



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년12월26일
(11) 등록번호 10-1215218
(24) 등록일자 2012년12월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/00 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2006-7001366
(22) 출원일자(국제) 2004년07월20일
심사청구일자 2009년07월20일
(85) 번역문제출일자 2006년01월20일
(65) 공개번호 10-2006-0054329
(43) 공개일자 2006년05월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/023143
(87) 국제공개번호 WO 2005/010048
국제공개일자 2005년02월03일
(30) 우선권주장
60/489,032 2003년07월22일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02001044291 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
바이엘 파마 악티엔게젤샤프트
독일 베를린 플레르스트라쎄 178 (우편번호 :
데-13353)
(72) 발명자
하르킨스, 리차드
미국 94502 캘리포니아주 알라메다 씨 뷰 파크웨
이 2819
파케스, 데보라
미국 94541 캘리포니아주 헤이워드 햄튼 플레이스
19050
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영, 장수길

전체 청구항 수 : 총 34 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 RG 1 항체 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 RG1 폴리펩티드에 대하여 지시된 항체 및 그의 항원 결합성 항체 단편에 관한 것이다. 추가로, 본 발명은 상기 항체 및 그의 항체 단편을 진단 및 치료 용도로 이용하는 방법에 관한 것이다.

(72) 발명자

패리, 고든

미국 94619 캘리포니아주 오크랜드 킹우드 로드 21

패리, 레네이트

미국 94619 캘리포니아주 오크랜드 킹우드 로드 21

슈나이더, 더글라스

미국 94549 캘리포니아주 라파예테 왓너트 레인
3329

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 서열 26의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 및 서열 27 또는 서열 28의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 또는
- b) 서열 29의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 및 서열 30 또는 서열 31의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역
- 을 포함하는,

민딘/F-스폰딘 계열(Mindin/F-spondin family)의 동족체이자 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 RG1 폴리펩티드와 결합하는 단리된 인간 항체, 또는 Fv, F(ab'), F(ab')₂, scFv, 미니바디(minibody) 및 디아바디(diabody) 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 그의 항원 결합 단편.

청구항 2

제1항에 있어서, 중쇄 가변 영역이 서열 27의 아미노산 서열을 갖는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 3

제1항에 있어서, 중쇄 가변 영역이 서열 28의 아미노산 서열을 갖는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 4

제1항에 있어서, 중쇄 가변 영역이 서열 30의 아미노산 서열을 갖는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 5

제1항에 있어서, 중쇄 가변 영역이 서열 31의 아미노산 서열을 갖는 것인 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 6

치료제 또는 검출가능한 마커인 분자와 접합된 제1항의 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하는 면역접합체.

청구항 7

제6항에 있어서, 치료제가 세포독성제인 면역접합체.

청구항 8

제7항에 있어서, 세포독성제가 리신(ricin), 독소루비신, 다우노루비신, 파클리탁셀, 에티덤 브로마이드, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 디히드록시 안트라신 디온, 악티노마이신 D, 디프테리아 독소, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 외독소(PE) A, PE40, 리신, 압린, 글루코코르티코이드 및 방사성 동위원소로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 면역접합체.

청구항 9

제8항에 있어서, 세포독성제가 방사성 동위원소이고 ⁴⁶Sc, ⁴⁷Sc, ⁴⁸Sc, ⁷²Ga, ⁷³Ga, ⁹⁰Y, ⁶⁷Cu, ¹⁰⁹Pd, ¹¹¹Ag, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹¹At, ²¹¹Bi, ²¹²Bi, ²¹³Bi 및 ²¹⁴Bi로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 면역접합체.

청구항 10

제6항에 있어서, 검출가능한 마커가 방사성 표지, 효소, 발색단 또는 형광제인 면역접합체.

청구항 11

제10항에 있어서, 검출가능한 마커가 방사성 표지이고 ⁴³Sc, ⁴⁴Sc, ⁵²Fe, ⁵⁵Co, ⁶⁸Ga, ⁶⁴Cu, ⁸⁶Y, ⁹⁴mTc, ¹¹¹In 및

⁹⁹mTc로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 면역접합체.

청구항 12

제6항에 있어서, 항체 또는 항원 결합 단편과 치료제 또는 검출가능한 마커와의 접합에 2-(4-이소티오시아네이토벤질)-디에틸렌트리아민펜타아세트산(p-SCN-벤질-DTPA으로 약칭됨), 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(DOTA) 및 1,4,7-트리아자시클로노난-N,N',N''-트리아세트산(NOTA)로 이루어진 군으로부터 선택되는 킬레이트제를 이용한 면역접합체.

청구항 13

제12항에 있어서, 사용된 킬레이트제가 시클로헥실-디에틸렌트리아민펜타아세트산(시클로헥실-DTPA로 약칭됨), N-[(R)-2-아미노-3-(p-이소티오시아네이토-페닐)프로필]-트랜스-(S,S)-시클로헥산-1,2-디아민-N,N,N',N'',N'''-펜타아세트산(CHX-A"-DTPA로 약칭됨) 또는 2-(4-이소티오시아네이토벤질)-6-메틸디에틸렌트리아민펜타아세트산(MX-DTPA 또는 1B4M-DTPA)인 면역접합체.

청구항 14

제1항에 있어서, 항체가 모노클로날 항체인, 항체 또는 그의 항원 결합 단편.

청구항 15

제1항에 따른 항체의 항원 결합 영역을 포함하고, 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 RG1 폴리펩티드와 결합하는 단일쇄 항체 분자.

청구항 16

제1항에 따른 항체의 항원 결합 영역을 포함하고, 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 RG1 폴리펩티드와 결합하는 폴리펩티드.

청구항 17

- a) 서열 26의 아미노산 잔기 110 내지 117을 포함하는 경쇄 CDR3 서열,
- b) 서열 27의 아미노산 잔기 117 내지 132를 포함하는 중쇄 CDR3 서열,
- c) 각각 서열 26의 아미노산 잔기 44 내지 55 및 서열 26의 아미노산 잔기 71 내지 77을 포함하는 경쇄 CDR1 서열 및 CDR2 서열, 및
- d) 각각 서열 27의 아미노산 잔기 50 내지 54 및 서열 27의 아미노산 잔기 69 내지 84를 포함하는 중쇄 CDR1 서열 및 CDR2 서열

을 포함하는,

민딘/F-스폰딘 계열(Mindin/F-spondin family)의 동족체이자 서열 2를 갖는 RG1과 결합하는 단리된 인간 항체, 또는 Fv, F(ab'), F(ab')₂, scFv, 미니바디(minibody) 및 디아바디(diabody) 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 그의 항원 결합 단편.

청구항 18

- a) 서열 29의 아미노산 잔기 110 내지 117을 포함하는 경쇄 CDR3 서열,
- b) 서열 30의 아미노산 잔기 117 내지 126을 포함하는 중쇄 CDR3 서열,
- c) 각각 서열 29의 아미노산 잔기 44 내지 55 및 서열 29의 아미노산 잔기 71 내지 77을 포함하는 경쇄 CDR1 서열 및 CDR2 서열, 및
- d) 각각 서열 30의 아미노산 잔기 50 내지 54 및 서열 30의 아미노산 잔기 69 내지 84를 포함하는 중쇄 CDR1 서열 및 CDR2 서열

을 포함하는,

민딘/F-스폰딘 계열(Mindin/F-spondin family)의 동족체이자 서열 2를 갖는 RG1과 결합하는 단리된 인간 항체, 또는 Fv, F(ab'), F(ab')₂, scFv, 미니바디(minibody) 및 디아바디(diabody) 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 그의 항원 결합 단편.

청구항 19

a) 서열 26의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 및 서열 27 또는 서열 28의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역; 또는

b) 서열 29의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 및 서열 30 또는 서열 31의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역

을 포함하는,

민딘/F-스폰딘 계열(Mindin/F-spondin family)의 동족체이자 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 RG1 폴리펩티드와 결합하는 단리된 항체, 또는 Fv, F(ab'), F(ab')₂, scFv, 미니바디(minibody) 및 디아바디(diabody) 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 그의 항원 결합 단편,

및 그에 접합된 치료제를 포함하는,

서열 2의 아미노산 서열을 갖는 인간 RG1 폴리펩티드의 발현과 관련된 암의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 20

a) 서열 26의 아미노산 잔기 110 내지 117을 포함하는 경쇄 CDR3 서열,

b) 서열 27의 아미노산 잔기 117 내지 132를 포함하는 중쇄 CDR3 서열,

c) 각각 서열 26의 아미노산 잔기 44 내지 55 및 서열 26의 아미노산 잔기 71 내지 77을 포함하는 경쇄 CDR1 서열 및 CDR2 서열, 및

d) 각각 서열 27의 아미노산 잔기 50 내지 54 및 서열 27의 아미노산 잔기 69 내지 84를 포함하는 중쇄 CDR1 서열 및 CDR2 서열

을 포함하는,

민딘/F-스폰딘 계열(Mindin/F-spondin family)의 동족체이자 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 RG1 폴리펩티드와 결합하는 단리된 항체, 또는 Fv, F(ab'), F(ab')₂, scFv, 미니바디(minibody) 및 디아바디(diabody) 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 그의 항원 결합 단편,

및 그에 접합된 치료제를 포함하는,

서열 2의 아미노산 서열을 갖는 인간 RG1 폴리펩티드의 발현과 관련된 암의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 21

a) 서열 29의 아미노산 잔기 110 내지 117을 포함하는 경쇄 CDR3 서열,

b) 서열 30의 아미노산 잔기 117 내지 126을 포함하는 중쇄 CDR3 서열,

c) 각각 서열 29의 아미노산 잔기 44 내지 55 및 서열 29의 아미노산 잔기 71 내지 77을 포함하는 경쇄 CDR1 서열 및 CDR2 서열, 및

d) 각각 서열 30의 아미노산 잔기 50 내지 54 및 서열 30의 아미노산 잔기 69 내지 84를 포함하는 중쇄 CDR1 서열 및 CDR2 서열

을 포함하는,

민딘/F-스폰딘 계열(Mindin/F-spondin family)의 동족체이자 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 RG1 폴리펩티드와 결합하는 단리된 항체, 또는 Fv, F(ab'), F(ab')₂, scFv, 미니바디(minibody) 및 디아바디(diabody) 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 그의 항원 결합 단편,

및 그에 접합된 치료제를 포함하는,

서열 2의 아미노산 서열을 갖는 인간 RG1 폴리펩티드의 발현과 관련된 암의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 면역접합체의 치료제가 세포독성제인 제약 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 면역접합체의 세포독성제가 리신, 독소루비신, 다우노루비신, 에티듬 브로마이드, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 디히드록시 안트라신 디온, 악티노마이신 D, 디프테리아 독소, 슈도모나스 외독소 (PE) A, PE40, 리신, 압린, 글루코코르티코이드 및 방사성 동위원소로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 방사성 동위원소가 ^{46}Sc , ^{47}Sc , ^{48}Sc , ^{72}Ga , ^{73}Ga , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , ^{211}Bi , ^{212}Bi , ^{213}Bi 및 ^{214}Bi 로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 25

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 항체와 치료제와의 접합에 p-SCN-벤질-DTPA, 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(DOTA) 및 1,4,7-트리아자시클로노난-N,N',N''-트리아세트산(NOTA)로 이루어진 군 중에서 선택되는 킬레이트제를 이용한 제약 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 킬레이트제가 시클로헥실-DTPA(CHX-A"-DTPA) 또는 MX-DTPA(1B4M-DTPA)인 제약 조성물.

청구항 27

(i) 서열 26의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 및 서열 27 또는 서열 28의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역,

(ii) 서열 29의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 및 서열 30 또는 서열 31의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역,

(iii) 서열 26의 아미노산 잔기 110 내지 117을 포함하는 경쇄 CDR3 서열; 서열 27의 아미노산 잔기 117 내지 132를 포함하는 중쇄 CDR3 서열; 각각 서열 26의 아미노산 잔기 44 내지 55 및 서열 26의 아미노산 잔기 71 내지 77을 포함하는 경쇄 CDR1 서열 및 CDR2 서열; 및 각각 서열 27의 아미노산 잔기 50 내지 54 및 서열 27의 아미노산 잔기 69 내지 84를 포함하는 중쇄 CDR1 서열 및 CDR2 서열, 또는

(iv) 서열 29의 아미노산 잔기 110 내지 117을 포함하는 경쇄 CDR3 서열; 서열 30의 아미노산 잔기 117 내지 126을 포함하는 중쇄 CDR3 서열; 각각 서열 29의 아미노산 잔기 44 내지 55 및 서열 29의 아미노산 잔기 71 내지 77을 포함하는 경쇄 CDR1 서열 및 CDR2 서열; 및 각각 서열 30의 아미노산 잔기 50 내지 54 및 서열 30의 아미노산 잔기 69 내지 84를 포함하는 중쇄 CDR1 서열 및 CDR2 서열

을 갖는 항체, 또는 Fv, F(ab'), F(ab')₂, scFv, 미니바디(minibody) 및 디아바디(diabody) 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항원 결합 단편을 포함하는,

민딘/F-스폰딘 계열(Mindin/F-spondin family)의 동족체이자 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 인간 RG1 폴리펩티드의 발현과 관련된 암의 치료를 위한 제약 조성물.

청구항 28

제19항 내지 제21항 및 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 전립선암, 신장암, 난소암 또는 결장직장암인 제약 조성물.

청구항 29

제27항에 있어서, 항체 또는 그의 항원 결합 단편이 치료제와 접합되어 있는 것인 제약 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 치료제가 세포독성제인 제약 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 세포독성제가 리신, 독소루비신, 다우노루비신, 에티둠 브로마이드, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 디히드록시 안트라신 디온, 악티노마이신 D, 디프테리아 독소, 슈도모나스 외독소 (PE) A, PE40, 리신, 압린, 글루코코르티코이드 및 방사성 동위원소로 이루어진 군 중에서 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 세포독성제가 ^{90}Y 또는 ^{177}Lu 인 제약 조성물.

청구항 33

제29항에 있어서, 항체와 치료제와의 접합에 p-SCN-벤질-DTPA, 1,4,7,10-테트라아자시클로도테칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산(DOTA) 및 1,4,7-트리아자시클로노난-N,N',N''-트리아세트산(NOTA)로 이루어진 군 중에서 선택되는 킬레이트제를 이용한 제약 조성물

청구항 34

제33항에 있어서, 사용된 킬레이트제가 시클로헥실-DTPA(CHX-A"-DTPA) 또는 MX-DTPA(1B4M-DTPA)인 제약 조성물.

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

명세서

[0001] 본 출원은 2003년 7월 22일자로 출원된 미국 가출원 제60/489,032호의 이점을 청구하며, 상기 문헌은 본원에 참고로 도입된다.

기술분야

[0002] 본 발명은 전립선 및 기타 종양 세포에서 우선적으로 발현되는 폴리펩티드 RG1에 대하여 지시된 신규한 항체에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 암 및 암 전이를 치료 및 검출하기 위한, 이들 항체의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 45세 이상의 남성들 중 대략 1/3에서 전립선 암이 발견된다는 점에서, 전립선 암은 남성에게 흔히 발병하는 질환이다. 전립선 암의 원인은 유전적인 요인과 환경적인 요인 둘다라는 증거가 있는데, 대부분의 경우가 이들 두가지 요인이 조합된 결과라고 여겨진다. 가족성 암에 관한 연구 결과, 55세 미만 남성의 경우에서의 45%와, 모든 전립선 암의 약 5 내지 10%에 있어서 유전적 소인이 일정 역할을 하는 것으로 보고되었다.

[0004] 전립선 암이 다단계 질환으로서 발병한다는 증거가 있는데, 전구 병변들 중 하나가 전립선 상피내 종양 (PIN)이다. 상기 질환의 초기 단계는 안드로겐-의존성이지만, 후기 단계는 호르몬-비의존성이다. 양성 전립선 비대증으로서 공지된 전립선 증식성 장애가 종종 임상적으로 검출되지만, 암 발병 단계가 아닌 것으로 추정된다. 그

러나, 이것이 종종 전립선 암과 관련이 있기도 하다. 전립선 암은 종종 다병소성 (multifocal)으로, 일반적으로 느리게 성장하며 이종성 (heterogenous)이다. 말기 암은 빈번히 림프절과 뼈로 전이되기도 한다.

[0005] 통상적으로, 전립선 암은 신체 검사로 진단되고 전립선 특이적 항원 (PSA)의 혈청 수준을 통해 진단된다. 근치 전립선절제술 (radical prostatectomy)은 국소성 질환에 대해 선택된 치료법이다. 현재, 전이가 많이 진행된 질환은 고환절제술 또는 GnRH (고나도트로핀 방출 호르몬) 처치를 통해 안드로겐 절제를 유도하여 치료하고 항-안드로겐 요법으로 치료하고 있다. 그러나, 많이 진행된 질환은 거의 대부분이 호르몬에 대한 내성을 지니게 되기 때문에 진행성 질환에 대해서는 치료하기가 어렵다. 더욱이, 근치 전립선절제술과 안드로겐 절제 요법 둘 다 심각한 부작용을 수반한다. 이러한 부작용으로는, 근치 전립선절제술과 관련하여서는 발기부전증과 실금 발병률이 높다는 것과, 안드로겐 절제 요법과 관련해서는 골절과 골다공증 발병률이 높다는 것 등이 있다.

[0006] 따라서, 초기 전립선 암과 말기 전립선 암 모두에 대한 새로운 치료학적 접근법이 상당히 요망된다. 또한, 새로운 진단제도 실제로 요망되는데, 이는 이러한 새로운 진단제가 치료 선택에 상당한 영향을 미치기 때문이다. 예를 들어, 질환이 전립선 영역을 벗어나서 진행되어 림프절로 전이된 경우에는 근치 전립선절제술을 수행하지 않는데, 이는 이러한 처치가 암 진행에 대해 전혀 효과를 나타내지 못하고, 오히려 바람직하지 못한 심각한 부작용을 유발시킬 수 있기 때문이다. 생체 내에서 전이를 검출할 수 있는 작용제가 상당히 유용할 것이다.

[0007] 말기 전립선 암에서의 비정상적인 p53 발현, TGF- β 수용체의 수준 감소, E-카드헤린, C-Cam (세포 부착 분자) 및 몇가지 인테그린의 수준 감소를 포함한, 특이적 단백질 발현 상의 변화가 전립선 암에서 나타났다. 종양형성 유전자 bc1-2의 발현은 말기 안드로겐-비의존성 종양에서 두드러지게 상승하고, 상승된 수준의 bc1-2 발현을 나타내는 환자에 대한 예후는 비교적 중분치 못하다. 앞서 언급된 유전자 발현 상의 변화가 상세히 보고되긴 하였지만, 상기 질환에 대해 원인이 되는 것으로 입증된 발현 상의 변화는 전혀 확인하지 못하였다. 따라서, 전립선 종양의 존재 또는 발병과 관련하여 발현되어 전립선 암 진단과 요법에 대해 지시된 조성물에 대한 분자 표적으로서 기능할 수 있는 새로운 단백질을 확인하는 것이 유용할 것이다.

[0008] 폴리펩티드 RG1 (미국 특허 제5,871,969호 참고)는 세포외 매트릭스 단백질인 민딘 (Mindin)/F-스폰딘 (spondin) 계열의 동족체이다. RG1 폴리펩티드는 전립선 조직 내에서 고도로 발현되는 것으로 입증되었으며 (WO 98/45442 참고), 이는 전립선 암 진단과 요법에 대한 유용한 표적일 뿐만 아니라 이러한 폴리펩티드가 발현되는 기타 암에 대해 유용함이 분명하다.

[0009] 발명의 요약

[0010] 본 발명은 RG1 폴리펩티드에 대해 고도로 선택적이고; 전립선, 신장, 결장 또는 난소 암과 같은 질환 상태와 관련된 RG1 발현을 검출하기 위한 방법과, 이러한 질환 상태의 치료에 이용될 수 있는 항체 또는 그의 항원 결합성 항체 단편 또는 이들의 변이체를 제공한다.

[0011] 이를 위해, 본 발명의 목적은 RG1 폴리펩티드 (서열 2)에 존재하는 에피토프와 특이적으로 결합하는 단리된 항체 또는 그의 항원 결합성 항체 단편 또는 이들의 변이체를 제공하는 것이다. 특히 바람직한 것은, RG1 폴리펩티드의 에피토프와 결합하는 해리 상수 (K_D)가 1 μ M 이하, 보다 바람직하게는 100 nM 이하, 가장 바람직하게는 10 nM 이하인 인간 항체이다.

[0012] 본 발명의 추가의 바람직한 양태에 따르면, 서열 26 또는 서열 29의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항체 및 그의 항원 결합성 항체 단편이 제공된다.

[0013] 또한, 서열 27, 서열 28, 서열 30 또는 서열 31의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 단리된 항체 및 그의 항원 결합성 항체 단편이 제공된다. 특히 바람직한 양태는 서열 26의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 및 서열 27 또는 서열 28의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하는 인간 항체이다. 제2의 특히 바람직한 양태는 서열 29의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역 및 서열 30 또는 서열 31의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하는 인간 항체이다.

[0014] 본 발명의 추가 국면에서는, 상기 언급된 아미노산 서열과의 서열 동일성이 80%인 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역과 중쇄 가변 영역이 또한 고려된다.

[0015] 상기 언급된 항체의 경쇄 가변 영역과 중쇄 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 또한 제공된다. 서열 20 또는 서열 23을 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체가 바람직하다. 또한, 서열 21, 서열 22, 서열 24 또는 서열 25를 포함하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체가 바람직하다.

