒤쪽에 다수의 불변 도메인을 갖는다. 각 경쇄는 한쪽 말단에 가변 도메인 (VL)을 갖고, 다른 쪽 말단에는 불변 도메인을 갖는데, 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 정렬되고, 경쇄의 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기가 경쇄와 중쇄의 가변 도메인의 경계면을 형성하는 것으로 여겨진다.

[0099] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체를 사이에서 서열이 매우 다르고, 각 특정 항체의 자신의 특정 항원에 대한 결합 및 특이성에 사용된다는 사실을 의미한다. 그러나, 가변성은 항체의 가변 도메인 전체에 고르게 분포하지 않는다. 이는 경쇄 및 중쇄 둘 모두의 가변 도메인 모두에서 초가변 영역으로 불리는 3개의 세그먼트에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분을 프레임워크 영역 (FR)이라 칭한다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은, β -시트 구조를 연결하는 (어떤 경우는 β -시트 구조의 부분을 형성함) 루프를 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된, 주로 β -시트 입체구조를 채택한 4개의 FR을 각각 포함한다. 각 쇠에서의 초가변 영역은 FR에 의해 서로 가깝게 유지되고, 다른 쇠의 초가변 영역과 함께 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 ([Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체가 항원에 결합하는데 직접 관여하지는 않지만, 다양한 이펙터 기능 (예로서, 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)에 항체가 관여하는 것)을 나타낸다.

[0100] 항체를 과파인으로 분해하면, 각각 1개의 항원-결합 부위가 있는 2개의 동일한 항원-결합 단편 ("Fab" 단편이라 불림), 및 나머지 "Fc" 단편 (이름이 용이하게 결정화되는 능력을 반영함)이 생성된다. 펩신으로 처리하면, 2개의 항원-결합 부위를 가지며 여전히 항원을 가교결합시킬 수 있는 $F(ab')_2$ 단편이 수득된다.

[0101] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소의 항체 단편이다. 이러한 영역은 하나의 중쇄 가변 도메인과 하나의 경쇄 가변 도메인이 단단한 비-공유 결합에 의해 연결되어 이루어진 이량체로 구성된다. 이 입체구조에서는 각 가변 도메인의 3개의 초가변 영역이 상호작용하여 V_H - V_L 이량체의 표면에서 항체-결합 부위를 형성한다. 총괄하여, 6개의 초가변 영역이 항체에게 항원-결합 특이성을 부여한다. 그러나, 1개의 가변 도메인 (또는 항원에 대해 특이적인 3개의 초가변 영역만을 포함하는 Fv의 반)만으로도 항원을 인식하여 결합하는 능력을 나타내지만, 이 경우의 친화도는 전체 결합 부위보다 낮다.

[0102] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 비롯하여, 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 몇 개의 잔기가 추가되어 있다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. 본원에서 Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 하나 이상의 유리 티올기를 갖는 Fab'를 의미한다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 원래 이들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 한쌍의 Fab' 단편으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 공지되어 있다.

[0103] 임의의 척추동물 종으로부터 유래한 항체 (면역글로불린)의 "경쇄"는 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여 명백히 구별되는 2가지 유형 (카파 (κ) 및 람다 (λ)로 불림) 중 하나에 할당될 수 있다.

[0104] 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체는 상이한 부류로 할당될 수 있다. 무손상 항체의 5가지 주요 부류 (IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM)가 있으며, 이들 중 몇몇은 하위 부류 (이소형), 예를 들면 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA 및 IgA2로 세분될 수 있다. 상이한 부류의 항체에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 으로 불린다. 상이한 부류의 면역 글로불린의 서브유닛 구조 및 3-차원 입체구조는 널리 공지되어 있다.

[0105] "단일-쇄 Fv" 또는 "scFv" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는데, 이때 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 쇠로 존재한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩티드는 scFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성할 수 있게 하는, VH와 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 연결기를 추가로 포함한다. scFv의 리뷰를 위해서는 [Plueckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]을 참조한다.

[0106] 용어 "디아바디"는 동일한 폴리펩티드쇄 (V_H - V_L)에서 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함하는, 2개의 항원-결합 부위가 있는 작은 항체 단편을 의미한다. 동일한 쇠에서 2개의 도메인 사이의 패어

링이 발생하지 않을 만큼 짧은 연결기를 사용함으로써, 도메인은 또다른 쇠의 상보적 도메인과 페어링하여 2개의 항원-결합 부위를 형성시킨다. 디아바디는 예를 들면, (유럽 특허 제404,097호; WO 93/11161; 및 [Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)])에 보다 상세히 기술되어 있다.

[0107]

본원에서 사용되는 용어 "단클론 항체"는 실질적으로 동질성인 항체 집단으로부터 얻은 항체, 즉 단클론 항체가 가능한 자연 발생 돌연변이화 (상기 변이체는 일반적으로 소량으로 존재할 수 있음)를 제외하고는 집단을 포함하는 개별 항체가 동일한 것을 의미한다. 단클론 항체는 단일 항원성 부위에 결합하는 높은 특이성이 있다. 또한, 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프)에 대한 상이한 항체를 포함하는 통상적인 (다클론) 항체 제제와는 달리, 각각의 단클론 항체는 항원 상의 단일 결정자에 결합한다. 특이성에 더해서, 단클론 항체는 이들을 하이브리도마 배양에 의해 합성하는 경우에 다른 면역글로불린으로 오염되지 않는다는 점에서 이점을 갖는다. 수식어 "단클론"은 항체가 실질적으로 동질성인 항체 집단으로부터 얻어졌다는 특징을 나타내며, 임의의 특정 방법으로 항체를 생성해야하는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들면, 본 발명에 따라 사용되는 단클론 항체는 [Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975)]에 최초로 기술된 하이브리도마 방법에 의해 제조하거나, 재조합 DNA 방법 (예를 들면, 미국 특허 제4,816,567호 참조)에 의해 제조할 수 있다. "단클론 항체"는 또한 예를 들면, [Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991)] 및 [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597(1991)]에 기술된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수 있다.

[0108]

본원의 단클론 항체는, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분이 특정 종으로부터 유래하거나 특정 항체 부류 또는 하위 부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 동질성이며, 상기 쇠(들)의 나머지 부분이 다른 종으로부터 유래하거나 다른 항체 부류 또는 하위 부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 동질성인 "키메라" 항체 (면역글로불린), 및 상기 항체의 단편 (단, 원하는 생물학적 활성을 보이는 경우에 한함)을 특별히 포함한다 (미국 특허 제4,816,567호; [Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855(1984)]). 본원에서 관심있는 키메라 항체로는 인간을 제외한 영장류 (예를 들면, 구세계 원숭이 (Old World Monkey), 예로서, 개코원숭이, 붉은털 원숭이 또는 사이노몰거스 원숭이)로부터 유래한 가변 도메인 항원-결합 서열, 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체가 있다 (미국 특허 제5,693,780호).

[0109]

비-인간 (예를 들면, 뮌) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 면역글로불린으로부터 유래한 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 추가변 영역으로부터의 잔기가 바람직한 특이성, 친화성 및 역량을 갖는 비-인간 중 (공여자 항체) (예로서, 마우스, 래트, 토끼, 또는 인간을 제외한 영장류)의 추가변 영역으로부터의 잔기로 교체된 인간 면역글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 예에서, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 교체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 개량하기 위해 수행된다. 일반적으로, 인간화 항체는 실질적으로 모든 하나 이상의 (전형적으로, 2개의) 가변 도메인을 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 추가변 루프는 비-인간 면역글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 임의로 적어도 일부분의 면역글로불린 불변 영역, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 불변 영역을 또한 포함할 것이다. 보다 상세한 설명을 위해 문헌 ([Jones et al., *Nature* 321:522-525(1986)]; [Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)])을 참조한다.

[0110]

본원에서 사용된 용어 "추가변 영역"은 항원-결합을 일으키는 항체의 아미노산 잔기를 의미한다. 추가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들면, 경쇄 가변 도메인의 잔기 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3), 및 중쇄 가변 도메인의 31-35 (H1), 50-65 (H2) 및 95-102 (H3); [Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)]) 및/또는 "추가변 루프"로부터의 잔기 (예를 들면, 경쇄 가변 도메인의 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2) 및 91-96 (L3), 및 중쇄 가변 도메인의 잔기 26-32 (H1), 53-55 (H2) 및 96-101 (H3); [Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)])를 포함한다. "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 추가변 영역 잔기 이외에 가변 도메인 잔기이다.

[0111]

본원에서 사용되는 바, 용어 "면역어드헤신"은 면역글로불린 불변 도메인의 이펙터 작용과 이중 단백질 ("어드헤신")의 결합 특이성을 조합시킨 항체-양 분자를 언급한다. 구조적으로, 면역어드헤신은, 항체의 항원 인식 부위 및 결합 부위 이외의 (즉, "이중"), 원하는 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열과, 면역글로불린 불변 도메인 서열의 융합을 포함한다. 면역어드헤신 분자의 어드헤신 부분은 적어도 수용체 또는 리간드의 결합 부위를 포함하는 인접 아미노산 서열이다. 면역어드헤신중의 면역글로불린 불변 도메인 서열은 임의의 면역글로불린, 예로서, IgG-1, IgG-2, IgG-3, 또는 IgG-4 아형, IgA (IgA-1 및 IgA-2 포함), IgE, IgD 또는 IgM으로부터 수득될

수 있다.

- [0112] 용어 항체의 "Fc 도메인"은 힌지, CH2 및 CH3 도메인을 포함하되, 항원 결합 부위는 결실되어 있는 분자의 일부분을 언급한다. 상기 용어는 또한 IgM 또는 기타 항체 동형의 등가 영역을 포함하는 것으로 의미된다.
- [0113] 관심의 대상이 되는 항원에 "결합하는" 항체는 항원을 발현시키는 세포를 표적화하기 위한 치료제 또는 진단제로서 유용하도록 충분한 친화성 및/또는 결합력으로 항원에 결합할 수 있는 것이다.
- [0114] 본 발명의 목적을 위해, "면역요법"은 비접합되거나 또는 "네이키드 (naked)" 항체일 수 있거나, 또는 이중 분자(들) 또는 제제(들), 예를 들면 하나 이상의 세포독성 제제(들)과 접합되거나 융합되어 "면역접합체"를 생성시킬 수 있는 항체를 사용하여 포유동물 (바람직하게는, 인간 환자)을 치료하는 방법을 의미할 것이다.
- [0115] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 동정 및 분리 및/또는 회수된 것이다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 길항제 또는 항체의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 항체는 (1) 로우리(Lowry) 방법에 의해 측정시에 항체의 95중량% 초과, 가장 바람직하게는 99중량% 초과 수준까지, (2) 스피닝 컵 서열화기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 수준까지 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질할 때까지 정제될 것이다. 단리된 항체는 항체의 천연 환경의 적어도 한 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함한다. 그러나, 통상적으로 단리된 항체는 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0116] 표현 "유효량"은 대상 질환 또는 용태의 예방, 완화 또는 치료에 효과적인 약제(예로서, TWEAK 항체 등)의 양을 의미한다.
- [0117] 본원에 사용된 "치료하는", "치료" 및 "요법"은 치료 요법, 예방 요법 및 방지 요법을 나타낸다. 연속 치료 또는 투여는 하루 이상까지 치료를 중단하지 않고 적어도 1일 1회로 치료하는 것을 의미한다. 간헐적 치료 또는 투여, 또는 간헐적 양식으로 치료하거나 투여하는 것은 연속적으로 하는 것인 아닌, 사실상 주기적으로 하는 치료를 언급한다.
- [0118] 용어 "사이토카인"은 세포간 매개체로서 다른 세포에 작용하는 하나의 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 포괄적 용어이다. 이러한 사이토카인의 예로는 림포카인, 모노카인 및 종래의 폴리펩티드 호르몬이 있다. 사이토카인에는 성장 호르몬, 예로서, 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로 인슐린; 킬렉신; 프로킬렉신; 당단백질 호르몬, 예로서, 여포 자극 호르몬(FSH), 갑상선 자극 호르몬(TSH) 및 황체형성 호르몬(LH); 간 성장인자; 섬유아세포 성장인자; 프롤락틴; 태반성 락토겐; 중양 괴사인자- α 및 중양 괴사인자- β ; 물리-억제 물질; 마우스 고나도트로핀-결합 펩티드; 인히빈; 악티빈; 혈관 내피세포 증식인자; 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); 신경 성장인자; 혈소판 증식인자; 형질 전환 성장인자 (TGF), 예로서, TGF- α 및 TGF- β ; 인슐린-유사 성장인자-I 및 인슐린-유사 성장인자-II; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예로서, 인터페론- α , 인터페론- β 및 인터페론- γ ; 콜로니 자극인자 (CSF), 예로서, 대식세포-CSF (M-CSF); 과립구-대식세포-CSF(GM-CSF); 과립구-CSF (G-CSF); 인터루킨(IL), 예로서, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; 및 LIF 및 키트 리간드 (KL)를 비롯한 다른 폴리펩티드 인자가 포함된다. 본원에 사용된 용어 사이토카인은 천연 공급원으로부터의 단백질 또는 재조합 세포 배양액으로부터의 단백질, 및 천연 서열 사이토카인의 생물학적 활성 등가물을 포함한다.
- [0119] 본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제하거나 방지하고/거나 세포의 파괴를 야기하는 물질을 나타낸다. 이 용어는 방사성 동위원소 (예를 들면, I^{131} , I^{125} , Y^{90} , 및 Re^{186}), 화학요법제, 및 박테리아, 진균류, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소와 같은 독소, 및 이들의 단편을 포함하는 것이다.
- [0120] "화학요법제"는 암 치료에 유용한 화합물이다. 화학요법제의 예로는 알킬화제, 예로서, 티오테파 및 사이클로포스파미드(시톡산(CYTOXAN)TM); 알킬 설포네이트, 예로서, 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예로서, 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민 (알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민 포함); 아세토제닌 (특히, 불라타신 및 불라타시논); 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토포신 (특히, 크립토포신 1 및 크립토포신 8); 둘라스타틴; 두오카르미신 (합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘루테로빈; 판크라티스타틴; 사르코타타인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예로서, 클로르암부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에

스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 하이드로클로라이드, 펠팔란, 노뱌비친, 페네스테린, 프레드니루스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예로서, 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라뉼누스틴; 항생제, 예로서, 엔다인 항생제 (예를 들면, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 피II (예를 들면, [Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); 다이네미신 (다이네미신 A 포함); 비스포스포네이트, 예로서, 클로드로네이트; 에스페라미신; 및 네오키르지노스타틴 크로모포어 및 관련 색소단백질 엔다인 항생제 크로모포어), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)TM 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피콜리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신 (예로서, 미토마이신 C), 마이코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물질, 예로서, 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 염산 유사체, 예로서, 테노프테린, 메토트렉세이트, 프레로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예로서, 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예로서, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디테옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐, 예로서, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스탄올, 메피티오스탄, 테스톨락톤; 항-아드레날, 예로서, 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스타틴; 염산 보충제, 예로서, 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예로서, 메이탄산 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나멧; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK[®] 다당류 복합체 (오리곤주 유진에 소재하는 JHS 내추럴 프러덕츠(JHS Natural Products)); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안퀴딘); 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피프프로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들면, 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)TM), 뉴욕주 프린스턴에 소재하는 브리스톨-마이어스 스킵 온컬로지(Bristol-Myers Squibb Oncology)), 및 독세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)TM), 프랑스 안토니 소재하는 롱프랑 로러(Rhone-Poulenc Rorer)); 클로르암부실; 겐시타빈 (겐자(GEMZAR)TM); 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토트렉세이트; 백금 유사체, 예로서, 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 나벨빈(NAVELBINE)TM 비노렐린; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예로서, 레티노산; 캅페시타빈; 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 산 또는 유도체가 있다. 또한, 이 정의는 종양에서 호르몬 작용을 조절 또는 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제, 예로서, 항-에스트로겐 및 선택적인 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예를 들면 타목시펜 (놀바텍스(NOLVADEX)TM 포함), 랄록시펜, 드롤록시펜, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 토레미펜 (파레스톤(FARESTON)TM 포함); 부신에서의 에스트로겐 생성을 조절하는 효소인 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예를 들면 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메게스트롤 아세테이트 (메가제(MEGASE)TM), 엑세메스탄, 포르메스타니에, 파드로졸, 보로졸 (리비조(RIVISOR)TM), 레트로졸 (페마라(FEMARA)TM) 및 아나스트로졸 (아리미텍스(ARIMIDEX)TM); 및 항-안드로겐, 예로서, 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드 및 고세렐린; 및 그들의 약제학적 허용가능한 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0121]

본원에 사용된 경우, "성장 저해제"는 시험관내 또는 생체내에서 세포의 증식을 억제하는 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 상기 유전자를 과발현시키는 세포의 비율을 유의하게 감소시키는 것이다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기가 아닌 단계에서) 차단하는 제제, 예로서, G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 제제를 포함한다. 종래의 M기 차단제로는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁솔 및 topo II 저해제, 예로서, 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신이 있다. G1 정지 제제는 또한 S기 정지를 유발하며, 예를 들면 DNA 알킬화제, 예로서, 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C가 있다. 추가의 정보는 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995)] (특히, 제 13면)에서

찾아볼 수 있다.

- [0122] 용어 "아포프토시스" 및 "아포프토시스 활성화"은 넓은 의미로 사용되고, 세포질의 축합, 혈장 막 미세융모의 손실, 핵의 분할, 염색체 DNA의 파괴 또는 미토콘드리아 기능의 손실을 비롯한 하나 이상의 특징적 세포 변화에 의해 전형적으로 달성되는 포유동물 중의 세포 사멸의 규칙적 또는 제어된 형태를 언급한다. 이 활성화는 당업계에 잘 공지된 방법, 예를 들면, 세포 생육성 분석법 (예로서, 알라마 블루 분석법 또는 MTT 분석법), FACS 분석, 캐스파제 활성화, DNA 단편화 (예를 들면, [Nicoletti et al., *J. Immunol. Methods*, 139:271-279 (1991)] 참조), 및 폴리-ADP 리보스 폴리머라제, "PARP", 절단 분석법을 포함한다.
- [0123] 본원에서 사용되는 바, 용어 "질병"은 일반적으로 본원에서 설명되는 조성물을 사용한 치료에 의해 개선되는 임의의 병태를 언급한다. 질환은 만성 및 급성 질환, 및 포유동물을 문제되는 질병에 걸리기 쉽게 만드는 병리학 적 상태를 포함한다. 본원에서 치료하고자 하는 질병의 비제한적인 예는 양성 및 악성 암; 염증, 감염, 혈관신생, 및 면역학적 질환, 자가 면역 질환, 관절염 (류마티스성 관절염 포함), 다발성 경화증, 및 HIV/AIDS를 포함한다.
- [0124] 용어 "암", "암성" 또는 "악성"은 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물에게서의 생리적 용태를 언급하거나 설명한다. 암의 예로서는 제한하는 것은 아니지만, 편평세포암종, 골수종, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 신경아교종, 위장(관) 암, 신장암, 난소암, 간암, 림프아구성 백혈병, 림프성 백혈병, 결장직장암, 자궁내막암, 콩팥암, 전립선암, 갑상선암, 신경모세포종, 췌장암, 다형성아교모세포종, 자궁경부암, 뇌암, 위암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 및 두경부암을 포함한다.
- [0125] 본원에서 사용되는 바, 용어 "체액 반응" 및 "세포성 반응"은, 포유동물이 항원에 대한 항체를 생산하거나, 항원에 대한 세포독성 반응을 나타내거나, 양자 모두를 나타내는, 항원에 대한 포유동물의 면역학적 반응을 언급한다. Th1 부류의 T 헬퍼 세포는 세포성 반응을 유도하는 역할을 하고, Th2부류의 T 헬퍼 세포는 고친화성 항체를 효율적으로 생산하는 역할을 한다.
- [0126] 본원에서 사용되는 바, 용어 "T 헬퍼 (Th) 세포"는, 세포독성 T 세포를 생성하는 것을 돕고, 항체 생산을 자극시키기 위해 B 세포와 함께 작용하는, T 세포의 작용상 하위 부류를 언급한다. 헬퍼 T 세포는 MHC 클래스 II에 결합되어 있는 항원을 인식하고, 이펙터 세포에 접촉성의 의존적 및 접촉성의 비의존적 (사이토카인 및 케모카인) 신호를 제공한다.
- [0127] 용어 "Th1"은, TNF, 인터페론-감마 및 IL-2 (및 기타 사이토카인)를 생산하고, 켈린지에 대한 세포성, 즉, 비-면역글로불린 반응과 관련된 염증 반응을 유도하는 T 헬퍼 세포의 하위 부류를 언급한다.
- [0128] 용어 "Th2"는, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10을 생산하고, 면역 켈린지에 대한 세포성, 즉, 면역글로불린 (체액성) 반응과 관련된 T 헬퍼 세포의 하위 부류를 언급한다.
- [0129] 용어 "면역 관련 질환"은 포유동물의 면역계의 성분이 포유동물의 이환을 유발하거나, 매개하거나, 다른 방식으로 작용하는 질환을 의미한다. 또한, 면역 반응의 자극 또는 개입이 질환의 진행에 대한 개선 효과를 갖는 질환이 포함된다. 상기 용어에는, 자가면역 질환, 면역-매개 염증 질환, 비-면역 매개 염증 질환, 감염성 질환, 및 면역결핍 질환이 포함된다. 그 일부가 면역 또는 T 세포 매개성인, 본 발명에 따라 치료될 수 있는 면역 관련 및 염증 질환의 예는 전신 홍반성 루푸스, 류마티스성 관절염, 소아 만성 관절염, 척추관절염증, 전신 경화증 (피부경화증), 특발성 염증성 근육병증 (피부근육염, 다발근육염), 쇼그렌 증후군, 전신 혈관염, 유육종증, 자가면역 용혈 빈혈 (면역 범혈구감소증, 발작성 야간혈색소뇨증), 자가면역 저혈소판증 (특발성 혈소판 감소자색반, 면역-매개 저혈소판증), 갑상선염 (그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 소아 림프구성 갑상선염, 위축 갑상선염), 당뇨병, 면역 매개 신장병 (사구체신염, 세뇨관 간질성 신장염), 중추 및 말초 신경계의 탈수초성 질환, 예를 들면 다발 경화증, 특발성 탈수초성 다발신경병증 또는 기랑-바레 (Guillain-Barre) 증후군, 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증; 간담즙성 질환, 예를 들면 감염성 간염 (간염 A, B, C, D, E 및 다른 비간친화성 바이러스), 자가면역 만성 활성 간염, 원발성 담즙성 간경변, 육아종 간염, 및 경화성 담관염, 염증성 및 섬유성 폐 질환, 예를 들면 염증성 장 질환 (예로서 궤양성 대장염 및 크론병); 글루텐 민감 장병증, 및 휘플 (Whipple) 병, 자가면역 또는 면역 매개 피부병, 예를 들면 수포성 피부 질환, 다형홍반 및 접촉성 피부염, 건선; 알레르기 질환, 예를 들면 천식, 알레르기 비염, 아토피성 피부염, 음식 과민증 및 두드러기, 폐의 면역학적 질환, 예를 들면 호산구성 폐렴, 특발성 폐섬유증 및 과민증 폐렴; 이식 관련 질환, 예를 들면 이식편 거부 및 이식편 대 숙주 질환을 포함한다. 감염성 질환은 AIDS (HIV 감염), 간염 A, B, C, D 및 E, 세균 감염, 진균 감염, 원충 감염 및 기생충 감염을 포함한다.

- [0130] "자가면역 질환"은 넓은, 일반적인 의미로 정상 또는 건강한 조직의 파괴가 개별 포유동물의 체액성 또는 세포성 면역 반응으로부터 그 자신의 조직 성분까지 발생하는 포유동물의 질병 또는 용태를 의미하기 위해 사용된다. 그 예는 제한하는 것은 아니지만, 홍반성 루푸스, 갑상선염, 류마티스성 관절염, 건선, 다발 경화증, 자가면역성 당뇨병 및 염증성 장 질환 (IBD)를 포함한다.
- [0131] 본원에서 사용될 때, 용어 "태그된"은 "태그 폴리펩티드"에 융합된 항체 또는 폴리펩티드를 포함하는 키메라 분자를 언급한다. 태그 폴리펩티드는 항체가 작용할 수 있는 에피토프를 제공하거나 일부 다른 기능, 예를 들면 일반적으로 항체 또는 폴리펩티드의 활성을 방해하지 않을 정도로 충분히 짧게 올리고머화하는 능력 (예로서, 류신 지퍼 도메인을 갖는 펩티드에서 발생)을 제공할 수 있는 잔기를 갖는다. 또한, 태그 폴리펩티드는 바람직하게는 태그-특이적 항체가 다른 에피토프에는 실질적으로 교차반응하지 않도록 매우 특유한 것이다. 적합한 태그 폴리펩티드는 일반적으로 적어도 6개의 아미노산 잔기, 보통 약 8 내지 약 50개의 아미노산 잔기 (바람직하게는, 약 10 내지 약 20개의 잔기)를 갖는다.
- [0132] 본원에서 개시된 다양한 펩티드 또는 단백질을 설명하기 위하여 사용될 때, "단리된"은 항체는 그의 천연 환경의 성분으로부터 동정 및 분리 및/또는 회수된 펩티드 또는 단백질을 의미한다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 전형적으로 펩티드 또는 단백질의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시태양에서, 펩티드 또는 단백질은 (1) 스피닝 컵 (spinning cup) 서열 분석기를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도까지, 또는 (2) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 사용하여 환원 또는 비-환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 균질할 때까지, 또는 (3) 질량 분광법 또는 펩티드 지도화 기술에 의해 균질할 때까지 정제될 것이다. 단리된 물질은 그의 천연 환경의 적어도 한 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에 재조합 세포내의 계내 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 그러나, 통상적으로 단리된 펩티드 또는 단백질은 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.
- [0133] 본원에서 동정된 서열과 관련하여, "아미노산 서열 일치도(%)"는 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 일치도를 구현하도록 갭(gap)을 도입시킨 후, 참조 서열내의 아미노산 잔기와 일치하는 후보 서열내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의되고, 임의의 보존적 치환은 상기 아미노산 서열 일치도의 일부로 간주하지 않는다. 아미노산 서열 일치도를 측정하기 위한 정렬은 비교되는 전장 서열에 걸친 최대 정렬의 구현에 필요한 할당 알고리즘을 포함하는, 정렬을 측정하기 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있는, 당업자에게 공지된 다양한 방법으로 구현될 수 있다. 본원의 목적을 위해, 아미노산 일치도 값은 그 소스 코드가 미국 워싱턴 디. 씨. 20559에 소재하는 미국 저작권국(United States Copyright Office)에서 사용자 제출서류로 출원되어 미국 저작권 TXU510087 하에 등록된 제넨테크 (Genentech) 소유의 서열 비교 컴퓨터 프로그램 "ALIGN-2"를 사용하여 얻을 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 미국 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코에 소재하는 제넨테크로부터 입수가 가능하다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고, 변하지 않는다.
- [0134] 혼성화 반응의 "엄격성"은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있고, 일반적으로 프로브 길이, 세척 온도 및 염 농도에 따라 경험적으로 산출된다. 일반적으로, 프로브가 길수록 적절한 어닐링을 위해 더 높은 온도가 필요하고, 프로브가 짧으면 보다 낮은 온도가 필요하다. 혼성화는 일반적으로 상보성 가닥이 그의 용점 미만의 환경에 존재할 때 변성 DNA가 재어닐링되는 능력에 따라 결정된다. 프로브와 혼성화 서열 사이의 요구되는 동일성 정도가 클수록 사용될 수 있는 상대적 온도가 더 높다. 그 결과, 보다 높은 상대 온도는 반응 조건을 보다 엄격하게 만들고, 보다 낮은 온도는 덜 엄격하게 만드는 경향이 있다. 혼성화 반응의 엄격성의 추가의 상세한 내용 및 설명에 대해서는 [Ausubel et al. Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)]을 참조한다.
- [0135] 본원에서 정의되는 바, "고염격성 조건"은 (1) 세척을 위해 낮은 이온 강도 및 높은 온도의 사용; 50℃의 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산나트륨/0.1% 소듐 도데실 설페이트; (2) 혼성화 동안 변성제의 사용; 50% (v/v) 포름아미드 + 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% 피콜(Ficoll)/0.1% 폴리비닐피롤리돈/50mM 인산나트륨 버퍼 (pH 6.5) + 750mM 염화나트륨, 75mM 시트르산나트륨 (42℃); 또는 (3) 42℃의 0.2 x SSC (염화나트륨/시트르산나트륨) 및 55℃의 50% 포름아미드를 사용한 세척, 이어서 55℃의 EDTA 함유 0.1 x SSC로 구성된 고염격성 세척과 함께 50% 포름아미드, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M/시트르산나트륨), 50mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5 x 덴하르트(Denhardt) 용액, 조음과 처리된 연어 정자 DNA (50μg/ml), 0.1% SDS, 및 10% 텍스트란 설페이트 (42℃)의 사용으로 동정된다.
- [0136] "중등 엄격성 조건"은 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring

Harbor Press, 1989]에 기재된 바와 같이 동정할 수 있고, 20% 포름아미드, 5 x SSC (150mM NaCl, 15mM 시트르산 삼나트륨), 50mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5 x 덴하르트 용액, 10% 텍스트란 설페이트, 및 20mg/ml 변성 전단 처리 연어 정자 DNA를 포함하는 용액 중에서 37°C에서 밤새도록 인큐베이션시킨 후, 약 37-50°C의 1 x SSC를 사용하여 필터를 세척하는 것을 포함한다. 당업자는 프로브 길이 등과 같은 인자를 조정하기 위해 필요한 온도, 이온 강도 등의 조정 방법을 인식할 것이다.

[0137] 용어 "프라이머" 또는 "프라이머들"은 상보성 RNA 또는 DNA 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화하고 예를 들면, 중합효소 연쇄 반응에서 발생하는 뉴클레오타이드트랜스퍼라제의 작용에 의해 모노뉴클레오타이드로부터 폴리뉴클레오타이드의 단계적 합성을 위한 출발점으로서의 역할을 하는 올리고뉴클레오타이드 서열을 의미한다.

[0138] 용어 "조절 서열"은 특정 숙주 유기체 내에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 의미한다. 예를 들면, 원핵생물에 적합한 조절 서열은 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서를 이용하는 것으로 알려져 있다.

