



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0020476
(43) 공개일자 2017년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01) G01N 33/574 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2863 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7001482
(22) 출원일자(국제) 2015년06월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년01월17일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2015/063700
(87) 국제공개번호 WO 2015/193428
국제공개일자 2015년12월23일
(30) 우선권주장
1410826.0 2014년06월18일 영국(GB)

(71) 출원인
베르겐바이오 에이에스
노르웨이, 엔-5009 베르겐, 조나스 라이즈 베이 91
(72) 발명자
미클렘, 데이비드 로버트
노르웨이, 엔-5009 베르겐, 조나스 라이즈 베이 91, 베르겐바이오 에이에스 내
키프리자노브, 세르게이
노르웨이, 엔-5009 베르겐, 조나스 라이즈 베이 91, 베르겐바이오 에이에스 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

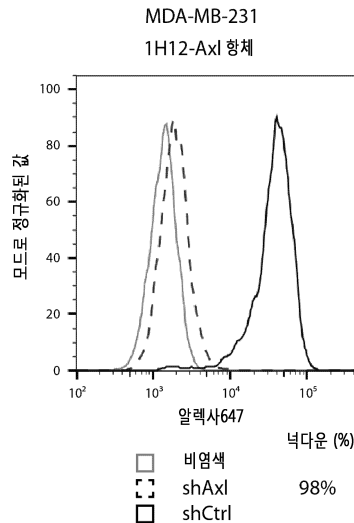
전체 청구항 수 : 총 60 항

(54) 발명의 명칭 항-AxL 항체

(57) 요약

AxL 단백질에 특이적으로 결합하는 그의 가변 서열/CDR을 특징으로 하는 항체를 기술한다. 항-AxL 항체의 제조 방법 및 그의 용도 또한 개시한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/48438 (2013.01)

A61K 47/48561 (2013.01)

G01N 33/57426 (2013.01)

G01N 33/57484 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

C07K 2317/75 (2013.01)

C07K 2317/77 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

(72) 발명자

닐슨, 린 호드넬란드

노르웨이, 엔-5009 베르겐, 조나스 라이즈 베이
91, 베르겐바이오 에이에스 내

아흐메드, 라비나

노르웨이, 엔-5009 베르겐, 조나스 라이즈 베이
91, 베르겐바이오 에이에스 내

하우젠, 할바드

노르웨이, 엔-5009 베르겐, 조나스 라이즈 베이
91, 베르겐바이오 에이에스 내

명세서

청구범위

청구항 1

Ax1에 결합하고, 하기를 포함하는 항체:

1H12 VH 도메인 (서열번호 3), 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3 및, 임의적으로, 서열번호 6 및 서열번호 5로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 VH CDR을 포함하는 VH 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 VH 도메인; 및/또는

1H12 VL 도메인 (서열번호 4), 및 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 VL CDR을 포함하는 VL 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 VL 도메인.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR을 갖는 항체 VH 도메인을 포함하고, 항체가 Ax1에의 결합에 대하여 1H12 VH 도메인 (서열번호 3) 및 1H12 VL 도메인 (서열번호 4)을 포함하는 항체의 Ax1 결합 도메인과 경쟁하는 것인 항체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 1H12 VH 도메인 (서열번호 3)을 포함하는 것인 항체.

청구항 4

제3항에 있어서, 1H12 VL 도메인 (서열번호 4)을 포함하는 것인 항체.

청구항 5

변이체가 하나 이상의 프레임워크 영역 및/또는 하나 이상의 CDR에 하나 이상의 아미노산 서열 변경을 포함하는 것인, 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항체의 변이체.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 1H12 VH 도메인 (서열번호 3) 및 1H12 VL 도메인 (서열번호 4)에 의해 형성된 Ax1 항원-결합 부위의 친화도와 동일하거나 그보다 우수한 친화도로 Ax1에 결합하고, 항체의 친화도 및 항원-결합 부위의 친화도는 같은 조건하에서 측정된 것인 항체.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, scFv 항체 분자를 포함하는 것인 항체.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 불변 영역을 포함하는 것인 항체.

청구항 9

제8항에 있어서, 전체 항체를 포함하는 것인 항체.

청구항 10

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 항원-결합 항체 단편, 예컨대, 단일 도메인 항체, Fv, scFv, dsFv, Fd, Fab, F(ab')₂, 미니바디, 디아바디, 단일쇄 디아바디, 탠덤 scFv, TandAb, 비-바디, 트리-바디, 카파(람다)-바디, BiTE, DVD-Ig, SIP, SMIP, 또는 DART인 것인 항체.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 항원에 결합할 수 있는 능력 이외에 추가의 기능적 특징을 제공하는 추가 아미노산을 포함하는 것인 항체.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 5×10^{-11} M 이하의 K_D 로 Ax1에 결합하는 것인 항체.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 1.5×10^{-11} M 이하의 K_D 로 Ax1에 결합하는 것인 항체.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 이하의 k_{off} 로 Ax1에 결합하는 것인 항체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, $3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 이하의 k_{off} 로 Ax1에 결합하는 것인 항체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, Ax1이 인간 Ax1인 것인 항체.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 영장류 Ax1에 특이적으로 결합하는 것인 항체.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 10^{-3} M 초과인 K_D 로 무린 Ax1에 결합하고/거나;

(ii) 10^{-3} M 초과인 K_D 로 인간 Mer에 결합하고/거나;

(iii) 10^{-3} M 초과인 K_D 로 인간 Tyro3에 결합하는 것인 항체.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 Ax1 효능제인 것인 항체.

청구항 20

제19항에 있어서, Ax1 신호전달이 10% 이상 더 큰 것인 항체.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 키메라 항체인 것인 항체.

청구항 22

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 인간화 항체인 것인 항체.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가

(i) 1H12 항체와 동일한 에피토프, 또는

(ii) 1H12 항체가 결합하는 에피토프와 중복되는 에피토프에 결합하는 것인 항체.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 항체가 세포 표면 상에 존재하는 Ax1에의 결합 이후에 내재화되는 것인 항체.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 임의적으로 펩티딜 결합 또는 링커를 통해 검출가능한 표지, 효소, 또는 독소에 접합된 것인 항체.

청구항 26

제25항에 있어서, 독소가 MMAE 및 MMAF를 포함하는 군으로부터 선택되는 것인 항체.

청구항 27

제25항에 있어서, 검출가능한 표지가 FITC인 것인 항체.

청구항 28

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 항체의 항체 VH 또는 VL 도메인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산.

청구항 29

제28항에 따른 핵산으로 형질전환된 숙주 세포.

청구항 30

제29항에 따른 숙주 세포를 항체 또는 항체 VH 또는 VL 도메인의 제조를 위한 조건하에서 배양하는 단계를 포함하는, 항체 또는 항체 VH 또는 VL 도메인을 제조하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 항체 또는 항체 VH 또는 VL 가변 도메인을 단리 및/또는 정제하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 항체 또는 항체 VH 또는 VL 가변 도메인을, 1종 이상의 추가 성분을 포함하는 조성물로 제제화시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 33

1H12 VH 도메인의 아미노산 서열 (서열번호 3)에 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실, 치환 또는 삽입에 의해 각각이 1H12 VH 도메인의 아미노산 서열 변이체인 하나 이상의 VH 도메인을 제공하고, 임의적으로 상기와 같이 제공된 하나 이상의 VH 도메인 아미노산 서열 변이체를 하나 이상의 VL 도메인과 조합하여 하나 이상의 VH/VL 조합을 제공하는 단계; 및/또는

1H12 VL 도메인의 아미노산 서열 (서열번호 4)에 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실, 치환 또는 삽입에 의해 1H12 VL 도메인의 아미노산 서열 변이체인 VL 도메인을 제공하고, 상기와 같이 제공된 하나 이상의 VL 도메인 아미노산 서열 변이체를 하나 이상의 VH 도메인과 조합하여 하나 이상의 VH/VL 도메인 조합을 제공하는 단계; 및

VH 도메인 아미노산 서열 변이체 또는 VH/VL 조합 또는 조합들을 시험하여 Ax1에 결합하는 항체를 확인하는 단계를 포함하는, Ax1에 결합하는 항체를 수득하는 방법.

청구항 34

대체하고자 하는 CDR3을 포함하거나, CDR3 코딩 영역이 없는 하나 이상의 VH 도메인을 코딩하는 출발 핵산을 제공하고 상기 출발 핵산을 서열번호 7의 VH CDR3 아미노산 서열을 코딩하는 도너 핵산과 조합하여 상기 도너 핵산을 출발 핵산 중 CDR3 영역 내로 삽입시켜 VH 도메인을 코딩하는 생성물 핵산을 제공하는 단계; 또는

대체하고자 하는 CDR3을 포함하거나 CDR3 코딩 영역이 없는 하나 이상의 VL 도메인을 코딩하는 출발 핵산을 제공하고 상기 출발 핵산을 서열번호 10의 VL CDR3 아미노산 서열을 코딩하는 도너 핵산과 조합하여 상기 도너 핵산을 출발 핵산 중 CDR3 영역 내로 삽입시켜 VL 도메인을 코딩하는 생성물 핵산을 제공하는 단계;

VH 도메인을 코딩하는 상기 생성물 핵산인 핵산을 발현시키고 임의적으로 상기와 같이 제조된 VH 도메인을 하나 이상의 VL 도메인과 조합하여 VH/VL 조합을 제공하고, 및/또는 VL 도메인을 코딩하는 상기 생성물 핵산인 핵산을 발현시키고 상기와 같이 제조된 VL 도메인을 하나 이상의 VH 도메인과 조합하여 VH/VL 조합을 제공하는 단계;

Ax1에 결합하는, VH 도메인 또는 VH/VL 조합을 포함하는 항체를 선별하는 단계; 및

Ax1에 결합하는 상기 항체, 및/또는 Ax1에 결합하는 항체를 코딩하는 핵산을 회수하는 단계를 포함하는, Ax1에 결합하는 항체를 수득하는 방법.

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, Ax1에 결합하는 항체가 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는 항체 단편인 것인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 항체 단편이 scFv 항체 분자인 것인 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 항체 단편이 Fab 항체 분자인 것인 방법.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 전체 항체에 항체 단편의 VH 도메인 및/또는 VL 도메인을 제공하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제33항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, Ax1에 결합하는 항체, 또는 Ax1에 결합하는 항체의 항체 VH 또는 VL 가변 도메인을 1종 이상의 추가 성분을 포함하는 조성물로 제제화하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 40

제30항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, Ax1에 결합하는 항체를 Ax1, 또는 Ax1의 단편에 결합시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 41

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른, Ax1에 결합하는 항체를 Ax1, 또는 Ax1의 단편에 결합시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 상기 결합이 시험관내에서 수행되는 것인 방법.

청구항 43

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 항체의 Ax1 또는 Ax1의 단편에의 결합량을 측정하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 44

제30항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, Ax1의 과발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애 치료용 의약의 제조에서 항체를 사용하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 45

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 또 다른 치료제와 조합된 항체 또는 그의 면역접합체.

청구항 46

제약상 허용되는 부형제와 함께 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 그의 면역접합체를 포함하는 조성물.

청구항 47

제46항에 있어서, 또 다른 치료제를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 48

제45항 또는 제47항에 있어서, 다른 치료제가 면역 체크포인트 조절제 (ICM), 예컨대, 면역 체크포인트 억제제 (ICI)인 것인 항체 또는 조성물.

청구항 49

제1항 내지 제27항 및 제45항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 방법에서 사용하기 위한 것인 항체 또는 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 증식성 질환 치료 방법에서 사용하기 위한 것인 항체 또는 조성물.

청구항 51

제40항에 있어서, 증식성 질환이 암, 예컨대, AML인 것인 항체 또는 조성물.

청구항 52

제51항에 있어서, 암이 전이성 암인 것인 항체 또는 조성물.

청구항 53

Ax1의 과발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애 치료용 의약의 제조에서 제1항 내지 제27항 및 제45항 내지 제48항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 조성물의 용도.

청구항 54

Ax1의 과발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 앓거나, 상기 질환 또는 장애 발병 위험이 있는 환자에게 제1항 내지 제27항 및 제45항 내지 제48항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, Ax1의 과발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애 치료 방법.

청구항 55

제50항에 있어서, 항체가 전이성 암 세포를 표적하도록 제약 조성물의 전달을 지시하는 것인 방법.

청구항 56

Ax1의 과발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애 검출용 진단제 제조에서 제1항 내지 제27항, 제45항 및 제48항 중 어느 한 항에 따른 항체 및 상기 항체의 전이성 암 세포에의 결합 측정을 허용하는 하나 이상의 시약의 용도.

청구항 57

Ax1의 과발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 앓거나 상기 질환 또는 장애 발병 위험이 있는 환자에게 제1항

내지 제27항 및 제45항 내지 제48항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 조성물 및 상기 항체의 전이성 암 세포에의 결합 측정을 허용하는 하나 이상의 시약을 투여하는 단계를 포함하는, Ax1의 과발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애 진단 방법.

청구항 58

제1항 내지 제27항, 제45항 및 제48항 중 어느 한 항에 따른 항체 및 상기 구성원의 전이성 암 세포에의 결합 측정을 허용하는 하나 이상의 시약을 포함하는 진단용 키트.

청구항 59

제1항 내지 제27항 및 제45항 내지 제48항 중 어느 한 항에 따른 항체 또는 조성물을 포함하는 키트.

청구항 60

제약상 허용되는 부형제와 함께, 활성 성분으로서 제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 항체를 유효량으로 포함하는 제약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 개시내용은 Ax1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체에 관한 것이다. 항-Ax1 항체의 제조 방법 및 사용 방법 또한 개시한다.

배경 기술

[0002] Ax1은 비타민 K-의존성 리간드 Gas6 (성장 정지-특이 6)을 공유하는 TAM (Tyro3-Ax1-Mer) 수용체 티로신 키나제 (RTK)의 구성원이다. TAM 패밀리의 RTK는 세포 생존, 증식, 자가포식, 이동, 혈관신생, 혈소판 응집, 및 자연살 세포 분화를 비롯한, 다양한 세포 반응을 조절한다. Ax1은 다수의 배아 조직에서 발현되고, 이는 중간엽 발생 및 신경 발생에 관여하는 것으로 사료되며, 성인 조직에서의 발현은 평활근 세포로 크게 제한된다 (MGI 진 익스 프레션 데이터베이스(MGI Gene Expression Database); www.informatics.jax.org). Ax1 활성화는 Akt, MAP 키나제, NF- κ B, STAT 등을 비롯한, 수개의 신호 전달 경로와 연관이 있다. 원래는 만성 골수성 백혈병 환자로 부터 형질전환 유전자로서 확인된 것인 Ax1은 그 이래로 각종 고등급 암과 연관되어 왔고, 불량한 예후와 상관 관계가 있는 것으로 여겨져 왔다.

[0003] Ax1 수용체 과발현은 다양한 고형 종양 및 골수 백혈병에서 검출되었다 (문헌 [Linger et al, Adv Cancer Res. 100: 35, 2008]; [Linger et al, Expert Opin Ther Targets. 14:1073, 2010]).

[0004] Ax1 발현은 악성 종양 진행과 상관 관계가 있고, 악성 췌장암 (문헌 [Song et al, Cancer. 117:734, 2011), 전립샘암 (문헌 [Paccez et al, Oncogene. 32:698, 2013]), 폐암 (문헌 [Ishikawa et al. Ann Surg Oncol. 2012]; [Zhang et al, Nat Genet. 44:852, 2012]), 유방암 (문헌 [Gjerdrum, Proc natl Acad Sci USA 107:1124, 2010]), 결장암 (문헌 [Yuen et al, PLoS One, 8:e54211, 2013]) 및 급성 골수 백혈병 (AML) (문헌 [Ben-Batalla et al, Blood 122:2443, 2013])을 비롯한 수개의 악성 종양에서 환자의 불량한 전체 생존에 대한 비의존성 예측 인자이다.

[0005] Ax1 신호 전달은 종양 연관 대식세포에 의해 단백질 리간드 (Gas6) (문헌 [Loges et al, Blood. 115:2264, 2010]) 또는 자가분비 기전 (문헌 [Gjerdrum, Proc natl Acad Sci USA 107:1124, 2010])에 의해 활성화되고, 이는 수용체 이량체화, 자기인산화 및 하류 신호전달, 예컨대, PI3 키나제 (PI3K)-AKT, 특히, AKT 및 미토겐-활성화된 단백질 키나제 (MAPK) 경로를 통한 신호전달을 구동시킨다 (문헌 [Korshunov, Clinical Science. 122:361, 2012]). 다른 티로신 키나제 수용체, 예컨대, 표피 성장 인자 수용체 (EGFR)와의 이종이량체화 또한 발생하는 것으로 보고되었다 (문헌 [Linger et al, Expert Opin Ther Targets. 14:1073, 2010]; [Meyer et al., Science Signalling 6:ra66, 2013]).

[0006] 종양 세포에서의 Ax1의 비정상적인 활성화는 시험관내 및 생체내에서의 표적화된 치료제에 대한 후천적 약물 내성(drug resistance)과 광범위한 연관성을 가진다 (문헌 [Zhang et al. Nat Genet. 44: 852, 2012]; [Byers et

al. Clin Cancer Res. 19: 279, 2013]). Ax1-표적화제는 삼중 음성 유방암, 호르몬 저항성(hormone resistance) 전립샘암 및 폐 샘암종을 비롯한, 수개의 실험상 암모델에서 EMT/CSC 특징을 역전시킴으로써 종양 형성, 전이를 차단하고, 약물 내성 (예컨대, 에를로티닙에 대한 내성)을 역전시킨다 (문헌 [Holland et al., Cancer Res 70:1544, 2010]; [Gjerdrum, Proc natl Acad Sci USA 107:1124, 2010]; [Zhang et al. Nat Genet. 44: 852, 2012]; [Paccez et al, Oncogene. 32:698, 2013]).

[0007] Ax1 및 항-Ax1 항체에 관한 다른 출원으로는 EP2267454A2 [발명의 명칭: Diagnosis and prevention of cancer cell invasion measuring ...Ax1 - 맥스 플랑크(Max Planck)]; WO2009063965 [발명의 명칭: anti Ax1 - 추가이 파마슈티칼(Chugai Pharmaceutical)]; WO2011159980A1 [발명의 명칭: anti-xl - (제넨텍(Genentech))], WO2011014457A1 [발명의 명칭: combination treatments Ax1 and VEGF antagonists - 제넨텍]; WO2012-175691A1 [발명의 명칭: Anti Ax1 20G7-D9 - INSERM], WO2012-175692A1 [발명의 명칭: Anti Ax1 3E3E8 - INSERM]; WO2009/062690A1 [발명의 명칭: anti Ax1 - U3 파마(U3 Pharma)] 및 WO2010/130751A1 [발명의 명칭: humanised anti Ax1 - U3 파마]을 포함한다.

[0008] 종양발생에서 Ax1의 역할을 고려해 볼 때, Ax1에 특이적으로 결합하는, 유익한 특성을 가진 추가의 항체를 확인 하는 것이 바람직할 수 있다. 본 개시내용은 상기 항체에 관한 것이다.

[0009] 도면의 간단한 설명

[0010] 도 1

[0011] 유세포 분석법에서의 모노클로날 항체 (MAb) 1H12의 Ax1⁺ 삼중 음성 유방암 세포주 MDA-MB-231에의 결합. MAb 1H12를 알렉사447(Alexa447) (인비트로젠(Invitrogen))과 접합시키고, 넥 다운 Ax1 발현을 보이는 MDA-MB-231 세포, 또는 대조군 shRNA로 형질감염된 세포와 함께 인큐베이션시켰다. 어큐리(Accuri) C6 유세포 분석기 (BD 바이오사이언시스(BD Biosciences))를 이용하여 세포 염색을 측정하였다. 기하 평균 형광 강도 값을 사용하여 넥다운 수준을 측정하였다.

[0012] 도 2

[0013] 제조합 인간 (rh) Ax1, rhMer 및 rhTyro3과 MAb 1H12의 상호작용을 보여주는 결합 분석으로부터의 센소그램의 중첩 플롯. 블랭크 표면 신호를 감산한 이후의 곡선이 제시되어 있다.

[0014] 도 3

[0015] rhAx1, rmAx1 및 rhTyro3-Fc로 코팅된 센서 칩 CM5와 상호작용하는 리간드 (MAb 1H12 및 rmGas6)의 비아코어 (Biacore) 분석. 블랭크 표면 신호를 감산한 이후의 곡선이 제시되어 있다.

[0016] 도 4

[0017] 비아코어 센서 칩의 표면 상에 고정화된 rhAx1과 상호작용하는 MAb 1H12의 동역학적 분석. 상이한 농도의 (1.3 - 666.7 nM) MAb 1H12에 대한 센소그램의 중첩 플롯이 제시되어 있다. BIA이벨류에이션(BIAevaluation) 소프트웨어 및 모델 '물질 이동을 갖는 1:1 결합'에 따른 곡선 피팅을 이용하여 정확한 동역학적 분석을 수행하였다. 친화도 상수 (동역학적 및 안정 상태) 뿐만 아니라, 25°C에서의 항원-결합의 반감기 (계산치)는 삽입된 표 안에 제시되어 있다.

[0018] 도 5

[0019] 비아코어 3000을 이용한, MAb 1H12 (제1 샘플) 및 MAb 1H12, MAbs 1-3, rhGas6 및 rmGas6 (제2 샘플) 사이의 경쟁에 관한 분석. 상이한 제2 샘플을 이용한 센소그램의 중첩 플롯이 제시되어 있다. 제1 샘플 (1H12) 및 제 2 샘플 주입의 출발점은 화살표로 표시되어 있다.

[0020] 도 6

[0021] 환원 및 비환원 조건하의 제조합 인간 (rh) Mer-Fc 및 Ax1-Fc 항원에 결합하는 항-Ax1 MAb 1H12의 웨스턴 블롯 분석. 레인: M, 분자량 마커 (매직 마커(Magic Mark)), MW 값 (kDa)은 좌측에 표시되어 있다; 1, rhAx1-Fc (비환원); 2, rhMer-Fc (비환원); 3, rhAx1-Fc (환원); 4, rhMer-Fc (환원). rhAx1-Fc에 상응하는 단백질 밴드는 화살표로 표시되어 있다.

[0022] 도 7

- [0023] 환원 및 비환원 조건하의 Ax1+ 및 Ax1- 세포의 용해물에 결합하는 항-Ax1 Mab 1H12의 웨스턴 블롯 분석. 레인: M, 분자량 마커 (매직 마커), MW 값 (kDa)은 좌측에 표시되어 있다; 1, Ax1- LNCaP 세포 (전립샘 샘암종)의 용해물 (비환원); 2, Ax1+ NCI-H1299 (비소세포 폐 암종)의 용해물 (환원); 3, Ax1+ NCI-H1299의 용해물 (비환원). Ax1 수용체에 상응하는 단백질 밴드는 화살표로 표시되어 있다.
- [0024] 도 8
- [0025] 항-Ax1 모노클로날 항체 1H12로부터 유래된 VH 및 VL 도메인의 아미노산 서열.
- [0026] 도 9
- [0027] 항-Ax1 마우스 항체 1H12 및 그의 키메라 (마우스 가변/인간 불변) 카운터파트의 Ax1- 양성 세포에의 용량 의존성 결합. 상이한 농도의 마우스 (m 1H12) 및 키메라 (ch 1H12) 항체를 삼중 음성 유방암 세포주 MDA-MB-231에의 결합에 대하여 유세포 분석법으로 시험하였다. 결합된 마우스 및 키메라 항체를, 각각 마우스 IgG (H+L) (1:500 희석액), 또는 인간 IgG (H+L) (1:300 희석액)에 특이적인 APC-접합된 당나귀 F(ab')₂ 단편으로 검출하였다. 어큐리 C6 유세포 분석기 (BD 바이오사이언시스)를 이용하여 세포 염색을 측정하였다. MFI, 기하 평균 형광 강도.
- [0028] 도 10
- [0029] 비아코어 센서 칩의 표면 상에 고정화된 rhAx1과 상호작용하는 키메라 Mab ch1H12의 동역학적 분석. 상이한 농도의 (1.3 - 666.7 nM)의 Mab ch1H12에 대한 센소그램의 중첩 플롯이 제시되어 있다. BIA이벨류에이션 소프트웨어 및 1:1 랭뮤어 결합 모델에 따른 곡선 피팅을 이용하여 정확한 동역학적 분석을 수행하였다. 친화도 상수 (동역학적 및 안정 상태) 뿐만 아니라, 25°C에서의 항원-결합의 반감기 (계산치)는 삽입된 표 안에 제시되어 있다.
- [0030] 도 11
- [0031] 인간-Ax1-Fc, 시노-Ax1-Fc 및 레수스-Ax1-Fc로 코팅된 센서 칩과 상호작용하는 뮤린 항체 1H12의 비아코어 분석
- [0032] 도 12
- [0033] 항체-사포린(Saporin) 접합체를 이용한 종양 세포 사멸. 비접합된 사포린 및 사포린에 커플링된 이소형 대조군 항체 (인간 IgG1) (대조군 SAP)를 음성 대조군으로서 사용하였다. 50% 세포 사멸을 유도하는 유효 농도 (EC₅₀, pM)는 삽입된 표 안에 제시되어 있다.
- [0034] 도 13
- [0035] 2차 항-마우스 항체와 가교 결합된 1H12 항체의 효능작용 활성을 예시하는 웨스턴 블롯 분석. Ser⁴⁷³ 상의 Akt의 인산화를 Ax1 활성화에 대한 대용 판독값 (surrogate readout)으로서 사용하였다. 레인: 1, 분자량 마커; 2, 양성 대조군 (전립샘 샘암종으로부터의 LNCaP 세포의 용해물); 3, 기아 이후의 HeLa 세포의 용해물; 4, 가교 결합된 1H12로 처리된, 기아 이후의 HeLa 세포. 전체 세포 용해물의 면역블롯을 항-포스포-Akt (Ser⁴⁷³)로 프로빙하였다.
- [0036] 도 14
- [0037] 2차 항-마우스 항체와 가교 결합된 1H12 항체의 용량-의존성 효능작용 활성을 예시하는 웨스턴 블롯 분석. Ser⁴⁷³ 상의 Akt의 인산화를 Ax1 활성화에 대한 대용 판독값으로서 사용하였다. 레인: 1, 분자량 마커; 2, 양성 대조군 (전립샘 샘암종으로부터의 LNCaP 세포의 용해물); 3, 기아 이후의 HeLa 세포의 용해물; 4-7, 상이한 용량의 가교 결합된 1H12 (각각 0.2, 0.6, 2.0 및 6.0 µg/ml)로 처리된, 기아 이후의 HeLa 세포. 전체 세포 용해물의 면역블롯을 항-포스포-Akt (Ser⁴⁷³)로 프로빙하였다.
- [0038] 도 15
- [0039] 1H12 항체 단독의 효능작용 활성을 예시하는 웨스턴 블롯 분석. Ser⁴⁷³ 상의 Akt의 인산화를 Ax1 활성화에 대한 대용 판독값으로서 사용하였다. 레인: 1, 분자량 마커; 2, 양성 대조군 (전립샘 샘암종으로부터의 LNCaP 세포의 용해물); 3, 기아 이후의 HeLa 세포의 용해물; 4, 추가로 Ax1-Fc로 처리된, 기아 이후의 HeLa 세포의 용해물; 5, 가교 결합된 1H12로 처리된, 기아 이후의 HeLa 세포; 6, 가교 결합된 1H12만으로 처리된, 기아 이후

의 HeLa 세포. 전체 세포 용해물의 면역블롯을 항-포스포-Akt (Ser⁴⁷³)로 프로빙하였다.

도 16

비아코어 3000을 이용한, 제1 샘플로서의 MAb 1H12 및 제2 샘플로서의 항Ax1 MAB154 또는 rmGas6 사이의 경쟁에 관한 분석. 상이한 제2 샘플을 이용한 센소그램의 중첩 플롯이 제시되어 있다. 제1 샘플 (1H12) 및 제2 샘플 주입의 출발점은 화살표로 표시되어 있다.

도 17

(a) MAb 1H12, 시판용 항체 폴리클로날 AF154, 및 모노클로날 MAB154를 이용한 Ax1+ 및 Ax1- 세포의 비교 IHC 염색. 각각 야생형 (wt) 및 Ax1-넉 다운 MDA-MB-231 세포를 Ax1+ 및 Ax1- 세포로서 사용하였다. (b) MAb 1H12 또는 폴리클로날 AF154 및 모노클로날 MAB154를 사용하여 전개된 Ax1+ 및 Ax1- 세포 용해물 (wt 및 Ax1-넉 다운 MDA-MB-231 세포)의 비교 웨스턴 블롯 분석. 로딩 대조군으로서, GAPDH 검출이 모든 블롯 상에 제시되어 있다.

발명의 내용

본원에서는 하기 서열을 개시한다 (전체 서열에 대해서는 하기의 '서열' 섹션 참조):

서열번호 1 → 1H12 VH를 코딩하는 뉴클레오티드 서열

서열번호 2 → 1H12 VL을 코딩하는 뉴클레오티드 서열

서열번호 3 → 1H12 VH를 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 4 → 1H12 VL을 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 5 → 1H12 VH CDR1을 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 6 → 1H12 VH CDR2를 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 7 → 1H12 VH CDR3을 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 8 → 1H12 VL CDR1을 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 9 → 1H12 VL CDR2를 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 10 → 1H12 VL CDR3을 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 11 → 1H12 VH FR1을 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 12 → 1H12 VH FR2를 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 13 → 1H12 VH FR3을 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 14 → 1H12 VH FR4를 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 15 → 1H12 VL FR1을 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 16 → 1H12 VL FR2를 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 17 → 1H12 VL FR3을 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 18 → 1H12 VL FR4를 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 19 → 인간 Ax1을 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 20 → 무린 Ax1을 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 21 → 인간 Tyro3 코딩하는 아미노산 서열

서열번호 22 → 인간 Mer을 코딩하는 아미노산 서열.

한 측면에서, 본 발명은 Ax1에 결합하고, 1H12 VH 도메인 (서열번호 3) 및/또는 1H12 VL 도메인 (서열번호 4)을 포함하는 단리된 항체를 제공한다. 바람직하게, 결합된 Ax1은 인간 Ax1이다.

- [0068] 비록 하기에서 추가로 논의되는 바와 같이, VH 도메인 단독인 것도 항원-결합에 사용될 수 있지만, 일반적으로는 VH 도메인은 VL 도메인과 쌍을 형성하여 항체 항원-결합 부위를 제공한다. 한 바람직한 실시양태에서, 1H12 VH 도메인 (서열번호 3)은 1H12 VL 도메인 (서열번호 4)과 쌍을 형성하고, 이로써, 1H12 VH 및 VL 도메인, 둘 모두를 포함하는 항체 항원-결합 부위가 형성된다. 다른 실시양태에서, 1H12 VH는 1H12 VL 이외의 다른 VL 도메인과 쌍을 형성한다. 경쇄의 무차별적 혼합 (promiscuity)은 당업계에 널리 확립되어 있다.
- [0069] 하나 이상의 CDR을 1H12 VH 또는 VL 도메인으로부터 취할 수 있고, 적합한 프레임워크 내로 도입할 수 있다. 이는 하기에서 추가로 논의된다. 1H12 VH CDR 1, 2 및 3은 각각 서열번호 5, 6 및 7에 제시되어 있다. 1H12 VL CDR 1, 2 및 3은 각각 서열번호 8, 9, 및 10에 제시되어 있다.
- [0070] 본 발명의 한 측면에서, Ax1에 결합하고,
- [0071] 1H12 VH 도메인 (서열번호 3), 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3 및 임의적으로, 서열번호 6 및 서열번호 5로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 VH CDR을 포함하는 VH 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 VH 도메인; 및/또는
- [0072] 1H12 VL 도메인 (서열번호 4), 및 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 VL CDR을 포함하는 VL 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 VL 도메인을 포함하는 항체를 제공한다.
- [0073] 예를 들어, 항체는 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR을 포함하는 항체 VH 도메인을 포함할 수 있다. 항체는 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR을 포함하는 항체 VL 도메인을 추가로 포함할 수 있다.
- [0074] 일부 실시양태에서, 항체는 (i) 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR을 포함하는 항체 VH 도메인, 및 (ii) 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR을 포함하는 항체 VL 도메인을 포함한다.
- [0075] 항체는 1H12 VH 도메인 (서열번호 3)을 포함할 수 있고, 임의적으로, 1H12 VL 도메인 (서열번호 4)을 추가로 포함할 수 있다.
- [0076] 바람직하게, 항체는 인간 Ax1에의 결합에 대하여 1H12 VH 도메인 (서열번호 3) 및 1H12 VL 도메인 (서열번호 4)을 포함하는 항체의 Ax1 결합 도메인과 경쟁한다.
- [0077] 본 발명의 추가의 측면에 따라, 그의 서열이 본원에 기재되어 있고, Ax1에 대한 항체에서 사용될 수 있으며, 서열 변경 또는 돌연변이화 및 스크리닝 방법에 의해 수득될 수 있는 것인, VH 및 VL 도메인의 변이체를 제공한다. 상기 방법 또한 본 발명에 의해 제공된다.
- [0078] 그의 서열이 본원에 구체적으로 개시되어 있는 것인 VH 및 VL 도메인 중 임의의 것의 가변 도메인 아미노산 서열 변이체가 논의되는 바와 같이, 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 특정 변이체는 하나 이상의 아미노산 서열 변경 (아미노산 잔기의 부가, 결실, 치환 및/또는 삽입), 아마도 약 20개 미만의 변경, 약 15개 미만의 변경, 약 10개 미만의 변경, 또는 약 5개 미만의 변경, 4, 3, 2 또는 1개를 포함할 수 있다. 변경은 하나 이상의 프레임워크 영역 및/또는 하나 이상의 CDR에서 이루어질 수 있다.
- [0079] 본 발명에 따른 항체는 항원에 결합하고, 본원에 개시된 항체 VH 및/또는 VL 도메인, 또는 본원에 개시된 VH CDR3을 포함하는, 이 둘 모두가 이루어지는 임의의 항체, 또는 상기 중 임의의 것의 변이체와, 항원과의 결합에 대하여 경쟁하는 것일 수 있다. 즉, 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 항체는 본원에 개시된 항체 VH 및/또는 VL 도메인, 또는 본원에 개시된 VH CDR3을 포함하는 항체, 또는 상기 중 임의의 것의 변이체와 동일한 에피토프 또는 중복 에피토프에 결합하는 항체이다. 항체 사이의 경쟁은 시험관내에서 예를 들어, ELISA를 사용하여 비아코어 3000 장치에서 결합 분석을 사용하여 (예를 들어, 실시예 15 & 도 16 참조), 및/또는 동일한 에피토프 또는 중복 에피토프에 결합하는 항체를 확인할 수 있도록 하기 위해 태그가 부착되지 않은 다른 항체(들)의 존재하에서 검출될 수 있는 한 항체에 특이 리포터 분자를 태그 부착시킴으로써 쉽게 검정될 수 있다.
- [0080] 따라서, 본 발명은 하나 이상의 프레임워크 영역 및/또는 하나 이상의 CDR 중 하나 이상의 아미노산 서열 변경을 포함하는 것인, 본원에서 구체적으로 개시된 임의의 것의 변이체를 포함한다. 예를 들어, 변이체 항체는 임의의 한 CDR 중에 4개 이하의 서열 변경, 예컨대, 3개 이하의 서열 변경, 2개 이하의 서열 변경, 1개 이하의 서열 변경을 포함할 수 있거나, 또는 임의의 한 CDR (예컨대, VH 도메인의 CDR3) 중에 어떤 서열 변경도 포함하지 않을 수 있다. 변이체 항체는 1H12 VH 도메인 (서열번호 3) 및 1H12 VL 도메인 (서열번호 4)을 포함하는 항체

의 Ax1 결합 도메인과, Ax1 (예를 들어, 인간 Ax1)에의 결합에 대하여 경쟁할 수 있다.