- [0016] 상기 본 발명의 국면의 특정 바람직한 국면에 따르면, 상기 항체를, 시험관내 세포, 생체의 세포 및 생체내 세포에 투여하거나 또는 다세포 유기체에 투여하기 위한 진단제로서 사용하기 위해, 검출가능한 마커에 접합시킨다. 방사성 표지, 효소, 발색단 또는 형광체에 접합된 항체가 특히 바람직할 것이다. 특히 바람직한 검출 방법은 면역신티그래피 (immunoscintigraphy) 및 양전자 방출 단층촬영술로서, 여기서는 항체를 면역신티그래피의 경우에는 방사성 동위원소, 예를 들어, ^{111}In 또는 $^{90\text{m}}\text{Tc}$ 와 접합시키거나, 또는 양전자 방출 단층촬영술의 경우에는 ^{43}Sc , ^{44}Sc , ^{52}Fe , ^{55}Co , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{86}Y 또는 $^{94\text{m}}\text{Tc}$ 와 접합시킨다.
- [0017] 본 발명의 추가 국면에서는, 시험관내 세포, 생체의 세포 및 생체내 세포에 투여하거나 또는 다세포 유기체에 투여하기 위해, 특정 치료제, 예를 들면, 리신 (ricin) 또는 방사성 동위원소에 접합되는 항체가 제공된다. 이와 관련하여, 세포독성인 치료제가 바람직하다. 치료제용으로 특히 바람직한 것은 방사성 동위원소, 예를 들어, ^{90}Y 및 ^{177}Lu 에 접합된 항체이다. 이와 관련하여 특정 바람직한 양태에서는, RG1 발현을 특징으로 하는 질환 상태, 예를 들어, 전립선 암, 특히 전이가 많이 진행된 전립선 암을 치료하기 위해, 상기 접합된 항체를 인간 환자에게 투여한다.
- [0018] 본 발명의 추가 국면에서, RG1 항체 또는 그의 항원 결합성 단편을 검출가능한 마커 또는 세포독성제에 접합시키는 것은 p-SCN-벤질-DTPA 및 그의 유도체, 1,4,7,10-테트라아자시클로도데칸-N,N',N'',N'''-테트라아세트산 (DOTA) 및 그의 유도체, 및 1,4,7-트리아자시클로노난-N,N',N''-트리아세트산 (NOTA) 및 그의 유도체로 이루어진 군 중에서 선택된 킬레이트제를 사용함으로써 달성된다.
- [0019] 본 발명의 추가 국면은 본 발명의 면역접합체를 사용하여, RG1 폴리펩티드의 발현과 관련된 질환 상태, 예를 들면, 전립선 암을 치료하는 방법이다.
- [0020] 본 발명의 추가 국면은 본 발명의 면역접합체를 사용하여, RG1 폴리펩티드의 발현과 관련된 질환 상태, 예를 들면, 전립선 암을 검출하는 방법이다.
- [0021] 본 발명의 추가 국면에서는, 면역 반응을 자극하기 위해 사용될 수 있는 펩티드 및 항-인자형 (anti-idiotypic) 항체가 제공된다.
- [0022] 본 발명의 기타 목적, 특징 및 이점은 다음의 설명으로부터 당업자에게 명백할 것이다. 그러나, 다음의 상세한 설명과, 본 발명의 바람직한 양태를 지시하는 구체적인 실시예는 단지 예로써 제공된다. 본 발명의 범위 및 요지 내의 각종 변화 및 변형은, 당업자가 다음의 상세한 설명과 본 명세서의 기타 부분을 판독함으로써 용이하게 명백해질 것이다.

발명의 상세한 설명

- [0027] 정의
- [0028] 달리 명시하지 않는 한, 본원의 명세서, 실시예 및 첨부된 청구의 범위에 사용된 바와 같은 다음 용어들은 지시된 의미를 갖는다.
- [0029] "Rg1"은 서열 1에 기재된 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 및 서열 2에 기재된 RG1의 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭하고; RG1 변이체, 유도체 및 단편, 및 이러한 변이체 및 유도체의 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. Rg1은 또한, RNA로 구성된 상기 폴리뉴클레오티드 뿐만 아니라 서열 2에 기재된 폴리펩티드 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 보체인 폴리뉴클레오티드를 지칭한다.
- [0030] "RG1"은 서열 2에 기재된 아미노산 서열, 그의 변이체 및 유도체, 및 서열 2의 단편, 그의 변이체 및 유도체를 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 서열 2의 폴리펩티드를 지칭하는 경우의 용어 "변이체", "단편" 및 "유도체"는 서열 2의 폴리펩티드와 본질적으로 동일한 생물학적 및(또는) 면역학적 활성을 보유하고 있는 폴리펩티드를 의미한다.
- [0031] "생물학적 활성"은 천연의 RG1 폴리펩티드의 구조적, 조절성 또는 생화학적 기능을 지칭한다.
- [0032] "면역학적 활성"은 (1) 적당한 동물 또는 세포에서 특이적 면역 반응을 유도시키고 특이적 항체와 결합할 수 있는 천연, 재조합 또는 합성 RG1, 또는 그의 모든 단편의 능력, 또는 (2) 생체 내에서 RG1과 결합할 수 있고 RG1 발현성 조직 또는 종양에 대한 증강된 세포성 면역 반응을 촉발시킬 수 있는, RG1에 대한 항체의 능력을 지칭한다.

- [0033] "천연의 RG1"은 유전 공학적으로 처리시키지 않은 인간 세포에 의해 생산된 RG1을 지칭하고, 구체적으로 언급하면 폴리펩티드의 해독 후 변형 (이에는 아세틸화, 카복실화, 당화, 인산화, 지질화, 아실화 및 절단이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다)으로부터 비롯된 각종 RG1 형태가 고려된다.
- [0034] "본래의 RG1" 또는 "nRG1"은 그의 본래의 입체 형태인 RG1을 지칭한다.
- [0035] "폴리뉴클레오티드(들)"는 일반적으로, 변형되지 않은 RNA 또는 DNA, 또는 변형된 RNA 또는 DNA일 수 있는, 모든 폴리리보뉴클레오티드 또는 폴리데옥시리보뉴클레오티드를 지칭한다. 따라서, 예를 들어, 본원에 사용된 바와 같은 폴리뉴클레오티드는 특히, 일본쇄 및 이본쇄 DNA; 단일쇄 영역과 이본쇄 영역의 혼합물인 DNA; 일본쇄 및 이본쇄 RNA; 일본쇄 영역과 이본쇄 영역의 혼합물인 RNA; 일본쇄, 또는 전형적으로 이본쇄일 수 있거나 또는 일본쇄 영역과 이본쇄 영역의 혼합물인 DNA와 RNA를 포함하는 하이브리드 분자를 지칭한다. 또한, 본원에 사용된 바와 같은 폴리뉴클레오티드는 RNA 또는 DNA 중의 어느 하나, 또는 RNA와 DNA 둘 다를 포함하는 삼본쇄 영역을 지칭한다. 이러한 영역 내의쇄는 동일한 분자로부터의 것이거나 상이한 분자로부터의 것일 수 있다. 상기 영역에는 상기 하나 이상의 분자들 모두가 포함될 수 있지만, 보다 전형적으로는, 몇몇 분자 영역 만이 관여한다. 삼중-나선 영역 분자들 중의 하나가 종종 올리고뉴클레오티드이다.
- [0036] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "폴리뉴클레오티드"에는 하나 이상의 변형된 염기를 함유하는, 상기 언급된 바와 같은 DNAs 또는 RNAs가 포함된다. 따라서, 안정성을 위해 또는 기타 이유로 인해 변형된 주쇄를 갖는 DNAs 또는 RNAs가, 본원에서 의도한 바와 같은 "폴리뉴클레오티드"이다. 더우기, 2가지 예를 열거하면, 이상한 (보기 드문) 염기, 예를 들면, 이노신, 또는 변형된 염기, 예를 들면, 3중 수소-표지된 염기를 포함하는 DNAs 또는 RNAs가 본원에서 사용되는 바와 같은 폴리뉴클레오티드이다.
- [0037] 당업자에게 공지된 수 많은 유용한 목적을 제공해주는, DNA 및 RNA에 대한 상당히 다양한 변형이 이루어졌다는 사실을 인지해야 할 것이다. 본원에 이용된 바와 같은 용어 "폴리뉴클레오티드"는 이와 같이 화학적, 효소적 또는 대사적으로 변형된 형태의 폴리뉴클레오티드 뿐만 아니라 바이러스 및 세포 (특히, 단순 및 복합 세포)에 특징적인 화학적 형태의 DNA 및 RNA를 포괄한다.
- [0038] "올리고뉴클레오티드(들)"는 비교적 짧은 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 종종, 상기 용어는 일본쇄 데옥시리보뉴클레오티드를 지칭하긴 하지만, 이는 또한, 일본쇄 또는 이본쇄 리보뉴클레오티드, RNA:DNA 하이브리드 및 이본쇄 DNAs를 지칭할 수 있다. 올리고뉴클레오티드, 예를 들어 일본쇄 DNA 프로브 올리고뉴클레오티드는 종종, 예를 들어 자동화 올리고뉴클레오티드 합성기 상에서 이행되는 방법과 같은 화학적 방법에 의해 합성된다. 그러나, 올리고뉴클레오티드는 시험관내 재조합 DNA-매개성 기술을 포함한 각종의 기타 방법에 의해 만들 수 있고, 세포 및 유기체에서의 DNAs의 발현에 의해서 만들 수 있다. "올리고뉴클레오티드" 또는 "올리고머" 또는 폴리뉴클레오티드 "단편", "부분" 또는 "절편"은 약 10개 이상의 뉴클레오티드 내지 약 60개 정도로 많은 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 15 내지 30개의 뉴클레오티드, 보다 바람직하게는 약 20 내지 25개의 뉴클레오티드를 수반한 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다.
- [0039] 본원에 사용된 바와 같은 "폴리펩티드"에는 다음에 기재되는 바와 같은 모든 폴리펩티드가 포함된다. 폴리펩티드의 기본 구조는 널리 공지되어 있고, 당해 분야의 무수한 교재와 기타 공개 문헌에 보고되었다. 이러한 맥락에서, 상기 용어는 펩티드 결합에 의해 직쇄로 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 모든 펩티드 또는 단백질을 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 본원에 사용된 바와 같은 상기 용어는 당해 분야에서 펩티드, 올리고펩티드 및 올리고머로서 통상 지칭되기도 하는 단쇄와, 당해 분야에서 일반적으로, 많은 유형으로 존재하는 단백질로서 지칭되는 장쇄 모두를 지칭한다.
- [0040] 폴리펩티드는 종종, 천연의 20가지 아미노산으로서 통상 지칭되는 20가지 아미노산 이외의 아미노산을 함유하고, 말단 아미노산을 포함한 많은 아미노산이 천연의 프로세스, 예를 들어 당화 및 기타 해독-후 변형에 의해 또는 당해 분야에 널리 공지되어 있는 화학적 변형 기술에 의해, 소정의 폴리펩티드에서 변형될 수 있다는 사실을 인지해야 할 것이다. 통상적인 변형에는 당화, 지질 부착, 황산화, 글루탐산 잔기의 감마-카복실화, 히드록실화 및 ADP-리보실화가 포함되며, 이들 및 기타 변형은 대부분의 기본 연구서, 예를 들어, 다음 문헌에 기재되어 있다 [참고: I. E. Creighton, Proteins-Structure and Molecular Properties, 2nd Ed., W. H. Freeman and Company, New York, 1993]. 상기 주제에 관한 많은 상세한 고찰이 예를 들어, 다음 문헌에 보고되었다 [참고: Wold, F., in Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp 1-12, 1983; Seifter et al., Meth. Enzymol. 182: 626-646, 1990 and Rattan et al., Protein Synthesis: Posttranslational Modifications and Aging, Ann. N. Y. Acad. Sci. 663: 48-

62, 1992].

- [0041] 널리 공지되어 있고 상기 언급된 바와 같이, 폴리펩티드가 항상 전적으로 선형이지 않다는 것을 인지해야 할 것이다. 예를 들어, 폴리펩티드는 유비퀴틴화 (ubiquitination)의 결과로서 분지될 수 있고, 천연 프로세싱 사건 및 천연이지 않은 인간 조작에 의해 유발된 사건을 포함한, 일반적으로 해독후 사건의 결과로서 환상 (분지화를 수반하거나 수반하지 않음)일 수 있다. 환상, 분지화 및 분지화 환상 폴리펩티드는 비-해독 천연 프로세스에 의해 합성할 수 있고, 또한 전적으로 합성 방법에 의해서 합성할 수도 있다.
- [0042] 변형은 펩티드 주쇄, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카복실 말단을 포함한, 폴리펩티드 내의 어느 곳에서도 일어날 수 있다. 사실상, 폴리펩티드 중의 아미노기 또는 카복실기, 또는 이들 둘 다를 공유적 변형에 의해 봉쇄시키는 것은 천연 및 합성 폴리펩티드에서 통상적인 일이며, 이러한 변형이 본 발명의 폴리펩티드에서도 마찬가지로 존재할 수 있다. 예를 들어, 단백질 분해적 프로세싱에 앞서, 이. 콜라이 (*E. coli*)에서 만든 폴리펩티드의 아미노 말단 잔기는 항상 변함없이 N-포름메티오닌일 것이다.
- [0043] 폴리펩티드 내에서 일어나는 변형은 종종, 이러한 폴리펩티드가 어떻게 만들어졌는가에 따라 다양할 것이다. 예를 들어, 클로닝된 유전자를 특정 숙주에서 발현시킴으로써 만들어진 폴리펩티드의 경우에는, 대부분의 변형의 특성과 정도가 숙주 세포 해독후 변형 능력과, 해당 폴리펩티드 아미노산 서열 내에 존재하는 변형 신호에 의해 결정될 것이다. 예를 들어, 널리 공지된 바와 같이, 당화는 종종, 이. 콜라이와 같은 세균성 숙주에서는 발생하지 않는다. 따라서, 당화를 목적으로 하는 경우에는, 폴리펩티드를 당화성 숙주, 일반적으로 진핵성 세포에서 발현시켜야 한다. 곤충 세포가 종종, 포유류 세포와 동일한 해독후 당화를 수행하는데, 이러한 이유로 인해, 본래 패틴의 당화를 나타내는 포유류 단백질을 효율적으로 발현하기 위한 곤충 세포 발현 시스템이 개발되었다. 기타 변형에 대해서도 유사하게 고려할 수 있다.
- [0044] 일반적으로 본원에 사용된 바와 같은 용어 폴리펩티드는 상기 모든 변형, 특히 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에서 발현시킴으로써 합성한 폴리펩티드 내에 존재하는 변형을 포괄한다.
- [0045] "유도체"는 화학적 변형, 예를 들어 유비퀴틴화, 표지화 (예를 들어, 방사성핵종, 각종 효소적 변형을 이용함), 폐길화 (폴리에틸렌 글리콜로의 유도체화)에 의해, 또는 인간 단백질에 천연적으로 존재하지 않는 아미노산 (예: 오르니틴)의 삽입 또는 치환 (또는 이러한 아미노산을 코딩하는 뉴클레오티드의 치환)에 의해, 천연의 *rgl*, RG1, 또는 항체 결합성 RG1로부터 각각 유래한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0046] 본원에 사용된 바와 같은 "폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드"는 본 발명의 폴리펩티드, 특히 서열 2에 기재된 아미노산 서열을 갖는 RG1 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포괄한다. 상기 용어는 폴리펩티드를 코딩하는 단일 연속 영역 또는 불연속 영역을 부가의 영역과 함께 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포괄한다.
- [0047] 폴리펩티드 "단편", "부분" 또는 "절편"은 약 5개 이상의 아미노산, 종종 약 7개 이상의 아미노산, 전형적으로 약 9 내지 13개 이상의 아미노산의 아미노산 잔기 연장물이고, 각종 양태에서는 약 17개 이상의 아미노산의 아미노산 잔기 연장물이다. "단편"은 전술된 RG1 폴리펩티드 또는 RG1에 대한 항체, 및 이들의 변이체 또는 유도체의 아미노산 서열의 전부는 아니지만, 일부와 거의 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0048] "결실"은 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기가 각각 존재하지 않는, 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열 상의 변화로서 정의된다.
- [0049] "삽입" 또는 "부가"는 천연의 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열과 비교할 때 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기 각각이 부가된, 폴리펩티드 또는 아미노산 서열 상의 변화이다.
- [0050] "치환"은 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산을 각각 상이한 뉴클레오티드 또는 아미노산으로 대체시킨 것이다.
- [0051] 본원에 사용된 경우, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 "변이체(들)"는 다음 및 본 명세서 어디에서든 보다 상세히 기재되어 있다.
- [0052] 폴리뉴클레오티드의 변이체는 또 다른 기준 폴리뉴클레오티드와 폴리뉴클레오티드 서열에 있어 상이한 폴리뉴클레오티드이다. 일반적으로, 이러한 차이는 기준 폴리뉴클레오티드와 변이체 폴리뉴클레오티드가 전반적으로 밀접하게 유사하도록, 많은 영역에서는 서로 동일하도록 제한된다.
- [0053] 변이체의 폴리뉴클레오티드 서열 상의 변화는 침묵 (무증후성)일 수 있다. 즉, 이러한 폴리뉴클레오티드에 의

해 코딩되는 아미노산이 변경되지 않을 수 있다. 변경이 이러한 유형의 침묵 변화로 제한되는 경우에는, 변이체가 기준 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 수반한 폴리뉴클레오타이드를 코딩할 것이다. 또한 다음에 기재되는 바와 같이, 변이체의 폴리뉴클레오타이드 서열 상의 변화는 기준 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 폴리펩티드의 아미노산 서열을 변경시킬 수 있다. 이러한 폴리뉴클레오타이드 변화로 인해, 다음에 논의되는 바와 같이 기준 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드 내에서 아미노산 치환, 부가, 결실, 융합 및 절단이 이루어질 수 있다.

[0054] 폴리펩티드의 변이체는 또 다른 기준 폴리펩티드와 아미노산 서열에 있어 상이한 폴리펩티드이다. 일반적으로, 이러한 차이는 기준 폴리펩티드와 변이체 폴리펩티드의 서열이 전반적으로 밀접하게 유사하고, 많은 영역에 있어서 서로 동일하도록 제한된다. 변이체 폴리펩티드와 기준 폴리펩티드는 아미노산 서열이 하나 이상의 치환, 부가, 결실, 융합 및 절단 (어떠한 조합으로도 존재할 수 있다)에 의해 상이할 수 있다. 이들 동일하거나 유사한 폴리펩티드를 코딩하는 재조합 변이체는 유전자 코드 상의 "여분 (redundancy)"을 이용함으로써 선별되거나 합성할 수 있다. 각종 코돈 치환, 예를 들어 각종의 제한 부위를 생성시키는 침묵 변화를 도입하여, 특정한 원핵성 또는 진핵성 시스템에서의 발현이나 플라스미드 또는 바이러스성 벡터 내로의 클로닝을 최적화할 수 있다. 돌연변이를 또한 도입함으로써 폴리펩티드의 특성을 변형시켜, 리간드-결합 친화성, 소산 친화성, 또는 폴리펩티드 분해 또는 교체율을 변화시킬 수도 있다.

[0055] 본원에 논의되는 바와 같이, 폴리펩티드, 항체 또는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열 상의 소수의 변이 역시 본 발명에 의해 포괄되는 것으로 고려되는데, 단 이러한 아미노산 서열 상의 변이는 본래의 서열을 80% 이상, 보다 바람직하게는 85%, 90%, 95% 이상, 가장 바람직하게는 99% 유지해야만 한다. 특히, 보존적 아미노산 대체가 고려된다. 보존적 대체는 그들의 측쇄와 관련되는 계열의 아미노산 내에서 이루어지는 대체이다. 유전적으로 코딩되는 아미노산은 일반적으로, 다음 계열들로 나누어진다: (1) 산성 (아스파르테이트, 글루타메이트); (2) 염기성 (리신, 아르기닌, 히스티딘); (3) 비극성 (알라닌, 발린, 루이신, 이소루이신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판); 및 (4) 전하를 띠지 않는 극성 (글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신). 보다 바람직한 계열은 다음과 같다: 세린 및 트레오닌은 지방족-히드록시 계열이고; 아스파라긴 및 글루타민은 아미드 함유 계열이며; 알라닌, 발린, 루이신 및 이소루이신은 지방족 계열이고; 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신은 방향족 계열이다. 예를 들어, 루이신을 이소루이신 또는 발린으로 단리 대체시키거나, 아스파르테이트를 글루타메이트로 단리 대체시키거나, 트레오닌을 세린으로 단리 대체시키거나, 또는 특정 아미노산을 구조적으로 관련된 아미노산으로 유사하게 대체시키는 것은, 특히 이러한 대체가 골격 부위 내의 아미노산을 수반하지 않을 경우에는, 이로써 생성되는 분자의 결합이나 특성에 중요한 영향을 미치지 않을 것이라고 예상하는 것은 무리가 아니다. 아미노산 변화로 인해 기능적 펩티드가 생성되는지의 여부는 폴리펩티드 유도체의 특이 활성을 변형되지 않은 폴리펩티드의 특이 활성과 비교함으로써 용이하게 결정할 수 있다. 본 출원의 목적상, 본 발명은 RG1 에피토프에 대한 결합 상수 (K_D)가 1 μ M 미만인, 본원에 청구된 항체의 변이체를 포괄한다.