[0139] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 있을 때 "작동가능하게 연결된다." 예를 들면, 프리서열 또는 분비 리더용 DNA는 폴리펩티드의 분비에 참여하는 예비 단백질로서 발현될 경우 폴리펩티드용 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 줄 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결되고, 리보솜 결합 부위는 번역을 촉진하도록 위치할 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결되는 DNA 서열이 인접함을 의미하고, 분비 리더의 경우 인접하고 리딩 단계로 존재한다. 그러나, 인핸서는 인접할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서 결합에 의해 구현된다. 상기 부위가 존재하지 않을 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커가 통상의 실례에 따라 사용된다.

[0140] "항체 의존성 세포 매개 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcR)을 발현하는 비특이적인 세포독성 세포 (예로서 자연 살해 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)가 표적 세포 상의 결합 항체를 인식한 후, 표적 세포의 용해를 야기하는 세포 매개 반응을 의미한다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하고, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈세포 상의 FcR 발현은 [Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)]의 464 페이지 표 3에 요약되어 있다. 관심의 대상이 되는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해서, 미국 특허 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 분석을 실시할 수 있다. 상기 분석에 유용한 이펙터 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 살해 (NK) 세포를 포함한다. 다르게는, 또는 추가로, 관심의 대상이 되는 분자의 ADCC 활성은 생체 내에서, 예를 들면 [Clynes et al., *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998)]에 개시된 동물 모델에서 평가할 수 있다.

[0141] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하고 ADCC 이펙터 작용을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초 혈액 단핵세포 (PBMC), 자연 살해 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함하고, PBMC 및 NK 세포가 바람직하다.

[0142] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 설명하기 위해 사용된다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 추가로, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하고 상기 수용체의 대립 유전자 변이체 및 교대 스플라이싱된 형태를 포함하여 Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII 하위 부류의 수용체를 포함하는 것이다. Fc γ RRII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이들은 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 활성화 모티프 (ITAM)를 포함한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신계 억제 모티프 (ITIM)를 포함한다 ([Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)] 참고). FcR은 문헌 ([Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991)]; [Capel et al., *Immunomethods* 4: 25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995)]에 개시되어 있다. 추후 동정되는 것을 포함하여 다른 FcR가 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 또한, 이 용어는 모체 IgG의 태아로의 전달에 작용하는 신생아의 수용체 FcRn를 포함한다 ([Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976)] 및 [Kim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994)]). 본원에서 FcR은 다형성, 예를 들면 IgG1에 결합하는 수용체의 영역에 위치하는 아미노산 위치 158번에 페닐알라닌 (F) 또는 발린 (V)을 생성시키는 Fc γ RIIIa를 코딩하는 유전자의 유전적 이형성을 포함한다. 동종 접합성 발린 Fc γ RIIIa (Fc γ RIIIa-158V)는 동종접합성 페닐알라닌 Fc γ RIIIa (Fc γ RIIIa-158F) 또는 이종접합성 (Fc γ RIIIa-158F/V) 수용체에 비해 인간 IgG1에 대해 보다 높은 친화도를 갖고, 시험관 내에서 증가된 ADCC를 매개하는 것으로 밝혀졌다.

[0143] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재 하에 표적을 용해시키는 분자의 능력을 의미한다. 보체 용

성화 경로는 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)이 동족 항원과 복합체화된 분자 (예로서 항체)에 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해서, 예를 들면 [Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996)]에 기재된 CDC 분석을 실시할 수 있다.

II. 본 발명의 다양한 방법 및 물질

감염에 대한 숙주 방어는 포유동물에서 선천성 및 적응 면역계의 동조 작용을 포함한다. NK 세포, 수지상 세포, 대식세포, 및 호중구를 포함하는 선천성 면역계는 감염에 대한 초기 반응에서 뿐만 아니라, T 및 B 세포-기반 적응 면역으로의 전이를 가이드하는데도 중요한 역할을 한다 [Diefenbach and Raulet, *Immunol. Rev.*, 188:9-21 (2002)]. 선천성 면역 세포는 감염된 세포의 직접적인 사멸 및 제거를 매개하고; 이후, 그들은 수지상 세포와의 물리적 상호작용 및 그 결과로서 특이적인 사이토카인의 분비를 통해 적응 작용의 발생을 활성적으로 지지한다 ([Diefenbach and Raulet, *Immunol. Rev.*, 181:170-184 (2001)]; [Fernandez et al., *Eur. Cytokine Netw.*, 13:17-27 (2002)]; [Ikeda et al., *Cytokine Growth Factor Rev.*, 13:95-109 (2002)]). INF-감마 및 IL-12는 T_H1 아형에 대한 헬퍼 $CD4^+$ T 세포의 발생을 분극화시켜 $CD8^+$ 이펙터 T 세포 반응을 활성화시키는 반면, IL-4는 T_H2 부류를 유도하여 B 세포-매개 항체 반응을 자극시킨다 ([Diefenbach and Raulet, 2002, 상기 문헌]; [Fernandez et al., 2002, 상기 문헌]; [Ikeda et al., 2002, 상기 문헌]).

선천성 면역은 감염에 대한 제1선의 방어로서 뿐만 아니라, 적응 면역 발생에 필요한 기간동안 숙주를 보호하는데도 중요하다. 추가로, 선천성 반응은 감염성 켈린지에 대한 반응으로 발생하는 적응 기작의 성질에 중요하게 영향을 미친다 ([Castriconi et al., *C R Biol.*, 327:533-537 (2004)]; [Lo et al., *Immunol. Rev.*, 169:225-239 (1999)]; [Palucka and Banchereau, *J. Clin. Immunol.*, 19:12-25 (1999)]; [Palucka and Banchereau, *Nat. Med.*, 5:868-870 (1999)]). NK 세포와 대식세포 및 수지상 세포의 상호작용이, 특정 T 및/또는 B 세포 반응의 발생을 지지하는 특이적인 사이토카인의 분비를 자극시킨다 ([Palucka and Banchereau, *J. Clin. Immunol.*, 19:12-25 (1999)]; [Palucka and Banchereau, *Nat. Med.*, 5:868-870 (1999)]; [Trinchieri, *Semin. Immunol.*, 7:83-88 (1995)]). NK 세포에 의한 INF-감마 분비 및 대식세포 및 수지상 세포에 의한 IL-12 생산은 적응 T_H1 반응의 발생을 촉진시킴으로써, 세포독성 T 세포 이펙터 작용을 일으킨다 ([Coudert et al., *J. Immunol.*, 169:2979-2987 (2002)]; [Fujii et al., *J. Exp. Med.*, 198:267-279 (2003)]; [Gerosa et al., *J. Exp. Med.*, 195:327-333 (2002)]; [Pan et al., *Immunol. Letters*, 94:141-151 (2004)]; [Varma et al., *Clin. Diag. Lab Immunol.*, 9:530-543 (2002)]). 대조적으로, NKT 세포에 의한 IL-4 생산은 적응 T_H2 분화 및 B 세포 활성화를 촉진시킨다 ([Araujo et al., *Int. Immunol.*, 12:1613-1622 (2000)]; [Kaneko et al., *J. Exp. Med.*, 191:105-114 (2000)]; [Leite-De-Moraes et al., *J. Immunol.*, 166:945-951 (2001)]).

본 출원에서 개시된 실험들은, TWEAK가 선천성 면역계의 중요한 조절자이며, 적응 면역과의 경계면임을 시사한다. 선천성 면역 세포, 즉, NK 세포, 대식세포 및 수지상 세포는 TWEAK 및 그의 수용체 FN14를 발현시키고, 자극시에는 상기 분자 둘 모두를 상향조절시켰다. 대조적으로, T 및 B 세포를 비롯한, 적응 면역계의 세포는 TWEAK 또는 FN14를 유의수준으로도 발현시키지 못했다. 이러한 발현 패턴은, 선천성 면역 세포에서의 TWEAK 신호화가 선천성 면역 작용을 조절할 수 있으며, 선천성 활성의 조절에 의해 적응 면역 반응에 간접적으로 영향을 줄 수 있다는 것을 시사한다.

하기 실시예 섹션에서 설명되는 바와 같이, 생산된 TWEAK 녹아웃(knockout) 마우스는 생육성이고 건강하였으며, 이는 TWEAK가 정상적인 발생에는 중요하지 않음을 입증하는 것이다. 그러나, 연령에 따라 매치된(age-matched), 야생형의 한배새끼(한배새끼)와 비교할 때 TWEAK^{-/-} 마우스에는 NK 세포가 현저히 축적되었다는 것이 나타났고, 이는 TWEAK가 NK 세포 생성 및/또는 사멸의 조절하에 있음과도 관련성이 있다. TWEAK 유전자 제거는 골수에서의 NK 세포양을 변화시키지 못했고, 이는 TWEAK 부재하에서의 NK 세포가 감소하지 않았음을 시사한다. 반대로, TWEAK의 중화는 TNF-알파, LPS, 또는 INF-감마에 의해 아포프토시스 유도로부터 인간 NK 세포를 보호하였다. 이러한 발견은, TWEAK^{-/-} 마우스에서 생성의 증가보다는 AICD의 손상이 NK 세포 축적을 유발한다는 것을 시사한다. 따라서, TWEAK의 하나의 면역 조절적 역할은, 면역학적 분해시 활성화된 NK 세포의 결실을 지지함으로써 잠재적으로 유해한, 과도의 선천성 반응을 방지하는 것을 돕는 것일 수 있다.

본 출원인들의 실험에서, 마우스에서의 TWEAK 결실은 전신 LPS 주사에 대한 마우스의 감수성을 상당 증가시켰고, 추가로 TWEAK는 선천성 반응을 억제시키는 것과 관련성을 갖는다. NK 세포 활성이 LPS에 대한 전신 염증 반응의 중요한 요소라고 가정할 때 ([Emoto et al., *J. Immunol.*, 169:1426-1432 (2002)]; [Heremans

et al., Eur. J. Immunol., 24:1155-1160 (1994)]), TWEAK^{-/-} 마우스의 과민성에 대한 이유로는 그의 NK 세포 갯수 상승일 수 있다. 그러나, 생체내에서 LPS에 노출된 후, TWEAK-결핍된 NK 세포는 더 많은 IFN-감마를 생산한 반면, TWEAK^{-/-} 대식세포는 더 많은 IL-12와 더 적은 갯수의 IL-10을 생산하였다는 것을 본 출원인들은 추가로 발견하게 되었다. 추가로, TWEAK 중화는 LPS-자극받은 NK 세포 및 대식세포는 IFN-감마 및 IL-12의 생산을 증진시켰다. 이러한 결과는, LPS에 대한 TWEAK^{-/-} 마우스의 감수성 증가는 그들의 NK 세포 갯수 상승 뿐만 아니라, IFN-감마 및 IL-12의 더 많은 선천성 면역 세포 생산으로부터 유래된 것이라는 것을 시사한다. 따라서, NK AICD를 지지하는 것 외에도, TWEAK는 중요한 전-염증성 사이토카인의 분비를 억제시킴으로써 선천성 반응을 단축시킬 수 있다. 이와 관련하여, TWEAK는 그와 관련된, IL-12 및 IFN-감마의 분비를 자극시키는 그와 관련된 TNF-알파와 현저하게 상이하고, 따라서, 선천성 염증 반응을 증강시킨다 ([D'Andrea et al., J. Exp. Med., 178:1041-1048 (1993)]; [Oswald et al., Eur. Cytokine Netw., 10:533-540 (1999)]; [Wilhelm et al., J. Immunol., 166:4012-4019 (2001)]; [Zhan and Cheers, J. Immunol., 161:1447-1453 (1998)]). 실제로, TWEAK 녹아웃의 LPS 과민성과는 대조적으로, TNF-알파 또는 TNFR1 녹아웃 마우스는 LPS-유도 치사에 대하여는 내성을 띤다([Pasparakis et al., J. Exp. Med., 184:1397-1411 (1996)]; [Rothe et al., Circ. Shock, 44:51-56 (1994)]).

[0150]

STAT-1는 감염에 대한 반응에서 IFN- 감마 및 IL-12 생산에 관여하는 중요한 신호-전달자이다 ([Dupuis et al., Immunol. Rev., 178:129-137 (2000)]; [Feinberg et al., Eur. J. Immunol., 34:3276-3284 (2004)]). TWEAK^{-/-} 및 야생형 마우스로부터 유래된 NK 세포 및 대식세포종의 포스포-STAT-1을 비교할 결과, LPS에 대한 반응에서 자극이 증진되었고 기본 활성이 상승되었음이 밝혀졌다. 이러한 결과는, TWEAK가 STAT-1 활성을 저해하는 것으로서, 상기 작용을 증진시키는 TNF-알파와는 대조적이라는 것을 시사한다 [Chen et al., Immunology, 107:199-208 (2002)]. 따라서, TWEAK가 IFN-감마 및 IL-12의 생산을 억제시키는데 도움이 될 수 있는 하나의 기작은 STAT-1의 저해이다. STAT-1과 유사하게, NF-κB1 또한 사이토카인 유전자 전사 조절에 중요한 역할을 한다 ([Feinberg et al., Eur. J. Immunol., 34:3276-3284 (2004)]; [Zhan and Cheers, J. Immunol., 161:1447-1453 (1998)]). 인간 NK 세포 및 대식세포에서 TWEAK는 전사 억제자 HDAC-1과 당해 인자와의 결합을 유도하면서 장기간의 NF-κB1 인산화를 자극시켰다. 대조적으로, TNF-알파는 일시적인 NF-κB1 인산화 및 전사 공-활성자 p300와의 결합을 유도하였다. 따라서, TWEAK가 IFN-감마 및 IL-12의 합성을 억제시키는데 도움이 되는 제2 기작은 NF-κB1 및 HDAC-1 사이의 결합을 유도하는 것일 수 있다. NF-κB1의 조절과 관련하여 TWEAK와 TNF-알파 사이의 차이는 당해 인자와 다른 전사 조절자의 결합에 영향을 미치는 NF-κB1 인산화의 동역학에 기인할 수 있는데, 이에 일시적인 인산화는 p300과의 상호작용에 유리한 반면, 지속적인 변형은 HDAC-1과의 결합을 촉진시킨다. 일시적인 것 vs 지속적인 JNK 인산화는 세포 생존 vs 세포 사멸의 촉진과 관련성을 갖는 바, 이러한 관찰과 TNF-알파에 의한 c-Jun N-말단 키나제 (JNK)의 조절 사이에는 유사점이 있는 것처럼 보인다 [Varfolomeev and Ashkenazi, Mol. Cell Biol., 24:997-1006 (2004)].

[0151]

본 출원인들의 관찰은 감염에 대한 반응에서 NK 세포 및 대식세포에 의한 TWEAK의 발현은 NK AICD를 촉진시킴으로써, NK 세포 및 대식세포에 의한 IFN-감마 및 IL-12의 생산을 억제시킴으로써 선천성 염증 반응을 단축시킨다는 것을 시사한다. IFN-감마 및 IL-12는 선천성 염증 반응을 증진시킬 뿐만 아니라; 세포성 T_H1-유형 반응을 위한 적응 면역으로의 전이를 촉진시켰다. TWEAK의 부재하에서 성숙 마우스에서는 NK 세포 (지라 특이세포의 극소 분획을 구성한다) 뿐만 아니라, T_H1 표현형의 T 세포의 갯수가 증가된, 지라비대가 발생하였다는 것을 본 출원인은 관찰하게 되었다. 추가의 실험적 증거를 통해 TWEAK가 적응 전이를 조절한다는 것이 입증되었다. 마우스 B16 흑색종 모델에서, TWEAK^{-/-} 마우스는 중등 침윤성 B16.F10 서브클론의 성장을 거부한 반면, 야생형 한 배새끼는 종양 성장을 퇴치시키지 못했다. TWEAK^{-/-} 마우스에서 NK 세포의 갯수가 상승하였다는 것은 종양을 거부할 수 있는 그들을 능력을 설명할 수 있는 반면, 이들 마우스에서의 항-종양 반응은 또한 CD8⁺ T 세포의 확대, 및 그와 일관되게 T_H1 반응의 증강과도 관련성을 가졌다. 더욱 침윤성인 B16.BL6 서브클론의 성장에 대해 TWEAK^{-/-} 마우스는 또한 야생형 대조군보다도 잘 저항하였고, 생체외에서 종양 세포로 재-캘린지시켰을 때에는 상응하는 대조군보다 그의 CD8⁺ T 세포 및 NK 세포는 현저히 더욱 많은 IFN-감마를 생산시키고, 그의 대식세포는 더욱 많은 IL-12를 생성시켰다.

[0152]

따라서, TWEAK는 IFN-감마 및 IL-12의 생산을 억제시켜 연속되는 T_H1-매개 세포성 반응의 발생을 억제시킴으로

써 킴으로써 선천성-대-적응 경계면을 조절한다는 것을 상기 발견은 시사한다. 본 출원인은, 구조상 관련성이 있는 TNF-알파의 작용과는 현저히 차이가 나는, TWEAK가 면역 조절에서 중요한 역할을 한다는 것을 발견하게 되었다. TNF-알파는 선천성 세포 자극 및 전-염증성 사이토카인 분비를 촉진시킴으로써 선천성 염증 반응을 지지한다는데에서 중요한 역할을 한다. 대조적으로, NK AICD를 매개함으로써 그리고 NK 세포 및 대식세포에 의한 IFN-감마 및 IL-12의 생산을 억제시킴으로써 선천성 반응을 단축시키는데 중요한 것처럼 보인다. TNF-알파는 STAT-1 활성화 및 p300과 NF-κB1 결합을 촉진시킴으로써 면역조절 유전자의 전사를 활성화시키는 반면, TWEAK는 STAT-1 활성을 억제시키고, HDAC-1와 NF-κB1의 결합을 유도함으로써 유전자 전사를 저해시킨다. 중요하게는, TWEAK는 또한 선천성으로부터 적응 T_H1 면역 반응으로의 전이를 감쇄시키는데 중요한 역할을 한다. 따라서, TWEAK의 작용은 숙주 포유동물의 선천성 및 적응 반응을 억제시키는데 도움을 줄 수 있고, 이로써, 과도한 염증 및 자가면역이 발생하지 못하도록 할 수 있다. 이러한 발견은, TWEAK 저해가 항-감염성 및 항-종양 면역을 증강시키는데에는 임상적으로 유용할 수 있고, 동시에 TWEAK 수용체 활성화는 급성 및 만성 자가 면역 질환을 조절하는데 유용할 수 있다는 것을 시사한다.

[0153] 본 발명의 방법에 따라, TWEAK 또는 TWEAK 수용체 활성을 조절하는 하나 이상의 분자를 포함하는 조성물은 다양한 질병을 치료하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, TWEAK 길항제는 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 그러한 TWEAK 길항제는 TWEAK 항체, TWEAK 변이체, TWEAK 수용체 면역억제제, 및 TWEAK 수용체 항체를 포함한다. TWEAK 길항제는 생체내 뿐만 아니라, 생체외에서도 사용될 수 있다. 임의로, TWEAK 길항제는 하기에 추가로 상세히 설명되는 바와 같이 약제학적 조성물의 형태로 사용된다.

[0154] 추가의 실시태양에서, TWEAK 효능제는 다양한 면역-관련 용태의 치료에 사용될 수 있다. 그러한 TWEAK 효능제는 TWEAK 수용체 항체 및 TWEAK 폴리펩티드를 포함한다. TWEAK 효능제는 생체내 뿐만 아니라, 생체외에서도 사용될 수 있다. 임의로, TWEAK 효능제는 하기에 추가로 상세히 설명되는 바와 같이 약제학적 조성물의 형태로 사용된다.

[0155] 하기 설명에서 다양한 방법 및 기술이 기재된다. 이들 방법 및 기술은 다양한 TWEAK 효능제 및 길항제를 제조하기 위해 유사하게 사용될 수 있음에 주시한다.

[0156] 일례로, TWEAK 폴리펩티드 및 TWEAK 폴리펩티드 변이체가 제조될 수 있음에 주시한다. TWEAK 변이체는 적절한 뉴클레오티드 변화를 코딩 DNA에 도입시키고/거나 원하는 폴리펩티드를 합성함으로써 제조될 수 있다. 당업자는 아미노산 변화가 TWEAK 폴리펩티드의 해독 후 과정을 변경시킬 수 있다는 것, 예로서, 당화 부위의 갯수 또는 위치를 변화시킬 수 있다는 것 또는 막 고정 특징을 변화시킬 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0157] 예를 들면, 미국 특허번호 제5,364,934호에 기재된 보존적 및 비보존적 돌연변이에 대한 임의의 기술 및 가이드 라인을 사용하여 본원에 기술된 TWEAK 폴리펩티드의 변이를 제조할 수 있다. 변이는 천연 서열 폴리펩티드와 비교할 때 아미노산 서열상의 변화를 가져오는, 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 코돈의 치환, 결실, 또는 삽입일 수 있다. 임의로, 변이는 TWEAK 폴리펩티드의 하나 이상의 도메인에서 적어도 하나의 아미노산이 임의의 다른 아미노산으로 치환되는 것에 의한다. TWEAK 폴리펩티드의 서열을 상동성의 공지 단백질 분자의 것과 비교하고, 고도의 상동성 영역에서 형성된 아미노산 서열의 변화 갯수를 최소화함으로써 원하는 활성에 대한 부작용 없이 어떤 아미노산 잔기를 삽입, 치환 또는 결실시킬 수 있는지를 결정하는 것에 대한 가이드를 찾을 수 있다. 아미노산 치환은 하나의 아미노산을, 구조 및/또는 화학적 성질이 유사한 또다른 아미노산으로 대체하는 것, 예로서, 류신을 세린으로 대체하는 것, 즉, 보존적 아미노산 대체의 결과일 수 있다. 삽입 및 결실은 임의로 약 1 내지 5개의 아미노산 범위로 존재할 수 있다. 허용되는 변이는, 서열내 아미노산을 체계적으로 삽입, 결실 또는 치환시키고, 전장 또는 성숙한 천연 서열에 의해 나타나는 활성에 대하여 생성된 변이체를 시험함으로써 결정될 수 있다.

[0158] TWEAK 폴리펩티드 단편은 본원에서 제공된다. 상기 단편은 N-말단 또는 C-말단에서 절단될 수 있거나, 예를 들면, 전장의 천연 단백질과 비교하였을 때 내부 잔기가 결실되어 있을 수 있다. 특정 단편에는 TWEAK 폴리펩티드의 원하는 생물학적 활성에 필수적인 것이 아닌 아미노산 잔기가 결실되어 있다.

[0159] TWEAK 폴리펩티드 단편은 다수의 통상적 기술중 어느 것에 의해 제조될 수 있다. 원하는 펩티드 단편을 화학적으로 합성할 수 있다. 대체 접근법은 효소 분해에 의해, 예로서, 단백질을 절단하는 것으로 공지되어 있는 효소로 단백질을 특정 아미노산 잔기에 의해 규정된 부위에서 처리하거나, 적합한 제한 효소로 DNA를 분해시키고 원하는 단편을 단리시킴으로써 폴리펩티드 단편을 생산하는 것을 포함한다. 추가의 또다른 적합한 기술은 원하는 폴리펩티드 단편을 코딩하는 DNA 단편을 단리시키고, 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 증폭시키는 것을 포함한다. DNA 단편의 원하는 말단을 규정짓는 올리고뉴클레오티드는 PCR에서 5' 및 3' 프라이머에서 사용된다.

[0160] 특정 실시태양에서, 관심의 대상이 되는 보존적 치환은 바람직한 치환이라는 표제하에 하기 표에 나타난다. 상기와 같은 치환을 통해 생물학적 활성이 변화될 경우에는 더 실질적인 변화, 표중의 명명된 예시 치환기 또는 아미노산 부류에 관한 하기 기술이 도입되고, 산물은 선별된다.

[0161] 표

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

[0162]

[0163] TWEAK 폴리펩티드의 작용 또는 면역학적 실체에 대한 실질적인 변형은 (a) 시트 또는 나선 형태로서 치환기 부분에서 폴리펩티드 골격 구조, (b) 표적 부위에 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는 것에 대한 영향에서 현저하게 다른 치환기를 선택함으로써 구현된다. 자연-발생적 잔기는 통상적인 측쇄 성질에 기초하여 군으로 분류된다:

[0164] (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0165] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

[0166] (3) 산성: asp, glu;

[0167] (4) 염기성: asn, gin, his, lys, arg;

[0168] (5) 쇠 배향에 영향을 끼치는 잔기: gly, pro;

[0169] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0170] 비보존적 치환은 상기 부류중 하나의 구성원을 또다른 부류의 것으로 교환시키는 것을 포함할 것이다. 상기과 같이 치환된 잔기는 또한 보존적 치환 부위에 도입될 수 있거나, 더욱 바람직하게는 나머지 (비보존) 부위에 도입될 수 있다.

[0171] 변이는 올리고뉴클레오티드-매개 (위치-지정) 돌연변이유발법, 알라닌 스캐닝법 및 PCR 돌연변이유발법과 같은

당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 위치 지정 돌연변이유발법 ([Carter et al., *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); [Zoller et al., *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1987)]), 카세트 돌연변이유발법 [Wells et al., *Gene*, 34:315 (1985)], 제한 선택 돌연변이유발법 [Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317:415 (1986)] 또는 다른 공지의 기술을 클로닝된 DNA상에서 실시하여 TWEAK 폴리펩티드 변이체 DNA를 생산할 수 있다.

[0172] 또한, 스캐닝 아미노산 분석을 사용하여 인접 서열을 따라 하나 이상의 아미노산을 동정할 수 있다. 바람직한 스캐닝 아미노산중 비교적 작은 중성 아미노산이 존재한다. 이러한 아미노산은 알라닌, 글리신, 세린 및 시스테인을 포함한다. 통상적으로, 알라닌은 베타-탄소 밖의 측쇄를 제거하고 변이체의 주쇄 배열을 변경시킬 가능성이 적기 때문에 바람직한 스캐닝 아미노산이다 [Cunningham and Wells, *Science*, 244: 1081-1085 (1989)]. 또한, 알라닌은 전형적으로 가장 흔한 아미노산이기 때문에 바람직하다. 추가로, 알라닌은 매립된(buried) 위치 및 노출된 위치 모두에서 빈번하게 발견된다 ([Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); [Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)]). 알라닌 치환이 적당한 양의 변이체를 생성시키지 않으면, 등가의(isoteric) 아미노산이 이용될 수 있다.

[0173] TWEAK 폴리펩티드의 적당한 구조를 유지하는데 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기를 일반적으로 세린으로 치환하여 상기 분자의 산화적 안정성을 향상시키고 잘못된 가교결합을 방지할 수 있다. 반대로, 시스테인 결합(들)을 TWEAK 폴리펩티드에 가하여 그의 안정성을 향상시킬 수 있다.

[0174] 하기 설명은 주로 TWEAK 폴리펩티드-코딩 핵산을 포함하는 벡터로 형질전환되거나 형질감염된 세포를 배양함으로써 TWEAK 폴리펩티드를 생산하는 것에 관한 것이다. 물론, 당업계에 잘 공지되어 있는 대체 방법을 사용하여 본원에서 주시하고 있는 다양한 TWEAK 효능제 및 TWEAK 길항제를 제조할 수 있다는 것도 주시하고 있다. 예를 들면, 적절한 아미노산 서열, 또는 그의 일부분은 고체상 기술을 사용하는 직접 펩티드 합성법에 의해 생산할 수 있다 (예로서, [Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969)]; [Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963)] 참조). 시험관내 단백질 합성법은 수동 기술 또는 자동화에 의해 실시할 수 있다. 자동화된 합성법은 어플라이드 바이오시스템즈 펩티드 합성기(Applied Biosystems Peptide Synthesizer)(캘리포니아주 포스터시티 소재)를 제조사의 지시에 따라 사용하여 수행할 수 있다. TWEAK 폴리펩티드의 다양한 단편을 별도로 화학적으로 합성하고 화학적 또는 효소적 방법을 사용하여 조합함으로써 원하는 TWEAK 폴리펩티드를 제조할 수 있다. 기재된 방법 및 기술은 TWEAK 변이체, TWEAK 및 TWEAK 항체의 변형된 형태의 생산에 유사하게 적용될 수 있다.

[0175] 1. TWEAK 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 단리

[0176] TWEAK 폴리펩티드를 코딩하는 DNA는 TWEAK 폴리펩티드 mRNA를 보유하여 그를 검출가능한 수준으로 발현시킬 것으로 여겨지는 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 수득될 수 있다. 따라서, 인간 TWEAK 폴리펩티드의 DNA는 인체 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 편리하게 수득할 수 있다. TWEAK 폴리펩티드-코딩 유전자는 또한 게놈 라이브러리로부터 수득하거나, 공지된 합성 방법 (예를 들면, 자동 핵산 합성 방법)에 의해 수득할 수 있다.

[0177] 라이브러리는 관심의 대상이 되는 유전자 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 동정하기 위해 고안된 프로브 (예를 들면, 적어도 약 20 내지 80개의 염기로 구성된 올리고뉴클레오타이드)를 사용하여 선별될 수 있다. 선택된 프로브를 사용한 cDNA 또는 게놈 라이브러리의 선별은 예를 들면, [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Haror Laboratory Press, 1989)]에 기재된 바와 같은 표준 방법을 사용하여 수행할 수 있다. TWEAK 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 단리하는 대체 수단은 PCR 방법을 사용하는 것이다 ([Sambrook et al., 상기 문헌]; [Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Haror Laboratory Press, 1995)]).

[0178] cDNA 라이브러리를 선별하는 기술은 당업계에 잘 공지되어 있다. 프로브로서 선택된 올리고뉴클레오타이드 서열은 거짓 양성 결과를 최소화하기 위해서 충분한 길이를 갖고 충분히 분명한 서열이어야 한다. 올리고뉴클레오타이드는 선별되는 라이브러리에서 DNA에 혼성화시에 검출될 수 있도록 표지되는 것이 바람직하다. 표지 방법은 당업계에 공지되어 있고, ³²P-표지된 ATP와 같은 방사성 표지, 바이오티닐화 또는 효소 표지의 사용을 포함한다. 중등의 엄격성 및 고엄격성을 포함하는 혼성화 조건은 [Sambrook et al., 상기 문헌]에서 제공된다.