- [0081] 따라서, 본 발명의 추가 측면은 인간 Ax1에의 결합에 대하여 1H12과 경쟁하는 인간 항체 항원-결합 부위를 포함하는 항체를 제공한다.
- [0082] Ax1에 대한 것이고, Ax1에의 결합에 대하여 1H12과 경쟁할 수 있는 항체를 수득할 수 있는 다양한 방법이 당업계에서 이용가능하다.
- [0083] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체의 라이브러리 및 상기 항원을 접촉시키는 단계, 및 상기 항원에 결합할 수 있는, 라이브러리 중의 하나 이상의 항체 구성원을 선별하는 단계를 포함하는, 항원에 결합할 수 있는 하나 이상의 항체를 수득하는 방법을 제공한다.
- [0084] 라이브러리는 박테리오파지 입자의 표면 상에 디스플레이될 수 있고, 여기서, 각 입자는 그의 표면 상에 디스플레이된 항체 VH 가변 도메인, 및 임의적으로는 존재할 경우, 디스플레이된 VL 도메인 또한 코딩하는 핵산을 함유한다.
- [0085] 항원에 결합할 수 있고, 박테리오파지 입자 상에 디스플레이된 항체 선별 후, 핵산을 상기 선별된 항체를 디스플레이하는 박테리오파지 입자로부터 채취할 수 있다. 상기 핵산은 상기 선별된 항체를 디스플레이하는 박테리오파지 입자로부터 채취된 핵산의 서열을 갖는 핵산으로부터의 발현에 의한 후속되는 항체 또는 항체 VH 가변 도메인 (임의적으로 항체 VL 가변 도메인) 제조에서 사용될 수 있다.
- [0086] 상기 선별된 항체의 항체 VH 가변 도메인의 아미노산 서열을 갖는 항체 VH 가변 도메인은, 상기 VH 도메인을 포함하는 항체와 같이, 단리된 형태로 제공될 수 있다.
- [0087] Ax1에 결합할 수 있는 능력, 또한 Ax1에의 결합에 대해 1H12과 경쟁할 수 있는 능력이 추가로 시험될 수 있다.
- [0088] 본 발명에 따른 항체는 1H12의 친화도로 Ax1에 결합할 수 있다.
- [0089] 본 발명의 항체는 뮤린, 래트, 원숭이, 비-인간 영장류 및/또는 인간 Ax1에 에 결합할 수 있다. 바람직하게, 항체는 인간 및 원숭이 Ax1에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 영장류 Ax1에 특이적으로 결합한다. 예를 들어, 항체는 인간 및 원숭이 Ax1에 특이적으로 결합할 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 오직 인간 Ax1에만 특이적으로 결합한다.
- [0090] 항체는 키메라, 인간화, 또는 CDR-이식된 항-Ax1 항체일 수 있다. 예를 들어, 항체는 키메라 인간/마우스 항체일 수 있다.
- [0091] 상이한 항체의 결합 친화도 및 중화 효능은 적절한 조건하에서 비교될 수 있다.
- [0092] 항체 서열 이외에도, 본 발명에 따른 항체는 예컨대, 펩티드 또는 폴리펩티드, 예컨대, 폴딩된 도메인을 형성하거나, 또는 상기 분자에 항원에 결합할 수 있는 능력 이외의 또 다른 기능적 특징을 부여하는 다른 아미노산을 포함할 수 있다.
- [0093] 본 발명의 항체는 검출가능한 표지를 보유할 수 있거나, 또는 (예컨대, 펩티드 결합 또는 링커를 통해) 독소 (예컨대, 세포독소), 효소, 또는 유기 모이어티에 접합될 수 있다.
- [0094] 당업자는 분자를 단백질에 화학적으로 접합시키는 다수의 접근법을 알고 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 항체는 검출가능한, 형광 표지, 예컨대, 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)에, 또는 리포터 효소, 예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다제 (HRP)에 접합될 수 있다.
- [0095] 바람직한 실시양태에서, 항체는 세포독성 약물에 접합되어 항체-약물 접합체 (ADC)를 형성한다. 항체가 제약 용도인 경우, 항체와 약물을 연결하는 결합은 바람직하게 순환 (예를 들어, 혈중 순환)에서는 안정적이지만, 일단 접합체가 세포내에서 분리되고 나면 불안정하다. 따라서, 면역접합체로서 접합된 항체는 예를 들어, 암 치료 방법에서 사용될 수 있다.
- [0096] 추가 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체, VH 도메인 및/또는 VL 도메인을 코딩하는 서열을 포함하는 단리된 핵산, 및 상기 항체, VH 도메인 및/또는 VL 도메인의 제조를 위한 조건하에서 상기 핵산을 발현시키는 단계, 및 그를 회수하는 단계를 포함하는, 본 발명에 따른 항체, VH 도메인 및/또는 VL 도메인을 제조하는 방법을 제공한다.
- [0097] 본 발명에 따른 항체는 인체 또는 동물의 신체의 치료 또는 진단 방법, 예컨대, 인간 환자에게 유효량의 본 발명의 항체, 또는 그의 접합체, 또는 약물-접합체를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 환자에서 질환 또는 장애를

치료하는 방법 (이는 예방적 치료를 포함할 수 있다)에서 사용될 수 있다. 본 발명에 따라 치료될 수 있는 병태로는 본원 다른 곳에서 논의되는 것을 포함한다.

- [0098] 본 발명에 따른 항체는 예를 들어, 항체가 결합하는 세포의 존재 또는 그의 위치를 측정하기 위한 영상화 방법에서 사용될 수 있다.
- [0099] 추가의 측면에서, 본 발명은 본 발명에 따른 항체, 및 항체의 항원에의 결합을 측정하는 하나 이상의 시약을 포함하는 진단용 키트를 제공한다.
- [0100] 본 발명의 추가의 측면은 본원에 개시된 항체 VH 가변 도메인 (서열번호 3) 및/또는 VL 가변 도메인 (서열번호 4)을 코딩하는, 핵산, 일반적으로는 단리된 핵산을 제공한다. 일부 실시양태에서, VH를 코딩한 핵산은 서열번호 1에 기재된 서열을 가진다. 일부 실시양태에서, VL을 코딩한 핵산은 서열번호 2에 기재된 서열을 가진다.
- [0101] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 개시된 VH CDR 또는 VL CDR 서열, 특히, 서열번호 5, 6, 및 7로부터 선택되는 VH CDR, 또는 서열번호 8, 9, 또는 10으로부터 선택되는 VL CDR, 가장 바람직하게는 1H12 CDR3 (서열번호 7)을 코딩하는 핵산, 일반적으로는 단리된 핵산을 제공한다.
- [0102] 추가 측면은 본 발명의 핵산으로 형질전환된 숙주 세포를 제공한다.
- [0103] 추가의 또 다른 측면은 코딩 핵산으로부터 발현될 수 있도록 하는 단계를 포함하는, 항체 VH 가변 도메인을 제조하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 상기 항체 VH 가변 도메인의 제조를 위한 조건하에서 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0104] VL 가변 도메인, 및 VH 및/또는 VL 도메인을 포함하는 항체를 제조하는 유사한 방법을 본 발명의 추가 측면으로서 제공한다.
- [0105] 제조 방법은 생성물의 단리 및/또는 정제 단계를 포함할 수 있다.
- [0106] 제조 방법은 생성물을, 1종 이상의 추가 성분, 예컨대, 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물로 제제화하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0107] 본 발명의 상기 측면 및 다른 측면은 하기 추가의 상세한 설명에서 기술한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0108] **항체 특성**
- [0109] Ax1에 대한 고친화도
- [0110] 본원에 기술된 1H12 항체는 고친화도로 인간 Ax1에 결합한다. 실시예 4에 기술된 바와 같이, 1H12 항체의 K_D 는 4.98×10^{-11} M인 것으로 측정되었다. 이는 항-Ax1 항체에 대해 기술되었지만 가장 낮은 K_D 이다.
- [0111] 예상 밖으로, 키메라 MAbs ch1H12 (실시예 11 & 도 10 참조)은 역시 더 높은 친화도, $K_D = 1.10 \times 10^{-11}$ M을 가지며; 상기 수치는, 인간 불변 도메인 스캐폴드 상에 탑재되었을 때에는 가능하게는 V_H 및 V_L 도메인의 더 나은 배향에 기인하여, 모체 무린 항체보다 4.5배 더 낮다.
- [0112] 따라서, 본원에 기술된 항체는 고친화도로 Ax1에 결합하고; 바람직하게, 인간 Ax1이 고친화도로 결합된다. 일부 실시양태에서, 항체는 10^{-6} M 이하, 예컨대, 5×10^{-7} M 이하, 10^{-7} M 이하, 5×10^{-8} M 이하, 10^{-8} M 이하, 5×10^{-9} M 이하, 10^{-9} M 이하, 5×10^{-10} M 이하, 10^{-10} M 이하, 5×10^{-11} M 이하, 1.5×10^{-11} M 이하, 10^{-11} M 이하, 5×10^{-12} M 이하, 10^{-12} M 이하, 5×10^{-13} M 이하, 10^{-13} M 이하, 5×10^{-14} M 이하, 10^{-14} M 이하, 5×10^{-15} M 이하, 또는 10^{-15} M 이하인 K_D 로 Ax1 (또는 인간 Ax1)에 결합한다.
- [0113] 일부 실시양태에서, 항체는 10^{-8} M 내지 10^{-10} M, 10^{-10} M 내지 10^{-12} M, 10^{-12} M 내지 10^{-14} M, 또는 10^{-14} M 내지 10^{-16} M인 K_D 로 Ax1 (또는 인간 Ax1)에 결합한다.

- [0114] k_{off} 는 실시예 4에 기술된 바와 같이 측정 및 계산될 수 있다.
- [0115] 본원에 기술된 1H12 항체는 매우 느린 해리 속도 (k_{off})를 가지는 것을 특징으로 한다. 구체적으로, 실시예 4에서, 1H12 항체는 매우 느린 해리 속도 ($k_{off} = 1.07 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$)를 가지는 것으로 측정되었다.
- [0116] 예상 밖으로, 키메라 MAbs ch1H12 (실시예 11 & 도 10 참조)은 여전히 더 낮은 해리 속도, $k_{off} = 2.99 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 을 가지며, 그 결과로 ch1H12/Ax1 복합체의 반감기는 64.4 hr이었다.
- [0117] 따라서, 본원에 기술된 항체는 바람직하게 느린 해리 속도로 인간 Ax1에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 10^{-3} s^{-1} 이하, 예컨대 이하, $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 이하, 10^{-4} s^{-1} 이하, $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 이하, $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 이하, 10^{-5} s^{-1} 이하, $3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 이하, $5 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 이하, 10^{-6} s^{-1} 이하, $5 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$ 이하, 10^{-7} s^{-1} 이하, $5 \times 10^{-8} \text{ s}^{-1}$ 이하, 또는 10^{-8} s^{-1} 이하인 k_{off} 로 Ax1 (또는 인간 Ax1)에 결합한다.
- [0118] 특이적 결합
- [0119] 일반적으로, '특이적' 및 '특이적으로 결합한다'라는 용어는 항체가 그의 특이적 결합 파트너(들) 이외의 다른 분자에는 어떤 유의적인 결합도 보이지 않는 상황을 의미하는 것으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 Ax1에 '특이적으로 결합'하는 항체는 무린 Ax1에 대해서는 어떤 유의적인 결합도 보이지 않을 것이다.
- [0120] 상기 용어는 또한 예컨대, 에피토프에 '특이적으로 결합'하는 항체가 인식된 에피토프를 보유하는 다양한 항원 모두에 결합할 수 있는 경우, 항체가 다수의 항원이 보유하는 특정 에피토프에 대해 특이적일 때에도 적용될 수 있다.
- [0121] 전형적으로, 특이성은 결합 검정법, 예컨대, 항원 패널을 이용하는 ELISA에 의해 측정될 수 있다.
- [0122] 본원에 기술된 1H12 항체는 고특이성으로 인간 Ax1에 결합한다. 이는
- [0123] (1) 실시예 2에서, 1H12는 인간 TAM 수용체 티로신 키나제 패밀리의 다른 구성원인, hMer 및 hTyro3으로부터 유래된 재조합 항원에는 어떤 유의적인 결합도 보이지 않고;
- [0124] (2) 실시예 3에서, 1H12는 인간 Ax1에는 강력하게 결합하지만, 무린 Ax1에의 결합은 보이지 않고 (이는 무린 및 인간 Ax1, 둘 모두에 강력하게 결합할 뿐만 아니라, (더욱 약하게) 인간 Tyro3에 결합하는 무린 Ax1 리간드인 무린 Gas 6과는 대조를 이룬다);
- [0125] (3) 실시예 9에서, 1H12는 압도적으로 많은 대다수의 시험 조직 샘플에 결합하지 않거나, 또는 거의 결합하지 않는 것으로 보이는 것으로 제시된 바와 같이, 실시예에서 입증된다.
- [0126] 따라서, 본원에 기술된 항체는 바람직하게 영양류 Ax1에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 항체는 인간 및 원숭이 Ax1에 특이적으로 결합한다. 한 실시양태에서, 항체는 오직 인간 Ax1에만 특이적으로 결합한다.
- [0127] 본 발명의 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 항체는 인간 Tyro3 및/또는 인간 Mer에 어떤 유의적인 결합도 보이지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 항체는 무린 Ax1에 어떤 유의적인 결합도 보이지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 항체는 인간 Tyro3, 인간 Mer, 또는 무린 Ax1 중 임의의 것에 어떤 유의적인 결합도 보이지 않는다.
- [0128] 항체가 항원에 대하여 '어떤 유의적인 결합도 보이지 않는 것'에 관한 여부는 예를 들어, 실시예 2 및 3에 기술된 기법을 사용하여 당업자에 의해 쉽게 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체가 10^{-3} M 초과, 예컨대, 10^{-2} M 초과, 10^{-1} M 초과, 또는 1 M 초과인 K_D 로 특정 항원에 결합한다면, 항체는 특정 항원에 '어떤 유의적인 결합도 보이지 않는 것'으로 간주된다. K_D 는 실시예 4에 기술된 바와 같이 측정 및 계산될 수 있다.
- [0129] 한 측면에서, 본 발명의 항체는 1H12 항체와 동일한 에피토프, 또는 1H12 항체가 결합하는 에피토프와 중복되는 에피토프에 결합한다. 상이한 항체 사이의 경쟁은 시험관내에서 예를 들어, ELISA를 사용하여, 및/또는 동일한 에피토프 또는 중복 에피토프에 결합하는 항체를 확인할 수 있도록 하기 위해 태그가 부착되지 않은 다른 항체(들)의 존재하에서 검출될 수 있는 한 결합 구성원에 특이 리포터 분자를 태그 부착시킴으로써 쉽게 검정될 수

있다.

[0130] 항체 내재화

[0131] 본원에 기술된 1H12 항체는 그의 표적, Ax1에의 결합시 우수한 세포 내재화를 가진다는 것을 나타낸다. 내재화는 또한 항체가 세포독소, 예컨대, 사포린에 접합되었을 때에도 관찰된다 (실시에 13 & 도 12 참조).

[0132] 따라서, 본 발명의 항체, 또는 그의 접합체는 바람직하게, 세포 표면 상에 존재하는 Ax1에의 결합 이후에 내재화된다.

[0133] Ax1 검출에서의 유용성

[0134] 본원에 기술된 항체의 예상 밖의 우수한 결합 특성에 기인하여 상기 항체는 Ax1 검출을 포함하는 적용에서 특히 효과적이다. 예를 들어, 비교 시험 결과, 1H12 항체가 면역조직화학법 및 웨스턴 블롯팅 적용, 둘 모두에서 AF154에 대한 시판용 항Ax1 항체 및 MAB154보다 현저히 더 강력한 신호를 보이는 것으로 나타났고 (실시에 16 및 도 17 참조); 경쟁 분석은 1H12 및 MAB154가 동일한 또는 중복 에피토프에 결합한다는 것을 시사한다 (도 16 참조). Ax1 검출의 상기와 같이 더 강력한 신호 및 증가된 감수성이 검출 및 분석 검정법에서 유의적인 이점을 제공한다.

[0135] Ax1 신호전달의 효능작용

[0136] 본원에 기술된 1H12 항체는 Ax1에의 결합시 Ax1 신호전달을 유도할 수 있다. 이는 도 13 - 15과 함께, Ser⁴⁷³ 상의 Ax1-이펙터 Akt의 인산화를 측정함으로써 측정된 바, 1H12 결합이 용량에 의존하는 방식으로 강력한 Ax1 신호전달을 유도하는 것이 관찰된다는 것이 실시에 14에서 입증된다.

[0137] 따라서, 한 측면에서, 본원에 기술된 항체는 Ax1 신호전달에 대하여 효능작용을 하고; 즉, 본원에 기술된 항체는 바람직하게 Ax1 효능제이다.

[0138] 추가 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 항체 VH 및/또는 VL 도메인, 또는 본원에 개시된 VH CDR3, 또는 이들 중 임의의 것의 변이체를 포함하는 항체와 동일한 에피토프 또는 중복 에피토프에 결합하는 항체로서, 여기서, 항체는 Ax1 효능제인 것인 항체를 제공한다. 그의 동일한 또는 중복 에피토프의 결합은 본원에 기술된 바와 같이, 경쟁 연구에 의해 시험관내에서 쉽게 측정될 수 있다.

[0139] 일부 실시양태에서, Ax1 신호전달은 비-Ax1 결합 대조군 항체의 존재하에서보다 본 발명의 항체의 존재하에서 10% 이상 더 크고; 예를 들어, 비-Ax1 결합 대조군 항체의 존재하에서보다 본 발명의 항체의 존재하에서 10% 이상 더 크거나, 20% 이상 더 크거나, 30% 이상 더 크거나, 40% 이상 더 크거나, 50% 이상 더 크거나, 60% 이상 더 크거나, 70% 이상 더 크거나, 80% 이상 더 크거나, 90% 이상 더 크거나, 100% 이상 더 크거나, 200% 이상 더 크거나, 500% 이상 더 크거나, 또는 1,000% 이상 더 크다. Ax1 신호전달 수준은 본원 실시에 14에 기술된 바와 같이, Ser⁴⁷³ 상의 Ax1-이펙터 Akt의 인산화를 측정함으로써 평가될 수 있다.

[0140] Ax1 발현 및/또는 활성의 하향 조절

[0141] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 세포 표면 (예컨대, 종양 세포 표면) 상의 Ax1 수용체 발현의 하향 조절을 유도한다.

[0142] 일부 실시양태에서, 세포 표면 Ax1 발현은 Ax1 항체가 처리되지 않았을 때의 Ax1 세포 표면 발현의 80% 미만으로까지 감소된다. 일부 실시양태에서, 세포 표면 발현은 Ax1 항체가 처리되지 않았을 때의 Ax1 세포 표면 발현의 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 또는 40% 미만으로까지 감소된다.

[0143] 일부 실시양태에서, 세포 (예컨대, 종양 세포)에서의 전체 Ax1 발현은 Ax1 항체가 처리되지 않았을 때의 전체 Ax1 발현의 80% 미만으로까지 감소된다. 일부 실시양태에서, 전체 Ax1 발현은 Ax1 항체가 처리되지 않았을 때의 전체 Ax1 발현의 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 또는 40% 미만으로까지 감소된다. 일부 실시양태에서, Ax1 발현의 하향 조절은 빠르게 이루어지고, 24시간 이상 동안 지속된다.

[0144] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 구성적 Ax1 활성을 억제시킨다.

[0145] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 Ax1 활성을 억제시킨다.

[0146] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 세포 사멸, 예를 들어, 아포프토시스에 의한 예컨대, 종양 세포, 예컨대, A549 종양 세포 사멸을 촉진시키고; 이는 예를 들어 BrdU 혼입 검정법, MTT, [³H]-티미딘 혼입 (예컨대, 탐카운

트(TopCount) 검정법 (퍼킨엘머(PerkinElmer))), 세포 생존가능성 검정법 (예컨대, 셀타타어-글로(CellTiter-Glo) (프로메가(Promega))), DNA 단편화 검정법, 카스파제 활성화 검정법, 트리판 블루 배제, 크로마틴 형태 검정법 등에 의해 측정될 수 있다.

[0147] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 Ax1 하류 신호전달을 억제시킨다. 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 Gas6 의존성 세포 증식을 억제시킨다.

[0148] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 종양-연관 대식세포로부터의 염증성 시토카인 발현을 억제시킨다.

[0149] 일부 실시양태에서, 항-Ax1 항체는 종양 기질 기능을 조절함으로써 종양 성장 및/또는 전이를 억제시킨다.

[0150] **정의**

[0151] **항체**

[0152] 본 용어는 천연적인지, 또는 부분적으로 또는 전체적으로 합성적으로 제조되었는지에 상관없이, 면역글로불린을 기술한다. 본 용어는 또한 항체 항원-결합 도메인을 포함하는 임의의 폴리펩티드 또는 단백질을 포함한다. 항체 항원-결합 도메인을 포함하는 항체 단편은 전체 항체 (예를 들어, 정규 배열로 VH, CH1, CH2, CH3, VL, 및 CL 도메인을 포함하는 IgG 항체), 또는 표적 항원에 대한 그의 결합 활성을 보유하는, 전체 항체의 단편을 포함한다. 상기 단편은 Fv (단편 가변), Fab (단편 항체 결합) 및 F(ab')₂ 단편 뿐만 아니라, 단일쇄 Fv 항체 (scFv), dsFv, 미니바디, 디아바디, 단일쇄 디아바디, 탠덤 scFv, TandAb, 비-바디, 트리-바디, 카파(람다) 바디, BiTE, DVD-Ig, SIP, SMIP, 또는 DART를 포함한다. 추가로, 항체 및 그의 단편은 예를 들어, EP239400A에 기술된 바와 같은 인간화 항체일 수 있다. 예를 들어: 모노클로날 및 폴리클로날 항체, 재조합 항체, 항체의 단백질 분해 및 재조합 단편 (Fab, Fv, scFv, 디아바디), 단일-도메인 항체 (VHH, sdAb, 나노바디, IgNAR, VNAR), 및 항체-유사 특이 결합을 가지도록 조작된, 항체와 관련이 없는 단백질 (항체 모방체), 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 하기와 같은 것이 있다:

명칭	근간:
에드넥틴/모노바디	인간 피브로넥틴의 10번째 III형 도메인 (10Fn3), 10 kDa
어피바디	단백질 A, Z 도메인, 6 kDa
어필린	인간 γ-크리스탈린/인간 유비퀴틴 (10-20 kDa)
어피틴	Sac7d (술포로부스 액시도칼다리우스 (<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)로부터), 7 kDa
안티칼린	림포칼린, 20 kDa
아비머	각종 막 수용체의 도메인, 9-18 kDa
DARPin	양키린 반복 모티프, 14 kDa
에비바디	세포독성 T-림프구 항원 4 (CTLA-4), 15 kDa
피노머	Fyn, SH3 도메인, 7 kDa
쿠니츠(Kunitz)	
도메인 펩티드	각종 프로테아제 억제제, 6 kDa

[0153] 항체는 항체 중쇄 불변 영역 및/또는 항체 경쇄 불변 영역 모두 또는 그의 일부를 포함할 수 있다.

[0154] 항체는 항체 중쇄 불변 영역 및/또는 항체 경쇄 불변 영역 모두 또는 그의 일부를 포함할 수 있다.

- [0155] 원래의 항체의 특이성을 보유하는 조작된 항체 또는 키메라 분자를 제조하는 데 모노클로날 및 다른 항체를 취할 수 있고, 재조합 DNA 기술의 기법을 사용할 수 있다. 상기 기법은 항체의 면역글로불린 가변 영역, 또는 상보성 결정 영역 (CDR)을 코딩하는 DNA 단편을 다른 면역글로불린의 면역글로불린 불변 영역, 또는 불변 영역 + 프레임워크 영역을 코딩하는 유전자를 라이게이션시키는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, EP-A-184187, GB 2188638A 또는 EP-A-239400을 참조할 수 있다. 하이브리도마 또는 항체를 생산하는 다른 세포는, 제조되는 항체의 결합 특이성을 변경시키거나, 변경시키지 않는, 유전적 돌연변이화 또는 다른 변이의 대상이 될 수 있다.
- [0156] 항체는 다수의 방식으로 변형될 수 있는 바, "항체 분자"라는 용어는 원하는 특이성을 가진 항체-유래의 항원-결합 도메인을 가진 임의의 폴리펩티드 또는 다른 분자를 포괄하는 것으로서 해석되어야 한다. 따라서, 본 용어는 천연적인지, 또는 전체적으로 또는 부분적으로 합성적인지 상관없이, 면역글로불린 결합 도메인을 포함하는 임의의 폴리펩티드를 비롯한, 항체 단편 및 유도체를 포괄한다. 그러므로, 또 다른 폴리펩티드에 융합된 면역글로불린 결합 도메인, 또는 당사물을 포함하는 키메라 분자도 포함된다. 키메라 항체의 클로닝 및 발현은 EP-A-0120694 및 EP-A-0125023에 기술되어 있다.
- [0157] 전체 항체의 단편이 항원에 결합할 수 있는 기능을 수행할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 결합 단편의 예로는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fab 단편; (ii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iii) 단일 항체의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (iv) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편 (문헌 [Ward, E.S. et al., Nature 341, 544-546 (1989)]); (v) 단리된 CDR 영역; (vi) 연결된 두 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')₂ 단편; (vii) VH 도메인 및 VL 도메인이, 두 도메인이 회합하여 항원-결합 부위를 형성할 수 있도록 허용하는 펩티드 링커에 의해 연결되어 있는 것인, 단일쇄 Fv 분자 (scFv) (문헌 [Bird et al, Science, 242, 423-426, 1988]; [Huston et al, PNAS USA, 85, 5879-5883, 1988]); (viii) 이중특이적 단일쇄 Fv 이량체 (PCT/US92/09965) 및 (ix) 유전자 융합체에 의해 구축된 다가 또는 다중특이적 단편인 "디아바디" (W094/13804; 문헌 [P. Holliger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448, 1993]). Fv, scFv 또는 디아바디 분자는 VH 및 VL 도메인을 연결하는 디설피드 브릿지의 도입에 의해 안정화될 수 있다 (문헌 [Y. Reiter et al, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996]). CH3 도메인에 연결된 scFv를 포함하는 미니바디 또한 제조될 수 있다 (문헌 [S. Hu et al, Cancer Res., 56, 3055-3061, 1996]).
- [0158] 항체는 이중특이적 또는 다중특이적일 수 있다. 이중특이적 항체가 사용되는 경우, 이는 다양한 방식으로 제조될 수 있는 (문헌 [Holliger, P. and Winter G. Current Opinion Biotechnol. 4, 446-449 (1993)]), 예컨대, 화학적으로 또는 하이브리드 하이브리도마로부터 제조될 수 있는, 종래 이중특이적 항체일 수 있거나, 또는 상기 언급된 이중특이적 항체 단편 중 임의의 것일 수 있다. 디아바디 및 scFv는 Fc 영역 없이, 오직 가변 도메인만을 사용하여 구축될 수 있고, 이로써, 부작용, 예컨대, 항체 이펙터 기능, 또는 면역 기원의 항체를 사용하는 경우에는 인간-항-마우스 항체 (HAMA) 반응에 기인하는 부작용을 잠재적으로 감소시킬 수 있다.
- [0159] 이중특이적 전체 항체와 달리, 이중특이적 디아바디는 또한 쉽게 구축될 수 있고, 박테리아 (예컨대, 에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*))에서 발현될 수 있기 때문에 특히 유용할 수 있다. 적절한 결합 특이성을 가진 디아바디 (및 다수의 다른 폴리펩티드, 예컨대, 항체 단편)는 파지 디스플레이 (W094/13804)를 사용하여 항체 라이브러리로부터 쉽게 선별될 수 있다. 디아바디의 한쪽 아암이 예를 들어, Ax1에 대한 특이성을 가진 그대로 불변 상태로 유지되어야 한다면, 나머지 다른 아암은 가변적인 라이브러리가 제조될 수 있고, 적절한 특이성을 가진 항체를 선별할 수 있다. 이중특이적 전체 항체는 "놉-인트루-홀(놉-인트루-홀)" 조작에 의해 제조될 수 있다 (문헌 [J. B. B. Ridgeway et al., Protein Eng., 9, 616-621, 1996]).
- [0160] 항원-결합 도메인
- [0161] 이는 항원을 인식하고, 그에 특이적으로 결합하고, 항원의 일부 또는 그 모두와 상보적인 영역을 포함하는 항체 분자의 일부를 기술한다. 항원이 클 경우, 항체는 항원의 특정 일부분에만 결합할 수 있고, 상기 일부분은 에피토프로 명명된다. 항원-결합 도메인은 하나 이상의 항체 가변 도메인 (예컨대, VH 도메인으로 이루어진, 소위 Fd 항체 단편으로 불리는 것)에 의해 제공될 수 있다. 바람직하게, 항원-결합 도메인은 항체 경쇄 가변 영역 (VL) 및 항체 중쇄 가변 영역 (VH)을 포함한다.
- [0162] 특이 단백질
- [0163] 인간 Ax1
- [0164] 본원에서 사용되는 바, '인간 Ax1'은 수용체 티로신 키나제의 인간 TAM 패밀리의 Ax1 구성원을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 인간 Ax1 폴리펩티드는 진뱅크 수탁 번호(Genbank accession no.) AAH32229, 버전 번호

AAH32229.1 GI:21619004 (기록 업데이트 날짜: 2012년 3월 6일 오후 1시 18분) (서열번호 19)에 상응한다. 한 실시양태에서, 인간 Ax1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 진뱅크 수탁 번호 M76125, 버전 번호 M76125.1 GI:292869 (기록 업데이트 날짜: 2010년 6월 23일 오전 8시 53분)에 상응한다.

[0165] 뮤린 Ax1

[0166] 본원에서 사용되는 바, '뮤린 Ax1'은 수용체 티로신 키나제의 뮤린 TAM 패밀리의 Ax1 구성원을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 뮤린 Ax1 폴리펩티드는 진뱅크 수탁 번호 AAH46618, 버전 번호 AAH46618.1 GI:55777082 (기록 업데이트 날짜: 2012년 3월 6일 오후 1시 36분) (서열번호 20)에 상응한다. 한 실시양태에서, 뮤린 Ax1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 진뱅크 수탁 번호 NM_009465, 버전 번호 NM_009465.4 GI:300794836 (기록 업데이트 날짜: 2014년 3월 12일 오후 3시 52분)에 상응한다.

[0167] 인간 Tyro3

[0168] 본원에서 사용되는 바, '인간 Tyro3'은 수용체 티로신 키나제의 인간 TAM 패밀리의 Tyro3 구성원을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 인간 Tyro3 폴리펩티드는 진뱅크 수탁 번호 Q06418, 버전 번호 Q06418.1 GI:1717829 (기록 업데이트 날짜: 2014년 4월 22일 오후 12시 7분) (서열번호 21)에 상응한다. 한 실시양태에서, 인간 Tyro3 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 진뱅크 수탁 번호 BC051756, 버전 번호 BC051756.1 GI:30704372 (기록 업데이트 날짜: 2012년 3월 6일 오후 1시 43분)에 상응한다.

[0169] 인간 Mer

[0170] 본원에서 사용되는 바, '인간 Mer'은 수용체 티로신 키나제의 인간 TAM 패밀리의 Mer 구성원을 지칭한다 (공식 명칭 = MERTK, 유니프로트 ID(Uniprot ID) = Q12866). 일부 실시양태에서, 인간 Mer 폴리펩티드는 진뱅크 수탁 번호 AAI14918, 버전 번호 AAI14918.1 GI:109732052 (기록 업데이트 날짜: 2012년 3월 6일 오후 4시 21분) (서열번호 22)에 상응한다. 한 실시양태에서, 인간 Mer 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 진뱅크 수탁 번호 NM_006343, 버전 번호 NM_006343.2 GI:66932917 (기록 업데이트 날짜: 2014년 3월 16일 오후 8시 52분)에 상응한다.

[0171] BSA

[0172] 본원에서 사용되는 바, 'BSA'는 우혈청 알부민을 지칭한다. 일부 실시양태에서, BSA는 진뱅크 수탁 번호 CAA76847, 버전 번호 CAA76847.1 GI:3336842 (기록 업데이트 날짜: 2011년 1월 7일 오후 2시 30분)에 상응한다.

[0173] 포함한다

[0174] 이는 일반적으로 "포함한다(include)"는 의미로 사용되며, 즉, 하나 이상의 특징 또는 성분이 존재할 수 있다는 것이다.

[0175] 단리된

[0176] 이는 본 발명의 항체, 또는 상기 항체를 코딩하는 핵산이 일반적으로 본 발명에 따라 존재하게 되는 상태를 지칭한다. 항체 및 핵산은 자연적으로 그와 함께 회합되어 있는 물질, 예컨대, 그의 천연 환경, 또는 그의 제조가 시험관내 또는 생체내에서 실시되는 재조합 DNA 기술에 의해 이루어질 때, 그의 제조가 이루어진 환경 (예컨대, 세포 배양물)에서 그와 함께 발견되는 다른 폴리펩티드 또는 핵산을 함유하지 않거나, 또는 실질적으로 함유하지 않을 것이다. 항체 및 핵산은 희석제 또는 애주번트와 함께 제제화될 수 있고, 추가로 실용적인 용도로 단리될 수 있고 - 예를 들어, 항체는 보통 면역검정법에서의 사용을 위해 마이크로타이터 플레이트를 코팅하는 데 사용된다면, 젤라틴 또는 다른 담체와 혼합되거나, 또는 진단 또는 요법에서 사용될 때에는 제약상 허용되는 담체 또는 희석제와 혼합될 것이다. 항체는 천연적으로, 또는 이중성 진핵 세포 (예컨대, CHO 또는 NSO (ECACC 85110503) 세포) 시스템에 의해 글리코실화될 수 있거나, 또는 (예를 들어, 원핵 세포에서의 발현에 의해 제조될 경우) 비-글리코실화될 수 있다.

[0177] 실질적으로 기술된 바와 같은

[0178] "실질적으로 기술된 바와 같은"이라는 것은, 본 발명의 관련된 CDR 또는 VH 또는 VL 도메인이, 서열이 본원에 기술된 것인 그의 명시된 영역과 동일하거나, 또는 고도로 유사할 것이라는 것을 의미하는 것이다. "고도로 유사한"이라는 것은, CDR 및/또는 VH 또는 VL 도메인 중에서 1 내지 5개, 바람직하게 1 내지 4개, 예컨대, 1 내지 3개 또는 1 또는 2개, 또는 3 또는 4개의 아미노산 치환이 이루어질 수 있다는 것으로 고려된다.