[0056] 다음 용어들은 2개 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열들 간의 서열 관계를 기재하기 위해 사용된다: "기준 서열", "비교 창 (comparison window)", "서열 동일성", "서열 동일성", "상당히 동일함", "유사성" 및 "상동성". "기준 서열"은 서열 비교를 위한 기준물로서 사용되는 규정 서열이고; 기준 서열은 예를 들어, 서열 목적에 제시된 완전한 길이의 DNA 또는 유전자 서열의 절편으로서, 보다 큰 서열의 서브세트일 수 있거나, 또는 완전한 cDNA 또는 유전자 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로, 기준 서열은 길이가 18개 이상의 뉴클레오타이드 또는 6개의 아미노산, 빈번하게는 24개 이상의 뉴클레오타이드 또는 8개의 아미노산, 종종 48개 이상의 뉴클레오타이드 또는 16개의 아미노산이다. 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열은 각각, (1) 2개 분자들 간에 유사한 서열 (즉, 완전한 폴리뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열의 일부)을 포함할 수 있고 (2) 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열들 사이에서 갈라지는 서열을 추가로 포함할 수 있는데, 2개 (또는 그 이상)의 분자들 간의 서열 비교는 전형적으로, 2개 분자를 "비교 창" 전반에 걸쳐 비교하여, 서열 유사성 국소 영역을 확인 및 비교함으로써 수행한다. 본원에 사용된 바와 같은 "비교 창"은 18개 이상의 연속되는 뉴클레오타이드 위치 또는 6개의 아미노산의 개념적 절편을 지칭하는데, 여기서는 폴리뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열을 18개 이상의 연속되는 뉴클레오타이드 또는 6개의 아미노산 서열의 기준 서열과 비교할 수 있고, 비교 창 중의 뉴클레오타이드 서열의 일부가, 두 서열을 최적으로 정렬시키기 위해 기준 서열 (부가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교할 때 20% 이하에서 부가, 결실, 치환 등 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 비교 창 정렬을 위해 서열을 최적으로 정렬시키는 것은 문헌 [참고: Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)]의 국소 상동성 알고리즘, 문헌 [참고: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘, 문헌 [참고: Pearson

and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444 (1988)]의 유사성 조사 방법, 컴퓨터를 이용하여 이들 알고리즘을 실행하는 방법 [Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks, 또는 MacVector 소프트웨어 패키지의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA], 또는 검사에 의해 수행할 수 있으며, 각종 방법에 의해 이루어진 최상의 정렬 (즉, 비교 창 전반에 걸쳐 가장 높은 상동률이 발생함)을 선별한다.

[0057] 용어 "서열 동일성"은 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열이 비교 창 전반에 걸쳐 동일한 (즉, 뉴클레오티드 대 뉴클레오티드 또는 잔기 대 잔기를 기준으로 하여 동일한) 것을 의미한다. 용어 "서열 동일성"은 최적으로 정렬된 2개의 서열을 비교 창 전반에 걸쳐 비교하고; 동일한 핵산 염기 (예를 들면, A, T, C, G, U 또는 I) 또는 잔기가 양 서열에 존재하는 위치 수를 결정하여, 일치되는 위치 수를 산출하며; 이러한 일치되는 위치 수를 비교 창 내의 총 위치 수 (즉, 창 크기)로 나눈 다음; 상기 결과치에 100을 곱하여 서열 동일성을 산출함으로써 산정한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "상당히 동일함"은 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산이, 18개 이상의 뉴클레오티드 (6개 아미노산) 위치의 비교 창 전반에 걸쳐, 종종 24 내지 48개 이상의 뉴클레오티드 (8 내지 16개 아미노산) 위치의 비교 창 전반에 걸쳐 기준 서열과 비교한 경우에, 서열 동일성이 85% 이상, 바람직하게는 90 내지 95% 이상, 보다 통상적으로는 99% 이상인 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 특징을 의미하는데, 이러한 서열 동일성은 비교 창 전반에 걸쳐 기준 서열의 총 20% 이하에서 부가 또는 결실이 나타날 수 있는 서열을 기준 서열과 비교함으로써 산정한다. 기준 서열은 보다 큰 서열의 서브세트일 수 있다. 폴리펩티드를 기재하기 위해 사용된 경우의 용어 "유사성"은 하나의 폴리펩티드의 아미노산 서열 및 보존적 아미노산 치환물을 제2의 폴리펩티드 서열과 비교함으로써 결정한다. 폴리뉴클레오티드를 기재하기 위해 사용된 경우의 용어 "상동성"은 최적으로 정렬되어 비교된 경우에 2개의 폴리뉴클레오티드, 또는 그의 지정된 서열이 해당 뉴클레오티드의 70% 이상, 통상적으로는 약 75 내지 99%, 보다 바람직하게는 약 98 내지 99% 이상에서, 적당한 뉴클레오티드 삽입 또는 결실을 수반하면서 동일한 것을 지시한다.

[0058] "항체" 또는 "항원-결합성 항체 단편"은 본래의 항체, 또는 특이적 결합을 위해 본래의 항체와 경쟁하는 그의 단편을 지칭한다. 항체 또는 항원-결합성 항체 단편은 해리 상수가 $1 \mu\text{M}$ 이하, 바람직하게는 100 nM 이하, 가장 바람직하게는 10 nM 이하인 경우에 항원과 특이적으로 결합하는 것으로 간주된다. 결합은 당업자에게 공지된 방법에 의해 측정할 수 있는데, 이의 한 예가 BIAcore™ 기기를 사용하는 것이다. 본래의 항체 일부, 바람직하게는 본래 항체의 항원 결합성 영역 또는 가변 영역을 포함한다. 결합성 단편에는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아바디 (diabody); 선형 항체; 단일쇄 항체 분자 및 그의 항체 단편으로부터 형성된 다중 특이적 항체가 포함된다 (문헌 [C.A.K Borrebaeck, editor (1995) Antibody Engineering (Breakthroughs in Molecular Biology), Oxford University Press; R. Kontermann & S. Duebel, editors (2001) Antibody Engineering (Springer Laboratory Manual), Springer Verlag] 참고). "이중 특이적" 또는 "이기능성 (bifunctional)" 항체 이외의 항체는 그의 결합성 부위가 각각 동일한 것으로 여겨진다.

[0059] "에피토프"에는 면역글로불린 또는 T-세포 수용체와 특이적으로 결합할 수 있는 모든 단백질 결정기가 포함된다. 에피토프성 결정기는 통상적으로, 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면 집단으로 이루어지고, 통상적으로 특이적인 3차원 구조 특징 뿐만 아니라 특이적 전하 특징을 지니고 있다. 당업자에게 널리 공지된 방법에 의해, 하나의 항체가 경쟁적 결합 점정에서 제2의 항체와 경쟁하는 것으로 밝혀진 경우에는, 이러한 2개의 항체가 "동일한 에피토프와 결합"하는 것으로 간주된다.

[0060] "재조합체" 또는 "재조합 DNA 분자"는 천연이 아니거나, 또는 그 밖의 2개의 분리된 서열 절편을 인공적으로 조합함으로써 만든 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. "재조합적으로 생성된"이란, 화학적 합성 수단에 의해 달성되거나, 또는 폴리뉴클레오티드의 분리된 절편을 인공적으로 조작함으로써, 예를 들어, 유전 공학 기술에 의해 종종 달성되는 인공적 조합을 의미한다. 이러한 조작은 통상적으로, 서열 인식 부위를 전형적으로 도입 또는 제거하면서, 특정 코돈을 동일하거나 보존적인 아미노산 서열을 코딩하는 중복 (과잉) 코돈으로 대체시키기 위해 수행된다. 또 다른 한편, 이는 폴리뉴클레오티드 절편을 목적하는 기능기와 함께 연결시켜, 통상의 천연 형태에서는 발견되지 않는 목적하는 기능기 조합을 포함하는 단일 유전자 실체를 생성시키기 위해 수행한다. 제한 효소 인식 부위, 조절 서열, 제어 서열, 또는 기타 유용한 특징들을 고안하여 혼입시킬 수 있다. "재조합 DNA 분자"에는 클로닝 및 발현 벡터가 포함된다. "재조합체"는 폴리펩티드를 코딩하고 재조합 DNA 기술을 이용하여 제조되는 폴리뉴클레오티드를 지칭할 수도 있다.

[0061] "단리된"이란 "인간의 수(手) 작업에 의해" 그의 천연 상태에서부터 변경된 것을 의미하는데, 즉 천연에 존재하는 경우에는 그의 본래의 환경으로부터 변화 또는 제거시키거나 또는 변화와 제거를 둘 다 수행한 것을 의미한다.

예를 들어, 천연 상태로 살아있는 동물에 본래부터 존재하는 천연의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 "단리된" 것이 아니지만, 그의 천연 상태의 공존하는 물질로부터 격리된 동일한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드가 본원에 이용되는 바와 같은 "단리된" 것이다. 예를 들어, 폴리뉴클레오티드와 관련하여, 용어 "단리된"이란 이것이 천연상 존재하는 염색체 및 세포로부터 격리되는 것을 의미한다. 폴리뉴클레오티드와 폴리펩티드는 조성물, 예를 들면 배지 제형; 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 세포 내로 도입하기 위한 용액; 천연이 아닌 조성물인, 화학적 또는 효소적 반응을 위한 조성물 또는 용액에 존재할 수 있고, 그 내부에는 본원에 이용되는 바와 같은 의미 내의 단리된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드가 여전히 존재한다.

[0062] "실질적으로 순수한" 및 "실질적으로 상동성"이란 상호 교환적으로 사용되고, RG1 폴리펩티드 또는 그의 단편, 또는 이들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 절편을 기재하는데, 이러한 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 이를 본래부터 수반하고 있는 성분들로부터 격리시킨다. RG1 폴리펩티드 또는 그의 단편, 또는 이들을 코딩하는 DNA 절편은, 이를 천연 상태로 수반하고 있는 본래의 오염물질로부터 격리시킨 경우에 천연상 연합된 성분들이 실질적으로 없다. 따라서, 화학적으로 합성되거나 또는 천연상 유래되는 세포와는 상이한 세포성 시스템에서 합성된 폴리펩티드는 그의 천연상 연합된 성분들이 실질적으로 없을 것이다. 유사하게, 화학적으로 합성되거나 또는 천연상 유래되는 세포와는 상이한 세포성 시스템에서 합성된 폴리뉴클레오티드는 그의 천연상 연합된 성분들이 실질적으로 없을 것이다.

[0063] "폴리머라제 연쇄 반응" 또는 "PCR"은 특이적 DNA 조각을 미국 특허 제4,683,195호 (1987년 7월 28일자로 허여됨)에 기재된 바와 같이 증폭시키는 과정을 지칭한다. 일반적으로, 올리고뉴클레오티드 프라이머를 고안할 수 있도록 하기 위해, 관심있는 또는 그 밖의 폴리펩티드 단편의 말단으로부터 서열 정보를 입수할 수 있는 것이 필요하며; 이들 프라이머는 서로에 대해 점 (point)일 것이고, 증폭시키고자 하는 주형의 반대편 쇄와 서열 면에서 동일하거나 유사할 것이다. 2개 프라이머의 5' 말단 뉴클레오티드는 증폭된 물질의 말단과 일치할 것이다. PCR을 사용하여 총 게놈 RNA, 총 세포성 RNA로부터 전사된 cDNA, 플라스미드 서열 등으로부터 특이적 DNA 서열을 증폭시킬 수 있다 (문헌 [Mullis et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 51: 263, 1987; Erlich, ed., PCR Technology, Stockton Press, NY, 1989] 참고).

[0064] "엄격성"은 전형적으로, 약 T_m (융점) -5°C (프로브 T_m 보다 5°C 아래) 내지 T_m 보다 약 20 내지 25°C 아래의 범위에서 발생한다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 엄격한 혼성화를 이용하여 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 확인 또는 검출하거나, 또는 유사하거나 관련된 폴리뉴클레오티드 서열을 확인 또는 검출할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "엄격한 조건"은 서열들 간의 동일성이 95% 이상, 바람직하게는 97% 이상인 경우에만 혼성화가 발생한다는 것을 의미한다.

[0065] 본원에 사용된 바와 같은 "혼성화"에는 "폴리뉴클레오티드 쇄가 염기 짝짓기를 통하여 상보적 쇄와 연결되게 하는 모든 프로세스"가 포함되어야 한다 (문헌 [Coombs, J., Dictionary of Biotechnology, Stockton Press, New York, N. Y., 1994] 참고).

[0066] "치료 유효 용량"은 특정 질환 상태의 증상이나 질환을 완화시켜 주는, 폴리펩티드 또는 그의 항체, 길항제 또는 억제제 (안티센스 분자 및 리보자임 포함)의 양을 지칭한다. 특정 용량이 종양 또는 전이성 성장을 느리게 하거나 중단시키거나, 또는 종양 또는 전이 크기를 수축시켜 대상체의 수명을 연장시킬 수 있도록 해주는 경우에, 이는 암이나 그의 전이를 치료하는데 있어 치료 유효 용량으로 간주된다. 특정 용량이 환자의 전반적인 삶의 질을 향상시켜주는 경우, 즉 환자의 통증을 경감시켜 주는 경우에도, 치료 유효 용량으로 간주된다. 상기 화합물의 치료 효능 및 독성은 세포 배양물 또는 실험용 동물에서의 표준 제약 과정, 예를 들어, ED_{50} (해당 집단의 50%에게서 치료 유효 용량) 및 LD_{50} (해당 집단의 50%에 치사적인 용량)에 의해 결정할 수 있다. 치료 효과와 독성 효과 간의 용량 비는 치료 지수이고, 이는 ED_{50}/LD_{50} 비로서 표현할 수 있다.

[0067] 본원에 사용된 바와 같은, "치료하는" 또는 "치료 (치치)"는 인간 환자의 질환 상태를 치료하는 것을 포괄하는데, 이러한 질환 상태에는 RG1의 수준 증가를 특징적으로 나타내는 질환 상태, 예를 들면, 전립선 암 또는 전이가 많이 진행된 전립선 암이 포함된다.

[0068] 항체

[0069] 본 발명은 RG1 폴리펩티드, 특히 서열 2의 아미노산 서열을 갖는 RG1 폴리펩티드와 특이적으로 결합하는 항체, 항원 결합성 항체 단편, 및 이러한 항체 및 단편의 변이체에 관한 것이다. 이들 항체는, 예를 들어, 폴리클로날 또는 모노클로날 항체일 수 있다. 모노클로날 항체가 보다 바람직하다. 보다 더 바람직한 것은 키메라 또

는 인간화 항체이고, 보다 더 바람직한 것은 인간 항체이다.

- [0070] 본 발명에서 고려된 항체, 항원 결합성 항체 단편, 및 이러한 항체 및 단편의 변이체는 RG1 폴리펩티드의 에피토프와 1 μ M 이하의 해리 상수 (K_D)로 결합한다. 100 nM 이하의 K_D 로 결합하는 항체가 보다 바람직하다. 10 nM 이하의 K_D 로 결합하는 항체가 가장 바람직하다. 다음에 기재된 항체가 결합하는 에피토프와 동일한 에피토프를 인식 및 결합하고, 당업자에게 널리 공지된 기술을 사용하여 경쟁적 결합 연구를 통하여 결정될 수 있는 항체가 또한 고려된다.
- [0071] 상기 항체, 항원 결합성 항체 단편, 및 이러한 항체 및 단편의 변이체는 경쇄 가변 영역과 중쇄 가변 영역으로 구성된다. 이와 관련하여 본 발명의 바람직한 양태는 서열 26 또는 서열 29의 아미노산 서열과의 서열 동일성이 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 보다 더 바람직하게는 99%인 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체, 항원 결합성 항체 단편 또는 이들의 변이체이다. 또한 바람직한 양태는 서열 27, 서열 28, 서열 30 또는 서열 31의 아미노산 서열과의 서열 동일성이 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상, 보다 더 바람직하게는 99%인 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체, 항원 결합성 항체 단편 또는 이들의 변이체이다 (도 3 및 4 참고).
- [0072] 본 발명의 특히 바람직한 양태는 서열 20 및 서열 23의 뉴클레오티드 서열에 의해 각각 코딩되는, 서열 26 또는 서열 29의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합성 항체 단편 또는 이들의 변이체이다.
- [0073] 또한 특히 바람직한 것은 서열 21, 22, 24 및 25의 뉴클레오티드 서열에 의해 각각 코딩되는, 서열 27, 28, 30 또는 31 중에서 선택된 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합성 항체 단편 또는 이들의 변이체이다.
- [0074] 이와 관련하여 보다 특히 바람직한 것은 서열 26의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하고 서열 27 또는 서열 28의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 추가로 포함하는 항체 또는 그의 항원 결합성 항체 단편 또는 이들의 변이체; 및 서열 29의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역을 포함하고 서열 30 또는 서열 31의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역을 추가로 포함하는 제2의 항체이다.
- [0075] 가장 바람직한 것은 다음과 같은 인간 항체 또는 그의 항원 결합성 항체 단편 또는 이들의 변이체이다: (a) 서열 26의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역과 서열 27의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역으로 구성된 항체; (b) 서열 26의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역과 서열 28의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역으로 구성된 항체; (c) 서열 29의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역과 서열 30의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역으로 구성된 항체; 또는 (d) 서열 29의 아미노산 서열을 갖는 경쇄 가변 영역과 서열 31의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 영역으로 구성된 항체.
- [0076] 항체 생성
- [0077] RG1 폴리펩티드, 단편 또는 유도체, 또는 이들을 발현하는 세포를 면역원으로서 사용하여, 이에 대한 항체를 생성시킬 수 있다 (문헌 [Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)] 참고). 이러한 항체 및 단편을 생성시키기 위해, 당해 분야에 공지된 각종 과정을 사용할 수 있다 (문헌 [C.A.K Borrebaeck, editor (1995) Antibody Engineering (Breakthroughs in Molecular Biology), Oxford University Press; R. Kontermann & S. Duebel, editors (2001) Antibody Engineering (Springer Laboratory Manual), Springer Verlag] 참고).
- [0078] RG1에 대하여 생성된 항체는 상기 폴리펩티드를 동물에게 직접 주사하거나 또는 이러한 폴리펩티드를 동물, 바람직하게는 비인간 동물에게 투여함으로써 획득할 수 있다. 이와 같이 하여 획득된 항체는 폴리펩티드 자체와 결합할 것이다. 이러한 방식으로, 단지 상기 폴리펩티드의 단편만을 코딩하는 서열을 사용해서도 완전한 본래의 폴리펩티드와 결합하는 항체를 생성시킬 수 있다. 이어서, 상기 항체를 사용하여, 해당 폴리펩티드를 발현하는 조직으로부터 이러한 폴리펩티드를 분리시킬 수 있다. RG1에 대한 항체를 생성시키기 위해 정제된 RG1 단백질 또는 RG1 펩티드의 사용을 요구하지 않는 대체 방법에는, RG1을 코딩하는 DNA를 이용하여 발현 벡터 또는 바이러스를 창출시키고, 이를 사용하여 숙주 조직 세포를 형질감염 또는 감염시켜, 항체를 생성시키기 위해 사용되었던 동물에게서 RG1을 발현시키는 'DNA 면역화' 방법; 또는 시험관 내에서 창출된 RG1을 발현하는 세포주를 면역화 과정에 사용하는 세포 이용 (세포계) 면역화 방법이 포함된다.
- [0079] 연속적인 세포주 배양물에 의해 생성된 항체를 제공하는 모든 기술을 사용하여, 모노클로날 항체를 제조할 수

있다. 이의 예로는 하이브리도마 기술 (문헌 [Kohler and Milstein, Nature 256: 495-497, 1975] 참고), 인간 B-세포 하이브리도마 기술 (문헌 [Kozbor et al., Immunology Today 4: 72,1983] 참고) 및 인간 모노클로날 항체를 생성하기 위한 EBV-하이브리도마 기술 (문헌 [Cole et al., in Monoclonal Antibodies and Cancer, Alan R. Liss, Inc., 77-96, 1985] 참고)이 있다. RG1을 발현하는 세포주를 이용하는 세포계 면역화 방법의 경우에는, 감법적 면역화를 이용하여 해당 동물을 모 세포주에 대해 면역관용화시킬 수 있다 (문헌 [Sleister, H. M. and Rao, A. G., J. Immunological Methods 261: 213-220, 2002] 참고).

[0080] 또한, "키메라 항체"를 생성시키기 위해 개발된 기술인, 적당한 항원 특이성과 생물학적 활성을 지닌 분자를 수득하기 위해 마우스 항체 유전자를 인간 항체 유전자로 스플라이싱하는 기술을 사용할 수 있다 (문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855, 1984; Neuberger et al., Nature 312: 604-608, 1984; Takeda et al., Nature 314: 452-454, 1985] 참고). 또 다른 한편, 단일쇄 항체를 생성하는 것으로 보고된 기술 [참고: 미국 특허 제4,946,778호]을, RG1-특이적 단일쇄 항체를 생성하도록 적응시킬 수 있다.

[0081] 더우기, 미국 특허 제5,877,397호 및 제5,569,825호 (이들 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 기재된 방법을 사용하거나, 또는 문헌 [참고: Mendez et al. Nature Genetics 15: 146-156, 1997]에 기재된 바와 같은 제노마우스™ (Xenomouse™)의 사용을 통하여, "인간" 항체를 생성시킬 수 있다. 이러한 항체는 또한, 파아지 디스플레이 (phage display) 기술을 사용하여 생성시킬 수 있다 (문헌 [Rader et al., Current Opinion in Biotechnology 8: 155-168, 1997; Aujame et al., Human Antibodies 8: 155-168, 1997] 참고). 인간 항체의 생성은, 이러한 항체가 마우스 또는 마우스 유래된 모노클로날 항체에 내재된 면역원성 반응과 알레르기성 반응을 최소화시켜줄 것으로 예상된다는 점에서 매우 흥미롭다. RG1 폴리펩티드 (서열 2)의 에피토프를 인식하는 인간 항체의 생성이 실시예 4에 기재되어 있다.

[0082] 항체는 또한, 문헌 [참고: Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837, 1989 and Winter and Milstein, Nature 349: 293-299, 1991]에 기재된 바와 같이, 고도로 특이적인 결합성 시약의 제조할 면역글로불린 라이브러리 또는 패널을 스크리닝하거나, 또는 림프구 집단 내에서 생체내 생성을 유도함으로써 생성시킬 수 있다.

[0083] RG1에 대한 특이적 결합 부위를 함유하는 항체 단편을 생성시킬 수도 있다. 완전한 항체 보다 오히려 항체 단편을 사용하는 것이 종종 유리하기도 한데, 이는 보다 작은 크기의 단편이 보다 신속한 청소율을 유도할 수 있고, 고형 종양에 대한 개선된 접근을 제공해줄 수도 있기 때문이다.

