

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.⁷
A61K 39/395
A61K 47/48

(11) 공개번호 10-2005-0105459
(43) 공개일자 2005년11월04일

(21) 출원번호 10-2005-7014534
(22) 출원일자 2005년08월05일
번역문 제출일자 2005년08월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2004/003607 (87) 국제공개번호 WO 2004/071530
국제출원일자 2004년02월05일 국제공개일자 2004년08월26일

(30) 우선권주장 60/445,396 2003년02월05일 미국(US)

(71) 출원인 제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1

(72) 발명자 프란츠, 그레첸
미국 94127 캘리포니아주 샌 프란시스코 산 베니토 웨이 135
힐란, 케네쓰
미국 94114 캘리포니아주 샌 프란시스코 시워드 스트리트 64
폴라키스, 폴
미국 94010 캘리포니아주 버링게임 코르테즈 에비뉴 1449
울프, 베니
미국 94065 캘리포니아주 레드우드 시티 시즌스 레인 607
우, 토마스
미국 94110 캘리포니아주 샌 프란시스코 네바다 스트리트 41
장, 제민
미국 94404 캘리포니아주 포스터 시티 타우러스 드라이브 876

(74) 대리인 장수길
김영

심사청구 : 없음

(54) 종양 세포에 의해 차별적으로 발현되는 세포성폴리펩티드의 동정

요약

본 발명은 포유동물에서 종양의 진단 및 치료에 유용한 물질의 조성물, 및 이 물질의 조성물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

색인어

종양, 종양-관련 항원성 표적 (TAT), 항체

명세서

기술분야

본 발명은 포유동물에서 종양의 진단 및 치료에 유용한 물질의 조성물 및 이 조성물을 이용하여 상기 종양을 진단 및 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

악성 종양(암)은 미국에서 심장 질환에 이어 두 번째로 높은 사망 원인이다 [Boring et al., CA Cancer J. Clin., 43:7 (1993)]. 암은 정상 조직으로부터 유래된 비정상 세포 또는 신생물 세포(증식하여 종양 덩어리를 형성함) 수의 증가, 이들 신생물성 종양 세포의 인접 조직으로의 침입, 및 전이라고 일컬어지는 과정에 의해 혈액 또는 림프계를 통해 결국 국부 림프절 및 원위부로 퍼지는 악성 세포의 발생을 특징으로 한다. 암 상태에서, 세포는 정상 세포라면 성장하지 않을 조건에서도 증식한다. 암 자체는 여러 다른 정도의 침입성 및 공격성을 특징으로 하는 매우 다양한 형태로 나타난다.

암의 진단 및 치료에 효과적인 세포 표적을 발견하기 위한 시도에서, 연구자들은 하나 이상의 특정 유형의 암세포 표면에 1종 이상의 정상적인 비-암성 세포에 비해 특이적으로 발현되는 막횡단 또는 막결합 폴리펩티드를 확인하고자 했다. 흔히, 이러한 막결합 폴리펩티드는 비-암성 세포의 표면에 비해 암세포의 표면에서 더 풍부하게 발현된다. 이러한 종양-관련 세포 표면의 항원 폴리펩티드를 확인하여 항체-기반의 요법을 통해 암세포를 특이적으로 표적화하여 파괴할 수 있었다. 이와 관련하여, 항체-기반의 요법은 특정 암의 치료에 매우 효과적인 것으로 입증되었음을 유의한다. 예를 들어, HERCEPTIN(등록상표) 및 RITUXAN(등록상표)(미국 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코에 소재하는 제넨테크, 인크. (Genentech, Inc.)사 제품)은 각각 유방암 및 비-호지킨 림프종을 치료하는 데 성공적으로 사용되어 온 항체이다. 더욱 구체적으로, HERCEPTIN(등록상표)은 인간 상피 성장 인자 수용체 2(HER2) 원종양유전자(proto-oncogene)의 세포의 도메인에 선택적으로 결합하는, 재조합 DNA 유래의 인간화 모노클로날 항체이다. HER2 단백질의 과발현은 원발성 유방암의 25 내지 30%에서 관찰된다. RITUXAN(등록상표)은 정상 B 림프구 및 악성 B 림프구의 표면에서 발견되는 CD20 항원에 대해 지시되는, 유전적으로 조작된 키메라 쥐/인간 모노클로날 항체이다. 이들 두 항체는 모두 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포에서 재조합적으로 제조된다.

암의 진단 및 치료에 효과적인 세포 표적을 발견하기 위한 다른 시도에서, 연구자들은 (1) 1종 이상의 특정 유형의 비-암성 정상 세포에 비해 1종 이상의 특정 유형의 암세포에 의해 특이적으로 생성되는 비-막결합 폴리펩티드, (2) 1종 이상의 정상 비-암성 세포보다 상당히 더 높은 발현 수준으로 암세포에 의해 생산되는 폴리펩티드 또는 (3) 암 상태 및 비-암성 상태 둘 다에서 단일(또는 매우 한정된 수의 여러) 조직 유형(예, 정상 전립선 및 전립선 종양 조직)에서만 특이적으로 한정되어 발현되는 폴리펩티드를 확인하고자 했다. 이러한 폴리펩티드는 세포내에 위치하거나 암세포에 의해 분비될 수 있다. 또한, 상기 폴리펩티드는 암세포 자체에 의해 발현되는 것이 아니라, 암세포에 대한 증가 또는 성장-증대 효과를 나타내는 폴리펩티드를 생산하고(하거나) 분비하는 세포에 의해 발현될 수 있다. 흔히 이러한 분비 폴리펩티드들은 정상 세포에 비해 암세포를 많이 성장시키는 단백질로서, 예를 들어 혈관신생 인자, 세포 부착 인자 및 성장 인자 등을 포함할 수 있다. 이러한 비-막결합 폴리펩티드에 대한 길항제를 확인하는 것은 상기 암의 치료를 위한 효과적인 치료제를 제공하는 역할을 할 것으로 예상된다. 또한, 이러한 폴리펩티드의 발현 패턴의 확인은 포유동물에서 특정 암의 진단에 유용할 것이다.

포유동물 암 요법에서의 상기 확인된 진전에도 불구하고, 포유동물에서 종양의 존재를 검출할 수 있는 추가의 진단제 및 신생물성 세포 성장을 효과적으로 억제하는 치료제 각각에 대한 요구가 높다. 따라서, 본 발명의 목적은 (1) 정상 세포 또는 기타 다른 암세포에 비해 1종 이상 유형의 암세포에서 더 풍부하게 발현되는 세포막-결합 폴리펩티드, (2) 1종 이상의 특정 유형의 비-암성 정상 세포에 비해 1종 이상의 특정 유형의 암세포(또는 암세포의 성장에 대해 증가된 효과를 나타내는 폴리펩티드를 생산하는 다른 세포)에 의해 특이적으로 생산되는 비-막결합 폴리펩티드, (3) 암세포에 의해 1종 이상의 정상적인 비-암성 세포보다 상당히 더 높은 발현 수준으로 생산되는 비-막결합 폴리펩티드, 또는 (4) 암 상태 및 비-암성 상태 둘 다에서 단일(또는 매우 제한된 수의 여러) 조직 유형(예를 들어, 정상 전립선 및 전립선 종양 조직)에서만 특이적으로 한정되어 발현되는 폴리펩티드를 확인하고, 상기 폴리펩티드 및 그의 코딩 핵산을 사용하여 포유동물에서 암의 치료 처치 및 진단 검출에 유용한 물질의 조성물을 제조하는 것이다. 또한, 본 발명의 목적은 단일 또는 매우 한정된 수의 조직에서 한정되어 발현되는 세포막-결합 폴리펩티드, 분비 폴리펩티드 또는 세포내 폴리펩티드를 확인하고, 이러한 폴리펩티드 및 그의 코딩 핵산을 사용하여 포유동물에서 암의 치료 처치 및 진단 검출에 유용한 물질의 조성물을 제조하는 것이다.

<발명의 개요>

A. 실시양태

본원에서, 본 발명자들은 1종 이상 유형의 암세포에 의해 또는 그의 표면에서, 1종 이상 유형의 정상적인 비-암세포에 의해 또는 그 표면에서보다 더 높은 정도로 발현되는 다양한 세포의 폴리펩티드 (및 그의 코딩 핵산 또는 그의 단편)의 확인에 관해 최초로 기술한다. 별법으로, 이러한 폴리펩티드는 암세포에 대한 증가 또는 성장-증대 효과를 나타내는 폴리펩티드를 생산하고(하거나) 분비하는 세포에 의해 발현된다. 또다른 별법으로, 상기 폴리펩티드는 동일한 조직 유형의 정상 세포에 비해 종양 세포에 의해 과발현되는 것이 아니라, 오히려 단일 또는 매우 한정된 수의 조직 유형 (바람직하게는, 생명에 필수적이지 않은 조직, 예를 들어 전립선 등)의 종양 세포 및 정상 세포 둘 다에 의해 특이적으로 발현될 수 있다. 본원에서는 이러한 폴리펩티드 모두를 종양-관련 항원성 표적 (Tumor-associated Antigenic Target) 폴리펩티드 ("TAT" 폴리펩티드)라 말하며, 이는 포유동물에서 암의 치료 및 진단에 효과적인 표적으로 기능할 것으로 기대된다.

따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명은 종양-관련 항원성 표적 폴리펩티드 또는 그의 단편 ("TAT" 폴리펩티드)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 단리된 핵산 분자를 제공한다.

특정 측면에서, 상기 단리된 핵산 분자는 (a) 본원에 개시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 전장 TAT 폴리펩티드, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 없는 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 있거나 없는 막횡단 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 바와 같이 전장 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열의 특별하게 정의된 임의의 다른 단편을 코딩하는 DNA 분자, 또는 (b) 상기 DNA 분자 (a)의 상보체와의 핵산 서열 동일성이 약 80% 이상, 다르게는 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100%인 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

다른 측면에서, 상기 단리된 핵산 분자는 (a) 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 cDNA의 코딩 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 없는 TAT 폴리펩티드의 코딩 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 있거나 없는 막횡단 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인의 코딩 서열 또는 본원에 개시된 바와 같이 전장 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열의 특별하게 정의된 임의의 다른 단편의 코딩 서열을 포함하는 DNA 분자, 또는 (b) 상기 DNA 분자 (a)의 상보체와의 핵산 서열 동일성이 약 80% 이상, 다르게는 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100%인 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

추가적 측면에서, 본 발명은 (a) 본원에 개시된 바와 같이 ATCC에 기탁된 임의의 인간 단백질 cDNA의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 것과 동일한 성숙 폴리펩티드를 코딩하는 DNA 분자, 또는 (b) 상기 DNA 분자 (a)의 상보체와의 핵산 서열 동일성이 약 80% 이상, 다르게는 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100%인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다.

본 발명의 다른 측면은 막횡단 도메인이 결실되거나 막횡단 도메인이 불활성화된 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 또는 이러한 코딩 뉴클레오티드 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공하며, 이러한 폴리펩티드의 막횡단 도메인을 본원에 개시한다. 따라서, 본원에 기재된 TAT 폴리펩티드들의 가용성 세포외 도메인이 고려된다.

다른 측면에서, 본 발명은 (a) 본원에 개시된 바와 같은 전장 아미노산 서열을 갖는 TAT 폴리펩티드, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 없는 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 있거나 없는 막횡단 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 바와 같이 전장 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열의 특별하게 정의된 임의의 다른 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 (b) 상기 뉴클레오티드 서열 (a)의 상보체와 혼성화되는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 이와 관련하여, 본 발명의 한 실시양태는 예를 들어 진단용 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오티드 프로브로 유용한 혼성화 프로브로 사용하거나, 또는 임의로는 항-TAT 폴리펩티드 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 폴리펩티드에 결합하는 다른 유기 소분자에 대한 결합 부위를 포함하는 폴리펩티드를 임의로 코딩할 수 있는 전장 TAT 폴리펩티드의 단편을 코딩하는 데 사용할 수 있는, 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 코딩 서열의 단편 또는 그의 상보체에 관한 것이다. 통상적으로, 이러한 핵산 단편의 길이는 뉴클레오티드 약 5개 이상, 다르게는 약 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개, 100개, 105개, 110개, 115개, 120개, 125개, 130개, 135개, 140개, 145개, 150개, 155개, 160개, 165개, 170개, 175개, 180개, 185개, 190개, 195개, 200개, 210개, 220개, 230개, 240개, 250개, 260개, 270개, 280개, 290개, 300개, 310개, 320개, 330개, 340개, 350개, 360개, 370개, 380개, 390개, 400개, 410개, 420개, 430개, 440개, 450개, 460개, 470개, 480개, 490개, 500개, 510개, 520개, 530개, 540개, 550개, 560개, 570개, 580개, 590개, 600개, 610개, 620개, 630개, 640개, 650개, 660개, 670개, 680개, 690개, 700개, 710개, 720개, 730개, 740개, 750개, 760개, 770개, 780개, 790개, 800개, 810개, 820개, 830개, 840개, 850개, 860개, 870개, 880개, 890개, 900개, 910개, 920개, 930개, 940개, 950개, 960개, 970개,

980개, 990개 또는 1,000개 이상이며, 이때 상기에서 용어 "약"은 언급한 뉴클레오티드 서열 길이 \pm 이 길이의 10%를 의미한다. TAT 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 신규 단편은, 공지된 수많은 서열 정렬 프로그램 중 임의의 것을 사용하여 상기 TAT 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열을 공지된 다른 뉴클레오티드 서열과 함께 정렬시키고, TAT 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열 단편이 신규한 것인지를 결정함으로써 통상적인 방식으로 결정할 수 있음을 유의한다. 본원에서는 TAT 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 이러한 신규 단편 모두가 고려된다. 또한, 이들 뉴클레오티드 분자 단편에 의해 코딩되는 TAT 폴리펩티드 단편, 바람직하게는 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 폴리펩티드에 결합하는 다른 유기 소분자에 대한 결합 부위를 포함하는 TAT 폴리펩티드 단편도 고려된다.

다른 실시양태에서, 본 발명은 상기에서 확인된 단리된 임의의 핵산 서열에 의해 코딩되는 단리된 TAT 폴리펩티드를 제공한다.

특정 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 전장 아미노산 서열을 갖는 TAT 폴리펩티드, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 없는 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 있거나 없는 막횡단 TAT 폴리펩티드 단백질의 세포외 도메인, 본원에 개시된 임의의 핵산 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열 또는 본원에 개시된 바와 같이 전장 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열의 특별하게 정의된 임의의 다른 단편과의 아미노산 서열 동일성이 약 80% 이상, 다르게는 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 100%인 아미노산 서열을 포함하는 단리된 TAT 폴리펩티드에 관한 것이다.

추가 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같이 ATCC에 기탁된 임의의 인간 단백질 cDNA에 의해 코딩되는 아미노산 서열과의 아미노산 서열 동일성이 약 80% 이상, 다르게는 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상인 아미노산 서열을 포함하는 단리된 TAT 폴리펩티드에 관한 것이다.

특정 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같이 N-말단 신호 서열 및(또는) 개시 메티오닌이 없으며 상기 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 단리된 TAT 폴리펩티드를 제공한다. 또한, 상기 단리된 TAT 폴리펩티드의 제조 방법도 본원에 기재하며, 이 방법은 적절한 코딩 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 TAT 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 배양하는 단계, 및 상기 세포 배양물로부터 TAT 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함한다.

본 발명의 다른 측면은 막횡단 도메인이 결실되거나 막횡단 도메인이 불활성화된 단리된 TAT 폴리펩티드를 제공한다. 또한, 상기 단리된 TAT 폴리펩티드의 제조 방법도 본원에 기재하며, 이 방법은 적절한 코딩 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 TAT 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 배양하는 단계, 및 상기 세포 배양물로부터 TAT 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함한다.

본 발명의 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 제공한다. 또한, 이러한 임의의 벡터를 포함하는 숙주 세포도 제공한다. 예를 들어, 숙주 세포는 CHO 세포, 이. 콜라이 (*E. coli*) 세포 또는 효모 세포일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 폴리펩티드를 제조하는 방법도 추가로 제공하며, 이 방법은 원하는 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 상기 세포 배양물로부터 원하는 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함한다.

다른 실시양태에서, 본 발명은 이중 (비-TAT) 폴리펩티드에 융합된 본원에 기재된 임의의 TAT 폴리펩티드를 포함하는 단리된 키메라 폴리펩티드를 제공한다. 이러한 키메라 분자의 예로는, 예를 들어 에피토프 태그 서열 또는 면역글로불린의 Fc 영역과 같은 이중 폴리펩티드에 융합된 본원에 기재된 임의의 TAT 폴리펩티드를 포함한다.

다른 실시양태에서, 본 발명은 상기 또는 하기에 기재된 임의의 폴리펩티드에, 바람직하게는 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 임의로는, 상기 항체는 모노클로날 항체, 항체 단편, 키메라 항체, 인간화 항체, 단쇄 항체, 또는 항-TAT 폴리펩티드 항체 또는 그의 각 항원성 에피토프의 결합을 경쟁적으로 억제하는 항체이다. 본 발명의 항체는 임의로는 성장억제제 또는 세포독성제, 예를 들어 메이탄시노이드 (maytansinoid) 또는 칼리케아미신 (calicheamicin) 등의 독소, 항생제, 방사성 동위원소 또는 핵분해 효소 등과 접합될 수 있다. 본 발명의 항체는 임의로는 CHO 세포 또는 박테리아 세포에서 제조될 수 있으며, 바람직하게는 이들이 결합하는 세포의 사멸을 유도한다. 진단 목적을 위해서, 본 발명의 항체를 검출가능하게 표지하거나, 고체 지지체에 부착시키거나, 또는 그 밖의 처리를 수행할 수 있다.