- [0179] CDR을 지지하는 프레임워크
- [0180] 본 발명의 CDR을 보유하는 구조는 일반적으로 CDR이, 재배열된 면역글로불린 유전자에 의해 코딩된, 천연적으로 발생된 VH 및 VL 항체 가변 도메인의 CDR에 상응하는 위치에 위치하는 것인, 항체 중쇄 또는 경쇄 서열 또는 그의 실질적인 부분의 것일 수 있다. 면역글로불린 가변 도메인의 구조 및 위치는 문헌 ([Kabat, E.A. et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4th Edition. US Department of Health and Human Services. 1987], 및 그의 최신판 (이제는 인터넷 상에서 이용가능 (<http://immuno.bme.nwu.edu> 또는 임의의 검색 엔진을 사용하여 "카바트(Kabat)" 검색)을 참조하여 결정될 수 있다.
- [0181] 본 발명에서 사용되는 가변 도메인은 임의의 생식 계열 또는 재배열된 마우스 또는 인간 가변 도메인으로부터 수득될 수 있거나, 또는 공지된 마우스 또는 인간 가변 도메인의 컨센서스 서열에 기초한 합성 가변 도메인일 수 있다. 본 발명의 CDR 서열 (예컨대, CDR3)은 재조합 DNA 기술을 사용하여, CDR (예컨대, CDR3)이 없는 가변 도메인의 레퍼토리 내로 도입될 수 있다.
- [0182] 예를 들어, 마크스(Marks) 등 (문헌 [(Bio/Technology, 1992, 10:779-783)])은 인간 VH 유전자의 제3 프레임워크 영역에 대한 컨센서스 프라이머와 함께 가변 도메인 영역의 5'-단부에 대한 또는 그에 인접한 컨센서스 프라이머를 사용하여 CDR3이 없는 VH 가변 도메인의 레퍼토리를 제공하는 것인, 항체 가변 도메인의 레퍼토리를 제조하는 방법을 기술하였다. 마크스 등은 상기 레퍼토리를 특정 항체의 CDR3과 조합할 수 있는 방법도 추가로 기술하였다. 유사한 기법을 사용하여, 본 발명의 CDR3-유래 서열을 CDR3이 없는 VH 또는 VL 도메인의 레퍼토리 와 서플링하고, 서플링된 완전 VH 또는 VL 도메인을 동족 VL 또는 VH 도메인과 조합하여 본 발명의 항체를 제공할 수 있다. 이어서, 레퍼토리를 적합한 숙주 시스템, 예컨대, W092/01047의 파지 디스플레이 시스템에 디스플레이할 수 있고, 이로써, 적합한 항체를 선별할 수 있다. 레퍼토리는 10^4 개 이상의 개별 항체, 예를 들어, 10^6 내지 10^8 개 또는 10^{10} 개의 항체로 이루어질 수 있다.
- [0183] 유사한 서플링 또는 조합 기법 또한 스템머(Stemmer) (문헌 [(Nature, 1994, 370:389-391)])에 의해 개시된 바 있는데, 스템머는 β -락타마제 유전자와 관련된 DNA 서플링 기법을 기술하였지만, 본 접근법이 항체 생성에 사용될 수 있다는 것을 알았다.
- [0184] 추가 대안은 하나 이상의 선택된 VH 및/또는 VL 유전자의 무작위 돌연변이유발법을 사용하여 전체 가변 도메인 내에 돌연변이를 생성함으로써 본 발명의 CDR-유래의 서열을 보유하는 신규 VH 또는 VL 영역을 생성하는 것이다. 상기 기법은 오류-유발(error-prone) PCR을 사용한 그램(Gram) 등 (문헌 [(1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580)])에 의해 기술되었다.
- [0185] 사용될 수 있는 또 다른 방법은 VH 또는 VL 유전자의 CDR 영역에 대한 직접적인 돌연변이유발법이다. 상기 기법은 바바스(Barbas) 등 (문헌 [(1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813)]) 및 시어(Schier) 등 (문헌 [(1996, J. Mol. Biol. 263:551-567)])에 의해 개시되었다.
- [0186] 상기 기술된 기법들은 모두 당업계에 그 자체로서 공지되어 있으며, 그 자체가 본 발명의 일부를 형성하지는 않는다. 당업자는 당업계의 통상적인 방법을 이용하여 본 발명의 항체를 제공하는 데 상기 기법을 사용할 수 있을 것이다.
- [0187] 에피토프-특이 항체
- [0188] 본 발명의 추가 측면은 본원에 기술된 VH 도메인의 아미노산 서열에 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실, 치환 또는 삽입에 의해 VH 도메인의 아미노산 서열 변이체인 VH 도메인을 제공하고, 임의적으로 상기와 같이 제공된 VH 도메인을 하나 이상의 VL 도메인과 조합하고, VH 도메인 또는 VH/VL 조합 또는 조합들을 시험하여 Ax1에 특이적인 항체 또는 항체 항원-결합 도메인을 확인하는 단계를 포함하는, Ax1 에피토프에 특이적인 항체를 수득하는 방법을 제공한다. 상기 VL 도메인은 본원에 실질적으로 기술된 바와 같은 아미노산 서열을 가질 수 있다.
- [0189] 본원에 개시된 VL 도메인의 하나 이상의 서열 변이체를 하나 이상의 VH 도메인과 조합하는 데 유사한 방법이 사용될 수 있다.
- [0190] 본 발명의 추가 측면은
- [0191] (a) 대체하고자 하는 CDR3을 포함하거나, CDR3 코딩 영역이 없는 VH 도메인을 코딩하는 핵산의 출발 레퍼토리를 제공하는 단계;

- [0192] (b) 상기 레퍼토리를, 실질적으로 본원에 기술된 바와 같은, VH CDR3에 대한 아미노산 서열을 코딩하는 도너 핵산 서열과 조합하여 상기 도너 핵산을 레퍼토리 중 CDR3 영역 내로 삽입시켜 VH 도메인을 코딩하는 핵산의 생성물 레퍼토리를 제공하는 단계;
- [0193] (c) 상기 생성물 레퍼토리의 핵산을 발현시키는 단계;
- [0194] (d) Ax1에 특이적인 항체를 선별하는 단계; 및
- [0195] (e) 상기 항체 또는 그를 코딩하는 핵산을 회수하는 단계를 포함하는, Ax1에 특이적인 항체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0196] 추가로, 본 발명의 VL CDR3을 대체하고자 하는 CDR3을 포함하거나, CDR3 코딩 영역이 없는 VL 도메인을 코딩하는 핵산의 레퍼토리과 조합하는 데 본 발명의 VL CDR3과 유사한 방법이 사용될 수 있다.
- [0197] 유사하게, 3개의 CDR 중 하나 이상, 또는 그들 모두가 VH 또는 VL 도메인의 레퍼토리 내로 삽입될 수 있고, 이어서, Ax1에 특이적인 항체 또는 항체들에 대해 스크리닝된다.
- [0198] 면역글로불린 가변 도메인의 실질적인 부분은 그의 개재 프레임워크 영역과 함께 3개 이상의 CDR 영역을 포함할 것이다. 바람직하게, 상기 부분은 제1 및 제4 프레임워크 영역 중 하나 또는 그 둘 모두 중 50% 이상을 포함할 것이며, 여기서, 50%는 제1 프레임워크 영역의 C-말단 50% 및 제4 프레임워크 영역의 N-말단 50%이다. 가변 도메인의 실질적인 부분의 N-말단 또는 C-말단 단부의 추가 잔기는 일반적으로는 자연적으로 발생된 가변 도메인과 회합되지 않은 것일 수 있다. 예를 들어, 재조합 DNA 기법에 의해 제조된 본 발명의 항체의 구축을 통하여 클로닝 또는 다른 조작 단계를 촉진시키기 위해 도입된 링커에 의해 코딩되는 N- 또는 C-말단 잔기가 도입될 수 있다. 다른 조작 단계는 링커를 도입하여 본 발명의 가변 도메인을, 면역글로불린 중쇄, 다른 가변 도메인 (예를 들어, 디아바디 제조에서) 또는 하기에서 더욱 상세하게 논의되는 바와 같은 단백질 표지를 비롯한 추가의 단백질 서열에 연결하는 것을 포함한다.
- [0199] 비록 본 발명의 바람직한 측면에서, 한 쌍의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 항체가 바람직하지만, VH 또는 VL 도메인 서열 중 어느 하나에 기반한 단일 결합 도메인이 본 발명의 추가 측면을 형성한다. 단일 면역글로불린 도메인, 특히, VH 도메인이 특이적인 방식으로 표적 항원에 결합할 수 있다는 것을 공지되어 있다.
- [0200] 단일 결합 도메인인 경우, 이들 도메인은 Ax1에 결합할 수 있는 2-도메인 항체를 형성할 수 있는 상보적인 도메인을 스크리닝하는 데 사용될 수 있다.
- [0201] 이는 W092/01047에 개시된 바와 같은, H 또는 L 쇠 클론 중 어느 하나를 함유하는 개별 콜로니를 사용하여 다른 쇠 (L 또는 H)를 코딩하는 클론으로 이루어진 완전 라이브러리를 감염시키고, 파지 디스플레이 기법, 예컨대, 상기 참고 문헌에 기술된 기법에 따라 생성된 2-쇄 항체를 선별하는 것인, 소위 계층적 이중 조합 접근법 (hierarchical dual combinatorial approach)이라 불리는 방법을 사용하는 파지 디스플레이 스크리닝 방법에 의해 달성될 수 있다. 상기 기법은 또한 문헌 [Marks et al., 상기 문헌 동일]에도 개시되어 있다.
- [0202] 본 발명의 항체는 항체 불변 영역 또는 그의 일부를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 CL, CH1, CH2, 및/또는 CH3 도메인 (또는 그의 임의 조합)을 포함할 수 있다. VL 도메인은 그의 C-말단 단부에서 인간 C κ 또는 C λ 쇠, 바람직하게 C κ 쇠를 포함하는 항체 경쇄 불변 도메인에 부착될 수 있다. 유사하게, VH 도메인에 기반한 항체는 그의 C-말단 단부에서 임의의 항체 이소형, 예컨대, IgG, IgA, IgE 및 IgM, 및 이소형 서브부류 중 임의의 것으로부터 유래된 면역글로불린 중쇄 모두 또는 그의 일부에 부착될 수 있다. Fc 영역, 예컨대, W099/58572에 개시된 Δ nab 및 Δ nac가 사용될 수 있다.
- [0203] 키메라, 인간화 및 CDR-이식된 항체
- [0204] 본원에서 사용되는 바, "키메라" 항체 또는 "인간화" 항체 또는 "CDR-이식된"이라는 것은 본원에 기술된 항-Ax1 항체의 임의 조합, 또는 그로부터 유래된 임의의 CDR과 비-뮤린, 바람직하게, 인간 항체로부터 유래된 하나 이상의 단백질 또는 펩티드가 조합된 것을 포함한다.
- [0205] 키메라 또는 인간화 항체는 CDR은 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 하나 이상의 것 및 적어도 일부로부터 유래되거나, 항체의 나머지 부분은 하나 이상의 인간 항체로부터 유래된 것인 항체를 포함한다. 따라서, 항체 인간 부분은 인간에서는 실질적으로 비-면역원성인 프레임워크, CL (예컨대, C κ 또는 C λ), CH 도메인 (예컨대, CH1, CH2, CH3), 힌지 영역을 포함할 수 있다.
- [0206] 인간 항체로부터 유래된 항체의 영역이 인간 항체와 100% 동일성을 가질 필요는 없다. 바람직한 실시양태에서,

면역원성이 무시해도 될 정도가 되게 하기 위해 가능한 한 마우스 아미노산 잔기는 거의 유지되지 않지만, 동시에 항체의 인간화를 최대화시키면서, 필요에 따라 CDR에 의해 형성되는 항원-결합 부위를 지지하기 위해 마우스 잔기가 유지될 수 있다. 상기와 같은 변형 또는 변이는 임의적으로 및 바람직하게는 비-변형된 항체와 비교하였을 때, 인간 또는 다른 종에서 면역원성을 유지 또는 감소시킨다.

[0207] 인간화 항체는 기능적으로 재배열된 인간 면역글로불린 (예컨대, 중쇄 및/또는 경쇄) 유전자를 발현할 수 있는 비-인간 동물 또는 원핵 또는 진핵 세포에 의해 제조될 수 있다는 것에 유의하여야 한다. 추가로, 항체가 단일쇄 항체일 때, 이는 천연 인간 항체에서는 발견되지 않는 링커 펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, scFv는, 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역을 연결하는, 링커 펩티드, 예컨대, 2 내지 약 20개의 글리신 또는 다른 아미노산 잔기 (바람직하게 글리신 및 세린 잔기 (예컨대, Gly₄Ser 또는 Gly₂Ser 반복부))를 포함할 수 있다. 상기 링커 펩티드는 인간에서 비-면역원성인 것으로 간주된다. 일부 실시양태에서, 링커 길이는 12개 이상의 아미노산 길이이다.

[0208] 항체 인간화는 예를 들어, 프레임 내에서 개별 인간 프레임워크 폴에 융합된 비-인간 표적 모노클로날 항체의 6개의 CDR 모듈을 포함하는 조합 라이브러리를 합성함으로써 수행될 수 있다. 모두가 공지된 중쇄 및 경쇄 인간 생식 계열 서열을 나타내는 유전자를 함유하는 인간 프레임워크 라이브러리를 사용할 수 있다. 이어서, 생성된 조합 라이브러리를 관심의 대상이 되는 항원에의 결합에 대해 스크리닝할 수 있다. 이러한 접근법을 통해 결합 활성을 모체 항체로 유지시키는 것에 있어서 완전한 인간 프레임워크의 가장 바람직한 조합을 선별할 수 있다. 이어서, 다양한 기법에 의해 인간화 항체를 추가로 최적화시킬 수 있다.

[0209] 전장의 항체 분자의 경우, 면역글로불린 유전자는 하이브리도마 세포주의 게놈 DNA 또는 mRNA로부터 수득될 수 있다. 항체 중쇄 및 경쇄를 포유동물 벡터 시스템에서 클로닝한다. 당업계에 공지된 방법을 사용하여 서열분석함으로써 어셈블리를 확인한다. 항체 구축물을 다른 인간 또는 포유동물 숙주 세포주에서 발현시킬 수 있다. 이어서, 관심의 대상이 되는 발현된 항체의 일시적인 형질감염 검정법 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 구축물을 확인할 수 있다. 생산성이 가장 높은, 안정한 세포주를 단리시키고, 고속 검정 방법을 사용하여 스크리닝할 수 있다.

[0210] 인간화 항체, 단편 및 영역의 불변 (C) 영역을 코딩하는 인간 유전자는 공지된 방법에 의해 인간 태아 간 라이브러리로부터 유래된 것일 수 있다. 인간 C 영역 유전자는 인간 면역글로불린을 발현하고, 생산하는 것을 비롯한, 임의의 인간 세포로부터 유래된 것일 수 있다. 인간 CH 영역은 γ , μ , α , δ , ϵ , 및 그의 서브부류, 예컨대, G1, G2, G3 및 G4를 비롯한, 인간 중쇄의 공지된 부류 또는 이소형 중 임의의 것으로부터 유래된 것일 수 있다. 중쇄 이소형이 항체의 다양한 이펙터 기능을 담당하는 바, CH 도메인 선택은 원하는 이펙터 기능, 예컨대, 보체 고정, 또는 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC)에서의 활성에 의해 좌우될 것이다. 바람직하게, CH 도메인은 감마 1 (IgG1)로부터 유래된 것이다.

[0211] 인간 CL 영역은 인간 L쇄 이소형, 카파 또는 람다, 바람직하게, 카파로부터 유래된 것일 수 있다.

[0212] 인간 면역글로불린 C 영역을 코딩하는 유전자는 표준 클로닝 기법에 의해 인간 세포로부터 수득된다 문헌 [(Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)) 및 [Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology (1987-1993))]. 인간 C 영역 유전자는 2가지 유형의 경쇄, 5가지 부류의 중쇄 및 그의 서브부류를 나타내는 유전자를 함유하는 공지된 클론으로부터 쉽게 이용될 수 있다.

[0213] 키메라 항체 단편, 예컨대, Fab 및 F(ab')₂는 적절히 말단절단된(truncated) 키메라 중쇄 유전자를 디자인함으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, F(ab')₂ 단편의 중쇄 부분을 코딩하는 키메라 유전자는 중쇄의 CH1 도메인 및 힌지 영역을 코딩하는 DNA 서열, 이어서, 번역 종결 코돈을 포함할 것이며, 이로써, 말단절단된 분자를 수득하게 될 것이다.

[0214] 비-인간 또는 인간 항체를 조작 또는 인간화하는 방법이 사용될 수 있고, 이는 당업계에 널리 공지되어 있다. 일반적으로, 인간화 또는 조작된 항체는 비-인간, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 마우스, 래트, 토끼, 비-인간 영장류 또는 다른 포유동물인 공급원으로부터의 하나 이상의 아미노산 잔기를 가진다. 이들 인간 아미노산 잔기는 대개 "임포트(import)" 잔기로 지칭되며, 이는 전형적으로는 공지된 인간 서열의 "임포트" 가변, 불변 또는 다른 도메인으로부터 채취된다. 공지된 인간 Ig 서열은 www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/~about.pedro/research_tools.html;

www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;
 www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/;
 www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/;
 mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html. www.immunologylink.com/;
 pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/;
 www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-
 u.ac.jp/.about.yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp;
 www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html; www.isac-
 net.org/sites_geo.html; aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEPStart.html;
 baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwvu.edu/; www.mrc-
 cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/;
 www.biochem.ucl.ac.uk/.about.martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/;
 abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/.about.honegger/AHOseminar/Slide01.html;
 www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
 www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
 www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/.about.fmolina/Web-
 pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html. 문헌 [Kabat et
 al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983)] (각각은 그 전체가 본원
 에서 참조로 포함된다)에 개시되어 있다.

[0215] 상기 임포트 서열은 당업계에서 공지된 바와 같이, 면역원성을 감소시키는 데, 또는 결합, 친화도, 온-속도, 오프-속도, 결합도, 특이성, 반감기, 또는 임의의 다른 적합한 특징을 감소, 증진, 또는 변형시키는 데 사용될 수 있다. 일반적으로, 가변 및 불변 영역의 비-인간 서열은 인간 또는 다른 아미노산으로 대체되면서, 비-인간 또는 인간 CDR 서열 중 일부 또는 그 모두가 유지된다.

[0216] 항체는 또한 임의적으로 항원에 대한 높은 친화도 및 다른 바람직한 생물학적 특성을 유지하면서 인간화될 수 있다. 이러한 목표를 달성하기 위해, 인간화 항체는 임의적으로 모체 및 인간화 서열의 3차원 모델을 사용하여 모체 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 프로세스에 의해 제조될 수 있다. 3차원 모델 면역글로불린 모델은 보편적으로 이용가능하며, 이는 당업자에게는 잘 알려져 있는 것이다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원 입체 구조를 예시하고, 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이 검사를 통해 후보 면역글로불린 서열의 기능에서의 잔기의 가능한 역할을 분석할 수 있고, 즉, 후보 면역글로불린이 그의 항원에 결합에 결합할 수 있는 능력에 영향을 주는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 선별할 수 있고, 컨센서스 및 임포트 서열로부터 조합할 수 있고, 이로써, 원하는 항체 특징, 예컨대, 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가를 달성할 수 있다.

[0217] 일반적으로, CDR 잔기는 직접적으로 및 가장 실질적으로 항원-결합에 영향을 미치는 데 관여한다. 항체 인간화 또는 조작은 임의이 공지된 방법, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 문헌 [Winter et al., Nature 321:522 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323 (1988)]; [Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988)]; [Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993)]; [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987)], [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992)]; [Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)], 미국 특허 번호 5,723,323, 5,976,862, 5,824,514, 5,817,483, 5,814,476, 5,763,192, 5,723,323, 5,766,886, 5,714,352, 6,204,023, 6,180,370, 5,693,762, 5,530,101, 5,585,089, 5,225,539; 4,816,567, PCT/:US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246에 기술되어 있는 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0218] 인간화 항체의 인간 불변 영역은 임의 부류 또는 이소형 (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD 등)의 것일 수 있고, 카파 또는 람다 경쇄를 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 인간 불변 영역은 IgG 중쇄 또는 정의된 단편, 예를 들어, IgG 서브부류, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 중 적어도 하나를 포함한다.

[0219] 표지된 항체

[0220] 본 발명의 항체는 검출가능한 또는 기능성 표지로 표지될 수 있다. 검출가능한 표지로는 방사성 표지, 예컨대, [¹³¹I] 또는 [⁹⁹Tc]를 포함하며, 이는 방사성 면역접합체 분야에 공지된 종래 화학법을 사용하여 본 발명의 항체에 부착될 수 있다. 표지로는 또한 효소 표지, 예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다제를 포함한다. 표지로는 화학적

모이어티, 예컨대, 비오틴을 추가로 포함하며, 이는 특이적인 동족 검출가능한 모이어티, 예컨대, 표지된 아비딘 또는 스트렙타아비딘에의 결합을 통해 검출될 수 있다. 바람직하게, 표지로는 형광 표지, 예컨대, FITC를 포함한다.

[0221] 유기 모이어티

[0222] 변형된 항체 및 항원-결합 단편은 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 공유 결합된 하나 이상의 유기 모이어티를 포함할 수 있다. 본원에 기술된 항체 또는 항원-결합 단편에 결합된 각 유기 모이어티는 독립적으로 친수성 중합체 기, 지방산 기 또는 지방산 에스테르 기일 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "지방산"이라는 용어는 모노-카르복실산 및 디-카르복실산을 포함한다. 본원에서 사용되는 바, "친수성 중합체 기"라는 용어는 옥탄보다는 물 중에서 더 큰 가용성을 띠는 유기 중합체를 지칭한다. 예를 들어, 폴리-리신은 옥탄보다는 물 중에서 더 큰 가용성을 띤다. 따라서, 폴리-리신의 공유 부착에 의해 변형된 항체는 본 개시내용에 포함된다. 본원에 기술된 항체를 변형시키는 데 적합한 친수성 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 예를 들어, 폴리-알칸 글리콜, 예컨대, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜 (mPEG), PPG 등, 탄수화물 (예컨대, 텍스트란, 셀룰로스, 올리고당, 다당류 등), 친수성 아미노산의 중합체 (예컨대, 폴리-리신, 폴리-아르기닌, 폴리-아스파르트레이트 등), 폴리-알칸 옥시드 (예컨대, 폴리에틸렌 옥시드, 폴리프로필렌 옥시드 등) 및 폴리비닐 피롤리돈을 포함한다. 바람직하게, 본원에 기술된 항체를 변형시키는 친수성 중합체는 별개의 분자 엔티티로서 그 분자량은 약 800 내지 약 150,000 달톤이다. 예를 들어, PEG5000 및 PEG20,000 (여기서, 밑에 기록한 숫자는 중합체의 평균 분자량 (달톤)이다)이 사용될 수 있다. 친수성 중합체 기는 1 내지 약 6개의 알킬, 지방산 또는 지방산 에스테르 기로 치환될 수 있다. 지방산 또는 지방산 에스테르 기로 치환되는 친수성 중합체는 적합한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 아민 기를 포함하는 중합체는 지방산 또는 지방산 에스테르의 카르복실레이트에 커플링될 수 있고, 지방산 또는 지방산 에스테르 상의 활성화된 카르복실레이트 (예컨대, N,N-카르보닐 디-이미다졸로 활성화된 것)는 중합체 상의 히드록실 기에 커플링될 수 있다.

[0223] 본원에 기술된 항체를 변형시키는 데 적합한 지방산 및 지방산 에스테르는 포화된 것일 수 있거나, 또는 하나 이상의 불포화 단위를 함유할 수 있다. 본원에 기술된 항체를 변형시키는 데 적합한 지방산으로는 예를 들어, n-도데카노에이트 (C12, 라우레이트), n-테트라데카노에이트 (C14, 미리스테이트), n-옥타데카노에이트 (C18, 스테아레이트), n-에이코사노에이트 (C20, 아라키테이트), n-도코사노에이트 (C22, 베헤네이트), n-트리아콘타노에이트 (C30), n-테트라콘타노에이트 (C40), 시트-8 9-옥타데카노에이트 (C18, 올레이트), 모든 시트-8 5,8,11,14-에이코사테트라에노에이트 (C20, 아라키도네이트), 옥탄디온산, 테트라데칸디온산, 옥타데칸디온산, 도코산디온산 등을 포함한다. 적합한 지방산 에스테르로는 선형 또는 분지형 저급 알킬 기를 포함하는 디카르복실산의 모노-에스테르를 포함한다. 저급 알킬 기는 1 내지 약 12개, 바람직하게, 1 내지 약 6개의 탄소 원자를 포함할 수 있다.

[0224] 변형된 인간 항체 및 항원-결합 단편은 적합한 방법을 사용하여, 예컨대, 하나 이상의 변형제와의 반응에 의해 제조될 수 있다. 본원에서 사용되는 바, "변형제"라는 용어는 활성화 기를 포함하는 적합한 유기 기 (예컨대, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)를 의미한다. "활성화 기"는 적절한 조건하에서 제2 화합기와 반응하여 변형제와 제2 화합기 사이의 공유 결합을 형성하는 화학적 모이어티 또는 작용기이다. 예를 들어, 아민-반응성 활성화 기로는 친전자성 기, 예컨대, 토실레이트, 메실레이트, 할로 (클로로, 브로모, 플루오로, 아이오도), N-히드록시숙신이미딜 에스테르 (NHS) 등을 포함한다. 티올과 반응할 수 있는 활성화 기로는 예를 들어, 말레이미드, 아이오도아세틸, 아크릴로릴, 피리딜 디설파이드, 5-티올-2-니트로벤조산 티올 (TNB-티올) 등을 포함한다. 알데히드 작용기는 아민- 또는 히드라지드-함유 분자에 커플링될 수 있고, 아지드 기는 3가 포스포르스 기와 반응하여 포스포르아미데이트 또는 포스포리미드 연결부를 형성할 수 있다. 활성화 기를 분자 내로 도입하는 데 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Hernanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)] 참조). 활성화 기는 유기 기 (예컨대, 친수성 중합체, 지방산, 지방산 에스테르)에 직접적으로, 또는 링커 모이어티, 예를 들어, 2가 C1-C12 기 (여기서, 하나 이상의 탄소 원자는 헤테로원자, 예컨대, 산소, 질소 또는 황에 의해 대체될 수 있다)를 통해 결합될 수 있다. 적합한 링커 모이어티로는 예를 들어, 테트라-에틸렌 글리콜, $--(CH_2)_3--$, $--NH--(CH_2)_6--NH--$, $--(CH_2)_2--NH--$ 및 $--CH_2--O--CH_2--CH_2--O--CH_2--CH_2--O--CH--NH--$ 를 포함한다. 링커 모이어티를 포함하는 변형제는 예를 들어, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카르보디이미드 (EDC)의 존재하에서 모노-Boc-알킬디아민 (예컨대, 모노-Boc-에틸렌디아민, 모노-Boc-디아미노헥산)을 지방산과 반응시켜 유리 아민과 지방산 카르복실레이트 사이에 아미드 결합을 형성함으로써 제조될 수 있다. Boc 보호기는 트리플루오로아세트산 (TFA) 처리에 의해 생성물로부터 제거되어 1급 아민이 노출될 수 있고, 이는 기술된 바와 같은 또 다른 카르복실레이트에 커플링될 수 있거나, 또

는 말레산 무수물 및 폐환화된 생성된 생성물과 반응하여 지방산의 활성화된 말레이미도 유도체를 생성할 수 있다 (예를 들어, WO 92/16221 (톰슨(Thompson) 등) 참조).

- [0225] 변형된 항체는 인간 항체 또는 항원-결합 단편을 변형체와 반응시킴으로써 제조될 수 있다. 예를 들어, 아민-반응성 변형체, 예를 들어, PEG의 NHS 에스테르를 사용함으로써 유기 모이어티를 비-부위 특이 방식으로 항체에 결합시킬 수 있다. 변형된 인간 항체 또는 항원-결합 단편은 또한 항체 또는 항원-결합 단편의 디술피드 결합 (예컨대, 쇠내 디술피드 결합)을 환원시킴으로써 제조될 수 있다. 이어서, 환원된 항체 또는 항원-결합 단편을 티올-반응성 변형체와 반응시켜 본원에 기술된 변형된 항체를 제조할 수 있다. 본원에 기술된 항체의 특이 부위에 결합된 유기 모이어티를 포함하는, 변형된 인간 항체 및 항원-결합 단편은 적합한 방법, 예컨대, 역 단백질 분해 (문헌 [Fisch et al., Bioconjugate Chem., 3:147-153 (1992)]; [Werlen et al., Bioconjugate Chem., 5:411-417 (1994)]; [Kumaran et al., Protein Sci. 6(10):2233-2241 (1997)]; [Itoh et al., Bioorg. Chem., 24(1): 59-68 (1996)]; [Capellas et al., Biotechnol. Bioeng., 56(4):456-463 (1997)]), 및 문헌 [Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)]에 기술된 방법을 사용하여 제조될 수 있다
- [0226] 면역접합체
- [0227] 본 발명은 또한 하나 이상의 세포독성제, 예컨대, 화학요법제 또는 약물, 성장 억제제, 독소 (예컨대, 단백질 독소, 박테리아, 진균, 식물, 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소에 접합된 본원의 항-Ax1 항체를 포함하는 면역접합체를 제공한다.
- [0228] 한 실시양태에서, 면역접합체는, 항체가 메이탄시노이드 (미국 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1 참조); 아우리스타틴, 예컨대, 모노메틸아우리스타틴 약물 모이어티 DE 및 DF (MMAE 및 MMAF) (미국 특허 번호 5,635,483 및 5,780,588, 및 7,498,298 참조); 돌라스타틴; 칼리키아미신 또는 그의 유도체 (미국 특허 번호 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 및 5,877,296; 문헌 [Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993)]; 및 [Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)] 참조); 안트라시클린, 예컨대, 다우노마이신 또는 독소루비신 (문헌 [Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006)]; [Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006)]; [Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005)]; [Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000)]; [Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002)]; [King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002)]; 및 미국 특허 번호 6,630,579 참조); 메토티렉세이트; 빈데신; 탁산, 예컨대, 도세탁셀, 파클리탁셀, 라로탁셀, 테세탁셀, 및 오르타탁셀; 트리코테센; 및 CC1065를 포함하나, 이에 제한되지 않는, 하나 이상의 약물에 접합되어 있는 것인, 항체-약물 접합체 (ADC)이다.
- [0229] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 디프테리아 독소 A 쇠, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇠 (슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 유래), 리신 A 쇠, 아브린 A 쇠, 모데신 A 쇠, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질 (P API, P APII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사포나리아 오피시날리스(*saponaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 및 트리코테센을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 효소적으로 활성인 독소 또는 그의 단편에 접합된, 본원에 기술된 바와 같은 항체를 포함한다.
- [0230] 또 다른 실시양태에서, 면역접합체는 방사성 원자에 접합하여 방사성 면역접합체를 형성하는 본원에 기술된 바와 같은 항체를 포함한다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성 면역접합체 제조에 이용가능하다. 예로는 [²¹¹At], [¹³¹I], [¹²⁵I], [⁹⁰Y], [¹⁸⁶Re], [¹⁸⁸Re], [¹⁵³Sm], [²¹²Bi], [³²P], [²¹²Pb] 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 방사성 면역접합체가 검출을 위해 사용되는 경우, 이는 신티그래프 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어, [⁹⁹Tc] 또는 [¹²³I], 또는 핵 자기 공명 (NMR) 영상화 (이는 또한 자기 공명 영상화, MRI로도 공지)를 위한 스핀 표지, 예컨대, 아이오딘-123 다시, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.
- [0231] 항체 및 세포독성제로 이루어진 접합체는 다양한 이작용성 단백질 커플링제, 예컨대, N-숙신이미딜-3-(2-피리딜 디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이작용성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디피미데이트 HCl), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스 (p-

아지도벤조일) 핵산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)를 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기술되어 있는 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MXDTPA)이 방사성 뉴클레오타이드를 항체에 접합시키기 위한 예시적인 킬레이팅제이다. WO94/11026을 참조할 수 있다. 링커는 세포에서 세포독성 약물의 방출을 촉진시키는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산-불안정성 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광-불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 디술피드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Res. 52: 127-131 (1992)]; 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0232] 본원에서 면역접합체 또는 ADC가 명백하게 고려되지만, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 및 상업적으로 이용가능한 (예컨대, 피어스 바이오테크놀로지, 인크.(Pierce Biotechnology, Inc.: 미국 일리노이주 록퍼드)로부터 이용가능) SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술포)벤조에이트)를 포함하나, 이에 제한되지 않는 가교제 시약으로 제조된 상기 접합체로 제한되는 것은 아니다.

[0233] 글리코실화 변이체

[0234] 특정 실시양태에서, 본원에서 제공하는 항체는 항체의 글리코실화 정도를 증가 또는 감소시키기 위해 변경된다. 항체에의 글리코실화 부위의 부가 또는 결실은 하나 이상의 글리코실화 부위가 생성 또는 제거될 수 있도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성될 수 있다.

[0235] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 그에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 포유동물 세포에 의해 생산된 천연 항체는 전형적으로는 일반적으로 Fc 영역의 CH2 도메인의 Asn297에의 N-연결부에 의해 부착된 분지형 바이안테나리 올리고당을 포함한다. 예컨대, 문헌 [Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997)]을 참조할 수 있다. 올리고당은 각종 탄수화물, 예컨대, 만노스, N-아세틸 글루코사민 (GlcNAc), 갈락토스, 및 시알산 뿐만 아니라, 바이안테나리 올리고당 구조의 "줄기"에서 GlcNAc에 부착된 푸코스를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체에서 올리고당은 특성의 특성이 개서된 항체 변이체 생성을 위해 변형될 수 있다.

[0236] 한 실시양태에서, Fc 영역에 (직접적으로 또는 간접적으로) 부착된 푸코스가 없는 탄수화물 구조를 가지는 항체 변이체를 제공한다. 예를 들어, 상기 항체 중 푸코스의 양은 1% 내지 80%, 1% 내지 65%, 5% 내지 65% 또는 20% 내지 40%일 수 있다. 푸코스의 양은 예를 들어, WO 2008/077546에 기술된 바와 같이, MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 측정되는 바, Asn297에 부착된 모든 글리코구조체 (예컨대, 복합, 하이브리드 및 고만노스 구조체)의 총합 대비, Asn297에서 당 쇄 내의 푸코스의 평균 양을 계산함으로써 측정된다. Asn297이란, Fc 영역 중 대략 297번 위치 (Fc 영역 잔기의 Eu 넘버링)에 위치하는 아스파라긴 잔기를 지칭하지만; Asn297은 또한 항체 중 최소 서열 변이에 기인하여 297번 위치의 상류 또는 하류로부터 약 ±3개의 아미노산 만큼의 거리까지, 즉, 294 내지 300 번 위치에 위치할 수 있다. 상기 푸코실화 변이체는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 예컨대, 미국 특허 공개 번호 US 2003/0157108 (프레스타, L.(Presta, L.)); US 2004/0093621 (교와 하클 코교 컴퍼니, 리미티드 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))을 참조할 수 있다. "탈푸코실화된" 또는 "푸코스-결핍" 항체 변이체에 관한 공개문헌의 예로는 US2003/01571; WO2000/61739; WO2001/29246; US2003/0115614; US2002/0164328; US2004/0093621; US2004/0132140; US2004/0110704; US2004/0110282; US2004/0109865; WO2003/085119; WO2003/084570; WO2005/035586; WO2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; 문헌 [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)]; [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]를 포함한다.

[0237] 탈푸코실화된 항체를 제조할 수 있는 세포주의 예로는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 [Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1 (프레스타, L.); 및 WO 2004/056312 A1 (아담스(Adams) 등), 특히, 실시예 11), 및 넉아웃 세포주, 예컨대, 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 넉아웃 CHO 세포 (예컨대, 문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)]; [Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)]; 및 WO2003/085107 참조)를 포함한다.

[0238] 올리고당이 이분된, 예컨대, 항체의 Fc 영역에 부착된 바이안테나리 올리고당이 GlcNAc에 의해 이분된, 항체 변이체를 추가로 제공한다. 상기 항체 변이체는 감소된 푸코실화 및/또는 개선된 ADCC 기능을 가질 수 있다. 상기 항체 변이체의 예는 예컨대, WO 2003/011878 (장-마이레트(Jean-Mairet) 등); 미국 특허 번호 6,602,684 (우마나(Umana) 등); 및 US2005/0123546 (우마나 등)에 기술되어 있다. Fc 영역에 부착된 올리고당에 1개 이상

의 갈락토스 잔기를 포함하는 항체 변이체 또한 제공한다. 상기 항체 변이체는 개선된 CDC 기능을 가질 수 있다. 상기 항체 변이체는 예컨대, WO 1997/30087 (파텔(Patel) 등); WO 1998/58964 (라주, S.(Raju, S.)); 및 WO 1999/22764 (라주, S.)에 기술되어 있다.

[0239] Fc 영역 변이체

[0240] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 아미노산 변형이 본원에서 제공하는 항체의 Fc 영역 내로 도입될 수 있고, 이로써, Fc 영역 변이체가 생성될 수 있다. Fc 영역 변이체는 하나 이상의 아미노산 위치에 아미노산 변형 (예컨대, 치환)을 포함하는 인간 Fc 영역 서열 (예컨대, 인간 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 Fc 영역)을 포함할 수 있다.

[0241] 특정 실시양태에서, 본 발명은, 생체내에서 항체의 반감기가 중요하지만, 특정 이펙터 기능 (보체 고정화 및 ADCC)이 불필요하거나, 또는 유해한 경우와 같은 적용에 바람직한 후보 물질로 만드는, 모두가 아닌, 일부 이펙터 기능을 가지는 항체 변이체를 고려한다. CDC 및/또는 ADCC 활성의 감소/고갈을 확인하기 위해 시험관내 및/또는 생체내 세포독성 검정법을 수행할 수 있다. 예를 들어, 항체가 Fc γ 결합은 하지 않지만 (그러므로, 가능하게는 ADCC 활성이 없을 수 있다), Fc 수용체 (FcR) 결합능을 보유한다는 것을 확인하기 위해 FcRn 결합 검정법을 수행할 수 있다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 오직 Fc γ RIII만을 발현하지만, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)] 464 페이지 표 3에 요약되어 있다. 관심의 대상이 되는 분자의 ADCC 활성을 평가하는 시험관내 검정법의 비제한적인 예는 미국 특허 번호 5,500,362 (예컨대, 문헌 [Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)] 참조) 및 문헌 [Hellstrom, I et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)]; 미국 특허 번호 5,821,337 (문헌 [Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)] 참조)에 기술되어 있다. 대안적으로, 비-방사성 검정 방법 (예를 들어, 유세포 분석법을 위해, ACT1™ 비-방사성 세포독성 검정법 (셀테크놀로지, 인크.(CellTechnology, Inc.: 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰)); 및 시토크스 96(CytoTox 96)® 비-방사성 세포독성 검정법 (프로메가: 미국 위스콘신주 매디슨) 참조)이 사용될 수 있다. 상기 검정법에 유용한 이펙터 세포로는 말초 혈액 단핵구 세포 (PBMC) 및 자연살 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 관심의 대상이 되는 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예컨대, 문헌 [Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)]에 개시된 동물 모델에서 평가될 수 있다. 항체가 C1q에 결합하지 못하고, 따라서, 보체-의존성 세포독성 (CDC) 활성이 없다는 것을 확인하기 위해 C1q 결합 검정법 또한 수행할 수 있다. 예컨대, WO2006/029879 및 WO2005/100402의 C1q 및 C3c 결합 ELISA를 참조할 수 있다. 보체 활성화를 평가하기 위해, CDC 검정법을 수행할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]; [Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003)]; 및 [Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)] 참조). 당업계에 공지된 방법을 사용하여 FcRn 결합 및 생체내 제거/반감기 Fc 측정 또한 수행할 수 있다 (예컨대, 문헌 [Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12): 1759-1769 (2006)] 참조).

[0242] 이펙터 기능이 감소된 항체는 Fc 영역 잔기 238, 265, 269, 270, 297, 327 및 329 중 하나 이상의 것이 치환된 것을 포함한다 (미국 특허 번호 6,737,056). 상기 Fc 돌연변이체로는 아미노산 위치 265, 269, 270, 297 및 327 중 2개 이상의 위치에서 치환된 Fc 돌연변이체, 예컨대, 잔기 265 및 297이 알라닌으로 치환된 소위 "DANA" Fc 돌연변이체로 불리는 것 (미국 특허 번호 7,332,581)을 포함한다.

[0243] FcR에의 결합이 개선 또는 감소된 특정 항체 변이체가 기술되어 있다 (예컨대, 미국 특허 번호 6,737,056; WO 2004/056312, 및 문헌 [Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)] 참조).

[0244] 특정 실시양태에서, 항체 변이체는 ADCC 활성을 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 예컨대, Fc 영역의 위치 298, 333, 및/또는 (잔기의 EU 넘버링)에서의 치환을 포함하는 FC 영역을 포함한다.

[0245] 일부 실시양태에서, 예컨대, 미국 특허 번호 6,194,551, WO 99/51642, 및 문헌 [Idusogie et al. J. Immunol.164: 4178-4184 (2000)]에 기술된 바와 같이, C1q 결합 및/또는 CDC 활성을 변경시키는 (즉, 개선 또는 감소시키는) 변경이 Fc 영역에서 이루어질 수 있다.

[0246] 반감기가 연장되고, 모체 IgG의 태아로의 이동을 담당하는 신생아 Fc 수용체 (FcRn) (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)])에의 결합이 개선된 항체는 US2005/0014934A1 (힌튼(Hinton) 등)에 기술되어 있다. 상기 항체는 Fc 영역의 FcRn에의 결합을 개선시키는 하나 이상의 치환을 Fc 영역 그 안에 포함한다. 상기 Fc 변이체로는 Fc 영역 잔기: 238, 256, 265, 272, 286,

303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 또는 434 중 하나 이상에서 치환된, 예컨대, Fc 영역 잔기 434가 치환된 (미국 특허 번호 7,371,826) 것을 포함한다. 또한, Fc 영역 변이체의 다른 예에 관해서는 문헌 [Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)]; 미국 특허 번호 5,648,260; 미국 특허 번호 5,624,821; 및 WO 94/29351을 참조할 수 있다.

[0247] 시스템인 조작된 항체 변이체

[0248] 특정 실시양태에서, 항체의 하나 이상의 잔기가 시스템인 잔기로 치환된, 시스템인 조작된 항체, 예컨대, "티오 MAb"를 생성하는 것이 바람직할 수 있다.