[0084] 상기 단편에는 항체 분자를 펩신 분해시킴으로써 생성될 수 있는 F(ab')₂ 단편; 및 F(ab')₂ 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 생성될 수 있는 Fab 단편이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 또 다른 한편으로, Fab 발현 라이브러리를 구축하여, 목적하는 특이성을 지닌 모노클로날 Fab 단편을 신속하고도 용이하게 확인할 수 있다 (문헌 [Huse et al., Science 256: 1270-1281, 1989] 참고). Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편을 모두 이. 콜라이 또는 각종의 진행 세포 발현 시스템에서 발현시키고 이로부터 분비시켜, 이들 단편을 다량으로 생성시키게 할 수 있다. 또 다른 한편, Fab'-SH 단편을 이. 콜라이로부터 직접 회수하고, 이들을 화학적으로 커플링시켜 F(ab')₂ 단편을 형성시킬 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)] 참고). 항체 단편을 생성시키기 위한 기타 기술은 당업자에게 공지되어 있다. 단일쇄 Fv 단편 (scFv), 디아바디, 미니바디 (minibody) 및 공학적으로 처리한 기타 항체 단편을 계획하기도 한다 (문헌 [미국 특허 제5,576,189호 및 제5,587,458호; Hudson et al. Nature Medicine 9: 129-133, 2003] 참고). Fv 및 sFv 단편은 불변 영역이 없는 본래의 결합 부위를 갖는 종류의 예이므로, 이들 단편은 생체내 사용시 감소된 비특이적 결합을 나타내는 것으로 여겨지고, 조영제로서 사용하기에 특히 바람직하다 (문헌 [C.A.K Borrebaeck, editor (1995) Antibody Engineering (Breakthroughs in Molecular Biology), Oxford University Press; R. Kontermann & S. Duebel, editors (2001) Antibody Engineering (Springer Laboratory Manual), Springer Verlag] 참고). 상기 항체 단편은, 예를 들어 미국 특허 제5,641,870호에 기재된 바와 같이, "선형 항체"일 수도 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일-특이적 또는 이중-특이적일 수 있다.

[0085] 본원에 기재된 항체 또는 항체 단편의 변이체가 또한 고려되고, 이는 보존적 및 비-보존적 돌연변이를 위한 기술 및 지침서를 이용하여 만들 수 있다 [예를 들어, 미국 특허 제5,364,934호 참고]. 변이에는, 본래의 항체 서열과 비교할 때 아미노산 서열이 변화되는, 항체를 코딩하는 하나 이상의 코돈의 치환, 결실 또는 삽입이 포함된다. 본원에 고려된 이러한 변이의 용도에는 (1) 산화 반응에 의한 불활성화 또는 단백질 분해작용에 대한 감수성을 감소시켜 주고; (2) 단백질 복합체를 형성하기 위한 결합 친화성, 또는 항원에 대한 결합 친화성을 변경시켜 주며; (3) 생체내 청소율 또는 생체내 분포를 변경시켜 주고; (4) 항체 이소형 (isotype) 또는 동종이형

(allotype)을 변화시켜 주며; (5) 항체의 기능적 특성, 예를 들면 Fc 수용체 결합성을 변화시켜 주고; (6) 면역 원성을 감소 또는 증가시키기 위해 에피토프 서열을 변경시켜 주며; (7) 상기 유사체의 생리화학적 또는 기능적 특성 상의 기타 변화를 유발시키는 것이 포함된다. 목적하는 활성에 불리한 영향을 미치지 않으면서도 아미노산 잔기를 삽입, 치환 또는 결실시킬 수 있는지를 결정하는데 있어서의 지침은 RG1 항체와 상동성 단백질 간의 고도로 상동성인 영역에서 만들어진 아미노산 서열 변화 수를 최소화함으로써 밝혀질 수 있다. 허용된 변이는 서열 중의 아미노산의 삽입, 결실 또는 치환을 계통적으로 만든 다음, 이로써 생성된 변이체를 대상으로 하여, 본래 서열에 의해 나타난 활성에 대해 시험함으로써 결정할 수 있다.

[0086] 특히 바람직한 유형의 치환 변이체는 모 항체 (예: 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기를 치환시키는 것과 관련이 있다. 일반적으로, 추가의 개발을 위해 선택된, 상기와 같이 하여 생성된 변이체(들)는 이들을 발 생시킨 모 항체와 비교할 때 개선된 생물학적 특성을 지닐 것이다. 이러한 치환 변이체를 생성시키기 위한 편 리한 방식은 파아지 디스플레이를 이용하는 친화성 성숙 과정을 포함한다 (문헌 [Schier R., J. Mol. Biol., 263: 551-67, 1996] 참고). 이어서, 상기 변이체들을 대상으로 하여, 본원에 기재된 바와 같이 (실시예 4 참고) 그들의 생물학적 활성 (예: 결합 친화성)에 대해 스크리닝한다. 변형시키기에 우수한 후보물질일 수 있는 추가변 영역 잔기를 확인하기 위해, 알라닌 스캐닝 돌연변이 유발을 수행하여, 항원 결합성에 상당히 기여하는 추가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 한 가지 이상의 관련 검정에서 탁월한 특성을 나타내는 항체는 추가 개발 을 위해 시험할 수 있다.

[0087] 본원에 제시된 RG1의 아미노산 서열 (서열 2)을 사용하여, 항체를 생성하기 위한 RG1 폴리펩티드의 특이적 영역 을 선별할 수 있다. 당업자에 의해 인지되는 바와 같이, 항체가 지시되는 RG1 폴리펩티드의 영역 또는 에피토프 는 의도한 용도에 따라서 다양할 수 있다. 예를 들어, 전립선 세포 상의 막-결합된 RG1을 검출하기 위한 면 역검정에 사용하도록 의도된 항체는 RG1 폴리펩티드 상의 접근 가능한 에피토프에 대하여 지시되어야 한다. 면 역원성 구조를 나타내는 RG1 폴리펩티드의 영역 뿐만 아니라 기타 영역과 도메인은 당해 분야에 공지된 각종의 기타 방법, 예를 들면, 초우-파스만 (Chou-Fasman), 가르니어-롭슨 (Garnier-Robson), 또는 제임슨-울프 (Jameson-Wolf) 분석 방법을 사용하여 용이하게 확인할 수 있다. 이들 잔기를 함유하는 단편은 항-RG1 항체를 생성시키는데 있어 특히 적합하다. 유용한 단편에는 서열 PLGGESICSAGAPAKYSIT (서열 8); HSSDYSMWKNQYVS (서열 10); DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (서열 11); 및 NEIVDSASVPET (서열 12)가 포함되지만, 이에 제한되지 않 는다. 이들 영역에 대한 폴리클로날 항체의 생성이 실시예 4에 기재되어 있다.

[0088] RG1의 에피토프를 인식하는 항체의 용도

[0089] 본 발명의 항체, 항원 결합성 항체 단편 및 이들의 변이체는 RG1이 과발현되는 암 (이에는 전립선 암, 신장 암, 결장 암 및 난소 암이 포함된다)을 관리하기 위한 진단 검정, 조영 방법론 및 치료 방법에 특히 유용할 수 있다.

[0090] 본 발명은 RG1 폴리펩티드를 검출하고 암, 예를 들면, 전립선 암을 진단하는데 유용한 각종의 면역학적 검정을 제공해준다. 이러한 검정은 일반적으로, RG1 폴리펩티드를 인식하고 결합할 수 있는 하나 이상의 RG1 항체를 포함한다. 가장 바람직한 항체는 RG1과 선택적으로 결합할 것이고, 비-RG1 폴리펩티드와는 결합하지 않거나 약 하게 결합할 것이다. 이러한 검정에는 당해 분야에 널리 공지된 각종의 면역학적 검정 포맷이 포함되며, 이의 예로는 각종 유형의 방사성 면역검정, 효소 결합 면역흡착 검정 등이 있지만, 이에 제한되지 않는다. 또한, 전 립선 암을 검출할 수 있는 면역학적 조영 방법 또한 본 발명에 의해 제공되는데, 이에는 표지된 RG1 항체를 사 용하는 방사성-신티그래픽 조영 방법이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 이러한 검정은 암, 예를 들면, 전 립선 암을 검출, 모니터링 및 예후하는데 있어 임상적으로 유용할 수 있다.

[0091] 상기 언급된 항체를 이용하여, 친화 크로마토그래피에 의해 분리 및(또는) 정제하기 위해 이러한 항체를 고정 지지체에 부착시킴으로써 본 발명의 폴리펩티드를 정제하거나 또는 이러한 폴리펩티드를 발현하는 클론을 분리 또는 확인할 수 있다.

[0092] 부가적으로, RG1 항체를 사용하여, 세포 분류 및 정제 기술을 이용하여 RG1 양성 세포를 분리할 수 있다. 특히, RG1 항체를 사용하여, 항체 이용 세포 분류 또는 친화 정제 기술을 이용하여 이중이식편 종양 조직으로부터, 배양 중인 세포로부터 전립선 암을 분리시킬 수 있다. 본 발명의 RG1 항체의 기타 용도에는 RG1 폴리펩티 드를 모방하는 항-인자형 항체를 생성시키는 것이 포함된다.

[0093] RG1 항체는 전립선 암 또는 종양 전이의 존재 여부를 검출하는데 이용할 수 있다. 혈청, 전립선 및 기타 조직 생검 표본을 포함한 각종의 생물학적 샘플 내에 상기 RG1-함유 세포가 존재하는지의 여부는 RG1 항체를 이용하

여 검출할 수 있다. 또한, RG1 항체는 각종의 조영 방법론, 예를 들면, ^{99m}Tc (또는 기타 동위원소) 접합된 항체를 사용하는 면역신티그래피에서 사용할 수 있다. 예를 들어, ^{111}In 접합된 항-PSMA 항체를 사용하여 최근에 보고된 것과 유사한 조영 프로토콜을 사용하여, 재발 및 전이성 전립선 암종을 검출할 수 있다 (문헌 [Sodee et al., Clin. Nuc. Med. 21: 759-766, 1997] 참고). 사용될 수 있는 또 다른 검출 방법은 양전자 방출 단층촬영술이다 (문헌 [Herzog et al., J. Nucl. Med. 34: 2222-2226, 1993] 참고).

[0094] 본 발명의 RG1 항체는 검출가능한 마커로 표지시키거나 또는 제2의 분자, 예를 들면 세포독성제에 접합시킬 수 있고, RG1 양성 세포에 대한 제2의 분자를 표적화하는데 사용할 수 있다 (문헌 [Vitetta, E. S. et al., Immunotoxin Therapy, in DeVita, Jr, V. T. et al., eds, Cancer: Principles and Practice of Oncology, 4th ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 2624-2636, 1993] 참고). 세포독성제의 예에는 리신 (ricin), 독소루비신 (doxorubicin), 다우노루비신 (daunorubicin), 탁솔 (taxol), 에티뮴 브로마이드, 미토마이신 (mitomycin), 에토포시드 (etoposide), 테노포시드 (tenoposide), 빈크리스틴 (vincristine), 빈블라스틴 (vinblastine), 콜히친 (colchicine), 디히드록시 안트라신 디온, 악티노마이신 (actinomycin) D, 디프테리아 독소, 에포틸론 (epothilones), 슈도모나스 (*Pseudomonas*) 외독소 (PE) A, PE40, 압린 (abrin) 및 글루코코르티코이드, 및 기타 화학요법제 뿐만 아니라 방사성 동위원소가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 항체를 목적하는 항종양 생물학적 활성을 지닌 적당한 사이토킨, 케모카인, 인터페론 또는 성장 인자에 유전적 또는 화학적으로 융합시킴으로써, 세포독성 또는 항증식성 표적화 융합 단백질을 생성시킬 수 있다 (문헌 [Asgeirsdottir et al., Biochem. Pharmacol. 15: 1729-1739, 2003] 참고). 적합한 검출가능한 마커에는 방사성 동위원소, 형광성 화합물, 생물발광성 화합물, 화학발광성 화합물, 금속 킬레이트제 또는 효소가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다. 면역요법에 적합하거나 검출가능한 마커로서 사용하기에 적합한 방사성 동위원소에는 다음이 포함된다: 안티몬-124, 안티몬-125, 비소-74, 바륨-103, 바륨-140, 베릴륨-7, 비스무트-j206, 비스무트-207, 카드뮴-109, 카드뮴-115m, 칼슘-45, 세륨-139, 세륨-141, 세륨-144, 세슘-137, 크롬-51, 코발트-56, 코발트-57, 코발트-58, 코발트-60, 코발트-64, 에르븀-169, 유로퓸-152, 가돌리늄-153, 금-195, 금-199, 하프늄-175, 하프늄-181, 인듐-111, 요오드-123, 요오드-131, 이리듐-192, 철-55, 철-59, 크립톤-85, 납-210, 루테튬-177, 망간-54, 수은-197, 수은-203, 폴리브덴-99, 네오디뮴-147, 넵튬-237, 니켈-63, 니오븀-95, 오스뮴-185+191, 팔라듐-103, 백금-195m, 프라세오디뮴-143, 프로메튬-147, 프로타티늄-233, 라듐-2226, 레늄-186, 루비듐-86, 루테튬-103, 루테튬-106, 스칸듐-44, 스칸듐-46, 셀레늄-75, 은-110m, 은-111, 나트륨-22, 스트론튬-85, 스트론튬-89, 스트론튬-90, 황-35, 탄탈-182, 테크네튬-99m, 테롤륨-125, 텔루륨-132, 탈륨-170, 탈륨-204, 토륨-228, 토륨-232, 주석-113, 티탄-44, 텅스텐-185, 바나듐-48, 바나듐-49, 이테르븀-169, 이트륨-88, 이트륨-90, 아연-65, 및 지르코늄-95.

[0095] 항체의 방사성 표지화는 항체에 공유적으로 부착되는 킬레이트제 (방사성 핵종이 이러한 킬레이트제에 삽입되었다)를 사용하여 달성한다. 바람직한 킬레이트제는 문헌 [참고: Srivagtava et al. Nucl. Med. Bio. 18: 589-603, 1991 and McMurry et al., J. Med. Chem. 41: 3546-3549, 1998]에 기재되어 있거나, 또는 문헌 [참고: H. Chong, K. et al., J. Med. Chem. 45: 3458-3464, 2002] (이들 문헌 모두의 전문이 본원에 참고로 도입된다)에 공개된 소위 NOTA 킬레이트로부터 유도된다. RG1 항체에 방사성 동위원소를 접합시키는데 있어 특히 바람직한 것은 이기능성 킬레이트제 p-SCN-벤질-DTPA의 유도체 (문헌 [Brechtbiel et al. Inorg. Chem. 25: 2772-2781, 1986] 참고), 예를 들면, 시클로헥실-DTPA (CHX-A"-DTPA, 문헌 [Wu et al., Bioorg. Med. Chem. 10: 1925-1934, 1997] 참고) 및 MX-DTPA (1B4M-DTPA, 문헌 [McMurry et al., J. Med. Chem., 41: 3546-3549, 1998] 참고) 뿐만 아니라 1,4,7-트리아자시클로노난-N,N',N"-트리아세트산 (NOTA) (문헌 [Chong et al. J. Med. Chem. 45: 3458-3464, 2002] 참고)이다. 접합은 문헌 [참고: Nikula et al. Nucl. Med. Biol. 3: 387-390, 1995]의 방법에 의해 달성할 수 있다. 면역신티그래피에 대한 검출가능한 마커로서 사용하기에 특히 바람직한 것은 방사성 동위원소 ^{111}In 또는 ^{99m}Tc 이다. 양전자 방출 단층촬영술에 바람직한 검출가능한 마커는 ^{43}Sc , ^{44}Sc , ^{52}Fe , ^{55}Co , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{86}Y 및 ^{94m}Tc 이다. 면역요법의 경우에는, 베타 방출성 방사성 동위원소 ^{46}Sc , ^{47}Sc , ^{48}Sc , ^{72}Ga , ^{73}Ga , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{109}Pd , ^{111}Ag , ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re 및 ^{188}Re , 및 알파 방출성 동위원소 ^{211}At , ^{211}Bi , ^{212}Bi , ^{213}Bi 및 ^{214}Bi 를 사용할 수 있다. 바람직한 것은 ^{90}Y , ^{177}Lu , ^{72}Ga , ^{153}Sm , ^{67}Cu 및 ^{212}Bi 이고, 특히 바람직한 것은 ^{90}Y 및 ^{177}Lu 이다.

[0096] 전립선 암 및 기타 암에 대한 면역요법

- [0097] 본 발명은 전립선 암 및 기타 암을 치료하기 위한 각종의 면역치료 방법을 제공하는데, 이에 는 항체 요법, 생체 내 백신, 및 생체의 면역요법 접근법이 포함된다. 기타 암에는 신장암, 결장암 및 난소암이 포함된다. 한 가지 접근법에서, 본 발명은 전립선 암을 치료하기 위해 전신 사용할 수 있는 RG1 항체를 제공한다. 예를 들어, 접합되지 않은 RG1 항체를 환자에게 도입하여, 이러한 항체가 전립선 암세포 상의 RG1, 전립선 암세포 내의 RG1, 또는 전립선 암세포와 관련된 RG1와 결합하도록 하고; 보체 매개형 세포 분해, 항체 의존성 세포성 세포독성, RG1의 생리학적 기능 변경, 및(또는) 리간드 결합 또는 신호 변환 경로의 억제를 포함할 수 있는 기전에 의해 상기 세포와 종양의 파괴를 매개하도록 한다. 상기 언급된 바와 같은, 독성제, 예를 들면, 리신 또는 방사성 동위원소에 접합된 RG1 항체를 또한 치료상 사용하여, 상기 독성제를 RG1-보유 전립선 종양 세포에 직접적으로 전달함으로써, 이러한 종양 세포를 붕괴시킬 수 있다.
- [0098] RG1 항체를 사용하는 전립선 암 면역 요법은, 결장암 (문헌 [Arlen et al., Crit. Rev. Immunol. 18: 133-138, 1998] 참고), 다발성 골수종 (문헌 [Ozaki et al., Blood 90: 3179-3186, 1997; Tsunenari et al., Blood 90: 2437-2444, 1997] 참고), 위암 (문헌 [Kasprzyk et al., Cancer Res. 52: 2771-2776, 1992] 참고), B-세포 림프종 (문헌 [Funakoshi et al., Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19: 93-101, 1996] 참고), 백혈병 (문헌 [Zhong et al., Leuk. Res. 20: 581-589, 1996] 참고), 결장직장암 (문헌 [Moun et al., Cancer Res. 54: 6160-6166, 1994; Velders et al., Cancer Res. 55: 4398-4403, 1995] 참고), 및 유방암 (문헌 [Shepard et al., J. Clin. Immunol. 11: 117-127, 1991] 참고)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 기타 유형의 암과 관련하여 성공적으로 이용되어 왔던 각종 접근법으로부터 발생한 기술을 따를 수 있다.
- [0099] 추가로, 본 발명은 RG1 폴리펩티드 또는 그의 단편을 함유하도록 제형화시킨 백신을 제공한다. 항암 요법에 사용하기 위한 체액성 면역과 세포 매개성 면역을 생성시키기 위해 백신 내에 종양 항원을 사용하는 것은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 인간 PSMA 및 설치류 PAP 면역원을 사용하여 전립선 암에 이용되어 왔다 (문헌 [Hodge et al., Int. J. Cancer 63: 231-237, 1995; Fong et al., J. Immunol. 159: 3113-3117, 1997] 참고). 이러한 방법은 RG1 폴리펩티드 또는 그의 단편, 또는 RG1 면역원을 발현하고 적절하게 제시할 수 있는 RG1 코딩 핵산 분자 및 재조합 벡터를 이용함으로써 용이하게 실시할 수 있다.
- [0100] 예를 들어, 바이러스성 유전자 전달 시스템을 사용하여 RG1 코딩 핵산 분자를 전달할 수 있다. 이러한 본 발명의 국면을 실시하는데 사용될 수 있는 다양한 바이러스성 유전자 전달 시스템에는 백시니아, 조류폭스 (fowlpox), 카나리폭스 (canarypox), 아데노바이러스 (adenovirus), 인플루엔자 (influenza), 폴리오바이러스 (poliovirus), 아데노 관련 바이러스, 렌티바이러스 (lentivirus), 및 신드비스 바이러스 (sindbis virus)가 포함되지만, 이에 제한되지 않는다 (문헌 [Restifo, in Curr. Opin. Immunol. 8: 658-663, 1996] 참고). 항종양 반응을 유도시키기 위해 환자에게 도입된 (즉, 근육내 도입됨) RG1 폴리펩티드 또는 그의 단편을 코딩하는 노출된 (있는 그 대로의) DNA를 사용함으로써, 비-바이러스성 전달 시스템을 이용할 수도 있다. 한 양태에서는, 완전한 길이의 인간 *rg1* cDNA를 이용할 수도 있다. 또 다른 양태에서는 인간 *rg1* cDNA 단편을 이용할 수 있다. 또 다른 양태에서는, 특이적 T 림프구 (CTL) 에피토프를 코딩하는 *rg1* 핵산 분자를 이용할 수 있다. CTL 에피토프는, 명시된 HLA 대립유전자와 최적으로 결합할 수 있는 RG1 폴리펩티드 내의 펩티드를 확인하기 위해 특이적 알고리즘 (예를 들면, Epimer, Brown University)을 사용하여 결정할 수 있다.
- [0101] 다양한 생체의 전략을 이용할 수도 있다. 한 가지 접근법은 환자의 면역계에 대한 항원으로서 RG1 폴리펩티드를 표시하기 위해 수지상 세포를 이용하는 것을 포함한다. 수지상 세포는 MHC 부류 I 및 II, B7 조자극인자, 및 IL-12를 발현하므로, 고도의 특수 항원 제시 세포이다. 전립선 암에서는, 전립선-특이적 막 항원 (PSMA)의 펩티드로 펄스된 자기 유래 (autologous) 수지상 세포를 I기 임상 시도에 사용하여 전립선 암 환자의 면역계를 자극한다 (문헌 [Tjoa et al., Prostate 28: 65-69, 1996; Murphy et al., Prostate 29: 371-380, 1996] 참고). 수지상 세포를 사용하여 MHC 부류 I 및 II 분자의 맥락에서 T 세포에 대한 RG1 폴리펩티드를 제시할 수 있다. 한 가지 양태에서는, 자기 유래 수지상 세포를, MHC 분자와 결합할 수 있는 RG1 폴리펩티드로 펄싱한다. 또 다른 양태에서는, 수지상 세포를 완전한 RG1 폴리펩티드로 펄싱한다. 또 다른 양태는 당해 분야에 공지된 각종 실험 벡터, 예를 들면, 아데노바이러스 (문헌 [Arthur et al., Cancer Gene Ther. 4: 17-25, 1997] 참고), 레트로바이러스 (문헌 [Henderson et al., Cancer Res. 56: 3763-3770, 1996] 참고), 렌티바이러스, 아데노 관련 바이러스, DNA 형질감염 (문헌 [Ribas et al., Cancer Res. 57: 2865-2869, 1997] 참고), 및 종양-유래된 RNA 형질감염 (문헌 [Ashley et al., J. Exp. Med. 186: 1177-1182, 1997] 참고)를 이용하여 수지상 세포에서의 *rg1* 유전자의 과발현을 공학적으로 처리하는 것을 포함한다.
- [0102] 항-인자형 항-RG1 항체를, RG1 폴리펩티드를 발현하는 세포에 대한 면역 반응을 유도하기 위한 백신으로서 항암 요법에 사용할 수도 있다. 구체적으로 언급하면, 항-인자형 항체의 생성은 당해 분야에 널리 공지되어 있고,

이는 RG1 폴리펩티드 상의 에피토프를 모방하는 항-인자형 항-RG1 항체를 생성하도록 용이하게 적응시킬 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Wagner et al., Hybridoma 16: 33-40, 1997; Foon et al., J. Clin. Invest. 96: 334-342, 1995; Herlyn et al., Cancer Immunol Immunother 43: 65-76, 1996] 참고). 이러한 항-인자형 항체는 종양 항원에 대하여 지시된 기타 항-인자형 항체를 사용하여 현재 실시되고 있는 바와 같은 항-인자형 요법에 사용될 수 있다.