[0179] 상기 라이브러리 선별 방법에서 동정된 서열은 진뱅크(GenBank)와 같은 공용 데이터베이스 또는 개인 소유의 다른 서열 데이터베이스에 기탁되고 이들 데이터베이스로부터 입수될 수 있는 다른 공지의 서열과 비교하여 정렬

시킬 수 있다. 분자의 규정된 영역내 또는 전장 서열에 걸친 서열 동일성 (아미노산 또는 뉴클레오티드 수준에서)은 선행 기술 공지된 방법 및 본원에서 설명된 방법을 이용하여 결정될 수 있다.

[0180] 단백질 코딩 서열을 갖는 핵산은 먼저 본원에 개시된 추정 아미노산 서열을 사용하고, 필요하다면, [Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재된, 전구체를 검출하기 위한 통상의 프라이머 신장 방법을 사용하여, 선택된 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 선별하고, cDNA로 역전사되지 않은 mRNA의 중간체를 프로세싱함으로써 수득할 수 있다.

[0181] 2. 숙주세포의 선택 및 형질전환

[0182] 숙주세포는 TWEAK 폴리펩티드 생성을 위해 본원에서 설명한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질감염 또는 형질전환되고, 프로모터 유도, 형질전환체 선별 또는 원하는 서열의 코딩 유전자 증폭에 적합하게끔 개질된 통상의 영양 배지중에서 배양된다. 당업자라면 불필요한 실험을 수행하지 않고서도 배지, 온도, pH 등과 같은 배양 조건을 선택할 수 있다. 일반적으로, 세포 배양물의 생산성을 최대화하기 위한 원칙, 프로토콜 및 실시되는 기술은 ([Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991)] 및 [Sambrook et al., 상기 문헌])에서 찾을 수 있다.

[0183] 진핵세포 형질감염 방법 및 원핵세포 형질전환 방법, 예를 들면, CaCl_2 , CaPO_4 , 리포솜-매개 방법 및 전기천공법은 당업자에게 공지되어 있다. 사용되는 숙주세포에 따라, 형질전환은 상기 세포에 적합한 표준 기술을 사용하여 수행된다. [Sambrook et al. 상기 문헌]에 기재된 염화칼슘을 이용하는 칼슘 처리, 또는 전기천공법은 일반적으로 원핵세포에 대해 사용된다. 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 사용한 감염은 [Shaw et al., Gene, 23:315 (1983)] 및 1989년 6월 29일 공개된 국제 공개 제89/05859호에 기재된 바와 같이 특정 식물 세포의 형질전환에 사용된다. 세포벽이 없는 포유동물 세포의 경우, [Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)]의 인산칼슘 침전법을 사용할 수 있다. 포유동물 세포 숙주 시스템 형질감염의 일반적인 특징은 미국 특허 제4,399,216호에 기재되어 있다. 효모내로의 형질전환은 일반적으로 ([Van Solingen et al., J. Bact., 130:949(1977) 및 [Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci.(USA), 76:3829(1979)])의 방법에 따라 수행된다. 그러나, 세포내로 DNA를 도입하는 다른 방법, 예를 들면, 핵내 미세주입, 전기천공법, 무손상 세포와 세균 원형질체 융합, 또는 다가양이온, 예를 들면, 폴리브렌, 폴리오르니틴도 사용될 수 있다. 포유동물 세포의 형질전환을 위한 다양한 기술에 대해서는 ([Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)] 및 [Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988)])을 참조한다.

[0184] 본원에서 벡터내의 DNA를 클로닝 또는 발현하기에 적합한 숙주세포에는 원핵세포, 효모 또는 고등 진핵세포가 포함된다. 적합한 원핵세포는 진정세균, 예를 들면, 그람 음성 또는 그람 양성 생물, 예를 들면, 엔테로박테리아세(*Enterobacteriaceae*), 예를 들면, E. 콜라이(*E. coli*)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 다양한 E. 콜라이 균주, 예를 들면, E. 콜라이 K12 균주 MM294 (ATCC 31,446), E. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537), E. 콜라이 균주 W3110 (ATCC 27,325) 및 E. 콜라이 균주 K5 772 (ATCC 53,635)는 공공연하게 입수할 수 있다. 다른 적합한 원핵생물 숙주세포는 에서리키아(*Eshcherichia*), 예를 들면, E. 콜라이, 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클렙시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들면, 살모넬라 티피무리움 (*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들면, 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*) 및 시겔라(*Shigella*) 등의 엔테로박테리아세, 및 바실러스(*Bacillus*), 예를 들면, B. 서브틸리스 (*B. subtilis*) 및 B. 리체니포르미스(*B. licheniformis*) (예를 들면, 1989년 4월 12일자로 공개된 DD 266,710호에 기재된 B. 리체니포르미스(*B. licheniformis*) 41P), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예를 들면, P. 아에루기노사 (*P. aeruginosa*) 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)를 포함한다. 이러한 예는 단지 예시적인 것으로서 이에 제한되는 것은 아니다. 균주 W3110은 재조합 DNA 산물 발효에 공통적인 숙주 균주이기 때문에 특히 바람직한 숙주 또는 모 숙주이다. 바람직하게는, 숙주세포는 최소량의 단백질 분해 효소를 분비한다. 예를 들면, 균주 W3110은 숙주의 내생 단백질을 코딩하는 유전자의 돌연변이를 초래하도록 변형될 수 있고, 이러한 숙주의 예는 완전한 유전자형 *tonA*를 갖는 E. 콜라이 W3110 균주 1A2; 완전한 유전자형 *tonA ptr3*을 갖는 E. 콜라이 W3110 균주 9E4; 완전한 유전자형 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan^r*를 갖는 E. 콜라이 W3110 균주 27C7 (ATCC 55,244); 완전한 유전자형 *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*를 갖는 E. 콜라이 W3110 균주 37D6; 비-카나마이신 내성 *degP* 결실 돌연변이를 갖는 균주 37D6인 E. 콜라이 W3110 균주 40B4; 및 1990년 8월 7일자로 허여된 미국 특허 제4,946,783호에 개시된 페리플라즈م 프로테아제 변이체를 갖는 E. 콜라이 균주를 포함한다. 다르게는, 시험관내 클로닝 방법, 예로서, PCR 또는 다른 핵산 증폭효소 반응이 적합하다.

- [0185] 원핵 세포 이외에, 진핵 세포 마이크로브, 예를 들면, 선상진균 또는 효모는 TWEAK 폴리펩티드-코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로미스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*)는 흔히 사용되는 하등 진핵세포 숙주 미생물이다. 이외에 쉬조사카로미스 폼브(*Schizosaccharomyces pombe*) ([Beach and Nurse, *Nature*, 290: 140 (1981); EP 139,383(1985년 5월 2일 공개)]; 클루이베로미스(*Kluyveromyces*) 숙주 (미국 특허 번호 제4,943,529호; [Fleer et al., *Bio/technology*, 9: 968-975(1991)]), 예를 들면 *K. 락티스*(*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; [Louvencourt et al., *J. Bacteriol.*, 154(2):737-742(1983)]), *K. 프라길리스*(*K. fragilis*) (ATCC 12,424), *K. 불가리쿠스*(*K.bulgaricus*) (ATCC 16,045), *K. 위커라미*(*K. wickeramii*) (ATCC 24,178), *K. 왈티*(*K. waltii*) (ATCC 56,500), *K. 드로소필라룸*(*K. drosophilorum*) (ATCC 36,906; [Van den Berg et al., *Bio/Technology*, 8:135(1990)]), *K. 테모토레란*(*K. thermotolerans*), 및 *K. 마르시아누스*(*K. marxianus*); 야로위아(*Yarrowia*) (EP 402,226); 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*)(EP 183,070; [Sreekrishna et al., *J. Basic Microbiol.*, 28: 265-278(1988)]); 칸디다(*Candida*); 트리코데르마 레에시아(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); 누로스포라 크라사(*Neurospora crassa*) [Case et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 5259-5263 [1979]]; 쉬와니오미스(*Schwanniomyces*), 예를 들면, 쉬와니오미스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*) (1990년 10월 31일 공개된 EP 394,538); 및 선상 진균, 예를 들면, 누로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포크라툼(*Tolypocladium*)(1991년 1월 10일 공개된 WO 91/00357), 및 아스퍼길루스(*Aspergillus*) 숙주, 예를 들면, *A. 니둘란스*(*A. nidulans*)([Ballance et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 112: 284-289 [1983]]; [Tilburn et al., *Gene*, 26: 205-221 [1983]]; [Yelton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:1470-1474 [1984]]) 및 *A. 니거*(*A. niger*) [Kelly and Hynes, *EMBO J.*, 4: 475-479 [1985]]이 포함된다. 메틸 요구 효모(methylotropic yeast)는 본원에 적합하며, 제한하는 것은 아니지만, 한세눌라(*Hansenula*), 칸디다(*Candida*), 클로에케라(*Kloeckera*), 피키아(*Pichia*), 사카로미스(*Saccharomyces*), 토루롭시스(*Torulopsis*) 및 로도토룰라(*Rhodotorula*)로 구성되는 숙주로부터 선택된 메탄올에서의 성장이 가능한 효모를 포함하고, 이로 제한되는 것은 아니다. 이러한 부류의 효소의 일례인 특정 종에 대한 목록은 [C. Anthony, *The Biochemistry of Methylotrophs*, 269 (1982)]에서 찾아볼 수 있다.
- [0186] 당화 TWEAK 폴리펩티드의 발현에 위한 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 비척추동물 세포의 예는 곤충 세포, 예를 들면, 드로소필라(*Drosophila*) S2 및 스포도프테라(*Spodoptera*) Sf9 뿐만 아니라, 식물 세포, 면화, 옥수수, 감자, 대두, 페투니아, 토마토 및 담배의 세포 배양물이 포함된다. 다수의 바쿨로바이러스 균주 및 변이체, 및 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) (모충), 아에데스 애기프티(*Aedes aegypti*) (모기), 아에데스 알보픽투스(*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*) (과실파리) 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*) 숙주로부터 유래된 상응하는 허용가능한 곤충 숙주 세포가 동정되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예로서, 오토그라파 칼리포니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 입수 가능하며, 이러한 바이러스는 특히 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해 본 발명에 따른 바이러스로서 사용될 수 있다.
- [0187] 그러나, 가장 큰 관심의 대상이 되는 것은 척추동물 세포에 있으며, 척추동물 세포를 배양물 (조직 배양물)에서 증식시키는 것은 통상적인 과정이 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40으로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (293 세포, 또는 현탁 배양물에서 성장시키기 위해 서브클로닝된 293 세포; [Graham et al., *J. Gen. Virol.*, 36:59, 1977]); 새끼 햄스터 신장 세포(BHK, ATCC CCL 10); 중국산 햄스터 난소 세포/-DHFR [CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)]; 마우스 세르톨리 세포 [TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)]; 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카산 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유선 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 [Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)]; MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암종 세포주 (Hep G2)이다.
- [0188] 숙주 세포를 TWEAK 폴리펩티드 생산을 위한 상기 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시킨 다음, 프로모터 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나 또는 원하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 경우에 따라 변형된 통상적인 영양 배지내에서 배양한다.
- [0189] 3. 복제가능 벡터의 선택 및 사용
- [0190] TWEAK 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 (예로서, cDNA 또는 게놈 DNA)은 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능 벡터에 삽입할 수 있다. 다양한 벡터를 공공연하게 이용할 수 있다. 예를 들면, 벡터는 플라스미드,

코스미드, 바이러스 입자 또는 파지의 형태일 수 있다. 적절한 핵산 서열은 다양한 방법에 의해 벡터 내에 삽입될 수 있다. 일반적으로, 당업계에 공지된 기술을 사용하여 DNA를 적절한 제한효소 부위내에 삽입한다. 벡터 성분은 일반적으로 제한하는 것은 아니지만, 하나 이상의 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 성분, 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함한다. 상기 성분을 하나 이상 포함하는 적합한 벡터의 작제는 당업자에게 공지된 표준 결찰 기술을 이용한다.

[0191] TWEAK 폴리펩티드는 직접 재조합 방법에 의해 생산될 수 있을 뿐만 아니라, 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에서 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드 또는 신호 서열일 수 있는 이중 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 생산될 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나, 벡터내로 삽입된 TWEAK 폴리펩티드-코딩 DNA의 일부일 수 있다. 신호 서열은 예를 들면, 알칼리 포스파타제, 페니실리나제, lpp 또는 열-안정성 엔테로톡신 II 리더의 군으로부터 선택된 원핵생물 신호 서열일 수 있다. 효모에서의 분비를 위해, 신호 서열은 예를 들면, 효모 인버타제 리더, 알파 인자 리더(사카로마이세스 및 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*) α -인자 리더(미국 특허 제5,010,182호)를 포함함) 또는 산 포스파타제 리더, *C. 알비칸스*(*C. albicans*) 글루코아밀라제 리더 (1990년 4월 4일 공개된 EP 362,179) 또는 1990년 11월 15일 공개된 W090/13646에 기재된 신호 서열일 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열, 예를 들면, 동일하거나 관련된 종의 분비 폴리펩티드로부터의 신호 서열 및 바이러스 분비 리더를 사용하여 단백질의 분비를 유도할 수 있다.

[0192] 발현 및 클로닝 벡터 양자 모두는 벡터가 선택된 하나 이상의 숙주세포에서 복제할 수 있도록 만드는 핵산 서열을 함유한다. 이러한 서열은 다양한 세균, 효모 및 바이러스에 대해 공지되어 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점은 대부분의 그람 음성 세균에 적합하고, 2 μ 플라스미드 복제 기점은 효모에 적합하고, 다양한 바이러스 복제 기점 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)은 포유동물 세포에서 벡터를 클로닝하는 데 유용하다.

[0193] 발현 및 클로닝 벡터는 전형적으로 선별가능한 마커로도 불리우는 선별 유전자를 함유할 것이다. 전형적인 선별 유전자, 예를 들면, 바실러스의 경우 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들면, 엠피실린, 네오마이신, 메토크세이트 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하는 단백질, (b) 영양요구성 결함을 보완하는 단백질 또는 (c) 복합 배지로부터 이용할 수 없는 중요한 영양물질을 공급하는 단백질을 코딩한다.

[0194] 포유동물 세포에 적합한 선별가능한 마커의 예에는 TWEAK 폴리펩티드-코딩 핵산을 수용할 수 있는 세포를 동정할 수 있게 하는 것, 예를 들면, DHFR 또는 티미딘 키나아제가 있다. 야생형 DHFR이 사용될 경우, 적절한 숙주 세포는 DHFR 활성이 결여된 CHO 세포주이고, [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216(1980)]에 기재된 바와 같이 제조 및 증식된다. 효모에 사용하기에 적합한 선별 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 *trp1* 유전자이다 ([Stinchcomb et al., Nature, 282:39(1979)]; [Kingsman et al., Gene, 7:141(1979)]; [Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]). *trp1* 유전자는 트립토판으로의 성장능이 결여된 효모의 변이주 (예로서, ATCC 44076 또는 PEP4-1)에 대한 선별 마커를 제공한다 [Jones, Genetics, 85: 12 (1977)].

[0195] 발현 및 클로닝 벡터는 일반적으로 mRNA 합성을 유도하는 TWEAK 폴리펩티드 코딩 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 다양한 잠재적 숙주세포에 의해 인식되는 프로모터는 잘 공지되어 있다. 원핵생물 숙주에 사용하기에 적합한 프로모터에는 β -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템 ([Chang et al., Nature, 275:615 (1978)]; [Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)]), 알칼리 포스파타제, 트립토판 (*trp*) 프로모터 시스템 [Goeddel, Nucleic acid Res., 8:4057 (1980); EP 36,776], 및 하이브리드 프로모터, 예를 들면, tac 프로모터 [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]를 포함한다. 또한, 세균 시스템에서 사용되는 프로모터는 TWEAK 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 샤인-달가노 (S.D.) 서열을 함유할 것이다.

[0196] 효모 숙주에 사용하기 적합한 프로모터 서열의 예에는 3-포스포글리세레이트 키나아제 [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 또는 다른 당분해 효소 ([Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149(1968)]; [Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)]), 예를 들면, 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 탈하이드로게나제, 헥소키나아제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프럭토키나아제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤티아제, 피루베이트 키나아제, 트리오세포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제 및 글루코키나아제에 대한 프로모터가 포함된다.

[0197] 성장 조건에 의해 조절되는 전사의 추가의 이점을 갖는 유도가능한 프로모터인 다른 효모 프로모터로는 알콜 데

하이드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사에 관련된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르 알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나제, 및 말토스 및 갈락토스 이용에 작용하는 효소에 대한 프로모터 영역이 있다. 효소 발현에 사용하기에 적합한 벡터 및 프로모터는 추가로 EP 73,657에 기재되어 있다.

[0198] 포유동물 숙주세포내의 벡터로부터의 TWEAK 폴리펩티드 전사는 바이러스, 예를 들면, 폴리오마 바이러스, 포울 폭스 바이러스 (1989년 7월 5일 공개된 UK 제2,211,504호), 아데노바이러스(예로서, 아데노바이러스 2), 소 파 필로마 바이러스, 조류 육종 바이러스, 싸이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)의 게놈으로부터 얻어진 프로모터, 이중 포유동물 프로모터, 예를 들면, 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터 및 열-충격 프로모터로부터 얻어진, 숙주세포 시스템에 적합한 프로모터에 의해 조절된다.

[0199] 고등 진핵세포에 의한 TWEAK 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 전사는 인핸서 서열을 벡터에 삽입함으로써 증가될 수 있다. 인핸서는 일반적으로 전사를 증가시키기 위해 프로모터에 대해 작용하는, 약 10 내지 300 bp의 DNA의 시스-액팅 성분이다. 다수의 인핸서 서열은 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α-페토단백질 및 인슐린)로부터 유래하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 전형적으로 진핵세포 바이러스로부터 유래한 인핸서를 사용할 것이다. 그 예에는 복제 기점의 후측상의 SV40 인핸서 (bp 100-270), 싸이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점의 후측상의 폴리오마 인핸서, 및 아데노바이러스 인핸서가 포함된다. 인핸서는 TWEAK 폴리펩티드 코딩 서열의 5' 또는 3' 위치에서 벡터에 스플라이싱될 수 있지만, 프로모터로부터 5' 부위에 위치하는 것이 바람직하다.

[0200] 또한, 진핵생물 숙주세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간 또는 다른 다세포 생물로부터 유래한 다핵 세포)에 사용되는 발현 벡터는 전사 종결 및 mRNA 안정화에 필요한 서열을 포함할 것이다. 그러한 서열은 통상적으로 진핵세포 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때로는 3' 비번역 영역으로부터 입수한다. 이들 영역은 TWEAK 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사되는 뉴클레오티드 세그먼트를 포함한다.

[0201] 재조합 척추동물 세포 배양에서 TWEAK 폴리펩티드의 합성에 적용하는 데 적합한 다른 방법, 벡터 및 숙주세포는 [Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117,060 및 EP 117,058]에 기재되어 있다.

[0202] 4. 숙주 세포의 배양

[0203] 본 발명의 TWEAK 폴리펩티드를 생산하기 위해 사용되는 숙주 세포는 각종 배지에서 배양될 수 있다. 햄스 (Ham's) F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM, 시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 둘베코 변형 이글즈 배지 (DMEM, 시그마)와 같은 시판되는 배지가 상기 숙주 세포를 배양하는 데 적합하다. 또한, ([Ham et al., *Meth. Enz.*, 58: 44 (1979)], [Barnes et al., *Anal. Biochem.*, 102:255 (1980)], 미국 특허 제4,767,704호; 미국 특허 제4,657,866호; 미국 특허 제4,927,762호; 미국 특허 제4,560,655호; 또는 미국 특허 제5,122,469호; WO90/03430; WO87/00195; 또는 미국 특허 등록 제30,985호])에 기재된 배지 중의 임의의 것도 상기 숙주 세포용 배양 배지로서 사용될 수 있다. 이들 배지 중 임의의 배지는 필요에 따라, 호르몬 및/또는 기타 성장인자 (예로서, 인슐린, 트랜스페린 또는 상피 성장인자), 염 (예로서, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 완충제 (예로서, HEPES), 뉴클레오티드 (예로서, 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예로서, 젠타마이신™ 약물), 미량 원소 (통상, 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 이와 동등한 에너지 공급원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필수 보충물도, 당업계에 공지되어 있는 적당한 농도로 포함시킬 수 있다. 온도, pH 등의 배양 조건은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이미 이용되고 있는 조건이며, 이는 당업자에게는 자명할 것이다.

[0204] 5. 유전자 증폭/발현의 검출

[0205] 유전자 증폭 및/또는 발현은 본원에서 제공된 서열을 기초로 하여 적절하게 표지된 프로브를 사용하는, 예를 들면, 통상의 서던 블롯팅, mRNA의 전사를 정량하기 위한 노던 블롯팅 [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], 도트 블롯팅 (DNA 분석) 또는 계내 혼성화에 의해 샘플에서 직접 측정할 수 있다. 다르게는, DNA 이중선, RNA 이중선 및 DNA-RNA 하이브리드 이중선 또는 DNA-단백질 이중선을 비롯한 특정 이중선을 인식할 수 있는 항체를 사용할 수 있다. 바꾸어 말하면, 항체를 표지하고, 상기 이중선을 표면에 결합시켜, 표면 상에 이중선이 형성될 때 이중선에 결합한 항체의 존재를 검출할 수 있는 분석을 수행할 수 있다.

[0206] 다르게는, 유전자 발현은 세포 또는 조직 절편의 면역조직화학적 염색과 같은 면역학적 방법 및 유전자 생성물

의 발현을 직접 정량하기 위한 세포 배양액 또는 체액의 분석을 통해 측정할 수 있다. 면역조직화학적 염색 및 /또는 샘플 유체의 분석에 유용한 항체는 단클론 항체 또는 다클론 항체일 수 있고, 이들은 임의의 포유동물에서 제조될 수 있다. 편리하게는, 천연 서열 TWEAK 폴리펩티드, 본원에서 제공되는 DNA 서열 기재의 합성 펩티드 또는 TWEAK DNA에 융합되어 있으며 특정 항체 에피토프를 코딩하는 외인성 서열에 대한 항체를 제조할 수 있다.

[0207] 6. TWEAK 폴리펩티드의 정제

[0208] TWEAK 폴리펩티드의 형태는 배양 배지 또는 숙주 세포 용해물로부터 회수될 수 있다. 막에 결합하는 경우, 적합한 디터전트 용액 (예로서, 트리톤(Triton)-X 100)을 사용하거나 효소적 절단을 통해 상기 막으로부터 방출시킬 수 있다. TWEAK 폴리펩티드의 발현에 사용된 세포는 동결-해동 주기, 초음파 처리, 기계적 파괴 또는 세포 용해제 등과 같은 다양한 물리적 또는 화학적 수단을 통해 파괴할 수 있다.

[0209] 재조합 세포 단백질 또는 폴리펩티드로부터 TWEAK 폴리펩티드를 정제하는 것이 바람직할 수 있다. 적합한 정제 방법의 예로는 이온 교환 컬럼 상에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 또는 양이온 교환 수지, 예를 들면, DEAE 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱(chromatofocusing), SDS-PAGE, 황산암모늄 침전, 세파덱스(Sephadex) G-75 등을 사용한 겔 여과, IgG와 같은 오염물질을 제거하기 위한 단백질 A 세파로스 컬럼, 및 TWEAK 폴리펩티드의 에피토프-태그된 형태를 결합시키기 위한 금속 킬레이팅 칼럼 등이 있다. 다양한 단백질 정제 방법을 이용할 수 있고, 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들면, ([Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990)], [Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)])에 기재되어 있다. 정제 단계(들)의 선택은 예를 들면, 사용되는 생산 방법 및 생산되는 특정 TWEAK 폴리펩티드의 성질에 따라 달라질 것이다.

[0210] 가용성 형태의 TWEAK가 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 상기와 같은 가용성 형태의 TWEAK는 하기 기술하는 바와 같은 변형을 포함할 수 있다 (예로서, 면역글로불린, 에피토프 태그 또는 류신 지퍼와의 융합에 의해). 면역어드헤신 분자는 본원의 방법에서 사용하기 위해 추가로 주시되고 있다. TWEAK 수용체 면역어드헤신은 다양한 형태의 TWEAK 수용체, 예로서, 전장의 폴리펩티드 뿐만 아니라, TWEAK 수용체의 가용성 형태 또는 그의 단편을 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 분자는 TWEAK 수용체 폴리펩티드와, 면역글로불린 또는 면역글로불린의 특정 영역의 융합을 포함할 수 있다. 2가 형태의 면역어드헤신의 경우, 그러한 융합은 IgG 분자의 Fc 영역에 대한 것일 수 있다. Ig 융합은 바람직하게, Ig 분자내 적어도 하나의 가변 영역 대신 가용성 (막형단 도메인이 결실되거나 불활성화된) 형태의 폴리펩티드 치환을 포함한다. 특히 바람직한 실시태양에서, 면역글로불린 융합은 IgG1 분자의 힌지, CH2 및 CH3, 또는 힌지, CH1, CH2 및 CH3 영역을 포함한다. 면역글로불린 융합의 생산에 대해서는 1995년 6월 27일 허여된 미국 특허 번호 제5,428,130호 및 [Chamow et al., TIBTECH, 14:52-60 (1996)]를 참조한다.

[0211] 가장 단순하고 가장 직접적인 면역어드헤신에 대한 고안은 어드헤신 (예로서 TWEAK 또는 TWEAK 수용체)의 결합 도메인(들)과 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역을 조합시키는 것이다. 통상, 본 발명의 면역어드헤신을 제조할 때, 어드헤신의 결합 도메인을 코딩하는 핵산은 면역글로불린 불변 도메인 서열의 N-말단을 코딩하는 핵산이 C-말단이 융합되지만, N-말단 융합 또한 가능하다.

[0212] 전형적으로, 상기 융합에서 코딩된 키메라 폴리펩티드는 면역글로불린 중쇄의 불변 영역중의 적어도 작용상 활성인 힌지, C_H2 및 C_H3 도메인을 유지할 것이다. 융합은 또한 불변 도메인의 Fc 부위의 C-말단에, 또는 중쇄의 C_H1에 대하여 N-말단에 인접하게 또는 경쇄의 상응하는 영역에 대하여 이루어진다. 융합이 이루어지는 정확한 위치는 중요하지 않고; 특정 위치는 잘 공지되어 있으며, 면역어드헤신의 생물학적 활성, 분비, 또는 결합 특성을 최적화시키기 위해 선택될 수 있다.

[0213] 바람직한 실시태양에서, 어드헤신 서열은 면역글로불린 G₁ (IgG₁) Fc 영역의 N-말단에 융합된다. 전체 중쇄 불변 영역을 어드헤신 서열에 융합시킬 수 있다. 그러나, 더욱 바람직하게, 화학적으로 IgG Fc를 규정짓는 파파인 절단 부위의 바로 그, 상류의 힌지 영역에서 시작되는 서열 (즉, 잔기 216번, 중쇄 불변 영역의 첫번째 잔기를 114가 되도록 한다), 또는 다른 면역글로불린의 유사 부위를 융합에 사용한다. 특히 바람직한 실시태양에서, 어드헤신 아미노산 서열은 IgG 중쇄의 (a) 힌지 영역 및 C_H2 및 C_H3, 또는 (b) C_H1, 힌지, C_H2 및 C_H3 도메인에 융합된다.

[0214] 이중특이성 면역어드헤신의 경우, 면역어드헤신은 다량체로서, 및 특히, 이중이량체 또는 이중사량체로서 어셈

불리된다. 일반적으로, 이러한 어셈블리된 면역글로불린은 공지된 단위 구조를 가질 것이다. 기본적인 4개의쇄 구조 단위는 IgG, IgD, 및 IgE가 존재하는 형태이다. 고분자 면역글로불린에서 4개의쇄 단위는 반복되고; IgM은 일반적으로, 디설파이드 결합에 의해 결합된 4개의 기본 단위의 오량체로서 존재한다. IgA 글로불린, 및 종종 IgG 글로불린 또한 혈청내에서 다량체 형태로 존재할 수 있다. 다량체의 경우, 각각의 4개의 단위는 동일하거나 상이할 수 있다.

본원의 범주내의 다양한 예시적 어셈블리된 면역어드헤신은 하기에 개략적으로 도표로 나타낸다:

(a) AC_L-AC_L ;

(b) $AC_H-(AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, \text{ 또는 } V_LC_L-AC_H)$;

(c) $AC_L-AC_H-(AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, \text{ 또는 } V_LC_L-V_HC_H)$

(d) $AC_L-V_HC_H-(AC_H, \text{ 또는 } AC_L-V_HC_H, \text{ 또는 } V_LC_L-AC_H)$;

(e) $V_LC_L-AC_H-(AC_L-V_HC_H, \text{ 또는 } V_LC_L-ACH)$; 및

(f) $(A-Y)_n-(V_LC_L-V_HC_H)_2$,

여기에서, 각각의 A는 일치하거나 상이한 어드헤신 아미노산 서열을 나타내고;

V_L 은 면역글로불린 경쇄 가변 도메인이고;

V_H 는 면역글로불린 중쇄 가변 도메인이고;

C_L 은 면역글로불린 경쇄 불변 도메인이고;

C_H 는 면역글로불린 중쇄 불변 도메인이고;

n은 1 초과인 정수이고;

Y는 공유 가교결합체의 잔기를 나타낸다.

간결성을 위해, 상기 구조는 단지 중요한 성질만을 나타내고 있고; 이는 면역글로불린의 연결(J) 또는 기타 도메인은 나타내지 않거나 디설파이드 결합도 제시하지 않고 있다. 그러나, 상기 도메인이 결합 활성을 위해 필요한 경우에는, 면역글로불린 분자중에서 그들이 차지하고 있는 통상의 위치에 존재하도록 작제되어야 한다.

다르게는, 면역글로불린 중쇄와 경쇄 서열 사이에 어드헤신 서열이 삽입될 수 있고, 이로써, 키메라 중쇄를 포함하는 면역글로불린을 수득하게 된다. 본 실시태양에서, 어드헤신 서열은 힌지와 C_H2 도메인 사이, 또는 C_H2 와 C_H3 도메인 사이에서, 면역글로불린의 각 암(arm)중의 면역글로불린 중쇄의 3' 말단에 융합된다. 유사한 작제물이 [Hoogenboom et al., *Mol. Immunol.*, 28:1027-1037 (1991)]에 보고되어 있다.