[0249] 특정 실시양태에서, 치환된 잔기는 항체의 접근가능한 부위에 존재한다. 본원에서 추가로 기술되는 바와 같이, 상기 잔기를 시스템인으로 치환함으로써, 이로써, 반응성 티올기가 항체의 접근가능한 부위에 위치하고, 항체를 다른 모이어티, 예컨대, 약물 모이어티 또는 링커-약물 모이어티에 접합시켜 면역접합체를 생성하는 데 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 하기 잔기 중 임의의 하나 이상의 잔기가 시스템인으로 치환될 수 있다: 경쇄의 V205 (카바트(Kabat) 넘버링); 중쇄의 A118 (EU 넘버링); 및 중쇄 Fc 영역의 S400 (EU 넘버링). 시스템인 조작된 항체는 예컨대, 미국 특허 번호 7,521,541에 기술된 바와 같이 생성될 수 있다.

[0250] 진단 및 치료 방법

[0251] 본 발명의 항체는 인간 또는 동물 대상체, 바람직하게 인간에서의 진단 또는 치료 방법에서 사용하기 위한 것으로 디자인된다.

[0252] 따라서, 본 발명의 추가 측면은 예컨대, 검출가능한 표지, 예컨대, FITC에 접합된 하나 이상의 시약과 함께, 제공하는 바와 같은 항체를 투여하는 단계를 포함하는 진단 방법을 제공한다. 제공하는 바와 같은 항체는 생검화된 조직으로부터 유래된 암 세포에 대한 신속하고, 신뢰가능한 검사 개발에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체는 전이성 암 세포, 예컨대, 체액, 예컨대, 혈액 또는 림프 중에서 순환하는 것으로 관찰될 수 있는 순환 종양 세포에 대한 검사로서 사용될 수 있다. 관심의 대상이 되는 다른 암으로는 유방암, 폐암, 위암, 두부경부암, 결장직장암, 신장암, 췌장, 자궁암, 간암, 방광암, 자궁내막암 및 전립샘암 뿐만 아니라, 림프종 (예컨대, 비호지킨 림프종, NHL) 및 백혈병 (특히, 급성 골수 백혈병, AML)을 포함한다.

[0253] 본 발명의 추가 측면은 제공하는 바와 같은 항체를 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법, 상기 항체를 포함하는 제약 조성물, 치료 방법에서 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 항체, 본원에 기술된 특정 임상 적응증의 치료 방법에서 사용하기 위한 본원에 기술된 바와 같은 항체, 및 투여용 의약 제조에서, 예를 들어, 제약상 허용되는 부형제와 함께 항체를 제제화하는 단계를 포함하는, 의약 또는 제약 조성물 제조 방법에서 상기 항체의 용도를 제공한다.

[0254] 임상 적응증

[0255] 인간 Ax1에 대한 특이성이 높은 항체가 치료학적 이익을 제공하는 데 사용될 수 있는 임상 적응증으로는 Ax1이 과발현되거나, 또는 Ax1 길항작용이 임상적으로 유의한 이익을 제공하게 되는 임의의 병태를 포함한다. 이는 면역 장애, 심혈관 장애, 혈전증, 당뇨병, 면역 체크포인트 장애, 또는 증식성 질환, 예컨대, 암, 특히, 전이성 암을 포함한다. 추가로, Ax1은 다수의 상피 기원의 암에서 중요한 역할을 하는 것으로 공지되어 있다.

[0256] 관심의 대상이 되는 면역 체크포인트 장애로는 만성 바이러스성 감염, 흑색종, 결장직장암, 유방암, 난소암, 비소세포 폐암 (NSCLC), 전립샘암, 신장암 세포 암, 췌장암, 식도암, 방광암, 골수종, 콩팥암, 방광암, 뇌 종양, 및 림프종을 포함한다.

[0257] 관심의 대상이 되는 암으로는 백혈병, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 예컨대, 골수모구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성, 적백혈병 백혈병 및 골수형성이상 증후군, 만성 백혈병, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 만성 골수구성 (과립구성) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 모발상 세포 백혈병; 진성 적혈구증가증; 림프종, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 호지킨병, 비호지킨병; 다발성 골수종, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 무증상 다발성 골수종, 비분비성 골수종, 골경화성 골수종, 혈장 세포 백혈병, 고립성 형질세포종 및 골수외성 형질세포종; 발덴스트롬 마크로글로불린혈증; 유의성이 결정되지 않은 모노클로날 감마글로불린 장애; 양성 모노클로날 감마글로불린 장애; 중쇄 질환; 뼈 및 결합 조직 육종, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 뼈 육종, 골육종, 연골육종, 유잉 육종, 악성 거대 세포 종양, 뼈 섬유육종, 척삭종, 골막 육종, 연조직 육종, 혈관육종(angiosarcoma) (혈관육종(hemangiosarcoma)), 섬유육종, 카포시 육종, 평활근육종, 지방육종, 림프관육종, 전이성 암, 신경집종, 횡문근육종, 윤활막 육종; 뇌

종양, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 신경교종, 교모세포종, 성상세포종, 뇌 줄기 신경교종, 뇌실막세포종, 희소돌기아교세포종, 비신경아교세포 종양, 청신경초종, 두개인두종, 수모세포종, 수막종, 송과체종, 송과체모세포종, 원발성 뇌 림프종; 유방암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 샘암종, 소엽 (소세포) 암종, 관내 암종, 수질성 유방암, 점액 유방암, 관 유방암, 유두상 유방암, 원발성 암, 파켓트병 및 염증성 유방암; 부신암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 크롬친화세포종 및 부신피질 암종; 갑상샘암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 유두상 또는 소포성 갑상샘암, 수질성 갑상샘암 및 역형성 갑상샘암; 췌장암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 인슐린종, 가스트린종, 글루카곤종, 비포마, 소마토스타틴-분비 종양 및 카르시노이드 또는 섬 세포 종양; 뇌하수체암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 쿠싱 질환, 프로락틴-분비 종양, 말단거대증 및 요붕증; 눈암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 안구 흑색종, 예컨대, 홍채 흑색종, 맥락막 흑색종 및 섬모체 흑색종 및 망막모세포종; 질암, 예컨대, 편평 세포 암종, 샘암종 및 흑색종; 외음부암, 예컨대, 편평 세포 암종, 흑색종, 샘암종, 기저 세포 암종, 육종, 및 파켓트병; 자궁경부암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 편평 세포 암종 및 샘암종; 자궁암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 자궁내막 암종 및 자궁 육종; 난소암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 난소 상피 암종, 경계 종양, 생식 세포 종양 및 기질 종양; 식도암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 편평암, 샘암종, 낭샘암종, 점액표피양 암종, 샘편평 암종, 육종, 흑색종, 형질세포종, 사마귀모양 암종 및 귀리 세포 (소세포) 암종; 위암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 샘암종, 균상 (폴립모양), 궤양성, 표재성 확산, 미만성 확산, 악성 림프종, 지방육종, 섬유육종 및 암육종; 결장암; 직장암; 간암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 간세포 암종 및 간모세포종, 담낭암, 예컨대, 샘암종; 담관암종, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 유두상, 결절 및 미만성; 폐암, 예컨대, 비소세포 폐암 (NSCLC), 편평 세포 암종 (표피모양 암종), 샘암종, 대세포 암종 및 소세포 폐암 (SCLC); 고환암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 배아 종양, 고환종, 역형성, 고전 (전형), 정모세포, 비정상피종성, 배아 암종, 기형종 암종, 융모암종 (난황낭 종양), 전립샘암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 샘암종, 평활근육종 및 횡문근육종; 생식기암, 예컨대, 음경암; 구강암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 편평 세포 암종; 기저세포암; 타액선암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 샘암종, 점막표피모양 암종 및 낭샘암종; 인두암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 편평 세포암 및 사마귀모양; 피부암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 기저 세포 암종, 편평 세포 암종 및 흑색종, 표재성 확산 흑색종, 결절 흑색종, 흑색점 악성 흑색종, 말단 흑자 흑색종; 콩팥암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 신장 세포암, 샘암종, 콩팥세포암종, 섬유육종, 이행 세포암 (신우 및/또는 요관); 율름즈 종양; 방광암, 예컨대, 제한하는 것은 아니지만, 이행 세포암종, 편평 세포암, 샘암종, 암육종을 포함한다. 추가로, 암은 점액육종, 골원성 육종, 내피육종, 림프관내피모세포육종, 중피종, 율활막종, 혈관모세포종, 상피 암종, 낭샘암종, 기관지원성 암종, 땀샘 암종, 피지샘 암종, 유두상 암종 및 유두상 샘암종을 포함한다. 바람직하게, 암은 유방암, 흑색종, 전립샘암, 난소암, 결장 직장암, 폐암 또는 신경교종 암으로부터 선택된다. 더욱 바람직하게, 암은 전이성 유방암 또는 폐암이다. 순환 종양 세포의 표적화 및 치료법이 구상된다.

[0258] 전이성 암의 치료법은 원발성 종양이 위치하는 위치에 의존한다. 유방암이 폐로 퍼진 경우, 예를 들어, 유방암은 그대로 남아있고, 치료법은 현재 암이 폐에 존재한다는 사실에 의해서가 아니라, 유방 내의 전이성 암 기원에 의해 결정된다. 이 시점에서 약 5%에서는 전이성 암은 발견되지만, 원발성 종양이 확인되지 못한다. 상기 전이성 암의 치료법은 그의 기원이라기보다는 그의 위치에 의해 좌우된다. 전이성 암은 (알고 있다면) 원래의 종양의 조직에 의해 명명된다. 예를 들어, 뇌로 퍼진 유방암은 뇌로 전이된 전이성 유방암으로 명명된다.

[0259] 본 발명에 따른 항-Ax1 치료법은 Ax1이 과발현되거나, 또는 Ax1 길항작용이 임상적으로 유익한 이익을 제공하게 되는 병태를 앓는 환자에게 뚜렷한 이익을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 치료법은 주사 (예컨대, 정맥내 주사)에 의해, 또는 국부 전달 방법에 의해 제공될 수 있다. 제공하는 바와 같은 항체는 예를 들어, 순환 종양 세포 (CTC) 또는 다른 전이성 세포를 표적화하기 위해, 표적 조직에 또는 전신으로 제약 조성물을 직접 전달하는 데 사용될 수 있다.

[0260] 본 발명의 추가의 측면에서, 대상체를 본원에서 기술된 바와 같은 항체 (또는 그의 접합체)와 접촉시키는 단계를 포함하는, 대상체에서 암 줄기 세포를 억제시키는 방법을 제공한다. 상기 방법에서 사용하기 위한 항체 및 접합체 또한 구상된다.

[0261] EGFR 길항작용

[0262] 본 발명은 또한 개체에게 유효량의, 본원에 개시된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 투여하여 구성적 Ax1을 억제시키는 단계를 포함하는, 구성적 Ax1 활성화를 억제시키는 방법을 제공한다.

[0263] 한 측면에서, 본 발명은 대상체가 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 보이는지 여부를 측

정하는 단계, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 보이는 대상체에게 EGFR 길항제 및 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 투여하는 단계를 포함하는, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법으로서, 여기서, 대상체는 EGFR 길항제를 이용하는 치료법에 대한 내성 발생을 보이는 것인 방법을 제공한다.

[0264] 한 측면에서, 본 발명은 (i) EGFR 길항제로 치료받는 대상체를 모니터링하여 대상체가 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 발생시키는지 여부를 측정하는 단계, 및 (ii) 대상체가 Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭 발생을 보인 경우, 대상체의 치료 요법을, EGFR 길항제 이외에도 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 포함하도록 변형시키는 단계를 포함하는, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0265] 한 측면에서, 본 발명은 (i) EGFR 길항제로 치료받는 대상체를 모니터링하여 대상체가 상기 억제제에 대한 내성을 발생시키는지 여부를 측정하는 단계, (ii) 대상체를 시험하여 대상체가 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 보이는지 여부에 관해 측정하는 단계, 및 (iii) 대상체가 Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 보인 경우, 대상체의 치료 요법을, EGFR 길항제 이외에도 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 포함하도록 변형시키는 단계를 포함하는, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0266] 한 측면에서, 본 발명은 (i) EGFR 길항제로 치료받는 대상체 집단을 모니터링하여 치료제에 대한 내성을 발생시키는 대상체를 확인하는 단계, (ii) 내성을 띠는 대상체를 시험하여 대상체가 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 보이는지 여부를 측정하는 단계, 및 (iii) 대상체가 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 보인 경우, 대상체의 치료 요법을, EGFR 길항제 이외에도 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 포함하도록 변형시키는 단계를 포함하는, EGFR 길항제를 평가하는 방법을 제공한다.

[0267] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암 세포에서 EGFR 인산화를 감소시키는 방법으로서, 여기서, 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득한 것이고, 여기서, 상기 세포는 Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0268] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암 세포에서 PBK 매개 신호전달을 감소시키는 방법으로서, 여기서, 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득한 것이고, 여기서, 상기 세포는 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0269] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암 세포에서 EGFR-매개 신호전달을 감소시키는 방법으로서, 여기서, 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득한 것이고, 여기서, 상기 세포는 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0270] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하는, EGFR 길항제에 대한 암 세포의 감수성을 회복시키는 방법으로서, 여기서, 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득한 것이고, 여기서, 상기 세포는 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0271] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암 세포의 성장 또는 증식을 감소시키는 방법으로서, 여기서, 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득한 것이고, 여기서, 상기 세포는 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0272] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암 세포의 아포토시스를 증가시키는 방법으로서, 여기서, 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득한 것이고, 여기서, 상기 세포는 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인 방법을 제공한다.

[0273] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하는, EGFR 길항제에 대한 암 세포의 저항성을 감소시키는 방법으로서, 여기서, 상기 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득한 것이고, 여기서, 상기 세포는 Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는

것인 방법을 제공한다.

- [0274] 한 측면에서, 본 발명은 세포를, 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것 및 EGFR 길항제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 암 세포에서 획득한 EGFR 길항제 내성을 치료하는 방법으로서, 여기서, 상기 세포는 Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 포함하는 것인 방법을 제공한다.
- [0275] 일부 실시양태에서, 암 세포는 임의의 EGFR-유도된 암이다. 일부 실시양태에서, 암 세포는 EGFR 활성화 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 암 세포는 EGFR 유전자 증폭을 포함한다. 일부 실시양태에서, EGFR 유전자 증폭은 2배 이상의 증폭이다. 일부 실시양태에서, Ax1 증폭은 2배 이상의 증폭이다. 일부 실시양태에서, 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성 증가와 연관된 EGFR 유전자 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, EGFR 길항제에 대한 내성 증가와 연관된 EGFR 유전자 돌연변이는 EGFR의 T790M 돌연변이이다.
- [0276] 일부 실시양태에서, EGFR 길항제는 소분자 치료제, 핵산 치료제, 또는 단백질 치료제이다. 일부 실시양태에서, EGFR 길항제는 항체, 안티센스 분자, 또는 소분자 키나제 억제제이다. 일부 실시양태에서, EGFR 길항제는 제피티닙, 에를로티닙, 세톡시맙, 파니투무맙으로 이루어진 군으로부터 선택되는 EGFR 키나제 억제제이다. 일부 실시양태에서, EGFR 길항제는 세톡시맙, 파니투무맙으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항-EGFR 항체이다. 일부 실시양태에서, 핵산 치료제는 siRNA 분자이다.
- [0277] 한 측면에서, 본 발명은 대상체로부터의 암 세포 중 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭을 검출하는 단계를 포함하는, EGFR 길항제 및 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 이용하는 치료법에 대한 후보로서 대상체를 확인하는 방법으로서, 여기서, 상기 대상체는 EGFR 길항제로 치료를 받아 왔고, 상기 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득한 암을 앓고 있는 대상체인 것인 방법을 제공한다.
- [0278] 한 측면에서, 본 발명은 대상체로부터의 암 세포 중 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭의 존재를 검출하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 Ax1 발현, Ax1 활성화 돌연변이 또는 Ax1 유전자 증폭이 존재한다면, 이는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득할 위험이 있음을 시사하는 것인, EGFR 길항제로 치료받고 있고, 상기 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득할 위험이 있는 대상체를 확인하는 방법을 제공한다.
- [0279] 한 측면에서, 본 발명은 대상체에게 EGFR 길항제 및 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 투여하는 단계를 포함하는, EGFR 길항제를 이용한 치료법에 대해 내성을 띠는 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0280] 한 측면에서, 본 발명은 대상체가 Ax1 발현을 보이는지 여부, 예컨대, Ax1 수준 및/또는 활성이 상승하였는지 여부를 측정하는 단계, 및 Ax1 발현을 보인, 예컨대, Ax1 활성이 상승한 대상체에게 EGFR 길항제 및 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 투여하는 단계를 포함하는, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법으로서, 여기서, 상기 대상체는 EGFR 길항제를 이용한 치료법에 대해 내성 발생을 보이는 대상체인 것인, 방법을 제공한다.
- [0281] 한 측면에서, 본 발명은 (i) EGFR 길항제로 치료받는 대상체를 모니터링하여 대상체가 Ax1 발현을 보이는지 여부, 예컨대, 수준 및/또는 Ax1 활성이 상승하였는지 여부를 측정하는 단계, 및 (ii) 대상체가 Ax1 발현을 보인 경우, 예컨대, Ax1 수준 및/활성이 상승한 경우, 대상체의 치료 요법을, EGFR 길항제 이외에도 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 포함하도록 변형시키는 단계를 포함하는, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0282] 한 측면에서, 본 발명은 (i) EGFR 길항제로 치료받는 대상체를 모니터링하여 대상체가 상기 억제제에 대한 내성을 발생시키는지 여부를 측정하는 단계, (ii) 대상체를 시험하여 대상체가 Ax1 발현을 보이는지 여부, 예컨대, Ax1 수준 및/활성이 상승하였는지 여부를 측정하는 단계, 및 (iii) 대상체가 상승된 Ax1 수준 및/활성을 보인 경우, 대상체의 치료 요법을, EGFR 길항제 이외에도 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것을 포함하도록 변형시키는 단계를 포함하는, EGFR 활성화 돌연변이 또는 EGFR 유전자 증폭과 연관된 암을 앓는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0283] 또 다른 측면에서, 본 발명은 세포를 EGFR 길항제 및 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것과 접촉시킴으로써 (i) EGFR 길항제에 대한 암 세포의 감수성을 회복시키는 방법, (ii) EGFR 길항제에 대한 암 세포의 내성을 감소시키는 방법, 및/또는 (iii) 암 세포에서 획득한 EGFR 길항제 내성을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0284] 예시적인 실시양태에서, 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득하였고, 예컨대, Ax1 유전자 중 활성화 돌연변이, Ax1 유전자 증폭, 또는 Gas6 매개된 Ax1 활성화와 연관된, Ax1 활성 및/또는 발현 수준의 상승을 포함하는 것이다. 본원에 개시된 본 방법은 암 세포의 감수성을 회복시키는 데, 내성을 감소시키는 데 및/또는 획득

한 내성을 치료하는 데 사용될 수 있다.

- [0285] 또 다른 측면에서, 본 발명은 세포를 EGFR 길항제 및 본원에 기술된 항-Ax1 항체 중 임의의 것과 접촉시킴으로써 암 세포의 성장 및/또는 증식을 감소시키거나, 또는 암 세포의 아포프토시스를 증가시키는 방법을 제공한다. 예시적인 실시양태에서, 암 세포는 EGFR 길항제에 대한 내성을 획득하였고, 예컨대, Ax1 유전자 중 활성화 돌연변이, Ax1 유전자 증폭, 또는 Gas6 매개된 Ax1 활성화와 연관된, Ax1 활성화 및/또는 발현 수준의 상승을 포함하는 것이다.
- [0286] 제약 조성물
- [0287] 본 발명의 항체는 보통, 항체 이외에도 1종 이상의 성분을 포함할 수 있는 제약 조성물 형태로 투여될 것이다.
- [0288] 따라서, 본 발명에 따른, 및 본 발명에 따른 용도의 제약 조성물은 활성 성분 이외에도 제약상 허용되는 부형제, 담체, 완충제, 안정제 또는 당업자에게 널리 공지된 다른 물질을 포함할 수 있다. 상기 물질은 비독성이어야 하고, 활성 성분의 효능을 방해하지 않아야 한다. 담체 또는 다른 물질의 정확한 성질은, 경구 투여, 또는 주사, 예컨대, 정맥내 주사에 의한 투여일 수 있는 투여 경로에 의존할 것이다. 제약 조성물은 인간 및 수의학적 의약에서 인간용 또는 동물용 용도의 것일 수 있다.
- [0289] 본원에 기술된 각종 상이한 형태의 제약 조성물을 위한 상기와 같은 적합한 부형제의 예는 문헌 ["Handbook of Pharmaceutical Excipients," 2nd Edition, (1994), Edited by A Wade and PJ Weller]에서 살펴볼 수 있다.
- [0290] 치료학적 용도로 허용되는 담체 또는 희석제는 제약 분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985)]에 기술되어 있다. 적합한 담체의 예로는 락토스, 전분, 글루코스, 메틸셀룰로스, 마그네슘 스테아레이트, 만니톨, 소르비톨 등을 포함한다. 적합한 희석제의 예로는 에탄올, 글리세롤, 물 및 완충처리된 염수를 포함한다.
- [0291] 최선의 제약 담체, 부형제 또는 희석제는 의도하는 투여 경로 및 표준 제약 관행과 관련하여 선택될 수 있다. 제약 조성물은 임의의 적합한 결합제(들), 윤활제(들), 현탁화제(들), 코팅제(들), 가용화제(들), 완충제(들), 향미제(들), 계면활성제(들), 증점제(들), 보존제(들) (항산화제 포함) 등, 및 제제가 의도되는 수혜자의 혈액과 등장성이 되게 하는 목적으로 포함되는 물질을 담체, 부형제 또는 희석제로서 또는 그 이외에 추가로 포함할 수 있다.
- [0292] 적합한 결합제의 예로는 전분, 젤라틴, 천연 당, 예컨대, 글루코스, 무수 락토스, 자유 유동 락토스, 베타-락토스, 옥수수 감미제, 천연 및 합성 검, 예컨대, 아카시아, 트라가칸트 또는 알긴산 나트륨, 카르복시메틸 셀룰로스 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다.
- [0293] 적합한 윤활제로는 소듐 올레이트, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 염화나트륨 등을 포함한다. 보존제, 안정제, 염료 및 심지어 향미제까지도 제약 조성물 중에 제공될 수 있다. 보존제의 예로는 소듐 벤조 에이트, 소르브산 및 p 히드록시벤조산의 에스테르를 포함한다. 항산화제 및 현탁화제 또한 사용될 수 있다.
- [0294] 제약 제제는 경구, 국소 (진피, 협측 및 설하 포함), 직장 또는 비경구 (피하, 진피내, 근육내 및 정맥내), 비강 및 폐 투여, 예컨대, 흡입에 의한 투여에 적합한 것을 포함한다. 제제는 적절할 경우, 개별 투여 단위로 편리하게 제공될 수 있고, 약학 분야에 널리 공지되어 있는 방법 중 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 모든 방법은 활성 화합물을 액체 담체와 또는 미분된 고체 담체와, 또는 그 둘 모두와 함께 회합시킨 후, 이어서, 필요할 경우, 생성물을 원하는 제제로 성형화시키는 단계를 포함한다. 담체가 고체인 경우, 경구 투여용으로 적합한 제약 제제는 가장 바람직하게는 각각 미리 결정된 양으로 활성제를 함유하는, 단위 투약 제제, 예컨대, 볼루스, 캡슐제 또는 정제로서 제공된다. 정제는 임의적으로 하나 이상의 부성분과 함께 압착 또는 성형시킴으로써 제조될 수 있다. 압착 정제는 임의적으로 결합제, 윤활제, 불활성 희석제, 활택제, 계면활성제 또는 분산제와 함께 혼합된 예컨대, 분제 또는 과립제와 같은, 자유 유동 형태의 활성제를 적합한 기기에서 압착시킴으로써 제조될 수 있다. 성형 정제는 불활성 액체 희석제와 함께 활성제를 성형화시킴으로써 제조될 수 있다. 정제는 임의적으로 코팅될 수 있고, 코팅되지 않은 경우, 이는 임의적으로 스코어링될 수 있다. 캡슐제는 활성제를 단독으로 또는 하나 이상의 부성분과 함께 캡슐제 쉘 내로 충전시킨 후, 이어서, 상기를 일반 방식으로 실링함으로써 제조될 수 있다. 카세트 (cachet)는 캡슐제와 유사하며, 여기서, 활성제는 임의의 부성분(들)과 함께 라이스 페이퍼 봉투에 실링된다. 활성제는 또한 예를 들어, 투여 전에 물 중에 현탁될 수 있거나, 또는 음식물에 뿌릴 수 있는, 분산가능한 과립제로 제제화될 수 있다. 과립제는 예컨대, 사세에 패키징될 수 있다. 담체가 액체인 경우, 경구 투여용으로 적합한 제제는 수성 또는 비수성 액체 중 액제로서 또는 현탁제로서 또는 수중유

액체 에멀전으로서 제공될 수 있다.

- [0295] 경구 투여용 제제는 방출 조절형(controlled release) 투여 형태, 예컨대, 활성제가 적절한 방출 조절 매트릭스 중에서 제제화되거나, 또는 적합한 방출 조절 필름으로 코팅된 정제를 포함한다. 상기 제제는 특히 예방적 용도에 편리할 수 있다.
- [0296] 담체가 고체인 경우, 직장 투여용으로 적합한 제약 제제는 가장 바람직하게는 단위 투여 좌제로 제공된다. 적합한 담체로는 코코아 버터 및 당업계에서 일반적으로 사용되는 다른 물질을 포함한다. 좌제는 편리하게는 활성제를 연화된 또는 용융된 담체(들)와 함께 혼합한 후, 냉각시키고, 몰드에서 성형화시킴으로써 형성될 수 있다.
- [0297] 비경구 투여용으로 적합한 제약 제제는 수성 또는 유지성 비히클 중의 활성제로 구성된, 멸균 액체 또는 현탁제를 포함한다.
- [0298] 주사용 제제는 볼루스 주사 또는 연속 주입용으로 그에 맞게 적합화될 수 있다. 상기 제제는 편리하게는 사용이 요구될 때까지 제제 도입 후 실링되는 단위 투약 또는 다회 투약 용기로 제공된다. 대안적으로, 활성제는 사용 전, 예컨대, 발열원 무함유 멸균수로 구성되는 분제 형태일 수 있다.
- [0299] 활성 화합물은 또한 예컨대, 피하로 또는 근육내로 근육내 주사에 의해 또는 이식에 의해 투여될 수 있는 지속성 데포 제제로서 제제화될 수 있다. 데포 제제는 예를 들어, 적합한 중합체 또는 소수성 물질 또는 이온 교환수지를 포함할 수 있다. 상기 지속성 제제는 특히 예방적 용도에 편리하다.
- [0300] 구강을 통한 폐 투여용으로 적합한 제제는, 활성 화합물을 함유하고, 바람직하게는 직경 범위가 0.5 내지 7 μm 인 입자가 수혜자의 기관지 수상 구조로 전달될 수 있도록 제공된다. 한가지 가능성으로서, 상기와 같은 제제는 미분된 분말 형태로, 이는 흡입 장치에서 사용하기 위한 것으로, 적합하게는 예를 들어, 젤라틴으로 이루어진 관통가능한 캡슐제로 또는 별법으로, 활성제, 적합한 액체 또는 기체 추진제 및 임의적으로 다른 성분, 예컨대, 계면활성제 및/또는 고체 희석제를 포함하는 자가 추진 제제(self-propelling formulation)로서 편리하게 제공될 수 있다. 적합한 액체 추진제로는 프로판 및 클로로플루오로카본을 포함하고, 적합한 기체 추진제로는 이산화탄소를 포함한다. 활성제가 용액 또는 현탁액의 소적 형태로 분배되는 자가 추진 제제는 또한 사용될 수 있다.
- [0301] 상기 자가 추진 제제는 당업계에 공지되어 있는 것과 유사하고, 확립된 방법에 의해 제조될 수 있다. 적합하게, 이는 원하는 분무 특징을 가지는 자동 기능 밸브 또는 수동식 밸브가 장착된 용기에 제공된다: 밸브는 그의 매 작동시 고정된 부피, 예를 들어, 25 내지 100 μl 씩 전달하는 계량형인 것이 이롭다.
- [0302] 추가의 가능성으로서, 활성제는 가속 기류 또는 초음파 교반을 사용하여 흡입을 위한 미세 소적 미스트를 생성하게 하는 분무기 또는 네블라이저에서 사용하기 위한 액체 또는 현탁제 형태의 것일 수 있다.
- [0303] 비강 투여용으로 적합한 제제는 일반적으로 폐 투여용으로 상기 기술된 것과 유사한 제제를 포함한다. 분배될 때, 상기 제제는 바람직하게는 비강내 잔류될 수 있도록 하기 위해 입자 직경이 10 내지 200 μm 범위여야 한다; 이는 적절하게는 적절한 입자 크기의 분제를 사용하거나, 적절한 밸브를 선택함으로써 달성될 수 있다. 다른 적합한 제제로는 코에 가깝게 장착된 용기로부터 쿨멍을 통한 신속한 흡입에 의해 투여하기 위한 것으로 입자 직경이 20 내지 500 μm 범위인 조분제(coarse powder) 및 수성 또는 오일성 용액 또는 현탁액 중 0.2 내지 5% w/v의 활성제를 포함하는 점비제를 포함한다.
- [0304] 제약상 허용되는 담체는 당업자에게 널리 공지되어 있고, 0.1 M 및 바람직하게, 0.05 M 포스페이트 완충제 또는 0.8% 염수를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 추가로, 상기 제약상 허용되는 담체는 수성 또는 비수성 용액, 현탁액 및 에멀전일 수 있다. 비수성 용매의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 예컨대, 올리브 오일 및 주사용 유기 에스테르, 예컨대, 에틸 올레이트가 있다. 수성 담체로는 물, 알콜/수성 용액, 에멀전 또는 현탁액 (염수 및 완충처리된 매질)을 포함한다. 비경구용 비히클로는 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스, 텍스트로스 및 염화나트륨, 락테이트화된 링거 또는 고정유를 포함한다. 보존제 및 다른 첨가제, 예컨대, 항미생물제, 항산화제, 킬레이팅제, 불활성 가스 등 또한 존재할 수 있다.
- [0305] 국소 투여용으로 적합한 제제는 예를 들어, 겔제, 크림제 또는 연고제로 제공될 수 있다. 상기 제제는 예컨대, 상처 또는 궤양 표면 상에 직접 도포되거나 또는 치료하고자 하는 부위에 및 그 위에 도포될 수 있는 적합한 지지체, 예컨대, 밴드, 거즈, 메쉬 등 위에 탑재되어 있어 상처 또는 궤양 부위에 도포될 수 있다.
- [0306] 치료하고자 하는 부위, 예컨대, 상처 또는 궤양 부위에 직접 분무하거나 또는 뿌릴 수 있는 액체 또는 분말 제

제 또한 제공될 수 있다. 대안적으로, 담체, 예컨대, 밴드, 거즈, 메쉬 등이 제제와 함께 분무되거나, 뿌려질 수 있고, 이어서, 치료하고자 하는 부위에 도포될 수 있다.

[0307] 본 발명의 추가의 측면에 따라, 활성 화합물(들)을 담체와 함께 예를 들어, 혼합하여 회합시키는 단계를 포함하는, 상기 기술된 바와 같은 제약 조성물 또는 수의학적 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 일반적으로, 제제는 활성제를 액체 담체 또는 미분된 고체 담체 또는 그 둘 모두와 함께 균일하고 밀접하게 회합시키고, 이어서, 필요할 경우, 생성물을 성형화시킴으로써 제공된다. 본 발명은 작용제를 제약상 또는 수의학상 허용되는 담체 또는 비히클과 함께 회합시키는 단계를 포함하는, 제약 조성물을 제조하는 방법으로까지 확장된다.

[0308] 투여

[0309] 본 발명의 제약 조성물은 경구, 직장, 비강, 기관지내, 국소 (협측 및 설하 포함), 질 또는 비경구 (피하, 근육내, 정맥내, 동맥내 및 진피내 포함), 복강내 또는 경막내 투여에 맞게 적합화될 수 있다. 바람직하게, 제제는 정맥내로 또는 피하로 투여되는 제제이다.

[0310] 제제는 편리하게 단위 투여 형태로, 즉, 단위 용량 또는 단위 용량의 다중 또는 서브 단위를 함유하는 개별 분량의 형태로 제공될 수 있다. 예로서, 제제는 정제 형태 및 지속 방출형 캡슐제 형태일 수 있고, 이는 약학 분야에 널리 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0311] 본 발명에서 경구 투여용 제제는 각각 미리 결정된 양으로 활성제를 함유하는 개별 단위, 예컨대, 캡슐제, 연질 캡슐제, 점적제, 카세제, 환제 또는 정제로서; 분제 또는 과립제로서; 수성 액체 또는 비수성 액체 중 활성제의 액체, 에멀전 또는 현탁제로서; 또는 수중유 액체 에멀전 또는 유중수 액체 에멀전으로서; 또는 볼루스 등으로서 제공될 수 있다. 바람직하게, 상기 조성물은 1 용량당 1 내지 250 mg 및 더욱 바람직하게, 10-100 mg의 활성 성분을 함유한다.

[0312] 경구 투여용 조성물의 경우 (예컨대, 정제 및 캡슐제), "허용되는 담체"라는 용어는 비히클, 예컨대, 일반 부형제, 예컨대, 결합제, 예를 들어, 시럽, 아카시아, 젤라틴, 소르비톨, 트라가칸트, 폴리비닐피롤리돈 (포비돈), 메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필-메틸셀룰로스, 수크로스 및 전분; 충전제 및 담체, 예를 들어, 옥수수 전분, 젤라틴, 락토스, 수크로스, 미정질 셀룰로스, 카올린, 만닛톨, 이인산 칼슘, 염화나트륨 및 알긴산; 및 윤활제, 예컨대, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 스테아레이트 및 다른 금속성 스테아레이트, 글리세롤 스테아레이트, 스테아르산, 실리콘 유체, 탈크 왁스, 오일 및 콜로이드성 실리카를 포함한다. 향미제, 예컨대, 페퍼민트, 윈터그린 오일, 체리 향미제 등도 또한 사용될 수 있다. 투여 형태가 쉽게 확인될 수 있게 만드는 착색제를 첨가하는 것이 바람직할 수도 있다. 정제는 또한 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 코팅될 수 있다.

[0313] 정제는 임의적으로 하나 이상의 부성분과 함께 압착 또는 성형시킴으로써 제조될 수 있다. 압착 정제는 임의적으로 결합제, 윤활제, 불활성 희석제, 보존제, 계면활성제 또는 분산제와 함께 혼합된 예컨대, 분제 또는 과립제와 같은, 자유 유동 형태의 활성제를 적합한 기기에서 압착시킴으로써 제조될 수 있다. 성형 정제는 불활성 액체 희석제로 습윤화된 분말형 화합물 혼합물을 적합한 기기에서 성형화시킴으로써 제조될 수 있다. 정제는 임의적으로 코팅되거나, 스코어링될 수 있고, 활성제가 저속으로 방출되거나, 조절식으로 방출되도록 제제화될 수 있다.

[0314] 경구 투여용으로 적합한 다른 제제로는 향미가 부가된 기재, 일반적으로, 수크로스 및 아카시아 또는 트라가칸트 중 활성제를 포함하는 로젠지; 불활성 기재, 예컨대, 젤라틴 및 글리세린 또는 수크로스 및 아카시아 중 활성제를 포함하는 향정(pastilles); 및 적합한 액체 담체 중 활성제를 포함하는 구강세척제를 포함한다.

[0315] 투여용으로 다른 형태의 것은 정맥내로, 동맥내로, 경막내로, 피하로, 진피내로, 복강내로 또는 근육내로 주사될 수 있고, 멸균 또는 멸균가능한 용액으로부터 제조되는 액체 또는 에멀전을 포함한다. 주사가능한 형태는 전형적으로 1 용량당 10-1,000 mg, 바람직하게, 10-250 mg의 활성 성분을 함유한다.

[0316] 본 발명의 제약 조성물은 또한 좌제, 페서리, 현탁제, 에멀전, 로션제, 연고제, 크림제, 젤제, 분무제, 액체 또는 살포성 분제 형태일 수 있다.

[0317] 경피 투여의 대체 수단은 피부 패치의 사용에 의한 것이다. 예를 들어, 활성 성분은 폴리에틸렌 글리콜 또는 액체 파라핀의 수성 에멀전으로 이루어진 크림제 내로 혼입될 수 있다. 활성 성분은 또한 1 내지 10중량%의 농도로 필요에 따라 안정제 및 보존제와 함께 백랍 또는 백색 연질 파라핀 기재로 이루어진 연고제로 혼입될 수 있다.