[0103] 유전자 면역화 방법을 이용하여, RG1을 발현하는 암 세포에 대하여 지시된 예방적 또는 치료적 체액성 및 세포성 면역 반응을 생성시킬 수 있다. 본원에 기재된 RG1 코딩 DNA 분자를 사용하여, RG1 폴리펩티드/면역원을 코딩하는 DNA와 적당한 조절성 서열을 포함하는 구조물을 개개인의 근육 또는 피부 내로 직접 주사하여, 이러한 근육 또는 피부 세포가 상기 구조물을 흡수하여, 코딩되는 RG1 폴리펩티드/면역원을 발현하도록 할 수 있다. RG1 폴리펩티드/면역원은 세포 표면 폴리펩티드로서 발현될 수 있거나 분비될 수 있다. RG1 폴리펩티드/면역원의 발현으로 인해, 전립선 암에 대한 예방적 또는 치료적 체액성 및 세포성 면역이 발생한다. 당해 분야에 공지된 각종의 예방적 및 치료적 유전자 면역화 기술을 사용할 수 있다 (이에 대한 고찰을 위해, 인터넷 주소 www.genweb.com에 공개된 정보와 인용 문헌을 참고할 수 있다).

[0104] RG1와 결합하는 작용제를 확인하기 위한 검정

[0105] 본 발명은 또한, RG1와 결합하는 작용제 (즉, 항체, 펩티드 등)를 확인하기 위해 사용될 수 있는 검정 및 방법에 관한 것이다. 구체적으로 언급하면, RG1와 결합하는 작용제는 RG1와 결합할 수 있는 RG1 리간드 또는 기타 작용제 또는 구성분의 능력 및(또는) RG1 활성을 억제/자극할 수 있는 능력에 의해 확인할 수 있다.

[0106] 상기 언급된 바와 같이, 적합한 포유류 대상체를, 항체에 의해 표적화될 것으로 의도한 RG1 폴리펩티드의 일부를 항원성 영역으로서 함유하는 펩티드로 면역시킴으로써 항체를 수득한다. 이러한 작용제를 경쟁적 결합 연구에 사용하여 차세대 억제제를 확인할 수 있을 뿐만 아니라 RG1 활성을 차단시킬 수도 있다.

[0107] RG1 폴리펩티드와 결합하는 작용제, 예를 들면, RG1 항체를 사용하여 RG1의 활성을 조정하거나, 항암제를 적당한 포유류 세포에 표적화하거나, 또는 RG1와의 상호 작용을 차단시키는 작용제를 확인할 수 있다. RG1을 발현하는 세포는 RG1와 결합하는 작용제를 사용함으로써 표적화 또는 확인할 수 있다.

[0108] RG1 결합성 작용제가 어떻게 사용될 것인지는 RG1 결합성 작용제의 특성에 좌우된다. 예를 들어, RG1 결합성 작용제는 접합된 독소, 예를 들면, 디프테리아 독소, 콜레라 독소, 리신 또는 슈도모나스 외독소를 RG1 발현성 세포에 전달하거나; RG1 활성을 조정하거나; RG1 발현성 세포를 직접 사멸시키거나; 또는 스크린에서 경쟁적 결합성 작용제를 확인하기 위해 사용할 수 있다. 예를 들어, RG1 억제제를 사용하여, RG1 발현성 세포의 성장을 직접적으로 억제시킬 수 있는 반면, RG1 결합성 제제는 진단제로서 사용할 수 있다.

[0109] 제약 조성물 및 투여

[0110] 본 발명은 또한, 염수, 완충 염수, 텍스트로스 및 물을 포함하지만 이에 제한되지 않는 모든 멸균성의 생체 적합성 제약 담체 중에서 투여될 수 있는, *rgl* 폴리펩티드, RG1 폴리펩티드, 항체, 효능제, 길항제 또는 억제제를 단독으로 포함하거나, 또는 한 가지 이상의 기타 작용제, 예를 들면 안정화 화합물과 조합하여 포함할 수 있는 제약 조성물에 관한 것이다. 이들 분자 중의 어떠한 것도, 부형제(들) 또는 제약상 허용 가능한 담체와 혼합되는 경우에 제약 조성물 중에서, 환자에게 단독으로 투여하거나 또는 기타 작용제, 약물 또는 호르몬과 조합하여 환자에게 투여될 수 있다. 본 발명의 한 가지 양태에서는, 제약상 허용 가능한 담체가 제약상 불활성이다.

[0111] 본 발명은 또한, 제약 조성물의 투여에 관한 것이다. 이러한 투여는 경구 또는 비경구적으로 수행된다. 비경구 전달 방법에는 국부, 동맥내 (종양에 직접적으로 투여함), 근육내, 피하, 수질내, 수막강내, 심실내, 정맥내, 복강내 또는 비내 투여가 포함된다. 이들 제약 조성물은 활성 성분 이외에도, 활성 성분을 제약상 사용될 수 있는 제제로 가공 처리하는 것을 촉진시켜 주는 부형제와 보조제를 포함하는 적합한 제약상 허용 가능한 담체를 함유할 수 있다. 제형 및 투여 기술에 관한 추가의 상세한 내역은 다음 문헌의 최신판을 참고할 수 있다 [참고: Remington's Pharmaceutical Sciences (Ed. Maack Publishing Co, Easton, Pa.)].

[0112] 경구 투여용 제약 조성물은 경구 투여용으로 적합한 투여량에서 당해 분야에 널리 공지된 제약상 허용 가능한 담체를 사용하여 제형화할 수 있다. 이러한 담체는 제약 조성물을 환자가 섭취할 수 있는 정제, 환제, 당의정, 캡슐제, 액제, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁제 등으로서 제형화시킬 수 있다.

[0113] 경구용 제약 제제는 활성 화합물을 고형의 부형제와 조합하고, 이로써 생성된 혼합물을 임의로 연마한 다음, 경우에 따라 적합한 보조제를 부가한 후 상기 혼합물을 과립으로 가공 처리하여 정제 또는 당의적 코어를 수득함

으로써 획득할 수 있다. 적합한 부형제는 탄수화물 또는 단백질 충전제, 예를 들면, 당 (이에는 락토스, 슈크로스, 만니톨 또는 솔비톨이 포함된다); 옥수수, 밀, 쌀, 감자 또는 기타 식물로부터의 전분; 셀룰로스, 예를 들면, 메틸 셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 또는 나트륨 카복시메틸 셀룰로스; 및 아라비아 검 및 트라가칸드 검을 포함한 검; 및 단백질, 예를 들면, 젤라틴 및 콜라겐이다. 경우에 따라, 봉해제 또는 가용화제, 예를 들면, 가교 결합된 폴리비닐 피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 그의 염, 예를 들어 나트륨 알지네이트를 부가할 수 있다.

[0114] 아라비아 검, 탈크, 폴리비닐 피롤리돈, 카보폴 젤, 폴리에틸렌 글리콜 및(또는) 이산화탄, 락커 용액, 및 적합한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 함유할 수도 있는 적합한 피복재, 예를 들면, 농축된 당 용액을 당의정 코어에 공급한다. 생성물을 확인하거나 또는 활성 화합물의 양, 즉 투여량을 성상 확인하기 위해, 염료 또는 색소를 정제 또는 당의정 피복재에 부가할 수도 있다.

[0115] 경구적으로 사용될 수 있는 제약 제제에는 젤라틴으로 만든 푸시-피트 (push-fit) 캡셀제 뿐만 아니라 젤라틴과 글리세롤 또는 솔비톨 등의 피복재로 만든 연질의 밀봉 캡셀제가 포함된다. 푸시-피트 캡셀제는 충전제 또는 결합제, 예를 들면, 락토스 또는 전분, 윤활제, 예를 들면, 탈크 또는 마그네슘 스테아레이트 및 임의의 안정화제와 혼합된 활성 성분을 함유할 수 있다. 연질 캡셀제에서는, 활성 화합물을 안정화제와 함께 또는 안정화제의 부재 하에, 적합한 액상물, 예를 들면, 지방 오일, 액상 파라핀, 또는 액상 폴리에틸렌 글리콜에 용해 또는 현탁시킬 수 있다.

[0116] 비경구 투여용 제약 제형에는 활성 화합물의 수성 용제가 포함된다. 주사용인 경우에는, 본 발명의 제약 조성물을 수용액, 바람직하게는 생리상 적합한 완충액, 예를 들면, 한크스 (Hank's) 용액, 링거 (Ringer) 용액, 또는 생리상 완충 염수에서 제형화할 수 있다. 수성 주사 현탁제는 이러한 현탁제의 점도를 증가시켜 주는 물질, 예를 들면, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 솔비톨 또는 텍스트란을 함유할 수 있다. 부가적으로, 활성 화합물의 현탁제는 적당한 오일상 주사 현탁제로서 제조할 수 있다. 적합한 친지성 용매 또는 비히클에는 지방 오일, 예를 들면, 참깨유, 또는 합성 지방산 에스테르, 예를 들면, 에틸 올레이트 또는 트리글리세라이드, 또는 리포솜이 포함된다. 임의로, 상기 현탁제는 고도로 농축된 용제를 제조할 수 있게 하기 위해 화합물의 용해도를 증가시켜 주는 적합한 작용제 또는 안정화제를 함유할 수도 있다.

[0117] 국부 또는 비내 투여의 경우에는, 침투하고자 하는 특별한 장벽에 적당한 침투제를 제형에 사용한다. 이러한 침투제는 일반적으로 당해 분야에 공지되어 있다.

[0118] 키트

[0119] 추가로, 본 발명은 전술된 본 발명의 조성물의 한 가지 이상의 성분들로 충전된 1개 이상의 용기를 포함하는 제약용 팩 및 키트에 관한 것이다. 이러한 용기(들)에는, 인간 투여용 제약 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매가 정부 기관에 의해 승인되었다는 것을 반영한, 이러한 제약 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 조절해주는 정부 기관에 의해 처방된 형태의 통지서가 부착되어 있다.

[0120] 제조 및 저장

[0121] 본 발명의 제약 조성물은 당해 분야에 공지되어 있는 방식, 예를 들면, 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 당의정 제조, 가루화 (levigation), 유화, 피막 형성, 포획 또는 동결건조 공정에 의해 제조할 수 있다.

[0122] 이러한 제약 조성물은 염으로서 제공될 수 있고, 염산, 황산, 아세트산, 락트산, 타르타르산, 말산, 석신산 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 많은 산과 함께 형성될 수도 있다. 염은 상응하는 자유 염기 형태인 수성 또는 기타 양성자성 용매 중에서 보다 잘 용해하려는 경향이 있다. 기타 경우에는, 바람직한 제제가, 사용에 앞서 완충제와 조합된 4.5 내지 5.5의 pH 범위에서 1 mM 내지 50 mM 히스티딘, 0.1 내지 0.2% 슈크로스, 2 내지 7% 만니톨 중에서 동결건조된 산제일 수 있다.

[0123] 허용 가능한 담체 중에서 제형화된 본 발명의 화합물을 포함하는 제약 조성물을 제조한 후, 이들을 적당한 용기 내에 놓아두고, 지시된 질환에 대한 처치법을 표지화할 수 있다. RG1을 투여하는 경우에는, 이러한 표지화에는 투여 양, 투여 횟수 및 투여 방법이 포함될 것이다.

[0124] 치료 유효 용량

[0125] 본 발명에 사용하기 적합한 제약 조성물에는, 활성 성분을 의도한 목적, 즉 RG1 발현을 특징으로 하는 특정한 질환 상태를 치료하는데 유효한 양으로 함유하고 있는 조성물이 포함된다. 유효 용량의 결정은 당업자의 능력

범위 내이다.

- [0126] 모든 화합물에 대해, 치료 유효 용량은 세포 배양 검증, 예를 들어, 종양 세포에서, 또는 동물 모델, 통상적으로 마우스, 토끼, 개 또는 돼지에서 초기에 추정할 수 있다. 이러한 동물 모델은 바람직한 농도 범위와 투여 경로를 달성하기 위해 사용하기도 한다. 이어서, 이러한 정보를 이용하여 인간에게서 유용한 용량과 투여 경로를 결정할 수 있다.
- [0127] 치료 유효 용량은 해당 증상 또는 상태를 완화시켜 주는 단백질 또는 그의 항체, 길항제 또는 억제제의 양을 지칭한다. 상기 화합물의 치료 효능 및 독성은 세포 배양물 또는 실험용 동물에서의 표준 제약 과정, 예를 들어, ED₅₀ (해당 집단의 50%에게서 치료 유효 용량) 및 LD₅₀ (해당 집단의 50%에 치사적인 용량)에 의해 결정할 수 있다. 치료 효과와 독성 효과 간의 용량 비는 치료 지수이고, 이는 ED₅₀/LD₅₀ 비로서 표현할 수 있다. 치료 지수가 큰 제약 조성물이 바람직하다. 세포 배양 검증과 동물 연구로부터 수득한 데이터는 인간에게 사용하기 위한 일정 범위의 투여량을 제형화하는데 사용된다. 이러한 화합물의 투여량이 ED₅₀를 포함하는 순환 농도 범위 내에 있는 것이 바람직하며, 이때에는 독성이 거의 없거나 전혀 없다. 투여량은 이용된 투여 형태, 환자의 민감도, 및 투여 경로에 따라서 상기 범위 내에서 다양하다.
- [0128] 정확한 투여량은 치료하고자 하는 환자를 고려하여 개개 의사에 의해 선택된다. 투여량과 투여는 충분한 수준의 활성 부분을 제공하거나 또는 목적하는 효과를 유지하도록 조정된다. 고려될 수 있는 부가의 요인으로는 질환 상태의 중증도, 예를 들어 종양 크기 및 위치; 환자의 연령, 체중 및 성별; 식이, 투여 시간 및 투여 횟수, 약물 조합물(들), 반응 민감도, 및 치료에 대한 내성/반응이 있다. 장시간 작용하는 제약 조성물은 특정한 제형의 청소율과 반감기에 따라서 3 내지 4일마다, 매주, 또는 2주에 1회씩 투여할 수 있다.
- [0129] 정상적인 투여량은 투여 경로에 따라서 0.1 내지 100,000 마이크로그램으로 다양할 수 있는데, 총 용량은 약 1 g까지이다. 특정한 투여량과 전달 방법에 관한 지침이 다음 문헌에 제공되었다 [참고: 미국 특허 4,657,760호; 제5,206,344호; 또는 제5,225,212호]. 당업자는 단백질 또는 이들의 억제제에 대해서 보다는 폴리뉴클레오티드에 대한 상이한 제형을 이용할 것이다. 유사하게, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 전달은 특정한 세포, 상태, 위치 등에 대해 특이적일 것이다. 방사성 표지된 항체에 대한 바람직한 특이 활성은 0.1 내지 10 mCi/단백질 mg의 범위 내일 수 있다 (문헌 [Riva et al., Clin. Cancer Res. 5: 3275s-3280s, 1999; Wong et al., Clin. Cancer Res. 6: 3855-3863, 2000; Wagner et al., J. Nuclear Med. 43: 267-272, 2002] 참고).
- [0130] 본 발명은 다음 실시예에 의해 추가로 기재된다. 본 실시예는 구체적 양태들을 참고로 하여 본 발명을 단지 예시하기 위해 제공된 것이다. 본 발명의 특정 구체적 국면을 보여주는 이들 예시에 의해, 본 발명의 범위가 제한되지 않는다.
- [0131] 모든 실시예는 본원에서 달리 상세히 기재되지 않는 한은, 당업자에게 널리 공지되어 있고 통상적인 표준 기술을 사용하여 수행하였다. 다음 실시예의 통상적인 분자 생물학 기술은 표준 실험실용 매뉴얼, 예를 들어, 문헌 [참고: Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989]에 기재된 바와 같이 수행할 수 있다.

실시예

- [0132] 실시예 1: 인간 *rgl* 폴리뉴클레오티드의 확인
- [0133] *Rgl*은 마이닝 인사이트스 (mining Incyte's) LifeSeq® 데이터베이스에 의해 전립선에서 발현된 유전자로서 확인되었다. 뉴클레오티드 서열은 상기 데이터베이스를 조사할 목적으로 인사이트에 의해 공급된 "단백질 기능" 도구를 사용하여, 이러한 데이터베이스의 주석 연구에 의해 확인하였다. 뉴클레오티드 서열은 주석을 단 데이터베이스 내의 세포 부착 분자의 범주 내에서 발견되었으며, f-스폰딘의 동족으로서 기재되었다. 데이터베이스 중의 라이브러리 세트 내에서의 *rgl* 폴리뉴클레오티드 서열 분포를 전자 노던 분석한 결과, *rgl*이 전립선 라이브러리에서 높은 수준으로 발현하였고, 정상 및 종양 조직을 포함한 기타 수 많은 조직 라이브러리에서는 보다 낮은 수준으로 발현한 것으로 나타났다.
- [0134] 데이터베이스 중의 *rgl* 클론 세트를 연속되는 폴리뉴클레오티드 서열 내로 어셈블리하고, 이러한 연속되는 서열을 편집한 후, 완전한 길이의 코딩 서열을, 상기와 같이 어셈블리된 것으로 예측되는 폴리뉴클레오티드에서 확인하였다. 이러한 서열은 f-스폰딘 및 민딘-2와 상동성인 단백질을 코딩하였다.
- [0135] 인사이트 클론 1640796, 1712252, 및 1880265를 실험 실습을 위해 인사이트로부터 수득하고, 클론 3360733은 대

부분의 5' 뉴클레오타이드 서열을 함유한 것으로 확인되었다. 이러한 클론을 대상으로 하여, 완전히 서열 분석한 결과, 이는 예측되는 RG1 단백질에 대한 완전한 코딩 서열을 함유하였다. 이 서열이 서열 1에 기재되었다.

[0136] 실시예 2: *Rg1* mRNA 발현

[0137] 정상 및 종양 조직으로부터의 각종 샘플 및 세포주에서의 *rg1* mRNA의 발현은 태크만 (Taqman) 검정 (Perkin-Elmer)을 이용한 반-정량적 PCR에 의해 결정하였다. 변형된 글레아슨 (Gleason) 등급화 시스템에 따라서 등급을 매긴 전립선 정상, 양성 및 종양 조직 샘플을 다음 공급처 [Urology Department at Stanford University School of Medicine]로부터 취득하였다. RNA를 표준 과정에 의해 그들로부터 분리하였다. 기타 종양 및 정상 조직으로부터의 RNA는 상업적 공급처 [클론테크 (Clontech), 및 바이오체인 (Biochain) 포함]로부터 구입하였다. 전립선 종양 세포주 (PC-3, LNCaP 및 DU145)는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션 (American Type Culture Collection)으로부터 취득하였고, 이는 혈청 함유 배지를 이용하여 표준 방법에 의해 배양 증식시켰다. 이들 세포주로부터 유래된 이종이식편 종양을 누드 마우스에서 확립시켰고, 이식한지 대략 4 내지 6주 후에 상기 마우스로부터 수거하였다. RNA는 표준 과정에 의해 상기 종양으로부터 분리하였다.

[0138] 태크만-이용 PCR 분석은 프라이머: CGC GCA TAG CTC CGA CTA C (서열 3) 및 GCC GCG TCC GCA AAG (서열 4) 및 태크만 프로브: 6-FAM-AGG AAG AAC CAG TAC GTC AGT AAC GGG CTG-Tamra (서열 5)를 사용하여 수행하였다.