본 발명의 면역어드헤신에는 면역글로불린 경쇄가 존재할 필요는 없지만, 면역글로불린 경쇄는 어드헤신-면역글로불린 중쇄 융합 폴리펩티드에 공유결합하여 존재할 수 있거나, 어드헤신에 직접 융합될 수 있다. 전자의 경우, 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA는 전형적으로 어드헤신-면역글로불린 중쇄 융합 단백질을 코딩하는 DNA와 함께 발현된다. 분비시, 하이브리드 중쇄 및 경쇄는 공유결합함으로써 2개의 디설파이드-연결된 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍을 포함하는 면역글로불린-양 구조를 제공할 것이다. 상기 구조를 제조하기에 적합한 방법예를 들면, 1989년 3월 28일 허여된 미국 특허 번호 제4,816,567에 개시되어 있다.

프레임내(in-frame) 어드헤신 부위를 코딩하는 cDNA 서열을 면역글로불린 cDNA 서열에 융합시킴으로써 면역어드헤신은 가장 용이하게 작제된다. 그러나, 게놈 면역글로불린 단편에 대한 융합 또한 사용될 수 있다 (예로서, [Aruffo et al., *Cell*, 61:1303-1313 (1990)]; 및 [Stamenkovic et al., *Cell*, 66:1133-1144 (1991)]). 후자 유형의 융합은 발현을 위해 Ig 조절 서열이 존재할 것으로 필요로 한다. IgG 중쇄 불변 영역을 코딩하는 cDNAs는 혼성화에 의해 또는 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술에 의해, 지라 또는 말초혈액 림프구로부터 유래된 cDNA 라이브러리로부터의 공개된 서열에 기초하여 단리될 수 있다. "어드헤신" 및 어드헤신의 면역글로불린 부분을 코딩하는 cDNA는 선택된 숙주 세포에서 유효한 발현을 지시하는 플라스미드 벡터내로 탠덤(tandem)으로 삽입된다.

- [0233] 다른 실시태양에서, TWEAK 효능제 또는 TWEAK 길항제는 미국 특허 번호 제4,640,835호; 제4,496,689호; 제4,301,144호; 제4,670,417호; 제4,791,192호 또는 제4,179,337호에 개시된 방식으로 다양한 비단백질성 폴리머 중 하나, 예로서, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌, 또는 다른 유사 분자, 예로서, 폴리글루타메이트에 상기 분자를 연결시킴으로써 공유적으로 개질될 수 있다. 당업계에 공지된 기술을 사용하여 상기 폐결환된 형태를 제조할 수 있다.
- [0234] 이들 분자의 류신 지퍼 형태 또한 본 발명에 의해 주시되고 있다. "류신 지퍼"는 그의 융합 상대(partner)의 이량체화 또는 삼량체화를 증진시키거나, 촉진시키거나, 또는 구동시키는 류신이 풍부한 서열 (예로서, 류신 지퍼가 융합되거나 연결되는 서열 또는 분자)을 언급하기 위해서 당업계에서 사용되는 용어이다. 다양한 류신 지퍼 폴리펩티드는 당업계에 기재되어 있다. 예로서, ([Landschulz et al., Science, 240:1759 (1988)]; 미국 특허 5,716,805; WO 94/10308; [Hoppe et al., FBBS Letters, 344:1991 (1994)]; [Maniatis et al., Nature, 341:24 (1989)])를 참조한다. 류신 지퍼 서열은 분자의 5' 또는 3' 말단에서 융합될 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다.
- [0235] 본 발명의 TWEAK 효능제 및 TWEAK 길항제는 또한 폴리펩티드를 또다른 이종 폴리펩티드 또는 아미노산 서열에 융합시켜 키메라 분자를 형성하는 방식으로 개질될 수 있다. 바람직하게, 상기 이종 폴리펩티드 또는 아미노산 서열은 키메라 분자를 올리고머화시키는 작용을 하는 것이다. 하나의 실시태양에서, 상기 키메라 분자는, 항-태그 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 에피토프를 제공하는 태그와 폴리펩티드의 융합을 포함한다. 에피토프 태그는 일반적으로 폴리펩티드의 아미노- 또는 카복실-말단에 위치한다. 상기의 에피토프-태그된 형태의 폴리펩티드의 존재는 태그 폴리펩티드에 대한 항체를 사용함으로써 검출될 수 있다. 또한, 에피토프 태그를 제공함으로써 폴리펩티드는, 항-태그 항체, 또는 에피토프 태그에 결합하는 또다른 유형의 친화성 기질을 사용하는 친화성 정제에 의해 용이하게 정제될 수 있다. 다양한 태그 폴리펩티드 및 그와 관련된 항체는 당업계에 잘 공지되어 있다. 일례로 폴리-히스티딘 (poly-his) 또는 폴리-히스티딘-글리신 (poly-his-gly) 태그; flu HA 태그 폴리펩티드 및 그의 항체 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 13:2159-2165 (1988)]; c-myc 태그 및 그에 대한 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 및 9E10 항체 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; 및 단순 헤르페스 바이러스 당단백질 D (gD) 태그 및 그의 항체 [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]를 포함한다. 다른 태그 폴리펩티드는 Flag-펩티드 [Hopp et al., BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; KT3 에피토프 펩티드 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]; α-튜블린 에피토프 펩티드 [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; 및 T7 유전자 10 단백질 펩티드 태그 [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)]를 포함한다.
- [0236] 항-TWEAK 또는 항-TWEAK 수용체 항체 또한 본 발명에 개시된 방법에서 사용될 수 있다는 것에 주시하고 있다. 이들 항체는 단클론 항체일 수 있다. 당업자는 TWEAK 또는 TWEAK 수용체 활성(들)의 효능제 또는 길항제로서 작용하는 TWEAK 항체 또는 TWEAK 수용체 항체를 동정하기 위하여 당업계에 공지된 방법, 및 본원에 기술된 방법을 사용할 수 있다.
- [0237] 단클론 항체는 [Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975)]에 기술된 바와 같은 하이브리도마 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 하이브리도마 방법에서는, 마우스, 햄스터 또는 다른 적절한 숙주 동물을 전염적으로 면역화제로 면역화시켜 면역화제에 특이적으로 결합하는 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도한다. 다르게는, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다.
- [0238] 면역화제는 전형적으로 TWEAK 폴리펩티드 또는 TWEAK 수용체 또는 그의 융합 단백질, 예로서, TWEAK-IgG 융합 단백질을 포함할 것이다. 일반적으로, 인간 기원의 세포를 원하는 경우에는 말초혈 림프구 ("PBL")를 사용하거나, 비-인간 포유동물 공급원을 원하는 경우에는 비장 세포 또는 림프절 세포를 사용한다. 이어서, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 융합제를 사용하여 림프구를 불멸화 세포주와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principle and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]. 불멸화 세포주는 통상적으로 형질전환된 포유동물 세포, 특히 설치류, 소 및 인간 기원의 골수종 세포이다. 통상적으로, 래트 또는 마우스 골수종 세포주를 사용한다. 하이브리도마 세포는 바람직하게는 비융합된 불멸화 세포의 성장 또는 생존을 저해하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에서 배양시킬 수 있다. 예를 들면, 모 세포가 히포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT) 효소가 결핍된 경우에, 하이브리도마 용 배양 배지 ("HAT 배지")는 전형적으로 히포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며, 이들 물질은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 억제한다.
- [0239] 바람직한 불멸화 세포주는 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정한 고수준 발현을

유지하며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성이 있는 것이다. 더욱 바람직한 불멸화 세포주는, 예를 들면, 미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center) 및 미국 버지니아주 마나사스에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection)으로부터 구입할 수 있는 뮤린 골수종 세포주이다. 또한, 인간 골수종 및 마우스-인간 헤테로골수종 세포주가 인간 단클론 항체의 생산에 대해 기술되어 있다 ([Kozbor, J., *Immunol.*, 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]).

[0240] 이어서, 하이브리도마 세포가 배양되는 배양 배지를 TWEAK 또는 TWEAK 수용체에 대해 지시된 단클론 항체의 존재에 대해 분석할 수 있다. 임의로, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 단클론 항체의 결합 특이성을 면역침전에 의해, 또는 방사성면역검정법 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 검정법 (ELISA)과 같은 시험관내 결합 분석법, 및 바람직하게 BIAcore 분석법에 의해 측정한다. 이러한 기술 및 분석법은 당업계에 공지되어 있다. 단클론 항체의 결합 친화성은, 예를 들면, 스카트카르트(Scatchard) 분석 [Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)]에 의해 측정할 수 있다.

[0241] 원하는 하이브리도마 세포를 동정한 후, 제한 회석 절차에 의해 클론을 서브클로닝시키고 표준 방법 [Goding, 상기 문헌]에 의해 성장시킬 수 있다. 이러한 목적에 적합한 배양 배지는, 예를 들면, 돌베코 변형 이글 배지 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 다르게는, 하이브리도마 세포를 포유동물에서 복수로서 생체내에서 성장시킬 수 있다.

[0242] 서브클론에 의해 분비된 단클론 항체는, 예를 들면, 단백질 A-세파로스, 하이드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화성 크로마토그래피와 같은 통상적인 면역글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지 또는 복수액으로부터 분리하거나 정제할 수 있다.

[0243] 또한, 단클론 항체는 미국 특허 제4,816,567호에 기술된 것과 같은 재조합 DNA 방법에 의해 제조할 수 있다. 단클론 항체를 코딩하는 DNA는 통상의 방법을 이용하여 (예를 들면, 단클론 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리되고 서열화된다. 하이브리도마 세포는 상기한 DNA의 바람직한 공급원으로서 작용한다. 일단 분리되면, DNA는 발현 벡터내로 유입시킨 후, E. 콜라이 세포, 유인원 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 달리 면역글로불린 단백질을 생산하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주 세포내로 형질감염시켜 재조합 숙주 세포내에서 단클론 항체의 합성을 수행할 수 있다. 또한, DNA는, 예를 들면, 상동성 뮤린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열로 치환하거나 [Morrison, et al., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81, 6851 (1984)], 비-면역글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전체 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 공유 결합시킴으로써 변형시킬 수 있다.

[0244] 전형적으로, 본 발명의 항체의 불변 도메인이 상기 비-면역글로불린 폴리펩티드로 치환되거나, 본 발명의 항체의 하나의 항원-결합 부위의 가변 도메인이 상기 비-면역글로불린 폴리펩티드로 치환됨으로써, TWEAK 또는 TWEAK 수용체에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위, 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 또하나의 항원-결합 부위를 포함하는 키메라성 2가 항체를 형성하게 된다.

[0245] 키메라 또는 하이브리드 항체는 또한 가교제를 포함하는 것을 비롯한, 합성 단백질 화학에서 공지된 방법을 사용하여 시험관내에서 제조될 수 있다. 예를 들면, 면역독소는 디설피드 교환 반응을 사용하거나 티오에테르 결합을 형성함으로써 작제할 수 있다. 상기 목적에 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메탈-4-메르캅토부티르이미데이트를 포함한다.

[0246] 단일 쇠 Fv 단편 또한 예로서, [Iliades et al., *FEBS Letters*, 409:437-441 (1997)]에 기재된 바와 같이 생산될 수 있다. 다양한 링커를 사용하여 상기 단일 쇠 단편을 커플링시키는 것이 [Kortt et al., *Protein Engineering*, 10:423-433 (1997)]에 기재되어 있다. 항체의 재조합 생산 및 조작에 대한 다양한 기술을 당업계에 잘 공지되어 있다. 당업자가 전형적으로 사용하는 상기 기술의 예시적인 일례는 하기에 보다 상세히 기술한다.

[0247] (i) 인간화된 항체

[0248] 일반적으로, 인간화된 항체에는 비-인간 공급원으로부터 유래된 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입되어 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 흔히 "임포트 (import)" 잔기로 언급되며, 전형적으로는 "임포트" 가변 도메인으로부터 얻는다. 인간화는 인간 항체의 상응하는 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 치환함으로써 본질적으로

윈터(Winter)와 동료들의 방법 ([Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988)], [Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)])에 따라 수행할 수 있다.

[0249] 따라서, 이러한 "인간화된" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 서열이 비-인간 중 유래의 상응하는 서열에 의해 치환된 키메라 항체이다. 원칙적으로, 인간화된 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 가 능하는 일부 FR 잔기를 설치류 항체의 유사한 부위로부터 유래된 잔기로 치환시킨 인간 항체이다.

[0250] 항체는 항원에 대한 고친화성 및 다른 바람직한 생물학적 성질을 유지하면서 인간화되다는 것에 주시한다. 이 러한 목적을 달성하기 위하여 바람직한 방법에 따라 모체 및 인간화된 서열의 3차원 모델을 사용하여 모체 서열 과 다양한 개념적 인간화된 산물의 분석 프로세스에 의해 인간화된 항체를 제조한다. 3차원 면역글로불린 모델 은 보편적으로 이용가능하고, 당업자에게는 통상적인 것이다. 통상적으로 당업자에게 이용되고 있고 공지되어 있다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원적 입체구조를 설명하고 보여주는 컴퓨터 프로그램을 이 용할 수 있다. 이 디스플레이의 정밀검사는 후보 면역글로불린 서열의 작용화에 있어서 잔기의 가능한 역할 분 석, 즉, 항원에 대한 후보 면역글로불린의 결합력에 영향을 주는 잔기의 분석을 허용한다. 이러한 방법을 통해, FR 잔기는 원하는 항체 특성이 얻어지도록, 예를 들면, 표적 항원(들)에 대한 친화성이 증가되도록 공통 서열과 임포트 서열로부터 선별되고 조합될 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 항원 결합에 영향을 주는 데 있 어서 직접적으로 및 대부분 실질적으로 관여한다.

[0251] (ii) 인간 항체

[0252] 인간 단클론 항체는 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 단클론 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이중골수종 세포주는 예를 들면, ([Kozbor, J. Immunol. 133, 3001 (1984)], 및 [Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)])에 기재되어 있다.

[0253] 면역화시킬 때, 내재 면역글로불린 생산없이 인간 항체의 전체 레파토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예 로서, 마우스)을 현재는 생산할 수 있다. 예를 들면, 키메라 및 생식세포주(germ-line) 돌연변이체 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (J_H) 유전자의 동종접합성 결실이 내재 항체 생산을 완전히 저해시킨다고 기재된 바 있다. 인간 생식세포주 면역글로불린 유전자 배열을 이러한 생식세포주 돌연변이체 마우스에 전달하면, 항원의 쉐린지 시에 인간 항체가 생산될 것이다. 예로서, ([Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)], [Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)])를 참조한다.

[0254] 멘데즈(Mendez) 등 [Nature Genetics 15: 146-156 [1997]]은 추가의 기술을 개선시켰고, 항원으로 쉐린지시, 고친화성을 갖는 완전한 인간 항체를 생성하는, "제노마우스(Xenomouse) II"로 명명된 트랜스제닉 마우스 주를 생성하였다. 이는 상기한 바와 같이 내인성 J_H 세그먼트가 결실된 마우스로의 메가염기 인간 중쇄 및 경쇄 유전 자좌의 배아계 통합에 의해 구현되었다. 제노마우스 II는 대략 66개의 V_H 유전자, 완전한 D_H 및 J_H 부위 및 3개 의 상이한 불변 부위 (μ , δ 및 χ)를 함유하는 1,020kb의 인간 중쇄 유전자좌를 포함하고, 또한 32개의 V_K 유전자, J_K 세그먼트 및 C_K 유전자를 함유하는 800kb의 인간 κ 유전자좌를 포함한다. 이들 마우스에서 생산 된 항체는 유전자 재배열, 조립 및 레파토리를 포함하는, 모든 측면에서 인간에서 보여지는 것과 매우 유사하다. 인간 항체는 무인 유전자좌에서 유전자 재배열을 막는 내인성 J_H 세그먼트에서의 결실로 인해 내인성 항체에 비해 우선적으로 발현된다.

[0255] 다르게는, 파지 디스플레이 기술 [McCafferty et al, Nature 348:552-553 [1990]]이 비면역화된 공여체로부터 의 면역글로불린 가변(V) 도메인 유전자 레파토리로부터, 시험관 내에서 인간 항체 및 항체 단편을 생산하는데 사용될 수 있다. 이 기술에 따르면, 항체 V 도메인 유전자는 M13 또는 fd와 같은 필라멘트상 박테리오파지의 주(major) 또는 부(minor) 외피 단백질 유전자로 프레임내에서 클로닝되고, 파지 입자의 표면에 작용상의 항 체 단편으로서 배치된다. 필라멘트상 입자는 싱글-스트랜드 DNA 카피의 파지 게놈을 함유하므로, 항체의 작용 상의 성질에 기초한 선별을 통해서도 그들 성질을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자를 선별하게 된다. 따라서, 파지는 B-세포의 성질중 일부를 모사한다. 파지 디스플레이는 다양한 포맷으로 수행될 수 있다; 그들의 리뷰를 위해서는, 예를 들면, [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)]를 참조한다. V-유전자 세그먼트의 몇몇 공급원을 파지 디스플레이를 위해 사용할 수 있다. [Clackson et al, Nature 352:624-628 (1991)]에서는 면역화된 마우스의 지라로부터 유래된 V 유전자의 작은 무작위 조합 라이브러리로부터 다양한 어레이의 항-옥사졸론 항체를 단리하였다. 비면역화된 인간 공여자로부터 의 V 유전자의 레파토리를 작제할 수 있고, 다양한 어레이의 항원 (자가-항원 포함)에 대한 항체를 필수적인

로 ([Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991)] 또는 [Griffith et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993)])에 의해 기재된 기술에 따라 단리시킬 수 있다. 자연적인 면역 반응에서, 항체 유전자는 고속으로 돌연변이를 축적시킨 (체세포 과돌연변이). 도입된 일부 변화는 더 높은 친화성을 부여하고, 고-친화성 표면 면역글로불린을 나타내는 B 세포가 추후 항원 켈린지시 우선적으로 복제되고 분화된다. 이 자연적인 과정은 "선택서플링"으로 알려진 기술을 사용함으로써 모사될 수 있다 [Marks et al., *Bio/Technol.* 10:779-783 (1992)]. 이 방법에서, 중쇄 및 경쇄 V 부위 유전자를 비변역화된 공여자로부터 수득된 V 도메인 유전자의 자연발생적으로 생성된 변이체 (레파토리)로 순차적으로 대체함으로써 파지 디스플레이에 의해 수득된 "일차" 인간 항체의 친화성을 개선시킬 수 있다. 이 기술을 통해 nM 범위의 친화성을 갖는 항체 및 항체 단편을 생산할 수 있다. 매우 큰 파지 항체 레파토리 ("최고의(mother-of-all) 라이브러리"로도 알려진)를 제조하기 위한 전략법이 [Waterhouse et al., *Nucl. Acids Res.* 21:2265-2266 (1993)]에 의해 기재되어 있다. 유전자 서플링은 또한 인간 항체가 출발 설치류 항체와 유사한 친화성과 특이성을 갖는, 설치류 항체로부터 인간 항체를 도출하는데 사용될 수 있다. "에피토프 임프린팅(imprinting)"으로도 언급되는, 이 방법에 따르면, 파지 디스플레이 기술에 의해 수득된 설치류 항체의 중쇄 또는 경쇄 V 도메인 유전자가 인간 V 도메인 유전자의 레파토리로 대체되어, 설치류-인간 키메라를 형성한다. 항원에 대해 선별함으로써 작용상의 항원-결합 위치를 회복시킬 수 있는 인간 가변 영역을 단리시킬 수 있고, 즉, 에피토프는 상대의 선택을 지배 (임프린트)한다. 나머지 설치류 V 영역을 교체하기 위해 이 과정을 반복할 때, 인간 항체가 수득된다 (1993년 4월 1일 공개된 PCT 특허출원 WO 93/06213). CDR 그래프팅에 의한 설치류 항체의 전통적 인간화와 달리, 이 기술은 설치류 기원의 프레임워크나 CDR 잔기를 갖지 않는, 완전한 인간 항체를 제공한다.

[0256] 하기 논의하는 바와 같이, 본 발명의 항체는 임의로 단량체 항체, 이량체 항체 뿐만 아니라, 다량 형태의 항체를 포함할 수 있다. 당업자는 그러한 이량체 또는 다량 형태를 당업계에 공지된 기술에 의해 작제할 수 있다. 1가 항체를 제조하는 방법 또한 당업계에 잘 공지되어 있다. 예를 들면, 하나의 방법은 면역글로불린 경쇄 및 변형된 중쇄의 재조합 발현을 포함한다. 중쇄는 일반적으로 중쇄 가교결합을 막기 위해 Fc 영역중 임의의 지점에서 절단된다. 다르게는, 가교결합을 막기 위해 관련된 시스템 잔기가 또다른 아미노산 잔기로 치환되거나 결실된다.

[0257] (iii) 이중특이성 항체

[0258] 이중특이성 항체는 적어도 2개의 상이한 항원에 대해 결합 특이성을 갖는, 단클론의, 바람직하게는 인간 또는 인간화된 항체이다. 본 경우에 있어, 결합 특이성중 하나는 TWEAK 또는 TWEAK 수용체에 대한 것이다.

[0259] 이중특이성 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전통적으로, 이중특이성 항체의 재조합적 생산은 2개의 중쇄가 상이한 특이성을 갖는, 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동발현에 기초한다 [Millstein and Cuello, *Nature* 305, 537-539(1983)]. 면역글로불린 중쇄와 경쇄의 무작위적 분류로 인해, 이들 하이브리도마 (퀴드로마)는 단지 하나만이 정확한 이중특이성 구조를 갖는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생산한다. 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 보통 행해지는, 정확한 분자의 정제는 다소 부담스럽고 산물 수율은 낮다. 유사한 과정이 PCT 출원 공개번호 W093/08829 (1993년 5월 13일 공개) 및, [Traunecker et al., *EMBO* 10, 3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0260] 상이하고 더욱 바람직한 접근법에 따르면, 원하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 위치)을 갖는 항체 가변 도메인이 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 융합은 바람직하게는 힌지, CH2 및 CH3 부위중 적어도 일부를 포함하는, 면역글로불린 중쇄 불변 도메인과의 융합이다. 융합중 적어도 하나에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 위치를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합, 및 원하는 경우, 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA가 별도의 발현 벡터에 삽입되고, 적합한 숙주 유기체내로 공형질감염된다. 이것은 작제에 사용되는 동일하지 않은 비율의, 3개의 폴리펩티드 쇄가 최적의 수율을 제공하는 실시태양에서 3개의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정할 때 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 적어도 2개의 폴리펩티드 쇄의 발현이 높은 수율을 낳거나 비율이 특별한 의미를 갖지 않을 때, 하나의 발현 벡터에 2개 또는 3개 모두의 폴리펩티드 쇄의 코딩 서열을 삽입하는 것이 가능하다. 이 접근법의 바람직한 실시태양에서, 이중특이성 항체는 한 암에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 면역글로불린 중쇄와, 나머지 암에 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공하는)으로 이루어진다. 이중특이성 분자의 단지 절반에서만 면역글로불린 경쇄의 존재는 용이한 단리 방법을 제공하므로, 이 비대칭적 구조는 원치않는 면역글로불린 쇄 조합들로부터 원하는 이중특이성 화합물의 단리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이 접근법은 1994년 3월 3일에 공개된, PCT 공개번호 WO 94/04690에 개시되어 있다.

- [0261] 이중특이성 항체를 생성하는 것에 대한 추가 상세 사항에 대해서는, 예를 들면, [Suresh et al., Methods in Enzymology 121, 210 (1986)]를 참조한다.
- [0262] (iv) 이중접합체 항체
- [0263] 이중접합체 항체 또한 본 발명의 범주에 포함된다. 이중접합체 항체는 2개의 공유적으로 결합된 항체로 이루어진다. 그러한 항체는 예를 들면, 원치않는 세포에 대해 면역계 세포를 표적화하기 위해 (미국 특허 번호 제 4,676,980호), 또한 HIV 감염의 치료를 위해 (PCT 출원 공개번호 WO 91/00360 및 WO 92/200373; EP 03089) 제안되어 있다. 이중접합체 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교결합체는 당업계에 잘 공지되어 있고, 다수의 가교결합 기술과 함께, 미국특허 제4,676,980호에 개시되어 있다.
- [0264] (v) 항체 단편
- [0265] 특정 실시태양에서, 항-TWEAK 또는 항-TWEAK 수용체 항체 (뮤린, 인간 및 인간화된 항체, 및 항체 변이체 포함)는 항체 단편이다. 다양한 기술이 항체 단편의 생산을 위해 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 완전한 항체의 단백질분해적 분해를 통해 유래되었다 (예로서, [Morimoto et al., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992)] 및 [Brennan et al., Science 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 이들 단편은 현재 재조합 숙주 세포로부터 직접 생산될 수 있다. 예를 들면, Fab'-SH 단편은 E. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 형성한다 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]. 또다른 실시태양에서, F(ab')₂는 F(ab')₂ 분자의 조립을 촉진하기 위하여 류신 지퍼 GCN₄를 사용하여 형성된다. 또다른 접근법에 따르면, Fv, Fab 또는 F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 항체 단편을 생산하는 다양한 기술은 기술자에게 자명할 것이다. 예를 들면, 분해는 파파인을 사용하여 실시될 수 있다. 파파인 분해의 예는 1994년 12월 22일 공개된 WO 94/29348, 및 미국 특허번호 제4,342,566호에 기재되어 있다. 항체의 파파인 분해는 전형적으로 Fab 단편으로 명명되는 2개의 일치하는 항원 결합 단편 (이들 각각은 단일의 항원 결합 부위를 갖는다)과 나머지 Fc 단편을 생산한다. 펩신 처리를 통해서 2개의 항원 결합 부위를 갖고, 여전히 항원에 가교결합할 수 있는 F(ab')₂ 단편이 생산된다.
- [0266] 항체 분해에서 생산된 Fab 단편 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH₁)을 포함한다. 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 비롯한 수개의 잔기를 항체 힌지 영역의 카복시 말단에 첨가함으로써 Fab' 단편은 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)이 유리 티올기를 수반하는 Fab'를 명명하는 것이다. F(ab')₂ 항체 단편은 본래 Fab' 단편 쌍 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편 쌍으로서 생산되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링 또한 공지되어 있다.
- [0267] 항체는 그의 불변 영역내의 보존된 위치에서 당화된다 ([Jefferis and Lund, Chem. Immunol. 65: 111-128 [1997]]; [Wright and Morrison, TioTECH. 15: 26-32 [1997]]). 면역글로불린의 올리고당 측쇄는 단백질의 기능에 영향을 주고 ([Boyd et al., Mol. Immunol. 32: 1311-1318 [1996]]; [Wittwe and Howard, Biochem. 29: 4175-4180 [1990]]), 당단백질의 형태 및 제시된 3차원 표면에 영향을 줄 수 있는 당단백질 부분들 사이의 분자 내 상호작용에 영향을 준다 ([Jefferis and Lund, 상기 문헌]; [Wyss and Wagner, Current Opin. Biotech. 7: 409-416 [1996]]). 또한, 올리고당은 주어진 당단백질을 특정한 인식 구조에 기초하여 특정 분자로 표적화시킬 수 있다. 예를 들면, 갈락토실화가 제거된 (agalactosylated) IgG는 올리고당 부분이 내부-CH₂ 공간에서 바깥 쪽으로 '플립 (flip)'되고, 말단 N-아세틸글루코사민 잔기가 만노스 결합 단백질에 결합할 수 있게 된다는 것이 보고되었다 [Malhotra et al., Nature Med. 1: 237-243 [1995]]. 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 생산된 CAMPATH-1H (인간 림프구의 CDw52 항원을 인식하는 재조합 인간화된 뮤린 단클론 IgG1 항체)로부터 올리고당을 당펩티다제에 의해 제거하면 보체 매개 용해 (CMCL)의 완전한 감소가 발생 [Boyd et al., Mol. Immunol. 32: 1311-1318 [1996]]하지만, 뉴라미니다제를 이용하여 시알산 잔기를 선택적으로 제거하면 DMCL은 손실되지 않는다. 또한, 항체의 당화는 항체-의존세포성 세포독성 (ADCC)에 영향을 주는 것으로 보고되었다. 특히, 글리코실트랜스퍼라제의 촉매작용으로 GlcNAc를 2등분함으로써 형성된 β(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII)의 발현이 테트라사이클린에 의해 조절되어 발현되는 CHO 세포가 향상된 ADCC 활성을 갖는 것으로 보고되었다 [Umana et al., Mature Biotech. 17: 176-180 [1999]].
- [0268] 항체의 당화 변이체는 항체의 당화 패턴이 변경된 변이체이다. 변경되는 것은 항체에서 발견되는 하나 이상의 당질 부분을 결실시키거나, 하나 이상의 당질 부분을 항체에 첨가하거나, 당화 조성 (당화 패턴), 당화 범위 등을 변화시키는 것을 의미한다. 예를 들면, 항체를 코당하는 핵산 서열중 하나 이상의 당화 부위를 제거, 변화

및/또는 첨가시킴으로써 당화 변이체를 제조할 수 있다.

[0269] 항체의 당화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된 것이다. N-연결되었다는 것은 당질 부분이 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 언급한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 당질 부분을 아스파라긴 측쇄에 효소적으로 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이들 트리펩티드 서열중의 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써 잠재적인 당화 부위가 형성된다. O-연결된 당화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스중의 하나를 하이드록시아미노산, 가장 보편적으로는, 세린 또는 트레오닌에 부착시키는 것을 의미하지만, 5-하이드록시프롤린 또는 5-하이드록시리신도 사용할 수 있다.

[0270] 항체에 당화 부위를 부가하는 것은, 하나 이상의 상기 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 수행된다 (N-연결된 당화 부위의 경우). 상기 변경은 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기를 최초 항체의 서열에 부가하거나, 또는 이들 잔기로 치환함으로써 이루어질 수도 있다 (O-연결된 당화 부위의 경우).