- [0318] 대체 제제화 전략법은 경구 또는 좌제 경로로 적합한 제제를 제공할 수 있다. 투여 경로는 치료법의 물리화학적 특징에 의해, 질환에 대한 특별한 고려 사항에 의해, 효능을 최적화시키기 위해, 또는 부작용을 최소화시키기 위해 결정될 수 있다.
- [0319] 추가의 투여 모드는 유지 장치의 사전 코팅, 또는 다르게는 유지 장치 내로의 혼입을 포함하고, 이를 위해 최적량의 항체는 적절한 실험에 의해 결정될 것이다.
- [0320] 본 발명의 일부 바람직한 실시양태에서, 항체 분자는 단량체 단편, 예컨대, Fab 또는 scFv이다. 상기 항체 단편은 반감기가 비교적 짧은 특징을 가질 수 있다.
- [0321] 투여량
- [0322] 당업계의 숙련가는 과도한 실험 없이도 대상체에게 투여하기 위한 본 조성물 중 하나의 적절한 용량을 쉽게 결정할 수 있다. 전형적으로, 의사는 개별 환자에 가장 적합한 실제 투여량을 결정할 것이며, 이는 사용되는 특정 작용제의 활성, 상기 작용제의 대상 안정성 및 작용 기간, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 성별, 섭식, 투여 모드 및 횟수, 배출 속도, 약물 조합, 특정 질환의 중증도 및 개체가 받고 있는 요법을 비롯한, 다양한 인자에 따라 달라질 것이다.
- [0323] 본 발명에 따라, 제공되는 조성물이 개별 환자에게 투여될 수 있다. 투여는 바람직하게, 환자에게 유익성을 보여주는 데 충분한 "치료학상 유효량"으로 이루어진다. 상기와 같은 유익성은 1종 이상의 증상을 적어도 호전시키는 것일 수 있다. 실제 투여량, 및 투여 속도 및 투여 시간 경로는 치료되는 것을 성질 및 중증도에 의존할 것이다. 치료법 처방, 예컨대, 투여량 등의 결정은 일반 의사 및 다른 의학 박사의 책임하에 있다. 항체의 적절한 용량은 당업계에 널리 공지되어 있고; 문헌 [Ledermann J.A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664]; [Bagshawe, K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922]를 참조할 수 있다.
- [0324] 정확한 용량은 항체가 진단용인지 또는 치료용인지 여부, 치료하고자 하는 부위의 크기 및 위치, 항체 (예컨대, 전체 항체, 항체 단편 또는 디아바디)의 정확한 성질, 및 항체에 부착된 임의의 검출가능한 표지 또는 다른 분자의 성질을 비롯한, 다수의 인자에 의존할 것이다. 전형적인 항체 용량이 볼루스로서 정맥내로 투여될 수 있다. 다른 투여 모드로는 유사한 전체 누적량을 달성하기 위해 수시간에 걸쳐 정맥내 주입을 포함한다. 이는 성인 환자의 단일 치료를 위한 용량이며, 이는 아동 및 유아를 위해 비례 방식으로 조정될 수 있고, 이는 또한 분자량에 비례하여 다른 항체 포맷에 대해 조정될 수 있다. 치료는 의사의 재량대로 매일, 매주 2회, 매주, 또는 매달인 간격으로 반복될 수 있다.
- [0325] 본원에 개시된 투여량은 평균 사례에 대한 예시적인 것이다. 물론 더 높거나 또는 더 낮은 투여량 범위가 합당한 개별 사례도 존재할 수 있으며, 이는 본 발명의 범주 내에 포함된다.
- [0326] 본 발명에 따라, Ax1을 억제시키기 위해 유효량의 작용제가 투여될 수 있다. 물론, 상기 투여량은 작용제의 투여 유형에 따라 추가로 변형될 수 있다. 예를 들어, 급성 요법을 위한 "유효량"을 달성하기 위해서는 비경구 투여가 바람직하다. 비록 근육내 볼루스 주사 또한 유용하기는 하지만, 물 중 5% 텍스트로스 또는 생리 식염수 중 화합물 또는 적합한 부형제를 포함하는 유사한 제제의 정맥내 주입이 가장 효과적이다. 전형적으로, 비경구적 용량은 혈장 중 약물의 농도를, 키나제를 억제시키거나, 또는 표적 수용체를 포화시키는 데 효과적인 농도로 유지시키는 방식으로 약 0.01 내지 약 100 mg/kg; 바람직하게, 0.1 내지 20 mg/kg일 될 것이다. 작용제는 약 0.4 내지 약 400 mg/kg/일의 총 1일 용량을 달성하기 위한 수준으로 1일 1 내지 4회 투여될 수 있다. 치료학상 유효한 활성제의 정확한 양 및 상기 작용제를 최적으로 투여하는 경로는, 작용제의 혈중 수준과, 치료학적 효과를 달성하는 데 요구되는 농도를 비교함으로써 당업계의 숙련가에 의해 쉽게 결정될 수 있다.
- [0327] 본 발명의 작용제는 또한 약물의 농도가 본원에 개시된 치료학적 지표 중 하나 이상을 달성하는 데 충분한 정도의 방식으로 환자에게 경구적으로 투여될 수 있다. 전형적으로, 작용제를 함유하는 제약 조성물은 환자 상태와 일관되는 방식으로 약 0.1 내지 약 50 mg/kg의 경구 용량으로 투여된다. 바람직하게, 경구 용량은 약 0.5 내지 약 20 mg/kg이 될 것이다.
- [0328] 본 발명의 작용제는 주어진 약리학적 효과를 달성하는 데 필요한 작용제의 농도를 측정하기 위해 수개의 생물학적 검정법 중 하나로 시험될 수 있다.
- [0329] 조합 요법
- [0330] 조성물은 치료하고자 하는 병태에 따라 단독으로, 또는 다른 치료법과 함께 조합하여 동시에 또는 순차적으로

투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체 또는 그의 접합체는 항암 단일요법으로서, 또는 하기 언급되는 바와 같은 다른 암 치료법과 함께 조합 요법으로 사용될 수 있다. 다른 치료법은 적합한 용량의 통증 완화 약물, 예컨대, 비-스테로이드성 항염증성 약물 (예컨대, 아스피린, 이부프로펜 또는 케토프로펜) 또는 아편제, 예컨대, 모르핀, 또는 항구토제의 투여를 포함할 수 있다.

- [0331] 바람직한 측면에서, 본 발명의 항체 (또는 그의 접합체)는 면역 체크포인트 조절제 (ICM), 예컨대, 면역 체크포인트 억제제 (ICI)와 함께 조합하여 투여된다. 전형적으로, ICM은 작용제, 예컨대, 압타머 또는 표적화된 수용체에 결합하는 항체이다.
- [0332] 본 발명의 항체 (또는 그의 접합체)와 함께 조합하여 사용되는 ICM은 당업계에 공지된 임의의 적합한 ICM일 수 있다. 특히, 적합한 면역 체크포인트 조절제로는 하기의 것을 포함한다:
- [0333] CTLA-4 표적화제 (이필리무맵(Ipilimumab) 및 트레멜리무맵(Tremelimumab) 포함).
- [0334] PD-1 표적화제 (펄브롤리주맵(Pembrolizumab), 니볼루맵(Nivolumab) 및 AMP-514/MEDI0680 포함).
- [0335] BD-L1 표적화제 (MPDL3280A, MEDI4736, MSB0010718C 및 BMS-936559 포함).
- [0336] 4-1BB 표적화제 (우렐루맵 및 PF-05082566 포함).
- [0337] OX-40 표적화제 (MEDI6469, MEDI6383 (rOX40L) 및 MOXR0916 포함).
- [0338] GITR 표적화제 (TRX518 포함).
- [0339] CD27 표적화제 (CDX-1127 포함).
- [0340] CD40 표적화제 (CP-870,893 포함).
- [0341] LAG3 표적화제 (BMS-986016 포함).
- [0342] 면역계에서 억제 경로인 면역 체크포인트는 면역 내성을 유도하기 위해 종양에 의해 선입될 수 있다. T-세포 자극성 및 억제성 수용체 및 수지상 세포 자극성 수용체를 비롯한, 면역 체크포인트를 차단 또는 조절하고, 이로써, 암의 면역 내성을 감소 또는 역전시키는 작용제를 사용하는 것이 암 연구에서 중요한 수단이 된다.
- [0343] ICM 사용을 통해 조절될 수 있는 T-세포 자극성 수용체로는 CD28, ICOS, 4-1BB, OX40, GITR, CD27, TWEAKR, HVEM 및 TIM-1을 포함한다. ICM 사용을 통해 조절될 수 있는 T-세포 억제성 수용체로는 PD-L1, CTLA-4, PD-1, BTLA, TIM-3, VISTA, LAG-3 및 TIGIT를 포함한다. ICM 사용을 통해 조절될 수 있는 수지상 세포 자극성 수용체로는 CD40 및 4-1BB를 포함한다.
- [0344] ICM의 조합이 본 발명의 항체 (또는 그의 접합체)와 함께 사용되는 경우, ICM은 모두 표적 억제성 수용체일 수 있거나, 사용되는 ICM은 모두 표적 자극성 수용체일 수 있거나, 또는 ICM를 표적화하는 억제성 수용체 및 자극성 수용체의 조합이 사용될 수 있다.
- [0345] 따라서, 치료법이 하나 이상의 ICM을 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인 암 치료 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 항체 (또는 그의 접합체)를 제공한다. 유사하게, 치료법이 하나 이상의 면역 체크포인트 조절제를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인 암 치료법을 위한 의약의 제조에서의 본 발명의 항체 (또는 그의 접합체)의 용도를 제공한다.
- [0346] 치료법이 이필리무맵, 트레멜리무맵, 펄브롤리주맵, 니볼루맵, AMP-514/MEDI0680, MPDL3280A, MEDI4736, MSB0010718C, BMS-936559, 우렐루맵, PF-05082566, MEDI6469, MEDI6383 (rOX40L), MOXR0916, TRX518, CDX-1127, CP-870,893 및 BMS-986016으로부터 선택되는 하나 이상의 면역 체크포인트 조절제를 추가로 포함하는 것인, 암 치료 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 항체 (또는 그의 접합체), 또는 암 치료법을 위한 의약의 제조에서의 상기 항체 (또는 그의 접합체)의 용도 또한 제공한다.
- [0347] 본 발명의 항체 (또는 그의 접합체)는 하나 이상의 ICM 이전에, 하나 이상의 ICM과 동시에, 또는 하나 이상의 ICM 이후에 투여될 수 있다.
- [0348] 치료법이 하나 이상의 ICM을 추가로 포함하고, 여기서, 암이 폐암, 흑색종, 유방암, 난소암 또는 암종으로부터 선택되는 것인, 암 치료 방법에서 사용하기 위한 본 발명의 항체 (또는 그의 접합체), 또는 암 치료법을 위한 의약의 제조에서의 상기 항체 (또는 그의 접합체)의 용도 또한 제공한다.
- [0349] -----

- [0350] 조합 요법에서 사용하는 데 적합한 작용제
- [0351] 이는 알킬화제, 예컨대, 알킬 술포네이트, 예컨대, 부술포;
- [0352] 질소 머스타드, 예컨대, 클로람부실, 시클로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 멜팔란 및 우라무스틴, 에틸렌이민 유도체, 예컨대, 티오테파;
- [0353] 니트로소우레아, 예컨대, 카무스틴, 로무스틴 및 스트렙토조토신, 트리아젠, 예컨대, 다카바진, 프로카바진 및 데모졸라미드;
- [0354] 백금 화합물, 예컨대, 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴, 사트라플라틴 및 피코플라틴 온나플라틴, 테트라플라틴, 스피로플라틴, 이프로플라틴, 클로로(디에틸렌디아미노)-백금 (II) 클로라이드, 디클로로(에틸렌디아미노)-백금 (II), 디아미노(2-에틸말로나토)백금 (II), (1,2-디아미노시클로헥산)말로나토백금 (II), (4-카르복시프탈로)-(1,2-디아미노시클로헥산)백금 (II), (1,2-디아미노시클로헥산)-(이소시트레이트)백금 (II), 및 (1,2-디아미노시클로헥산)-시스-(피루베이트)백금 (II);
- [0355] 항대사산물, 예컨대, 엽산 길항제, 예컨대, 메토틱세이트, 페메트렉세드, 칼티트렉세드 및 트리메트렉세이트,
- [0356] 피리미딘 유사체, 예컨대, 아자시티딘, 카페시타빈, 시타라빈, 에다트렉세이트, 플록수리딘, 플루오로우라실, 젬시타빈 및 트록사시타빈;
- [0357] 퓨린 유사체, 예컨대, 클라드리빈, 클로로데옥시아데노신, 크로파라빈, 플루다라빈, 메르캅토피린, 펜토스타틴 및 티오구아닌;
- [0358] 천연 생성물, 예컨대, 항종양 항생제, 예컨대, 블레오마이신, 닥티노마이신, 미트라마이신, 미토마이신, 미톡산트론, 포르피로마이신 및 안트라시클린, 예컨대, 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신 및 발루비신;
- [0359] 유사분열 억제제, 예컨대, 빈카 알칼로이드 빈블라스틴, 빈베시르, 빈크리스틴, 빈데신 및 비노렐빈;
- [0360] 효소, 예컨대, L-아스파라기나제 및 PEG-L-아스파라기나제,
- [0361] 미세소관 중합체 안정제, 예컨대, 탁산 파클리탁셀 및 도세탁셀;
- [0362] 토포이소머라제 I 억제제, 예컨대, 캄프토테신 이리노테칸 및 토포테칸; 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대, 포도필로톡신, 암사크린, 에토포시드, 테니포시드, 로속산트론 및 악티노마이신;
- [0363] 호르몬 및 호르몬 길항제, 예컨대, 안드로겐제, 예컨대, 플루옥시메스테론 및 테스토락톤,
- [0364] 항안드로겐제, 예컨대, 비칼루타미드, 시프로테론, 플루타미드 및 닐루타미드;
- [0365] 코르티코스테로이드제, 예컨대, 텍사메타손 및 프레드니손;
- [0366] 아로마타제 억제제, 예컨대, 아미노글루테티미드, 아나스트로졸, 엑스메스탄, 포르메스탄 및 레트로졸;
- [0367] 에스트로겐제, 예컨대, 디에틸stil베스트롤;
- [0368] 항에스트로겐제, 예컨대, 풀베스트란트, 알록시펜, 타목시펜 및 토레미펜;
- [0369] 황체 형성 호르몬 방출 호르몬 (LHRH) 효능제 및 길항제, 예컨대, 아바렐릭스, 부세레린, 고세렐린, 류프롤라이드, 히스트렐린, 데슬로렐린, 나파렐린 아세테이트 및 트립토텐린;
- [0370] 프로게스테린제, 예컨대, 메드록시프로게스테론 아세테이트 및 메게스트롤 아세테이트 및 갑상샘 호르몬, 예컨대, 레보티록신 및 리오티로닌;
- [0371] PKB 경로 억제제, 예컨대, 페리포신, 엔자스타우린 히드로클로라이드 및 트리시리빈;
- [0372] P13K 억제제, 예컨대, 세마포어 및 SF1126;
- [0373] mTOR 억제제, 예컨대, 라파마이신 및 유사체;
- [0374] CDK 억제제, 예컨대, 셀리시슬립, 알보시딕 및 7-히드록시스타우로스포린;
- [0375] COX-2 억제제, 예컨대, 셀레콕시브;

- [0376] HDAC 억제제, 예컨대, 트리코스타틴 A, 수베로일아닐리드 히드록삼산 및 클라미도신;
- [0377] DNA 메틸라제 억제제, 예컨대, 테모졸로미드; 및
- [0378] 기타 작용제, 예컨대, 알트레타민, 삼산화비소, 탈리도미드, 레날리도미드, 갈륨 니트레이트, 레바미솔, 미토탄, 히드록시우레아, 옥트레오티드, 프로카바진, 수라민, 광역학적 화합물, 예컨대, 메톡살렌 및 소듐 포르피머 및 프로테아좀 억제제, 예컨대, 보테조밋.
- [0379] 분자 표적화 요법제, 예컨대:
- [0380] 기능성 치료제, 예컨대, 유전자 요법제;
- [0381] 안티센스 요법제;
- [0382] 티로신 키나제 억제제, 예컨대, 에를로티닙 히드로클로라이드, 제피티닙, 이마티닙 메실레이트 및 세막사닙;
- [0383] RAF 억제제, 예컨대, 소라페닙;
- [0384] 유전자 발현 조절제, 예컨대, 레티노이드 및 렉시노이드, 예를 들어, 아다팔렌, 벡사로텐, 트랜스-레티노산, 9-시스-레티노산 및 N-(4-히드록시페닐)레틴아미드;
- [0385] 표현형-지정 요법제, 예컨대, 모노클로날 항체, 예컨대, 알렘투주맙, 베바시주맙, 세특시맙, 이브리투모맙 티옥세탄, 리톡시맙 및 트라스투주맙;
- [0386] 면역독소, 예컨대, 엠타신, 방사성면역결구제이트, 예컨대, I-토시투모맙,
- [0387] 본원에 기술된 분자 표적 중 어느 하나를 표적화하는, 결합제, 예컨대, 압타머, 및
- [0388] 암 백신.
- [0389] 생물학적 요법제, 예컨대:
- [0390] 인터페론, 예컨대, 인터페론-[알파]2a 및 인터페론-[알파]2b, 및
- [0391] 인터루킨, 예컨대, 알데스루킨, 데니루킨 디프티톡스 및 오프레베킨. Ax1 억제제, 예컨대, 1-(6,7-디히드로-5H-벤조[6,7]시클로헥타[1,2-c]피리다진-3-일)-N3-((7-(S)-피롤리딘-1-일)-6,7,8,9-테트라히드로-5H-벤조[7]안놀렌-2-일)-1H-1,2,4-트리아졸-3,5-디아민 (BGB324/R428), CH5451098 (로슈(Roche)) 및 PCT/US07/089177, PCT/US2010/021275 및 PCT/EP2011/004451 (본원에서 참조로 포함)에 기술된 Ax1 억제제.
- [0392] 암 세포에 대하여 작용하도록 의도되는 상기 작용제 이외에도, 항암 요법은 보호제 또는 보조제, 예컨대,
- [0393] 세포보호제, 예컨대, 아미포스틴 및 텍스라죽산;
- [0394] 포스포네이트, 예컨대, 파미드로네이트 및 졸레드론산; 및
- [0395] 자극 인자, 예컨대, 에포에틴, 다베포에틴, 필그라스티프, PEG-필그라스티프 및 사르그라모스티프를 사용하는 것을 포함한다.
- [0396] 다수의 조합 화학요법제 요법, 예컨대, 카보플라틴/파클리탁셀, 카페시타빈/도세탁셀, 플루오로우라실/레바미솔, 플루오로우라실/류코보린, 메토티렉세이트/류코보린 및 트라스투주맙/파클리탁셀의 조합 단독 또는 카보플라틴과의 추가의 조합 등이 당업계에 공지되어 있다.
- [0397] -----
- [0398] 본 명세서 전역에 걸쳐, 바람직하게, 본원에 기술된 방법은 시험관내 또는 생체외에서 수행된다.
- [0399] -----
- [0400] 본 발명은 본원에서 제공하는 바와 같은 항체가 Ax1에 결합하도록, 또는 결합할 수 있도록 하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 언급한 바와 같이, 상기 결합은 생체내에서, 예컨대, 항체 또는 항체를 코딩하는 핵산의 투여 이후에 이루어질 수 있거나, 또는 시험관내에서, 예를 들어, ELISA, 웨스턴 블롯 분석, 면역세포화학법, 면역조직화학법, 면역침강법 또는 친화도 크로마토그래피에서 이루어질 수 있다.
- [0401] Ax1 수용체에 결합된 항체의 양을 측정할 수 있다. 정량화는 시험 샘플 중의 항원의 양에 관한 것일 수 있고, 이는 진단학적으로 관심의 대상이 될 수 있다.

- [0402] 샘플 중 항체의 반응성은 임의의 적절한 수단에 의해 측정될 수 있다. 방사성면역검정법 (RIA)이 한가지 가능성이다. 방사성 표지된 항원을 표지되지 않은 항원 (시험 샘플)과 혼합하고, 항체에 결합할 수 있도록 한다. 결합된 항원을 비결합 항원으로부터 물리적으로 분리시키고, 항체에 결합된 방사성 항원의 양을 측정한다. 시험 샘플 중 항원이 많으면 많을수록, 더 적은 방사성 항원이 항체에 결합하게 될 것이다. 항원 또는 리포터 분자에 연결된 유사체를 사용하는 경쟁적 결합 검정법 또한 비-방사성 항원과 함께 사용될 수 있다. 리포터 분자는 스펙트럼으로 분리되는 흡수 또는 방출 특징이 있는 형광 색소, 포스포르, 또는 레이저 염료일 수 있다. 적합한 형광 색소로는 플루오레세인, 로다민, 피코에리트린 및 텍사스 레드(Texas Red)를 포함한다. 적합한 발색 염료는 디아미노벤지딘을 포함한다.
- [0403] 다른 리포터로는 거대분자 콜로이드성 입자 또는 미립자 물질, 예컨대, 착색된 라텍스 비드, 검출가능한 신호가 직접 또는 간접적으로 시각적으로 관찰될 수 있도록, 전자적으로 검출될 수 있도록 또는 다르게 기록될 수 있도록 유발할 수 있는 자성 또는 상자성, 및 생물학적으로 또는 화학적으로 활성인 작용제를 포함한다. 이들 분자는 예를 들어, 발색 또는 변색, 또는 전기적 특성 변화를 일으키는 반응을 촉매화하는 효소일 수 있다. 이는 분자적으로 여기될 수 있고, 이로써, 에너지 상태 사이에서의 전자 전이가 특징적인 스펙트럼 흡수 또는 방출을 일으킨다. 이는 바이오센서와 함께 사용되는 화학적 엔티티를 포함할 수 있다. 비오틴/아비딘 또는 비오틴/스트렙타아비딘 및 알칼리성 포스파타제 검출 시스템이 사용될 수 있다.
- [0404] 추가의 리포터로는 DNA 태그를 포함한다. 상기 태그는 예를 들어, qPCR에 의해 쉽게 정량화될 수 있다.
- [0405] 개별 항체-리포터 접합체에 의해 발생된 신호는 샘플 (정상 및 시험) 중 관련된 항체 결합에 관한 정량가능한 절대 또는 상대 데이터를 도출해 내는 데 사용될 수 있다.
- [0406] 본 발명은 또한 경쟁 검정법, 즉, 경쟁 검정법에서 본 발명에 의해 제공되는 항체를 사용함으로써 샘플 중 항원의 수준을 측정하는 방법에서 항원 수준을 측정하기 위한 상기와 같은 항체의 용도를 제공한다. 이는 비결합 항원으로부터 결합된 항원의 물리적 분리가 요구되지 않는 경우일 수 있다. 리포터 분자를 항체에 연결함으로써, 이를 통해 결합시 물리적 또는 광학적 변화가 발생하는 것이 한가지 가능성이다. 리포터 분자는 검출가능한, 및 바람직하게, 측정가능한 신호를 직접 또는 간접적으로 생성할 수 있다. 리포터 분자의 연결은 직접 또는 간접적으로 공유적으로, 예컨대, 펩티드 결합을 통해, 또는 비공유적으로 이루어질 수 있다. 펩티드 결합을 통한 연결은 항체 및 리포터 분자를 코딩하는 유전자 융합물의 재조합 발현의 결과일 수 있다.
- [0407] 본 발명은 또한 예를 들어, 바이오센서 시스템에서 본 발명에 따른 항체를 사용함으로써 직접적으로 항원 수준을 측정하는 것을 제공한다.
- [0408] 결합 측정 모드가 본 발명의 특징은 아니며, 당업자는 그의 선호도 및 일반적인 지식에 따라 적합한 모드를 선택할 수 있다.
- [0409] 본 발명은 추가로 항원에 결합하고, 본원에 실질적으로 기술된 바와 같은 아미노산을 포함하는 CDR 또는 본원에 실질적으로 기술된 바와 같은 아미노산을 포함하는 가변 도메인을 비롯한, 항체 가변 도메인 (VH 또는 VL 중 어느 하나, 또는 그 둘 모두)을 포함하는 것, 이 둘 모두가 이루어지는 임의의 항체와 Ax1에의 결합에 대하여 경쟁하는 항체로 확장된다. 항체 사이의 경쟁은 시험관내에서 예를 들어, 동일한 에피토프 또는 중복 에피토프에 결합하는 항체를 확인할 수 있도록 하기 위해 태그가 부착되지 않은 다른 결합 구성원(들)의 존재하에서 검출될 수 있는 한 결합 구성원에 특이 리포터 분자를 태그 부착시킴으로써 쉽게 검정될 수 있다. 경쟁은 예를 들어, ELISA 또는 유세포 분석법을 사용하여 측정될 수 있다. 대안적으로, 경쟁 항체는 실시예 5에 기술된 바와 같이, 비아코어 장치를 사용하여 표면 플라스몬 공명 (SPR) 기법을 통해 확인할 수 있다.
- [0410] 경쟁에 대한 시험에서, 항원의 펩티드 단편, 특히 관심의 대상이 되는 에피토프를 포함하는 펩티드가 사용될 수 있다. 에피토프 서열과 함께 양단에 하나 이상의 아미노산을 가지는 펩티드가 사용될 수 있다. 상기 펩티드는 명시된 서열로 "본질적으로 이루어진 것이다"라고 말할 수 있다. 본 발명에 따른 항체는 그의 항원과의 결합이 주어진 서열을 포함하는 펩티드에 의해 또는 주어진 서열을 포함함으로써 억제되도록 이루어질 수 있다. 본 시험에서, 서열과 함께 하나 이상의 아미노산을 포함하는 펩티드가 사용될 수 있다.
- [0411] 특이 펩티드에 결합하는 항체는 예를 들어, 펩티드(들)를 이용하여 패닝함으로써 파지 디스플레이 라이브러리로부터 분리될 수 있다.
- [0412] 본 발명은 본 발명의 항체를 코딩하는 분리된 핵산을 추가로 제공한다. 핵산은 DNA 및 RNA를 포함한다. 바람직한 측면에서, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 본 발명의 CDR, VH 또는 VL 도메인을 코딩하는 핵산을 제공한다.

다.

- [0413] 본 발명은 또한 상기와 같은 1개 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 플라스미드, 벡터, 전사 또는 발현 카세트 형태의 구축물을 제공한다.
- [0414] 본 발명은 또한 상기와 같은 하나 이상의 구축물을 포함하는 재조합 숙주 세포를 제공한다. 그에 대한 코딩 핵산으로부터의 발현을 포함하는 것인, 코딩된 생성물을 제조하는 방법과 같이, 제공하는 바와 같은 임의의 CDR, VH 또는 VL 도메인, 또는 항체를 코딩하는 핵산은 그 자체가 본 발명의 한 측면을 형성한다. 발현은 편리하게 핵산을 함유하는 재조합 숙주 세포를 적절한 조건하에서 배양함으로써 달성될 수 있다. 발현에 의한 제조 후, VH 또는 VL 도메인, 또는 항체는 당업계에 공지된 임의의 적합한 기법을 사용하여 분리 및/또는 정제될 수 있다.
- [0415] 본 발명에 따른 항체, VH 및/또는 VL 도메인, 및 코딩 핵산 분자 및 벡터는 예컨대, 그의 천연 환경으로부터 분리 및/또는 정제된 상태의 실질적으로 순수한 또는 균질인 상태로 제공될 수 있거나, 또는 핵산의 경우, 필요한 기능을 가진 폴리펩티드를 코딩하는 서열 이외의 다른, 기원인 되는 핵산 또는 유전자는 함유하지 않거나, 또는 실질적으로 함유하지 않는 상태로 제공될 수 있다. 본 발명에 따른 핵산은 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있고, 전체적으로 또는 부분적으로 합성된 것일 수 있다. 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 본원에서 기술하는 바와 같은 뉴클레오티드 서열에 대한 언급은 명시된 서열을 포함하는 DNA 분자를 포함하고, T가 U 대신 치환된, 명시된 서열을 포함하는 RNA 분자를 포함한다.
- [0416] 각종의 상이한 숙주 세포에서 폴리펩티드를 클로닝 및 발현시키기 위한 시스템이 널리 공지되어 있다. 적합한 숙주 세포로는 박테리아, 포유동물 세포, 효모, 바큘로바이러스, 및 곤충 세포 시스템을 포함한다. 이중성 폴리펩티드 발현용으로 당업계에서 이용가능한 포유동물 세포주로는 차이니즈 햄스터 난소 세포 (CHO), HeLa 세포, 새끼 햄스터 신장 (BHK) 세포, NSO 및 SP2/0 마우스 골수종 세포, YB2/0 래트 골수종 세포, 인간 세포주s HEK-293 및 PER.C6 및 기타 많은 것들을 포함한다. 보통 바람직한 박테리아 숙주는 E. 콜라이(*E. coli*)이다.
- [0417] 원핵 세포, 예컨대, E. 콜라이에서의 항체 및 항체 단편의 발현은 당업계에 잘 확립되어 있다. 리뷰를 위해, 예를 들어, 문헌 [Plueckthun, A. Bio/ Technology 9: 545-551 (1991)]을 참조할 수 있다. 항체 제조를 위한 옵션으로서 배양물 중에서 진핵 세포를 발현시키는 것 또한 당업자에게 이용가능하며, 리뷰를 위해, 예를 들어, 문헌 [Ref, M.E. (1993) Curr. Opinion Biotech. 4: 573-576]; [Trill J.J. et al. (1995) Curr. Opinion Biotech 6: 553-560]을 참조할 수 있다.
- [0418] 적절하게 프로모터 서열, 종결인자 서열, 폴리아데닐화 서열, 인핸서 서열, 마커 유전자 및 다른 서열을 비롯한, 적절한 조절 서열을 함유하는 적합한 벡터가 선택 또는 구축될 수 있다. 벡터는 적절하게, 플라스미드, 바이러스, 예컨대, 파지, 또는 파지미드일 수 있다 (문헌 [(Sambrook and Russell, 2001, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press)]. 예를 들어, 핵산 구축물 제조, 돌연변이유발법, 서열분석, DNA의 세포 내로의 도입 및 유전자 발현, 및 단백질 분석에서 핵산 조작을 위한 다수의 공지된 기법 및 프로토콜이 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology, Second Edition, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992]에 상세하게 기술되어 있다.
- [0419] 따라서, 본 발명의 추가 측면은 본원에 개시된 핵산을 함유하는 숙주 세포를 제공한다. 또 다른 추가 측면은 상기 핵산을 숙주 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 도입은 임의의 이용가능한 기법을 사용할 수 있다. 진핵 세포의 경우, 적합한 기법으로는 인산칼슘 형질감염, DEAE-텍스트란, 전기천공, 리포솜-매개 형질감염, 및 레트로바이러스 또는 다른 바이러스, 예컨대, 백시니아, 곤충 세포의 경우, 바큘로바이러스를 이용한 형질도입을 포함할 수 있다. 박테리아 세포의 경우, 적합한 기법으로는 염화칼슘 형질전환, 전기천공 및 박테리오파지를 이용한 형질감염을 포함할 수 있다.
- [0420] 도입에 이어서, 예컨대, 유전자 발현을 위한 조건하에서 숙주 세포를 배양함으로써 핵산으로부터 발현되도록 또는 발현될 수 있도록 할 수 있다.
- [0421] 한 실시양태에서, 본 발명의 핵산은 숙주 세포의 게놈 (예컨대, 염색체) 내로 통합된다. 통합은 표준 기법에 따라 게놈과의 재조합을 촉진시키는 서열을 포함함으로써 촉진될 수 있다.
- [0422] 본 발명은 또한 상기 항체 또는 폴리펩티드를 발현시키기 위해 발현 시스템에서 상기 언급된 구축물을 사용하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0423] 본 발명의 측면 및 실시양태는 이제 하기 실험을 참조로 하여 실시예에 의해 예시될 것이다.

- [0424] 본 명세서 어디에서든 인용된 모든 문헌들은 참조로 포함된다.
- [0425] 본 발명의 진술
- [0426] 하기 단락은 다수의 본 발명의 구체적으로 구상되는 실시양태 및 조합을 기술한다.
- [0427] 1. Ax1에 결합하고, 하기를 포함하는 항체:
- [0428] 1H12 VH 도메인 (서열번호 3), 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3 및, 임의적으로, 서열번호 6 및 서열번호 5로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 VH CDR을 포함하는 VH 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 VH 도메인; 및/또는
- [0429] 1H12 VL 도메인 (서열번호 4), 및 서열번호 8, 서열번호 9 및 서열번호 10으로부터 선택되는 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 VL CDR을 포함하는 VL 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는 항체 VL 도메인.
- [0430] 2. 1 단락에 있어서, 서열번호 5, 서열번호 6 및 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR을 포함하는 항체 VH 도메인을 포함하고, 항체가 Ax1에의 결합에 대하여 1H12 VH 도메인 (서열번호 3) 및 1H12 VL 도메인 (서열번호 4)을 포함하는 항체의 Ax1 결합 도메인과 경쟁하는 것인 항체.
- [0431] 3. 1 단락 또는 2 단락에 있어서, 1H12 VH 도메인 (서열번호 3)을 포함하는 것인 항체.
- [0432] 4. 3 단락에 있어서, 1H12 VL 도메인 (서열번호 4)을 포함하는 것인 항체.
- [0433] 5. 변이체가 하나 이상의 프레임워크 영역 및/또는 하나 이상의 CDR에 하나 이상의 아미노산 서열 변경을 포함하는 것인, 1 단락 내지 4 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체의 변이체.
- [0434] 6. 1 단락 내지 5 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 1H12 VH 도메인 (서열번호 3) 및 1H12 VL 도메인 (서열번호 4)에 의해 형성된 Ax1 항원-결합 부위의 친화도와 동일하거나, 또는 그보다 우수한 친화도로 Ax1에 결합하고, 항체의 친화도 및 항원-결합 부위의 친화도는 같은 조건하에서 측정된 것인 항체.
- [0435] 7. 1 단락 내지 6 단락 중 어느 한 단락에 있어서, scFv 항체 분자를 포함하는 것인 항체.
- [0436] 8. 1 단락 내지 6 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 항체 불변 영역을 포함하는 것인 항체.
- [0437] 9. 8 단락에 있어서, 전체 항체를 포함하는 것인 항체.
- [0438] 10. 1 단락 내지 6 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 항체가 항원-결합 항체 단편, 예컨대, 단일 도메인 항체, Fv, scFv, dsFv, Fd, Fab, F(ab')₂, 미니바디, 디아바디, 단일쇄 디아바디, 탠덤 scFv, TandAb, 비-바디, 트리-바디, 카파(람다)-바디, BiTE, DVD-Ig, SIP, SMIP, 또는 DART인 것인 항체.
- [0439] 11. 1 단락 내지 10 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 항원에 결합할 수 있는 능력 이외에도, 추가의 기능적 특징을 제공하는 추가 아미노산을 포함하는 것인 항체.
- [0440] 12. 1 단락 내지 11 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 5×10^{-11} M 이하의 K_D 로 Ax1에 결합하는 것인 항체.
- [0441] 13. 1 단락 내지 11 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 1.5×10^{-11} M 이하의 K_D 로 Ax1에 결합하는 것인 항체.
- [0442] 14. 1 단락 내지 13 단락 중 어느 한 단락에 있어서, $2 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 이하의 k_{off} 로 Ax1에 결합하는 것인 항체.
- [0443] 15. 1 단락 내지 14 단락 중 어느 한 단락에 있어서, $3 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ 이하의 k_{off} 로 Ax1에 결합하는 것인 항체.
- [0444] 16. 1 단락 내지 15 단락 중 어느 한 단락에 있어서, Ax1이 인간 Ax1인 것인 항체.
- [0445] 17. 1 단락 내지 16 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 영장류 Ax1에 특이적으로 결합하는 것인 항체.
- [0446] 18. 1 단락 내지 17 단락 중 어느 한 단락에 있어서,
- [0447] (i) 10^{-3} M 초과인 K_D 로 무린 Ax1에 결합하고/거나;
- [0448] (ii) 10^{-3} M 초과인 K_D 로 인간 Mer에 결합하고/거나;

- [0449] (iii) 10^{-3} M 초과인 K_D 로 인간 Tyro3에 결합하는 것인 항체.
- [0450] 19. 1 단락 내지 18 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 항체가 Ax1 효능제인 것인 항체.
- [0451] 20. 19 단락에 있어서, Ax1 신호전달이 10% 이상 더 큰 것인 항체.
- [0452] 21. 1 단락 내지 20 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 항체가 키메라 항체인 것인 항체.
- [0453] 22. 1 단락 내지 20 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 항체가 인간화 항체인 것인 항체.
- [0454] 23. 1 단락 내지 22 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 항체가
- [0455] (i) 1H12 항체와 동일한 에피토프, 또는
- [0456] (ii) 1H12 항체가 결합하는 에피토프와 중복되는 에피토프에 결합하는 것인 항체.
- [0457] 24. 1 단락 내지 23 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 항체가 세포 표면 상에 존재하는 Ax1에의 결합 이후에 내재화되는 것인 항체.
- [0458] 25. 1 단락 내지 24 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 임의적으로 펩티딜 결합 또는 링커를 통해 검출가능한 표지, 효소, 또는 독소에 접합된 것인 항체.
- [0459] 26. 25 단락에 있어서, 독소가 MMAE 및 MMAF를 포함하는 군으로부터 선택되는 것인 항체.
- [0460] 27. 25 단락에 있어서, 검출가능한 표지가 FITC인 것인 항체.
- [0461] 28. 1 단락 내지 24 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체 또는 항체의 항체 VH 또는 VL 도메인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산.
- [0462] 29. 28 단락에 따른 핵산으로 형질전환된 숙주 세포.
- [0463] 30. 항체 또는 항체 VH 또는 VL 도메인의 제조를 위한 조건하에서 29 단락에 따른 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는, 항체 또는 항체 VH 또는 VL 도메인을 제조하는 방법.
- [0464] 31. 30 단락에 있어서, 상기 항체 또는 항체 VH 또는 VL 가변 도메인을 단리 및/또는 정제하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0465] 32. 30 단락 또는 31 단락에 있어서, 항체 또는 항체 VH 또는 VL 가변 도메인을, 1종 이상의 추가 성분을 포함하는 조성물로 제제화시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0466] 33. 1H12 VH 도메인의 아미노산 서열 (서열번호 3)에 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실, 치환 또는 삽입에 의해 각각이 1H12 VH 도메인의 아미노산 서열 변이체인 하나 이상의 VH 도메인을 제공하고, 임의적으로 상기와 같이 제공된 하나 이상의 VH 도메인 아미노산 서열 변이체를 하나 이상의 VL 도메인과 조합하여 하나 이상의 VH/VL 조합을 제공하는 단계; 및/또는
- [0467] 1H12 VL 도메인의 아미노산 서열 (서열번호 4)에 하나 이상의 아미노산의 부가, 결실, 치환 또는 삽입에 의해 1H12 VL 도메인의 아미노산 서열 변이체인 VL 도메인을 제공하고, 상기와 같이 제공된 하나 이상의 VL 도메인 아미노산 서열 변이체를 하나 이상의 VH 도메인과 조합하여 하나 이상의 VH/VL 도메인 조합을 제공하는 단계; 및
- [0468] VH 도메인 아미노산 서열 변이체 또는 VH/VL 조합 또는 조합들을 시험하여 Ax1에 결합하는 항체를 확인하는 단계를 포함하는, Ax1에 결합하는 항체를 수득하는 방법.
- [0469] 34. 대체하고자 하는 CDR3을 포함하거나, CDR3 코딩 영역이 없는 하나 이상의 VH 도메인을 코딩하는 출발 핵산을 제공하고 상기 출발 핵산을 서열번호 7의 VH CDR3 아미노산 서열을 코딩하는 도너 핵산과 조합하여 상기 도너 핵산을 출발 핵산 중 CDR3 영역 내로 삽입시켜 VH 도메인을 코딩하는 생성물 핵산을 제공하는 단계; 또는
- [0470] 대체하고자 하는 CDR3을 포함하거나 CDR3 코딩 영역이 없는 하나 이상의 VL 도메인을 코딩하는 출발 핵산을 제공하고 상기 출발 핵산을 서열번호 10의 VL CDR3 아미노산 서열을 코딩하는 도너 핵산과 조합하여 상기 도너 핵산을 출발 핵산 중 CDR3 영역 내로 삽입시켜 VL 도메인을 코딩하는 생성물 핵산을 제공하는 단계;
- [0471] VH 도메인을 코딩하는 상기 생성물 핵산인 핵산을 발현시키고 임의적으로 상기와 같이 제조된 VH 도메인을 하나 이상의 VL 도메인과 조합하여 VH/VL 조합을 제공하고, 및/또는 VL 도메인을 코딩하는 상기 생성물 핵산인 핵산