본 발명의 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 항체를 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 제공한다. 또한, 이러한 임의의 벡터를 포함하는 숙주 세포도 제공한다. 예를 들어, 숙주 세포는 CHO 세포, 이. 콜라이 세포 또는 효모 세포일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 항체를 제조하는 방법도 추가로 제공하며, 이 방법은 원하는 항체의 발현에 적합한 조건하에서 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 상기 세포 배양물로부터 원하는 항체를 회수하는 단계를 포함한다.

다른 실시양태에서, 본 발명은 상기 또는 하기에 기재된 임의의 TAT 폴리펩티드에, 바람직하게는 특이적으로 결합하는 올리고펩티드 ("TAT 결합 올리고펩티드")를 제공한다. 임의로는, 본 발명의 TAT 결합 올리고펩티드는 성장억제제 또는 세포독성제, 예를 들어 메이탄시노이드 또는 칼리케아미신 등의 독소, 항생제, 방사성 동위원소 또는 핵분해 효소 등과 결합될 수 있다. 본 발명의 TAT 결합 올리고펩티드는 임의로는 CHO 세포 또는 박테리아 세포에서 생산될 수 있으며, 바람직하게는 이들이 결합하는 세포의 사멸을 유도한다. 진단 목적을 위해서, 본 발명의 TAT 결합 올리고펩티드를 검출가능하게 표지하거나, 고체 지지체에 부착시키거나, 또는 그 밖의 처리를 수행할 수 있다.

본 발명의 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 TAT 결합 올리고펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 제공한다. 또한, 이러한 임의의 벡터를 포함하는 숙주 세포도 제공한다. 예를 들어, 숙주 세포는 CHO 세포, 이. 콜라이 세포 또는 효모 세포일 수 있다. 본원에 기재된 임의의 TAT 결합 올리고펩티드를 제조하는 방법도 추가로 제공하며, 이 방법은 원하는 올리고펩티드의 발현에 적합한 조건하에서 숙주 세포를 배양하는 단계, 및 상기 세포 배양물로부터 원하는 올리고펩티드를 회수하는 단계를 포함한다.

또 다른 실시양태에서, 본 발명은 상기 또는 하기에 기재된 임의의 TAT 폴리펩티드에, 바람직하게는 특이적으로 결합하는 유기 소분자 ("TAT 결합 유기 분자")를 제공한다. 임의로는, 본 발명의 TAT 결합 유기 분자는 성장억제제 또는 세포독성제, 예를 들어 메이탄시노이드 또는 칼리케아미신 등의 독소, 항생제, 방사성 동위원소 또는 핵분해 효소 등과 결합될 수 있다. 본 발명의 TAT 결합 유기 분자는 바람직하게는 이들이 결합하는 세포의 사멸을 유도한다. 진단 목적을 위해서, 본 발명의 TAT 결합 유기 분자를 검출가능하게 표지하거나, 고체 지지체에 부착시키거나, 또는 그 밖의 처리를 수행할 수 있다.

또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 TAT 폴리펩티드, 본원에 기재된 바와 같은 항-TAT 항체, 본원에 기재된 바와 같은 TAT 결합 올리고펩티드 또는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 결합 유기 분자를 담체와 함께 포함하는 조성물에 관한 것이다. 임의로는, 상기 담체는 제약상 허용되는 담체이다.

또 다른 실시양태에서, 본 발명은 용기 및 용기내에 들어있는 조성물을 포함하는 제품에 관한 것이며, 이때 상기 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 TAT 폴리펩티드, 본원에 기재된 바와 같은 항-TAT 항체, 본원에 기재된 바와 같은 TAT 결합 올리고펩티드 또는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 결합 유기 분자를 포함할 수 있다. 추가로, 상기 제품은 임의로는 상기 조성물이 종양의 치료 처치 또는 진단 검출에 사용됨을 나타내는 라벨이 용기에 부착되어 있거나 그러한 용도를 나타내는 포장 삽입물이 용기내에 포함되어 있을 수 있다.

본 발명의 다른 실시양태는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 TAT 폴리펩티드, 본원에 기재된 바와 같은 항-TAT 폴리펩티드 항체, 본원에 기재된 바와 같은 TAT 결합 올리고펩티드 또는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 결합 유기 분자에 반응하는 증상의 치료에 유용한 의약의 제조를 위한, 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 TAT 폴리펩티드, 본원에 기재된 바와 같은 항-TAT 폴리펩티드 항체, 본원에 기재된 바와 같은 TAT 결합 올리고펩티드 또는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 결합 유기 분자의 용도에 관한 것이다.

B. 추가의 실시양태

본 발명의 다른 실시양태는 TAT 폴리펩티드를 발현하는 세포의 성장을 억제하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 상기 세포를 TAT 폴리펩티드에 결합하는 항체, 올리고펩티드 또는 유기 소분자와 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 상기 TAT 폴리펩티드에 결합하여 TAT 폴리펩티드를 발현시키는 세포의 성장을 억제한다. 바람직한 실시양태에서, 세포는 암세포이며, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 상기 TAT 폴리펩티드에 결합하여 TAT 폴리펩티드를 발현하는 세포를 사멸시킨다. 임의로는, 상기 항체는 모노클로날 항체, 항체 단편, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 단쇄 항체이다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체, TAT 결합 올리고펩티드 및 TAT 결합 유기 분자는 임의

로는 성장억제제 또는 세포독성제, 예를 들어 메이탄시노이드 또는 칼리케아미신 등의 독소, 항생제, 방사성 동위원소 또는 핵분해 효소 등과 결합될 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체 및 TAT 결합 올리고펩티드는 임의로는 CHO 세포 또는 박테리아 세포에서 생산될 수 있다.

본 발명의 다른 실시양태는 TAT 폴리펩티드-발현 세포를 포함하는 암성 종양을 보유하는 포유동물을 치료 처치하는 방법에 관한 것으로, 이 방법은 TAT 폴리펩티드에 결합하는 치료 유효량의 항체, 올리고펩티드 또는 유기 소분자를 포유동물에게 투여함으로써 상기 종양을 효과적으로 치료하는 것을 포함한다. 임의로는, 상기 항체는 모노클로날 항체, 항체 단편, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 단쇄 항체이다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체, TAT 결합 올리고펩티드 및 TAT 결합 유기 분자는 임의로는 성장억제제 또는 세포독성제, 예를 들어 메이탄시노이드 또는 칼리케아미신 등의 독소, 항생제, 방사성 동위원소 또는 핵분해 효소 등과 결합될 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체 및 올리고펩티드는 임의로는 CHO 세포 또는 박테리아 세포에서 생산될 수 있다.

본 발명의 또 다른 실시양태는 TAT 폴리펩티드를 함유할 것으로 추정되는 샘플에서 TAT 폴리펩티드의 존재를 결정하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 상기 샘플을 TAT 폴리펩티드에 결합하는 항체, 올리고펩티드 또는 유기 소분자에 노출시키는 단계 및 상기 샘플에서 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자와 TAT 폴리펩티드의 결합을 결정하는 단계를 포함하며, 이때 이러한 결합의 존재에 의해 샘플내 TAT 폴리펩티드가 존재함을 알 수 있다. 임의로는, 상기 샘플은 TAT 폴리펩티드를 발현할 것으로 추정되는 세포 (암세포일 수 있음)를 함유할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자를 임의로는 검출가능하게 표지하거나, 고체 지지체에 부착시키거나, 또는 그 밖의 처리를 수행할 수 있다.

본 발명의 추가의 실시양태는 포유동물에서 종양의 존재를 진단하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 (a) 상기 포유동물로부터 수득한 조직 세포의 시험 샘플, 및 (b) 상기와 동일한 조직 기원 또는 유형의 공지된 정상 비-암성 세포의 대조 샘플에서 검출하는 단계를 포함하며, 이때 시험 샘플에서 TAT 폴리펩티드의 발현 수준이 대조 샘플에 비해 더 높은 것에 의해 상기 시험 샘플을 수득한 포유동물에 종양이 존재함을 알 수 있다.

본 발명의 다른 실시양태는 포유동물에서 종양의 존재를 진단하는 방법에 관한 것으로서, 이 방법은 (a) 포유동물로부터 수득한 조직 세포를 포함하는 시험 샘플을 TAT 폴리펩티드에 결합하는 항체, 올리고펩티드 또는 유기 소분자와 접촉시키는 단계 및 (b) 상기 시험 샘플에서 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 소분자와 TAT 폴리펩티드 사이의 복합체 형성을 검출하는 단계를 포함하며, 이때 복합체의 형성에 의해 상기 포유동물에 종양이 존재함을 알 수 있다. 임의로는, 사용된 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자를 검출가능하게 표지하거나, 고체 지지체에 부착시키거나 또는 그 밖의 처리를 수행하고(하거나) 조직 세포의 시험 샘플을 암성 종양이 있을 것으로 추정되는 개체로부터 얻는다.

본 발명의 또 다른 실시양태는 TAT 폴리펩티드의 발현 또는 활성의 변화, 바람직하게는 증가와 관련된 세포 증식성 질환을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이며, 이 방법은 상기 치료 또는 예방을 요하는 대상체에게 유효량의 TAT 폴리펩티드 길항제를 투여하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 세포 증식성 질환은 암이며, TAT 폴리펩티드 길항제는 항-TAT 폴리펩티드 항체, TAT 결합 올리고펩티드, TAT 결합 유기 분자 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 세포 증식성 질환의 효과적인 치료 또는 예방은 TAT 폴리펩티드 발현 세포의 직접적인 사멸 또는 성장억제의 결과이거나, TAT 폴리펩티드의 세포 성장 강화 활성을 길항한 결과일 수 있다.

본 발명의 또 다른 실시양태는 항체, 올리고펩티드 또는 유기 소분자를 TAT 폴리펩티드 발현 세포에 결합시키는 방법에 관한 것이며, 이 방법은 TAT 폴리펩티드 발현 세포를 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 소분자와, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 소분자가 상기 TAT 폴리펩티드에 결합하기에 적합한 조건하에 접촉시켜 이들을 서로 결합시키는 것을 포함한다.

본 발명의 다른 실시양태는 (i) 암 또는 종양의 치료 처치 또는 진단 검출 또는 (ii) 세포 증식성 질환의 치료 처치 또는 예방에 유용한 의약의 제조에 있어서 (a) TAT 폴리펩티드, (b) TAT 폴리펩티드 코딩 핵산 또는 이 핵산을 포함하는 벡터 또는 숙주 세포, (c) 항-TAT 폴리펩티드 항체, (d) TAT-결합 올리고펩티드 또는 (e) TAT-결합 유기 소분자의 용도에 관한 것이다.

본 발명의 다른 실시양태는 암세포의 성장이 적어도 부분적으로는 TAT 폴리펩티드의 성장 증대 효과에 의존하는 암세포의 성장을 억제하는 방법에 관한 것이며 (여기서, TAT 폴리펩티드는 암세포 자체 또는 암세포에 대해 성장 증대 효과를 나타내는 폴리펩티드를 생산하는 세포에 의해 발현될 수 있음), 상기 방법은 TAT 폴리펩티드를 이 TAT 폴리펩티드와 결합하는 항체, 올리고펩티드 또는 유기 소분자와 접촉시킴으로써 TAT 폴리펩티드의 성장 증대 활성을 길항하고, 따라서 암세포의 성장을 억제하는 것을 포함한다. 바람직하게는, 암세포의 성장은 완전히 억제된다. 보다 더 바람직하게, 항체, 올

리고펩티드 또는 유기 소분자와 TAT 폴리펩티드의 결합은 암세포의 사멸을 유도한다. 임의로는, 항체는 모노클로날 항체, 항체 단편, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 단쇄 항체이다. 임의로는 본 발명의 방법에 사용되는 항체, TAT 결합 올리고펩티드 및 TAT 결합 유기 분자를 성장억제제 또는 세포독성제, 예를 들어 메이탄시노이드 또는 칼리케아미신 등의 독소, 항생제, 방사성 동위원소 또는 핵분해 효소 등에 접합시킬 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체 및 TAT 결합 올리고펩티드는 임의로는 CHO 세포 또는 박테리아 세포에서 생산될 수 있다.

본 발명의 또 다른 실시양태는 포유동물에서 종양의 성장이 적어도 부분적으로는 TAT 폴리펩티드의 성장 증대 효과에 의존하는 종양을 치료 처치하는 방법에 관한 것이며, 이 방법은 포유동물에게 TAT 폴리펩티드에 결합하는 치료 유효량의 항체, 올리고펩티드 또는 유기 소분자를 투여함으로써 상기 TAT 폴리펩티드의 성장 증대 활성을 길항하여 종양을 효과적으로 치료 처치하는 것을 포함한다. 임의로는, 상기 항체는 모노클로날 항체, 항체 단편, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 단쇄 항체이다. 임의로는 본 발명의 방법에 사용되는 항체, TAT 결합 올리고펩티드 및 TAT 결합 유기 분자를 성장억제제 또는 세포독성제, 예를 들어 메이탄시노이드 또는 칼리케아미신 등의 독소, 항생제, 방사성 동위원소 또는 핵분해 효소 등에 접합시킬 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체 및 올리고펩티드는 임의로는 CHO 세포 또는 박테리아 세포에서 생산될 수 있다.

C. 추가의 다른 실시양태

또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본 출원의 잠재적인 청구범위에 해당하는 하기 세트에 관한 것이다:

<제1양태>

- (a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 분자;
 - (b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 분자;
 - (c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인을 코딩하는 DNA 분자;
 - (d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인을 코딩하는 DNA 분자;
 - (e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열;
 - (f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역; 또는
 - (g) 상기 (a), (b), (c), (d), (e) 또는 (f)의 상보체
- 와의 핵산 서열 동일성이 80% 이상인 뉴클레오티드 서열을 갖는 단리된 핵산.

<제2양태>

- (a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인을 코딩하는 뉴클레오티드 서열;
- (e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열;

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오타이드 서열의 전장 코딩 영역; 또는

(g) 상기 (a), (b), (c), (d), (e) 또는 (f)의 상보체

를 갖는 단리된 핵산.

<제3양태>

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열을 코딩하는 핵산;

(b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열을 코딩하는 핵산;

(c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인을 코딩하는 핵산;

(d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인을 코딩하는 핵산;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오타이드 서열;

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오타이드 서열의 전장 코딩 영역; 또는

(g) 상기 (a), (b), (c), (d), (e) 또는 (f)의 상보체

와 혼성화시키는 단리된 핵산.

<제4양태>

제3양태에 있어서, 혼성화가 엄격 조건하에서 일어나는 것인 핵산.

<제5양태>

제3양태에 있어서, 길이가 뉴클레오타이드 약 5개 이상인 핵산.

<제6양태>

제1양태 내지 제3양태 중 어느 한 양태의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

<제7양태>

제6양태에 있어서, 상기 핵산이 상기 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 의해 인식되는 조절 서열에 작동가능하게 연결된 것인 발현 벡터.

<제8양태>

제7양태의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

<제9양태>

제8양태에 있어서, CHO 세포, 이. 콜라이 세포 또는 효모 세포인 숙주 세포.

<제10양태>

제8양태의 숙주 세포를 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 배양하는 단계 및 상기 세포 배양물로부터 상기 폴리펩티드를 회수하는 단계를 포함하는, 폴리펩티드의 제조 방법.

<제11양태>

- (a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;
- (b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;
- (c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;
- (d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;
- (e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 또는
- (f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드

와의 아미노산 서열 동일성이 80% 이상인 단리된 폴리펩티드.

<제12양태>

- (a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;
- (b) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;
- (c) 연결된 신호 펩티드 서열이 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;
- (d) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;
- (e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열; 또는
- (f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열

을 갖는 단리된 폴리펩티드.

<제13양태>

이중 폴리펩티드에 융합된 제11양태 또는 제12양태의 폴리펩티드를 포함하는 키메라 폴리펩티드.

<제14양태>

제13양태에 있어서, 상기 이중 폴리펩티드가 에피토프 태그 서열 또는 면역글로불린의 Fc 영역인 키메라 폴리펩티드.

<제15양태>

- (a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;
- (b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

- (c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;
- (d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;
- (e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 또는
- (f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드

와의 아미노산 서열 동일성이 80% 이상인 폴리펩티드에 결합하는 단리된 항체.

<제16양태>

- (a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;
- (b) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;
- (c) 연결된 신호 펩티드 서열이 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;
- (d) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;
- (e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열; 또는
- (f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열

을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 단리된 항체.

<제17양태>

제15양태 또는 제16양태에 있어서, 모노클로날 항체인 항체.

<제18양태>

제15양태 또는 제16양태에 있어서, 항체 단편인 항체.

<제19양태>

제15양태 또는 제16양태에 있어서, 키메라 항체 또는 인간화 항체인 항체.

<제20양태>

제15양태 또는 제16양태에 있어서, 성장억제제에 접합된 항체.

<제21양태>

제15양태 또는 제16양태에 있어서, 세포독성제에 접합된 항체.

<제22양태>

제21양태에 있어서, 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵분해 효소로 구성된 군으로부터 선택된 것인 항체.

<제23양태>

제21양태에 있어서, 세포독성제가 독소인 항체.

<제24양태>

제23양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 및 칼리케아미신으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 항체.

<제25양태>

제23양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드인 항체.

<제26양태>

제15양태 또는 제16양태에 있어서, 박테리아에서 제조된 항체.

<제27양태>

제15양태 또는 제16양태에 있어서, CHO 세포에서 제조된 항체.