[0271] 또한, 항체의 당화 (당화 패턴 포함)은 근원적인 뉴클레오타이드 서열을 변경시키지 않고 변경될 수도 있다. 당화는 대개 항체를 발현시키는데 사용되는 숙주 세포에 의존한다. 잠재적 치료제로서의 재조합 당단백질, 예로서, 항체의 발현에 사용되는 세포 유형은 거의 천연 세포가 아니기 때문에, 항체의 당화 패턴에서의 유의적인 변화를 기대할 수 있다 (예를 들면, [Hse et al., *J. Biol. Chem.* 272: 9062-9070 (1997)]를 참조). 숙주 세포 선택 이외에, 항체의 재조합 생산시 당화에 영향을 주는 인자에는 성장 모드, 배지 조성, 배양 밀도, 산소화, pH, 정제 계획 등이 포함된다. 올리고당 생산에 관여하는 특정 효소들을 도입하거나 과발현시키는 것을 비롯한, 특정한 숙주 유기체내에서 구현되는 당화 패턴을 변경시키는 다양한 방법에 제안되었다 (미국 특허 번호 제5,047,335호; 제5,510,261호 및 제5,278,299호). 당화 또는 특정 유형의 당화는, 예를 들면 엔도글리코시다제 H (엔도 H)를 이용하여 당단백질로부터 효소적으로 제거될 수 있다. 또한, 상기 재조합 숙주 세포는, 예를 들면, 특정 유형의 다당류를 프로세싱하는 데에 결합이 있도록 유전자 조작될 수 있다. 이러한 기술 및 유사 기술은 당업계에 공지되어 있다.

[0272] 항체의 당화 구조는 당질 분석에서의 통상의 기술에 의해 쉽게 분석될 수 있으며, 여기에는 렉틴 크로마토그래피, NMR, 질량분석법, HPLC, GPC, 단당류 성분 분석법, 순차적 효소 절단법, 및 전하에 기초하여 올리고당을 분리하기 위해 고 pH 음이온 교환 크로마토그래피를 이용한 HPAEC-PAD가 포함된다. 또한, 분석 목적으로 올리고당을 유리시키는 방법도 공지되어 있으며, 제한하지 않고, 효소적 처리 (보통 펩티드-N-글리코시다제 F/엔도-β-갈락토시다제를 이용하여 수행함), 주로 O-연결된 구조를 유리시키기 위해 극도의 알칼리성 환경을 이용하는 제거, 및 N- 및 O-연결된 올리고당 양자 모두를 유리시키기 위해 무수 히드라진을 이용하는 화학적 방법이 포함된다.

[0273] 트리아바디(triobody) 또한 본 발명의 범주내 포함된다. 상기 항체는 예를 들면, ([Iliades et al., 상기 문헌] 및 [Kortt et al., 상기 문헌])에 기재되어 있다.

[0274] 세포독성체 (예로서, 독소 분자), 또는 프로드럭 (예를 들면, 펩티드 화학요법제, WO 81/01145 참조)을 활성 함암제로 전환시키는 프로드럭-활성화 효소에 항체를 접합시킴으로써 본 발명의 항체를 개질시킬 수 있다. 예를 들면, WO 88/07378 및 미국 특허번호 제4,975,278호를 참조한다. 이러한 기술은 또한 "항체 의존 효소 매개 프로드럭 요법" (ADEPT)으로도 언급된다.

[0275] ADEPT에 유용한 면역접합체의 효소 성분에는 프로드럭을 더욱 활성 형태로 전환시킬 수 있도록 하는 방식으로 프로드럭에 작용할 수 있는 효소가 포함된다. 본 발명의 방법에 유용한 효소에는 제한하는 것은 아니지만, 인산염-함유 프로드럭을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 알칼리성 포스파타제; 황산염-함유 프로드럭을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 아릴sul파타제; 비독성 5-플루오로시토신을 항암제인 5-플루오로우라실로 전환시키는데 유용한 시토신 데아미나제; 펩티드-함유 프로드럭을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 프로테아제, 예로서, 세라티아 프로테아제, 썬모리신, 서브틸리신, 카르복시펩티다제 및 카텝신 (예로서, 카텝신 B 및 L); D-아미노산 치환기를 함유하는 프로드럭을 전환시키는데 유용한 D-알라닐카르복시펩티다제; 당화된 프로드럭을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 당질-절단 효소, 예로서, 베타-갈락토시다제 및 뉴라미니다제; 베타-락탐으로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 베타-락타마제; 및 각각 아민 질소에서 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸기로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 페니실린 V 아미다제 또는 페니실린 G 아미다제와 같은 페니실린 아미다제를 포함한다. 다르게는, 당업계에 '아브자임(abzyme)'으로도 공지된 효소 활성을 갖는 항체를 이용하여 본 발명의 프로드럭을 유리 활성 약물로 전환시킬 수 있다 (예로서, [Massey, *Nature* 328: 457-

458 (1987)] 참조). 항체-아브자임 접합체는 아브자임을 원하는 세포 군집으로 전달하는 것에 대해 본원에서 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0276] 상기 효소는 상기한 이중작용성 가교제를 이용하는 것과 같이 당업계에 잘 공지된 기술에 의해 항체에 공유결합될 수 있다. 다르게는, 적어도 하나의, 본 발명의 효소의 작용상 활성인 부분에 연결된, 적어도 본 발명 항체의 항원 결합 부위를 포함하는 융합 단백질은 당업계에 잘 공지된 재조합 DNA 기술을 이용하여 작제될 수 있다 (예로서, [Neuberger et al., *Nature*, 312: 604-608 (1984)] 참조).

[0277] 추가의 항체 개질이 주시되고 있다. 예를 들면, 항체는 다양한 비단백질성 중합체, 예로서, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체, 또는 기타 분자들, 예로서, 폴리글루타메이트중 하나에 연결될 수 있다. 항체는 또한 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들면, 리포솜, 알부민 마이크로캡슐, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐), 또는 마크로에멀전중에서 예를 들면, 코아세르베이션(coacervation) 기술 또는 계면 중합화 (예를 들면, 각각 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에 의해 제조된 마이크로캡슐)에 포획될 수도 있다. 상기 기술은 [Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다. 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들면, 미국 특허 제5,739,277호에 기재되어 있는 바와 같이, 재이용 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히, 항체 단편)내로 혼입시킬 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 용어 "재이용 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 것을 담당하고 있는 IgG 분자 (예로서, IgG₁, IgG₂, IgG₃, 또는 IgG₄)의 Fc 영역의 에피토프를 언급한다.

[0278] 다르게는, 또는 추가로, 항체의 Fc 영역의 아미노산을 변경시켜 변경된 FcRn 결합을 갖는 변이체를 생성함으로써 혈청 반감기를 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 변경된 FcRn 결합 및/또는 혈청 반감기를 갖는 변이체는 W000/42072 (Presta, L.)에 기재되어 있다.

[0279] 본 발명의 항체는 중합화에 의해 안정화될 수 있다. 이는 다작용성 중합체를 통해 직접 또는 간접적으로 다작용성 가교제와 단량체 쇄를 가교결합시킴으로써 수행될 수 있다. 보통, 이작용성 가교제를 사용하여 2개의, 실질적으로 일치하는 폴리펩티드를 그의 C- 또는 N-말단에서 가교결합시킨다. 상기 가교제를 사용하여 말단의 아미노기 및/또는 카복실기를 가교결합시킨다. 일반적으로, 적절한 가교제의 선택에 의해 하나의 폴리펩티드의 알파 아미노가 다른 폴리펩티드의 말단 카복실기에 가교결합되지만, 말단 카복실기 양자 모두, 또는 말단 아미노기 양자 모두는 서로서로에 가교결합된다. 바람직하게, 폴리펩티드는 그의 C-말단에서 시스테인으로 치환된다. 당업계에 잘 공지되어 있는 조건하에서, 디설파이드 결합은 말단 시스테인 사이에서 형성될 수 있고, 이로써, 폴리펩티드 쇄가 가교결합될 수 있다. 예를 들면, 디설파이드 가교는 유리 시스테인의 금속-촉매화된 산화에 의해, 또는 적절하게 변경된 시스테인 잔기의 친핵성 치환에 의해 용이하게 형성된다. 가교제의 선택은 폴리펩티드에 존재하는 아미노산의 반응성 측쇄의 실체에 따라 달라질 것이다. 예를 들면, 시스테인이 C-말단 이외의 추가의 위치에 있는 폴리펩티드에 존재할 경우, 디설파이드 가교결합은 바람직하지 않을 수 있다. 메틸렌가교와 가교결합된 펩티드 또한 본 발명의 범주내 포함된다.

[0280] N-말단 아미노 및 C-말단 카복실기를 제외한, 항체상의 적합한 가교결합 위치는 리신 잔기상에서 발견되는 엡실론 아미노기 뿐만 아니라, 펩티드의 내부 잔기의 측쇄 또는 측면 서열내로 도입된 잔기상에 위치하는 아미노기, 이미노기, 카복실기, 설프하이드릴기 및 하이드록실기를 포함한다. 외부적으로 첨가되는 가교제를 통한 가교결합은 예로서, 당업자에게 공지되어 있는 다수의 시약중 임의의 것을 사용함으로써, 예를 들면, 폴리펩티드의 카보디이미드 처리를 통해 적합하게 구현된다. 적절한 다작용성 (보통 이작용성) 가교제의 다른 일례로 문헌에서 찾아볼 수 있다.

[0281] 본원의 전형적인 제형을 제조하는데 있어서, 사용되는 성분들의 권장되는 품질 또는 "등급"이 제형의 궁극적인 용도에 따라 달라질 것이라는 것을 인지해야 한다. 치료적 용도인 경우에는, 성분(들)이 제약 생성물에 대한 첨가제로서 허용 가능한 등급 (예: "GRAS")인 것이 바람직하다.

[0282] 특정 실시태양에서는, 길항제 또는 효능제, 및 용해도 및/또는 안정성을 증진시키기 위해 충분한 이온 강도를 제공하는 하나 이상의 부형제를 포함하는 조성물이 제공되며, 이 조성물의 pH는 6 (또는 약 6) 또는 9 (또는 약 9)이다. 길항제 또는 효능제는 원하는 순도를 얻기에 적합한 임의의 방법, 예를 들면, 상기 방법에 따라서 제조될 수 있다. 특정 실시태양에서는, 길항제 또는 효능제를 숙주 세포에서 재조합적으로 발현시키거나, 화학적 합성에 의해 제조한다. 제형중의 길항제 또는 효능제의 농도는, 예를 들면, 제형의 의도하는 용도에 따라서 달라질 수 있다. 당업자는 과도한 실험없이 길항제 또는 효능제의 원하는 농도를 결정할 수 있다.

- [0283] 길항제 또는 효능제의 용해도 및/또는 안정성을 증진시키기에 충분한 이온 강도를 제공해주는 제형중의 하나 이상의 부형제는 임의로, 다가이온성 유기 또는 무기 산, 아스파르테이트, 황산나트륨, 숙신산나트륨, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 캡티솔(Captisol)TM, 트리스(Tris), 아르기닌 염 또는 기타 아미노산, 당 및 폴리올, 예를 들면 트레할로스 및 슈크로스이다. 바람직하게는, 충분한 이온 강도를 제공해주는 제형중의 하나 이상의 부형제는 염이다. 사용될 수 있는 염에는, 제한하는 것은 아니지만, 나트륨 염 및 아르기닌 염을 포함한다. 사용된 염의 유형과 염의 농도는 바람직하게, 길항제 또는 효능제가 제형중에 안정할 수 있도록 해주는 상대적으로 높은 이온 강도를 갖도록 하는 것이다. 임의로는, 이러한 염은 제형중에 약 20 mM 내지 약 0.5M의 농도로 존재한다.
- [0284] 본 발명의 조성물의 pH는 바람직하게 6 (또는 약 6) 내지 9 (또는 약 9), 더욱 바람직하게, 약 6.5 내지 약 8.5, 더욱더 바람직하게, 약 7 내지 약 7.5이다. 이러한 실시태양의 바람직한 측면에서, 조성물은 그의 pH를 적어도 약 6 내지 약 8이 되도록 유지시키기 위한 완충제를 추가로 포함할 것이다. 사용될 수 있는 완충제의 예에는, 제한하는 것은 아니지만, 트리스, HEPES, 및 히스티딘을 포함한다. 트리스를 사용하는 경우에는, pH를 임의로 약 7 내지 8.5로 조정할 수 있다. HEPES 또는 히스티딘을 사용하는 경우에는, pH를 임의로 약 6.5 내지 7로 조정할 수 있다. 임의로는, 완충제가 제형중의 약 5mM 내지 약 50mM의 농도로 사용된다.
- [0285] 특히 액상 제형 (또는 재구성된 동결건조된 제형)의 경우에는, 조성물내에 하나 이상의 계면활성제를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 계면활성제에는, 예를 들면 트윈(TWEEN)TM 또는 플루로닉(PLURONICS)TM 같은 비이온성 계면활성제 (예: 폴리솔베이트 또는 폴록사머)가 포함될 수 있다. 바람직하게는, 계면활성제가 폴리솔베이트 20 ("트윈(Tween) 20")을 포함한다. 계면활성제는 임의로, 0.005% 내지 약 0.2%의 농도로 사용될 것이다.
- [0286] 본 발명의 제형은 길항제 또는 효능제 및 상기 언급된 성분들 이외에도, 추가의 각종 기타 부형제 또는 성분을 포함할 수 있다. 임의로는, 상기 제형이 비경구 투여용의 약제학적으로 또는 비경구적으로 허용가능한 담체, 즉, 사용된 투여량과 농도에서 수혜자에게 비독성이고 제형의 다른 성분들과 화합성인 담체를 함유할 수 있다. 임의로는, 상기 담체가 비경구용 담체, 예를 들면 수혜자의 혈액과 등장성인 용액이다. 상기 담체 비히클의 예에는 물, 식염수 또는 완충액, 예를 들면, 인산염 완충 식염수 (PBS), 링거액 및 텍스트로스 용액이 포함된다. 다양한 임의의 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 추가로 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. (1980)]에 기재되어 있다.
- [0287] 본원의 제형은 하나 이상의 방부제를 함유할 수도 있다. 이의 예에는 옥타데실디메틸베질 암모늄 클로라이드, 헥사메토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드 (알킬기가 장쇄 화합물인 알킬벤질디메틸암모늄 클로라이드의 혼합물), 및 벤제토늄 클로라이드가 포함된다. 기타 유형의 방부제에는 방향족 알코올, 알킬 파라벤, 예를 들면 메틸 또는 프로필 파라벤, 및 m-크레졸이 포함된다. 항산화제에는 아스코르브산 및 메티오닌; 방부제 (예: 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 부틸 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들면 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 미만 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들면, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들면 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들면 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물, 예를 들면 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 당, 예를 들면 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨; 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 포함된다.
- [0288] 이러한 담체의 추가의 예에는 레시틴, 혈청 단백질, 예를 들면 인간 혈청 알부민, 완충제 물질, 예를 들면 글리신, 소르브산, 칼륨 솔베이트, 포화 식물성 지방산의 부분 글리세라이드 혼합물, 물, 염, 또는 전해질, 예를 들면 프로타민 설페이트, 염화나트륨, 폴리비닐 피롤리돈, 및 셀룰로스계 물질이 포함된다. 겔-사용 형태에 대한 담체에는 다당류, 예를 들면 나트륨 카복시메틸셀룰로스 또는 메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 폴리아크릴레이트, 폴리옥시에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체, 폴리에틸렌 글리콜, 및 우드 왁스 알코올이 포함된다. 통상적인 데포 형태에는, 예를 들면 미소캡슐, 나노캡슐, 리포솜, 석고, 흡입 형태, 비내 분무제, 및 지효성 방출제제가 포함된다.
- [0289] 본 발명의 조성물에는 액상 제형 (액상 용제 또는 액상 현탁제), 및 동결건조된 제형 뿐만 아니라, TWEAK 길항제 또는 TWEAK 효능제가 결정 또는 무정형 침전물 형태인 현탁제 제형이 포함될 수 있다.
- [0290] 액상인 경우의 최종 제형은 바람직하게, $\leq 20^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 저장한다. 다르게는, 제형을 동결건조시킬 수 있고, 임의로 2 내지 30°C 에서 저장할 수 있는 주사용 수로 재구성하기 위한 산제로서 제공될 수 있다.

- [0291] 치료적 투여를 위해 사용하고자 하는 제형은 반드시 멸균성이어야 한다. 멸균성은 멸균성 여과 막 (예: 0.2 마이크로 막)을 통하여 여과시킴으로써 용이하게 달성한다. 치료적 조성물은 일반적으로, 멸균성 유입 포트를 갖는 용기, 예를 들면 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용제 백 또는 바이알 내에 놓아둔다.
- [0292] 본 발명의 조성물은 통상적으로, 단일 단위 또는 다중-투여 용기, 예를 들면, 밀봉 앰플 또는 바이알에 수성 용제로서 또는 재구성하기 위한 동결건조된 제형으로서 저장할 것이다. 용기는 당해 분야에서 입수 가능한 임의의 용기일 수 있고, 통상적인 방법으로 충전시킬 수 있다. 임의로는, 제형을 치료적 전달하는데 적합한 주사용 펜 장치 (또는 펜 장치에 맞춘 카트릿지), 예를 들면 당해 분야에서 입수 가능한 것 (미국 특허 제5,370,629호 참조)이 상기 제형 내에 포함될 수 있다. 주사용 용제는, 예를 들면 주사용 수를 사용하여, 동결건조된 길항제 또는 효능제 제형을 재구성함으로써 제조할 수 있다.
- [0293] TWEAK 또는 TWEAK 수용체 활성(들)을 조절하는 본원에 기술된 조성물은 다양한 치료학적 적용에 사용될 수 있다. 예를 들면, TWEAK 길항제는 암 치료 방법에 사용될 수 있는 반면, TWEAK 효능제는 다양한 면역 관련 용태의 치료에서 유용성을 발견할 수 있다.
- [0294] 상기 질병을 치료하기 위한 본 발명의 방법에서, 길항제 또는 효능제의 제제는 주입 또는 주사를 비롯한 임의의 적합한 기술에 의해 포유동물에 직접 투여될 수 있다. 구체적인 투여 경로는, 예를 들면, 환자의 의학적 병력, 길항제 또는 효능제를 사용한 경우에 인지되거나 예상되는 모든 부작용, 및 교정하고자 하는 특정한 질병에 따라 달라질 것이다. 비경구 투여의 예에는 조성물을 피하, 근육내, 정맥내, 동맥내 및 복강내 투여하는 것이 포함된다. 제형은 바람직하게, 반복적 정맥내 (i.v.), 피하 (s.c.), 근육내 (i.m.) 주사 또는 주입, 두개내 주입 제로서, 또는 비내 또는 폐내 전달에 적합한 에어로졸 제형으로서 투여한다 (폐내 전달의 경우에는, 예를 들면, EP 257,956을 참고할 수 있다).
- [0295] 피하 및 근육내 주사에 있어서는 주사제의 삼투압이 중요할 수 있다는 것을 인지해야 한다. 저장성 또는 고장성인 경우의 주사용 용제는 주입시 환자에게 통증을 유발시킬 수 있다. 일반적으로, 본원의 주사용 제형을 치료적으로 사용하는 경우에는, 주사용 용제의 상대 삼투압이 약 300mosm 내지 약 600
- [0296] m인 것이 바람직하다.
- [0297] 제제는 또한, 경구 또는 지효성 방출 제제 형태로 투여될 수 있다. 지효성 방출 제제의 적합한 예에는 단백질을 함유하는 고형 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스가 포함되는데, 이러한 매트릭스는 성형품, 예를 들면, 필름 또는 미소캡슐 형태이다. 지효성 방출 매트릭스의 예에는 셀룰로스 유도체 (예: 카복시메틸셀룰로스), 비수성 매질 중의 슈크로스-아세테이트 이소부티레이트 (세이버(SABER)TM), 폴리에스테르, 하이드로겔 (예로서, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트) ([Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 1981, 15: 167-277]; [Langer, Chem. Tech. 1982, 12: 98-105] 참조) 또는 폴리(비닐알코올), 폴리락티드 (미국 특허 제3,773,919호, EP 58,481 참조), L-글루탐산과 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체 ([Sidman et al., Biopolymers 1983, 22: 547-556] 참조), 비분해성 에틸렌-비닐 아세테이트 ([Langer et al., 상기 문헌] 참조), 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들면, 루프론(Lupron) 데포 (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프폴리드 아세테이트로 구성된 주사용 미소구), 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산 (EP 133,980 참조)이 포함된다. 전신 작용성 약물에 대한 한 가지 임의의 전달 방법은 연속적으로 주입하거나 (예를 들면, 저속-방출형 장치 또는 미니펌프, 예를 들면, 삼투압 펌프 또는 피부 패치를 사용함) 또는 주사함으로써 (예를 들면, 단일-볼루스 주사를 포함한 정맥내 또는 피하 수단을 사용함) 투여하는 것을 포함한다.
- [0298] 요법에 사용될 조성물은 개개 환자의 임상적 용태, 조성물 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄, 및 의사에게 공지된 기타 요인들을 고려하여, 우수한 의료 행위에 부합되는 방식으로 제형화 및 투약될 것이다.
- [0299] 본 발명의 방법에 추가 요법을 사용할 수 있다는 것이 고려된다. 하나 이상의 기타 요법에는 제한하는 것은 아니지만, 당업계에 공지되어 있고 상기에서 특정하게 추가로 규정된, 방사선 요법, 사이토킨(들), 성장 억제제(들), 화학요법제(들), 세포독성제(들), 티로신 키나제 억제제, ras 파르네실 트랜스퍼라제 억제제, 혈관형성 억제제 및 사이클린-의존성 키나제 억제제를 투여하는 것을 포함하고, 이들 요법을 TWEAK 길항제 또는 TWEAK 효능제와 병용해서 (예를 들면, 동시에 또는 순차적으로) 투여할 수 있다. 또한, 종양 또는 기타 세포 항원을 표적으로 하는 치료적 항체, 예를 들면, CD20 항체 (리툭산(Rituxan)TM 포함) 또는 Her 수용체 항체 (허셉틴(Herceptin)TM 포함) 뿐만 아니라, 항혈관형성 항체, 예를 들면, 항-VEGF, 또는 기타 수용체, 예로서, EGFR을 표적하는 항체 (예로서, 타르세바(Tarceva)TM)에 의거한 요법이 종양 백신화와 함께 사용될 수 있다.

- [0300] 암과 같은 용태를 치료하는 방법에서, 화학요법제에 대한 제제 및 투약 스케줄은 제조사의 지시에 따라서 또는 전문의에 의해 실험적으로 결정된 바와 같이 사용할 수 있다. 상기 화학요법에 대한 제제 및 투약 스케줄은 또한 [Chemotherapy Service, Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)]에 기재되어 있다 [Chemotherapy Service, Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)]. 몇몇 경우에는, TWEAK 길항제를 투여하기에 앞서, 세포를 하나 이상 화학요법제에 노출시키는 것이 유리할 수 있다.
- [0301] 기타 항원에 대한 항체, 예를 들면, CD20, CD11a, CD18, CD40, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, 혈관 내피 인자 (VEGF), 또는 기타 TNFR 계열 구성원 (예: OPG, DR4, TNFR1, TNFR2)와 결합하는 항체를 또한 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 다르게는, 또는 추가로, 본원에 개시된 동일한 항원 또는 2 가지 이상 상이한 항원과 결합하는 2개 이상의 항체를 환자에 공-투여할 수 있다. 종종, 하나 이상 사이토킨을 환자에게 투여하는 것이 유리할 수도 있다.
- [0302] 길항제 또는 효능제 제형은 본 출원에 기재된 치료적 방법중 임의의 것으로 예를 들면, 본 출원의 상기 정의 섹션에서 구체적으로 제공된 기타 제제, 사이토킨, 화학요법제, 항체 등과 병용해서, 예를 들면, 동시에 또는 순차적으로 투여할 수 있다. 예를 들면, TWEAK 길항제 제형은 (임의의 다른 제제를 투여하기에 앞서) 전-치료제로서 투여될 수 있는데, 예를 들면, 기타 치료제의 아포프토시스 효과에 대한 내성이 있을 수 있는 암 세포의 전-치료제로서 투여될 수 있다.
- [0303] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 길항제 또는 효능제는 각종 용도를 지니고 있다. 예를 들면, TWEAK 길항제는 포유동물에서 암과 같은 병적 용태를 치료하기 위한 방법에 사용될 수 있다. TWEAK 효능제는 포유동물에서 면역-관련 질환을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본원에 기재된 다양한 병적 용태를 포유동물에게서 진단하는 것은 전문의에 의해 이루어질 수 있다. 예를 들면, 포유동물에게서 암 또는 면역 관련 질환을 진단 또는 검출할 수 있게 해주는 진단 기술이 당업계에서 입수 가능하다. 예를 들면, 암은 제한하는 것은 아니지만, 촉진 (palpation), 혈액 분석, x-선, NMR 등을 비롯한 기술을 통하여 확인할 수 있다. 면역 관련 질환 역시 용이하게 확인할 수 있다. 전신성 홍반성 루푸스에서는, 질환의 중추적 매개인자가 자기 단백질/조직에 대한 자가-반응성 항체의 생성과, 면역-매개된 염증의 후속 발생이다. 신장, 폐, 근골격계, 피부점막, 눈, 중추 신경계, 심혈관계, 위장관, 골수 및 혈액을 포함한 다중 기관 및 시스템이 임상적으로 병에 걸린다.
- [0304] 의사들은 면역 및/또는 염증 반응의 개입이 이로운 다수의 질환을 잘 알고 있다. 예를 들면, 류마티스성 관절염 (RA)은 주로 관절 연골에 대한 손상의 원인이 되는 다중 관절의 활막과 관련이 있는 만성 전신성 자가면역 염증 질환이다. 발병 기전은 T 림프구 의존성이고, 이는 류마티스양 인자, 자기 IgG에 대하여 지시된 자가-항체의 생성과 연관이 있는데, 이로써 관절액 및 혈액 내에서 고수준으로 수득되는 면역 복합체가 형성된다. 이들 관절 내의 복합체는 림프구와 단구가 활막 내로 현저하게 침윤되는 것을 유도시킬 수 있고, 이로 인해 활막 상의 현저한 변화가 야기될 수 있는데, 다수의 호중구를 부가하면서 유사한 세포에 의해 침윤된 경우에는 관절 공간/유체가 변한다. 병든 조직은 주로, 대칭적 패턴을 보이는 관절이다. 그러나, 관절의 질환이 2 가지 주요 형태로 발생한다. 한 가지 형태는 진행성 관절 질환이 진행되고 있는 관절의 병변 및 전형적인 폐 섬유증 병변, 혈관염 및 피부 궤양의 발생이다. 관절의 질환의 두 번째 형태는 RA 질환 과정 말기에 나타나고, 종종 관절 질환이 활동을 멈춘 후에 나타나며 호중구 감소증, 저혈소판증 및 지라비대 발병과 관련이 있는 소위 펠티 증후군(Felty's syndrome)이다. 이는 경색증, 피부 궤양 및 괴저의 형성을 나타내는 다중 기관에서의 혈관염을 수반할 수 있다. 환자에게서 종종, 병든 관절을 덮고 있는 피하 조직에 류마티스양 결절이 발생하는데; 이러한 결절 말기에는 혼합 염증 세포 침윤물로 둘러싸인 "괴사 중심"이 생긴다. RA에게서 발생할 수 있는 기타 징후에는 심막염, 흉막염, 관상 동맥염, 폐 섬유증을 수반한 간질성 폐렴, 건성 각막결막염 및 류마티스양 결절이 포함된다.
- [0305] 유년성 만성 관절염은 종종 16세 미만에게서 시작하는 만성 특발성 염증 질환이다. 그의 표현형은 RA와 몇 가지 유사한 점이 있는데; 류마티스양 인자 양성인 몇몇 환자는 유년성 류마티스성 관절염으로서 분류된다. 이 질환은 3 가지 주요 범주로 세부적으로 분류된다: 소수관절성, 다관절성 및 전신성. 상기 관절염은 중증일 수 있고, 전형적으로 파괴적이어서 관절 강직증과 성장 지연을 유발시킨다. 기타 징후에는 만성 전방 포도막염 및 전신성 아밀로이드증이 포함될 수 있다.
- [0306] 척추관절병증은 HLA-B27 유전자 생성물의 발현과 연관이 있는 몇 가지 통상적인 임상적 특징을 나타내는 일군의 질병이다. 이 질병에는 강직성 척추염, 라이터(Reiter) 증후군 (반응성 관절염), 염증성 장 질환과 연관된 관절염, 건선과 연관된 척추염, 유년성 척추관절병증 및 미분화 척추관절병증이 포함된다. 두드러진 특징에는 척추염을 수반하거나 수반하지 않는 천골장골 관절염; 염증성 비대칭 관절염; HLA-B27 (부류 I MHC의 HLA-B 유전

자 자리의 혈청학적으로 규정된 대립 유전자)과의 연관성; 안구 염증, 및 기타 류마티스양 질환과 연관된 자가 항체의 부재가 포함된다. 상기 질환을 유도하기 위한 주요 인자로서 가장 밀접한 영향을 미친 세포는, 부류 I MHC 분자에 의해 제시된 항원을 표적으로 하는 세포인 CD8+ T 림프구이다. CD8+ T 세포는 이것이 MHC 부류 I 분자에 의해 발현된 외래 펩티드인 것 처럼, 부류 I MHC 대립 유전자 HLA-B27에 대항하여 반응할 수 있다. HLA-B27의 에피토프는 세균 또는 기타 미생물 항원성 에피토프를 모사할 수 있으므로, CD8+ T 세포 반응을 유도할 수 있는 것으로 가정되었다.

[0307] 전신성 경화증 (피부 경화증)은 병인이 알려져 있지 않다. 이 질환의 특징은 피부의 경화인데, 이는 활성화 염증 과정에 의해 유도되는 것으로 예상된다. 피부 경화증은 국한성 또는 전신성일 수 있고; 각종 병변이 흔히 발생하고, 미소혈관계 내의 내피 세포 손상은 전신성 경화증 발병에 있어 중요한 초기 사건이며; 이러한 혈관 손상은 면역 매개될 수 있다. 면역학적 근거는 많은 환자에 있어 항핵 항체가 존재하고 피부 병변에 단핵 세포 침윤물이 존재하는 것을 내포한다. ICAM-1은 피부 병변 내의 섬유아세포 세포 표면 상에서 종종 상향 조절되는데, 이는 이들 세포와 T 세포 상호 작용이 상기 질환의 발병 기전에 있어 일정 역할을 할 수 있다는 것을 제안한다. 발병되는 기타 기관에는 다음이 포함된다: 위장관: 비정상적인 연동/운동성을 가져다 주는 평활근 위축 및 섬유증; 신장: 단백뇨, 질소혈증 및 고혈압을 유발시키는, 신 피질 혈류 감소의 원인이 되는 작은 혈관 동맥과 소엽사이 동맥에 영향을 미치는 동심성 내피하 혈관내막 증식; 골격근: 위축, 간질성 섬유증; 염증; 폐: 간질성 폐렴 및 간질성 섬유증; 및 심장: 수축대 괴사, 반흔 형성/섬유증.