을 발현시키고 상기와 같이 제조된 VL 도메인을 하나 이상의 VH 도메인과 조합하여 VH/VL 조합을 제공하는 단계;

- [0472] Ax1에 결합하는, VH 도메인 또는 VH/VL 조합을 포함하는 항체를 선별하는 단계; 및
- [0473] Ax1에 결합하는 상기 항체, 및/또는 Ax1에 결합하는 항체를 코딩하는 핵산을 회수하는 단계를 포함하는, Ax1에 결합하는 항체를 수득하는 방법.
- [0474] 35. 33 단락 또는 34 단락에 있어서, Ax1에 결합하는 항체가 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하는 항체 단편인 것인 방법.
- [0475] 36. 35 단락에 있어서, 항체 단편이 scFv 항체 분자인 것인 방법.
- [0476] 37. 35 단락에 있어서, 항체 단편이 Fab 항체 분자인 것인 방법.
- [0477] 38. 36 단락 또는 37 단락에 있어서, 전체 항체에 항체 단편의 VH 도메인 및/또는 VL 도메인을 제공하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0478] 39. 33 단락 내지 38 단락 중 어느 한 단락에 있어서, Ax1에 결합하는 항체, 또는 Ax1에 결합하는 항체의 항체 VH 또는 VL 가변 도메인을 1종 이상의 추가 성분을 포함하는 조성물로 제제화하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0479] 40. 30 단락 내지 39 단락 중 어느 한 단락에 있어서, Ax1에 결합하는 항체를 Ax1, 또는 Ax1의 단편에 결합시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0480] 41. 1 단락 내지 27 단락 중 어느 한 단락에 따른, Ax1에 결합하는 항체를 Ax1, 또는 Ax1의 단편에 결합시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0481] 42. 40 단락 또는 41 단락에 있어서, 상기 결합이 시험관내에서 수행되는 것인 방법.
- [0482] 43. 40 단락 내지 42 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 항체의 Ax1 또는 Ax1의 단편에의 결합량을 측정하는 단계를 포함하는 것인 방법.
- [0483] 44. 30 단락 내지 39 단락 중 어느 한 단락에 있어서, Ax1의 과발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애 치료용 의약의 제조에서 항체를 사용하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0484] 45. 1 단락 내지 27 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 또 다른 치료제와 조합된 항체 또는 그의 면역접합체.
- [0485] 46. 제약상 허용되는 부형제와 함께 1 단락 내지 27 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체 또는 그의 면역접합체를 포함하는 조성물.
- [0486] 47. 46 단락에 있어서, 또 다른 치료제를 추가로 포함하는 것인 조성물.
- [0487] 48. 45 단락 또는 47 단락에 있어서, 다른 치료제가 면역 체크포인트 조절제 (ICM), 예컨대, 면역 체크포인트 억제제 (ICI)인 것인 항체 또는 조성물.
- [0488] 49. 1 단락 내지 27 단락 및 45 단락 내지 48 단락 중 어느 한 단락에 있어서, 치료 방법에서 사용하기 위한 것인 항체 또는 조성물.
- [0489] 50. 49 단락에 있어서, 증식성 질환 치료 방법에서 사용하기 위한 것인 항체 또는 조성물.
- [0490] 51. 40 단락에 있어서, 증식성 질환이 암, 예컨대, AML인 것인 항체 또는 조성물.
- [0491] 52. 51 단락에 있어서, 암이 전이성 암인 것인 항체 또는 조성물.
- [0492] 53. Ax1의 과발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애 치료용 의약의 제조에서 1 단락 내지 27 단락 및 45 단락 내지 48 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체 또는 조성물의 용도.
- [0493] 54. Ax1의 과발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 앓거나, 상기 질환 또는 장애 발병 위험이 있는 환자에게 1 단락 내지 27 단락 및 45 단락 내지 48 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, Ax1의 과발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애 치료 방법.
- [0494] 55. 50 단락에 있어서, 항체가 전이성 암 세포를 표적하도록 제약 조성물의 전달을 지시하는 것인 방법.
- [0495] 56. Ax1의 과발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애 검출용 진단제 제조에서 1 단락 내지 27 단락, 45 단락 및

48 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체 및 상기 항체의 전이성 암 세포에의 결합 측정을 허용하는 하나 이상의 시약의 용도.

[0496] 57. Ax1의 과발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애를 앓거나, 상기 질환 또는 장애 발병 위험이 있는 환자에게 1 단락 내지 27 단락 및 45 단락 내지 48 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체 또는 조성물 및 상기 항체의 전이성 암 세포에의 결합 측정을 허용하는 하나 이상의 시약을 투여하는 단계를 포함하는, Ax1의 과발현을 특징으로 하는 질환 또는 장애 진단 방법.

[0497] 58. 1 단락 내지 27 단락, 45 단락 및 48 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체 및 상기 구성원의 전이성 암 세포에의 결합 측정을 허용하는 하나 이상의 시약을 포함하는 진단용 키트.

[0498] 59. 1 단락 내지 27 단락 및 45 단락 내지 48 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체 또는 조성물을 포함하는 키트.

[0499] 60. 제약상 허용되는 부형제와 함께, 활성 성분으로서 1 단락 내지 27 단락 중 어느 한 단락에 따른 항체를 유효량으로 포함하는 제약 조성물.

[0500] 실시예

[0501] 실시예 1: 마우스 항-Ax1 모노클로날 항체의 생성

[0502] 인간 IgG1 Fc 도메인에 융합된 인간 Ax1의 세포외 도메인을 포함하는 재조합 항원 (rhAx1-Fc; R&D 시스템즈)으로 면역 능력이 있는(immunocompetent) OF1 마우스 (찰스 리버)를 면역화시킴으로써 인간 Ax1 수용체에 대한 모노클로날 항체 (MAb)를 생성하였다.

[0503] 표준 프로토콜에 따라 마우스 골수종 세포와의 융합을 위해 혈액 중 rhAx1-특이 항체가 존재하는 것으로 보이는 마우스로부터의 비장 세포를 사용하였다. 하이브리도마 선별을 위해 히포크산틴-아미노프테린-티미딘 (HAT) 배지를 갖는 플레이트에서 세포를 배양하였다 (웰당 10^5 개의 세포). 12일 동안 선별한 후, 상청액을 수거하고, 효소 결합 면역흡착 검정법 (ELISA) 및 유세포 분석법으로 Ax1 결합에 대해 시험하였다. 제한 희석에 의한 2차 서브클로닝 후 가장 높은 항원-결합 활성을 보인 5개의 양성 클론을 대규모 항체 제조를 위해 시험관내에서 확장시켰다. 단백질 G 친화도 크로마토그래피에 의해 세포 배양물 상청액으로부터 MAb를 정제하였다.

[0504] 유세포 분석법 (도 1)에서 Ax1⁺ 세포에 특이적인 결합을 보인 항체 클론 1H12를 추가의 특징 규명을 위해 선택하였다.

[0505] 유세포 분석법을 위해, 배양물 중 부착성 세포를 PBS로 세척하고, 1 min 동안 트립신 (0.25%)으로 처리하고, 완전히 분리될 수 있도록 배양 접시를 히팅하여 분리시켰다. 조직 플라스크에 완전 배지를 첨가한 후, 세포를 PBS로 세척함으로써 트립신을 퀸칭시켰다. 세척 단계 동안, 5 min 동안 200 g로 원심분리하여 세포를 수집하였다. 0.02% 우혈청 알부민 (BSA)을 함유하는 PBS 중 전체 농도에 대해 항체를 희석시켰다. 실온에서 20 min 동안 10^5 개의 세포를 포함하는 200 μ l의 세포 현탁액을 사용하여 세포 염색을 수행하였다. PBS 0.02% BSA로 2회에 걸친 세척 단계를 수행한 후, 세포를 200 μ l 중에 재현탁시키고, 어큐리 C6 유세포 분석기 (BD 바이오사이언시스)에서 분석하기 전, 얼음 상에서 보관하였다.

[0506] 실시예 2: 마우스 모노클로날 항체 1H12는 인간 TAM 수용체 패밀리의 다른 구성원과 교차 반응하지 않는다

[0507] 25°C에서 비아코어 3000 장치 (GE 헬스케어)를 이용하여 모든 결합 실험을 수행하였다. 인간 TAM 수용체 패밀리의 구성원인, Ax1 (rhAx1-Fc 키메라; R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 154-AL), Mer (rhMer-Fc 키메라; R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 891-MR) 및 Tyro3 (rhTyro3/Dtk-Fc 키메라; R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 859-DK)에 상응하는 가용성 재조합 항원을 각각 393.0, 303.6 및 364.0 공명 단위 (RU)의 표면 밀도로 아민 커플링을 사용하여 CM5 센서 칩 표면에 고정화시켰다. 결합 분석 위저드를 이용하여 자동 모드로 비아코어 실험을 수행하였다. HBS-EP 완충제 (GE 헬스케어) 중 10 μ g/mL 농도로 MAb 1H12를 함유하는 샘플을 항원이 고정화되어 있는 표면에 30 μ l/min의 유속으로 3 min 동안 주입하였고 (회합), 이어서, 5 min 동안의 해리가 이어졌다.

[0508] 도 2에 제시된 결과는 인간 Ax1과의 특이적인 상호작용, 및 재조합 인간 Mer 및 Tyro3 항원에의 비결합을 입증한다.

[0509] 실시예 3: 마우스 모노클로날 항체 1H12는 마우스 AxL과는 교차 반응하지 않는다

[0510] 25°C에서 비아코어 3000 장치 (GE 헬스케어)를 이용하여 결합 실험을 수행하였다. 인간 Ax1 (rhAx1-Fc 키메라;

R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 154-AL), 마우스 Ax1 (rmAx1-Fc 키메라; R&D 시스템즈, R&D 시스템즈; 카탈로그 번호 854-AX) 및 인간 Tyro3 (rhTyro3/Dtk-Fc 키메라; R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 859-DK)에 상응하는 가용성 재조합 항원을 각각 1,308.0, 2,115.9 및 1,429.0 RU의 표면 밀도로 아민 커플링을 사용하여 CM5 센서 칩 표면에 고정화시켰다. 결합 분석 위저드를 이용하여 자동 모드로 비아코어 실험을 수행하였다.

[0511] HBS-EP 완충제 (GE 헬쓰케어) 중 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 Mab 1H12 또는 재조합 마우스 (rm) Ax1-리간드 Gas6 (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 986-GS/CF)을 함유하는 샘플을 항원이 고정화되어 있는 표면 상에 30 $\mu\text{L/min}$ 의 유속으로 3 min 동안 주입하였고 (회합), 이어서, 5 min 동안의 해리가 이어졌다.

[0512] 도 3에 제시된 결과는 인간 Ax1과 Mab 1H12의 특이적인 상호작용 및 재조합 마우스 Ax1 및 인간 Mer 항원과의 비결합을 입증한다 (도 3, 상부 패널). 그에 반해, 대조군으로서 사용된 마우스 Gas6은 인간 및 마우스 Ax1, 둘 모두에 강력하게 결합하였고, 인간 Tyro3에는 다소 더 약하게 결합하였다는 것을 입증하였다 (도 3, 하부 패널).

[0513] 실시예 4: 마우스 모노클로날 항체 1H12의 친화도 측정

[0514] 25°C에서 비아코어 3000 장치 (GE 헬쓰케어)를 사용하여 표면 플라스몬 공명 측정에 의해 항-Ax1 항체 1H12의 친화도 측정을 수행하였다. 고체 항원-코팅된 표면으로서, rhAx1-Fc 키메라 (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 154-AL)가 190 RU의 밀도로 고정화되어 있는 센서 칩 CM5를 사용하였다.

[0515] 동역학적 측정을 위해, HBS-EP 완충제 (비아코어, 카탈로그 번호 BR-1001-88) 중 상이한 농도의 항-Ax1 Mab 1H12 (1.3 내지 666.7 nM)을 3 min의 주입 시간 동안 30 $\mu\text{L/min}$ 유속으로 주입한 후, 5 min의 해리 기간이 이어졌다 (완충제 단독). 각 사이클 후, 재생 용액 (10 mM HCl, 1 M NaCl)을 50 $\mu\text{L/min}$ 유속으로 30 sec 동안 주입하여 표면을 재생시켰다.

[0516] 물질 이동 대조군 실험을 통해 Mab 1H12에 대한 유의적인 물질 이동 제한은 없다는 것이 입증되었다. 농도 (1.8 nM 또는 270 $\mu\text{g/mL}$)의 한 분석물 또는 1, 3 또는 20 min 동안 진행된 주입 후, 해리 단계는 사실상 동일하였는 바, 추가의 연관된 반응 대조군 실험에서는 Mab 1H12에 대한 연관된 반응이 밝혀지지 못했다. BIA이벨류에이션 소프트웨어 및 1:1 랭뮤어 결합 모델을 사용하여 동역학적 회합 (온-속도, k_{on}) 및 해리 (오프-속도, k_{off}) 속도를 계산하였다. k_{off}/k_{on} 비로서 평형 해리 상수 (K_D)를 계산하였다. 형성된 항체-항원 복합체의 반감기 ($t_{1/2}$)는 $\ln 2/k_{off}$ 비로서 계산하였다.

[0517] 도 4에 제시된 바와 같이, 마우스 Mab 1H12는 주로 매우 느린 해리 속도 ($k_{off} = 1.07 \times 10^{-5} \text{ 1/s}$)에 기인하여 매우 높은 친화도 ($K_D = 4.98 \times 10^{-11} \text{ M}$)를 가지는 것으로 입증되었고, 그 결과로 1H12/Ax1 복합체의 반감기는 18 hr이었다.

[0518] 실시예 5: 마우스 모노클로날 항체 1H12는 GAS6의 AXL에의 결합을 차단하지 않는다

[0519] 수회에 걸친 사이클로 2개의 샘플을 주사하면서 비아코어 3000 장치 (GE 헬쓰케어) 및 결합 분석 위저드를 사용하여 경쟁적 결합 연구를 수행하였다. 제1 샘플로서, 포화 농도의 Mab 1H12 (1.8 nM 또는 270 $\mu\text{g/mL}$)을 3 min 동안 30 $\mu\text{L/min}$ 의 유속으로 (아민 커플링을 사용하여) rhAx1-Fc로 코팅된 CM5 센서 칩의 표면 상에 주입한 후, 제2 샘플 주입 전에 2.5 min 동안의 안정화 (HBS-EP 완충제 단독)가 이어졌다. 하기 제2 샘플을 사용하였다: 재조합 인간 (rh) Gas6 (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 885-GS), 재조합 마우스 (rm) Gas6 (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 986-GS/CF) 및 항-Ax1 항체 패널 (Mab1,2,3); 모두의 농도는 25 $\mu\text{g/mL}$ 였다. 대조군으로서, 같은 조건하의 제2 샘플로서 Mab 1H12를 사용하였다 (25 $\mu\text{g/mL}$). 제2 샘플을 3 min 동안 주입한 후, 2.5 min 동안의 안정화 (완충제 단독), 및 50 $\mu\text{L/min}$ 의 유속으로 재생 용액 (10 mM HCl, 1 M NaCl)을 30 sec 동안 주입함으로써 이루어지는 표면 재생이 이어졌다.

[0520] 도 5에 제시된 결과는 Mab 1H12이 Ax1 결합에 대하여 Gas6 (인간 및 마우스) 및 본 실험에서 사용된 임의의 다른 항-Ax1 항체와 경쟁하지 않았다는 것을 입증하였다.

[0521] 실시예 6: 마우스 모노클로날 항체 1H12는 웨스턴 블롯 분석에서 변성된, 환원된 및 비-환원된 AXL, 둘 모두에 결합한다

[0522] 웨스턴 블롯 분석을 위해, 예측 분자 질량이 71.7 kDa (환원 조건하에 SDS-PAGE에서 100-110 kDa에 상응)인 재조합 인간 (rh) Ax1-Fc 키메라 (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 154-AL) 및 예측 분자 질량이 78.9 kDa (환원 조

건하에 SDS-PAGE에서 100-110 kDa에 상응)인 rhMer-Fc (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 891-MR)를 항원으로서 사용하였다. 상기 항원을 함유하는 샘플을 환원제 (라이프 테크놀로지스(Life Technologies))의 존재 또는 부재 하에서 변성시키고, 누페이지(NuPAGE) 3-8% 트리스-아세테이트 폴리아크릴아미드 (PAA) 겔, 1.0 mm x 12 웰 (인비트로젠)의 웰에 로딩하였다. 분자량 마커로서, 씨블루 플러스2 프리스테인드(SeeBlue Plus2 Prestained) MW 마커 (노벡스(Novex) LC5925)를 사용하였다.

[0523] 권고된 조건하에서 (라이프 테크놀로지스) 트리스-아세테이트 SDS 전개 완충제를 사용하여 전기영동을 수행하고, 20% 메탄올과 함께 이동 완충제를 이용하여 X셀 II™ 블롯 모듈(XCell II™ Blot Module) (인비트로젠)에 대한 매뉴얼 중 2개의 겔에 대해 기술된 바와 같이, 단백질을 니트로셀룰로스 막 위로 옮겨 놓았다. 10 mL의 차단 완충제인 5% 탈지유를 포함하는 TBS/0.1% 트윈20 (TBST) 중에서 막을 실온에서 1 hr 동안 인큐베이션 시킨 후, 1 µg/mL MAb 1H12를 함유하는 5 mL의 인큐베이션 완충제 (3% 탈지유를 포함하는 TBST) 중 4°C에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 매회 5 min 동안 10 mL의 TBST로 3회에 걸쳐 막을 세척한 후, 실온에서 완만하게 흔들어 주면서, 5 mL의 인큐베이션 완충제 중에서 염소-항 마우스 IgG (H+L) HRP-접합된 2차 항체 (1:3,000)와 함께 1 hr 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 막을 10 mL의 TBST 중에서 5 min 동안 3회에 걸쳐 세척하고, 10 mL의 TBS 완충제로 2회에 걸쳐 세척하였다. 막을 실온에서 1 min 동안 1 mL ECL 기질과 함께 인큐베이션시켰다. 과량의 기질 용액을 흡인하고, 케미독™ XRS+(Chemidoc™ XRS+) 영상 장치 (바이오 래드(Bio Rad)) 및 이미지 랩 (Image lab) 소프트웨어를 이용하여 현상하였다.

[0524] 도 6에 제시된 결과는 항체 1H12이 환원 및 비-환원의 변성된 Ax1 항원, 둘 모두와 특이적으로 상호작용한다는 것을 입증하였다. rhMer-Fc에의 결합은 검출되지 않았다. 본 결과는 MAb 1H12이 Ax1 수용체의 세포의 부분 상의 선형 에피토프를 인식한다는 것을 시사한다.

[0525] 실시예 7: 마우스 모노클로날 항체 1H12는 AXL 수용체의 천연 환경에서 세포 표면 상에서 발현된, 변성된, 환원된 및 비-환원된 AXL 수용체, 둘 모두에 결합한다

[0526] 표준 프로토콜에 따라 Ax1⁺ 및 Ax1⁻ 세포주, 각각 NCI-H1299 (비소세포 폐 암종, NSCLC) 및 LNCaP (전립샘 샘암종), 둘 모두로부터의 세포 용해물을 제조하였다. 세포 용해물 분액을 환원제 (라이프 테크놀로지스)의 존재 또는 부재하에서 변성시키고, 누페이지 3-8% 트리스-아세테이트 폴리아크릴아미드 (PAA) 겔, 1.0 mm x 12 웰 (인비트로젠)의 웰에 로딩하였다. SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯 분석은 본질적으로 실시예 6에 기술되어 있는 바와 같이 수행하였다.

[0527] 도 7에 제시된 결과는 Ax1⁺ NCI-H1299 세포에 존재하는 Ax1 수용체 (환원된 것 및 비-환원된 것, 둘 모두)와 MAb 1H12의 특이적인 상호작용을 입증하였다. Ax1⁺ 또는 Ax1⁻ 세포에 존재하는 다른 세포 단백질과의 상호작용은 전혀 관찰되지 않았다.

[0528] 실시예 8: 마우스 모노클로날 항체 1H12의 서열분석

[0529] 표준 조건하에서 하이브리도마 1H12 세포를 증식시켰다. 표준 프로토콜에 따라 mRNA 단리 및 cDNA 합성을 위해 5 x 10⁶개의 세포를 사용하였다. 중쇄 및 경쇄 가변 영역 (각각 VH 및 VL)을 코딩하는 유전자의 PCR 증폭을 위해, 마우스 IgG 라이브러리 프라이머 세트 (프로젠(Progen: 독일 하이텔베르그), 카탈로그 번호 F2010)를 사용하였다. 상이한 프라이머 조합을 사용하여 PCR 증폭을 수행함으로써 VH 유전자에 대하여 7개의 상이한 프라이머 조합을 사용하여 이루어진 PCR로부터 14개의 서열을, 및 VL 유전자에 대하여 4개의 상이한 프라이머 조합을 사용하여 이루어진 PCR로부터 7개의 서열을 얻었다. IMGT 데이터베이스와의 뉴클레오타이드 정렬에 의해 측정된 바와 같이, 상응하는 생식 계열 서열과의 가장 높은 상동성에 기초하여 클론 VH5 C9-3 및 Vκ4 G4-1의 서열을 추가 실험을 위해 선택하였다

[0530] 1H12 VH 및 VL 도메인의 아미노산 서열은 도 8에 제시되어 있다.

[0531] 실시예 9: 항-AXL 마우스 모노클로날 항체 1H12는 면역조직화학법에서 정상적인 인간 조직과 약한 반응을 보이거나, 또는 어떤 반응도 보이지 않았다

[0532] 입증 실험에서, 항체 1H12에 대한 최적의 프로토콜 및 농도를 측정하였다. 본 연구를 위해, Ax1⁺ 및 Ax1⁻ 세포의 냉동된 펠렛을 사용하였다. 항체를 0.05 µg/mL 내지 16.0 µg/mL (16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.1, 및 0.05 µg/mL)의 농도로 시험하였다. MAb 1H12는 8 µg/mL에서부터 아래로 1 µg/mL까지 Ax1⁺ 세포에서 중간 정도 내지 강

력한 반응을 보였고; 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 반응은 중간 정도였다. 따라서, 조직 교차 반응 (TCR) 연구에서 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 최적 농도로 설정하고 사용하였다. 상기 농도에서, Ax1-음성 세포에서는 어떤 반응도 관찰되지 않았다.

[0533] 바이오체인(BioChain)으로부터 구입한 시판용 냉동 조직 마이크로어레이 (TMA) (제품 번호 T6234701-2)를 사용하여 TCR 연구를 수행하였다. 모든 조직은 냉동-절단된, 아세톤-고정된 냉동 TMA로서 바이오체인으로부터 전달 받았다. 하기와 같이 실험을 수행하였다: 냉동-절편 (8 μm)을 실온에서 밤새도록 대기 건조시키고, 30 min 동안 5% 염소 정상 혈청 (잭슨 이뮤노리서치, 005-000-121) 중에서 차단하기 전 10 min 동안 아세톤 중에서 고정시켰다. 이어서, 절편을 1 hr 동안 5% 염소 정상 혈청을 갖는 PBS 중에서 1차 항체 (1H12)로 염색한 후, 이를 PBS 중에서 3회에 걸쳐 세척하였다. 이어서, 절편을 30 min 동안 엔비전(EnVision) 마우스 (다코(Dako), K4001)로 염색하였다. 절편을 트리스-HCl 중에서 3회에 걸쳐 세척한 후, 5 min 동안 3,3'-디아미노벤지딘 (DAB) 염료로 염색하였다. HTX 영상화를 사용하여 영상을 촬영하였다. 음성 (0), 약한 반응 (1+), 중간 정도의 반응 (2+), 또는 강력한 반응 (3+)으로 염색 강도를 판단하였다. 정상적인 인간 TCR의 결과가 하기 표 2에 제시되어 있다.

[0534] 항체 1H12는 림프절 및 비장 세포에서 약한 반응 내지 중간 정도의 반응, 또는 중간 정도의 반응을 보였다 (막 염색). 간 - 가능하게는 쿠퍼 세포에서 국부의 중간 정도의 반응도 관찰되었다 (막 염색). 췌장 상피 세포에서 일부 국부의 중간 정도 또는 강력한 세포내 반응이 관찰되었다. 하기 조직은 어떤 특이적인 양성 염색도 보이지 않았다: 부신, 골수, 다양한 뇌 조직 및 척수, 결장, 내피/대동맥, 식도, 난관, 심장, 신장, 폐, 난소, 태반, 전립샘, 피부, 척수, 횡문근, 위, 고환, 흉선, 갑상샘, 요관 및 자궁.

[0535] [표 2]

조직	MAb 1H12 에의 결합
부신 (1)	음성
부신 (2)	음성
부신 (3)	음성
골수 (1)	일부 세포 유형에서 1-2+ 배경
골수 (2)	일부 세포 유형에서 1-2+ 배경
골수 (3)	일부 세포 유형에서 1-2+ 배경
유방 (1)	음성
유방 (2)	음성
유방 (3)	음성

[0536]

뇌 소뇌 (1)	음성
뇌 소뇌 (2)	음성
뇌 소뇌 (3)	음성
뇌 피질 (1)	음성
뇌 피질 (2)	음성
뇌 피질 (3)	음성
뇌 뇌하수체 (1)	음성
뇌 뇌하수체 (2)	음성
뇌 뇌하수체 (3)	음성
결장 (1)	상피 세포 (불특정)의 뮤신에서 2-3+
결장 (2)	음성 (절편에는 상피 없음)
결장 (3)	음성 (절편에는 상피 없음)
내피, 대동맥 (1)	음성
내피, 대동맥 (2)	음성
내피, 대동맥 (3)	음성
식도 (1)	음성
식도 (2)	음성
식도 (3)	음성
난관 (1)	음성
난관 (2)	음성
난관 (3)	음성
심장 (1)	음성 (일부는 국부적인 불특정 배경)
심장 (2)	음성 (일부는 국부적인 불특정 배경)
심장 (3)	음성 (일부는 국부적인 불특정 배경)
신장 (1)	음성 (일부는 불특정 배경)
신장 (2)	음성 (일부는 불특정 배경)
신장 (3)	음성 (일부는 불특정 배경)
간 (1)	가능하게는 쿠퍼 대식세포에서 2+
간 (2)	가능하게는 쿠퍼 대식세포에서 2+
간 (3)	가능하게는 쿠퍼 대식세포에서 2+
폐 (1)	2-3+ 국부, 불특정일 수 있음
폐 (2)	2-3+ 국부, 불특정일 수 있음
폐 (3)	2-3+ 국부, 불특정일 수 있음
림프절 (1)	다수의 세포에서 1-2+
림프절 (2)	다수의 세포에서 1-2+

[0537]

림프절 (3)	다수의 세포에서 1-2+
난소 (1)	음성
난소 (2)	음성
난소 (3)	음성
췌장 (1)	상피 세포에서 2+ 국부
췌장 (2)	음성
췌장 (3)	3+ 국부
태반 (1)	음성
태반 (2)	음성
태반 (3)	음성
전립샘 (1)	음성
전립샘 (2)	음성
전립샘 (3)	음성
피부 (1)	음성
피부 (2)	음성
피부 (3)	음성
척수 (1)	음성
척수 (2)	음성
척수 (3)	음성
비장 (1)	다수의 세포에서 2+
비장 (2)	다수의 세포에서 2+
비장 (3)	다수의 세포에서 2+
황문근 (1)	음성
황문근 (2)	음성
황문근 (3)	음성
위 (1)	음성
위 (2)	음성
위 (3)	음성
고환 (1)	음성
고환 (2)	음성
고환 (3)	음성
흉선 (1)	음성
흉선 (2)	음성
흉선 (3)	음성
갑상샘 (1)	음성

[0538]

갑상샘 (2)	음성
갑상샘 (3)	음성
요관 (1)	음성
요관 (2)	음성
요관 (3)	음성
자궁, 자궁내막 (1)	음성
자궁, 자궁내막 (2)	음성
자궁, 자궁내막 (3)	음성
자궁, 자궁경부 (1)	음성
자궁, 자궁경부 (2)	음성
자궁, 자궁경부 (3)	음성

[0539]

[0540]

실시예 10: 키메라 모노클로날 항체 1H12 생성 및 시험

- [0541] 포유동물 세포 (진아트(GeneArt))에서의 발현을 위해 코돈이 최적화된 합성 유전자 생성을 위하여 뮤린 하이브리도마 1H12로부터 검색된 VH 및 VL 서열을 사용하였다. 포유동물 세포에서 항체를 제조하는 데 적합한 발현 벡터에서 상기 마우스 VH 및 VL 유전자를 프레임내에서 각각 인간 IgG1 중쇄 및 경쇄 (C-카파)의 불변 도메인을 코딩하는 유전 요소와 라이게이션시켰다. 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 일시적으로 발현시킨 후, 단백질 A 친화도 크로마토그래피를 사용하여 정제함으로써 키메라 (마우스 가변/인간 불변) IgG1 항체 제조를 달성하였다. 정제된 키메라 항체 (>95% 순도)를 유세포 분석법으로 Ax1- 양성 유방암 세포주 MDA-MB-231에의 결합에 대하여 분석하였다. 비교를 위해, 모체 마우스 Mab 1H12를 사용하였다. 유세포 분석법을 위해, 배양물 중 부착성 세포를 PBS로 세척하고, 1 min 동안 트립신 (0.25%)으로 처리하고, 완전히 분리될 수 있도록 배양 접시를 히팅하여 분리시켰다. 조직 플라스크에 완전 배지를 첨가한 후, 세포를 PBS로 세척함으로써 트립신을 쿼칭시켰다. 세척 단계 동안, 5 min 동안 200 g로 원심분리하여 세포를 수집하였다. 0.02% 우혈청 알부민 (BSA)을 함유하는 PBS 중 전체 농도에 대해 항체를 희석시켰다. 실온에서 20 min 동안 10^5 개의 세포를 포함하는 200 μ l의 세포 현탁액을 사용하여 세포 염색을 수행하였다. 세포 결합 항체를 각각 APC-접합된 당나귀 항인간 또는 항-마우스 IgG (H+L) F(ab')₂ 단편 (잭슨 면역리서치(Jackson ImmunoResearch))를 사용하여 검출하였다. PBS/0.02% BSA를 이용한 2회에 걸친 세척 단계 후, 세포를 200 μ l 중에 재현탁시키고, 어큐리 C6 유세포 분석기 (BD 바이오사이언시스)에서 분석하기 전, 얼음 상에서 보관하였다. 도 9에 제시된 결과는 키메라 항체가 MDA-MB-231 세포에 강력하게 결합한다는 것을 입증하였다.
- [0542] 실시예 11: 키메라 모노클로날 항체 ch1H12의 친화도 측정
- [0543] 25°C에서 비아코어 3000 장치 (GE 헬스케어)를 사용하여 표면 플라즈몬 공명 측정에 의해 항-Ax1 키메라 (마우스 가변/인간 불변 IgG1) 항체 ch1H12의 친화도 측정을 수행하였다. 고체 항원-코팅된 표면으로서, rhAx1-Fc 키메라 (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 154-AL)가 190 RU의 밀도로 고정화되어 있는 센서 칩 CM5를 사용하였다.
- [0544] 동역학적 측정을 위해, HBS-EP 완충제 (비아코어, 카탈로그 번호 BR-1001-88) 중 상이한 농도의 항-Ax1 키메라 Mab ch1H12 (1.3 내지 666.7 nM)을 3 min의 주입 시간 동안 30 μ l/min 유속으로 주입한 후, 5 min의 해리 기간이 이어졌다 (완충제 단독). 각 사이클 후, 재생 용액 (10 mM HCl, 1 M NaCl)을 50 μ l/min 유속으로 30 sec 동안 주입하여 표면을 재생시켰다.
- [0545] 물질 이동 대조군 실험을 통해 Mab ch1H12에 대한 유의적인 물질 이동 제한은 없다는 것이 입증되었다. BIA이벨류에이션 소프트웨어 및 1:1 랭뮤어 결합 모델을 사용하여 동역학적 회합 (온-속도, k_{on}) 및 해리 (오프-속도, k_{off}) 속도를 계산하였다. k_{off}/k_{on} 비로서 평형 해리 상수 (K_D)를 계산하였다. 형성된 항체-항원 복합체의 반감기 ($t_{1/2}$)는 $\ln 2/k_{off}$ 비로서 계산하였다.
- [0546] 도 10에 제시된 바와 같이, 키메라 Mab Mab ch1H12는 주로 매우 느린 회합 속도 ($k_{off} = 2.99 \times 10^{-6}$ 1/s)에 기인하여 매우 높은 친화도 ($K_D = 1.10 \times 10^{-11}$ M)를 가지는 것으로 입증되었고, 그 결과로 ch1H12/Ax1 복합체의 반감기는 64.4 hr이었다. 관측된 친화도 값은 모체 뮤린 항체 1H12와 비교하였을 때, 더 우수하였고 (K_D 보다 4.5배 더 낮음), 이는 인간 불변 도메인 스캐폴드 상에 탑재되었을 때, V_H 및 V_L 도메인의 배향이 더 우수하다는 것을 시사하는 것일 수 있다.
- [0547] 실시예 12: 마우스 모노클로날 항체 1H12는 비-인간 영장류로부터의 AXL과는 교차 반응하지 않는다
- [0548] CHO 세포에서의 일시적 발현에 의해 시노물구스 및 레수스 원숭이로부터의 Ax1 수용체의 세포외 부위를 포함하는 재조합 Ax1-Fc 키메라 단백질 (각각 시노-Ax1 및 rhe-Ax1)을 생성하였다. 재조합 시노-Ax1 및 rhe-Ax1 항원을 각각 1,345.0 및 1,515.9 RU의 표면 밀도로 아민 커플링을 사용하여 CM5 센서 칩 표면에 고정화시켰다. 양성 대조군으로서, 같은 조건하에서 제조된 hu-Ax1-Fc 키메라는 1,234.9 RU의 밀도로 같은 칩에 고정화시켰다.
- [0549] 25°C에서 비아코어 3000 장치 (GE 헬스케어)를 이용하여 결합 실험을 수행하였다. 결합 분석 위저드를 이용하여 자동 모드로 비아코어 실험을 수행하였다.
- [0550] HBS-EP 완충제 (GE 헬스케어) 중 10 μ g/mL 농도로 Mab 1H12를 함유하는 샘플을 항원이 고정화되어 있는 표면에 30 μ l/min의 유속으로 3 min 동안 주입하였고 (회합), 이어서, 5 min 동안의 해리가 이어졌다.
- [0551] 도 11에 제시된 결과는 Mab 1H12의, 인간 기원의, 및 시노물구스 및 레수스 원숭이로부터의 모든 Ax1 변이체에

의 강력하고, 특이적인 결합을 입증한다.

[0552] 실시예 13: 사포린에 커플링된 키메라 모노클로날 항체 ch1H12를 이용한 종양 세포 사멸

[0553] 면역독소를 생성하기 위해, FabFc-ZAP 인간 접합체 (4.5 nM 최종 농도) (어드밴스드 타겟팅 시스템즈(Advanced Targeting Systems), 카탈로그 번호 IT-65)를 이용하여 키메라 MAbs ch1H12를 식물 독소 사포린에 비공유적으로 커플링시켰다. ch1H12-사포린 내재화가 종양 세포 생존가능성에 미치는 효과를 Ax1- 양성 종양 세포주 MDA-MB-231 (인간 삼중 음성 유방 암종)을 이용하여 시험하였다. 10% FBS, L-글루타민 (4 mM), 스트렙토마이신 (5 µg/ml) 및 페니실린 (5 U/ml)으로 보충된 DMEM/F-12 배지 중 96-웰 플레이트의 웰당 800개의 세포를 시딩하고, 16 hr 동안 부착시켰다. 세포를 상이한 희석물의 면역독소 ch1H12-사포린 희석액과 함께 72 hr 동안 인큐베이션시켰다. 클라리오스타(CLARIOstar)[®] 마이크로플레이트 판독기 (BMG 랩테크(BMG LABTECH))를 사용하여 XTT/PMS 검정법을 수행함으로써 세포의 생존가능성을 측정하였다.

[0554] 도 12에 제시된 결과는 내재화가 우수하고, 피코몰 범위의 EC₅₀ 값 (50% 세포를 사멸시키는 유효 농도)으로 ch1H12-기반 면역독소의 세포 사멸 효능이 강력하다는 것을 입증한다.