[0139] 이들 프라이머와 프로브는 퍼킨 엘머의 프라이머 발현 (Perkin Elmer's Primer Express) 소프트웨어를 사용하여 고안하였으며, 공급처 [Synthetic Genetics]에 의해 합성되었다. PCR 반응을 30 내지 40 주기 동안 수행하고, 전립선 RNA를 사용하여 정량화하여 상대적 비교를 위한 표준 곡선을 생성시켰다. 이러한 분석 결과는, *rg1* mRNA가 전립선에서 가장 높은 존재비로 검출되었고, 여러 개의 기타 조직에서는 상당히 낮은 수준으로 검출되었다는 것을 입증해주었다.

[0140] 실시예 3: BHK 세포에서의 RG1의 생성

[0141] 클로닝: 인사이트 플라스미드 3360733으로부터 RG1 코딩 영역을 취득하였다. 이러한 코딩 서열은 1x Pfu 터보 (Turbo) 폴리머라제 완충액 (Stratagene, LaJolla, CA)/200 μ M dNTPs/0.2 μ M 올리고뉴클레오타이드 프라이머 /2.5 U Pfu 터보 폴리머라제 (Stratagene)를 사용하여 표준 PCR 반응물 (100 μ l)에서, 프라이머 SST115 (5'-TCCCTCTAGAGCCACCATGGAAACCCAGCCCGGC-3') (서열 6) 및 SST113 (5'-AAGGCATCACGTGTAGACGCAGTTATCAGGGACG-3') (서열 7)으로 PCR 증폭시켰다. PCR 증폭 조건은 다음과 같았다: 95 $^{\circ}$ C 하에서 3분, (95 $^{\circ}$ C 하에서 15초, 60 $^{\circ}$ C 하에서 30초, 72 $^{\circ}$ C 하에서 2분) x 35, 72 $^{\circ}$ C 하에서 7분. 이로써 생성된 PCR 증폭된 생성물은 QIAquick PCR 컬럼 (Qiagen, Valencia, CA)을 사용하여 정제하고, XbaI 및 PmlI 제한 효소로 분해시켜 1010 bp 단편을 생성시켰는데, 이는 BIO 101 진클린 (GeneClean) 키트 (Vista, CA)를 사용하여 1% 아가로스 겔로부터 정제하였다. 이와 같이 정제된 단편은 다음 키트 [Epicentre Fast Link Kit (Epicenter, Madison, WI)]를 사용하여, XbaI 및 PmlI로 분해시킨 비-세포변성 신드비스 발현 벡터 pSINrep21 (문헌 [Agapov et al, 1998, PNAS 95: 12989-12994] 참고)에 연결시키고, 이를 DH5 알파 적격한 세포 (Life Technologies, Gaithersburg, CA) 내로 형질전환시킨 다음, 앰피실린 (100 μ g/ml)을 함유하는 LB 한천 판 상에서 선별하였다. 이러한 하나의 앰피실린 내성 콜로니를, 앰피실린을 수반한 LB 배지에서 성장시키고, 서열 분석한 결과, 삽입된 RG1 코딩 서열을 함유하는 것으로 밝혀졌다. 이 플라스미드는 pPEG6으로 명명되었다.

[0142] 발현: 2 마이크로그램의 pPEG6을 사용하여, 제조업자의 지시에 따라서 리포펙타민 플러스 시약 [Lipofectamine Plus reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD)]을 이용하여 $1-3 \times 10^5$ 개 소의 햄스터 신장 세포 (BHK)를 형질감염시켰다. 형질감염시킨 후, 세포를 DMEM + 태아 혈청에서 24 내지 48시간 동안 항온 배양하였는데, 이때 세포가 1 내지 10개로 분할되었고, 푸로마이신 (puromycin) (2.5 μ g/ml 최종 농도) 및 혈청 함유 DMEM을 부가함으로써 상기 플라스미드 함유 세포에 대한 선별을 개시하였다. 세포들이 합류된 후 (푸로마이신을 부가한지 4 내지 5일 후), 세포를 PBS로 세척하고, 1 내지 10개로 분할시키며, 혈청 함유 DMEM과 5 μ g/ml 푸로마이신을 가하였다. 2 내지 3일이 더 지난 후, 상기 배지를 혈청 무함유 DMEM과 5 μ g/ml 푸로마이신으로 대체시키고, 2 내지 3일 동안 성장시킨 다음, RG1 항체를 사용하여 웨스턴 분석함으로써 RG1 단백질의 존재 여부를 상기 배지에서 검출하였다. RG1 단백질은 1 μ g/ml의 수준에서 검출되었다.

[0143] 정제: 안정적으로 과발현시키고 RG1 단백질을 성장 배지 내로 분비시키기 위해 형질감염시킨 유아 햄스터 신장 세포 (BHK)를, 태아 소 혈청을 함유하는 배지에서 배양하였다. 합류 수준에 못미치는 경우에는, 상기 세포를 혈청 무함유 배지에 24 내지 48시간 동안 작동시켰다. 상기 배지를 수집하고, 원심분리시켜 세포를 제거하고, -80 $^{\circ}$ C 하에 저장하였다. 배지는 정제하기 직전에 해동시키고, 얼음 위에 유지시켰다. 프로테아제 억제제를 가

하고, 배지를 찬 20 mM 나트륨 아세테이트 완충액 (pH 6.5)으로 10배 희석시킨 다음, 정제 기간 내내 4℃로 유지시켰다. 이와 같이 희석시킨 샘플을 0.5 ml/min의 유속으로 Q-세파로스 음이온 교환 컬럼 상으로 부하한 다음, 동일한 완충액으로 세척하였다. 분획을 수집하면서 선형 NaCl 구배 (완충액 중의 0 내지 80%의 1 M NaCl, 분당 0.5%)를 이용하여 용출을 수행하였다. SDS PAGE 및 웨스턴 블롯 (Western blot)에 의해 결정한 결과, RG1은 대략 75 mM NaCl에서 용출되었다. RG1 함유 분획을 모으고, 한외여과시킴으로써 농축시키며, 슈퍼덱스 (Superdex) 75 겔 여과 컬럼 상으로 추가로 정제하였다. 정제된 BHK-RG1은 본래의 RG1 (nRG1) 단백질에 대해 특이적인 인간 mabs를 생성시키는데 있어 면역원으로서 사용하였고, 이들 항체를 스크리닝 및 성상 확인하는데 있어 항원으로서 사용하였다.

[0144] 실시예 4: 항체 생성

[0145] 폴리클로날 항체: RG1 단백질 서열로부터 유래된 5개의 합성 폴리펩티드 서열에 대한 토끼 폴리클로날 항혈청을 생성시켰다. 이들 서열은 상기 단백질 표면에서의 이들의 예측 위치 때문에 선별되었는데, 이는 표면 에피토프를 보다 잘 인식하는 것으로 예상되는 항혈청을 생성시키기 위한 것이다. 시스테인 잔기를 아미노부티르산 (Abu)으로 대체시켜 합성을 도왔다. 특이적 아미노산 서열, RG1 단백질 상에서의 위치, 및 5개 펩티드에 대한 명칭이 다음에 기재되었다:

[0146] 명칭 위치 아미노산 서열

[0147] 1C 28-46 PLGGESICSAGAPAKYSIT (서열 8)

[0148] 2C 46-64 TFTGKWSQTAFPKQYPLFR (서열 9)

[0149] 3C 77-91 HSSDYSMWWRKNQYVS (서열 10)

[0150] 4C 188-210 DAGTDSGFTFSSPNFATIPQDTV (서열 11)

[0151] 5C 263-274 NEIVDSASVPET (서열 12)

[0152] 펩티드를 면역원으로서 사용하기 위해 부가의 카복실 말단 시스테인을 통하여, 키홀 림펫 헤모시아닌 [keyhole limpet hemocyanin (KLH)]에 공유 커플링시켰다. 유사하게, ELISA를 통하여 항혈청 역가를 분석하기 위해, 소의 혈청 알부민 (BSA) 접합체를 제조하였다.

[0153] 2마리 동물을 각 펩티드로 면역시켰다. 초기 면역을 프로인트 (Freunds) 완전 아주반트 (동물당 0.5 mg)에서 수행한 다음, 3주 간격으로 정맥내 적용된 프로인트 불완전 아주반트에서 동물당 0.25 mg으로 추가 면역시켰다. 주기적으로 시험용 혈액을 채집하고, 특이적 BSA-펩티드 접합체에 대한 항체 역가를 ELISA에 의해 측정한 다음, 예비면역 혈청과 비교하였다. 펩티드 1C 및 3C에 대한 항혈청이 활성화된 것으로 밝혀졌다. 펩티드 2C에 대한 항혈청은 RG1 폴리펩티드를 인식하지 못하였다. 펩티드 4C 및 5C에 대한 항혈청은 시험하지 않았다.

[0154] 모노클로날 항체: 이. 콜라이에서 발현된 6-히스티딘-태그된 RG1 융합 단백질 및 RG1 펩티드에 대하여 트랜스제닉 마우스를 면역시킴으로써, RG1에 대한 모노클로날 항체를 생성시켰다. 이들 동물의 비장 세포를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 생성시켰다. 이로써 생성되는 하이브리도마를 대상으로 하여, RG1 펩티드 및 단백질에 대하여 지시된 항체를 생산하는 하이브리도마를 알아보기 위해 ELISA에 의해 스크리닝하였다.

[0155] 분열된 마우스 중쇄 및 마우스 카파 경쇄 유전자좌를 함유하는 트랜스제닉 마우스를 면역시킴으로써, 본래의 RG1에 대한 특이성을 지닌 인간 모노클로날 항체를 또한 제조하였다 [참고: 미국 특허 제5,877,397호]. C57BL/6J 근친계 (Medarex)로부터의 트랜스제닉 마우스를, 안정한 형질감염된 BHK 세포주에서 생성된 정제된 RG1 단백질로 면역시켰다 (실시예 3 참고).

[0156] 제1 프로토콜에 대한 제1 및 제2 면역을 위해, 상기 항원을 완전 프로인트 (Sigma, F5881) 아주반트와 혼합한 후; 상기 항원을 불완전 프로인트 (Sigma, F5506)와 혼합하였다. 제2 프로토콜의 경우에는, 완전 프로인트를 제1 면역을 위해 사용한 다음, 불완전 프로인트를 사용하였다. 각 마우스에게, 유화성 바늘을 사용하여 아주반트와 1:1로 혼합시킨 100 μ l PBS 중의 25 μ g 본래의 RG1 (nRG1)을 투여하였다. 마우스에게 0.2 ml로 제조된 항원을 복강내 주사하였다.

[0157] 하이브리도마 제조: P3 X63 ag8.653 골수종 세포주 (ATCC CRL 1580, lot F-15183)를 본 융합에 사용하였다. 본래의 ATCC 바이알을 해동시키고, 배양물 중에서 확장시켰다. 이러한 확장물로부터 동결된 바이알의 시드 스톱을 제조하였다. 세포를 배양물 중에서 3 내지 6개월 동안 유지시키고, 1주에 2회씩 통과시켰다. P388D1 (ATCC, TIB-63 FL) 세포로부터의 상등액을 하이브리도마에 대한 적응용 배지로서 사용하였다. 간략하게 언급하

면, 세포를 성장시키고, 200 ml로 확장시켰다. 정류 배양물을 대략 7일 동안 성장시켰다. 소모된 상등액을 스펀 다운 (spun down)시키고, 0.2 μm 멸균용 필터 내로 여과시켰다. 이러한 세포주를 3 내지 6개월 동안 통과시킨 다음, 새로운 바이알을 해동시켰다.

[0158] 5% FBS (Hyclone, #AKE11828)을 함유하는 DMEM (Cellgro # 10013271, 10013270), 및 P/S (Cellgro, #30002029)를 사용하여 상기 골수종 세포와 P388D1 세포를 배양하였다. 부가의 배지 상등액을, 5% 오리젠-하이브리도마 (Origen-Hybridoma) 클로닝 인자 (IGEN, #36684, 36908), 5% P388D1 적응용 배지 (11/15/00, 12/21/00 DH), 10% FCS (Hyclone, #AKE11828), β -머캅토에탄올 (Gibco #1076640), 제네타신 (Genetacin) (Gibco #1079874), 헤페스 (Hepes) (Cellgro #25060041) 및 HAT [Sigma, H 0262; 1.0×10^{-4} M 히포크산틴, 4.0×10^{-7} M 아미노프테린 (Aminopterin), 1.6×10^{-5} M 티미딘 (Thymidine)], 또는 HT (Sigma, H0137; 1.0×10^{-4} M 히포크산틴, 1.6×10^{-5} M 티미딘)을 포함하는 하이브리도마 성장 배지에 추가하였다.

[0159] PEG 및 표준 방법론을 이용하여, 비장 세포를 골수종 세포와 융합시켰다. 이로써 생성된 하이브리도마를, 제1 융합을 위해 200 μl /웰로 시딩한 50개의 96-웰 판 상으로 도말하였다. 인간 IgG, κ 항체에 대한 초기 ELISA 스크린을 융합 후 10 내지 12일째에 수행하였다. 이어서, 인간 IgG, κ 양성 웰을 6-His 포획 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 이러한 스크리닝으로 인해, 3개의 융합물로부터 8개의 인간 항체를 단리하였는데, 다음과 같다: 3개의 IgM, 1개의 IgG3, 및 4개의 IgG1 아부류 항체.

[0160] 항원 결합성 항체를 수반한 웰로부터의 하이브리도마를 먼저, 24 웰 판에 옮기고, 특이성을 알아보기 위해 다시 재스크리닝하였다. 본래의 RG1 특이적 하이브리도마를 제한 희석에 의해 아클로닝하여 모노클로날성을 보장하였다. 본래의 RG1 (nRG1)와 결합한 항체를 생산하는 하이브리도마를, 세포를 IGEN 동결 배지에서 동결시킴으로써 발생 과정의 여러 단계에서 보존시켰다. 이들 세포주로부터의 배지를 동결시키고, 다음에 기재되는 바와 같이 세포를 정제하기 위해 사용하였다. 8개 중의 4개가 추가의 연구를 보증해주기에 충분한 특이성을 지니고 있는 것으로 결정되었다.

[0161] 항체의 정제: 상기 언급된 RG1에 대한 인간 모노클로날 항체 중의 4개를, 단백질 G 세파로스 친화 크로마토그래피를 이용하여 세포 적응용 배지로부터 정제하였다. 세포를 원심분리 및 여과시킴으로써 배지로부터 제거하고, 배지를 단백질 G 컬럼 상으로 통과시켰다. 이어서, 상기 컬럼을 PBS 중에서 세척하여 결합되지 않은 물질을 제거하였다. 결합된 항체는 100 mM 글리신 (pH 2.5)로 용출시키고, 10% v/v 1 M 트리스, pH 8을 상기 분획에 부가함으로써 즉시 중화시켰다. 항체를 함유하는 분획을 모으고, PBS 내로 투석한 다음, 이를 대상으로 하여 SDS PAGE에 의해 순도를 시험하며, ELISA에 의해 항원 결합성 활성에 대해 검정하였다.

[0162] 항체 스크리닝: 항체 스크리닝은 몇가지 상이한 검정 과정을 이용하여 수행하였다:

[0163] A. hIgG γ κ ELISA 스크린: 96 웰 미세역가 판 (Falcon, #3912)을 PBS (50 μl /웰) 중의 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 항-인간 IgG κ 또는 항-인간 IgG κ 으로 밤새 피복시켰다. 판을 실온에서 1시간 동안 (100 μl /웰) 5% 치킨 혈청을 함유하는 PBS 0.05% 트윈 (Tween) 20으로 흡인 및 차단시킨 다음, PBS-트윈으로 3회 세척하였다. 하이브리도마 상등액을 차단용 완충액 중에서 1:2로 희석시키고, 스크리닝하기 위해 실온에서 1시간 동안 (100 μl /웰) 항온 배양하였다. 항온 배양한 후, 상기 판을 차단용 완충액 중에서 3회 세척한 다음에, 100 μl /웰의 2차 항체 [HRP 항-인간 IgGFc (Jackson, #109-036-098) 또는 HRP 항-인간 IgG κ (Sigma, #A-7164)]을 부가하였다. 이러한 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 항온 배양한 다음, 상기 판을 차단용 완충액 중에서 2회 세척하였다. 판당 80 μl ABTS (Sigma, #A1888), 8 μl H₂O₂를 함유하는 10 ml 시트레이트 인산염 완충액 (pH 4.0)을 사용하여 판을 현상하고, A₄₁₅₋₄₉₀ nm에서 판독하였다.

[0164] B. RG1 결합성 ELISA: 96웰 미세역가 판을 4°C 하에 PBS (50 μl /웰) 중의 0.5 내지 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 정제된 본래의 RG1 단백질로 밤새 피복시켰다. 상기 웰을 흡인시킨 다음, 100 μl /웰 PBS-트윈 + 5% 치킨 혈청을 부가하여 상기 반응물을 차단시킨 후, 실온에서 1시간 동안 항온 배양하였다. 이어서, 판을 차단용 완충액 중에서 3회 세척하였다. 이어서, 일련으로 희석된 샘플 (혈청, 하이브리도마 상등액, 정제된 mabs 등)을 각 웰에 50 μl /웰로 부가하였다. 실온에서 1시간 동안 항온 배양한 다음, 차단용 완충액 중에서 3회 세척하였다. 이어서, 상기 웰을 차단용 완충액 중에서 HRP 항-인간 IgGFc 2차 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 항온 배양한 다음, 전술된 바와 같이 3회 세척하였다. 앞서 기재된 기질을 사용하여 판을 현상하고 96 웰 판 판독기를 사용하여 A₄₀₅ nm를 측정하였다.

[0165] C. 포획 ELISA 방법: 본래의 입체 형태로 RG1 단백질과 결합하는 mab를 결정하기 위해, 포획 ELISA 포맷을 사용

하였다. 6개의 히스티딘 발현 태그를 함유하는 RG1 단백질 (6His-RG1)을 BHK 세포에 발현시키고, 이를 항원으로 사용하였다. 6His-RG1을 표준 방법론에 따라서, NiNTA 아가로스 친화 크로마토그래피를 이용하여 적응용 배지로부터 정제하였다.

[0166] 정제된 6HisRG1는 PBS + 0.2% BSA (PBS/BSA, 100 μ l/웰) 중의 1.5 μ g/ml 농도를 이용하여 96 웰 NiNTA 판 (Qiagen NiNTA HisSorb) 상에서 4°C 하에 밤새 포획하였다. 웰을 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS (PBST)로 3회 세척하였다. 샘플 (하이브리도마 상등액, 혈청, 정제된 mabs 등)을 PBS/BSA에서 희석시키고, 판 상에서 실온 하에 (50 μ l/웰) 1 내지 2시간 동안 항은 배양한 다음, PBST로 3회 세척하였다. 2차 항체 (HRP-표지된 염소 항-인간 IgGf)를 PBS/BSA 중에서 1:5000으로 희석시키고, 50 μ l/웰로 판에 가한 다음, 실온에서 1시간 동안 항은 배양하였다.

[0167] 판을 PBST로 3회 세척하고, ELISA에서와 같이 현상하였다. ELISA 판 판독기를 사용하여 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0168] D. BiAcore 표면 플라스몬 공명 (SPR) 검정: 모 하이브리도마 상등액을 추가로 스크리닝하여, SPR을 이용한 항원항체 결합력 (avidity)에 의해 클론을 정량적으로 계수하였다. 표준 아민 커플링 및 아세테이트 (pH 4.0) 중의 60 μ g/ml 항체 및 HEPES 완충 염수 (HBS)의 이동 상을 사용하여, 토끼 항-인간 IgGf (Pierce, 31142)를 센서 칩 (Biacore, BR-1000-12) 상에 고정화시켰다. 하이브리도마 배지를 5 μ l/min으로 표면 상으로 통과시켜, 이를 표면 상에 포획시킨 다음, HBS를 사용하여 기선까지 세척하였다. 이어서, 정제된 본래의 BHK-RG1 단백질 (400 nM)을 표면 상으로 통과시키고, 결합성을 SPR에 의해 측정하였다. 주입이 끝날 무렵, HBS를 표면 상으로 통과시켜 항체:RG1 복합체의 해리를 측정하였다. 시간이 지남에 따른 SPR 측정치의 기울기는 해리 속도의 지표이므로, 기울기가 더 클수록, 제거 속도는 더 빨라지므로, 항체의 결합력이 더 낮아진다.

[0169] 실시예 5: 항체의 웨스턴 블롯 분석

[0170] 항혈청을 대상으로 하여, 웨스턴 블롯팅을 통하여 RG1 특이성에 대해 시험하였다. RG1 특이적 항혈청 (상기 서열 1C 및 3C에 대하여 생성된 것)을 COS 세포에서 일시적으로 발현된 RG1, LNCaP 세포로부터 분리된 본래의 RG1 및 형질감염된 유아 햄스터 신장 세포 (BHK)로부터 생성된 RG1 상에서 시험하였다. RG1-특이적 항혈청을 다음으로부터 제조된 용해물 상에서 추가로 시험하였다: LNCaP 종양, LNCaP 세포, PC3 종양, PC3 세포, 및 인간 전립선 종양의 몇가지 임상 샘플. 세포와 조직을 세정 완충액 중에서 용해시켰다. 5분 동안 비등시킨 후, 10 μ l의 각 용해물을 12% SDS-폴리아크릴아미드 겔 상으로 부하하여 단백질을 분할시켰다. 이어서, 분리된 단백질을 니트로셀룰로스 막으로 옮겼다. RG1 항체의 결합 특이성은 동종 및 이종 펩티드의 존재 하에서의 결합력에 의해 확인하였다. RG1-특이적 항혈청은 PC-3 세포와 PC-3 종양을 제외한 모든 샘플에서 단백질을 검출할 수 있었다.

[0171] 본래의 RG1에 대해 특이적인 인간 mabs을 웨스턴 블롯 분석한 결과, 이들 항체가 단지 비-환원 조건 하에서만 블롯 상의 RG1를 인식하였다는 것이 입증되었다. 이는 이들 mabs가 보다 본래 형태의 RG1와 결합하고 있다는 사실을 제안하였다.