<제28양태>

제15양태 또는 제16양태에 있어서, 결합하는 세포의 사멸을 유도하는 항체.

<제29양태>

제15양태 또는 제16양태에 있어서, 검출가능하게 표지된 항체.

<제30양태>

제15양태 또는 제16양태의 항체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 단리된 핵산.

<제31양태>

발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 의해 인식되는 조절 서열에 작동가능하게 연결된 제30양태의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

<제32양태>

제31양태의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.

<제33양태>

제32양태에 있어서, CHO 세포, 이. 콜라이 세포 또는 효모 세포인 숙주 세포.

<제34양태>

제32양태의 숙주 세포를 항체의 발현에 적합한 조건하에 배양하는 단계 및 상기 세포 배양물로부터 상기 항체를 회수하는 단계를 포함하는, 항체의 제조 방법.

<제35양태>

- (a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 폴리펩티드;
 - (b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 폴리펩티드;
 - (c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 폴리펩티드의 세포외 도메인;
 - (d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 폴리펩티드의 세포외 도메인;
 - (e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 또는
 - (f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드
- 와의 아미노산 서열 동일성이 80% 이상인 폴리펩티드에 결합하는 단리된 올리고펩티드.

<제36양태>

- (a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 아미노산 서열;
 - (b) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 아미노산 서열;
 - (c) 연결된 신호 펩티드 서열이 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;
 - (d) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;
 - (e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열; 또는
 - (f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열
- 을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 단리된 올리고펩티드.

<제37양태>

제35양태 또는 제36양태에 있어서, 성장억제제에 접합된 올리고펩티드.

<제38양태>

제35양태 또는 제36양태에 있어서, 세포독성제에 접합된 올리고펩티드.

<제39양태>

제38양태에 있어서, 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵분해 효소로 구성된 군으로부터 선택된 것인 올리고펩티드.

<제40양태>

제38양태에 있어서, 세포독성제가 독소인 올리고펩티드.

<제41양태>

제40양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 및 칼리케아미신으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 올리고펩티드.

<제42양태>

제40양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드인 올리고펩티드.

<제43양태>

제35양태 또는 제36양태에 있어서, 결합하는 세포의 사멸을 유도하는 올리고펩티드.

<제44양태>

제35양태 또는 제36양태에 있어서, 검출가능하게 표지된 올리고펩티드.

<제45양태>

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드

와의 아미노산 서열 동일성이 80% 이상인 폴리펩티드에 결합하는 TAT 결합 유기 분자.

<제46양태>

제45양태에 있어서,

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;

(b) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;

(c) 연결된 신호 펩티드 서열이 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(d) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열

을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 유기 분자.

<제47양태>

제45양태 또는 제46양태에 있어서, 성장억제제에 접합된 유기 분자.

<제48양태>

제45양태 또는 제46양태에 있어서, 세포독성제에 접합된 유기 분자.

<제49양태>

제48양태에 있어서, 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵분해 효소로 구성된 군으로부터 선택된 것인 유기 분자.

<제50양태>

제48양태에 있어서, 세포독성제가 독소인 유기 분자.

<제51양태>

제50양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 및 칼리케아미신으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 유기 분자.

<제52양태>

제50양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드인 유기 분자.

<제53양태>

제45양태 또는 제46양태에 있어서, 결합하는 세포의 사멸을 유도하는 유기 분자.

<제54양태>

제45양태 또는 제46양태에 있어서, 검출가능하게 표지된 유기 분자.

<제55양태>

(a) 제11양태의 폴리펩티드;

(b) 제12양태의 폴리펩티드;

(c) 제13양태의 키메라 폴리펩티드;

(d) 제15양태의 항체;

(e) 제16양태의 항체;

(f) 제35양태의 올리고펩티드;

(g) 제36양태의 올리고펩티드;

(h) 제45양태의 TAT 결합 유기 분자; 또는

(i) 제46양태의 TAT 결합 유기 분자

를 담체와 함께 포함하는 조성물.

<제56양태>

제55양태에 있어서, 상기 담체가 제약상 허용되는 담체인 조성물.

<제57양태>

(a) 용기; 및 (b) 상기 용기내에 포함된 제55양태의 조성물을 포함하는 제품.

<제58양태>

제57양태에 있어서, 상기 조성물이 암의 치료 처치 또는 진단 검출에 사용됨을 나타내는 상기 용기내에 부착된 라벨 또는 상기 용기내에 포함된 포장 삽입물을 추가로 포함하는 제품.

<제59양태>

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 폴리펩티드;

(b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 폴리펩티드;

(c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드

와의 아미노산 서열 동일성이 80% 이상인 단백질을 발현하는 세포를 상기 단백질에 결합하는 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자와 접촉시켜 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 상기 단백질에 결합되도록 함으로써 상기 세포의 성장을 억제하는 것을 포함하는, 상기 세포의 성장을 억제하는 방법.

<제60양태>

제59양태에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 방법.

<제61양태>

제59양태에 있어서, 상기 항체가 항체 단편인 방법.

<제62양태>

제59양태에 있어서, 상기 항체가 키메라 항체 또는 인간화 항체인 방법.

<제63양태>

제59양태에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 성장억제제에 접합된 것인 방법.

<제64양태>

제59양태에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 세포독성제에 접합된 것인 방법.

<제65양태>

제64양태에 있어서, 상기 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵분해 효소로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

<제66양태>

제64양태에 있어서, 세포독성제가 독소인 방법.

<제67양태>

제66양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 및 칼리케아미신으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

<제68양태>

제66양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드인 방법.

<제69양태>

제59양태에 있어서, 상기 항체가 박테리아에서 제조된 것인 방법.

<제70양태>

제59양태에 있어서, 상기 항체가 CHO 세포에서 제조된 것인 방법.

<제71양태>

제59양태에 있어서, 상기 세포가 암세포인 방법.

<제72양태>

제71양태에 있어서, 상기 암세포가 방사선 처치 또는 화학요법에 추가로 노출되는 것인 방법.

<제73양태>

제71양태에 있어서, 상기 암세포가 유방암 세포, 결장직장암 세포, 폐암 세포, 난소암 세포, 중추신경계암 세포, 간암 세포, 방광암 세포, 췌장암 세포, 자궁경부암 세포, 흑색종 세포 및 백혈병 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

<제74양태>

제71양태에 있어서, 상기 단백질이 동일한 조직 기원의 정상 세포에 비해 상기 암세포에 의해 더 풍부하게 발현되는 것인 방법.

<제75양태>

제59양태에 있어서, 상기 세포의 사멸을 유발하는 방법.

<제76양태>

제59양태에 있어서, 상기 단백질이

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;

(b) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;

(c) 연결된 신호 펩티드 서열이 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(d) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열

을 갖는 것인 방법.

<제77양태>

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드

와의 아미노산 서열 동일성이 80% 이상인 단백질을 발현하는 세포를 포함하는 암성 종양이 있는 포유동물에게 상기 단백질에 결합하는 치료 유효량의 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 투여함으로써 상기 포유동물을 효과적으로 치료하는 것을 포함하는, 상기 포유동물의 치료 처치 방법.

<제78양태>

제77양태에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 방법.

<제79양태>

제77양태에 있어서, 상기 항체가 항체 단편인 방법.

<제80양태>

제77양태에 있어서, 상기 항체가 키메라 항체 또는 인간화 항체인 방법.

<제81양태>

제77양태에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 성장억제제에 접합된 것인 방법.

<제82양태>

제77양태에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 세포독성제에 접합된 것인 방법.

<제83양태>

제82양태에 있어서, 상기 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵분해 효소로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

<제84양태>

제82양태에 있어서, 세포독성제가 독소인 방법.

<제85양태>

제84양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 및 칼리케아미신으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

<제86양태>

제84양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드인 방법.

<제87양태>

제77양태에 있어서, 상기 항체가 박테리아에서 제조된 것인 방법.

<제88양태>

제77양태에 있어서, 상기 항체가 CHO 세포에서 제조된 것인 방법.

<제89양태>

제77양태에 있어서, 상기 종양이 방사선 치료 또는 화학요법에 추가로 노출되는 것인 방법.

<제90양태>

제77양태에 있어서, 상기 종양이 유방 종양, 결장직장 종양, 폐 종양, 난소 종양, 중추신경계 종양, 간 종양, 방광 종양, 췌장 종양 또는 자궁경부 종양인 방법.

<제91양태>

제77양태에 있어서, 상기 단백질이 동일한 조직 기원의 정상 세포에 비해 상기 종양의 암성 세포에 의해 더 풍부하게 발현되는 것인 방법.

<제92양태>

제77양태에 있어서, 상기 단백질이

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;

(b) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;

(c) 연결된 신호 펩티드 서열이 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(d) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열

을 갖는 것인 방법.

<제93양태>

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드

와의 아미노산 서열 동일성이 80% 이상인 단백질을 함유하는 것으로 추정되는 샘플을 상기 단백질에 결합하는 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자에 노출시키는 단계 및 상기 샘플에서 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자와 상기 단백질의 결합을 결정하는 단계를 포함하며, 이들 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 상기 단백질에 결합하는 것에 의해 상기 샘플 중 상기 단백질이 존재함을 알 수 있는 것인, 상기 샘플에서 상기 단백질의 존재를 결정하는 방법.

<제94양태>

제93양태에 있어서, 상기 샘플이 상기 단백질을 발현하는 것으로 추정되는 세포를 포함하는 것인 방법.

<제95양태>

제94양태에 있어서, 상기 세포가 암세포인 방법.

<제96양태>

제93양태에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 검출가능하게 표지된 것인 방법.

<제97양태>

제93양태에 있어서, 상기 단백질이

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;

(b) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;

(c) 연결된 신호 펩티드 서열이 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(d) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오타이드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열

을 갖는 것인 방법.

<제98양태>

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오타이드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드

와의 아미노산 서열 동일성이 80% 이상인 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을, 포유동물로부터 수득한 조직 세포의 시험 샘플 및 동일한 조직 기원의 공지된 정상 세포의 대조 샘플에서 결정하는 것을 포함하며, 이 때 시험 샘플에서 상기 단백질의 발현 수준이 대조 샘플에 비해 더 높은 것에 의해 시험 샘플이 얻어진 포유동물에 종양이 존재함을 알 수 있는 것인, 포유동물에서 종양의 존재를 진단하는 방법.

<제99양태>

제98양태에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계가 제자리 (in situ) 혼성화 또는 RT-PCR 분석에 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 것을 포함하는 것인 방법.

<제100양태>

제98양태에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계가 항체를 면역조직화학 분석 또는 웨스턴 블랏 분석에서 사용하는 것을 포함하는 것인 방법.

<제101양태>

제98양태에 있어서, 상기 단백질이

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;

(b) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;

(c) 연결된 신호 펩티드 서열이 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(d) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열

을 갖는 것인 방법.

<제102양태>

포유동물로부터 수득한 조직 세포의 시험 샘플을,

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드

와의 아미노산 서열 동일성이 80% 이상인 단백질과 결합하는 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자와 접촉시키는 단계, 및

상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자와 시험 샘플 중의 상기 단백질 사이의 복합체 형성을 검출하여 상기 복합체의 형성에 의해 상기 포유동물에 종양이 존재함을 알 수 있는 단계

를 포함하는, 포유동물에서 종양의 존재를 진단하는 방법.

<제103양태>

제102양태에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 검출가능하게 표지된 것인 방법.

<제104양태>

제102양태에 있어서, 조직 세포로 구성된 상기 시험 샘플이 암성 종양에 걸린 것으로 추정되는 개체로부터 얻어진 것인 방법.

<제105양태>

제102양태에 있어서, 상기 단백질이

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;

(b) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;

(c) 연결된 신호 펩티드 서열이 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(d) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열

을 갖는 것인 방법.

<제106양태>

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드

와의 아미노산 서열 동일성이 80% 이상인 단백질의 발현 또는 활성 증가와 관련된 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방을 요하는 대상체에게 상기 단백질의 길항제를 유효량 투여함으로써 상기 세포 증식성 질환을 효과적으로 치료 또는 예방하는 것을 포함하는, 상기 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방 방법.

<제107양태>

제106양태에 있어서, 상기 세포 증식성 질환이 암인 방법.

<제108양태>

제106양태에 있어서, 상기 길항제가 항-TAT 폴리펩티드 항체, TAT 결합 올리고펩티드, TAT 결합 유기 분자 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드인 방법.

<제109양태>

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드

와의 아미노산 서열 동일성이 80% 이상인 단백질을 발현하는 세포를 상기 단백질과 결합하는 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자와 접촉시키는 단계, 및

상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 상기 단백질과 결합하도록 함으로써 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 상기 세포에 결합되도록 하는 단계

를 포함하는, 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 상기 세포에 결합시키는 방법.

<제110양태>

제109양태에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 방법.

<제111양태>

제109양태에 있어서, 상기 항체가 항체 단편인 방법.

<제112양태>

제109양태에 있어서, 상기 항체가 키메라 항체 또는 인간화 항체인 방법.

<제113양태>

제109양태에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 성장억제제에 접합된 것인 방법.

<제114양태>

제109양태에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 세포독성제에 접합된 것인 방법.

<제115양태>

제114양태에 있어서, 상기 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵분해 효소로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

<제116양태>

제114양태에 있어서, 세포독성제가 독소인 방법.

<제117양태>

제116양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 및 칼리케아미신으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

<제118양태>

제116양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드인 방법.

<제119양태>

제109양태에 있어서, 상기 항체가 박테리아에서 제조된 것인 방법.

<제120양태>

제109양태에 있어서, 상기 항체가 CHO 세포에서 제조된 것인 방법.

<제121양태>

제109양태에 있어서, 상기 세포가 암세포인 방법.

<제122양태>

제121양태에 있어서, 상기 암세포가 방사선 처치 또는 화학요법에 추가로 노출되는 것인 방법.

<제123양태>

제121양태에 있어서, 상기 암세포가 유방암 세포, 결장직장암 세포, 폐암 세포, 난소암 세포, 중추신경계암 세포, 간암 세포, 방광암 세포, 췌장암 세포, 자궁경부암 세포, 흑색종 세포 및 백혈병 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

<제124양태>

제123양태에 있어서, 상기 단백질이 동일한 조직 기원의 정상 세포에 비해 상기 암세포에 의해 더 풍부하게 발현되는 것인 방법.

<제125양태>

제109양태에 있어서, 상기 세포의 사멸을 유발하는 방법.

<제126양태>

제1양태 내지 제5양태 및 제30양태 중 어느 한 양태의 핵산의 암의 치료 처치 또는 진단 검출용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제127양태>

제1양태 내지 제5양태 및 제30양태 중 어느 한 양태의 핵산의 종양 치료용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제128양태>

제1양태 내지 제5양태 및 제30양태 중 어느 한 양태의 핵산의 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제129양태>

제6양태, 제7양태 및 제31양태 중 어느 한 양태의 발현 벡터의 암의 치료 처치 또는 진단 검출용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제130양태>

제6양태, 제7양태 및 제31양태 중 어느 한 양태의 발현 벡터의 종양 치료용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제131양태>

제6양태, 제7양태 및 제31양태 중 어느 한 양태의 발현 벡터의 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제132양태>

제8양태, 제9양태, 제32양태 및 제33양태 중 어느 한 양태의 숙주 세포의 암의 치료 처치 또는 진단 검출용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제133양태>

제8양태, 제9양태, 제32양태 및 제33양태 중 어느 한 양태의 숙주 세포의 종양 치료용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제134양태>

제8양태, 제9양태, 제32양태 및 제33양태 중 어느 한 양태의 숙주 세포의 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제135양태>

제11양태 내지 제14양태 중 어느 한 양태의 폴리펩티드의 암의 치료 처치 또는 진단 검출용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제136양태>

제11양태 내지 제14양태 중 어느 한 양태의 폴리펩티드의 종양 치료용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제137양태>

제11양태 내지 제14양태 중 어느 한 양태의 폴리펩티드의 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제138양태>

제15양태 내지 제29양태 중 어느 한 양태의 항체의 암의 치료 처치 또는 진단 검출용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제139양태>

제15양태 내지 제29양태 중 어느 한 양태의 항체의 종양 치료용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제140양태>

제15양태 내지 제29양태 중 어느 한 양태의 항체의 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제141양태>

제35양태 내지 제44양태 중 어느 한 양태의 올리고펩티드의 암의 치료 처치 또는 진단 검출용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제142양태>

제35양태 내지 제44양태 중 어느 한 양태의 올리고펩티드의 종양 치료용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제143양태>

제35양태 내지 제44양태 중 어느 한 양태의 올리고펩티드의 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제144양태>

제45양태 내지 제54양태 중 어느 한 양태의 TAT 결합 유기 분자의 암의 치료 처치 또는 진단 검출용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제145양태>

제45양태 내지 제54양태 중 어느 한 양태의 TAT 결합 유기 분자의 종양 치료용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제146양태>

제45양태 내지 제54양태 중 어느 한 양태의 TAT 결합 유기 분자의 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제147양태>

제55양태 또는 제56양태의 조성물의 암의 치료 처치 또는 진단 검출용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제148양태>

제55양태 또는 제56양태의 조성물의 종양 치료용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제149양태>

제55양태 또는 제56양태의 조성물의 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제150양태>

제57양태 또는 제58양태의 제품의 암의 치료 처치 또는 진단 검출용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제151양태>

제57양태 또는 제58양태의 제품의 종양 치료용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제152양태>

제57양태 또는 제58양태의 제품의 세포 증식성 질환의 치료 또는 예방용 의약의 제조에 있어서의 용도.