[0555] 실시예 14: 항체 1H12는 AXL 하류 신호전달을 유도한다

[0556] 본 실험은 인간 자궁경부암 유래 세포주 HeLa (ATCC[®] CCL-2[™])를 이용하여 수행하였다. T175 플라스크에서 세포를 10% FBS, 페니실린-스트렙토마이신 및 L-글루타민으로 보충된 MEM 배양 배지 (시그마(Sigma)) 중에서 전면 성장률(confluence)이 80%가 될 때까지 성장시켰다. 세포를 PBS로 세척하고, 0.25% 트립신/EDTA (시그마)로 처리하여 분리한 후, 원심분리하고, 새 배지 (MEM/0.5% FBS) 중에 재현탁시켰다. 페트리 디쉬 (디쉬당 3 x 10⁶ 개의 세포)에서 세포를 10% FBS로 보충된 MEM 배지 중에 시딩하였다. 37°C에서 7 hr 동안 인큐베이션시킨 후, 세포를 PBS로 세척하고, 내인성 Gas6을 고갈시키기 위해 500 ng/ml의 Ax1-Fc (R&D 시스템즈)로 보충된 기아 배지 (MEM/0.5% FBS) 중에서 유지시켰다. 24 hr 동안 인큐베이션시킨 후, 배양 배지를 흡인하고, 7.5 µg/mL 농도의 항-AXL 항체 1H12 단독, 또는 비오틴-SP-접합된 어피니퓨어(AffiniPure) 염소 항-마우스 IgG (H+L) #2.22와 미리 혼합된 1H12 (ab 가교 결합 혼합물)를 포함하는 새 MEM/0.5% FBS 배지를 첨가하였다. 37°C에서 10-30 min 동안 인큐베이션시킨 후, 원심분리에 의해 세포를 수집하고, NP40-용해 완충제 중에 재현탁시킨 후, 얼음 상에서 30 min 동안 인큐베이션시켰다. 세포 용해물을 원심분리 (12,000 rpm, 4°C, 5 min)에 의해 세정하고, BCA 단백질 검정법을 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 35 µg의 전체 단백질을 포함하는 세포 용해물 샘플을 환원제 (라이프 테크놀로지)의 존재하에서 변성시키고, 누페이지 10% 비스-트리스 폴리아크릴아미드 (PAA) 겔, 1.0 mm x 12 웰 (인비트로젠)의 웰에 로딩하였다. 권고된 조건하에서 (라이프 테크놀로지) 비스-트리스 SDS 전개 완충제를 사용하여 전기영동을 수행하고, 20% 메탄올과 함께 이동 완충제를 이용하여 X셀 II[™] 블롯 모듈 (인비트로젠)에 대한 매뉴얼 중 2개의 겔에 대해 기술된 바와 같이, 단백질을 PVDF 막 위로 옮겨 놓았다. 10 mL의 차단 완충제인 5% 탈지유를 갖는 TBS/0.1% 트윈20 (TBST) 중에서 막을 실온에서 1 hr 동안 인큐베이션시킨 후, 항-포스포-Akt (Ser⁴⁷³) 항체 (셀 시그널링(Cell Signaling))의 1:1,000 희석액을 함유하는 5 mL의 인큐베이션 완충제 (3% 탈지유를 갖는 TBST) 중 4°C에서 밤새도록 인큐베이션시켰다. 매회 5 min 동안 10 mL의 TBST로 3회에 걸쳐 막을 세척한 후, 실온에서 완만하게 흔들어 주면서, 염소 항-토끼 HRP-접합된 2차 항체와 함께 1 hr 동안 인큐베이션시켰다. 이어서, 막을 10 mL의 TBST 중에서 5 min 동안 3회에 걸쳐 세척하고, 10 mL의 TBS 완충제로 2회에 걸쳐 세척하였다. 막을 실온에서 1 min 동안 1 mL ECL 기질과 함께 인큐베이션시켰다. 과량의 기질 용액을 흡인하고, 케미독[™] XRS+ 영상 장치 (바이오 래드) 및 이미지 랩 소프트웨어를 이용하여 시각화하였다. 로딩 대조군으로서, 같은 조건하에서 항-마우스 액틴 항체 (1:10,000; 시그마)를 사용하는 검출을 이용하였다. 항-포스포-Akt는 AKT1, AKT2, 및 AKT3 사이를 구별하지 못하는 바, 이에 불렀에 '포스포-Akt'이 전체 수준으로 제시된다. 항GAPDH 항체 (밀리포어(Millipore))를 이용한 검출을 로딩 대조군으로서 사용하였다.

[0557] 도 13에 제시된 결과는 판독값으로서 Ser⁴⁷³ 상의 Akt의 하류 인산화를 사용한 HeLa 세포에서 2차 항-마우스 항체와 가교 결합된 항-AXL 항체 1H12가 강력한 Ax1 신호전달을 유도하였다는 것을 입증하였다. 효과는 용량의 의존하는 것으로 입증되었는데, 가교 결합된 1H12의 양이 많을수록, 더욱 강력한 수용체 신호전달을 일으켰다 (도 14). 추가로, 도 15에 제시된 데이터는 1H12 항체가 2차 항체와의 가교 결합 없이도 단독으로 Ax1 수용체 활성화 및 하류 신호전달을 일으킬 수 있다는 것을 입증한다. 본 결과는 1H12 항체가 강력한 효능작용 활성을 가지고 있다는 것을 시사한다.

- [0558] 실시예 15: 마우스 모노클로날 항체 1H12는 AXL 결합에 대하여 시판용 항체 MAB154와 경쟁한다
- [0559] 수회에 걸친 사이클로 2개의 샘플을 주사하면서 비아코어 3000 장치 (GE 헬스케어) 및 결합 분석 위저드를 사용하여 경쟁적 결합 연구를 수행하였다. 제1 샘플로서, 포화 농도의 MAb 1H12 (1.8 μ M 또는 270 μ g/mL)을 3 min 동안 30 μ l/min의 유속으로 (아민 커플링을 사용하여) rhAx1-Fc로 코팅된 CM5 센서 칩의 표면 상에 주입한 후, 제2 샘플 주입 전에 2.5 min 동안의 안정화 (HBS-EP 완충제 단독)가 이어졌다. 하기 제2 샘플을 사용하였다: 재조합 마우스 (rm) Gas6 (R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 986-GS/CF) 및 시판용 항-AXL 모노클로날 항체 MAB154 (마우스 IgG1, 클로 번호 108724; R&D 시스템즈, 카탈로그 번호 MAB154); 둘 모두의 농도는 25 μ g/mL였다. 대조군으로서, 같은 조건하의 제2 샘플로서 MAb 1H12를 사용하였다 (25 μ g/mL). 제2 샘플을 3 min 동안 주입한 후, 2.5 min 동안의 안정화 (완충제 단독), 및 50 μ l/min의 유속으로 재생 용액 (10 mM HCl, 1 M NaCl)을 30 sec 동안 주입함으로써 이루어지는 표면 재생이 이어졌다.
- [0560] 도 16에 제시된 결과는 MAb 1H12가 MAB154의 Ax1에의 결합을 억제시켰고, 마우스 Gas6과는 경쟁하지 않았다는 것을 입증하였다.
- [0561] 실시예 16: 1H12 및 시판용 항체를 이용한 AXL 검출 비교
- [0562] MAb 1H12를 이용하여 Ax1을 검출하기 위해 면역조직화학법 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.
- [0563] Ax1+ 모체 MDA-MB-231 세포 또는 Ax1- MDA-MB-231shAx12 세포를 사용하여 제조된 세포 펠릿으로부터의 FFPE 절편 상에서 MAb 1H12, 폴리클로날 AF154 및 모노클로날 MAB154를 이용하여 염색시켰다 (도 17a). Ax1-표적화 shRNA를 발현하는 레트로바이러스 구축물을 사용하였을 때, MDA-MB-231 shAx12 세포주는 Ax1 발현 너 다운을 보였고; 이를 통해 세포 중 ~10%가 Ax1+ 그대로 유지된, 혼합형 집단을 얻었다.
- [0564] MAb 1H12를 이용하여 Ax1+ 세포를 염색하였을 때, 가장 우수한 염색은 1 μ g/ml 농도에서 달성된 반면 (세포막의 염색은 높은 점수의 양성이고, 세포질 염색은 약하거나, 또는 염색되지 않음), Ax1- 세포는 대부분 음성 염색을 보였으며, 흩어져 있는 단일 세포에서 일부 발현되었다. 유세포 분석법 결과, 세포 중 대략 90%가 레트로바이러스 shRNA 구축물을 보유한 것으로 나타났는 바, 단리된 Ax1-발현 세포의 존재는 관찰된 MDA-MB-231shAx12의 순도와 일치하였다. 1:6,400 (0.03125 μ g/ml 0.03125 μ g/mL) 희석률로 AF154를 이용하여 비교 염색한 결과, 막 염색이 다소 강력하게 이루어졌다는 것이 입증되었다. 그러나, 강력한 염색은 흩어져 있는 집단 중 Ax1- 세포에서도 관찰되었으며, 대부분의 세포에 일부는 더 약한 발현을 보였다.
- [0565] MAB154로 염색하였을 때, 유사 농도에서 Ax1+ 세포 상의 MAb 1H12보다 성능이 더 약한 것으로 입증되었다. 그러나, MAb 1H12 및 AF154, 둘 모두와 비교하였을 때, Ax1- 집단 중 더 적은 수의 세포가 약하게 염색되었다. 이는 1H12가 IHC에서 AF154 및 MAB154와 비교하였을 때, 개선된 결과를 가져온다는 것을 시사한다.
- [0566] MAb 1H12, AF154 및 MAB154를 이용하여 Ax1+ 및 Ax1- 세포 용해물의 웨스턴 블롯 분석에 의해 유사 비교를 수행하였다 (도 17b). 권고 및 시각화 목적으로 3가지 항체 모두 1 μ g/ml 농도로 사용하였다. 이들 모두 Ax1+ 세포 용해물 중 140 kDa의 Ax1의 단백질 밴드를 보였다. 그러나, 비록 일부 약한 배경 염색이 검출되기는 하였지만, 상기 밴드는 AF154를 이용한 경우에는 Ax1- 용해물 중에서 거의 검출되지 않았으며, 이는 2015년 아메드 (Ahmed) 등의 이전 연구에서 언급된 바와 같이, 다른 단백질에 대한 그의 반응은 수준이 낮다는 것을 시사한다. MAb 1H12를 이용한 블롯은 일관되게 MAB154를 이용하였을 때 관찰된 것보다 더욱 강력하였다. 본 결과로부터 본 발명자들은 MAb 1H12가 웨스턴 블롯에서 AF154 및 MAB154보다 유의적으로 더욱 잘 수행한다는 결론을 얻었다.

[0567] 서열

서열 번호: 1 [VII 도메인 (nt)]

GAGGTGAAGCTGGTGAATCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATGGCATGTCTTGGGTTGCGCA
GACTCCAGACAAGAGGCTGGAGTGGGTCGCAACCATTAGTAGTGGTGGTAGTTACACC
TACTATCCAGACAGTGTGAAGGGGCGATTCAACATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACA
CCCTGTACCTGCAAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCA
AGACATCCCATCTACTATACTTACGACGATACTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTC
AGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCC

서열 번호: 2 [VL 도메인 (nt)]

GACATTGTGCTGACCAATCTCCAGCAATCATGGCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCA
CCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCTGGTAACTTTCACTGGTACCAGCAG
AAGCCAGGCACTTCTCCAACTCTGGATTTATAGGACATCCAACCTGGCTTCTGGAGT
CCCCGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTTACAATCAGCAGC
ATGGAGGCCGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTGGTTACCCGTGGA
CGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATC
C

서열 번호: 3 [VII 도메인 (aa)]

EVKLVESSGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWVATISSGGSYTY
PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHPIYYTYDDTMDYWGQGTSTV
SS

서열 번호: 4 [VL 도메인 (aa)]

DIVLTQSPAIMAASPGKVTMTCSASSSVSSGNFHWYQQKPGTSPKLWIYRTSNLASGVPA
RFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYCQQWSGYPWTFGGGTKLEIK

서열 번호: 5 [중쇄 CDR1]

GFTFSSYGMS

서열 번호: 6 [중쇄 CDR2]

TISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNA

서열 번호: 7 [중쇄 CDR3]

HPIYYTYDDTMDY

[0568]

서열 번호: 8 [경쇄 CDR1]

SASSSVSSGNFH

서열 번호: 9 [경쇄 CDR2]

RTSNLAS

서열 번호: 10 [경쇄 CDR3]

QQWSGYPWT

서열 번호: 11 [중쇄 FR1]

EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSAAS

서열 번호: 12 [중쇄 FR2]

WVRQTPDKRLEWVA

서열 번호: 13 [중쇄 FR3]

KNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCAR

서열 번호: 14 [중쇄 FR4]

WGQGTSTVSS

서열 번호: 15 [경쇄 FR1]

DIVLTQSPAIMAASPGKVTMTC

서열 번호: 16 [경쇄 FR2]

WYQQKPGTSPKLWIY

서열 번호: 17 [경쇄 FR3]

GVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC

서열 번호: 18 [경쇄 FR4]

FGGGTKLEIK

서열 번호: 19 [인간 Ax1]

MAWRCPRMGRVPLAWCLALCGWACMAPRGTQAEESPFVGNPGNITGARGLTGTLRCQL
QVQGEPPEVHWLRDQGILELADSTQTQVPLGEDEQDDWIVVSQLRITSLQLSDTGQYQCL

[0569]

VFLGHQTFVSQPGYVGLGLELPYFLEEPEDRTVAANTPFNLSCQAQGPPEPVDLLWLQDAV
 PLATAPGHGPPQRSRLHVPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSTRTATITVLPQQPRNLHLVSRQPT
 ELEVAWTPGLSGIYPLTHCTLQAVLSDDGMGIQAGEPDPEEPLTSQASVPPHQLRLGSLH
 PHTPYHIRVACTSSQGPSSWTHWLPVETPEGVPLGPPENISATRNGSQAFVHWQEPRAPL
 QGTLLGYRLAYQQGDTPEVLMDIGLRQEVTLELQGDGSVSNLTVCAAYTAAGDGPWSLP
 VPLEAWRPGQAQPVHQLVKEPSTPAFSWPWWYVLLGAVVAAACVLILALFLVHRRKKETR
 YGEVFPTVERGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKT
 LGEGEFGAVMEGQLNQDSSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGV
 CFQGSERESFPAPVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVLPTQMLVKFMADIASGMEYLS
 TKRFIHRDLAARNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVY
 TSKSDVWSFGVTMWEIATRGTPTYPGVENSEIYDYLRRGNRLKQPADCLDGLYALMSRC
 WELNPQDRPSFTELREDLENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGGYPEPPGAAGGADPPTQ
 PDPKDCSCSLTAAEVHPAGRYVLCPTTSPAQPADRGSPAAPGQEDGA

서열 번호: 20 [류린 Ax1]

MGRVPLAWWLALCCWGCAAHKDTQTEAGSPFVGNPGNITGARGLTGTLRCELQVQGEPP
 EVVWLRDGGQILELADNTQTQVPLGEDWQDEWKVVSQRLISALQLSDAGEYQCMVHLEGRT
 FVSQPGFVGLGLELPYFLEEPEDKAVPANTPFNLSCQAQGPPEPVTLLWLQDAVPLAPVTGH
 SSQHSLSQTPGLNKTSSFSCEAHNAKGVTTSTRTATITVLPQRPHHLHVSRQPTTELEVAWTP
 GLSGIYPLTHCNLQAVLSDDGVGIWLGKSDPPEDPLTLQVSVPPHQLRLEKLLPHTPYHIRIS
 CSSSQGPSPWTHWLPVETTEGVPLGPPENVSAMRNGSQVLVRWQEPVRPLQGTLLGYRL
 AYRGQDTPEVLMDIGLTREVTLELRGDRPVANLTVSVTAYTSAGDGPWSLPVPLEPWRPG
 QGQPLHHLVSEPPPPRAFSWPWWYVLLGALVAAACVLILALFLVHRRKKETRYGEVFPTVE
 RGELVVRYRVRKSYSRRTEATLNSLGISEELKEKLRDVMVDRHKVALGKTLGEGEFGAVM
 EGQLNQDSSILKVAVKTMKIAICTRSELEDFLSEAVCMKEFDHPNVMRLIGVCFQGSREGF
 PEPVILPFMKHGDLSFLLYSRLGDQPVLPTQMLVKFMADIASGMEYLSKRFIHRDLAA
 RNCMLNENMSVCVADFGLSKKIYNGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWSFG
 VTMWEIATRGTPTYPGVENSEIYDYLRRGNRLKQPDCLDGLYALMSRCWELNPRDRPSF
 AELREDLENTLKALPPAQEPDEILYVNMDEGGSHLEPRGAAGGADPPTQDPKDCSCSLTA
 ADVHSAGRYVLCPTAPGPTLSADRGCAPPGQEDGA

서열 번호: 21 [인간 Tyro3]

MALRRSMGRGPLPLPLPPPPRLGLLLAALASLLLPEAAAAGLKLGMGAPVKLTVSQGPVK
 LNCSVEGMEEPDIQWVKDGAQQVQLDQLYIPVSEQHWIGFLSLKSVERSDAGRYWCQVED
 GGETEISQPVWLTVEGVPPFTVEPKDLAVPPNAPFQLSCEAVGPPPEPVTIVWWRGTTKIGG
 PAPSPSVLNVGTQSTMFSCAHLNKLGLASSRTATVHLQALPAAPFNITVTKLSSSNASVA
 WMPGADGRALLQSCVTQVQAPGGWEVLAVVVPVPFTCLLRDLVPATNYSRLVRCANAL

[0570]

GPSPYADWVPFQTKGLAPASAPQNLHAIRTD SGLILEWEEVIPEAPLEGPLGPYKLSWVQD
 NGTQDELTVETRANLTGWDPQKDLIVRVCVSNVAVGCGPWSQPLVVSSHDRAGQQGPPH
 SRTSWVPVVLGVLTAALVTAALALILLRKRKTRFGQAFDSVMARGEPAVHFRAARSFNR
 ERPERIEATLDSLGISDELKEKLEDVLIPEQQFTLGRMLGKGEFGSVREAQLKQEDGSFVKV
 AVKMLKADIIASSDIEEFLREAACMKEDHHPHVAKLVGVSLRSRAKGRPLIPMVILPFMKHGD
 LHAFLLASRIGENPFNLPLQTLIRFMVDIACGMEYLSSRNFIHRDLAARNCMLAEDMTVCVA
 DFGLSRKIYSGDYRQGCASKLPVKWLALLESADNLYTVQSDVWAFGVTMWEIMTRGQTP
 YAGIENAEIYNLIGGNRLKQPPECMEDVYDLMYQCWSADPKQRPSFTCLRMELNIGQL
 SVLSASQDPLYINIERAEPTAGGSLELPGRDQPYSGAGDGSGMGAVGGTPSDCRYILTPG
 GLAEQPGQAEHQPE SPLNETQRLLLLQQGLLPHSSC

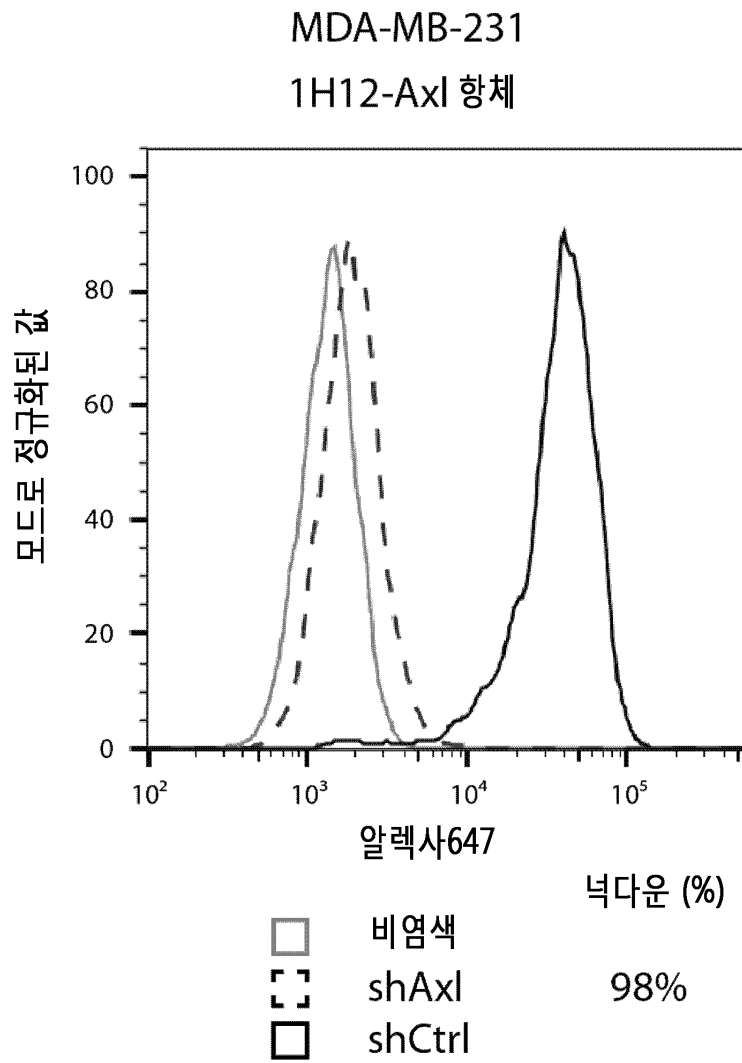
서열 번호: 22 [인간 Mer]

MKINNEEIVSDPIYIEVQGLPHFTKQPESMNVTRNTAFNLTCQAVGPPEPVNIFWVQNSSRV
 NEQPEKSPSVLTVPLTEMAVFSCEAHNDKGLTVSKGVQINIKAIKPSPTTEVSIRNSTAHSILI
 SWVPGFDGYSPFRNCISQVKEADPLSNGSVMIFNTSALPHLYQIKQLQALANYSIGVSCMN
 EIGWSAVSPWILASTTEGAPSVAPLNVTVFLNESSDNVDIRWMKPPTKQQDGELVGYRISH
 VWQSAGISKELLEEVGQNGSRARISVQVHNATCTVRIAAVTGGVGPFSFDPVKIFIPAHGW
 VDYAPSSTPAPGNADPVLIFGCFGFI GLVLYISLAIRKRVQETKFGNAFTEEDSELVNYI
 AKKSFCRRRAIELTLHSLGVSEELQNKLEDVVIDRNLLILGKILGEGEFGSVMEGNLKQEDGTS
 LKVAVKTMKLDNSSQREIEEFLSEAACMKDFSHPNVIRLLGVCIEMSSQGIPKPMVILPFMKY
 GDLHTYLLYSRLETGPKHIPLQTLKFMVDIALGMEYLSNRNFIHRDLAARNCMLRDDMTVC
 VADFGLSKKIYSGDYRQGRIAKMPVKWIAIESLADRVYTSKSDVWAFGVTMWEIATRGMT
 PYPGVQNHMYDYLLHGHRLKQPEDCLDELYEIMYSCWRTDPLDRPTFSVLRQLQEKLLS
 LPDVRNQADVIVNTQLLESSEGLAQGSTLAPLDLNDPDSIIASCTPRAAISVVTAEVHDSKP
 HEGRYILNGGSEEWEDLTSAPSAAVTAEKNSVLPGERLVRNGVSWSHSSMLPLGSSLPDE
 LLFADDSSEGSEVLM

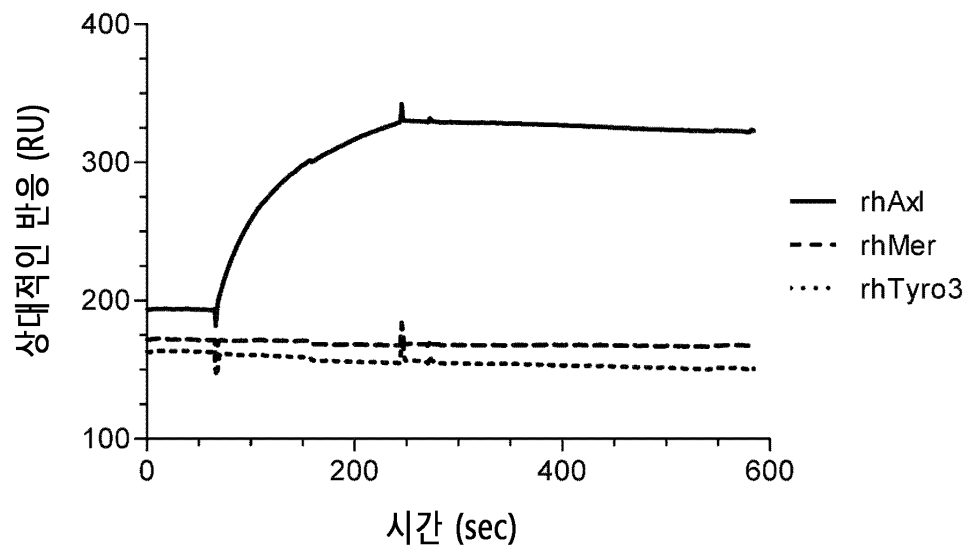
[0571]

도면

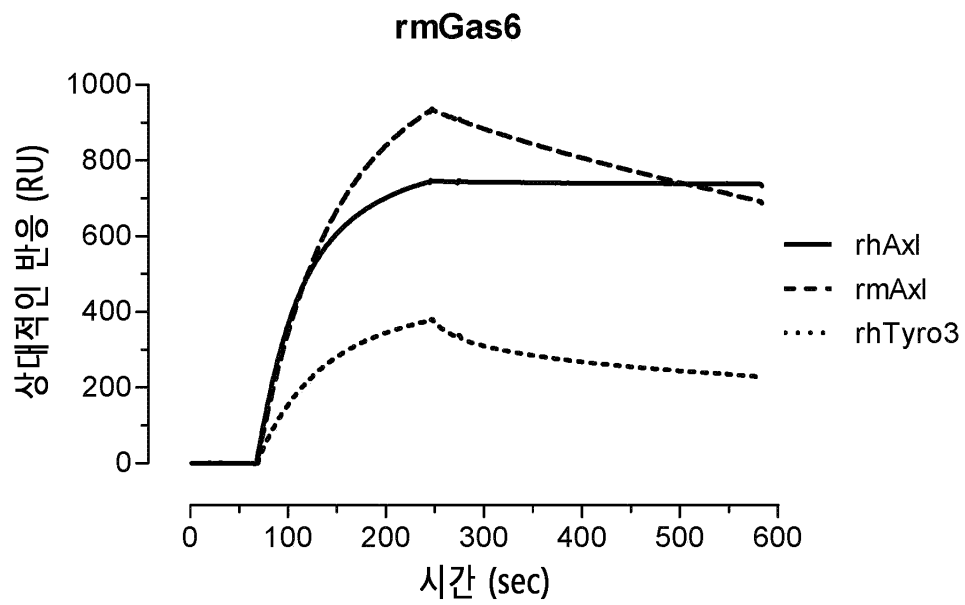
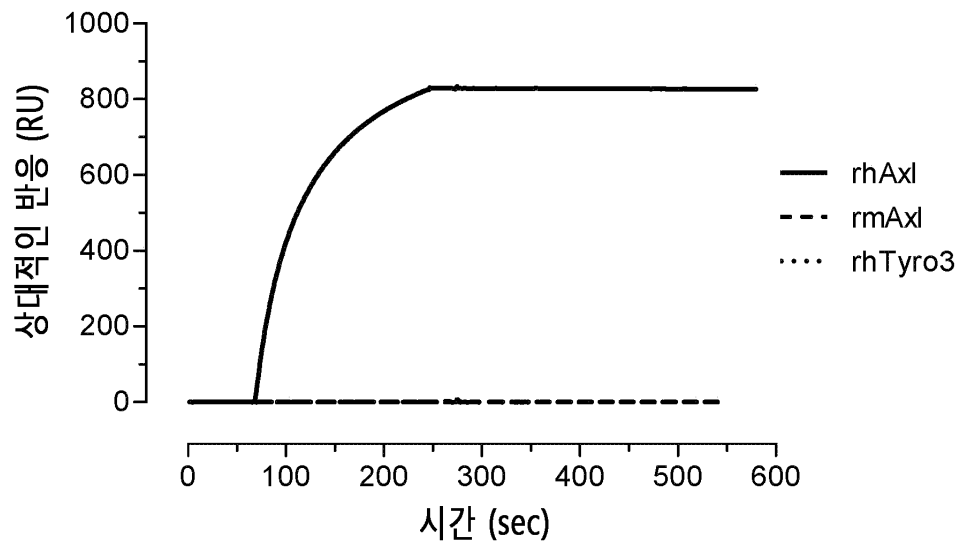
도면1



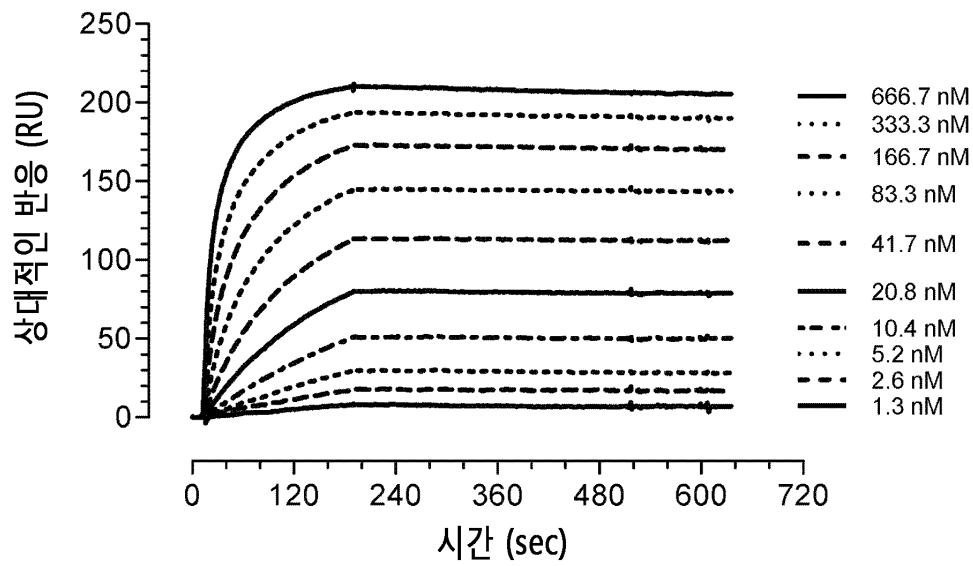
도면2



도면3

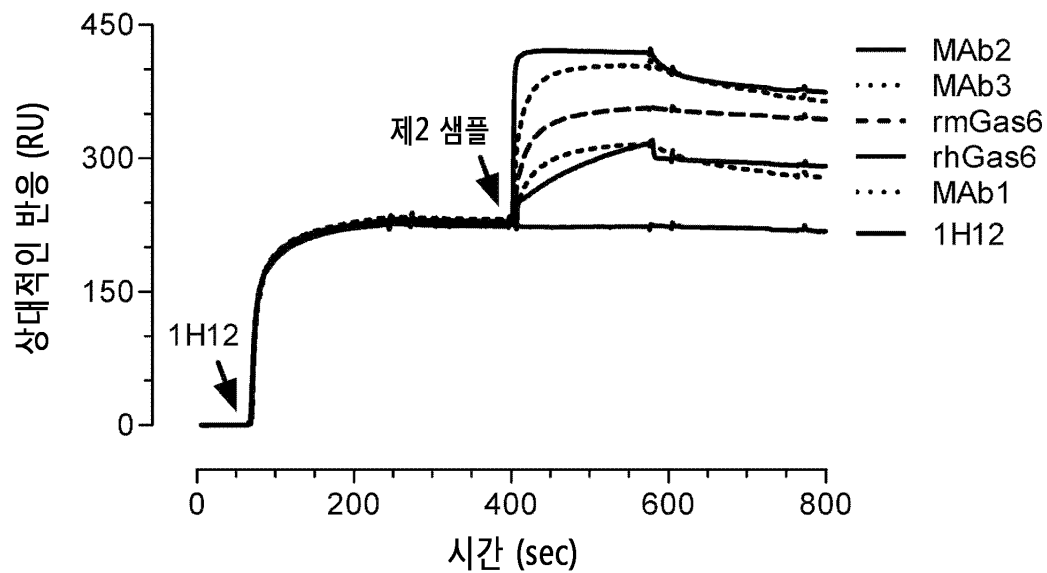


도면4

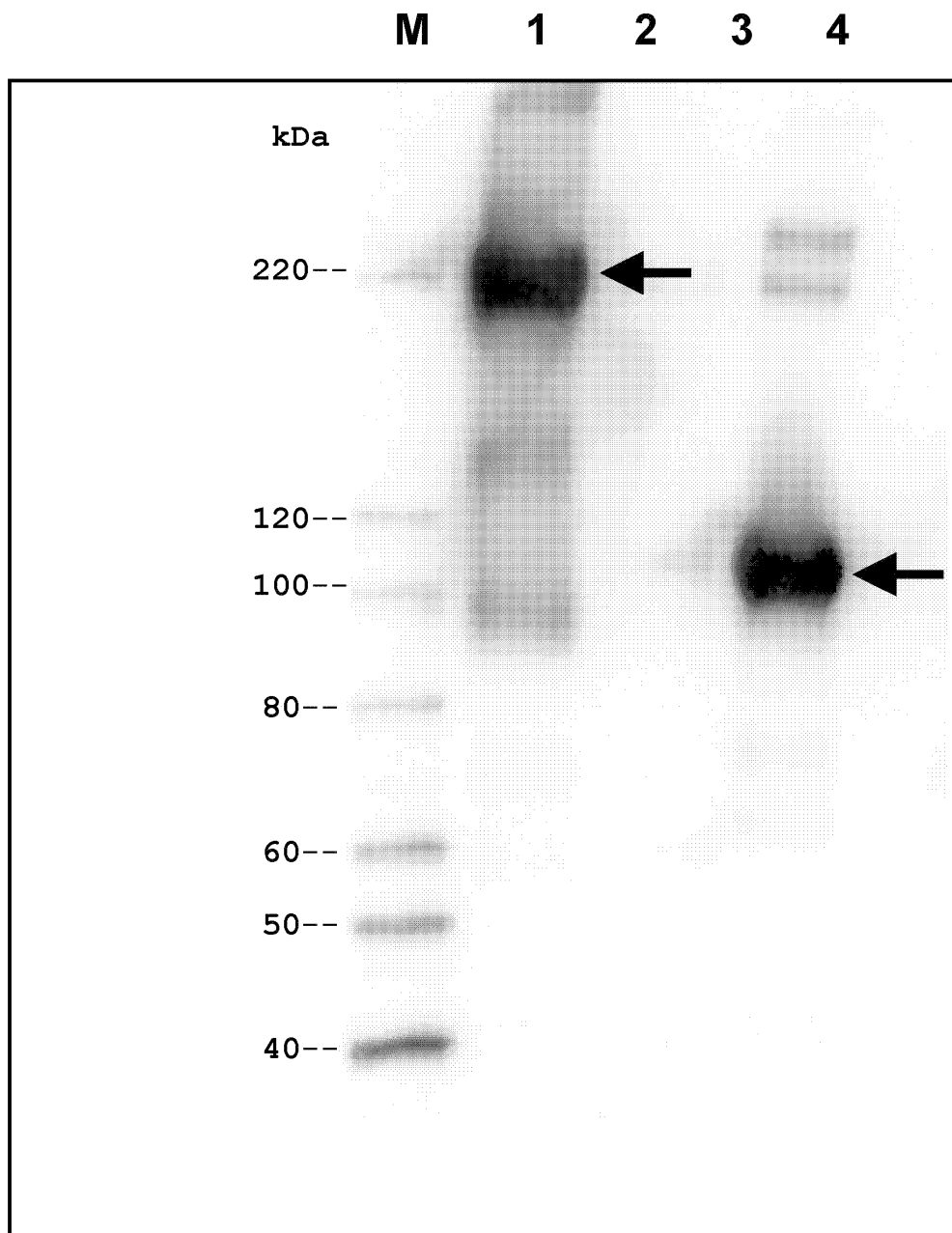


MAb	온-속도 (k_{on} ; $M^{-1}s^{-1}$)	오프-속도 (k_{off} ; s^{-1})	K_D (M)	반감기 ($t_{1/2}$; hr)
1H12	2.14×10^5	1.07×10^{-5}	4.98×10^{-11}	18.0