[0308] 피부 근염, 다발성 근염 등을 포함한 특발성 염증성 근육병증은 근육 쇠약을 가져다 주는, 병인이 알려져 있지 않은 만성 근육 염증 질환이다. 근육 손상/염증이 종종 대칭적 및 진행적이다. 자가항체는 대부분의 형태와 연관이 있다. 이들 근염-특이적 자가항체는 단백질 합성에 관여하는 성분인 단백질과 RNA의 기능에 대항하여 지시되고 이의 기능을 억제시킨다.

[0309] 쇼그렌 증후군은 눈물샘과 타액선의 면역 매개된 염증과 후속 기능적 파괴에 기인한다. 이 질환은 염증성 결합 조직 질환과 연관이 있거나 이를 수반할 수 있다. 이 질환은 Ro 및 La 항원 (둘 다는 작은 RNA-단백질 복합체이다)에 대한 자가항체 생성과 연관이 있다. 병변은 건성 각막결막염, 구강 건조증; 담즙성 간경변, 말초 또는 감각 신경병증을 포함한 기타 징후 또는 연관된 증상, 및 촉진 가능한 자반증을 유발시킨다.

[0310] 전신성 혈관염은 일차 병변이 염증 및 혈관에 대한 후속 상해로 인해, 병든 혈관에 의해 공급된 조직에 대한 허혈증/괴사/변성, 및 몇몇 경우에는 궁극적으로 종말 기관 기능질환을 유발시키는 질환이다. 혈관염은 또한, 특히 면역 복합체 형성과 연관되기도 하는 질환에서, 기타 면역-염증 매개 질환, 예를 들면, 류마티스성 관절염, 전신성 경화증 등에 대한 이차 병변 또는 후유증으로서 발생할 수 있다. 원발성 전신성 혈관염 군에 속하는 질환에는 전신성 괴사성 혈관염; 다발성 결절성 동맥염; 알레르기성 혈관염 및 육아종증, 다발성 혈관염; 베거너 (Wegener) 육아종증; 림프종양 육아종증; 및 거대 세포 동맥염이 포함된다. 혼합 혈관염에는 피부점막 림프절 증후군 (MLNS 또는 가와사키병(Kawasaki's disease)), 단리된 CNS 혈관염, 베체트병(Behcet's disease), 폐쇄성 혈전혈관염 (버거병(Buerger's disease)) 및 피부 괴사성 세정맥염이 포함된다. 열거된 혈관염 대부분 유형의 발병 기전은 주로, 면역글로불린 복합체가 혈관벽에 침착되어, ADCC 또는 보체 활성화, 또는 둘 다를 통하여 염증 반응이 후속 유도되는 것에 기인하는 것으로 여겨진다.

[0311] 사르코이드증은 체내 거의 모든 조직에 상피양 육아종이 존재하는 것을 특징으로 하는, 병인이 알려져 있지 않은 질환인데, 폐 장애가 가장 흔하다. 발병 기전은 질환 부위에서 활성화 대식세포 및 림프계 세포의 존속과 관련이 있으며, 이들 세포 유형에 의해 방출된 국소적 및 전신적 활성화 생성물의 방출로부터 비롯되는 만성 후유증이 후속 수반된다.

[0312] 자가면역 용혈성 빈혈, 면역 범혈구감소증, 및 발작성 야간혈색소뇨증을 포함한 자가면역 용혈성 빈혈은 적혈구 세포 (및 몇몇 경우에는, 혈소판을 포함한 기타 혈액 세포) 표면 상에 발현된 항원과 반응하는 항체가 생성된 결과이고, 보체 매개된 용해 및/또는 ADCC/Fc-수용체-매개된 기전을 통한 이들 항체 피복된 세포의 제거를 반영한 것이다.

[0313] 기타 임상 설정에서의 저혈소판성 자반증 및 면역-매개된 저혈소판증을 포함한 자가면역성 저혈소판증에서는, 항체 또는 보체를 혈소판에 부착시키고, 연속해서 보체 용해, ADCC 또는 Fc-수용체 매개된 기전에 의해 후속 제거시킴에 따라 혈소판 파괴/제거가 일어난다.

[0314] 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 유년성 림프구성 갑상선염, 및 위축성 갑상선염을 포함한 갑상선염은 갑상선에 존재하고 종종 이에 대해 특이적인 단백질과 반응하는 항체의 생성을 수반하면서 갑상선 항원에 대항한 자가

면역 반응에 따른 결과이다. 자발적 모델 (래트 (BUF 및 BB 래트) 및 치킨 (비만 치킨 계)); 유도성 모델 (동물을 티로글로불린 또는 갑상선 미세소체 항원 (갑상선 퍼옥시다제)으로 면역화시킴)을 포함한 실험적 동물이 존재한다.

[0315] 유형 I 당뇨병 또는 인슐린 의존성 당뇨병은 췌장 섬 β 세포의 자가면역성 파괴인데, 이러한 파괴는 자가항체 및 자가-반응성 T 세포에 의해 매개된다. 인슐린 또는 인슐린 수용체에 대한 항체가 인슐린 비-반응성의 표현형을 생성시킬 수도 있다.

[0316] 사구체신염 및 세뇨관간질 신염을 포함한 면역-매개된 신 질환은 신 항원에 대한 T 세포 또는 자가반응성 항체가 생성된 결과로서 직접적으로, 또는 기타 비-신 항원에 대항하여 반응성인 신장 내의 항체 및/또는 면역 복합체가 침착된 결과로서 간접적으로, 신 조직에 대한 항체 또는 T 림프구 매개된 손상의 결과이다. 따라서, 면역 복합체 형성을 가져다 주는 기타 면역 매개된 질환이 간접 후유증으로서 면역 매개된 신 질환을 유도시킬 수도 있다. 직접 면역 기전과 간접 면역 기전 양자 모두로 인해, 기관 기능 질환과 몇몇 경우에는 신 부전증으로의 진행의 원인이 되는 신 조직 내의 병변 발생을 유발/유도 시키는 염증 반응이 일어난다. 체액성 면역 기전과 세포성 면역 기전 둘 다도 이러한 병변의 발생 기전에 관여할 수 있다.

[0317] 다발성 경화증; 특발성 탈수초성 다발신경병증 또는 길랑-바레 증후군; 및 만성 염증성 탈수초성 다발신경병증을 포함한, 중추 및 말초 신경계의 탈수초성 질환은 자가면역 근거를 나타내고, 회돌기아교세포 또는 수초에 대해 직접적으로 유발된 손상 결과로서 신경 탈수초가 발생하는 것으로 여겨진다. MS에서는 질환 유도 및 진행이 T 림프구 의존성이라는 사실을 제안하는 명백한 증거가 있다. 다발성 경화증은 T 림프구 의존성이고 재발-완화 과정 또는 만성 진행성 과정을 나타내는 탈수초성 질환이다. 병인은 알려져 있지 않지만, 바이러스성 감염, 유전적 소인, 환경 및 자가면역 모두가 원인이 된다. 병변은 주로 T 림프구 매개된 침윤물, 미세아교세포 및 침윤성 대식세포를 함유하는데; CD4+T 림프구가 병변에서 의 주된 세포 유형이다. 회돌기아교세포 사멸과 후속 탈수초의 기전은 공지되어 있지 않지만, T 림프구에 의해 구동되는 것으로 예상된다.

[0318] 호산구성 폐렴; 특발성 폐 섬유증, 및 과민성 폐렴을 포함한 염증성 및 섬유성 폐 질환은 조절되지 않는 면역-염증 반응과 관계가 있을 수 있다. 이러한 반응을 억제하는 것이 치료적으로 이득일 것이다.

[0319] 수포성 피부 질환, 다형 홍반 및 접촉성 피부염을 포함한 자가면역 또는 면역-매개된 피부 질환은 자가항체에 의해 매개되는데, 이의 발생은 T 림프구 의존성이다.

[0320] 건선은 T 림프구-매개된 염증 질환이다. 병변은 T 림프구, 대식세포 및 항원 프로세싱 세포의 침윤물, 및 몇몇 호중구를 함유한다.

[0321] 천식; 알레르기성 비염; 아토피성 피부염; 음식물 과민증; 및 두드러기를 포함한 알레르기성 질환은 T 림프구 의존성이다. 이들 질환은 주로, T 림프구 유도된 염증, IgE 매개된 염증 또는 이 둘의 조합에 의해 매개된다.

[0322] 이식편 거부 및 이식편 대 숙주 질환 (GVHD)을 포함한 이식 관련 질환은 T 림프구 의존성이고, T 림프구 기능 억제가 병 완화에 도움을 준다.

[0323] 면역 및/또는 염증 반응의 개입이 유리한 기타 질환은 바이러스성 감염 (AIDS, A형, B형, C형, D형, E형 간염이 포함되지만, 이에 제한되지 않음), 세균성 감염, 진균성 감염, 및 원생동물 및 기생충 감염 (MLR을 자극시키는 분자 (또는 유도체/효능제)를 치료학적으로 사용하여 감염체에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있다)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 감염성 질환, 면역결핍증 (MLR을 자극시키는 분자/유도체/효능제를 치료학적으로 사용하여 유전성, 후천성, 감염성 유도된 (HIV 감염에서와 같음) 또는 의원성 (즉, 화학요법으로부터) 면역결핍증 질환에 대한 면역 반응을 증진시킬 수 있다), 및 신생물이다.

[0324] 본 발명은 또한 본원에 기술된 길항제 또는 효능제를 포함하는 키트를 제공한다. 전형적인 키트는 상기 언급된 바와 같은 하나 이상의 부형제와의 길항제 또는 효능제에 대한 용기, 바람직하게는 바이알; 및 사용자가 길항제 또는 효능제 제형을 사용하는 방법에 관해 설명해주는 설명서, 예를 들면, 제품 인서트(insert) 또는 라벨을 포함할 것이다. 이것이 바람직하게 약제학적 제형을 제공할 것이다. 바람직하게는, 이러한 약제학적 제형은 암 또는 면역 관련 질환을 치료하기 위한 것이다. 적합한 용기에는, 예를 들면, 병, 바이알, 주사기 및 시험용 튜브가 포함된다. 용기는 각종 재료, 예를 들면, 유리 또는 플라스틱으로부터 형성할 수 있다. 용기는 상기 질환을 진단 또는 치료하는데 유효한 길항제 또는 효능제 제형을 보유하고 있고 멸균성 유입 포트를 가질 수 있다 (예를 들면, 상기 용기는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 막개를 갖는 정맥내 용제 백 또는 바이알일 수 있다). 이러한 용기상에 부착되거나 용기와 부착된 라벨은 해당 제형이 선택된 질병을 진단 또는 치료하는데

사용된다는 것을 지시한다. 본 발명의 제품은 주사용 수, 약제학적으로 허용가능한 용액, 식염수, 링거액 또는 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 상업적 및 사용자 측면에서 바람직한 기타 재료, 예를 들면, 기타 완충액, 희석제, 충전제, 바늘, 주사기, 및 사용에 대한 설명서를 수반한 패키지 인서트를 추가로 포함할 수도 있다.

[0325]

본원 전반에 걸쳐 인용된 모든 특허, 특허 출원, 공개문헌, 제품 설명, 및 프로토콜은 그 전문이 본원에 참고로 인용된다. 본원에 사용된 섹션 제목은 단지 편성 목적이며, 본원에 기재된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

발명의 효과

[0326]

본 발명은 TWEAK 및 TWEAK 수용체의 활성을 조절하는 효능제 및 길항제를 제공한다. 더욱 특히, 본 발명은 면역 세포상의 TWEAK 및/또는 TWEAK 수용체의 활성을 조절하기 위하여 사용될 수 있는 방법, 조성물 및 키트, 및 암과 같은 질병 및 면역-관련 질환의 치료를 위한 방법, 조성물 및 키트를 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0327]

도 1a-1b. TWEAK, 및 그의 수용체 FN14는 선천성 면역계의 세포상에서 발현된다. (1a) 휴지기 ("비자극") 인간 PBMC, 및 IFN-감마 또는 PMA로 12시간동안 활성화된 인간 PBMC 양자 모두를 림프구 계통 마커에 대한 항체로 표면-염색시키고, 투과화시키고, TWEAK 항체로 염색시키고, FACS로 분석하였다 (대식세포 ("mac"), 수지상 세포 ("DC"), NK 세포, 및 NKT 세포). (1b) 휴지기 인간 PBMC 및 활성화된 인간 PBMC 양자 모두를 TWEAK 수용체, FN14에 대하여 표면 염색시켰다.

도 2a-2d. TWEAK KO 마우스가 2차 조절 조직에서 더욱 많은 갯수의 NK 세포를 가졌다. (2a, 2b) 지라, 말초 혈액, 파이어판, 및 림프절을 2개월된 TWEAK^{+/+} 마우스 (검은색 막대) 또는 TWEAK^{-/-} 마우스 (흰색 막대) (군당 6마리)로부터 분리시키고, 해리시키고, NK 세포 (a) 또는 NKT 세포 (b)를 FACS 분석에 의해 측정하였다. (상단 그래프: 수컷; 하단 그래프: 암컷). (2c) TWEAK^{+/+} 마우스 (검은색 막대) 또는 TWEAK^{-/-} 마우스 (흰색 막대) (군당 6마리) (상단 그래프: 수컷; 하단 그래프: 암컷)의 우측 대퇴부로부터 골수 (0.5mL)를 흡입시키고, NK 세포를 측정하였다. (2d) 인간 PBMC를 전혈로부터 분리시키고, 다양한 농도의 FN14 Fc (검은색 사각형), 항-TWEAK mAb (흰색 사각형), EDAR Fc (검은색 원형), 또는 항-CD4 mAb (흰색 원형)의 존재하에서 TNF-알파, LPS, 또는 IFN-감마로 자극시킴으로써 활성화-유도 세포 사멸을 일으켰다. 이어서, NK 세포를 분리시키고, 상기를 그의 서브-G1 함량을 위해 염색시켰다.

도 3a-3c. TWEAK 제거 또는 저해는 내독소에 대한 선천성 염증 반응을 증강시킨다. (3a) TWEAK^{+/+} 및 TWEAK^{-/-} 마우스 (군당 10마리)에 지정량의 LPS를 사용하여 i.p. 주사하고, 5일간에 걸쳐 생육성에 대하여 모니터링하였다. (3b) 생체내에서 LPS (30mg/kg)로 챌린지시킨 후 24시간째 TWEAK^{+/+} 및 TWEAK^{-/-} 마우스의 말초 혈액 및 지라로부터 NK 세포 및 대식세포를 분리시키고, 상기를 IFN-감마, IL-12, 및 IL-10의 세포내 수준을 위해 염색시켰다. (3c) 4개의 인간 공여체로부터 수득한 PBMC를 24시간동안 LPS로 자극시켰다. 이어서, NK 세포 또는 대식세포 (계통 마커로 확인됨)를 각각 IFN-감마 및 IL-12의 세포내 수준을 위해 염색시켰다.

도 4a-4c. TWEAK는 STAT-1 및 NF-κB1 조절에 관여한다. (4a) STAT-1 활성화의 분석. 인간 NK 세포 및 대식세포를 1시간동안 시험관내에서 LPS (1μg/mL)로 자극시키고, 계통 마커에 대하여 표면-염색시키고, 투과화시키고, 인산화된 STAT-1의 세포내 수준을 위해 염색시켰다. 상단의 패널은 NK 세포를 나타내고, 하단의 패널은 대식세포를 나타낸다 (우측에는 막대 그래프로서 요약된 FACS 히스토그램도 함께 나타낸다). (4b) NF-κB1 인산화의 분석. 지라 인간 NK 세포 및 대식세포를 24시간에 걸쳐 TWEAK 또는 TNF-알파 (100ng/mL)로 자극시켰다. 지정 시점에서 세포 용해물을 제조하고, 면역블롯에 의해 인산화된 p65 NF-κB1에 대하여 분석하였다. (4c) NF-κB1 상호작용의 분석. TWEAK- 또는 TNF-알파-자극받은 세포의 용해물로부터 p65를 통해 NF-κB1을 면역침전시키고, 면역블롯에 의해 면역침전물을 p300 및 HDAC-1에 대하여 분석하였다.

도 5a-5e. 성숙 TWEAK^{-/-} 마우스는 확대된 기억과 T_H1 세포 구획을 갖는, 더욱 큰 지라를 갖는다. TWEAK^{+/+} 및 TWEAK^{-/-} 수컷 마우스 한배새끼를 3-, 6-, 또는 12개월 (연령)까지 성장시키고, 그의 지라 및 림프절을 조사하였다. (5a) TWEAK^{+/+} 및 TWEAK^{-/-} 마우스로부터 수득한 지라의 대표적인 영상. (5b) 연령에 대한 함수로서 지라

의 평균 중량 (군당 6마리). (5c) 12개월된 TWEAK^{+/+} 및 TWEAK^{-/-} 마우스로부터 수득한, CD3 항체로 염색된 지라 단편의 대표적인 영상. (5d, 5e) 12개월된 야생형 마우스 및 TWEAK KO 한배새끼로부터 수득한 지라 특이세포(splenocytes)를 FACS에 의해 분석하여 CD3⁺, CD4⁺, 및 CD8⁺ T 세포의 갯수 (5d) 및 기억 세포 및 T_H1 T 세포 (5e)의 갯수를 측정하였다.

도 6a-6c. TWEAK 결실은 B16.F10 흑색종의 확립 및 성장을 저해시키고, 적응 CD8⁺ T 세포의 확장을 촉진시킨다. TWEAK^{+/+} 및 TWEAK^{-/-} 마우스에 100,000개의 B16.F10 세포를 s.c. 주사하고, 종양 성장 (A) 또는 발생율 (B)을 6주간에 걸쳐 모니터링하였다 (6a, 6b). 연구 종결시, 주사한 마우스로부터 지라를 수거하고, 지정된 림프구 아 집단에 대하여 분석하였다 (6c).

도 7a-7e. TWEAK 결실은 B16.BL6 종양 성장을 저해시키고, 항-종양 면역 반응의 선천성으로부터 적응 프라이밍으로의 전이를 촉진시킨다. TWEAK^{+/+} 및 TWEAK^{-/-} 마우스에 500,000개의 B16.BL6 세포를 s.c. 주사하고, 종양 중량 (7a) 또는 지라 중량 (7b)을 1개월째 측정하였다. (7c) 종양-수반 마우스로부터 수득한 지라 특이세포를 다양한 계통 군집을 위해 염색시키고, FACS에 의해 분석하였다. (7d) 종양-수반 마우스로부터 단리된 NK 세포 및 대식세포를 세포내 염색 및 FACS에 의해 분석하였다. (7e) 종양-수반 마우스로부터 수득한 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 IFN-감마 생산에 대하여 유사하게 분석하였다. (*)는 기본 사이토카인 통계학적 유의성 (p<0.01)을 나타내고; (**)는 종양-유도 사이토카인 통계학적 유의성 (p<0.01)을 나타낸다.

도 8a-8g. TWEAK^{-/-} 마우스의 특징화. (8a) 마우스 TWEAK 유전자좌의 구조. 박스는 TWEAK (흰색 막대), APRIL (검은색 막대) 및 SMT3IP1 (회색 막대) 유전자를 포함하는 게놈 영역에 상응한다. 3개의 유전자의 배향은 화살표로 표시되어 있다. (8b) TWEAK 유전자의 엑손 6 및 7의 코딩 서열이 neo 카세트에 대체된 표적 작제물에 대한 개략적 대표도. (8c) TWEAK 유전자에서 돌연변이화된 영역의 구조. ES 세포의 서던 블롯 분석을 위해 사용된 5' 및 3' 외부 프로브의 위치는 막대로 표시한다. 마우스 꼬리 DNA의 유전자형 분석에 사용된 프라이머 세트의 위치는 검은색 (외부) 및 회색 (내부)의 화살촉모양의 기호로 나타낸다. (8d) TWEAK 유전자의 재조합에 대한 분석. 수개의 ES 세포 클론으로부터 유래된, BsmI (DI) 및 NarI (DII) 분해된 DNA의 분석. DNA를 분해하고, 0.7% 아가로스 겔상에서 분획화하고, 나일론막상에 블롯팅하고, 5' (DI) 및 3' (DII) 프로브와 혼성화시켰다. (8e) PCR에 의한 TWEAK^{-/-} 마우스의 유전자형 분석. 꼬리로부터 유래된 DNA를 네스티드(nested) 외부 및 내부 프라이머 세트를 사용하여 PCR 증폭시킴으로써 야생형 또는 결실-돌연변이체 TWEAK 유전자를 각각 4.3kB 또는 5.3kB 단편으로서 가시화시켰다. (8f) 항-마우스 TWEAK 단클론 항체 (검은색), 또는 동형 대조군 (회색선 및 채워진 영역)을 사용한 FACS에 의해 측정된 바에 따른, TWEAK^{+/+} 및 TWEAK^{-/-} 마우스로부터 유래된 총 지라 특이적 세포에서의 TWEAK 발현. (8g) TWEAK^{+/+}, TWEAK^{+/-} 및 TWEAK^{-/-} 마우스의 지라에서의 TWEAK (흰색 막대), APRIL (검은색 막대), 및 SMT3IP1 (회색 막대) mRNA 발현에 대한 실시간 정량 PCR 분석. 모든 값은 RPL19 RNA 내부 대조군으로 표준화시켰다. 표준 편차는 3회의 반응로부터 산출하였다.

도 9. TWEAK^{-/-} 마우스는 더욱 큰 종양 림프성 침윤을 갖는다. B16.BL6 종양을 1개월된 TWEAK^{+/+} 및 TWEAK^{-/-} 마우스로부터 수거하고, 절개하고, RBC를 용해시켰다. Fc를 차단시킨 후, 절개한 종양 세포를 림프구 계대 마커에 대하여 염색하고 FACS에 의해 분석하였다. 검은색 막대는 지정된 TWEAK^{+/+} 마우스의 종양 림프성 침윤을 나타내고; 흰색 막대는 지정된 TWEAK^{-/-} 마우스의 종양 림프성 침윤을 나타낸다.

도 10. 2개월된 TWEAK^{+/+} 및 TWEAK^{-/-} 마우스의 체중/기관의 중량(gm)을 나타내는 표이다.

도 11은 인간 TWEAK 리간드의 아미노산 서열이다 (서열 1).

도 12는 인간 FN14 수용체의 아미노산 서열이다 (서열 2).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0328]

하기 실시예를 통해 본 발명의 다양한 측면이 추가로 기술되고 설명되되, 하기 실시예는 본 발명의 범주를 제한하고자 하는 것은 아니다.

[0329]

실시예에서 언급하는 상업적으로 이용가능한 시약은, 달리 언급하지 않는 한, 제조사의 지시에 따라

사용되었다. 하기 실시예 및 명세서 전반에서 ATCC 수탁 번호로 나타내어 확인되는 세포의 공급처는 버지니아 주 매나서스 소재의 아메리칸 타입 컬처 컬렉션이다. 달리 언급하지 않는 한, 본 발명은 재조합 DNA 기술의 표준 방법, 예로서, 상기 본원 상기 및 하기 텍스트북, [Sambrook et al., 11 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press N. Y., 1989]; [Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y., 1989]; [Innis et al., *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc., N.Y., 1990]; [Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988]; [Gait, M.J., *Oligonucleotides Synthesis*, IRL Press, Oxford, 1984; R.I. Freshney, *Animal Cell Culture*, 1987]; [Coligan et al., *Current Protocols in Immunology*, 1991])에 기재되어 있는 것을 사용한다.

[0330] **재료 및 기술:**

[0331] **인간 PBMC에서의 TWEAK 및 Fn14의 발현 분석.** 인간 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)는 제조사의 지시에 따라 림프구 분리 배지(Lymphocyte Separation Medium) (ICN)를 사용하여 50ml의 인간 공여체 전혈로부터 분리시켰다. 염증 자극의 존재 및 부재하에서 24시간동안 브레펠딘(Brefeldin) A (5ug/mL)가 존재하는 완전 이스코베스(Iscoves's) 배지에서 세포를 재현탁시켰다. 자극시킨 후, Fc 수용체를 실온에서 20분동안 2ug/mL의 Fc 블록(Block)(캘리포니아주 어번에 소재하는 밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec))으로 차단시켰다. 이어서, 실온에서 30분동안 세포를 CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD14, CD20, CD45, CD56, HLA-DR, Lin1 FITC(캘리포니아주 샌호세에 소재하는 BD 바이오사이언스(BD Biosciences)) 및 FN14 (e-바이오사이언스(e-Biosciences))에 형광-접합된 단클론 항체로 표면 염색시키고, 제조사의 지시에 따라 BD FACS 용해액으로 처리하고, -70°C에서 밤새도록 저장하였다.

[0332] 세포를 투과화시키고, 실온에서 30분동안 TWEAK (e-바이오사이언스)에 대해 염색시켰다. 세척한 후, 세포를 FACS 캘리버(Calibur)(BD 바이오사이언스)상에서 분석하였다.

[0333] **TWEAK-결합된 마우스의 생성.** 제1 및 5개 모두의 하류 엑손을 포함하고 있는 2.5kb의 TWEAK 유전자를 PGK-*neo* 카세트에 대체시킴으로써 *TNLOX1-3* 벡터 [Gerber et al., Development, 126:1149-1159(1999)]에 기초하여 TWEAK 표적 벡터를 작제하였다. 상기 작제물은 마우스 게놈으로부터 유래된 2개의 DNA 스트레치: TWEAK의 6번째 및 7번째 엑손 및 TWEAK의 엑손 하나의 일부분을 포함하고 있고, *neo* 카세트의 5'에 위치하고 있는 3.1-kb의 단편, 및 PGK-*neo* 카세트의 3'에 위치하는 제1 및 제2 *SMT3IP1* 엑손을 포함하는 4.1-kb의 단편을 포함하였다.

[0334] R1 배아줄기 세포 [Nagy et al., Gene Targeting: A Practical Approach, A. L. Joyner, ed., Oxford University Press, Oxford, England, pp. 147-179 (1993)]는 전기천공에 의해 선형 벡터로 형질감염시키고, 5'- 및 3'-특이 DNA 프로브를 사용하여 서던 블롯 분석에 의해 예측되는 재조합 이벤트의 존재에 대하여 G418-내성 클론을 선별하였다 (도 8에 나타냄). 2개의 독립적인 TWEAK -/- 세포주를 C57BL/6 낭배내로 미세주사하였다. 키메라 수컷과 C57BL/6 암컷을 교배시켜 생성된 마우스내 생식세포주 전달은 외피 색상에 의해 검출하고, 하기의 외부 (E) 및 내부 (I) 프라이머 세트: E 전향, TGCCCTAAGCCAGTCTACACCCAGTATTCCTTC (서열 3); E 역향, TGGCCTGAAGAAATGCTCACACTATCACCAAC (서열 4); I 전향, CTTAGAACCCAGCGTAGGAAGGATT (서열 5); 및 I 역향, GTGCCAGGCGCTCCAGTACATACAA (서열 6)를 사용하여 2-단계 게놈 PCR에 의해 확인하였다 (도 8).

[0335] TWEAK 녹아웃 동물을 C57BL/6 배경에 대하여 최소 6회에 걸쳐 역교배시켰다.

[0336] **APRIL, TWEAK, 및 SMT3IP1 mRNA 발현 연구**

[0337] 정량적 RT-PCR에 의한 수개의 조직 분석을 통해, TWEAK-/- 마우스는 TWEAK 전사체를 발현시키지 못하는 반면, 2개의 근접한 유전자, APRIL 및 SMT3IP1의 mRNA 발현은 녹아웃에서 변경되지 않았음이 입증되었다 [Varfolomeev et al., Mol. Cell. Biol., 24:997-1006 (2004)]; 도 9.

[0338] **유세포 측정 분석.** 철망 스크린(wire mesh screen) 및 주사기로부터의 고무 마개를 사용하여 분리된 조직을 해리시킴으로써 8주령된 마우스로부터 조직 기관으로부터의 단세포 현탁액을 획득하였다. 단세포 현탁액을 Fc 차단 항체 (2ug/mL, BD 바이오사이언스)와 함께 인큐베이션시킨 후, 실온에서 30분동안 B220, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD19, CD45, DX5, Lin1 FITC(캘리포니아주 샌호세에 소재하는 BD 바이오사이언스), CD161, 및 F4/80 (e-바이오사이언스)에 대하여 게통-특이적 접합된 단클론 항체로 염색시켰다. 표면을 염색시킨 후, 제조사의 지시에 따라 ACK 용해 버퍼(ACK Lysis Buffer)(바이오소스 인터내셔널(Biosource International))로 용해시키고, 남은 세포는 고정시켰다. TRUCount 비드 (BD 바이오사이언스)를 측정용 튜브에 가하였다. 세포-결합 형광을 FACS FACS 캘리버 기기 및 관련된 세포 퀘스트 소프트웨어(Cell Quest software) (BD 바이오사이언스)로

분석하였다.