<제153양태>

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 폴리펩티드;

(b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 폴리펩티드;

(c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타낸 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드

와의 아미노산 서열 동일성이 80% 이상인 단백질을 상기 단백질과 결합하는 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자와 접촉 시킴으로써 상기 세포의 성장을 억제하는 것을 포함하며, 상기 세포의 성장이 적어도 부분적으로는 상기 단백질의 성장 증대 효과에 의존하는 것인, 상기 세포의 성장을 억제하는 방법.

<제154양태>

제153양태에 있어서, 상기 세포가 암세포인 방법.

<제155양태>

제153양태에 있어서, 상기 단백질이 상기 세포에 의해 발현되는 것인 방법.

<제156양태>

제153양태에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자와 상기 단백질의 결합이 상기 단백질의 세포 성장 증대 활성을 길항하는 것인 방법.

<제157양태>

제153양태에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자와 상기 단백질의 결합이 상기 세포의 사멸을 유도하는 것인 방법.

<제158양태>

제153양태에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 방법.

<제159양태>

제153양태에 있어서, 상기 항체가 항체 단편인 방법.

<제160양태>

제153양태에 있어서, 상기 항체가 키메라 항체 또는 인간화 항체인 방법.

<제161양태>

제153양태에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 성장억제제에 접합된 것인 방법.

<제162양태>

제153양태에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 세포독성제에 접합된 것인 방법.

<제163양태>

제162양태에 있어서, 상기 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵분해 효소로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

<제164양태>

제162양태에 있어서, 세포독성제가 독소인 방법.

<제165양태>

제164양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 및 칼리케아미신으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

<제166양태>

제164양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드인 방법.

<제167양태>

제153양태에 있어서, 상기 항체가 박테리아에서 제조된 것인 방법.

<제168양태>

제153양태에 있어서, 상기 항체가 CHO 세포에서 제조된 것인 방법.

<제169양태>

제153양태에 있어서, 상기 단백질이

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;

(b) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 아미노산 서열;

(c) 연결된 신호 펩티드 서열이 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(d) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열

을 갖는 것인 방법.

<제170양태>

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드;

(c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드

와의 아미노산 서열 동일성이 80% 이상인 단백질을 상기 단백질에 결합하는 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자와 접촉 시킴으로써 상기 종양을 효과적으로 치료하는 것을 포함하며, 상기 종양의 성장이 적어도 부분적으로는 상기 단백질의 성장 증대 효과에 의존하는 것인, 포유동물에서 종양을 치료하는 방법.

<제171양태>

제170양태에 있어서, 상기 단백질이 상기 종양 세포에 의해 발현되는 것인 방법.

<제172양태>

제170양태에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자와 상기 단백질의 결합이 상기 단백질의 세포 성장 증대 활성을 길항하는 것인 방법.

<제173양태>

제170양태에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 방법.

<제174양태>

제170양태에 있어서, 상기 항체가 항체 단편인 방법.

<제175양태>

제170양태에 있어서, 상기 항체가 키메라 항체 또는 인간화 항체인 방법.

<제176양태>

제170양태에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 성장억제제에 접합된 것인 방법.

<제177양태>

제170양태에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 세포독성제에 접합된 것인 방법.

<제178양태>

제177양태에 있어서, 상기 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵분해 효소로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

<제179양태>

제177양태에 있어서, 세포독성제가 독소인 방법.

<제180양태>

제179양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 및 칼리케아미신으로 구성된 군으로부터 선택된 것인 방법.

<제181양태>

제179양태에 있어서, 독소가 메이탄시노이드인 방법.

<제182양태>

제170양태에 있어서, 상기 항체가 박테리아에서 제조된 것인 방법.

<제183양태>

제170양태에 있어서, 상기 항체가 CHO 세포에서 제조된 것인 방법.

<제184양태>

제170양태에 있어서, 상기 단백질이

(a) 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 아미노산 서열;

(b) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타낸 아미노산 서열;

(c) 연결된 신호 펩티드 서열이 있는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(d) 연결된 신호 펩티드 서열이 없는, 도 4 내지 6 (서열 4 내지 6) 중 어느 하나에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열;

(e) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열; 또는

(f) 도 1 내지 3 (서열 1 내지 3) 중 어느 하나에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열

을 갖는 것인 방법.

본 발명의 또 다른 실시양태들은 본원을 읽음으로써 당업자에게 자명할 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1은 TAT420 cDNA의 뉴클레오티드 서열 (서열 1)을 나타내며, 서열 1은 본원에서 "DNA272579"로 지칭되는 클론이다.

도 2는 TAT421 cDNA의 뉴클레오티드 서열 (서열 2)을 나타내며, 서열 2는 본원에서 "DNA333440"으로 지칭되는 클론이다.

도 3은 TAT136 cDNA의 뉴클레오티드 서열 (서열 3)을 나타내며, 서열 3은 본원에서 "DNA59610"으로 지칭되는 클론이다.

도 4는 도 1에 나타난 서열 1의 코딩 서열로부터 유래된 아미노산 서열 (서열 4)을 나타낸다.

도 5는 도 2에 나타난 서열 2의 코딩 서열로부터 유래된 아미노산 서열 (서열 5)을 나타낸다.

도 6은 도 3에 나타난 서열 3의 코딩 서열로부터 유래된 아미노산 서열 (서열 6)을 나타낸다.

발명의 상세한 설명

I. 정의

본원에 사용된 바와 같은 용어 "TAT 폴리펩티드" 및 "TAT"는 바로 뒤에 숫자가 붙어서 다양한 폴리펩티드를 의미하는데, 완전한 명칭 (즉, TAT/숫자)은 본원에 기재된 바와 같은 특정 폴리펩티드 서열을 말한다. 용어 "TAT/숫자 폴리펩티드" 및 "TAT/숫자"에서 용어 "숫자"는 본원에 사용된 바와 같이 실제 수로 나타내며, 상기 폴리펩티드는 천연 서열 폴리펩티드, 폴리펩티드 변이체, 천연 서열 폴리펩티드의 단편 및 폴리펩티드 변이체 (본원에서 추가로 정의됨)를 포함한다. 본원에 기재된 TAT 폴리펩티드는 인간 조직 유형 또는 다른 공급원과 같은 다양한 공급원에서 단리되거나 재조합 또는 합성 방법으로 제조될 수 있다. 용어 "TAT 폴리펩티드"는 본원에 개시된 개개의 TAT/숫자 폴리펩티드 각각을 말한다. 본원에서 "TAT 폴리펩티드"를 언급하는 모든 개시 내용은 상기 폴리펩티드 각각을 개별적으로 말하는 것일 뿐 아니라 통칭하여 말하는 것이다. 예를 들어, TAT 폴리펩티드의 제조, 그의 정제, 그의 유도, 그에 대한 항체 형성, 그에 대한 TAT 결합 올리고펩티드의 형성, 그에 대한 TAT 결합 유기 분자의 형성, 그의 투여, 그를 함유하는 조성물, 그를 사용한 질병 치료 등에 대한 기재는 본 발명의 개개의 폴리펩티드 각각에 해당한다. 용어 "TAT 폴리펩티드"는 본원에 개시된 TAT/숫자 폴리펩티드의 변이체도 포함한다.

"천연 서열 TAT 폴리펩티드"는 자연으로부터 유래된 상응하는 TAT 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 천연 서열 TAT 폴리펩티드는 자연으로부터 단리될 수도 있고 또는 재조합 또는 합성 수단에 의해 제조될 수도 있다. 용어 "천연 서열 TAT 폴리펩티드"는 구체적으로는 특정 TAT 폴리펩티드의 자연 발생적인 말단절단 (truncated) 형태 또는 분비 형태 (예를 들어, 세포외 도메인 서열), 상기 폴리펩티드의 자연 발생적인 변이체 형태 (예를 들면, 다르게 스포라이싱된 형태) 및 상기 폴리펩티드의 자연 발생적인 대립유전자 변이체를 포함한다. 본 발명의 특정

실시양태에서, 본원에 개시된 천연 서열 TAT 폴리펩티드는 첨부된 도면에 나타난 전장 아미노산 서열을 포함하는 성숙 또는 전장 천연 서열 폴리펩티드이다. 출발 및 정지 코돈은 (표시되어 있는 경우에는) 도면에서 굵은 글씨와 밑줄로 표시된다. 첨부된 도면에서 "N"으로 나타난 핵산 잔기는 임의의 핵산 잔기이다. 그러나, 첨부된 도면에 개시된 TAT 폴리펩티드는 도면에서 아미노산 위치 1로 지정된 메티오닌 잔기로 시작하는 것으로 나타나 있지만, 도면에서 아미노산 위치 1로부터 상류 또는 하류에 위치한 다른 메티오닌 잔기가 TAT 폴리펩티드의 출발 아미노산 잔기로 이용될 수 있음을 생각할 수 있으며 또한 가능하다.

TAT 폴리펩티드 "세포외 도메인" 또는 "ECD"는 본질적으로 막횡단 및 세포질 도메인이 없는 TAT 폴리펩티드 형태를 의미한다. 통상적으로, TAT 폴리펩티드 ECD는 이러한 막횡단 및(또는) 세포질 도메인을 1% 미만으로 보유할 것이며, 바람직하게는 상기 도메인들을 0.5% 미만으로 보유할 것이다. 본 발명의 TAT 폴리펩티드에 대해 확인된 임의의 막횡단 도메인은 당업계에서 소수성 도메인 유형을 밝히는데 통상적으로 사용되는 기준에 따라 확인된 것임을 이해할 것이다. 막횡단 도메인의 정확한 경계는 달라질 수 있지만 본원에서 처음 확인된 바와 같이 이 도메인의 각 말단에서 단지 아미노산 약 5개 이내에 있을 가능성이 가장 크다. 따라서, 임의로 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인은 실시예 또는 명세서에서 확인된 막횡단 도메인/세포외 도메인 경계의 각 측면에서 아미노산을 약 5개 이하로 함유할 수 있고, 연결된 신호 펩티드가 있거나 없는 이러한 폴리펩티드 및 이들을 코딩하는 핵산은 본 발명에서 고려된다.

본원에 개시된 다양한 TAT 폴리펩티드의 "신호 펩티드"의 대략적인 위치는 본원 및(또는) 첨부된 도면에 제시될 수 있다. 그러나, 신호 펩티드의 C-말단 경계가 달라질 수 있지만, 대부분은 본원에서 처음 확인된 신호 펩티드 C-말단 경계의 각 측면에서 단지 아미노산 약 5개 이내에 있을 가능성이 가장 크며, 여기서 신호 펩티드의 C-말단 경계는 당업계에서 아미노산 서열 요소의 유형을 확인하는데 통상적으로 이용되는 기준에 따라 확인될 수 있음을 주목한다 (예를 들어, 문헌 [Nielsen et al., *Prot. Eng.* 10:1-6 (1997)] 및 [von Heinje et al., *Nucl. Acids. Res.* 14:4683-4690 (1986)] 참조). 게다가, 일부 경우에는 분비 폴리펩티드로부터의 신호 서열의 절단이 전체적으로 일정하지 않아 하나 이상의 분비된 종류가 생산되는 것으로 인지된다. 본원에서 확인된 신호 펩티드의 C-말단 경계의 각 측면에서 단지 아미노산 약 5개의 범위 내에서 신호 펩티드가 절단된 이들 성숙 폴리펩티드 및 이들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 본 발명에서 고려된다.

"TAT 폴리펩티드 변이체"는 본원에 기재된 바와 같은 전장 천연 서열 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 없는 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에 기재된 바와 같이 신호 펩티드가 있거나 없는 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 서열의 임의의 다른 단편 (예를 들어, 전장 TAT 폴리펩티드의 완전한 코딩 서열의 일부만을 나타내는 핵산에 의해 코딩된 단편)과의 아미노산 서열 동일성이 약 80% 이상인, 본원에서 정의된 바와 같은 TAT 폴리펩티드, 바람직하게는 활성 TAT 폴리펩티드를 의미한다. 이러한 TAT 폴리펩티드 변이체는, 예를 들어 전장 천연 아미노산 서열의 N-말단 또는 C-말단에 하나 이상의 아미노산 잔기가 부가되거나 결실된 TAT 폴리펩티드를 포함한다. 통상적으로, TAT 폴리펩티드 변이체는 본원에서 개시된 바와 같은 전장 천연 서열 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에서 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 없는 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에 기재된 바와 같이 신호 펩티드가 있거나 없는 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 바와 같이 전장 TAT 폴리펩티드 서열의 특별하게 정의된 임의의 다른 단편과의 아미노산 서열 동일성이 약 80% 이상, 다르게는 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상일 것이다. 통상적으로, TAT 변이체 폴리펩티드의 길이는 아미노산 약 10개 이상, 다르게는 약 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 110개, 120개, 130개, 140개, 150개, 160개, 170개, 180개, 190개, 200개, 210개, 220개, 230개, 240개, 250개, 260개, 270개, 280개, 290개, 300개, 310개, 320개, 330개, 340개, 350개, 360개, 370개, 380개, 390개, 400개, 410개, 420개, 430개, 440개, 450개, 460개, 470개, 480개, 490개, 500개, 510개, 520개, 530개, 540개, 550개, 560개, 570개, 580개, 590개, 600개 이상이다. 임의로는, TAT 변이체 폴리펩티드는 천연 TAT 폴리펩티드 서열과 비교하여 단지 1개의 보존적인 아미노산 치환, 다르게는 천연 TAT 폴리펩티드 서열과 비교하여 단지 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 보존적인 아미노산 치환을 가질 것이다.

본원에서 확인된 TAT 폴리펩티드 서열과 관련하여 "아미노산 서열 동일성(%)"은 서열을 정렬하고, 필요하다면, 최대 서열 동일성(%)을 얻기 위해 갭 (gap)을 도입한 후 임의의 보존적인 치환을 서열 동일성의 일부로서 고려하지 않은 상태에서 특정 TAT 폴리펩티드 서열의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성(%)을 측정하기 위한 정렬은 당업계의 기술에 속하는 다양한 방법, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈린 (Megalign; DNASTAR) 소프트웨어와 같이 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교될 전장 서열에 대한 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 정렬 측정에 적합한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 서열 동일성(%) 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 구하는데, ALIGN-2 프로그램의 완전한 원시 코드는 하기 표 1에 기재되어 있다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크.에 의해 개발되었고, 하기 표 1에 나타난 원시 코드는 미국 저작권청 (미국 워싱턴 D.C. 20559에 소재)에 사용자 문서로 보관되어 있고, 미국 저작권 등록번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프

로그그램은 제넨테크, 인크. (미국 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코에 소재)를 통해 공개적으로 이용가능하거나, 표 1에 기재된 원시 코드로부터 컴파일할 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 작업 시스템, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D 상에서 컴파일되어 사용되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고 변하지 않는다.

ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 사용되는 경우, 주어진 아미노산 서열 B에, B와, 또는 B에 대한 주어진 아미노산 서열 A (또한, 주어진 아미노산 서열 B에, B와, 또는 B에 대한 특정 아미노산 서열 동일성(%)을 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A라는 어구로 달리 표현할 수 있음)의 아미노산 서열 동일성(%)은 하기와 같이 계산한다:

$$X/Y \times 100$$

여기서, X는 A와 B의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일하게 매치되는 것으로 기록되는 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B에 있는 아미노산 잔기의 총 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 같지 않는 경우, B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성(%)은 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성(%)과 같지 않을 것임을 인지해야 할 것이다. 이 방법을 이용한 아미노산 서열 동일성(%) 계산의 예로서, 표 2 및 표 3은 "TAT"로 지칭되는 아미노산 서열에 대한 "비교 단백질"로 지칭되는 아미노산 서열의 아미노산 서열 동일성(%)을 계산하는 방법을 나타내며, 여기서 "TAT"는 가정의 대상 TAT 폴리펩티드의 아미노산 서열을 나타내고, "비교 단백질"은 대상 "TAT" 폴리펩티드와 비교될 폴리펩티드의 아미노산 서열을 나타내며, "X", "Y" 및 "Z"는 각각 상이한 가정의 아미노산 잔기를 나타낸다. 달리 명시하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 아미노산 서열 동일성(%) 값은 바로 앞선 단락에 기재된 바와 같이 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 얻는다.

"TAT 변이체 폴리뉴클레오티드" 또는 "TAT 변이체 핵산 서열"은 본원에서 정의된 바와 같은 TAT 폴리펩티드, 바람직하게는 활성 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자로서, 본원에 개시된 바와 같은 전장 천연 서열 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 없는 전장 천연 서열 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같이 신호 펩티드가 있거나 없는 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 서열의 임의의 다른 단편 (예를 들어, 전장 TAT 폴리펩티드의 완전한 코딩 서열의 일부분을 나타내는 핵산에 의해 코딩된 단편)을 코딩하는 핵산 서열과의 핵산 서열 동일성이 약 80% 이상이다. 통상적으로, TAT 변이체 폴리뉴클레오티드는 본원에 개시된 바와 같은 전장 천연 서열 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에 기재된 바와 같이 신호 펩티드가 없는 전장 천연 서열 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에 기재된 바와 같이 신호 펩티드가 있거나 없는 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 서열의 임의의 다른 단편을 코딩하는 핵산 서열과의 핵산 서열 동일성이 약 80% 이상, 다르게는 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상일 것이다. 변이체는 천연 뉴클레오티드 서열을 포함하지 않는다.