[0172] 실시예 6: LNCaP 세포로부터 분리된 본래의 RG1 단백질의 정제

[0173] 배양물 중에서 성장시킨 LNCaP 세포를 웨스턴 블롯 분석한 결과, 본래의 RG1 단백질을 분리하는 것으로 밝혀졌다. 본래의 단백질을 정제하기 위해서는, 세포를 혈청 무함유 배지에서 48시간 동안 성장시켰다. 이러한 혈청 무함유 적응용 배지를 수거하고, 원심분리시켜 모든 세포를 제거하며, 한외여과시킴으로써 대략 50배 농축시켰다. 이어서, 이와 같이 농축된 배지를 20 mM 나트륨 아세테이트 완충액 (pH 6.5)으로 10배 희석시키고, Q-세파로스 음이온 교환 컬럼 상으로 부하하였다. 컬럼 용출은 2.0 ml 분획을 수집하면서 염화나트륨 구배 (분당 0.5%)로 구성되었다. 웨스턴 블롯 및 SDS PAGE에 의해 결정된 바와 같이, RG1 단백질은 대략 75 mM NaCl에서 용출되었다. 본래의 RG1 단백질은 세균에서 발현된 6 히스티딘-RG1 융합 단백질 보다 약간 낮은 분자량에서 수행되었는데, 이는 상기 본래 단백질에는 융합 펩티드가 결합되었기 때문인 것으로 추정된다.

[0174] 실시예 7: 전립선 및 전립선 암 전이에 있어서 RG1 발현의 면역조직화학적 염색

[0175] RG1 단백질의 발현은 신장, 폐, 췌장, 근육, 뇌 및 전립선을 포함한 각종 인간 조직에서 뿐만 아니라 림프절 및 뼈 전이물에서 라이프스판 바이오사이언스, 인코포레이티드 (LifeSpan Biosciences, Inc.)에 의해 결정되었다. 부가의 전립선 조직을 다음 공급처 [Urology Department at Stanford University School of Stanford]로부터 획득하고, 베를렉스 (Berlex)에서 시험하였다. 표준 과정을 사용하여 조직 박편을 탈파라핀 처리하였다. 폴리클로날 항체 RG1-3C를 1차 항체로서 사용하였고, 검출 시스템은 벡터 ABC-AP 키트 (AK5002)를 벡터 레드 기질

키트 (Sk5002)와 함께 사용하는 것으로 구성되었다. 음성 대조군으로서, 염색을 1차 항체의 부재 하에서 수행하였다.

[0176] 몇몇 환자로부터의 전립선 종양 및 정상 전립선 조직에서 RG1의 발현을 조사하였다. 모든 경우에 있어, RG1 발현을 나타내는 강한 염색이 전립선 종양 샘플에서 관찰되었다. RG1 발현은 정상 전립선 조직에서는 다양하였는데, 즉 거의 염색되지 않은 것부터 상당히 염색된 것으로 다양하였다.

[0177] 전립선 종양 전이를 함유하는 것으로 공지된 림프절 및 뼈 샘플에서 면역조직화학에 의해 RG1의 발현을 또한 검출하였다. 정상적인 림프절 또는 뼈는 염색을 나타내지 않았다.

[0178] 실시예 8: RG1 항체의 서열 분석

[0179] 상기 실시예 4에 기재된 바와 같이 생성되고 정제된 2개의 인간 RG1 항체 (C 및 B)의 핵산 서열은 표준 방법에 의해 결정하였다. B 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은 서열 20에 명시되었고, B 중쇄 가변 영역은 서열 21에 명시되었다. C 경쇄 가변 영역의 뉴클레오티드 서열은 서열 23에 명시되었고, C 중쇄 가변 영역은 서열 24에 명시되었다.

[0180] 이들 가변 쇄 영역의 상응하는 추정된 아미노산 서열을 결정하였고, 이들은 서열 26 (B 경쇄); 서열 27 (B 중쇄); 서열 29 (C 경쇄); 서열 30 (C 중쇄)에 명시되었다 (도 3 및 4 참고).

[0181] 실시예 9: RG1 항체에 대한 결합 상수의 결정

[0182] 본래의 RG1 단백질과 결합하는 mab의 역학 상수 (K_D , k_a 및 k_d)는, 가용성의 본래의 RG1 단백질을 센서 칩 상에 고정화된 mab에 결합시키는 포획 포맷을 사용하여 BIAcore에 의해 결정하였다. 표준 아민 커플링 방법을 사용하여, 이뮤노퓨어 (ImmunoPure) 토끼 항-인간 IgGfc (Pierce, 31142)를 센서 칩 CM5 (Biacore, BR-1000-12)에 공유적으로 고정화시켰다. 10 mm 아세트이트 (pH 4.0)에 희석시킨 100 $\mu\text{g/ml}$ 항체를 5 $\mu\text{l/min}$ 으로 사용하였다. HBS-EP (Biacore, BR-1001-88)를 이동 상으로서 사용하였다. 반응되지 않은 부위를 에탄올아민으로 차단시켰다. Mabs를 HBS로 200 nM이 되도록 희석시키고, 50 μl 를 주기마다 10 $\mu\text{l/min}$ 으로 주입하였다. BHK-RG1의 일련의 희석물 (12.5 내지 400 nM)을 고정화 mab에 결합시켰다. 8분 동안 20 $\mu\text{l/min}$ 으로 항원 주입을 완료한 직후에 해리 역학을 측정하였다. 25 μl 의 10 mm 글리신 (pH 1.8)을 사용하여 각 주기 후에 표면을 재생시킨 다음, HBS로 세척하였다.

[0183] 전형적으로, 5개의 농축물과 배지 대조군을 수행시켰다. 기기 제조업자에 의해 공급된 소프트웨어 (BIAevaluation 3.0)를 사용하여, 데이터를 1:1 랑뮈르 (Langmuir) 모델에 고정시키고, 역학 상수를 산정하였다. 평형 상수는 선호되는 해리 속도 (10^{-4} s^{-1})를 수반한 나노몰 범위였다. 다음 표 1에는 인간 항체 4개에 대한 역학 상수가 제시되었다:

표 1

[0184] 인간 RG-1 항체 A, B, C, 및 D에 대한 역학 상수. 이들 항체에 대한 역학 상수는 BIAcore 연구로부터 획득한 데이터에 1:1 랑뮈르 모델을 고정시킴으로써 결정하였다. K_a : 연합 속도(1/s); k_d : 해리 속도 (1/s), K_D : 친화도 (M)

Mab	K_a (1/M s)	K_d (1/s)	K_D (M)
A	2.3×10^4	1.9×10^{-4}	8.9×10^{-9}
B	2.9×10^4	2.3×10^{-4}	8.4×10^{-9}
C	2.5×10^4	8.4×10^{-4}	3.36×10^{-8}
D	3.17×10^4	2.95×10^{-3}	9.27×10^{-8}

[0185] 실시예 10: RG1 항체의 방사성 표지화

[0186] RG1 항체에 대한 킬레이트제의 접합: 문헌 [참고: Nikula et al, Nucl. Med. Biol., Vol. 22, No. 3, pp. 387-390, 1995]로부터 적응시킨 방법을 사용하여, 이기능성 킬레이트제 p-SCN-벤질-DTPA (Macrocyclics, Inc.)를 항

체에 공유적으로 부착시켰다. 이러한 과정 동안에 이용한 모든 시약과 장비는, 상기 킬레이트제의 불활성화를 피하기 위해 사용하기 전에 금속이 전혀 존재하지 않도록 하였다. 저 금속 시약, 고 순도 (MilliQ) 물 및 미량의 금속을 제거하기 위해 처리시킨 켈렉스 (Chelex)를 사용하여 모든 용액을 제조하였다. 모든 장비를 10 mM EDTA로 세정한 다음, MilliQ 물로 광범위하게 세정하였다.

[0187] 먼저, 정제된 mabs (약 20 mg)를 AKTA 크로마토그래피 시스템 상에서 파마시아 (Pharmacia) 26/10 탈염용 컬럼을 사용하여 50 mM 탄산염 완충액, 150 mM NaCl, pH 8.5으로의 완충액 교환에 앞서 모든 금속을 제거하기 위해 실온에서 1시간 동안 1 mM EDTA로 처리하였다. 항체 함유 분획을 모으고, 한외여과 (Centricon 30)시킴으로써 농축시켜 대략 2 mg/ml가 되도록 하였다. 100 mg/ml p-SCN-벤질-DTPA 스톱 용액을 무수 DMSO에서 신선하게 제조하였다. 50 내지 100배 물 과량의 DTPA를 접합 반응에 사용하고, 이를 실온에서 밤새 처리하였다. 이어서, 반응 혼합물을 50 mM Na 아세테이트, 150 mM NaCl, pH 6.5 (방사성 표지화 완충액)으로 완충액 교환시키고, 한외여과시킴으로써 농축시켜 3 mg/ml 이상이 되도록 하였다. 항체 접합체는 상기 완충액 중에서 4°C 하에 수주 동안 안정적이었다. 단백질 농도를 BCA에 의해 결정하고, 항원 결합 활성을 ELISA에 의해 확인하였다.

[0188] RG1 항체의 방사성 표지화: 종양 보유 동물에서의 생체내 연구에 사용하기 위해, 금속 무함유 조건 하에 DTPA-접합된 항체를 ^{90}Y 또는 ^{111}In 으로 방사성 표지시켰다. 전형적으로, 10 mg의 항체 접합체를 엄격하게 차폐시키는 이면에 온화하게 혼합하면서, 실온에서 1시간 동안 10 mCi의 [^{90}Y]Cl₃ 또는 [^{111}In]Cl₃ (PerkinElmer Life Sciences)와 혼합하였다. EDTA를 1 mM에 가하고, 실온에서 10분 동안 항온 배양하였다. 방사성 표지된 항체를 결합되지 않은 ^{90}Y 으로부터 격리시키고 완충액을 교환하기 위해서는, 금속 무함유 PBS에서 예비평형시킨 바 있는 파마시아 26/10 탈염 컬럼 상에서 상기 반응 혼합물을 수행하였다. 1 ml 분획을 수집하고, 항체 함유 분획을 모았다. 단백질 농도를 BCA에 의해 결정하였다. ^{90}Y 에 대한 액체 신틸레이션 계수기 또는 ^{111}In 에 대한 감마 계수기를 사용하여, 1 μl 샘플 중의 총 방사능을 결정하였다. 특히 활성을 단백질 1 mg당 mCi로서 산정하였는데, 이는 전형적으로 0.25 내지 1.0 mCi/mg의 범위 내였다. 문헌 [참고: Nikula et al, Nucl. Med. Biol. 22: 387-390, 1995]에 따르는 순간 박층 크로마토그래피 (ITLC)에 의해 방사선 순도를 결정하였다. 전형적으로, 방사능의 98% 초과가 단백질과 연합되었다. 결합되지 않은 항체 표준물 (^{90}Y 접합체)에 대한 ELISA에 의해, 또는 고정화 RG1 단백질 (^{111}In 접합체) 상에서의 고체 상 방사성면역 결합 검정을 이용하여, 방사성 접합체의 항원 결합성 활성을 결정하였다. 모든 경우에 있어, 상기 방사성접합체의 항원 결합성은 결합되지 않은 항체의 항원 결합성과 구별할 수 없었다.

[0189] 실시예 11: ^{111}In -표지된 RG1 항체의 종양 특이적 축적

[0190] 마트리젤 중의 1×10^{-7} 개 LNCaP 세포를 5 내지 6주생 숫컷 홍선 누드 마우스의 옆구리에 피하 주사함으로써 종양 이종이식편을 확립하였다. 종양의 용적이 150 내지 400 mm³에 도달한 시점 (종양 세포를 접종한지 대략 4 내지 6주 후)에 생체내 분포 연구를 수행하였다. ^{111}In -표지된 인간 RG1 항체 (C, B, A) 및 비-특이적 인간 IgG₁ 대조군 항체 (특히 활성, 0.3 mCi/mg)를, LNCaP 이종이식편을 보유하고 있는 12마리 마우스의 4개 군에게 정맥 내 투여하였다. 절개시킴에 앞서, 심장 천자를 이용하여 마우스를 방혈시켰다. 혈액, 종양 및 모든 주요 기관을 꺼내고, 분석용 저울 상에서 칭량한 다음, 방사능을 감마 계수기로 계수하였다. 혈액, 개개 기관, 및 나머지 사체에서 측정된 방사능의 합계를 냄으로써, 전신 청소율을 결정하였다. 모든 데이터는 방사성 동위원소 붕괴에 대해 교정하였다. 그 결과는 조직 1 g 당 주사된 용량의 비율 (%)로서 표현하였다. RG1 특이적 항체는 높은 종양 특이적 축적을 나타내었다 (도 1 참고).

[0191] 실시예 12: ^{90}Y -표지된 RG1 항체를 이용한 종양 성장 억제

[0192] 마트리젤 중의 1×10^{-7} 개 LNCaP 세포를 5 내지 6주생 숫컷 홍선 마우스의 옆구리에 동시에 피하 접종함으로써 종양 이종이식편을 확립하였다. 종양의 용적이 50 내지 350 mm³에 도달한 시점 (종양 세포를 접종한지 5주 후)에 처리를 개시하였다. 종양 보유 동물을 4개의 처리군 (하나의 군당 13마리)에 균등하게 분포시켰다. LNCaP 이종이식편을 보유하고 있는 마우스에게, 방사성 표지된 항체 B, C, 및 비-특이적 IgG₁ (동물당 125 μCi)의 단일 주사제를 복강내 투여하였다. 4번째 처리군에게는 염수를 복강내 주사하였다. LNCaP-유래된 종양의 성장에 대한 ^{90}Y 표지된 RG1 특이적 항체의 효과를 주사한 후 32일 동안 모니터링하였다. 이때, 동물을 희생시키고, 종

양을 꺼낸 다음 칭량하였다. 체중을 모니터링함으로써 건강 상태를 결정하였다. ⁹⁰Y 표지된 특이적 인간 RG1 항체를 단일 투여하면, ⁹⁰Y 표지된 비특이적 항체 또는 비히를 대조군을 주사한 동물에게서 관찰된 결과와 비교할 때 종양 성장이 상당히 억제되었다 (도 2 참고).

[0193] 실시예 13: CHO 세포에서 RG1 항체의 클로닝 및 발현

[0194] 돌연변이 유발: 항-RG1 항체 B 및 C의 가변 영역을 코딩하는 야생형 cDNA의 부위 지시된 돌연변이 유발을 수행하여, 인간에게서 보다 자주 발견되는 동종이형을 생성시켰다. QuickChange® 다중 부위-지시된 돌연변이 유발 방법 (Stratagene)을 사용하여 상기 돌연변이 유발을 수행하였는데, TOPO/BVH 및 TOPO/CVH (Medarex)를 주형으로서 사용하였다. 프라이머 (GGGGAGGCTTGGTACAACCTGGGGGTCCCTGAG; 서열 14) 및 (GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAG; 서열 15)를 사용하여, 점 돌연변이물 H13Q, M90T 및 M92V를 B cDNA (BVH_3m) 내로 도입하였고; H13Q, M90T를 C cDNA (CVH_2m) 내로 도입하였다. 돌연변이물을 DNA 서열 분석하여 확인하였고, 그 결과 서열 22와 서열 25를 각각 수반한 돌연변이체 중쇄 가변 영역이 생성되었다. 이들 2개의 중쇄 가변 영역에 대해 추정되는 아미노산 서열이 서열 28 및 31에 각각 제시되었다.

[0195] 발현 벡터의 구축: pIE_SRγ1fa (Medarex)의 발현 벡터는 인간 IgG1 (fa 일배체형)의 CH 및 CL 영역 및 카파쇄를 각각 코딩하는 cDNAs를 함유하였다. B 및 C 경쇄 가변 영역의 pIE_SRγ1fa 내의 동일 프레임내 클로닝을 허용하기 위해서는, 프라이머 쌍 BVK_F (GGGAAGCTTGCCACCATGGAAACCCAGCG; 서열 16) 및 BVK_R (CAGTCGTACGTTT GATCTCCACCTTGGTCC; 서열 17)를 사용하여 화합성 HindIII/Bsiw 부위 (밑줄쳐져 있음)를 BVL 및 CVL cDNA의 5' 말단과 3' 말단에 각각 도입하였다. 이로써 생성되는 PCR-생성된 VL cDNAs를 pIE_SRγ1fa의 HindIII/Bsiw 부위 내로 클로닝하여 pIE/BVL 및 CVL를 창출시켰다. pIE/BVL 및 CVL 내의 동일 프레임내 VH 융합물 (BVH, BVH_3m, CVH 및 CVH_2m)을 구축하는데 동일한 전략을 사용하였다. 간략하게 언급하면, 프라이머 쌍 CVH_F (GTCAGGATGCGGCCGCCACCATGGAGTTTGTGTGAGCT; 서열 18) 및 CVH_R (ACCGATGGGCCCTTGGTGGA; 서열 19)를 사용하여, NotI/ApaI 부위를 PCR-증폭된 VH cDNA의 말단에 도입하였다. 이러한 PCR 생성물을 NotI/ApaI로 분해시키고, pIE/BVL 및 pIE/CVL의 CH 영역의 상단에 삽입하여, VH 영역이 각각의 pIE 유도체 내의 CH 영역과 동일한 프레임 내에 있도록 하였다. 최종 구조물은 pIE/B, pIE/B_3m, pIE/C 및 pIE/C_2m으로 명명되었다. 모든 삽입물은 DNA 서열 분석에 의해 확인하였다.

[0196] DG44 및 DXB11 세포의 형질감염 및 선별/증폭: F12 배지와 5% FCS가 보충된 약 4×10^6 개의 DG44 및 DXB11 세포를, 형질감염시키기 하루 전에 P100 디쉬 상에 도말하였다. 리포펙타민 2000 (Invitrogen) 및 24 μg 선형화 플라스미드 DNA (pIE/B_3m 또는 pIE/C_2m)/P100을 사용하여 형질감염을 수행하였다. 형질감염시킨지 4시간 후에 배지를 변화시켰다. 형질감염 후 대략 24시간 후에 선별적 조건을 적용하였다.

[0197] 선별은 먼저, 5% 투석된 FBS, 2 mM L-글루타민 및 G418 (400 μg/ml)를 함유하지만, 리보뉴클레오시드와 테옥시 리보뉴클레오시드가 결여된 MEM 배지를 이용하여 수행하였다. 약 90%의 융합도에 도달하면, 세포를 4 x P100 디쉬 내로 분할하고, 각종 농도의 G418 + 메토틱세이트로 동시 선별하였다. 1주 후, 살아있는 세포를 동시-선별 배지의 존재 하에 100-세포/판으로 96-웰 판 내로 도말하였다. 재조합 항체의 발현을 알아보기 위해, 살아있는 세포를 ELISA에 의해 스크리닝하였다. 가장 높은 발현 수준을 나타내는 10개 클론의 유전자 복사물 수를, 증가 농도의 메토틱세이트의 존재 하에 연속적으로 선별함으로써 증폭시키고, 마스터 세포 배양을 제조하기 위한 혈청 무함유 배지에 적응시킨 클론을 선택하였다.

[0198] 상기 명세서 내에 언급된 모든 공개 문헌 및 특허가 본원에 참고도 도입되었다. 본 발명이 그의 구체적 양태를 참조로 하여 기재되긴 하였지만, 당업자는 본 발명의 요지 및 범위를 벗어나지 않고서도 각종 변화가 이루어질 수 있고, 등가물로 대체할 수 있다는 것을 인지해야 한다. 또한, 많은 변형들은, 특정한 상황, 물질, 조성물, 공정, 공정 단계(들)가 본 발명의 목적, 요지 및 범위에 맞도록 적응시킬 수 있다. 이러한 모든 변형은 첨부된 청구의 범위 내에 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1: ¹¹¹In 표지된 RG1 항체의 생체내 분포: 3가지 RG1 항체 (A, B, 및 C), 비-특이적 hIgG₁ 대조군 항체 및 프로스타신트 (Prostascint™)를 ¹¹¹In로 방사성 표지시켰다. 방사성 표지된 항체 (특이 활성: 0.3 mCi/mg)를 중

양 (LNCaP) 보유 누드 마우스에게 정맥내 투여하였다. 주사한 후 6, 24, 120 및 150시간 췌에, 군 (무리) 당 12마리 동물을 (한번에 3마리 동물씩) 희생시키고, 종양, 혈액 및 간의 축적을 모니터링하였다 (실시에 11 참고).

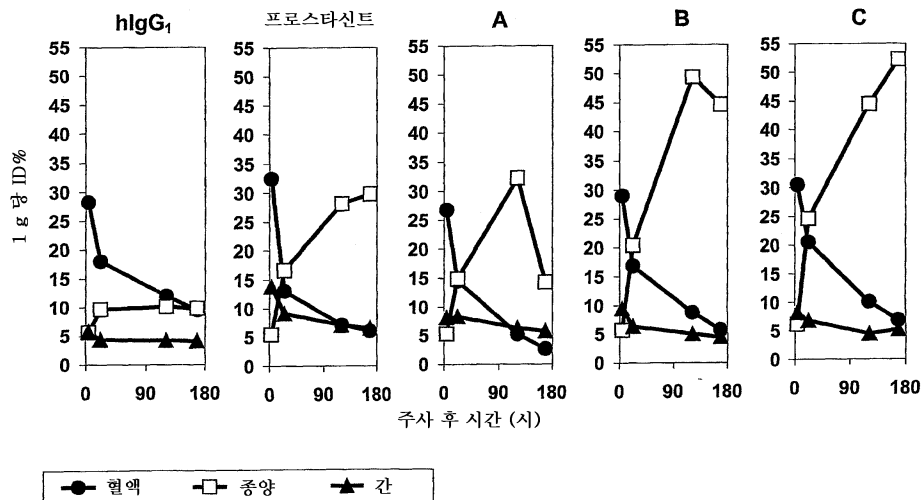
[0024] 도 2: ^{90}Y 표지된 RG1 항체의 항종양 효과: LNCaP 종양 보유 동물에게 ^{90}Y 표지된 항체 (항-RG1 항체 B 및 C 또는 비-특이적 IgG₁, 특이 활성화, 0.5 mCi/mg)를 주사하였다. 단일 용량의 125 μCi ^{90}Y -표지된 RG1 항체 (B,C)를 복강내 투여하였다. 32일째에 마우스를 희생시키고, 종양을 절제한 다음 칭량하였다 (실시에 12 참고).