- [0339] **NK 세포 AICD 분석법.** 인간 PBMC를 100mL의 인간의 전 현혈로부터 분리시키고, 항-TWEAK mAb (CARL-1(e-바이오 사이언스)) 또는 FN14-FC (도 12의 아미노산 1-129를 포함하는 융합 단백질)(제넨테크)의 부재 또는 존재하에서 24시간동안 TNF- α (500ng/mL), LPS (5 μ g/L), 또는 IFN- γ (500ng/mL)를 사용하여 자극시켰다. 자극시킨 후, 밀테니 CD56+ 비드를 사용하여 NK 세포를 분리시키고, [Maecker et al., Cancer Cell, 2:139-148(2002)]에 기재된 바와 같이 서브-G1 DNA 함량을 위해 염색시켰다.
- [0340] **LPS 실험.** 각 군당 10마리의 TWEAK^{-/-} 및 TWEAK^{+/+} 마우스에 LPS(에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*) 055:B5(시그마))를 복강내 (i.p.) 주사하였다. 100mg/kg 내지 10mg/kg 범위의 LPS 투여분을 평균 염수에 용해시켰다. 5일간의 기간동안 매 시간마다 생육성에 대하여 마우스를 모니터링하였다. 각 군당 10마리의 마우스에 30mg/kg LPS를 i.p. 주사하고, 24시간 후 혈액 및 지라를 분리시켜 뮤린 사이토카인 분석을 수행하였다. 브레펠딘 A (5 μ g/mL)의 존재하에서 6시간동안 단세포 현탁액을 인큐베이션시켰다. 상기 인큐베이션의 최종 20분동안 세포를 Fc (2 μ g/mL)(BD 바이오사이언스)로 차단시킨 후, 실온에서 30분동안 계통-특이성의 접합된 단클론 항체, DX5 (NK 세포를 확인하기 위함), CD11b 및 F4/80 (대식세포를 확인하기 위함) 뿐만 아니라, CD45 (공통의 백혈구 항원)로 염색시켰다. 표면을 염색시킨 후, 상기 기술된 바와 같이 RBC를 용해시켰다. 세포를 투과화시키고, IFN- γ , IL-12, 또는 IL-10에 대한 항체로 염색시키고, 세포를 FACS 캘리버 (BD 바이오사이언스)상에서 분석하였다. 4개의 별개의 인간 공여체로부터 PBMC를 분리시켜 인간 사이토카인 분석을 수행하였다. 공여체 PBMC를 16시간동안 1 μ g/mL LPS의 존재하에 또는 부재하에 시험관내에서 인큐베이션시켰다. 자극의 최종 6시간 동안 최종 5 μ g/mL의 세포에 브레펠딘 A를 가하였다. 실온에서 20분동안 인간 PBMC를 Fc (밀테니)로 차단하고, 실온에서 30분동안 표면을 염색시켰다 (CD3, CD56, CD14, CD45; BD 바이오사이언스). 표면을 염색시킨 후, 세포내 염색을 위해 제조사의 지시에 따라 RBC를 용해시켰다. 세포를 고정시키고, 투과화시키고, IFN- γ 또는 IL-12 항체로 염색시키고, FACS 캘리버상에서 분석하였다.
- [0341] **STAT-1 활성 분석법.** 각각 밀테니 CD56+ 및 CD11b+ 비드를 사용하여 인간 공여체 지라로부터 NK 세포 및 대식세포를 분리시켰다. 1.0×10^6 개의 NK 세포/0.5mL를 1.0×10^6 개의 대식세포/0.5mL 대식세포-SFM 배지 (인비트로 겐(Invitrogen))와 함께 공-형질감염시켰다. 12시간동안 무혈청 배지에서 세포를 정지시키고, 1 μ g/mL LPS로 자극시켰다. 12시간 후, 세포를 CD56 및 CD11b에 대해 표면 염색시킨 후, 페레즈(Perez) 및 놀란(Nolan)에 의해 개략적으로 설명된 바와 같이 포스포-STAT-1에 대하여 세포내 염색시켰다 ([Krutzik et al., Clin. Immunol., 110:206-221 (2004)]; [Perez et al., Meth. Mol. Biol., 263:67-94 (2004)]; [Perez and Nolan, Nat. Biotechnol., 20:155-162 (2002)]).
- [0342] **NF- κ B 분석.** 각각 밀테니 CD56⁺ 및 CD11b⁺ 비드를 사용하여 인간 공여체 지라로부터 NK 세포 및 대식세포를 분리시켰다. 각 시점에서 5mL 대식세포-SFM 배지중 5.0×10^6 개의 대식세포를 사용하여 5.0×10^6 개의 NK 세포를 공-형질감염시켰다. TWEAK (100ng/mL) 또는 TNF- α (100ng/mL)로 자극시키기 전에, 세포를 12시간동안 정지시켰다. 용해물 (20 μ g의 총 단백질) 및 면역침전물 (50 μ g의 총 단백질)을 제조사의 지시에 따라 제조하였다 (메사추세츠주 베벌리에 소재하는 셀 시그널링(Cell Signaling)). 추후 면역블롯 및 면역침전에 대한 모든 항체를 셀 시그널링으로부터 구입하고, 그의 프로토콜에 따라 실험을 수행하였다.
- [0343] **조직구조 및 면역학적 조직구조.** 3, 6, 및 12개월된 수컷 TWEAK^{-/-} 및 TWEAK^{+/+} 마우스의 조직의 중량을 측정하고, 고정시키고, 절개하고, 병적 상태에 대하여 분석하였다. 헤마톡실린 및 에오신-염색된 단면을 조직학적 이상에 대하여 육안으로 분석하였다. 피넛 어글루티닌(peanut agglutinin)(캘리포니아주 벵링엄에 소재하는 벡터 리서치(Vector Research))-염색된 냉동 단면을 배중심의 구조에 대하여 분석하였다. 12개월된 수컷 마우스로부터 유래된 5개의 TWEAK^{-/-} 및 TWEAK^{+/+} 지라를 해리시키고, 염색하고, 제조사의 지시에 따라 TruCount 비드 (BD 바이오사이언스)를 사용하여 림프구 세포 충실성(Cellularity)에 대하여 측정하였다.
- [0344] **B16 흑색종 실험.** 10마리의 TWEAK^{-/-} 및 TWEAK^{+/+} 마우스의 우측 뒤쪽 옆구리에 $0.1-0.5 \times 10^6$ 개의 세포/0.1 mL 멸균 염수를 피하 (s.c.) 주사하였다. 매일 마우스를 모니터링하고, 4주 (B16.BL6 연구) 또는 6주 (B16.F10 연구)동안 이틀에 한번 종양을 측정하였다. 연구 종결시, 종양을 제거하고, 질량을 측정하고, 철망 스크린을 통해 먼저 해리시킨 후, 5분동안 비-효소적 세포 해리 완충액 (시그마)으로 처리하여 단세포 현탁액을 제조하였다. 지라 특이세포를 종양-주사된 마우스로부터 생성하고, 세포내 사이토카인 생산을 측정하기 위하여 12시간 동안 브레펠딘 A의 존재하에서 멸균 염수 또는 종양 세포 현탁액과 함께 공-인큐베이션시켰다.

[0345]

실험 결과:

[0346]

다양한 조혈 조직에서의 TWEAK 발현은 앞서 보고된 바 있지만 ([Chicheportiche et al., 상기 문헌]; [Marsters et al., 상기 문헌]), TWEAK를 발현시킨다고 앞서 보고된 바 있는 유일한 림프계 세포는 단핵구이다 [Nakayama et al., J. Exp. Med., 192:1373-1380 (2000)]. TWEAK의 면역학적 표적을 추가로 밝히기 위하여, 다수의 림프성 군집을 다양한 염증 자극 후의 TWEAK 및 그의 수용체, FN14의 발현에 대하여 분석하였다 (도 1a 및 1b).

[0347]

TWEAK 및 그의 수용체, FN14는 선천성 면역계의 세포에 의해 발현되는 것으로 나타났다 (도 1 참조). 오직 NK 세포, 대식세포, 및 수지상 세포만이 TWEAK (도 1a) 및 그의 수용체, FN14 (도 1b)를 발현시키는 것으로 나타났다. 추가로, 수용체 및 리간드 양자 모두의 표면 발현은 IFN-감마 또는 PMA의 자극 후에 상향조절되었다. NKT 세포는 TWEAK를 발현시키지만, FN14는 발현시키지 못했고, IFN-감마 또는 PMA에 의해서도 상향조절되지 못했다. T 및 B 세포를 비롯한, 다른 림프계 세포 타입은 유의적 수준으로 TWEAK 또는 FN14를 발현시키지 못했다 (데이터로 나타내지 않음).

[0348]

생체내 TWEAK의 생물학적 역할을 조사하기 위하여, TWEAK 유전자 녹아웃 마우스를 제작하였다 (도 8). 상세한 해부학적 분석 및 조직학적 분석은 TWEAK^{-/-} 마우스의 비-림프계 조직에서의 임의의 유의적 이상을 제시하지 못했다 (도 10). 그러나, 조혈 조직의 분석을 통해서는 TWEAK^{-/-} 마우스가 연령에 따라 매치된, 야생형의 한배새끼와 비교할 때 현저하게 더 많은 NK 세포를 갖는 것으로 밝혀졌다 (도 2a). 이러한 증가는 지라, 파이어판, 림프절, 및 말초 혈액을 비롯한 2차 림프계 기관에서 뚜렷이 나타났고 (도 2a), 암컷 (도 2a, 하단)보다는 수컷 (도 2a, 상단)에서 더욱 컸다. 그의 NK 갯수의 증가와는 대조적으로, TWEAK^{-/-} 마우스는 정상 수준의 NKT 세포 (도 2b) 뿐만 아니라, CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포, B 세포, 대식세포, 수지상 세포, 과립구, 및 혈소판 (데이터로 나타내지 않음)을 나타내었다. TWEAK^{-/-} 및 야생형 마우스의 골수에서의 NK 세포의 양은 유사하였고 (도 2c), 이는 NK 계수의 증가는 NK 세포 발생 변화에 의해 유발될 수 없음을 제시한다 [Kim et al., Nat. Immunol., 3:523-528 (2002)]. 다르게는, 활성화-유도된 세포 사멸 (AICD)에 의한 NK 세포의 손상된 제거는 TWEAK 부재하에서 NK를 축적시킬 수 있다. 인간 말초 혈액으로부터 NK 세포를 분리시키고, TWEAK 중화제 그의 AICD에 대한 감수성에 미치는 효과에 대하여 조사하였다 (도 2d). 가용성 FN14-FC 미끼(decoy) 수용체 또는 TWEAK-중화항체에 의한 TWEAK 저해는 NK 세포를 TNF-알파, LPS, 또는 IFN-감마에 의한 AICD의 자극으로부터 현저하게 보호하였고, 이는 AICD를 통한 불충분한 NK 결실 때문에 NK 세포가 TWEAK^{-/-} 마우스에서 축적될 수 있다는 것을 시사한다.

[0349]

생체내 선천성 면역 반응을 위한 TWEAK의 중요성을 측정하기 위하여 전신 챌린지의 확립된 모델을 치사량의 그람-음성 세균성 내독소 지질다당질 (LPS)을 사용하여 연구하였다 (도 3a). TWEAK^{-/-} 마우스는 광범위한 LPS 투여량 범위에 걸쳐 야생형 대조군보다도 더욱 LPS-유도성 사멸에 대하여 감수성이었고, 이는 더욱 강력한 선천성 염증 반응은 TWEAK의 부재하에서 발생한다는 것을 시사한다. LPS-주사받은 마우스의 말초 혈액 및 지라로부터 분리된 TWEAK^{-/-} NK 세포 및 대식세포는 야생형 세포와 비교할 때 더욱 많은 INF-감마 및 IL-12를 생산하였고 더욱 적은 IL-10을 생산하였다 (도 3b). 유사하게, TWEAK의 항체 중화는 LPS 자극 후, 인간 말초 혈액 NK 세포 및 대식세포에 의한 INF-감마 및 IL-12의 생산을 증가시켰다 (도 3c). 따라서, TWEAK^{-/-} 마우스에서는 NK 세포의 갯수가 증가하였고, 그의 NK 세포 및 대식세포는 더욱 많은 IFN-감마 및 IL-12를 생산하여 추가로 염증 반응을 촉진시키기 때문에, TWEAK^{-/-} 마우스가 LPS에 과민성인 것으로 여겨진다 ([D'Andrea et al., J. Exp. Med., 178:1041-1048 (1993)]; [Emoto et al., J. Immunol., 169:1426-1432 (2002)]; [Heremans et al., Eur. J. Immunol., 24:1155-1160 (1994)]). 이러한 결과는, TWEAK가 선천성 염증 반응을 감쇄시키는 작용을 한다는 것을 시사한다. TWEAK의 부재가 선천성 면역 세포에 의해 IFN-감마 및 IL-12의 생산을 촉진시킬 수 있는 방법을 조사하기 위하여, 병원체에 대한 반응시 NK 세포에서는 IFN-감마의 발현을, 및 대식세포에서는 IL-12의 발현을 유도하는데 중요한, 전사의 신호 전달자 및 활성화자(STAT-1)의 활성을 연구하였다 ([Marodi et al., Clin. Exp. Immunol., 126:456-460 (2001)]; [Morrison et al., J. Immunol., 172:1825-1832 (2004)]; [Nelson et al., J. Immunol., 156:3711-3720 (1996)]; [Varma et al., Clin. Diag. Lab Immunol., 9:530-543 (2002)]). TWEAK 중화는 NK 세포 및 대식세포에서 기본 STAT-1 인산화를 증가시켰고, 추가로 이들 세포에서의 LPS에 의한 STAT-1의 자극을 증진시켰다 (도 4a). 따라서, IFN-감마 및 IL-12 생산에 대한 TWEAK의 억제에 도움이 되는 하

나의 기작은 STAT-1 활성화의 감쇄일 수 있다.

[0350]

선천성 염증 반응을 증강시키는데 중요한 역할을 하는 사이토카인인 TNF-알파는 정규 NF- κ B1 경로의 활성화를 통해 IFN-감마 및 IL-12 (뿐만 아니라, 다른 면역 조절 유전자)의 발현을 유도한다 ([Bonizzi and Karin, Trends Immunol., 25:280-288 (2004)]; [Chen and Greene, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 5:392-401 (2004)]; [Chen et al., J. Immunol., 166:270-276 (2001)]; [D'Andrea et al., J. Exp. Med., 178:1041-1048 (1993)]; [Zhong et al., Mol. Cell, 9:625-636 (2002)]). TNF-알파는 p65/RelA NF- κ B1 서브유니트의 일시적인 인산화를 유도하여 p50 서브유니트와 그를 결합시키고, 생성된 이형(heteromeric) 복합체의 핵 전위를 일으킨다. 핵에서, p65/p50 이중이량체는 p300/CBP 전사 공-활성자와의 결합을 통해 하류의 표적 유전자, 예로서, IFN-감마 및 IL-12를 트랜스활성화시킨다 ([Chen and Greene, 상기 문헌]; [Chen et al., J. Immunol., 166:270-276 (2001)]; [Chen et al., Immunology, 107:199-208 (2002)]; [Kiernan et al., J. Biol. Chem., 278:2758-2766 (2003)]; [Zhong et al., 상기 문헌]). 다르게는, NF- κ B1은, 표적 유전자의 전사를 억제시키는 히스톤 디아세틸라제 (HDAC) -1, -2, 또는 -3과 상호작용할 수 있다 ([Ashburner et al., Mol. Cell Biol., 21:7065-7077 (2001)]; [Kiernan et al., J. Biol. Chem., 278:2758-2766 (2003)]; [Quivy and Van Lint, Biochem. Pharmacol., 68:2507-2515 (2004)]; [Rahman et al., Biochem. Pharmacol., 68:1255-1267 (2004)]; [Zhong et al., 상기 문헌]). TNF-알파는 정규 NF- κ B1 경로를 선택적으로 활성화시키는 반면, TWEAK는 정규 NF- κ B1 (Chicheportiche et al., 상기 문헌; Marsters et al., 상기 문헌; Saitoh et al., 상기 문헌) 및 비-정규 NF- κ B2 서브유니트 [Saitoh et al., 상기 문헌] 양자 모두의 핵 전위를 촉진시킬 수 있는 것으로 보인다.

[0351]

TWEAK는 또한 NF- κ B1의 전사 상호작용을 조절함으로써 유전자 발현에 영향을 줄 수 있는지 여부를 조사하기 위하여, 인간 지라 NK 세포 및 대식세포에서 p65 NF- κ B1의 인산화에 대하여 TWEAK 및 TNF-알파가 미치는 효과를 비교하였다 (도 4b). 0.5시간째 검출가능한, 일시적인 p65 변형을 유발하는 TNF-알파와는 달리, TWEAK는 0.25시간째 출발하여 8시간동안 지속된, 장기간의 p65 인산화를 유도하였다. 이어서, 자극받은 세포로부터의 p65 NF- κ B1을 면역침전시키고, 면역블롯 분석에 의해 p300 또는 HDAC-1과의 결합에 대하여 조사하였다 (도 4c). TNF-알파는 HDAC-1이 아닌 p300과 p65와의 강한 상호작용을 유도한 반면, TWEAK는 p300이 아닌 HDAC-1과 p65와의 강력한 결합을 유도하였다. 따라서, TWEAK는 STAT-1 활성화를 저해하는 것 이외에도, NF- κ B1과 HDAC-1의 상호작용을 촉진시킴으로써 IFN-감마 및 IL-12의 전사를 억제시킬 수 있다. NK 세포에 의한 IFN-감마 생산 및 대식세포에 의한 IL-12 생산에 대하여 TWEAK가 미치는 저해 효과는 HDAC 저해성 트리코스타틴(Trichostatin) A에 의해 반복되었다 (데이타로 나타내지 않음).

[0352]

TWEAK 결실이 면역계 발생을 변경시키는지 여부를 조사하기 위하여, 3, 6 및 12개월된 (연령) TWEAK^{-/-} 마우스 및 야생형 한배새끼의 림프구양 조직을 비교하였다 (도 5). 6개월까지 TWEAK^{-/-} 마우스의 지라 및 림프절은 대조군과 비교할 때 현저히 비대해진 것으로 보였으나 (도 5a, 5b), 흉선 및 간에 있어서는 차이가 없었다 (데이타로 나타내지 않음). 조직학적 평가에서 볼 때, 림프절과 같이 TWEAK^{-/-} 지라는 정상적인 배종심 형성을 가졌고, 암은 없었다 (도 5c). 그러나, 지라의 면역조직화학적 염색에서는 연령에 따라 매치된 한배새끼와 비교해 볼 때 12개월된 TWEAK^{-/-} 마우스에서 항-CD3 항체와 더욱 강력한 신호를 나타내었고, 이는 T 세포 구획이 확대되었음을 시사한다. 성숙 TWEAK^{-/-} 마우스에 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포 양자 모두가 현저히 더욱 풍부하게 존재하였음을 FACS 분석을 통해 확인하였다 (도 5d). 지라 NK 세포 갯수 또한 증가한 반면, B 세포, 대식세포, 과립구 또는 혈소판의 양은 유사하였다 (데이타로 나타내지 않음). NK 세포가 단지 적은 비율로만 지라 세포를 포함한다면, TWEAK 부재하에서 주로 T 세포 구획의 확대에 의해 지라 크기가 비대해 질 수도 있다. TWEAK^{-/-} 마우스에서 기억 T 세포의 현저한 증가 및 T_H1-특이 전사 인자 T-bet의 발현에 대하여 양성인 T 세포의 현저한 증가는 추가의 분석을 통해 입증되었다 (도 5e). 이러한 결과는 TWEAK가 적응 T_H1 면역 프로파일의 발생을 저해하는 작용을 한다는 것을 시사한다. 추가로, TWEAK가 적응 면역으로의 전이를 조절하는데 관여하는 것을 평가하기 위하여, 유전적 동계 마우스 C57 블랙 6 B16 흑색종 세포에 기초하여 항-종양 면역의 확립된 모델을 연구하였다 ([Yang et al., Int. J. Cancer, 105:512-519 (2003)]; [Yang et al., Cell. Immunology, 179:84-95 (1997)]; [Yei et al., Gene Ther., 9:1302-1311 (2002)]). 상기 모델에서, NK 세포 및 이펙터 T 세포 양자 모두는 종양 거부에 중요하다 ([Prevost-Blondel et al., Eur. J. Immunol., 30:2507-2515 (2000)]; [Turk et al., J. Exp. Med., 200:771-782 (2004)]; [Yang et al., Int. J. Cancer, 105:512-519 (2003)]; [Yang et al., Cell. Immunol., 179:84-95 (1997)]; [Yei et al., Gene Ther., 9:1302-1311 (2002)]). 먼저, B16 세포주의 중등

침윤성 B16.F10 서브클론으로 마우스를 켈린지시켰다 (도 6). TWEAK^{-/-} 마우스는 B16.F10 종양의 확립 및 성장에 완전하게 저항한 반면, 야생형 동물에서는 앞서 보고된 데이터에서와 유사한 속도로 종양이 성장하였다 (도 6a 및 6b) [Yei et al., 상기 문헌]. 어떤 면역학적 차이가 종양 거부에 있어 상기와 같이 현저한 상이함을 유발할 수 있는지를 규정짓기 위해, B16.F10-주사받은 마우스의 지라 림프구 군집을 분석하였다 (도 6c). 기타 관찰된 것과 일관되게, TWEAK-결핍된 동물은 야생형 대조군보다 더욱 많은 NK 세포를 가졌다. 놀랍게도, 검출 가능한 종양은 부족하고, 이로써 풍부한 종양-관련 항원은 존재하지 않음에도 불구하고, TWEAK^{-/-} 마우스는 대조군과 비교하여 현저히 확대된 CD8⁺ T 세포를 나타내었다. 상기 관찰과, 성숙 TWEAK^{-/-} 마우스에서 기억 T 세포가 증가되었다는 관찰을 함께 고려해 볼 때, TWEAK의 부재는 가능하게는, 더욱 높은 수준의 IFN-감마 및 IL-12이 존재하에서 촉진되는 더욱 강한 T 세포 프라이밍을 통해 종양-유도된 기억 반응의 증진을 촉진시킬 수 있다고 여겨진다.

[0353]

더욱 침윤성인 B16 흑색종 서브클론, B16.BL6으로 마우스를 다시 켈린지시키고; 1개월째 종양의 평균 중량으로 나타낸 바와 같이, 비록 야생형 대조군과 비교할 때 TWEAK^{-/-} 마우스에서 종양 성장은 현저하게 감소되었지만 종양 이식이 확인되었다 (도 7a). TWEAK^{-/-} 마우스로부터 단리된 종양은 현저히 증가된 림프구 침윤을 나타내었고, 대조군보다 T 및 NK 세포에서 2-8배 더 많았다 (도 9). 종양-수반 TWEAK^{-/-} 마우스는 또한 대조군보다 더욱 비대한 지라를 가졌고 (도 7b), NK 및 T 세포 군집은 확대되었다 (도 7c). 확대된 림프구 군집이 특이적인 항-종양 활성을 포함하는지 여부를 확인하기 위하여, 종양-수반 마우스로부터 지라 특이세포를 단리시키고, B16.BL6 종양 세포로 생체외에서 재-켈린지시키고, 특이 사이토카인을 생산할 수 있는 그의 능력에 대하여 측정하였다. 재-켈린지시 상응하는 야생형 대조군에서보다 TWEAK-결핍된 CD8⁺ T 세포 및 NK 세포는 현저히 더 많은 IFN-감마를 생산한 반면, TWEAK^{-/-} 대식세포는 더욱 많은 IL-12를 생성하였다 (도 7d, 7e). 이들 연구 또한 TWEAK의 부재가 선천성 뿐만 아니라 적응 항종양 면역을 증강시킨다는 것을 입증하였고, 이는 TWEAK가 생리학적으로 양 반응 모두를 억제시키는 작용을 한다는 것을 시사한다. 추가로, TWEAK^{-/-} 마우스에서 T 세포 확대 및 항종양 사이토카인 생산의 증진에 대한 증거는 TWEAK가 선천성-대-적응 경계면을 조절한다는 것을 시사한다.

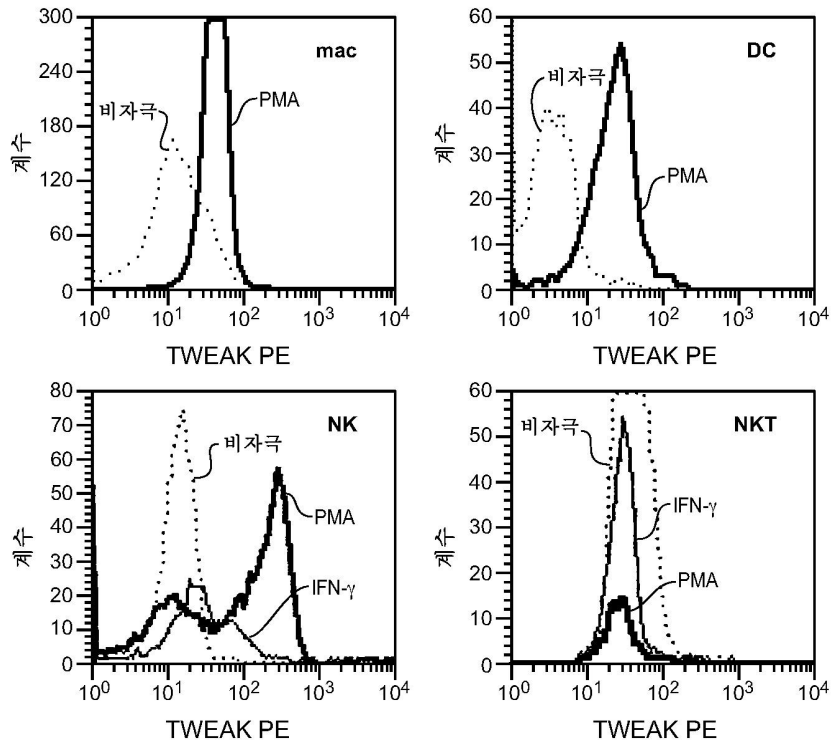
부호의 설명

[0354]