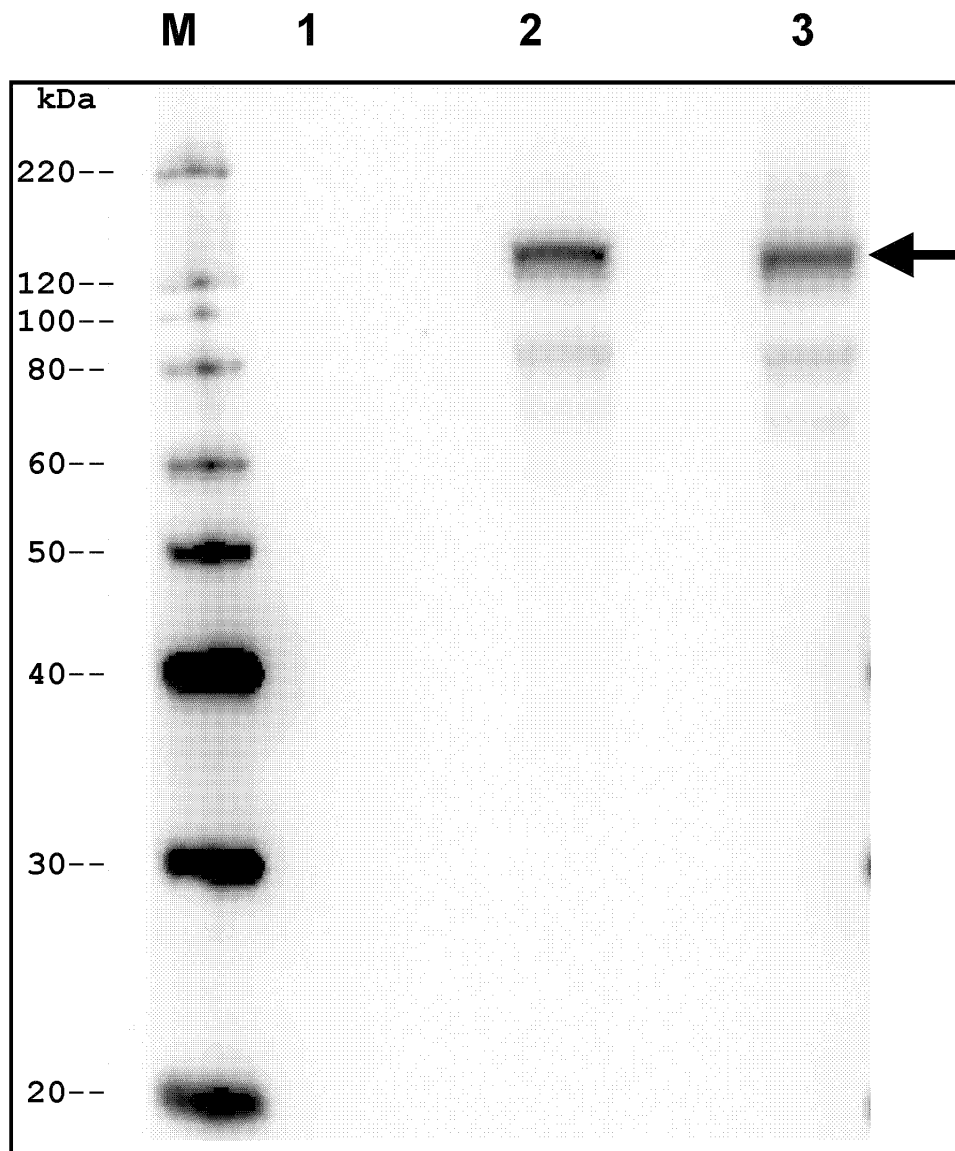
도면5



도면6



도면7



도면8

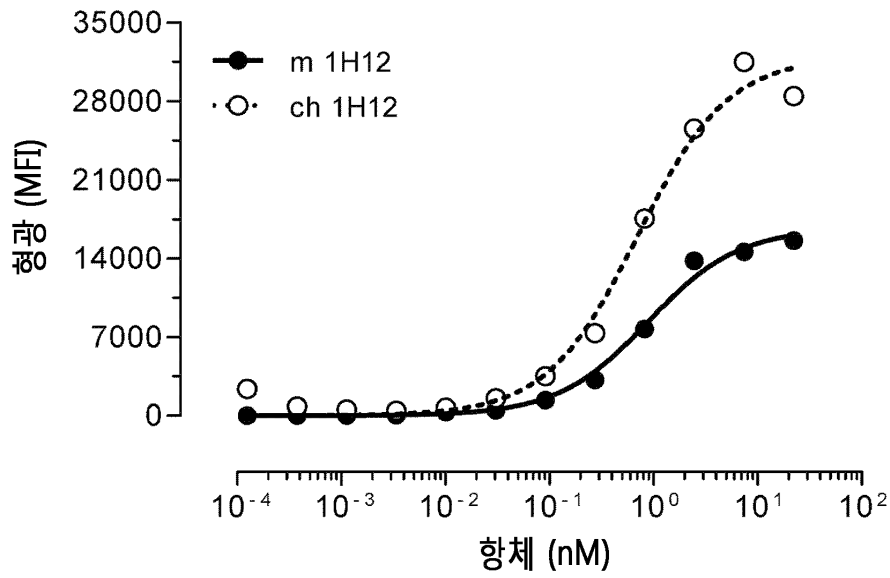
VH5 C9-3

EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYGMSWVRQTPDKRLEWWATISSGGSYTTY
PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHPIYYTYDDTMDYWGQGTSVTV
SS

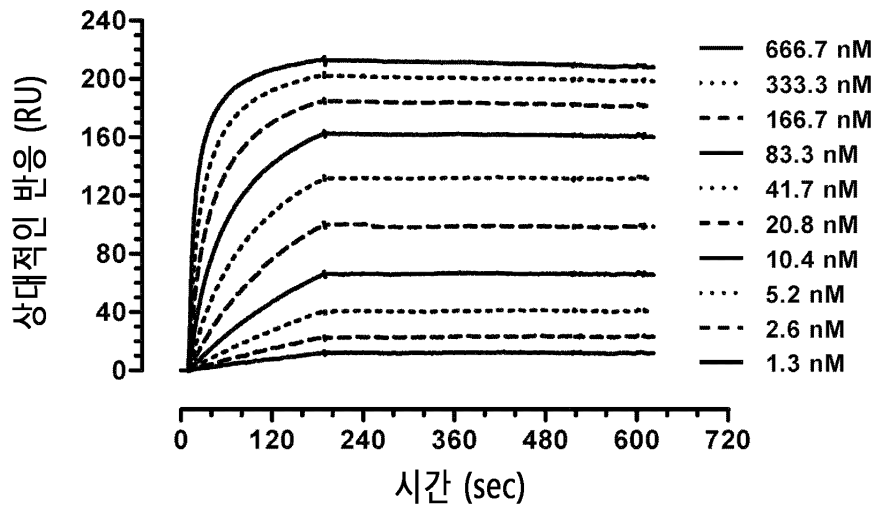
Vκ4 G4-1

DIVLTQSPAIMAASPGEKVTMTCSASSSVSSGNFHWYQQKPGTSPKLWIYRTSNLASGVPA
RFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSGYPWTFGGGTKLEIK

도면9

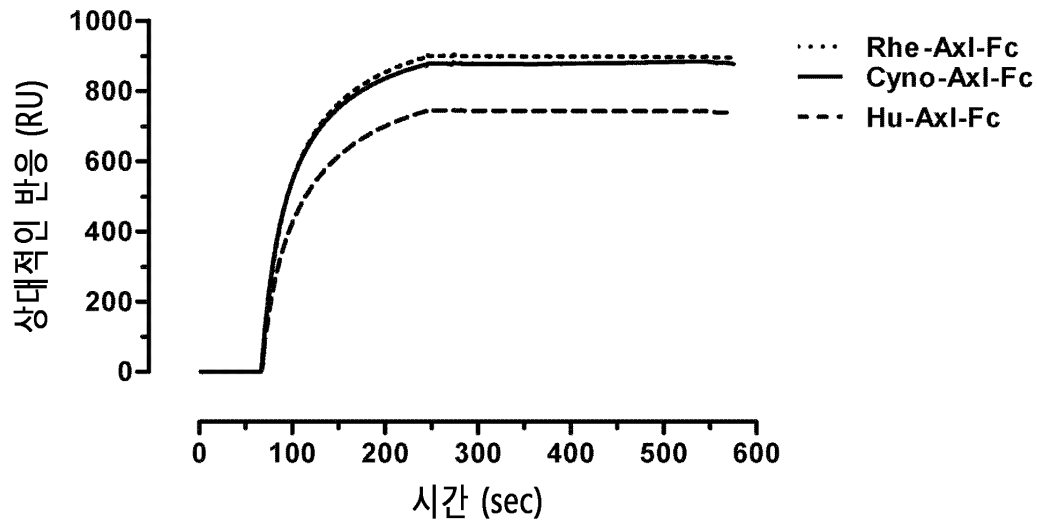


도면10

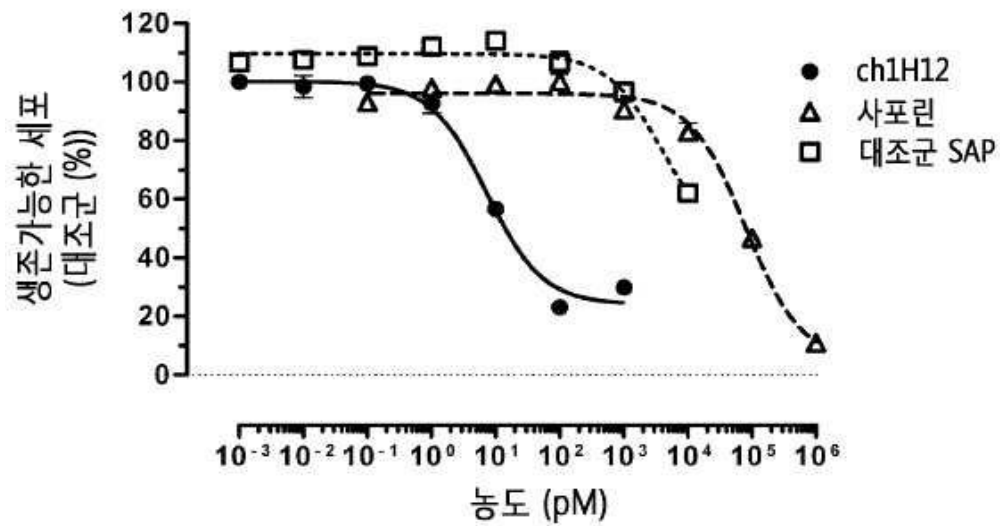


MAb	온-속도 (k_{on} ; $M^{-1}s^{-1}$)	오프-속도 (k_{off} ; s^{-1})	K_D (M)	반감기 ($t_{1/2}$; hr)
ch1H12	2.71×10^5	2.99×10^{-6}	1.10×10^{-11}	64.39

도면11

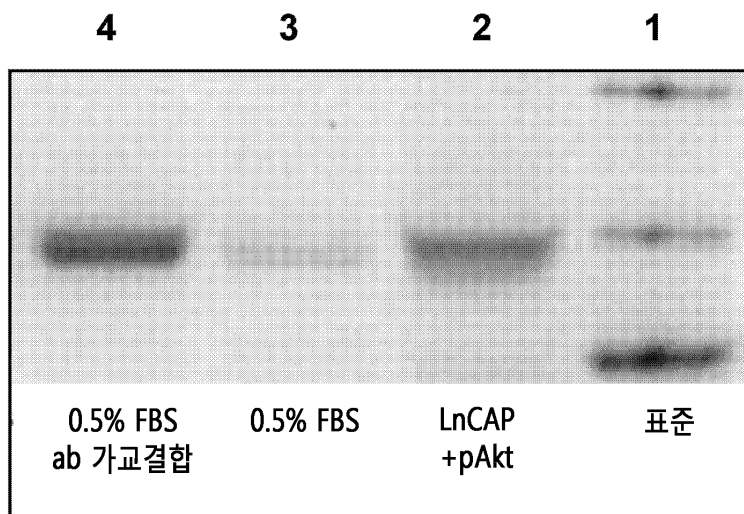


도면12

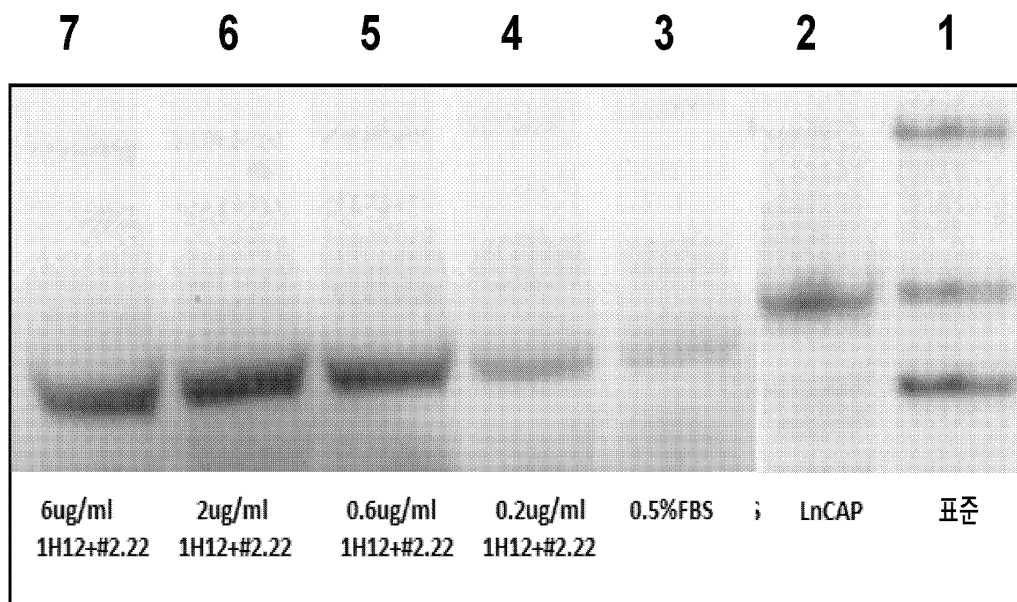


	ch1H12	사포린	대조군 SAP
EC_{50} (pM)	7.22	79,763.00	4,081.00

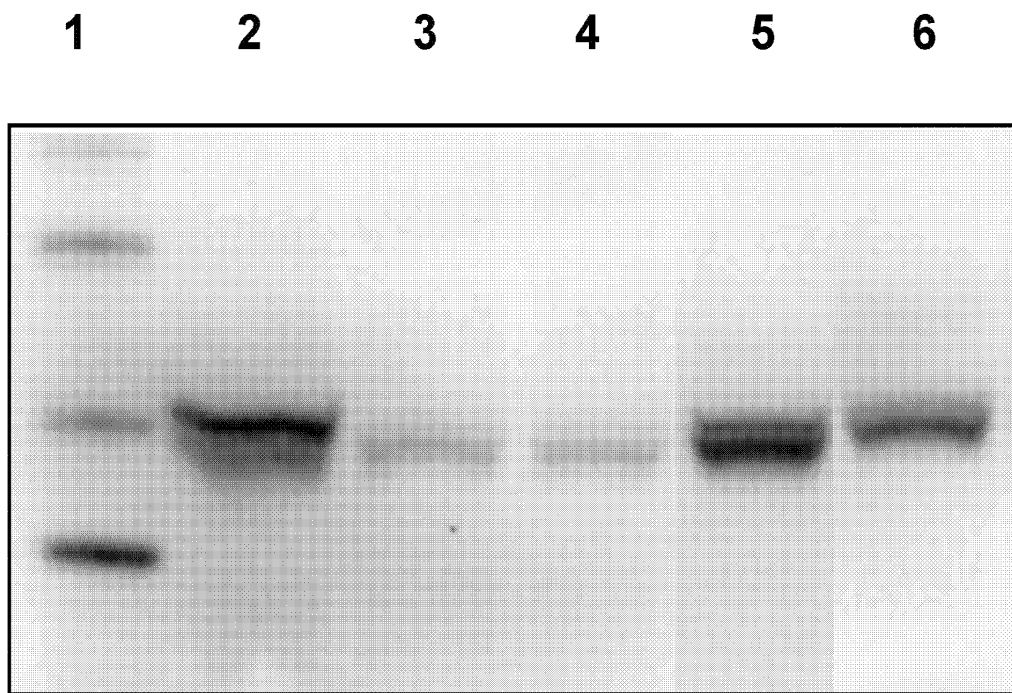
도면13



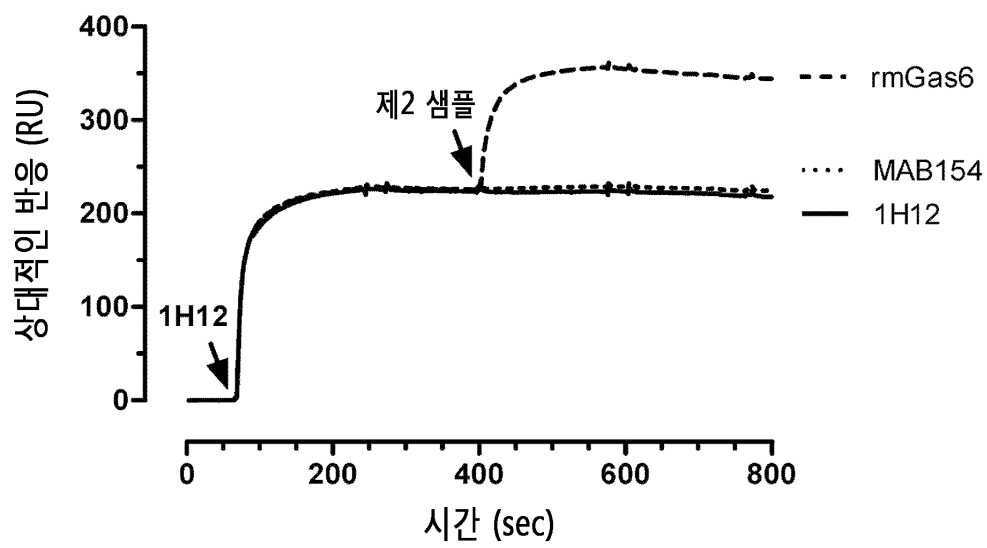
도면14



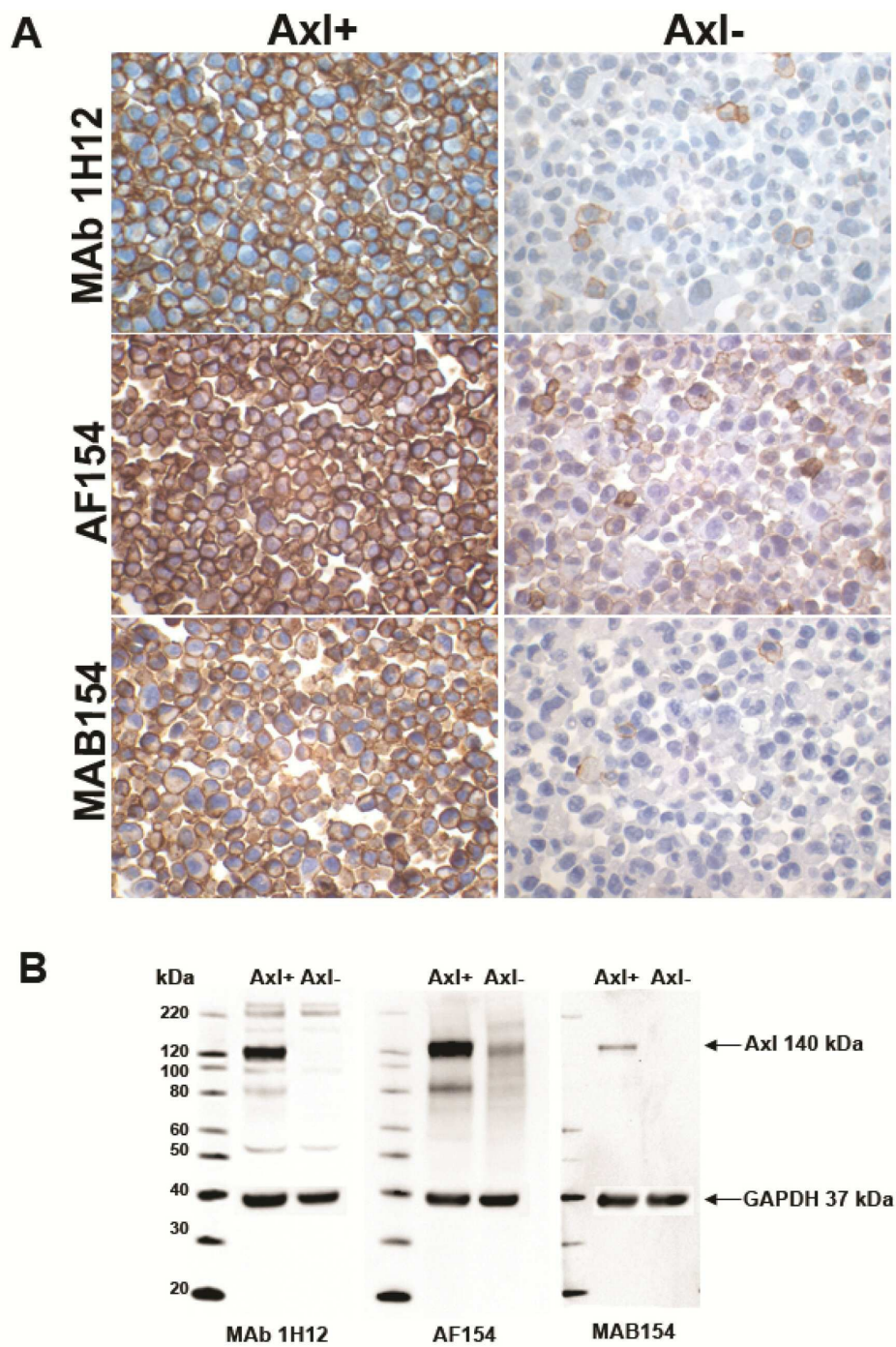
도면15



도면16



도면17



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> BerGenBio AS

<120> Anti-Axl Antibodies

<130> IPA161646-GB

<150> GB 1410826.0

<151> 2014-06-18

<160> 22

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 381

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

gaggtgaagc tggctggaatc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact	120
ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtagtg gtggtagtta cacctactat	180
ccagacagtg tgaaggggcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagacatccc	300
atctactata cttacgacga tactatggac tactggggtc aaggaacctc agtcaccgtc	360
tcctcagcca aaacgacacc c	381

<210> 2

<211> 351

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

gacattgtgc tgaccaatc tccagcaatc atggctgcat ctccaggga gaaggtcacc	60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaatg tctggtaact ttacttgta ccagcagaag	120
ccaggcaatt ctcccaact ctggatttat aggacatcca acctggcttc tggagtcacc	180
gctcgttca gtggcagtg gtctgggacc tcttactctc ttacaatcag cagcatggag	240
gccgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagtg gttaccctg gacgttcggt	300
ggaggcacca agctggaaat caaacgggct gatgctgcac caactgtatc c	351

<210> 3

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly

1	5	10	15
---	---	----	----

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

20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Arg His Pro Ile Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Thr Met Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Gly
20 25 30

Asn Phe His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

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

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser

1 5 10

<210> 6

<211> 26

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

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

1 5 10 15

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala

20 25

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

His Pro Ile Tyr Tyr Thr Tyr Asp Asp Thr Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Gly Asn Phe His

1 5 10

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Trp Thr

1 5

<210> 11

<211> 25

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 11

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala

1 5 10

<210> 13

<211> 23

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 13

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr

1 5 10 15

Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg

20

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 14

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 15

<211> 23

<

212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 15

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys

20

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 16

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 17

<211> 32

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser

1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 18
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 18

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 19
<211> 894
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 19

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

Leu Ala Leu Cys Gly Trp Ala Cys Met Ala Pro Arg Gly Thr Gln Ala
20 25 30

Glu Glu Ser Pro Phe Val Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg
35 40 45

Gly Leu Thr Gly Thr Leu Arg Cys Gln Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro
50 55 60

Pro Glu Val His Trp Leu Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp
65 70 75 80

Ser Thr Gln Thr Gln Val Pro Leu Gly Glu Asp Glu Gln Asp Asp Trp
85 90 95

Ile Val Val Ser Gln Leu Arg Ile Thr Ser Leu Gln Leu Ser Asp Thr
100 105 110

Gly Gln Tyr Gln Cys Leu Val Phe Leu Gly His Gln Thr Phe Val Ser
115 120 125

Gln Pro Gly Tyr Val Gly Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu
130 135 140

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

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu
210 215 220
Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu
225 230 235 240
Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
245 250 255
His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln
260 265 270

Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser
275 280 285
Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro
290 295 300
Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp
305 310 315 320
Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
325 330 335

Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
340 345 350
Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
355 360 365
Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
370 375 380
Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser

385 390 395 400
 Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro
 405 410 415
 Trp Ser Leu Pro Val Pro Leu Glu Ala Trp Arg Pro Gly Gln Ala Gln
 420 425 430
 Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
 435 440 445
 Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val
 450 455 460

 Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg
 465 470 475 480
 Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val
 485 490 495
 Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr
 500 505 510
 Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp
 515 520 525

 Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu
 530 535 540
 Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser
 545 550 555 560
 Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg
 565 570 575
 Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe
 580 585 590

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

Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile
645 650 655

Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp
660 665 670

Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val
675 680 685

Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg
690 695 700

Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser
705 710 715 720

Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
725 730 735

Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly
740 745 750

Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Arg Gly Asn Arg Leu
755 760 765

Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg
770 775 780

Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
785 790 795 800

Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
805 810 815

Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
820 825 830

Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro
835 840 845

Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
850 855 860

Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
865 870 875 880

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

885

890

<210> 20

<211> 888

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Trp Leu Ala Leu Cys Cys Trp Gly

1 5 10 15
Cys Ala Ala His Lys Asp Thr Gln Thr Glu Ala Gly Ser Pro Phe Val

20 25 30
Gly Asn Pro Gly Asn Ile Thr Gly Ala Arg Gly Leu Thr Gly Thr Leu

35 40 45
Arg Cys Glu Leu Gln Val Gln Gly Glu Pro Pro Glu Val Val Trp Leu

50 55 60
Arg Asp Gly Gln Ile Leu Glu Leu Ala Asp Asn Thr Gln Thr Gln Val

65 70 75 80
Pro Leu Gly Glu Asp Trp Gln Asp Glu Trp Lys Val Val Ser Gln Leu

85 90 95
Arg Ile Ser Ala Leu Gln Leu Ser Asp Ala Gly Glu Tyr Gln Cys Met

100 105 110
Val His Leu Glu Gly Arg Thr Phe Val Ser Gln Pro Gly Phe Val Gly

115 120 125
Leu Glu Gly Leu Pro Tyr Phe Leu Glu Glu Pro Glu Asp Lys Ala Val

130 135 140
Pro Ala Asn Thr Pro Phe Asn Leu Ser Cys Gln Ala Gln Gly Pro Pro

145 150 155 160
Glu Pro Val Thr Leu Leu Trp Leu Gln Asp Ala Val Pro Leu Ala Pro

165 170 175
Val Thr Gly His Ser Ser Gln His Ser Leu Gln Thr Pro Gly Leu Asn

180 185 190
Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Ala Lys Gly Val Thr

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

 260 265 270
 Pro Glu Asp Pro Leu Thr Leu Gln Val Ser Val Pro Pro His Gln Leu
 275 280 285
 Arg Leu Glu Lys Leu Leu Pro His Thr Pro Tyr His Ile Arg Ile Ser
 290 295 300
 Cys Ser Ser Ser Gln Gly Pro Ser Pro Trp Thr His Trp Leu Pro Val
 305 310 315 320
 Glu Thr Thr Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro Pro Glu Asn Val Ser Ala

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

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

Leu Gly Ala Leu Val Ala Ala Ala Cys Val Leu Ile Leu Ala Leu Phe

450 455 460

Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg Tyr Gly Glu Val Phe Glu

465 470 475 480

Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val Arg Tyr Arg Val Arg Lys

485 490 495

Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gly Ile

500 505 510

Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp Val Met Val Asp Arg His

515 520 525

Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ala Val

530 535 540

Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser Ile Leu Lys Val Ala Val

545 550 555 560

Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg Ser Glu Leu Glu Asp Phe

565 570 575

Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe Asp His Pro Asn Val Met

580 585 590

Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser Asp Arg Glu Gly Phe Pro

595 600 605

Glu Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His Gly Asp Leu His Ser

610 615 620

Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln Pro Val Phe Leu Pro Thr

625 630 635 640

Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile Ala Ser Gly Met Glu Tyr

645 650 655

Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys

660 665 670

Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser

675 680 685

Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys

690 695 700
Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr

705 710 715 720
Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile

725 730 735
Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly Val Glu Asn Ser Glu Ile

740 745 750
Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu Lys Gln Pro Val Asp Cys

755 760 765
Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg Cys Trp Glu Leu Asn Pro

770 775 780
Arg Asp Arg Pro Ser Phe Ala Glu Leu Arg Glu Asp Leu Glu Asn Thr

785 790 795 800
Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro Asp Glu Ile Leu Tyr Val

805 810 815
Asn Met Asp Glu Gly Gly Ser His Leu Glu Pro Arg Gly Ala Ala Gly

820 825 830
Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro Lys Asp Ser Cys Ser Cys

835 840 845
Leu Thr Ala Ala Asp Val His Ser Ala Gly Arg Tyr Val Leu Cys Pro

850 855 860
Ser Thr Ala Pro Gly Pro Thr Leu Ser Ala Asp Arg Gly Cys Pro Ala

865 870 875 880
Pro Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala

885

<210> 21

<211> 890

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Ala Leu Arg Arg Ser Met Gly Arg Pro Gly Leu Pro Pro Leu Pro

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

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

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

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

Ser Cys Thr Val Gln Val Thr Gln Ala Pro Gly Gly Trp Glu Val Leu

260 265 270

Ala Val Val Val Pro Val Pro Pro Phe Thr Cys Leu Leu Arg Asp Leu

275 280 285

Val Pro Ala Thr Asn Tyr Ser Leu Arg Val Arg Cys Ala Asn Ala Leu

290 295 300

Gly Pro Ser Pro Tyr Ala Asp Trp Val Pro Phe Gln Thr Lys Gly Leu

305 310 315 320

Ala Pro Ala Ser Ala Pro Gln Asn Leu His Ala Ile Arg Thr Asp Ser

325 330 335

Gly Leu Ile Leu Glu Trp Glu Glu Val Ile Pro Glu Ala Pro Leu Glu

340 345 350

Gly Pro Leu Gly Pro Tyr Lys Leu Ser Trp Val Gln Asp Asn Gly Thr

355 360 365

Gln Asp Glu Leu Thr Val Glu Gly Thr Arg Ala Asn Leu Thr Gly Trp

370 375 380

Asp Pro Gln Lys Asp Leu Ile Val Arg Val Cys Val Ser Asn Ala Val

385 390 395 400

Gly Cys Gly Pro Trp Ser Gln Pro Leu Val Val Ser Ser His Asp Arg

405 410 415

Ala Gly Gln Gln Gly Pro Pro His Ser Arg Thr Ser Trp Val Pro Val

420 425 430

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

435 440 445

Ile Leu Leu Arg Lys Arg Arg Lys Glu Thr Arg Phe Gly Gln Ala Phe

450 455 460

Asp Ser Val Met Ala Arg Gly Glu Pro Ala Val His Phe Arg Ala Ala

465 470 475 480

Arg Ser Phe Asn Arg Glu Arg Pro Glu Arg Ile Glu Ala Thr Leu Asp

485 490 495

Ser Leu Gly Ile Ser Asp Glu Leu Lys Glu Lys Leu Glu Asp Val Leu

500 505 510
Ile Pro Glu Gln Gln Phe Thr Leu Gly Arg Met Leu Gly Lys Gly Glu

515 520 525
Phe Gly Ser Val Arg Glu Ala Gln Leu Lys Gln Glu Asp Gly Ser Phe

530 535 540
Val Lys Val Ala Val Lys Met Leu Lys Ala Asp Ile Ile Ala Ser Ser

545 550 555 560
Asp Ile Glu Glu Phe Leu Arg Glu Ala Ala Cys Met Lys Glu Phe Asp

565 570 575
His Pro His Val Ala Lys Leu Val Gly Val Ser Leu Arg Ser Arg Ala

580 585 590
Lys Gly Arg Leu Pro Ile Pro Met Val Ile Leu Pro Phe Met Lys His

595 600 605
Gly Asp Leu His Ala Phe Leu Leu Ala Ser Arg Ile Gly Glu Asn Pro

610 615 620
Phe Asn Leu Pro Leu Gln Thr Leu Ile Arg Phe Met Val Asp Ile Ala

625 630 635 640
Cys Gly Met Glu Tyr Leu Ser Ser Arg Asn Phe Ile His Arg Asp Leu

645 650 655
Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Ala Glu Asp Met Thr Val Cys Val Ala

660 665 670
Asp Phe Gly Leu Ser Arg Lys Ile Tyr Ser Gly Asp Tyr Tyr Arg Gln

675 680 685
Gly Cys Ala Ser Lys Leu Pro Val Lys Trp Leu Ala Leu Glu Ser Leu

690 695 700
Ala Asp Asn Leu Tyr Thr Val Gln Ser Asp Val Trp Ala Phe Gly Val

705 710 715 720
Thr Met Trp Glu Ile Met Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Ala Gly Ile

725 730 735
Glu Asn Ala Glu Ile Tyr Asn Tyr Leu Ile Gly Gly Asn Arg Leu Lys

740 745 750

Gln Pro Pro Glu Cys Met Glu Asp Val Tyr Asp Leu Met Tyr Gln Cys
755 760 765

Trp Ser Ala Asp Pro Lys Gln Arg Pro Ser Phe Thr Cys Leu Arg Met

770 775 780

Glu Leu Glu Asn Ile Leu Gly Gln Leu Ser Val Leu Ser Ala Ser Gln
785 790 795 800

Asp Pro Leu Tyr Ile Asn Ile Glu Arg Ala Glu Glu Pro Thr Ala Gly
805 810 815

Gly Ser Leu Glu Leu Pro Gly Arg Asp Gln Pro Tyr Ser Gly Ala Gly
820 825 830

Asp Gly Ser Gly Met Gly Ala Val Gly Gly Thr Pro Ser Asp Cys Arg

835 840 845

Tyr Ile Leu Thr Pro Gly Gly Leu Ala Glu Gln Pro Gly Gln Ala Glu
850 855 860

His Gln Pro Glu Ser Pro Leu Asn Glu Thr Gln Arg Leu Leu Leu Leu
865 870 875 880

Gln Gln Gly Leu Leu Pro His Ser Ser Cys
885 890

<210> 22

<211> 823

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Lys Ile Asn Asn Glu Glu Ile Val Ser Asp Pro Ile Tyr Ile Glu

1 5 10 15

Val Gln Gly Leu Pro His Phe Thr Lys Gln Pro Glu Ser Met Asn Val

20 25 30

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

35 40 45

Glu Pro Val Asn Ile Phe Trp Val Gln Asn Ser Ser Arg Val Asn Glu

50 55 60

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

65 70 75 80

Met Ala Val Phe Ser Cys Glu Ala His Asn Asp Lys Gly Leu Thr Val

85 90 95

Ser Lys Gly Val Gln Ile Asn Ile Lys Ala Ile Pro Ser Pro Pro Thr

100 105 110

Glu Val Ser Ile Arg Asn Ser Thr Ala His Ser Ile Leu Ile Ser Trp

115 120 125

Val Pro Gly Phe Asp Gly Tyr Ser Pro Phe Arg Asn Cys Ser Ile Gln

130 135 140

Val Lys Glu Ala Asp Pro Leu Ser Asn Gly Ser Val Met Ile Phe Asn

145 150 155 160

Thr Ser Ala Leu Pro His Leu Tyr Gln Ile Lys Gln Leu Gln Ala Leu

165 170 175

Ala Asn Tyr Ser Ile Gly Val Ser Cys Met Asn Glu Ile Gly Trp Ser

180 185 190

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

195 200 205

Val Ala Pro Leu Asn Val Thr Val Phe Leu Asn Glu Ser Ser Asp Asn

210 215 220

Val Asp Ile Arg Trp Met Lys Pro Pro Thr Lys Gln Gln Asp Gly Glu

225 230 235 240

Leu Val Gly Tyr Arg Ile Ser His Val Trp Gln Ser Ala Gly Ile Ser

245 250 255

Lys Glu Leu Leu Glu Glu Val Gly Gln Asn Gly Ser Arg Ala Arg Ile

260 265 270

Ser Val Gln Val His Asn Ala Thr Cys Thr Val Arg Ile Ala Ala Val

275 280 285

Thr Lys Gly Gly Val Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Lys Ile Phe Ile

290 295 300

Pro Ala His Gly Trp Val Asp Tyr Ala Pro Ser Ser Thr Pro Ala Pro

305 310 315 320
 Gly Asn Ala Asp Pro Val Leu Ile Ile Phe Gly Cys Phe Cys Gly Phe

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

 385 390 395 400
 Leu Glu Asp Val Val Ile Asp Arg Asn Leu Leu Ile Leu Gly Lys Ile
 405 410 415
 Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ser Val Met Glu Gly Asn Leu Lys Gln
 420 425 430
 Glu Asp Gly Thr Ser Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Leu Asp
 435 440 445
 Asn Ser Ser Gln Arg Glu Ile Glu Glu Phe Leu Ser Glu Ala Ala Cys

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

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

Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Ser Gly Asp
565 570 575

Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala
580 585 590

Ile Glu Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp
595 600 605

Ala Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Met Thr Pro
610 615 620

Tyr Pro Gly Val Gln Asn His Glu Met Tyr Asp Tyr Leu Leu His Gly
625 630 635 640

His Arg Leu Lys Gln Pro Glu Asp Cys Leu Asp Glu Leu Tyr Glu Ile
645 650 655

Met Tyr Ser Cys Trp Arg Thr Asp Pro Leu Asp Arg Pro Thr Phe Ser
660 665 670

Val Leu Arg Leu Gln Leu Glu Lys Leu Leu Glu Ser Leu Pro Asp Val
675 680 685

Arg Asn Gln Ala Asp Val Ile Tyr Val Asn Thr Gln Leu Leu Glu Ser
690 695 700

Ser Glu Gly Leu Ala Gln Gly Ser Thr Leu Ala Pro Leu Asp Leu Asn
705 710 715 720

Ile Asp Pro Asp Ser Ile Ile Ala Ser Cys Thr Pro Arg Ala Ala Ile
725 730 735

Ser Val Val Thr Ala Glu Val His Asp Ser Lys Pro His Glu Gly Arg
740 745 750

Tyr Ile Leu Asn Gly Gly Ser Glu Glu Trp Glu Asp Leu Thr Ser Ala
755 760 765

Pro Ser Ala Ala Val Thr Ala Glu Lys Asn Ser Val Leu Pro Gly Glu
770 775 780

Arg Leu Val Arg Asn Gly Val Ser Trp Ser His Ser Ser Met Leu Pro
785 790 795 800

Leu Gly Ser Ser Leu Pro Asp Glu Leu Leu Phe Ala Asp Asp Ser Ser

805	810	815
Glu Gly Ser Glu Val Leu Met		
820		