통상적으로, TAT 변이체 폴리뉴클레오티드의 길이는 뉴클레오티드 약 5개 이상, 다르게는 약 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개, 100개, 105개, 110개, 115개, 120개, 125개, 130개, 135개, 140개, 145개, 150개, 155개, 160개, 165개, 170개, 175개, 180개, 185개, 190개, 195개, 200개, 210개, 220개, 230개, 240개, 250개, 260개, 270개, 280개, 290개, 300개, 310개, 320개, 330개, 340개, 350개, 360개, 370개, 380개, 390개, 400개, 410개, 420개, 430개, 440개, 450개, 460개, 470개, 480개, 490개, 500개, 510개, 520개, 530개, 540개, 550개, 560개, 570개, 580개, 590개, 600개, 610개, 620개, 630개, 640개, 650개, 660개, 670개, 680개, 690개, 700개, 710개, 720개, 730개, 740개, 750개, 760개, 770개, 780개, 790개, 800개, 810개, 820개, 830개, 840개, 850개, 860개, 870개, 880개, 890개, 900개, 910개, 920개, 930개, 940개, 950개, 960개, 970개, 980개, 990개 또는 1,000개 이상이며, 이때 본 문맥에서 용어 "약"은 언급된 뉴클레오티드 서열 길이 ± 이 길이의 10%를 의미한다.

본원에서 확인된 TAT-코딩 핵산 서열과 관련하여 "핵산 서열 동일성(%)은 서열을 정렬하고, 필요하다면, 최대 서열 동일성(%)을 얻기 위해 갭을 도입한 후 대상 TAT 핵산 서열의 뉴클레오티드와 동일한 후보 서열의 뉴클레오티드의 백분율로서 정의된다. 핵산 서열 동일성(%)을 측정하기 위한 정렬은 당업계에 속하는 다양한 방법, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈린 (DNASTAR) 소프트웨어와 같이 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여 달성할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상, 핵산 서열 동일성(%) 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2을 이용하여 구하는데, ALIGN-2 프로그램의 완전한 원시 코드는 하기 표 1에 기재되어 있다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크가 개발하였으며, 표 1에 나타난 원시 코드는 미국 저작권청 (미국 워싱턴 D.C. 20559에 소재)에 사용자 문서로 보관되어 있고, 미국 저작권 등록번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크, 인크 (미국 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코에 소재)를 통해 공개적으로 이용가능하거나, 표 1에 기재된 원시 코드로부터 컴파일할 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 작업 시스템, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D 상에서 컴파일되어 사용될 수 있다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되고 변하지 않는다.

ALIGN-2가 핵산 서열 비교를 위해 사용되는 경우, 주어진 핵산 서열 D에, D와, 또는 D에 대한 주어진 핵산 서열 C (주어진 핵산 서열 D에, D와, 또는 D에 대한 일정한 핵산 서열 동일성(%)을 갖거나 포함하는 주어진 핵산 서열 C라는 어구로 달리 표현할 수 있음)의 핵산 서열 동일성(%)은 하기와 같이 계산한다:

$$W/Z \times 100$$

여기서, W는 C와 D의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일하게 매치되는 것으로 기록되는 뉴클레오타이드의 수이고, Z는 D에 있는 뉴클레오타이드의 총 수이다. 핵산 서열 C의 길이가 핵산 서열 D의 길이와 같지 않은 경우, D에 대한 C의 핵산 서열 동일성(%)은 C에 대한 D의 핵산 서열 동일성(%)과 같지 않음을 인지해야 할 것이다. 핵산 서열 동일성(%) 계산의 예로서, 표 4 및 5는 "TAT-DNA"로 지칭되는 핵산 서열에 대한 "비교 DNA"로 지칭되는 핵산 서열의 핵산 서열 동일성(%)을 계산하는 방법을 나타내며, 여기서 "TAT-DNA"는 가정의 대상 TAT-코딩 핵산 서열을 나타내고, "비교 DNA"는 대상 "TAT-DNA" 핵산 분자와 비교될 핵산 분자의 뉴클레오타이드 서열을 나타내며, "N", "L" 및 "V"는 각각 상이한 가정의 뉴클레오타이드를 나타낸다. 달리 명시하지 않는 한, 본원에 사용된 모든 핵산 서열 동일성(%) 값은 바로 앞선 단락에 기재된 바와 같이 ALIGN-2 컴퓨터 프로그램을 이용하여 얻는다.

다른 실시양태에서, TAT 변이체 폴리뉴클레오타이드는 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자로서, 바람직하게는 엄격 혼성화 조건 및 세척 조건하에서 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있다. TAT 변이체 폴리펩티드는 TAT 변이체 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

용어 "전장 코딩 영역"은 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열과 관련하여 사용되는 경우에 (첨부되는 도면에서 종종 개시 및 종결 코돈 사이에 이를 포함하여 제시된) 본 발명의 전장 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드의 서열을 의미한다. 용어 "전장 코딩 영역"은 ATCC에 기탁된 핵산과 관련하여 사용되는 경우에 (첨부되는 도면에서 종종 개시 및 종결 코돈 사이에 이를 포함하여 제시된) ATCC에 기탁된 벡터에 삽입된 cDNA의 TAT 폴리펩티드-코딩 부분을 의미한다.

"단리된"이 본원에 개시된 다양한 TAT 폴리펩티드를 기재하기 위해 사용되는 경우, 이는 천연 환경 성분으로부터 확인 및 분리 및(또는) 회수된 폴리펩티드를 의미한다. 전형적으로, 상기 폴리펩티드의 천연 환경의 오염 성분은 상기 폴리펩티드가 진단 또는 치료에 사용되는 것을 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 폴리펩티드는 (1) 스피닝 컵 시퀀서 (spinning cup sequenator)의 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 잔기를 15개 이상 얻기에 충분한 정도로, 또는 (2) 쿠마시에 블루 (Coomassie Blue) 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하여 환원 또는 비-환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 하나의 밴드만 나타날 정도로 정제한다. 단리된 폴리펩티드는 재조합 세포내에서 제자리 폴리펩티드를 포함하는데, 이는 TAT 폴리펩티드 천연 환경 성분이 1종 이상 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로 단리된 폴리펩티드는 하나 이상의 정제 단계를 통해 제조될 것이다.

"단리된" TAT 폴리펩티드-코딩 핵산 또는 기타 폴리펩티드-코딩 핵산은 상기 폴리펩티드-코딩 핵산의 천연 공급원 내에서 통상적으로 결합되는 하나 이상의 오염 핵산 분자로부터 확인 및 분리된 핵산 분자이다. 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는 자연계에서 발견되는 형태 또는 환경과는 다르게 존재한다. 따라서, 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는 천연 세포에 존재하는 특정 폴리펩티드-코딩 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는, 예를 들어 천연 세포의 경우와 상이한 염색체 위치에 존재하며 통상적으로 폴리펩티드를 발현하는 세포에 함유된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자를 포함한다.

용어 "조절 서열"은 특정 숙주 유기체에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 의미한다. 원핵생물에 적합한 조절 서열은, 예를 들어 프로모터, 임의로 오퍼레이터 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서(enhancer)를 이용하는 것으로 공지되어 있다.

핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들면, 전서열 (presequence) 또는 분비 리더의 DNA는 해당 폴리펩티드가 그의 분비에 관여하는 전단백질 (preprotein)로서 발현되는 경우 상기 폴리펩티드의 DNA에 작동가능하게 연결되고, 프로모터 또는 인핸서는 해당 폴리펩티드의 코딩 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 상기 코딩 서열에 작동가능하게 연결되며, 리보솜 결합 부위는 코딩 서열의 번역을 촉진하도록 배치될 때 상기 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 통상적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결될 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우에는 인접하여 위치할 뿐만 아니라 동일한 리딩 프레임 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접하여 위치할 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 효소 부위에서의 라이게이션을 통해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우에는 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커를 통상적인 관행에 따라 사용한다.

혼성화 반응의 "엄격도"는 당업자가 용이하게 측정할 수 있으며, 일반적으로 프로브 길이, 세척 온도 및 염 농도에 따라 달라지는 실험적 계산값이다. 일반적으로, 프로브의 길이가 길수록, 적절한 어닐링에 요구되는 온도가 더 높고, 프로브의 길이가 짧을수록, 요구되는 온도가 더 낮다. 일반적으로, 혼성화는 상보적 가닥이 자신들의 융점보다 낮은 환경에 존재할 때 리어닐링되는 변성된 DNA의 능력에 따라 달라진다. 프로브와 혼성화가능한 서열 사이의 목적하는 상동성의 정도가 높을수록, 사용할 수 있는 상대적인 온도가 높아진다. 결과적으로, 상대적 온도가 높아질수록 반응 조건은 더욱 엄격해지는 반면, 상대적 온도가 낮을수록 반응 조건은 덜 엄격해진다. 혼성화 반응의 엄격도와 관련한 더 상세한 정보 및 설명은 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers (1995)]을 참조한다.

본원에서 정의된 바와 같은 "엄격 조건" 또는 "고엄격 조건"은 (1) 세척시 이온 농도가 낮고 온도가 높은 조건, 예를 들어 50°C에서 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산나트륨/0.1% 나트륨 도데실 황페이트를 사용하는 조건, (2) 혼성화시에 42°C에서 포름아미드, 예를 들어 0.1% 소혈청 알부민/0.1% 피콜/0.1% 폴리비닐피롤리돈/750 mM 염화나트륨, 75 mM 시트르산나트륨이 함유된 50 mM 인산나트륨 완충액 (pH 6.5)을 함유하는 50% (v/v) 포름아미드와 같은 변성제를 사용하는 조건, 또는 (3) 42°C에서 50% 포름아미드, 5 ×SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5 ×덴하르트 (Denhardt's) 용액, 초음파처리된 연어 정자 DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS 및 10% 텍스트란 황페이트를 사용하여 용액 중에서 밤새 혼성화한 다음, 42°C에서 0.2 ×SSC (염화나트륨/시트르산나트륨)로 10분간 세척한 후에, 55°C에서 EDTA가 함유된 0.1 ×SSC를 이용하여 10분간 고엄격 세척을 수행하는 조건이다.

"중간 정도의 엄격 조건"은 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press 1989]에 기재된 바와 같이 확인할 수 있으며, 상기한 것보다 덜 엄격한 세척 용액 및 혼성화 조건 (예를 들어, 온도, 이온 농도 및 SDS의 비율(%))의 사용을 포함한다. 중간 정도의 엄격 조건의 예는 20% 포름아미드, 5 ×SSC (150 mM NaCl, 15 mM 시트르산삼나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5 ×덴하르트 용액, 10% 텍스트란 황페이트 및 20 mg/ml의 연어 정자의 절단된 변성 DNA를 포함하는 용액 중에서 37°C에서 밤새 인큐베이션한 후, 필터를 약 37 내지 50°C에서 1 ×SSC로 세척하는 조건이다. 당업자라면, 프로브 길이 등과 같은 인자에 맞춰 필요한 온도, 이온 농도 등을 조절하는 방법을 인지할 것이다.

본원에 사용된 용어 "에피토프 태그가 부착된"은 "태그 폴리펩티드"에 융합된 TAT 폴리펩티드 또는 항-TAT 항체를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 의미한다. 태그 폴리펩티드는 항체가 만들어질 수 있을 정도의 에피토프를 제공하기에 충분한 잔기를 갖지만 융합될 TAT 폴리펩티드의 활성을 방해하지 않을 정도로 충분히 짧다. 또한, 태그 폴리펩티드는 자신에 대한 항체가 다른 에피토프와는 실질적으로 교차반응하지 않도록 아주 독특한 것이 바람직하다. 일반적으로, 적합한 태그 폴리펩티드의 아미노산 잔기는 6개 이상이며, 보통은 약 8 내지 50개 (바람직하게는 약 10 내지 20개)이다.

본원의 목적상, "활성의" 또는 "활성"은 천연 또는 자연 발생적인 TAT 폴리펩티드의 생물학적 및(또는) 면역학적 활성을 보유하는 TAT 폴리펩티드의 형태를 의미하는데, 여기서 "생물학적" 활성이란 천연 또는 자연 발생적인 TAT에 있는 항원성 에피토프에 대한 항체 제조를 유도하는 능력이 아니라, 천연 또는 자연 발생적인 TAT에 의한 생물학적 기능 (억제 기능 또는 자극 기능)을 말하며, "면역학적" 활성이란 천연 또는 자연 발생적인 TAT에 있는 항원성 에피토프에 대한 항체 제조를 유도하는 능력을 의미한다.

용어 "길항제"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 본원에 개시된 천연 TAT 폴리펩티드의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단, 억제 또는 중화시키는 임의의 분자를 포함한다. 이와 유사한 방식으로, 용어 "아고니스트"도 가장 넓은 의미로 사용되며, 본원에 개시된 천연 TAT 폴리펩티드의 생물학적 활성을 모방하는 임의의 분자를 통칭한다. 적합한 아고니스트 또는 길항제 분자로 는 구체적으로 아고니스트 또는 길항제의 항체 또는 항체 단편, 천연 TAT 폴리펩티드의 단편 또는 아미노산 서열 변이체, 펩티드, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 유기 소분자 등이 있다. TAT 폴리펩티드의 아고니스트 또는 길항제를 확인하는 방법은 TAT 폴리펩티드를 후보 아고니스트 분자 또는 후보 길항제 분자와 접촉시키는 단계, 및 TAT 폴리펩티드와 정상적으로 관련된 하나 이상의 생물학적 활성에서 검출가능한 변화를 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

"치료하는", "치료" 또는 "완화"는 치료 처치와 예방 조치 또는 예방적 조치 모두를 의미하는데, 이는 표적화된 병리학적 증상 또는 질환을 예방하거나 경감(감소)시키는 것이 목적이다. 치료가 필요한 대상에는 이미 질환을 앓는 대상뿐만 아니라, 질환을 앓기 쉬운 대상 또는 질환이 예방되어야 하는 대상이 포함된다. 본 발명의 방법에 따라 치료 유효량의 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자가 투여된 후, 암세포 수의 감소 또는 암세포의 부재; 종양 크기의 감소; 연조직 및 뼈로 암이 퍼지는 것을 비롯하여 말초 기관으로의 암세포 침윤의 억제 (즉, 어느 정도 느려지고 바람직하게는 멈추는 것); 종양 전이의 억제 (즉, 어느 정도 느려지고 바람직하게는 멈추는 것); 종양 성장의 어느 정도까지의 억제;

및(또는) 특정 암과 관련된 1종 이상의 증상의 어느 정도까지의 경감; 이환률 및 사망률 감소 및 삶의 질 개선 중 1가지 이상이 환자에서 관찰가능하고(하거나) 측정가능한 정도로 감소되거나 나타나지 않는 경우, 상기 대상 또는 포유동물은 TAT 폴리펩티드-발현 암에 대해 성공적으로 "치료된" 것이다. 항-TAT 항체 또는 TAT 결합 올리고펩티드가 기존 암세포의 성장을 방해하고(하거나) 기존 암세포를 사멸시킬 수 있는 정도이면, 이는 세포정지 및(또는) 세포독성을 나타낼 수 있다. 이러한 징후 또는 증상의 감소는 환자도 느낄 수 있다.

성공적인 치료 및 질환의 호전을 평가하기 위한 상기 파라미터는 의사에게 공지된 통상의 방법으로 용이하게 측정할 수 있다. 암 요법의 경우, 효능은, 예를 들어 질환 진행에 소요되는 시간 (TTP)을 평가하고(하거나) 반응율 (RR)을 결정함으로써 측정할 수 있다. 전이는 질병단계 결정 시험 및 칼슘 수준 및 기타 효소에 대한 뼈 스캔과 시험에 의해 측정하여 암이 뼈로 퍼졌는지를 측정할 수 있다. CT 스캔을 수행하여 암이 골반 및 림프절에 퍼져있는지를 알아볼 수도 있다. 흉부 X-선 및 공지된 방법에 의한 간 효소 수준의 측정을 이용하여 폐 및 간 각각에 전이되었는지를 확인한다. 상기 질환을 모니터링하기 위한 다른 통상적인 방법은 경직장 초음파검사법 (TRUS) 및 경직장 침 생검법 (TRNB)을 포함한다.

보다 국한된 암인 방광암의 경우, 질환의 진행을 측정하는 방법은 방광경검사에 의한 비뇨기 세포 검사, 소변 중의 혈액의 존재에 대한 모니터링, 음파 홀로그래피 또는 정맥내 신우 촬영에 의한 요로상피관의 관찰, 컴퓨터 단층촬영 (CT) 및 자기공명 영상법 (MRI)을 포함한다. 원위부 전이의 존재는 복부 CT, 흉부 X-선 또는 골격의 방사성핵종 영상화로 조사할 수 있다.

"만성" 투여는 초기 치료 효과 (활성)가 연장된 기간 동안 유지되도록 급성 방식과 반대로 연속 방식으로 작용제를 투여하는 것을 의미한다. "간헐적" 투여는 중단하지 않고 연속해서 수행하는 것이라기 보다는 주기적으로 수행하는 것이 특징인 치료법이다.

암을 치료하거나 암의 증상을 완화시키기 위한 "포유동물"은 인간, 가축 및 축산용 동물, 동물원 동물, 경기용 동물 또는 애완용 동물, 예를 들어 개, 고양이, 소, 말, 양, 돼지, 염소, 토끼 등을 비롯한 포유동물로 분류되는 임의의 동물을 의미한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

1종 이상의 추가의 치료제와 "병용" 투여는 동시 (함께) 투여하는 것 및 임의의 순서로 연속 투여하는 것을 포함한다.

본원에 사용된 바와 같이 "담체"에는 사용된 투여량 및 농도에서 그에 노출된 세포 또는 포유동물에 무독성인 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화가 포함된다. 종종 생리학적으로 허용가능한 담체는 pH 완충 수용액이다. 생리학적으로 허용가능한 담체의 예로는 인산, 시트르산 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산을 비롯한 항산화제; 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 라이신과 같은 아미노산; 당당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이팅제; 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당 알콜; 나트륨과 같은 염-형성 카운터 이온; 및(또는) TWEEN (등록상표), 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 및 PLURONICS (등록상표)과 같은 비이온성 계면활성제가 포함된다.