[0025] 도 3: 돌연변이된 가변 중쇄 영역을 포함한, 인간 모노클로날 항체 B의 가변 쇠 영역의 아미노산 서열. V_L (서열 26), V_H (서열 27), V_{H-2m} (서열 28).

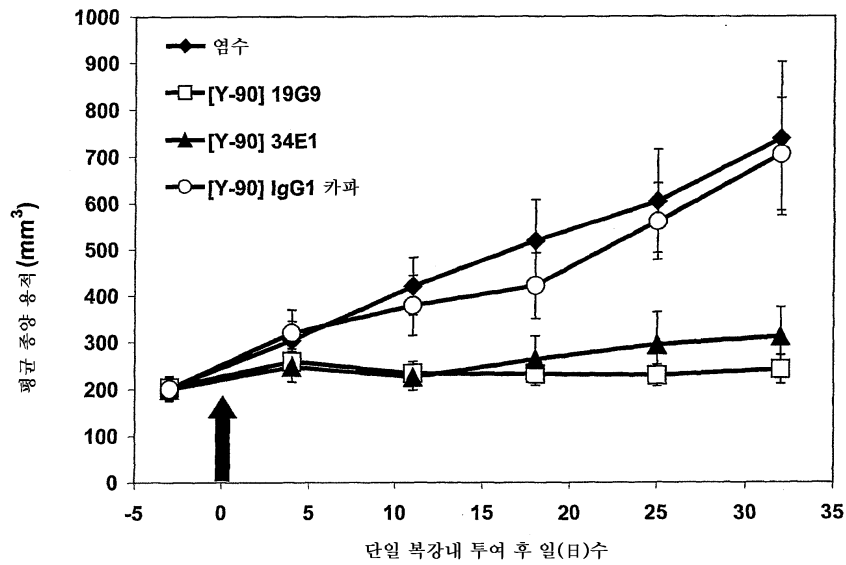
[0026] 도 4: 돌연변이된 가변 중쇄 영역을 포함한, 인간 모노클로날 항체 C의 가변 쇠 영역의 아미노산 서열. V_L (서열 29), V_H (서열 30), V_{H-3m} (서열 31).

도면

도면1



도면2



도면3

huMAb B 가변 영역 서열

V_L

1 METPAQLLFLLLLWLPDPTTGEIVLTQSPGTL~~SLSPGERATL~~SCRASQSVS 50
 51 ~~SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATG~~IPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE 100
 101 PEDFAVYYCQYSSSLTFGGGTKVEIK 150

V_H

1 MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSS 50
 51 ~~YVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTHYADSVKGRFTISR~~DNAKNSLYLQ 100
 101 MNSLRAEDMAMYYCARWGYGSGSYENDAFDIWGQGTMTVTVSSASTK 150

B_{3M}, V_H (진한 부분이 돌연변이됨)

1 MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVQPGGSRLRLSCAGSGFTFSS 50
 51 ~~YVMHWLRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTHYADSVKGRFTISR~~DNAKNSLYLQ 100
 101 MNSLRAEDTAVYYCARWGYGSGSYENDAFDIWGQGTMTVTVSSASTK 150

각 가변 영역에 대한 CDR 서열 (CDR1, CDR2 및 CDR3)에는 밑줄을 그었음

도면4

HuMAb C 가변 영역 서열

V_L

1 METPAQLLFLLLLWLPD TTGEIVLTQSPGTL SLSLSPGERATLSCRASQSVS 50
51 SSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE 100
101 PEDFAVYYCQQYGSSLTFGGGTKVEIK 150

V_H

1 MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSCAGSGFTFSS 50
51 YVMHWVRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ 100
101 MNSLRAEDMAVYYCARWGDWDDAFDIWGQGTMTVSSASTK 144

C_{2m}, V_H (진한 부분이 돌연변이됨)

1 MEFVLSWVFLVAILKGVQCEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSS 50
51 YVMHWVRQAPGKGLEWVSVIGTGGVTNYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ 100
101 MNSLRAEDTAVYYCARWGDWDDAFDIWGQGTMTVSSASTK 144

각 가변 영역에 대한 CDR 서열 (CDR1, CDR2, CDR3)에는 밑줄을 그었음

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Harkins, Richard
Parkes, Deborah
Parry, Gordon
Parry, Renate
Schneider, Douglas W.
- <120> RG1 ANTIBODIES AND USES THEREOF
- <130> 30852.15USU1
- <140> US 10/895,183
- <141> 2004-07-20
- <150> US 60/489,032
- <151> 2003-07-22

<160> 31

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 1785

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (296)..(1291)

<400> 1

agaaaggggt gcggcagcac tgccagggga agagggatgat ccgacccggg gaaggtcgct 60

gggcagggcg agttgggaaa gcggcagccc ccgccgcccc cgcagccctt tctcctcctt 120

tctcccacgt cctatctgcc tctcgttgga ggccaggccg tgcagcatcg aagacaggag 180

gaactggagc ctattggcc ggcccggggc gccggcctcg ggcttaata ggagctccgg 240

gctctggctg ggacccgacc gctgccggcc gcgctccgc tgctcctgcc gggatg atg 298
Met
1

gaa aac ccc agc ccg gcc gcc gcc ctg ggc aag gcc ctc tgc gct ctc 346
Glu Asn Pro Ser Pro Ala Ala Ala Leu Gly Lys Ala Leu Cys Ala Leu
5 10 15

ctc ctg gcc act ctc ggc gcc gcc ggc cag cct ctt ggg gga gag tcc 394
Leu Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ala Gly Gln Pro Leu Gly Gly Glu Ser
20 25 30

atc tgt tcc gcc gga gcc ccg gcc aaa tac agc atc acc ttc acg ggc 442
Ile Cys Ser Ala Gly Ala Pro Ala Lys Tyr Ser Ile Thr Phe Thr Gly
35 40 45

aag tgg agc cag acg gcc ttc ccc aag cag tac ccc ctg ttc cgc ccc 490
Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro Leu Phe Arg Pro
50 55 60 65

cct gcg cag tgg tct tcg ctg ctg ggg gcc gcg cat agc tcc gac tac Pro Ala Gln Trp Ser Ser Leu Leu Gly Ala Ala His Ser Ser Asp Tyr 70 75 80	538
agc atg tgg agg aag aac cag tac gtc agt aac ggg ctg cgc gac ttt Ser Met Trp Arg Lys Asn Gln Tyr Val Ser Asn Gly Leu Arg Asp Phe 85 90 95	586
gcg gag cgc ggc gag gcc tgg gcg ctg atg aag gag atc gag gcg gcg Ala Glu Arg Gly Glu Ala Trp Ala Leu Met Lys Glu Ile Glu Ala Ala 100 105 110	634
ggg gag gcg ctg cag agc gtg cac gcg gtg ttt tcg gcg ccc gcc gtc Gly Glu Ala Leu Gln Ser Val His Ala Val Phe Ser Ala Pro Ala Val 115 120 125	682
ccc agc ggc acc ggg cag acg tcg gcg gag ctg gag gtg cag cgc agg Pro Ser Gly Thr Gly Gln Thr Ser Ala Glu Leu Glu Val Gln Arg Arg 130 135 140 145	730
cac tcg ctg gtc tcg ttt gtg gtg cgc atc gtg ccc agc ccc gac tgg His Ser Leu Val Ser Phe Val Val Arg Ile Val Pro Ser Pro Asp Trp 150 155 160	778
ttc gtg ggc gtg gac agc ctg gac ctg tgc gac ggg gac cgt tgg cgg Phe Val Gly Val Asp Ser Leu Asp Leu Cys Asp Gly Asp Arg Trp Arg 165 170 175	826
gaa cag gcg gcg ctg gac ctg tac ccc tac gac gcc ggg acg gac agc Glu Gln Ala Ala Leu Asp Leu Tyr Pro Tyr Asp Ala Gly Thr Asp Ser 180 185 190	874
ggc ttc acc ttc tcc tcc ccc aac ttc gcc acc atc ccg cag gac acg Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala Thr Ile Pro Gln Asp Thr 195 200 205	922
gtg acc gag ata acg tcc tcc tct ccc agc cac ccg gcc aac tcc ttc Val Thr Glu Ile Thr Ser Ser Ser Pro Ser His Pro Ala Asn Ser Phe 210 215 220 225	970
tac tac cca cgg ctg aag gcc ctg cct ccc atc gcc agg gtg aca ctg Tyr Tyr Pro Arg Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ile Ala Arg Val Thr Leu 230 235 240	1018

gtg cgg ctg cga cag agc ccc agg gcc ttc atc cct ccc gcc cca gtc Val Arg Leu Arg Gln Ser Pro Arg Ala Phe Ile Pro Pro Ala Pro Val 245 250 255	1066
ctg ccc agc agg gac aat gag att gta gac agc gcc tca gtt cca gaa Leu Pro Ser Arg Asp Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro Glu 260 265 270	1114
acg ccg ctg gac tgc gag gtc tcc ctg tgg tgc tcc tgg gga ctg tgc Thr Pro Leu Asp Cys Glu Val Ser Leu Trp Ser Ser Trp Gly Leu Cys 275 280 285	1162
gga ggc cac tgt ggg agg ctc ggg acc aag agc agg act cgc tac gtc Gly Gly His Cys Gly Arg Leu Gly Thr Lys Ser Arg Thr Arg Tyr Val 290 295 300 305	1210
cgg gtc cag ccc gcc aac aac ggg agc ccc tgc ccc gag ctc gaa gaa Arg Val Gln Pro Ala Asn Asn Gly Ser Pro Cys Pro Glu Leu Glu Glu 310 315 320	1258
gag gct gag tgc gtc cct gat aac tgc gtc taa gaccagagcc ccgcagcccc Glu Ala Glu Cys Val Pro Asp Asn Cys Val 325 330	1311
tggggccccc cggagccatg ggggtgcggg ggctcctgtg caggctcatg ctgcaggcgg	1371
ccgagggcac aggggggttc gcgctgctcc tgaccgcggt gaggccgcgc cgaccatctc	1431
tgcactgaag ggcctcttgg tggccggcac gggcattggg aaacagcctc ctctttccc	1491
aaccttgctt cttaggggcc cccgtgtccc gtctgtcttc agcctctctc tctgcagga	1551
taaagtcac cccaaggctc cagctactct aaattatgtc tccttataag ttattgctgc	1611
tccaggagat tgtccttcat cgtccagggg cctggctccc acgtggttgc agatacctca	1671
gacctggtgc tctaggctgt gctgagccca ctctcccgag ggcgcatcca agcggggggc	1731
acttgagaag tgaataaatg gggcgggttc ggaagcgtca aaaaaaaaaa aaaa	1785

<210> 2
 <211> 331
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Asn Pro Ser Pro Ala Ala Ala Leu Gly Lys Ala Leu Cys Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ala Gly Gln Pro Leu Gly Gly Glu
 20 25 30

Ser Ile Cys Ser Ala Gly Ala Pro Ala Lys Tyr Ser Ile Thr Phe Thr
 35 40 45

Gly Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro Leu Phe Arg
 50 55 60

Pro Pro Ala Gln Trp Ser Ser Leu Leu Gly Ala Ala His Ser Ser Asp
 65 70 75 80

Tyr Ser Met Trp Arg Lys Asn Gln Tyr Val Ser Asn Gly Leu Arg Asp
 85 90 95

Phe Ala Glu Arg Gly Glu Ala Trp Ala Leu Met Lys Glu Ile Glu Ala
 100 105 110

Ala Gly Glu Ala Leu Gln Ser Val His Ala Val Phe Ser Ala Pro Ala
 115 120 125

Val Pro Ser Gly Thr Gly Gln Thr Ser Ala Glu Leu Glu Val Gln Arg
 130 135 140

Arg His Ser Leu Val Ser Phe Val Val Arg Ile Val Pro Ser Pro Asp
 145 150 155 160

Trp Phe Val Gly Val Asp Ser Leu Asp Leu Cys Asp Gly Asp Arg Trp

165

170

175

Arg Glu Gln Ala Ala Leu Asp Leu Tyr Pro Tyr Asp Ala Gly Thr Asp
180 185 190

Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala Thr Ile Pro Gln Asp
195 200 205

Thr Val Thr Glu Ile Thr Ser Ser Ser Pro Ser His Pro Ala Asn Ser
210 215 220

Phe Tyr Tyr Pro Arg Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ile Ala Arg Val Thr
225 230 235 240

Leu Val Arg Leu Arg Gln Ser Pro Arg Ala Phe Ile Pro Pro Ala Pro
245 250 255

Val Leu Pro Ser Arg Asp Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro
260 265 270

Glu Thr Pro Leu Asp Cys Glu Val Ser Leu Trp Ser Ser Trp Gly Leu
275 280 285

Cys Gly Gly His Cys Gly Arg Leu Gly Thr Lys Ser Arg Thr Arg Tyr
290 295 300

Val Arg Val Gln Pro Ala Asn Asn Gly Ser Pro Cys Pro Glu Leu Glu
305 310 315 320

Glu Glu Ala Glu Cys Val Pro Asp Asn Cys Val
325 330

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 3

cgcgcatagc tccgactac

19

<210> 4

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 4

gccgcgtccg caaag

15

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> probe

<400> 5

aggaagaacc agtacgtcag taacgggctg

30

<210> 6

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 6

tccctctaga gccacatgg aaaaccccag cccggc

36

<210> 7

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer2

<400> 7

aaggcatcac gtgttagacg cagttatcag ggacg

35

<210> 8

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Ser Ile Thr

<210> 9

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Thr Phe Thr Gly Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro
1 5 10 15

Leu Phe Arg

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

His Ser Ser Asp Tyr Ser Met Trp Arg Lys Asn Gln Tyr Val Ser
1 5 10 15

<210> 11

<211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Asp Ala Gly Thr Asp Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala
1 5 10 15

Thr Ile Pro Gln Asp Thr Val
20

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro Glu Thr
1 5 10

<210> 13

<211> 330

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 13

Met Glu Asn Val Ser Phe Ser Leu Asp Arg Thr Leu Trp Val Phe Leu
1 5 10 15

Leu Ala Met Leu Gly Ser Thr Ala Gly Gln Pro Leu Gly Gly Glu Ser
20 25 30

Val Cys Thr Ala Arg Pro Leu Ala Arg Tyr Ser Ile Thr Phe Thr Gly
35 40 45

Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro Leu Phe Arg Pro
50 55 60

Pro Ala Gln Trp Ser Ser Leu Leu Gly Ala Ala His Ser Ser Asp Tyr
65 70 75 80

Ser Met Trp Arg Lys Asn Glu Tyr Val Ser Asn Gly Leu Arg Asp Phe
85 90 95

Ala Glu Arg Gly Glu Ala Trp Ala Leu Met Lys Glu Ile Glu Ala Ala
100 105 110

Gly Glu Lys Leu Gln Ser Val His Ala Val Phe Ser Ala Pro Ala Val
115 120 125

Pro Ser Gly Thr Gly Gln Thr Ser Ala Glu Leu Glu Val His Pro Arg
130 135 140

His Ser Leu Val Ser Phe Val Val Arg Ile Val Pro Ser Pro Asp Trp
145 150 155 160

Phe Val Gly Ile Asp Ser Leu Asp Leu Cys Glu Gly Gly Arg Trp Lys
165 170 175

Glu Gln Val Val Leu Asp Leu Tyr Pro His Asp Ala Gly Thr Asp Ser
180 185 190

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala Thr Ile Pro Gln Asp Thr
195 200 205

Val Thr Glu Ile Thr Ala Ser Ser Pro Ser His Pro Ala Asn Ser Phe

210

215

220

Tyr Tyr Pro Arg Leu Lys Ser Leu Pro Pro Ile Ala Lys Val Thr Phe

225230235240

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

245250255

Leu Ala Ser Arg Gly Asn Glu Ile Val Asp Ser Leu Ser Val Pro Glu

260265270

Thr Pro Leu Asp Cys Glu Val Ser Leu Trp Ser Ser Trp Gly Leu Cys

275280285

Gly Gly Pro Cys Gly Lys Leu Gly Ala Lys Ser Arg Thr Arg Tyr Val

290295300

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

305310315320

Glu Ala Glu Cys Ala Pro Asp Asn Cys Val

325330

<210> 14
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> primer

<400> 14

ggggaggctt ggtacaacct ggggggtccc tgag

34

<210> 15
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 15

gaacagcctg agagccgagg acacggctgt gtattactgt gcaag

45

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 16

gggaagcttg ccaccatgga aaccccagcg

30

<210> 17

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 17

cagtcgtacg ttgatctcc accttggtcc

30

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 18

gtcaggatgc ggccgccacc atggagtttg tgctgagct

39

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> primer

<400> 19

accgatgggc ccttggtgga 20

<210> 20

<211> 381

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

atggaaaccc cagcgcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120

ctctctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcaggggcac tggcatccca 240

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300

cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatagta gctcgtcac tticggcggg 360

gggaccaagg tggagatcaa a 381

<210> 21

<211> 441

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

atggagtttg tgctgagctg ggttttctt gttgctatat taaaaggtgt ccagtgtgag 60

gttcagctgg tgcaagtctgg gggaggcttg gtacatcctg gggggtcct gagactctcc 120

tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgttatgc actggcttcg ccaggtcca 180

ggaaaaggtc tggagtgggt atcagttatt ggtactgggtg gtgtcacaca ctatgcagac 240

tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca agaactcctt gtatcttcaa 300

atgaacagcc tgagagccga ggacatggct atgtattact gtgcaagatg gggttactat 360

ggttcgggga gttatgagaa tgatgctttt gatatctggg gccaaggac aatggtcacc 420

gtctcttcag cctccaccaa g 441

<210> 22
 <211> 441
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 atggagtttg tgctgagctg ggttttcctt gttgctatat taaaagggtg ccagtgtgag 60

gttcagctgg tgcagctcgg gggaggcttg gtacaacctg gggggtcctt gagactctcc 120

tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgttatgc actggcttcg ccaggtccca 180

ggaaaaggtc tggagtgggt atcagttatt ggtactgggtg gtgtcacaca ctatgcagac 240

tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca agaactcctt gtatcttcaa 300

atgaacagcc tgagagccga ggacacggct gtgtattact gtgcaagatg gggttactat 360

ggttcgggga gttatgagaa tgatgctttt gatatctggg gccaaggac aatggtcacc 420

gtctcttcag cctccaccaa g 441

<210> 23
 <211> 381
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 atggaaacc cagcgagct tctcttctc ctgtactct ggctcccaga taccaccgga 60

gaaatttgtg tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccaggga aagagccacc 120

ctctcctgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 180

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 240

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 300

cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcactcac tttcggcgga 360

gggaccaagg tggagatcaa a 381

<210> 24
 <211> 423
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 atggagtttg tgctgagctg gggttttcctt gttgctatat taaaagggtg ccagtgtgag 60

gttcagctgg tgcagtctgg gggaggcttg gtacatcctg gggggtcctt gagactctcc 120

tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgtcatgc actgggttcg ccaggctcca 180

ggaaaaggtc tggagtgggt atcagtaatt ggtactggtg gtgtcacaaa ctatgcagac 240

tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca agaactcctt gtatcttcaa 300

atgaacagcc tgagagccga ggacatggct gtgtattact gtgcaagatg gggggactgg 360

gatgatgctt ttgatatctg gggccaaggg acaatggtca ccgtctcttc agcctccacc 420

aag 423

<210> 25
 <211> 423
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 25

atggagtttg tgcagagctg gggttttcctt gttgctatat taaaagggtg ccagtgtgag 60

gttcagctgg tgcagctcgg gggaggcttg gtacaacctg gggggtcctt gagactctcc 120

tgtgcaggct ctggattcac cttcagtagc tatgtcatgc actgggttcg ccaggctcca 180

ggaaaaggtc tggagtgggt atcagtaatt ggtactgggt gtgtcacaaa ctatgcagac 240

tccgtgaagg gccgattcac catctccaga gacaatgcca agaactcctt gtatcttcaa 300

atgaacagcc tgagagccga ggacacggct gtgtattact gtgcaagatg gggggactgg 360

gatgatgctt ttgatatctg gggccaaggg acaatggta ccgctctctc agcctccacc 420

aag 423

<210> 26
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
100 105 110

Ser Ser Ser Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 27

<211> 147

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Glu Phe Val Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Val Met His Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr His Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Met Tyr
100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Glu Asn Asp
115 120 125

Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140

Ser Thr Lys
145

<210> 28
<211> 147
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Glu Phe Val Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Ser Tyr Val Met His Trp Leu Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr His Tyr Ala Asp
65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
85 90 95

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

100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Glu Asn Asp
115 120 125

Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala
130 135 140

Ser Thr Lys
145

<210> 29
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
50 55 60

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
65 70 75 80

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
85 90 95

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

	100		105		110
Gly Ser Ser Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys					
	115		120		125
<210>	30				
<211>	141				
<212>	PRT				
<213>	Homo sapiens				
<400>	30				
Met Glu Phe Val Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly					
1		5		10	15
Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val His					
	20		25		30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe					
	35		40		45
Ser Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu					
	50		55		60
Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp					
65		70		75	80
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser					
	85		90		95
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr					
	100		105		110
Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Asp Trp Asp Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly					
	115		120		125
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys					

130

135

140

<210> 31
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Met Glu Phe Val Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ser Val Ile Gly Thr Gly Gly Val Thr Asn Tyr Ala Asp
 65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser
 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Asp Trp Asp Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 130 135 140