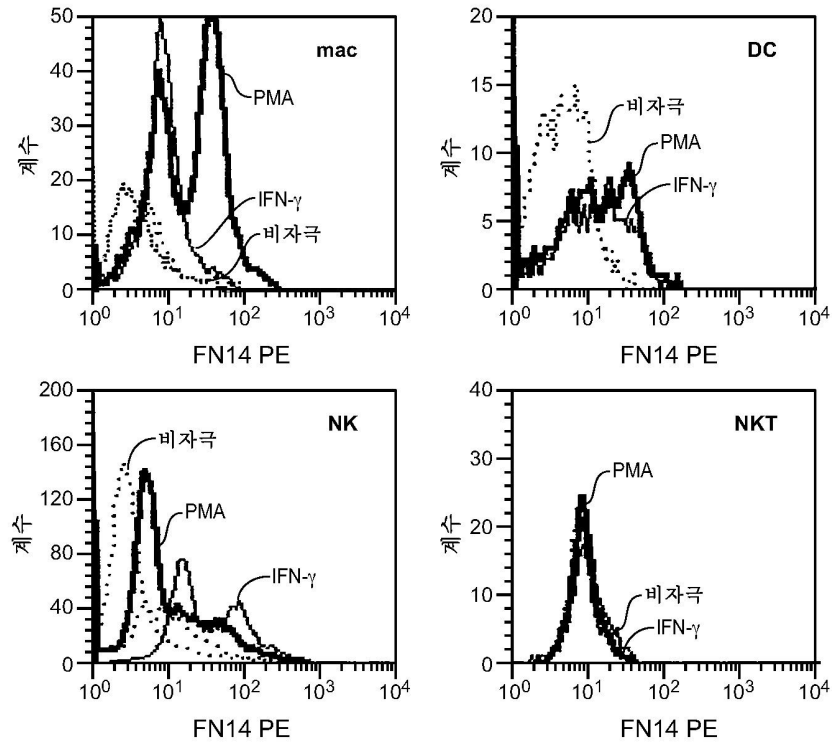
TNF: 종양 괴사 인자

도면

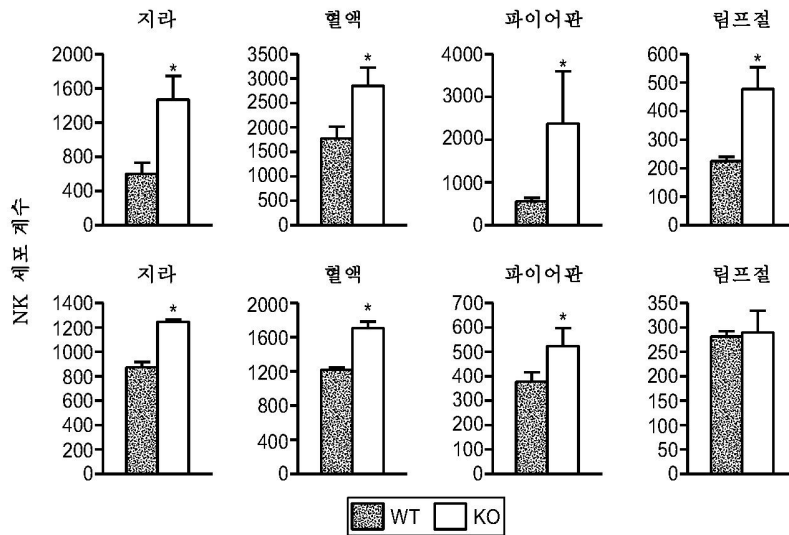
도면1a



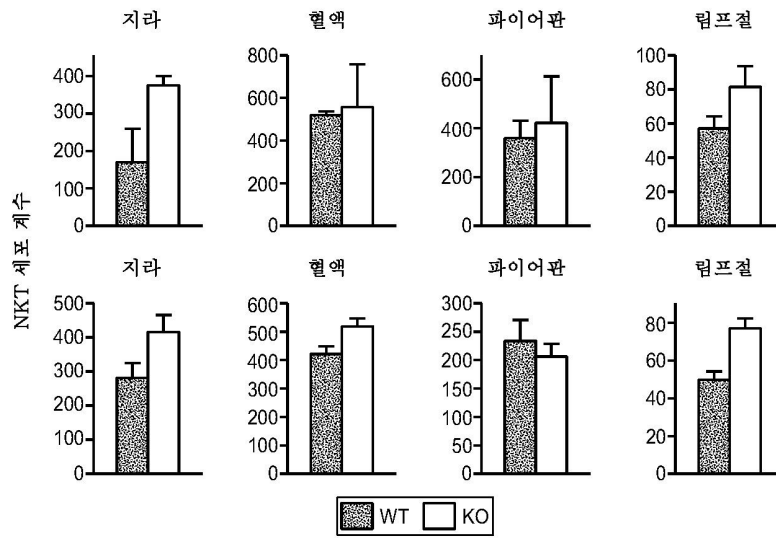
도면1b



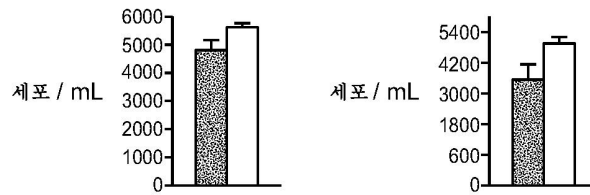
도면2a



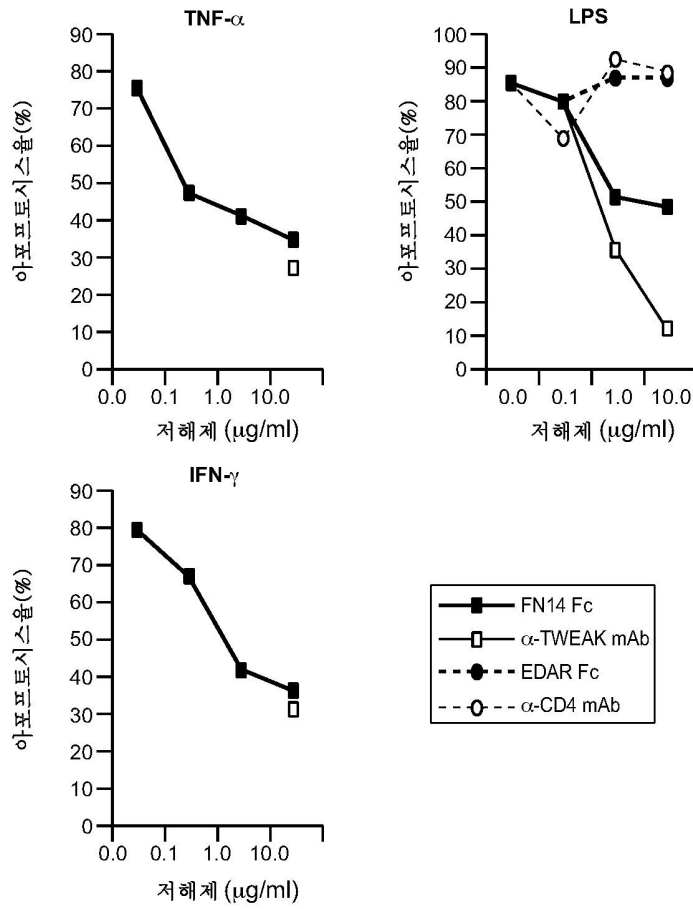
도면2b



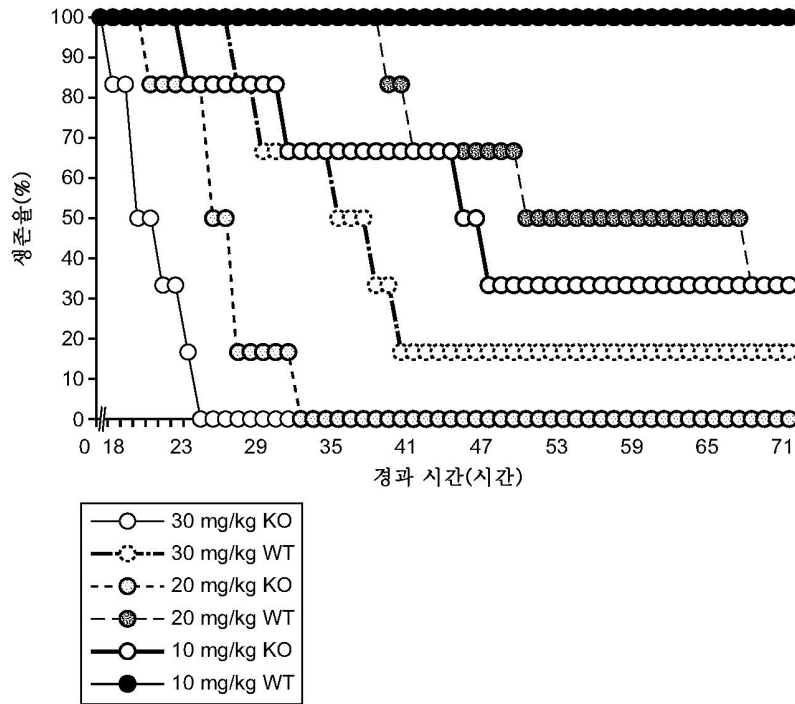
도면2c



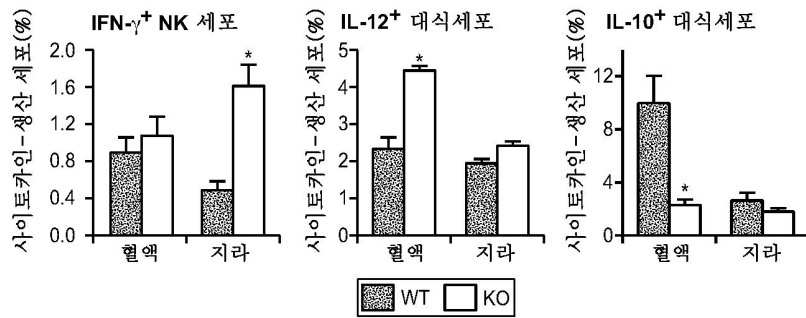
도면2d



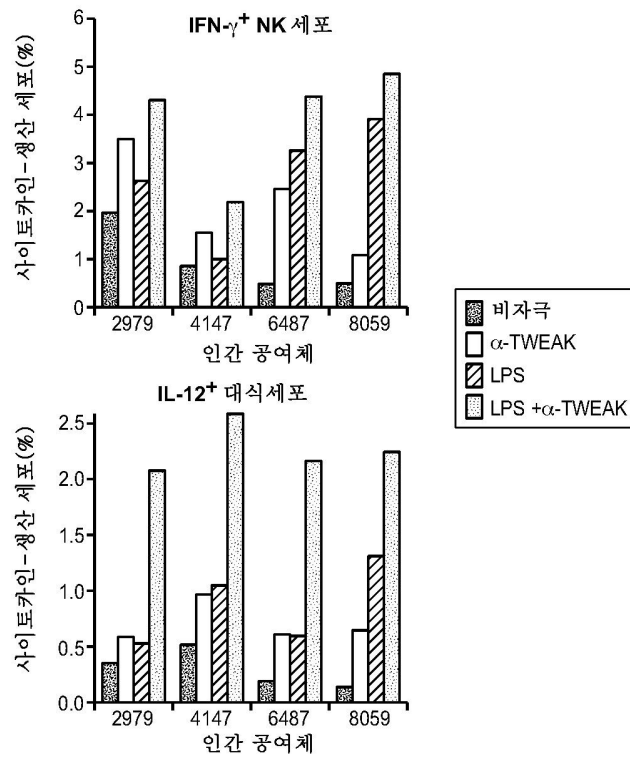
도면3a



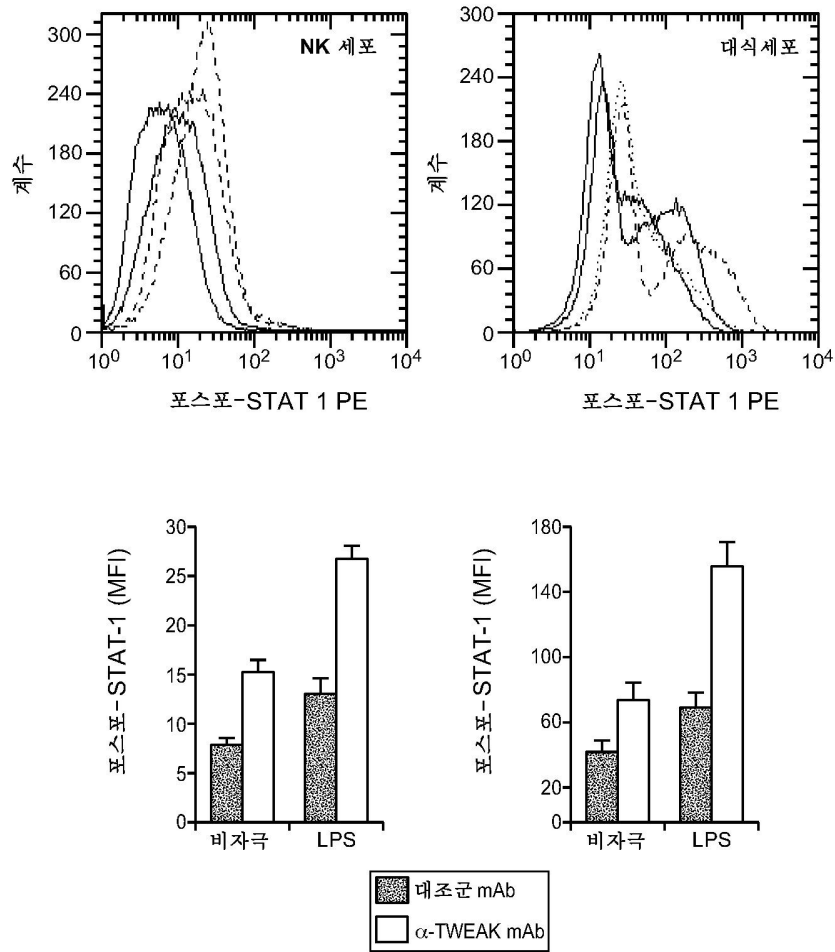
도면3b



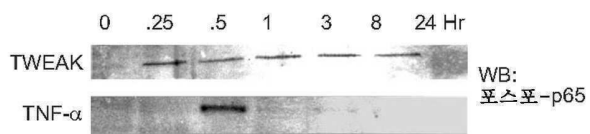
도면3c



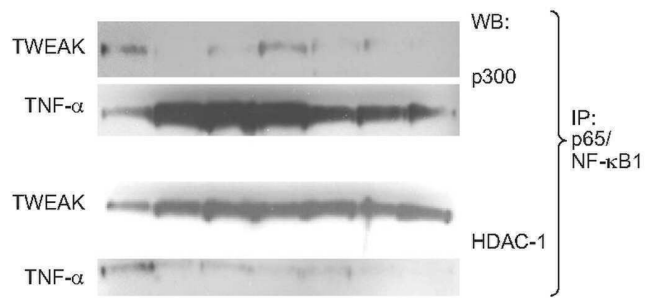
도면4a



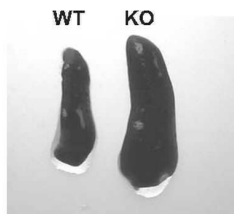
도면4b



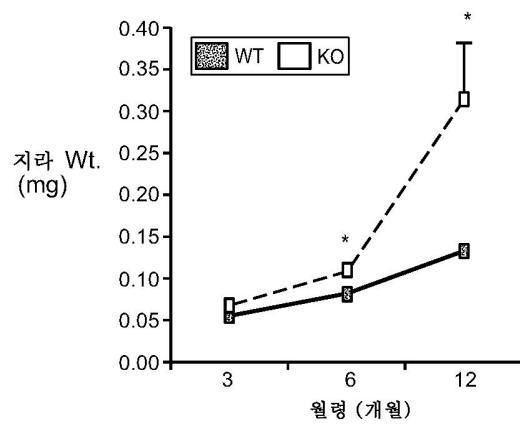
도면4c



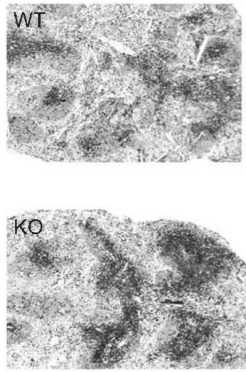
도면5a



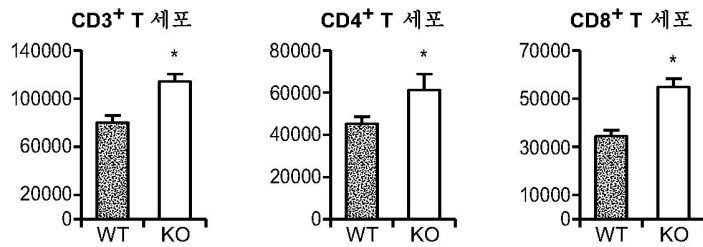
도면5b



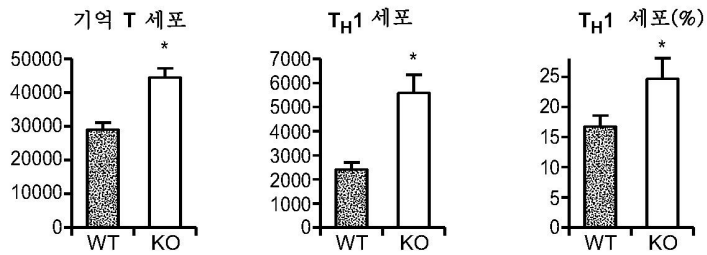
도면5c



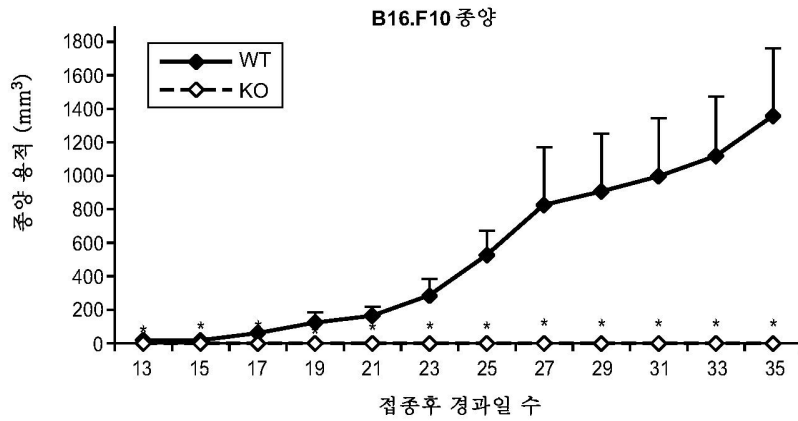
도면5d



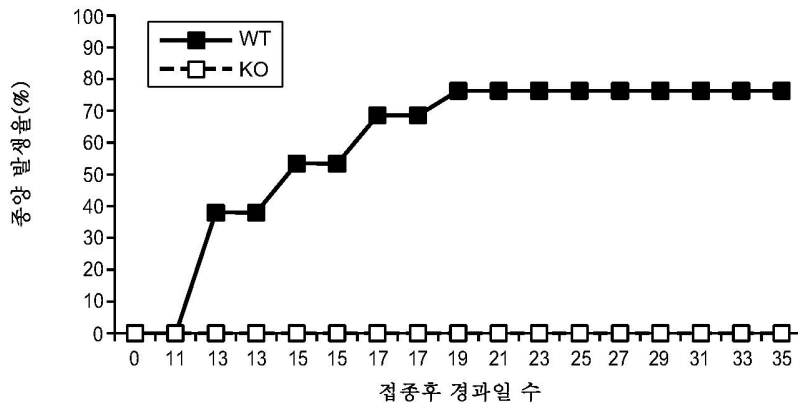
도면5e



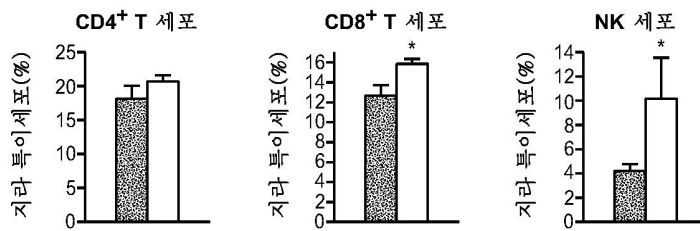
도면6a



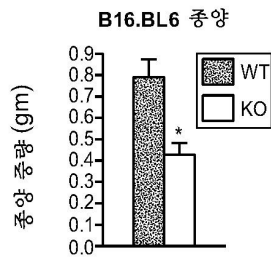
도면6b



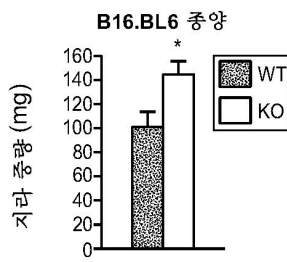
도면6c



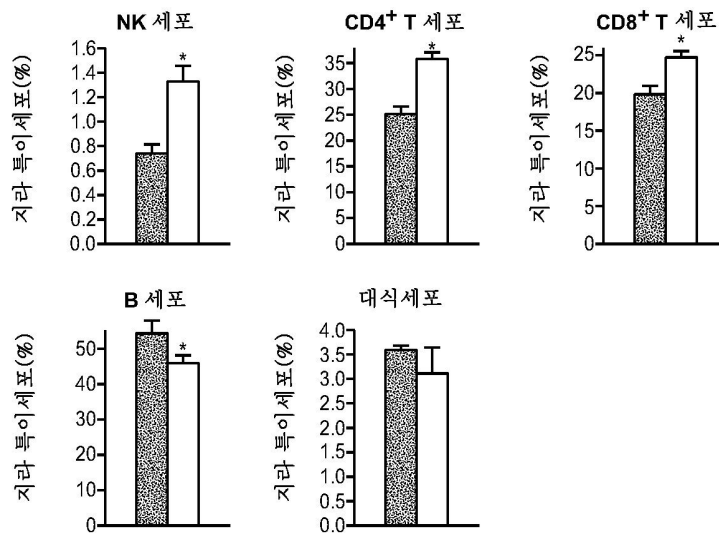
도면7a



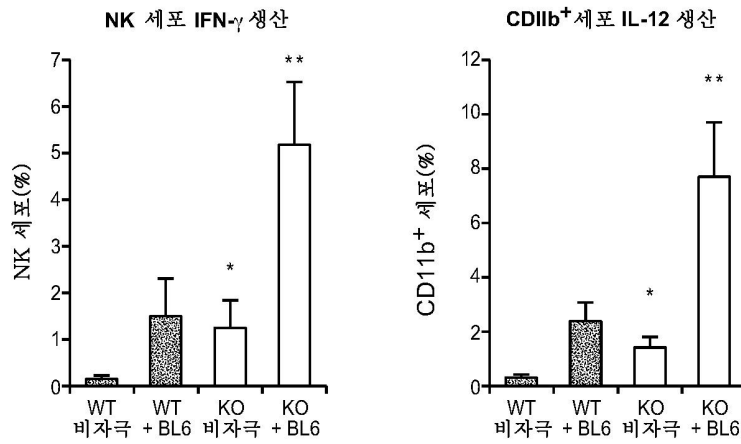
도면7b



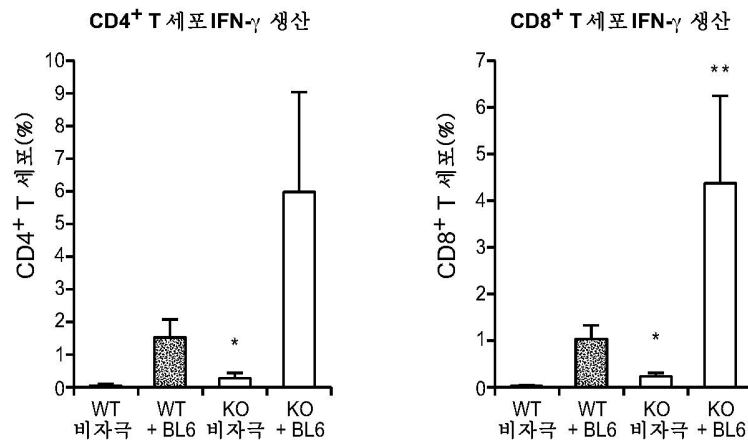
도면7c



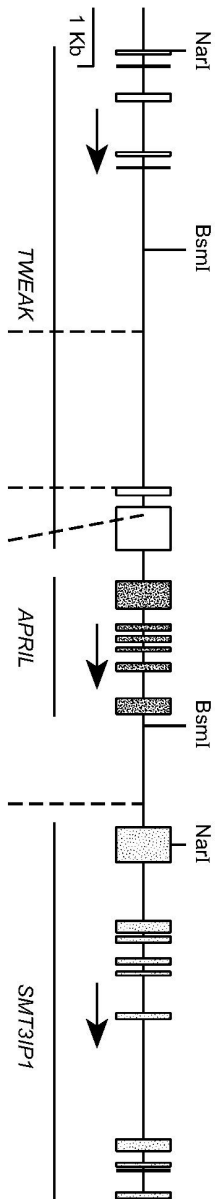
도면7d



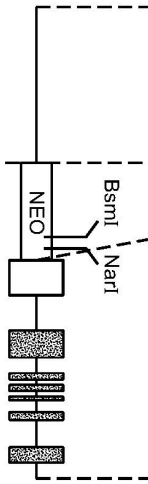
도면7e



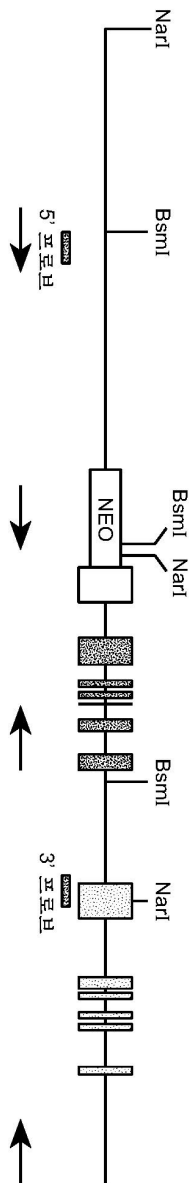
도면8a



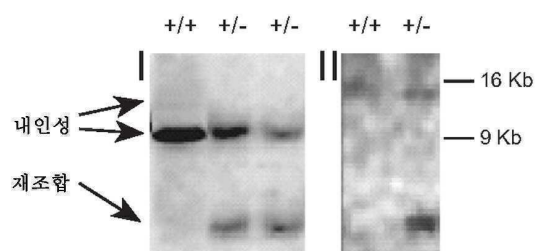
도면8b



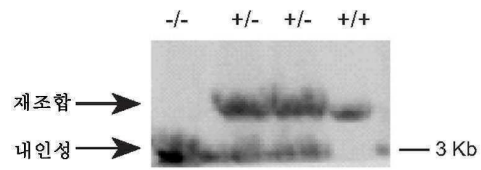
도면8c



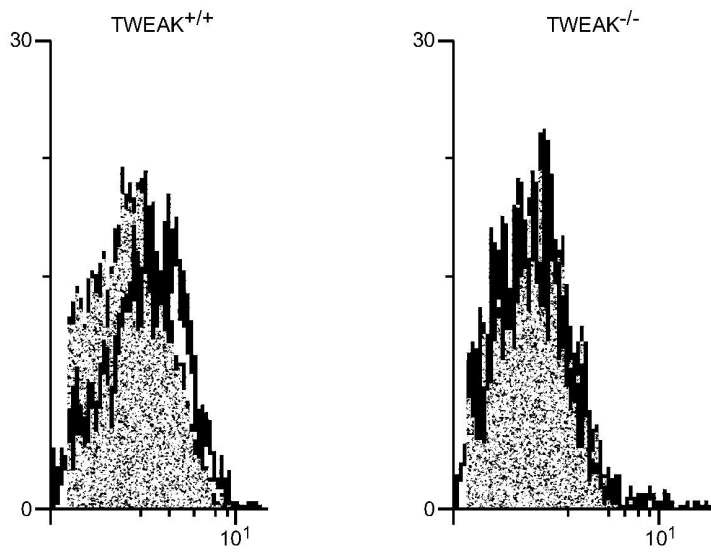
도면8d



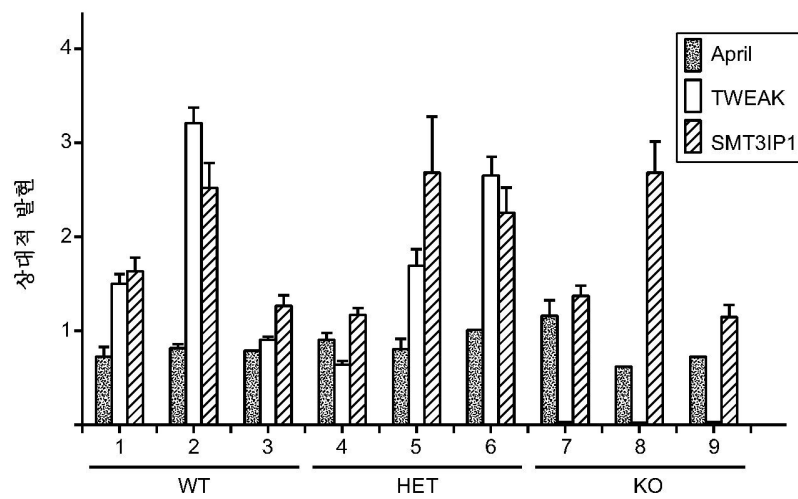
도면8e



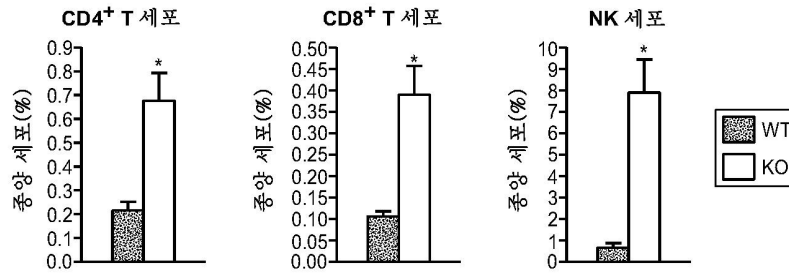
도면8f



도면8g



도면9



도면10

2개월된 TWEAK^{+/+} 및 TWEAK^{-/-} 마우스의 체중/기관의 중량(gm)

유전자형	체중	뇌의 중량	심장의 중량	신장의 중량
KO	22.794±.736	0.442±.004	0.179±.01	0.354±.014
WT	21.854±.1045	0.438±.009	0.171±.008	0.347±.012
p	0.506	0.554	0.601	0.772
유전자형	간의 중량	폐의 중량	흉선의 중량	지라의 중량
KO	1.575±.104	0.367±.06	0.054±.003	0.078±.003
WT	1.352±.072	0.399±.01	0.049±.004	0.071±.0.01
p	0.224	0.71	0.396	0.1

*지정 기관의 IHC 분석에 의해서는 어떠한 조직학적 또는 병적 차이도 관찰되지 않았다.

도면11

인간 TWEAK 아미노산 서열

```

1  MAARRSQRRR  GRRGEPGTAL  LVPLALGLGL  ALACLGLLLA
41  VVSLGSRASL  SAQEPAQEEL  VAEEDQDPSE  LNPQTESQD
81  PAPFLNRLVR  PRRSAPKGRK  TRARRAIAAH  YEVHPRPGQD
121 GAQAGVDGTV  SGWEERARINS  SSPLRYNRQI  GEFIVTRAGL
161 YYLYCQVHFD  EGKAVYLLKD  LLVDGVLALR  CLEEFSAATA
201 SSLGPFQLRLC  QVSGLLALRP  GSSLRIRTLF  WAHLKAAPFL
241 TYFGLFQVH
    
```

도면12

인간 FN14 아미노산 서열

```

1MARGSLRLLRLVLGLWLALLRSVAGEQAPGTAPCSRGSWSADLDKCMDCASCRARPHSDF
CLGCAAAPPAPFRLLWPILGGALSLTFVLGLLSGFLVWRRRCREKFTTPIETGGGCPAVALIQ
    
```

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> GENENTECH, INC.

ASHKENAZI, Avi J.

MAECKER, Heather

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR MODULATEING TWEAK AND

FN14 ACTIVITY

<130> P2223R1 PCT

<140> PCT/US2006/007547

<141> 2006-03-02

<150> US 60/659,339

<151> 2005-03-07

<160> 6

<210> 1

<211> 249

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Pro Gly Thr Ala Leu Leu Val Pro Leu Ala Leu Gly Leu Gly Leu

20 25 30
Ala Leu Ala Cys Leu Gly Leu Leu Leu Ala Val Val Ser Leu Gly

35 40 45
Ser Arg Ala Ser Leu Ser Ala Gln Glu Pro Ala Gln Glu Glu Leu

50 55 60
Val Ala Glu Glu Asp Gln Asp Pro Ser Glu Leu Asn Pro Gln Thr

65 70 75
Glu Glu Ser Gln Asp Pro Ala Pro Phe Leu Asn Arg Leu Val Arg

80 85 90

Pro Arg Arg Ser Ala Pro Lys Gly Arg Lys Thr Arg Ala Arg Arg
95 100 105

Ala Ile Ala Ala His Tyr Glu Val His Pro Arg Pro Gly Gln Asp
110 115 120

Gly Ala Gln Ala Gly Val Asp Gly Thr Val Ser Gly Trp Glu Glu
125 130 135

Ala Arg Ile Asn Ser Ser Ser Pro Leu Arg Tyr Asn Arg Gln Ile
140 145 150

Gly Glu Phe Ile Val Thr Arg Ala Gly Leu Tyr Tyr Leu Tyr Cys

155 160 165

Gln Val His Phe Asp Glu Gly Lys Ala Val Tyr Leu Lys Leu Asp
170 175 180
Leu Leu Val Asp Gly Val Leu Ala Leu Arg Cys Leu Glu Glu Phe
185 190 195
Ser Ala Thr Ala Ala Ser Ser Leu Gly Pro Gln Leu Arg Leu Cys
200 205 210
Gln Val Ser Gly Leu Leu Ala Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu Arg
215 220 225

Ile Arg Thr Leu Pro Trp Ala His Leu Lys Ala Ala Pro Phe Leu
230 235 240
Thr Tyr Phe Gly Leu Phe Gln Val His
245

<210> 2

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Arg Gly Ser Leu Arg Arg Leu Leu Arg Leu Leu Val Leu
1 5 10 15
Gly Leu Trp Leu Ala Leu Leu Arg Ser Val Ala Gly Glu Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Thr Ala Pro Cys Ser Arg Gly Ser Ser Trp Ser Ala Asp
35 40 45
Leu Asp Lys Cys Met Asp Cys Ala Ser Cys Arg Ala Arg Pro His
50 55 60
Ser Asp Phe Cys Leu Gly Cys Ala Ala Ala Pro Pro Ala Pro Phe
65 70 75
Arg Leu Leu Trp Pro Ile Leu Gly Gly Ala Leu Ser Leu Thr Phe
80 85 90
Val Leu Gly Leu Leu Ser Gly Phe Leu Val Trp Arg Arg Cys Arg
95 100 105
Arg Glu Lys Phe Thr Thr Pro Ile Glu Glu Thr Gly Gly Gly Cys

110	115	120
Pro Ala Val Ala Leu Ile Gln		
125		
<210> 3		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Sequence is synthesized		
<400> 3		
tgccctaagc cagtctacac ccagtattcc ttc 33		
<210> 4		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Sequence is synthesized		
<400> 4		
tggcctgaaa gaaatgctca cactatcacc aac 33		
<210> 5		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Sequence is synthesized		
<400> 5		
cttagaacca gccgtaggaa ggatt 25		
<210> 6		
<211> 25		
<212> DNA		
<213> Artificial sequence		
<220><223> Sequence is synthesized		
<400> 6		
gtgccagggc gtccagtaca taaaa 25		