"고상 (solid phase)" 또는 "고체 지지체"는 본 발명의 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자가 접착 또는 부착될 수 있는 비수성 매트릭스를 의미한다. 본원에 포함되는 고상의 예로는 부분적으로 또는 완전하게 유리 (예를 들어, 조절된 공극 유리)로 형성된 고상, 다당류 (예를 들어, 아가로스), 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 폴리비닐 알콜 및 실리콘이 포함된다. 특정 실시양태에서, 내용에 따라 고상은 분석용 플레이트의 웰을 포함할 수 있으며, 다른 실시양태에서 고상은 정제용 컬럼 (예를 들어, 친화성 크로마토그래피 컬럼)이다. 이 용어는 또한 미국 특허 제4,275,149호에 기재된 것과 같은 별개 입자의 비연속적 고상도 포함한다.

"리포솜"은 약물 (예를 들어, TAT 폴리펩티드 또는 그에 대한 항체 또는 TAT 결합 올리고펩티드)을 포유동물에게 전달하는데 유용한 여러 유형의 지질, 인지질 및(또는) 계면활성제로 구성된 소형 소포이다. 통상적으로, 리포솜의 성분들은 생체막의 지질 배열과 유사한 이중층 형태로 배열되어 있다.

"소"분자 또는 유기 "소"분자는 본원에서 분자량이 약 500 달톤 미만인 것으로 정의된다.

본원에 개시된 바와 같은 폴리펩티드, 항체, TAT 결합 올리고펩티드, TAT 결합 유기 분자 또는 그의 아고니스트 또는 길항제의 "유효량"은 구체적으로 언급한 목적 수행에 충분한 양이다. 언급한 목적과 관련하여, "유효량"은 경험적으로 및 통상적인 방식으로 결정할 수 있다.

용어 "치료 유효량"은 대상 또는 포유동물에서 질병 또는 질환의 "치료"에 효과적인 항체, 폴리펩티드, TAT 결합 올리고펩티드, TAT 결합 유기 분자 또는 다른 약물의 양을 의미한다. 암의 경우, 치료 유효량의 약물은 암세포 수의 감소; 종양 크기의 감소; 말초 기관으로의 암세포 침윤의 억제 (즉, 어느 정도 느려지고 바람직하게는 멈추는 것); 종양 전이의 억제 (즉, 어느 정도 느려지고 바람직하게는 멈추는 것); 종양 성장의 어느 정도까지의 억제; 및(또는) 상기 암과 관련된 1종 이상의 증상의 어느 정도까지의 경감을 가능하게 할 수 있다. 본원에서의 "치료"의 정의를 참조한다. 기존 암세포의 성장을 방해하고(하거나) 기존 암세포를 사멸시킬 수 있는 정도이면, 이는 세포정지 및(또는) 세포독성을 나타낼 수 있다.

항-TAT 항체, TAT 폴리펩티드, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자의 "성장억제량"은 시험관내 또는 생체내에서 세포, 특히 종양, 예를 들어 암세포의 성장을 억제할 수 있는 양이다. 신생물성 세포 성장을 억제하기 위한, 항-TAT 항체, TAT 폴리펩티드, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자의 "성장억제량"은 경험적으로 및 통상적인 방식으로 결정할 수 있다.

항-TAT 항체, TAT 폴리펩티드, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자의 "세포독성량"은 시험관내 또는 생체내에서 세포, 특히 종양, 예를 들어 암세포의 파괴를 유발할 수 있는 양이다. 신생물성 세포 성장을 억제하기 위한 항-TAT 항체, TAT 폴리펩티드, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자의 "세포독성량"은 경험적으로 및 통상적인 방식으로 결정할 수 있다.

용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 구체적으로는, 예를 들어 목적하는 생물학적 또는 면역학적 활성을 나타내는 한 단일 항-TAT 모노클로날 항체 (아고니스트, 길항제 및 중화 항체 포함), 폴리에피토프 특이성을 갖는 항-TAT 항체 조성물, 폴리클로날 항체, 단쇄 항-TAT 항체 및 항-TAT 항체의 단편 (하기 참조)을 포함한다. 용어 "면역글로불린" (Ig)은 본원에서 "항체"와 상호교환 가능하게 사용된다.

"단리된 항체"는 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및(또는) 회수된 항체이다. 천연 환경의 오염 성분은 항체가 진단 또는 치료에 사용되는 것을 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리 (Lowry) 방법으로 측정시 항체의 95 중량%를 초과하는 정도, 가장 바람직하게는 99 중량%를 초과하는 정도로, (2) 스피닝 컵 시퀀네이터 사용에 의해 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 잔기 15 개 이상을 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시에 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하여 환원 또는 비-환원 조건 하에 SDS-PAGE에 의해 하나의 밴드만 나타날 정도로 정제한다. 단리된 항체에는 재조합 세포내의 제자리 항체가 포함되는데, 이는 항체 천연 환경 성분이 1종 이상 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 1회 이상의 정제 단계를 통해 제조될 것이다.

기본적인 4-쇄 항체 단위는 두 개의 동일한 경쇄 (L)와 두 개의 동일한 중쇄 (H)로 구성되는 이종사량체 당단백질이다 (IgM 항체는 J쇄라 불리는 추가의 폴리펩티드와 함께 5개의 기본적인 이종사량체 단위로 구성되어 있으므로 10개의 항원 결합 부위를 함유하지만, 분비되는 IgA 항체는 중합되어 J쇄와 함께 기본적인 4-쇄 단위를 2 내지 5개 포함하는 다량체를 형성할 수 있음). IgG의 경우, 4-쇄 단위는 대체적으로 약 150,000 달톤이다. 각 L쇄는 하나의 공유결합성 디설피드 결합에 의해 H쇄에 연결되어 있지만, 두 개의 H쇄는 H쇄 이소타입 (isotype)에 따라 하나 이상의 디설피드 결합에 의해 서로와 연결되어 있다. 또한, 각 H쇄 및 L쇄에는 일정한 간격을 두고 떨어져 있는쇄내 디설피드 가교도 존재한다. 각 H쇄의 N-말단에는 가변 도메인 (V_H)이 있고, 이 도메인 다음에는 α 및 γ 쇄 각각의 경우에는 3개의 불변 도메인 (C_H)이 있고, μ 및 ϵ 이소타입의 경우에는 4개의 C_H 도메인이 있다. 각 L쇄의 N-말단에는 가변 도메인 (V_L)이 있고, 반대쪽 말단에는 불변 도메인 (C_L)이 있다. V_L 은 V_H 와 정렬되어 있고, C_L 은 중쇄의 제1 불변 도메인 (C_H1)과 정렬되어 있다. 특정 아미노산 잔기가 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 사이의 경계면을 형성하는 것으로 여겨진다. V_H 와 V_L 의 페어링 (pairing)은 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 여러 클래스에 속하는 항체의 구조 및 성질에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6]을 참조한다.

임의의 척추동물 종의 L쇄는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라 카파 및 람다로 불리는 명백히 다른 2가지 유형 중 하나일 수 있다. 면역글로불린은 중쇄의 불변 도메인 (C_H)의 아미노산 서열에 따라 다양한 클래스 또는 이소타입으로 분류될 수 있다. 5가지 클래스의 면역글로불린, 즉 각각 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 지칭되는 중쇄가 있는 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있다. γ 및 α 클래스는 C_H 서열 및 기능에 있어서의 상대적으로 작은 차이점을 기초로 하여 서브클래스로 더 분류되는데, 예를 들어 인간은 서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2를 발현한다.

용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 단편들이 항체들 사이에서 광범위한 서열 상이성을 나타낸다는 사실을 의미한다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 한정한다. 그러나, 이러한 가변성이 가변 도메인의 110개 아미노산 전반에 걸쳐 고르게 분포되어 있는 것은 아니다. 대신에, V 영역은 길이가 9 내지 12개 아미노산이며 가변성이 극도로 높아 "초가변 영역"으로 불리는 보다 짧은 영역에 의해 분리되어 있는, 15 내지 30개 아미노산으로 구성된 프레임워크 영역 (framework region, FR)으로 불리는 비교적 불변성인 스트레치로 구성된다. 천연 중쇄 및 경쇄 각각의 가변 도메인은 주로 β -시트 구조를 취하며 3개의 초가변 영역으로 연결되어 있는 4개의 FR을 포함하는데, 상기 FR은 β -시트 구조를 연결하고, 몇몇 경우에는 상기 β -시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각 쇄에서의 초가변 영역들은 FR에 의해 서로 근접하게 위치되어 있고, 다른 쇄로부터의 초가변 영역은 항체의 항원-결합 부위 형성에 기여한다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 참조). 불변 도메인은 항체를 항원에 결합시키는 데는 직접 관여하지 않지만, 항체-의존성 세포에 의해 매개된 세포독성(ADCC)에 항체가 참여하는 것과 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.

본원에 사용된 용어 "초가변 영역"은 항원-결합을 담당하는, 항체의 아미노산 잔기를 의미한다. 일반적으로, 이러한 초가변 영역은 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, V_L 내의 잔기 약 24 내지 34 (L1), 50 내지 56 (L2) 및 89 내지 97 (L3) 부근 및 V_H 내의 잔기 약 1 내지 35 (H1), 50 내지 65 (H2) 및 95 내지 102 (H3) 부근 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)] 및(또는) "초가변 루프"로부터의 아미노산 잔기 (예를 들어, V_L 내의 잔기 26 내지 32 (L1), 50 내지 52 (L2) 및 91 내지 96 (L3) 및 V_H 내의 잔기 26 내지 32 (H1), 53 내지 55 (H2) 및 96 내지 101 (H3) [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)])를 포함한다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 의미하는데, 즉 이러한 집단을 구성하는 개개의 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생적인 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원성 부위에 대해 고도로 특이적이다. 또한, 여러 결정인자 (에피토프)에 대해 지시된 여러 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 반대로, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정인자에 대해 지시된다. 이러한 특이성 이외에도, 모노클로날 항체는 이들이 다른 항체에 의해 오염되지 않은 채로 합성될 수 있다는 점에서 유리하다. 수식어구 "모노클로날"은 임의의 특정한 방법을 통한 항체 제조가 필요하다는 의미로 해석되어서는 안된다. 예를 들면, 본 발명에 유용한 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 처음으로 기재되었던 하이브리도마 방법으로 제조할 수 있거나, 또는 박테리아, 진핵동물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법 [예를 들어, 미국 특허 제 4,816,567호 참조]으로 제조할 수 있다. 또한, "모노클로날 항체"는, 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 이용하여 파지 (phage) 항체 라이브러리로부터 분리할 수도 있다.

본원에서의 모노클로날 항체에는 중쇄 및(또는) 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되었거나 특정한 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성이 있으며, 상기 쇄의 나머지 부분은 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한 다른 종으로부터 유래되었거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 뿐만 아니라, 상기 항체 단편의 상응하는 서열과 동일하거나 이와 상동성이 있는 "키메라" 항체가 포함된다 (미국 특허 제 4,816,567호; 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)] 참조). 본원에서 대상 키메라 항체로는 비-인간 영장류 (예를 들어, 구세계 원숭이, 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체가 있다.

"원형" 항체는 항원 결합 부위뿐만 아니라 C_L 및 중쇄 불변 도메인 C_H1 , C_H2 및 C_H3 중 하나 이상을 포함하는 항체이다. 이러한 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 원형 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 갖는 것이 바람직하다.

"항체 단편"은 원형 항체의 일부, 바람직하게는 원형 항체의 항원 결합 영역 또는 그의 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디 (diabody); 선형 항체 (미국 특허 제 5,641,870호의 실시예 2, [Zapata et al., Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)] 참조); 단쇄 항체 분자; 및 항체 단편들로부터 형성된 다중 특이적 항체가 있다.

항체를 과파인으로 절단하면 "Fab" 단편이라고 불리는 두 개의 동일한 항원-결합 단편 및 나머지 "Fc" 단편 (이러한 명칭은 용이하게 결정화되는 능력을 반영함)이 생성된다. Fab 단편은 H쇄의 가변 영역 도메인 (V_H) 및 한 중쇄의 제1 불변 도

메인 (C_H1)과 L쇄 전체로 구성된다. 각 Fab 단편은 항원 결합에 대해 1가, 즉 단일 항원-결합 부위를 갖는다. 항체의 펩신 처리는 2가 항원-결합 활성을 나타내는, 2개의 디설피드 결합된 Fab 단편에 대략 상응하며, 항원을 여전히 가교결합할 수 있는 커다란 단일 $F(ab')_2$ 단편을 생성시킨다. 또한, Fab' 단편은 항체 힌지 (hinge) 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인이 존재하는 것을 비롯하여 C_H1 도메인의 카르복시-말단에 수개의 잔기가 추가로 부가되어 있다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. 본원에서, Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기에 유리 티올기를 보유하는 Fab'에 대한 명칭이다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 본래, Fab' 단편들 사이에 힌지 시스테인이 있는, Fab' 단편들의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 기타 화학적 커플링 또한 공지되어 있다.

Fc 단편은 디설피드 결합에 의해 함께 결합되어 있는 H쇄 두개 모두의 카르복시-말단 부분을 포함한다. 항체의 이펙터 기능은 Fc 영역의 서열에 의해 결정되는데, 이 영역은 특정 유형의 세포에서 발견되는 Fc 수용체 (FcR)에 의해 인식되는 부위이기도 하다.

"Fv"는 완전한 항원-인식 부위 및 항원-결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 1개의 중쇄 가변 영역 도메인과 1개의 경쇄 가변 영역 도메인이 비-공유 결합으로 서로 단단하게 연결되어 있는 이량체로 구성된다. 이들 두 도메인이 폴딩되어 6개의 추가변 루프 (H쇄 및 L쇄로부터 각각 3개의 루프)가 형성되는데, 상기 루프는 항원 결합을 위한 아미노산 잔기를 제공하고 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 1개의 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 CDR을 단지 3개만 포함하는 Fv의 절반)일지라도 전체 결합 부위보다 친화성이 낮은 하지만 항원을 인식하고 결합할 수 있는 능력을 갖고 있다.

"sFv" 또는 "scFv"로도 약칭되는 "단쇄 Fv"는 단일 폴리펩티드 쇄로 연결되어 있는 V_H 및 V_L 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. sFv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합을 위한 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 해주는, V_H 도메인과 V_L 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 추가로 포함하는 것이 바람직하다. sFv의 개관을 위해서는 문헌 [Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp.269-315 (1994)] 및 [Borrebaeck 1995, 하기 문헌]을 참조한다.

용어 "디아바디"는 V_H 도메인과 V_L 도메인 사이에 짧은 링커 (약 5 내지 10개의 잔기)가 있는 sFv 단편 (상기 단락 참조)을 제작하여 V 도메인들의 쇄내 페어링이 아닌 쇄간 페어링을 형성시킴으로써 2가 단편, 즉 2개의 항원-결합 부위가 있는 단편을 생성시켜 제조한 작은 항체 단편을 의미한다. 이중특이적 디아바디는 2개 항체의 V_H 도메인 및 V_L 도메인이 상이한 폴리펩티드 쇄에 존재하는 2개의 "교차" sFv 단편으로 구성된 이중이량체이다. 디아바디는 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 더욱 상세하게 기재되어 있다.

비-인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 항체로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 추가변 영역의 잔기가 목적하는 항체 특이성, 친화성 및 능력을 보유하는 마우스, 래트, 토끼 또는 비-인간 영장류 등의 비-인간 종 (공여 항체)의 추가변 영역의 잔기로 대체된 인간 면역글로불린 (수용 항체)이다. 몇몇 경우에는, 인간 면역글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기를 상응하는 비-인간 잔기로 대체한다. 또한, 인간화 항체는 수용 항체 또는 공여 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 더 증진시킨다. 일반적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것인데, 여기서 전체 또는 실질적으로 전체 추가변 루프는 비-인간 면역글로불린의 추가변 루프에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 면역글로불린 서열의 FR이다. 또한, 인간화 항체는 임의로는 면역글로불린 불변 영역 (Fc) 중 적어도 일부, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 적어도 일부를 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)], [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)] 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

"중-의존성 항체", 예를 들어 포유동물 항-인간 IgE 항체는 제1 포유동물 종으로부터의 항원에 대한 결합 친화성이 제2 포유동물 종으로부터의 항원의 상동체에 대한 결합 친화성 보다 더 강한 항체이다. 통상적으로, 중-의존성 항체는 인간 항원에 "특이적으로 결합" (즉, 결합 친화성 (Kd) 값이 단지 약 1×10^{-7} M, 바람직하게는 단지 약 1×10^{-8} M, 가장 바람직하게는 단지 약 1×10^{-9} M임)하지만, 제2의 비-인간 포유동물 종으로부터의 항원의 상동체에 대한 결합 친화성은 인간 항원에 대한 결합 친화성 보다 약 50배 이상 또는 약 500배 이상 또는 약 1,000배 이상 더 약하다. 중-의존성 항체는 상기에서 정의된 바와 같은 다양한 유형의 항체 중 임의의 항체일 수 있으나, 바람직하게는 인간화 항체 또는 인간 항체이다.

"TAT 결합 올리고펩티드"는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드에, 바람직하게는 특이적으로 결합하는 올리고펩티드이다. TAT 결합 올리고펩티드는 공지된 올리고펩티드 합성법을 사용하여 화학적으로 합성할 수도 있고 또는 재조합 기술을 사용하여 제조 및 정제할 수도 있다. 통상적으로, TAT 결합 올리고펩티드의 길이는 아미노산 약 5개 이상, 다르게는 약 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 44개, 45개, 46개, 47개, 48개, 49개, 50개, 51개, 52개, 53개, 54개, 55개, 56개, 57개, 58개, 59개, 60개, 61개, 62개, 63개, 64개, 65개, 66개, 67개, 68개, 69개, 70개, 71개, 72개, 73개, 74개, 75개, 76개, 77개, 78개, 79개, 80개, 81개, 82개, 83개, 84개, 85개, 86개, 87개, 88개, 89개, 90개, 91개, 92개, 93개, 94개, 95개, 96개, 97개, 98개, 99개 또는 100개 이상이며, 이러한 올리고펩티드는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드에, 바람직하게는 특이적으로 결합할 수 있다. TAT 결합 올리고펩티드는 공지된 기술을 사용하여 과도한 실험 없이 확인할 수 있다. 이와 관련하여, 폴리펩티드 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고펩티드에 대한 올리고펩티드 라이브러리의 스크리닝 기술이 당업계에 공지되어 있음을 주지한다 (예를 들어, 미국 특허 제5,556,762호, 동 제5,750,373호, 동 제4,708,871호, 동 제4,833,092호, 동 제5,223,409호, 동 제5,403,484호, 동 제5,571,689호, 동 제5,663,143호, PCT 공개공보 WO 84/03506 및 WO 84/03564, [Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984)], [Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)], [Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)], [Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)], [Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988)], [Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378], [Lowman, H. B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832], [Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352:624], [Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581], [Kang, A. S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363] 및 [Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668] 참조).

"TAT 결합 유기 분자"는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드에, 바람직하게는 특이적으로 결합하는, 본원에서 정의한 바와 같은 올리고펩티드 또는 항체가 아닌 유기 분자이다. TAT 결합 유기 분자는 공지된 방법을 이용하여 확인하고 화학적으로 합성할 수 있다 (예를 들어, PCT 공개공보 WO 00/00823 및 WO 00/39585 참조). 통상적으로, TAT 결합 유기 분자의 크기는 약 2,000 달톤 미만, 다르게는 약 1,500 달톤, 750 달톤, 500 달톤, 250 달톤 또는 200 달톤 미만이며, 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드에 바람직하게는 특이적으로 결합할 수 있는 이러한 유기 분자는 공지된 기술을 사용하여 과도한 시행착오 없이 확인할 수 있다. 이와 관련하여, 폴리펩티드 표적에 결합할 수 있는 분자에 대한 유기 분자 라이브러리를 스크리닝하는 기술은 당업계에 공지되어 있음을 주지한다 (예를 들어, PCT 공개공보 WO 00/00823 및 WO 00/39585 참조).

대상 항원, 예를 들어 종양-관련 폴리펩티드 항원 표적에 "결합"하는 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자는 상기 항원에 충분한 친화성으로 결합하여, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자는 상기 항원을 발현하는 세포의 표적화에 진단제 및(또는) 치료제로서 유용하고 다른 단백질과 유의한 교차반응하지 않는다. 이러한 실시양태에서, 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자와 "비-표적" 단백질과의 결합 정도는 형광 활성화 세포 분류법 (FACS) 분석 또는 방사성면역침전법 (RIA)으로 측정된 상기 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자와 그의 특정 표적 단백질과의 결합의 약 10% 미만일 것이다. 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자의 표적 분자로의 결합과 관련하여, 용어 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 표적 상의 에피토프에 대한 "특이적 결합," "그에 특이적으로 결합하는" 또는 "그에 특이적인"은 비-특이적 상호작용과 측정가능하게 상이한 결합을 의미한다. 특이적 결합은, 예를 들어 분자의 결합을 일반적으로 결합 활성을 보유하지 않는 유사한 구조의 분자인 조절 분자의 결합과 비교하여 결정함으로써 측정할 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합은 표적, 예를 들어, 과량의 비표지된 표적과 유사한 조절 분자와의 경쟁에 의해 측정할 수 있다. 이 경우에, 프로브에 대한 표지된 표적의 결합이 과량의 비표지된 표적에 의해 경쟁적으로 억제되는 경우에 특이적 결합이 나타난다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 표적 상의 에피토프에 대한 "특이적 결합," "그에 특이적으로 결합하는" 또는 "그에 특이적인"은 예를 들어 표적에 대한 Kd가 약 10^{-4} M 이상, 다르게는 약 10^{-5} M 이상, 다르게는 약 10^{-6} M 이상, 다르게는 10^{-7} M 이상, 다르게는 약 10^{-8} M 이상, 다르게는 약 10^{-9} M 이상, 다르게는 약 10^{-10} M 이상, 다르게는 약 10^{-11} M 이상, 다르게는 약 10^{-12} M 이상, 또는 그 이상인 분자에 의해 나타낼 수 있다. 한 실시양태에 있어서, 용어 "특이적 결합"은 분자가 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프에 대해 실질적으로 결합하지 않으면서 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 상의 에피토프에 결합하는 결합을 의미한다.

"TAT 폴리펩티드를 발현하는 종양 세포의 성장을 억제하는" 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자 또는 "성장억제" 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자는 적절한 TAT 폴리펩티드를 발현하거나 과발현하는 암세포에 결합하여 측정가능하게 성장을 억제하는 것이다. TAT 폴리펩티드는 암세포의 표면에서 발현되는 막횡단 폴리펩티드이거나, 암세포에 의해 생산 및 분비되는 폴리펩티드일 수 있다. 바람직한 성장억제성 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 적절한 대조군에 비해 TAT-발현 종양 세포의 성장을 20% 초과, 바람직하게는 약 20% 내지 약 50%, 훨씬 더 바람직하게는

50% 초과 (예를 들어, 약 50% 내지 약 100%) 억제하며, 여기서 대조군은 전형적으로 시험될 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자를 처리하지 않은 종양 세포이다. 한 실시양태에서, 성장억제는 세포 배양물 중에서 약 0.1 내지 30 $\mu\text{g/ml}$ 또는 약 0.5 nM 내지 200 nM의 항체 농도에서 측정할 수 있는데, 이때 성장억제는 종양 세포를 항체에 노출시키고 1 내지 10일 후 측정한다. 생체내 종양 세포의 성장억제는 하기 실시예 단락에 기재된 바와 같은 다양한 방법으로 측정할 수 있다. 체중 1 kg 당 약 1 μg 내지 약 100 mg의 항-TAT 항체를 투여했을 때 항체의 1차 투여로부터 약 5일 내지 3개월, 바람직하게는 약 5일 내지 30일 이내에 종양 크기 또는 종양 세포의 증식이 감소되는 경우, 상기 항체는 생체내에서 성장억제 효과를 나타낸다고 한다.

"아포토시스 (apoptosis)를 유도하는" 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자는 아넥신 V의 결합, DNA의 단편형성 (fragmentation), 세포 수축, 소포체의 팽창, 세포 단편형성 및(또는) 막 소포 (아포토시스체로 불림)의 형성으로 측정되는 바와 같이 계획된 세포 사멸을 유도하는 것이다. 통상적으로, 이러한 세포는 TAT 폴리펩티드를 과발현하는 세포이다. 바람직하게는, 상기 세포는 종양 세포, 예를 들어 전립선 종양 세포, 유방 종양 세포, 난소 종양 세포, 위 종양 세포, 자궁내막 종양 세포, 폐 종양 세포, 신장 종양 세포, 결장 종양 세포, 방광 종양 세포이다. 다양한 방법을 이용하여 아포토시스와 연관된 세포 반응을 평가할 수 있다. 예를 들면, 포스파티딜 세린 (PS) 전위는 아넥신 결합에 의해 측정할 수 있고, DNA 단편형성은 DNA 래더링 (laddering)을 통해 평가할 수 있으며, DNA 단편형성과 함께 일어나는 핵/염색질 응집은 하이포디플로이드 (hypodiploid) 세포의 임의의 증가에 의해서 확인할 수 있다. 바람직하게는, 아포토시스를 유도하는 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자는 아넥신 결합 분석에서 비처리 세포에 비해 아넥신 결합을 약 2 내지 50배, 바람직하게는 약 5 내지 50배, 가장 바람직하게는 약 10 내지 50배만큼 유도하는 것이다.

항체의 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 말하고, 항체 이소타입에 따라 달라진다. 항체 이펙터 기능의 예로는 C1q 결합; 보체-의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포에 의해 매개된 세포독성 (ADCC); 대식작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절 및 B 세포 활성화가 있다.

"항체-의존성 세포에 의해 매개된 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정한 세포독성 세포 (예를 들어, 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포) 상에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비 Ig가 이들 세포독성 이펙터 세포가 항원을 보유하는 표적 세포에 특이적으로 결합한 후, 상기 표적 세포를 세포독소로 사멸시킬 수 있게 하는 세포독성 형태를 의미한다. 항체는 세포독성 세포의 "무기"이고 이러한 세포 사멸에 절대적으로 필요하다. ADCC를 매개하는 1차 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ R II 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991)]의 464쪽의 표 3에 요약되어 있다. 대상 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, 미국 특허 제5,500,362호 또는 동 제5,821,337호에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 이러한 분석에 유용한 이펙터 세포에는 말초혈 단핵 세포 (PBMC) 및 천연 킬러 (NK) 세포가 포함된다. 별법으로 또는 추가로, 대상 분자의 ADCC 활성은 문헌 [Clynes et al., (USA) 95:652-656 (1998)] 등에 개시된 바와 같은 동물 모델 등에서 생체내 평가할 수 있다.

"Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역과 결합되는 수용체를 의미한다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 또한, 바람직한 FcR은 IgG 항체와 결합하는 수용체 (감마 수용체)이고, 이것으로는 Fc γ RI, Fc γ R II 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체가 포함되는데, 이는 이들 수용체의 대립유전자 변이체와 다르게 스플라이싱된 형태를 포함한다. Fc γ R II 수용체에는 주로 그의 세포질 도메인이 여러가지 유사한 아미노산 서열을 갖는, Fc γ RIIA ("활성화 수용체")와 Fc γ RIIB ("억제 수용체")가 포함된다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재의 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재의 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 (개관을 위해서는 문헌 [M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)]을 참조). FcR에 대한 개관을 위해서는 문헌 ([Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)], [Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994)] 및 [de Haas et al, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)]을 참조한다. 추후로 확인될 것을 포함하는 기타 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 상기 용어에는 모체 IgG를 태아에게 전달시키는 신생아 수용체 FcRn도 포함된다 ([Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)]).

"인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 이러한 세포는 적어도 R γ RIII를 발현하고 ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예로는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 천연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구가 있지만, PBMC와 NK 세포가 바람직하다. 이펙터 세포는 천연 공급원, 예를 들어 혈액으로부터 분리할 수 있다.

"보체-의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에서의 표적 세포의 용해를 의미한다. 고전적인 보체 활성화 경로는 보체의 동종 항원과 결합한 (적절한 서브클래스의) 항체에 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)이 결합됨으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위하여, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 분석을 수행할 수 있다.

용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장을 특징으로 하는, 포유동물의 생리학적 상태를 의미한다. 암의 예로는 암종, 림프종, 아세포종, 육종 및 백혈병 또는 림프계 악성 종양이 있으나, 이에 한정되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예로는 편평세포암 (예를 들어, 상피 편평세포암), 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포암종을 비롯한 폐암, 복막암, 간암, 위장암을 비롯한 위암, 췌장암, 신경교아종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 요도암, 간종, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 흑색종, 다발성 흑색종 및 B-세포 림프종, 뇌암 뿐만 아니라 두부경부암 및 관련 전이가 있다.

용어 "세포 증식성 질환" 및 "증식성 질환"은 특정한 정도의 비정상 세포 증식과 관련된 질환을 의미한다. 한 실시양태에 있어서, 세포 증식성 질환은 암이다.

본원에 사용된 바와 같이, "종양"은 악성이든 양성이든지 관계없이 모든 신생물성 세포 성장 및 증식 및 모든 전암성 세포 및 암성 세포와 암유발성 조직 및 암성 조직을 의미한다.

"세포 사멸을 유도하는" 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자는 살아있는 세포를 사멸시키는 것이다. 상기 세포는 TAT 폴리펩티드를 발현하는 세포이며, 바람직하게는 동일한 조직 유형의 정상 세포에 비해 TAT 폴리펩티드를 과발현하는 세포이다. TAT 폴리펩티드는 암세포의 표면에서 발현되는 막횡단 폴리펩티드이거나, 암세포에 의해 생산 및 분비되는 폴리펩티드일 수 있다. 바람직하게는, 상기 세포는 암세포, 예를 들어 유방암 세포, 난소암 세포, 위암 세포, 자궁내막암 세포, 침샘암 세포, 폐암 세포, 신장암 세포, 결장암 세포, 갑상선암 세포, 췌장암 세포 또는 방광암 세포이다. 시험관내 세포 사멸은 보체 및 면역 이펙터 세포의 부재하에 측정하며, 항체-의존성 세포에 의해 매개된 세포독성 (ADCC) 또는 보체-의존성 세포독성 (CDC)에 의해 유도되는 세포 사멸이 구별될 수 있다. 따라서, 세포 사멸 분석은 열-불활성화된 혈청 (즉, 보체의 부재)을 사용하고 면역 이펙터 세포의 부재하에 수행할 수 있다. 세포 사멸을 유도할 수 있는 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자를 결정하기 위해서, 요오드화 프로피듐 (PI), 트립판 블루 (문헌 [Moore et al. *Cytotechnology* 17:1-11 (1995)] 참조) 또는 7AAD 흡수에 의해 평가되는 막의 일체성 손상 정도를 비처리 세포와 비교하여 평가할 수 있다. 세포 사멸을 유도하는 바람직한 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자는 BT474 세포에서의 PI 흡수 분석시에 PI 흡수를 유도하는 것이다.

"TAT-발현 세포"는 세포 표면에 또는 분비 형태로 내생성 TAT 또는 형질감염된 TAT를 발현하는 세포이다. "TAT-발현 암"은 세포 표면에 TAT 폴리펩티드가 존재하는 세포 또는 TAT 폴리펩티드를 생산 및 분비하는 세포를 포함하는 암이다. "TAT-발현 암"은 임의로 그의 세포 표면에 충분한 수준의 TAT를 발현하여 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자가 암세포의 표면 상의 TAT와 결합하여 암에 대한 치료 효과를 나타낸다. 다른 실시양태에 있어서, "TAT-발현 암"은 임의로 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자 길항제가 결합할 수 있도록 충분한 수준의 TAT 폴리펩티드를 생산하고 분비하여 암과 관련하여 치료 효과를 나타낸다. 후자와 관련하여, 길항제는 종양 세포에 의한 분비된 TAT 폴리펩티드의 생산 및 분비를 감소, 저해 또는 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오티드일 수 있다. TAT 폴리펩티드를 "과발현"하는 암은 동일한 조직 유형의 비-암성 세포에 비해 그의 세포 표면에서 상당히 더 높은 수준의 TAT 폴리펩티드를 보유하거나, 생산 및 분비하는 것이다. 이러한 과발현은 유전자 증폭에 의해 야기될 수도 있고, 전사 또는 번역 증가에 의해 유발될 수도 있다. TAT 폴리펩티드 과발현은 세포 표면 상에 존재하거나 세포에 의해 분비되는 TAT 단백질의 수준 증가를 평가 (예를 들어, 재조합 DNA 기술을 사용하여 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 단리된 핵산으로부터 제조할 수 있는 단리된 TAT 폴리펩티드에 대한 항-TAT 항체를 사용한 면역조직화학 분석; FACS 분석 등을 통한 평가)함으로써 진단 또는 예후 분석에서 확인할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 예를 들어 TAT-코딩 핵산 또는 그의 상보체에 상응하는 핵산-기체의 프로브를 사용한 형광 제자리 혼성화 [FISH; WO 98/45479 (1998년 10월에 공개됨) 참조], 서던 블롯팅, 노던 블롯팅 또는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 기술, 예를 들어 실시간 정량적 PCR (RT-PCR) 등을 통해 세포내에서 TAT 폴리펩티드-코딩 핵산 또는 mRNA의 수준을 측정할 수 있다. 또한, 예를 들어 항체-기반의 분석을 이용하여 혈청과 같은 생체액 중의 유리 항원을 측정함으로써 TAT 과발현을 연구할 수도 있다 (또한, 미국 특허 제4,933,294호 (1990년 6월 12일자로 허여됨); WO 91/05264 (1991년 4월 18일자로 공개됨); 미국 특허 제5,401,638호 (1995년 3월 28일자로 허여됨); 및 문헌 [Sias et al., *J. Immunol. Methods* 132:73-80 (1990)] 참조). 상기 분석법들과는 별도로, 당업자는 다양한 생체내 분석

법을 이용할 수 있다. 예를 들면, 환자의 신체내 세포를 임의로는 검출가능한 표지, 예를 들어 방사성 동위원소로 표지한 항체에 노출시킬 수 있는데, 이러한 항체가 환자의 세포에 결합되는지의 여부는, 예를 들어 방사능에 대해 외부 스캐닝하거나 항체에 노출시키기 이전에 환자로부터 채취한 생검을 분석함으로써 확인할 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 "면역어드헤신"은 면역글로불린 불변 도메인의 이펙터 기능과 이종 단백질 ("어드헤신")의 결합 특이성을 겸비한 항체 유사 분자를 지칭한다. 구조적으로, 면역어드헤신은 항체의 항원 인식 부위 및 항원 결합 부위가 아닌, 목적하는 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열 (즉, "이종")과 면역글로불린 불변 도메인 서열의 융합체를 포함한다. 면역어드헤신 분자의 어드헤신 부분은 전형적으로 적어도 수용체 또는 리간드의 결합 부위를 포함하는 인접 아미노산 서열이다. 면역어드헤신 중 면역글로불린 불변 도메인 서열은 IgG-1, IgG-2, IgG-3 또는 IgG-4 서브타입, IgA (IgA-1 및 IgA-2 포함), IgE, IgD 또는 IgM과 같은 임의의 면역글로불린으로부터 얻을 수 있다.

본원에 사용된 단어 "표지"는 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자에 직접 또는 간접적으로 접합되어 "표지된" 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자를 생성시키는 검출가능한 화합물 또는 조성물을 의미한다. 표지는 그 자체가 검출가능한 것 (예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지)일 수 있거나 효소 표지의 경우 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변화를 촉매할 수 있다.

본원에 사용된 바와 같은 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 방해하고(하거나) 세포의 파괴를 유발하는 물질을 의미한다. 이러한 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} 및 Lu의 방사성 동위원소); 화학요법제, 예를 들어 메토크세이트, 아드리아마이신, 빈카 알칼로이드 (빈크리스틴, 빈블라스틴, 에토포사이드), 독소루비신, 펠팔란, 미토마이신 C, 클로람부실, 다우노루비신 또는 기타 인터칼레이팅제 (intercalating agent); 핵분해 효소와 같은 효소 및 그의 단편; 항생제; 및 독소, 예를 들어 박테리아, 진균, 식물 또는 동물에서 기원된 소분자 독소 또는 효소 활성 독소 (이들의 단편 및(또는) 변이체를 포함함); 및 하기에 개시한 다양한 항종양제 또는 항암제를 포함한다. 다른 세포독성제는 하기에 기재되어 있다. 항종양제는 종양 세포의 파괴를 야기한다.

본원에서 사용된 "성장억제제"는 시험관내 또는 생체내에서 세포, 특히 TAT-발현 암세포의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 따라서, 성장억제제는 S-기에서의 TAT-발현 세포의 비율(%)을 상당히 감소시키는 것일 수 있다. 성장억제제의 예로는 세포 주기 진행을 (S-기 이외의 시기에서) 차단하는 작용제, 예를 들어 G1 정지 및 M-기 정지를 유도하는 작용제가 있다. 종래의 M-기 차단제로는 빈카스 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 타산 및 토포이소머라제 II 억제제, 예를 들어 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신이 있다. G1 정지 여파로 S-기 정지를 초래하는 작용제의 예로는 DNA 알킬화제, 예를 들어 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로르에타민, 시스플라틴, 메토크세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C가 있다. 보다 자세한 정보는 문헌 [Murakami et al., The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" (WB Saunders: Philadelphia, 1995), Chapter 1, 특히 13쪽]에서 찾을 수 있다. 타산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목(yew tree)으로부터 유래된 항암 약물이다. 유럽 주목으로부터 유래된 도세탁셀 (TAXOTERE (등록상표), 론-포울렌크 로러 (Rhone-Poulenc Rorer) 제품)은 파클리탁셀 (TAXOL (등록상표), 브리스톨-마이어스 스쿼브 (Bristol-Myers Squibb) 제품)의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜블린 이량체가 미세관으로 조립되는 것을 촉진하고 탈중합을 방해함으로써 미세관을 안정시켜, 세포의 유사분열을 억제한다.

"독소루비신"은 안트라사이클린 항생제이다. 독소루비신의 전체 화학명은 (8S-시스)-10-[(3-아미노-2,3,6-트리데옥시- α -L-리코-헥사피라노실)옥시]-7,8,9,10-테트라히드로-6,8,11-트리히드록시-8-(히드록시아세틸)-1-메톡시-5,12-나프타세네디온이다.

용어 "사이토카인"은 하나의 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 일반 용어로서 다른 세포 상에서 세포간 매개자로서 작용한다. 이러한 사이토카인의 예는 림포킨, 모노킨 및 통상의 폴리펩티드 호르몬이다. 사이토카인으로는 성장 호르몬, 예를 들어 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 펠락신; 프로펠락신; 당단백질 호르몬, 예를 들어 여포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH) 및 황체형성 호르몬 (LH); 간 성장 인자; 섬유아세포 성장 인자; 프롤라틴; 태반 락토젠; 중앙 괴사 인자- α 및 - β ; 물리리안-억제 물질; 마우스 생식선자극호르몬 관련 펩티드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); 신경 성장 인자, 예를 들어 NGF- β ; 혈소판-성장 인자; 형질전이 성장 인자 (TGF), 예를 들어 TGF- α 및 TGF- β ; 인슐린 유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트르포이에틴 (EPO); 골유도성 인자; 인터페론, 예를 들어 인터페론- α , - β 및 - γ ; 콜로니 자극 인자 (CSF), 예를 들어 대식세포-CSF (M-CSF); 과립구-대식세포-CSF (GM-CSF); 및 과립구-CSF (G-CSF); 인터루킨 (IL), 예를 들어 IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; 중앙 괴사 인자, 예를 들어

TNF- α 및 TNF- β ; 및 LIF 및 키트 리간드 (KL)를 비롯한 기타 폴리펩티드 인자가 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 사이토카인은 천연 공급원으로부터 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 사이토카인의 생물학적 활성 등 가물을 포함한다.

용어 "포장 삽입물"은 치료용 제품의 시판되는 포장물 내에 통상적으로 포함되어 있으며 증상에 대한 정보, 사용법, 투여량, 투여 방법, 금기 사항 및(또는) 이러한 치료용 제품의 사용에 관한 경고를 포함하는 지침서를 의미하는데 사용된다.

표 1-1.

```

/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define _M      -8      /* value of a match with a stop */

int      _day[26][26] = {
/* A */      { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0,_M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0},
/* B */      { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1},
/* C */      { -2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5},
/* D */      { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 2},
/* E */      { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 3},
/* F */      { -4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5},
/* G */      { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
/* H */      { -1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */      { -1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */      { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */      { -1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */      { -2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */      { -1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */      { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */      { _M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */      { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */      { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */      { -2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */      { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */      { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */      { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */      { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */      { -6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */      { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */      { -3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */      { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};

```

표 1-2.

```

/*
*/
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define MAXJMP 16 /* max jumps in a diag */
#define MAXGAP 24 /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define JMPS 1024 /* max jmps in an path */
#define MX 4 /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define DMAT 3 /* value of matching bases */
#define DMIS 0 /* penalty for mismatched bases */
#define DINS0 8 /* penalty for a gap */
#define DINS1 1 /* penalty per base */
#define PINS0 8 /* penalty for a gap */
#define PINS1 4 /* penalty per residue */

struct jmp {
    short n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
    unsigned short x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
};

struct diag {
    int score; /* score at last jmp */
    long offset; /* offset of prev block */
    short jmp; /* current jmp index */
    struct jmp jp; /* list of jmps */
};

struct path {
    int spc; /* number of leading spaces */
    short n[JMPS]; /* size of jmp (gap) */
    int x[JMPS]; /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char *ofile; /* output file name */
char *namex[2]; /* seq names: getseqs() */
char *prog; /* prog name for err msgs */
char *seqx[2]; /* seqs: getseqs() */
int dmax; /* best diag: nw() */
int dmax0; /* final diag */
int dna; /* set if dna: main() */
int endgaps; /* set if penalizing end gaps */
int gapx, gapy; /* total gaps in seqs */
int len0, len1; /* seq lens */
int ngapx, ngapy; /* total size of gaps */
int smax; /* max score: nw() */
int *xbm; /* bitmap for matching */
long offset; /* current offset in jmp file */
struct diag *dx; /* holds diagonals */
struct path pp[2]; /* holds path for seqs */

char *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char *getseq(), *g_calloc();

```

표 1-3.

```

/* Needleman-Wunsch alignment program
*
* usage: progs file1 file2
* where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
* The sequences can be in upper- or lower-case and may contain ambiguity
* Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
* Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
* A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
* Output is in the file "align.out"
*
* The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
* Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
*/
#include "nw.h"
#include "day.h"

static _dbval[26] = {
    1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static _pbval[26] = {
    1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
    128, 256, 0xFFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
    1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
    1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)
int ac;
char *av[];
{
    prog = av[0];
    if (ac != 3) {
        fprintf(stderr, "usage: %s file1 file2\n", prog);
        fprintf(stderr, "where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
        fprintf(stderr, "The sequences can be in upper- or lower-case\n");
        fprintf(stderr, "Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored\n");
        fprintf(stderr, "Output is in the file \"align.out\"\n");
        exit(1);
    }
    namex[0] = av[1];
    namex[1] = av[2];
    seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
    seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
    xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

    endgaps = 0; /* 1 to penalize endgaps */
    ofile = "align.out"; /* output file */

    nw(); /* fill in the matrix, get the possible jumps */
    readjumps(); /* get the actual jumps */
    print(); /* print stats, alignment */

    cleanup(0); /* unlink any tmp files */
}

```

표 1-4.

```

/* do the alignment, return best score: main()
* dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: PAM 250 values
* When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
* a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
* to a gap in seq y.
*/
nw()
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int        *ndely, *dely;    /* keep track of dely */
    int        ndelx, delx;      /* keep track of delx */
    int        *tmp;             /* for swapping row0, row1 */
    int        mis;              /* score for each type */
    int        ins0, ins1;       /* insertion penalties */
    register   id;               /* diagonal index */
    register   ij;              /* jmp index */
    register   *col0, *col1;     /* score for curr, last row */
    register   xx, yy;          /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0;          /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* fill in match matrix
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

표 1-5.

```

...nw
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
    mis = col0[yy-1];
    if (dna)
        mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
    else
        mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

    /* update penalty for del in x seq;
     * favor new del over ongong del
     * ignore MAXGAP if weighting endgaps
     */
    if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
        if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else {
            dely[yy] -= ins1;
            ndely[yy]++;
        }
    } else {
        if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
            dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
            ndely[yy] = 1;
        } else
            ndely[yy]++;
    }

    /* update penalty for del in y seq;
     * favor new del over ongong del
     */
    if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
        if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else {
            delx -= ins1;
            ndelx++;
        }
    } else {
        if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
            delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
            ndelx = 1;
        } else
            ndelx++;
    }

    /* pick the maximum score; we're favoring
     * mis over any del and delx over dely
     */

    id = xx - yy + len1 - 1;
    if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
        col1[yy] = mis;
}
...nw

```

표 1-6.

```

else if (delx >= dely[yy]) {
    col1[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = delx;
    }
} else {
    col1[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
        dx[id].ijmp++;
        if (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
        dx[id].jp.x[ij] = xx;
        dx[id].score = dely[yy];
    }
}
if (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    if (endgaps)
        col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    if (col1[yy] > smax) {
        smax = col1[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
if (endgaps && xx < len0)
    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
if (col1[yy-1] > smax) {
    smax = col1[yy-1];
    dmax = id;
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

표 1-7.


```

/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() -- put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC      3
#define P_LINE  256 /* maximum output line */
#define P_SPC    3 /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int olen; /* set output line length */
FILE *fx; /* output file */

print()
{
    int lx, ly, firstgap, lastgap; /* overlap */

    if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "< first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "< second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    if (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    else if (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    if (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    else if (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align();
}

```

print

표 1-8.

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
{
    int      lx, ly;                                /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap;                        /* leading trailing overlap */

    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char      outx[32];
    double    pct;
    register  n0, n1;
    register char *p0, *p1;
    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[i].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;
    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0]++;
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1]++;
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* pct homology:
     * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
     * else, knock off overhangs and take shorter core
     */
    if (endgaps)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*((double)nm)/((double)lx);
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "< %d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

표 1-9.

```

fprintf(fx, "< gaps in first sequence: %d", gapx);
if (gapx) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
fprintf(fx, "\n", gaps in second sequence: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outx);
}
if (dna)
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
else
    fprintf(fx,
        "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);
if (endgaps)
    fprintf(fx,
        "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
else
    fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
static      nm;          /* matches in core -- for checking */
static      lmax;        /* lengths of stripped file names */
static      ij[2];        /* jmp index for a path */
static      nc[2];        /* number at start of current line */
static      ni[2];        /* current elem number -- for gapping */
static      siz[2];
static char *ps[2];        /* ptr to current element */
static char *po[2];        /* ptr to next output char slot */
static char out[2][P_LINE]; /* output line */
static char star[P_LINE]; /* set by stars */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()
{
    int      nn;          /* char count */
    int      more;
    register i;

    for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(namex[i]);
        if (nn > lmax)
            lmax = nn;
        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

pr_align

표 1-10.

```

for (nn = nm = 0, more = 1; more;) {
    for (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * do we have more of this sequence?
         */
        if (!*ps[i])
            continue;
        more++;
        if (pp[i].spc) { /* leading space */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        else if (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        else { /* we're putting a seq element
            */
            *po[i] = *ps[i];
            if (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;
            /*
             * are we at next gap for this seq?
             */
            if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * we need to merge all gaps
                 * at this location
                 */
                siz[i] = pp[i].nf[ij[i]]++;
                while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]]++;
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    if (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        for (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
dumpblock()
{
    register i;
    for (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

dumpblock

표 1-11.

...dumpblock

```

(void) puts("\n", fx);
for (i = 0; i < 2; i++) {
    if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        if (i == 0)
            nums(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            stars();
        putline(i);
        if (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        if (i == 1)
            nums(i);
    }
}
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)
int ix; /* index in out[] holding seq line */
{
    char nline[P_LINE];
    register i, j;
    register char *pn, *px, *py;
    for (pn = nline, i = 0; i < lmax + P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        if (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        else {
            if (i % 10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                for (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j % 10 + '0';
                if (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            else
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    for (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) puts(*pn, fx);
    (void) puts("\n", fx);
}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)
int ix;
{

```

nums

putline

표 1-12.

...putline

```

int          i;
register char *px;

for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
    (void) putc(*px, fx);
for (; i < lmax+P_SPC; i++)
    (void) putc(' ', fx);

/* these count from 1:
 * ni[] is current element (from 1)
 * nc[] is number at start of current line
 */
for (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()
{
    int          i;
    register char *p0, *p1, cx, *px;

    if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(p0[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(p0[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

    for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            else
                cx = ' ';
        }
        else
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

stars

㉞ 1-13.

```

/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)
    char *pn; /* file name (may be path) */
{
    register char *px, *py;

    py = 0;
    for (px = pn; *px; px++)
        if (*px == '/')
            py = px + 1;

    if (py)
        (void) strcpy(pn, py);
    return(strlen(pn));
}

```

stripname

㉞ 1-14.

```

/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjumps() -- get the good jumps, from tmp file if necessary
 * writejumps() -- write a filled array of jumps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";          /* tmp file for jumps */
FILE    *fj;
int      cleanup();                          /* cleanup tmp file */
long     lseek();
/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                  cleanup
{
    int    i;
    if (fj)
        (void) unlink(jname);
    exit(i);
}
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                          getseq
{
    char    *file;    /* file name */
    int      *len;    /* seq len */

    {
        char    line[1024], *pseq;
        register char    *px, *py;
        int      natgc, tlen;
        FILE      *fp;
        if ((fp = fopen(file, "r")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't read %s\n", prog, file);
            exit(1);
        }
        tlen = natgc = 0;
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
            if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                continue;
            for (px = line; *px != '\n'; px++)
                if (isupper(*px) || islower(*px))
                    tlen++;
        }
        if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
            exit(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
    }
}

```

표 1-15.

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);
while (fgets(line, 1024, fp)) {
    if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continue;
    for (px = line; *px != '\n'; px++) {
        if (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        else if (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        if (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}
char *
g_alloc(msg, nx, sz)
char *msg; /* program, calling routine */
int nx, sz; /* number and size of elements */
{
    char *px, *calloc();
    if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        if (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_alloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    register i, j, xx;
    if (!f) {
        (void) fclose(f);
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; i++) {
        while (1) {
            for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                ;

```

...getseq

g_alloc

readjmps

표 1-16.

...readjumps

```

        if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
            (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
            (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
            dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
        }
        else
            break;
    }
    if (i >= JMPS) {
        fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
        cleanup(1);
    }
    if (j >= 0) {
        siz = dx[dmax].jp.n[j];
        xx = dx[dmax].jp.x[j];
        dmax += siz;
        if (siz < 0) { /* gap in second seq */
            pp[1].n[i1] = -siz;
            xx += siz;
            /* id = xx - yy + len1 - 1 */
            pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
            gapy ++;
            ngapy -= siz;
        }
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1 ++;
    }
    else if (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx ++;
        ngapx += siz;
    }
    /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
    siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
    i0 ++;
}
else
    break;
}
/* reverse the order of jumps */
for (j = 0, i0--, j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--, j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
    (void) close(fd);
if (!fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

표 1-17.

```

/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejumps(ix)
{
    int ix;
    char *mktemp();

    if (!fj) {
        if (mktemp(jname) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
        if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
            exit(1);
        }
    }
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
    (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}

```

writejumps

표 2.

TAT	XXXXXXXXXXXXXXX	(길이 = 아미노산 15개)
비교 단백질	XXXXXXYYYYYYY	(길이 = 아미노산 12개)

아미노산 서열 동일성(%) =

(ALIGN-2에 의해 두 폴리펩티드 서열 사이에서 동일하게 매치되는 것으로 결정된 아미노산 잔기의 수) ÷ (TAT 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 총 수) =

5 / 15 = 33.3%

표 3.

TAT	XXXXXXXXXX	(길이 = 아미노산 10개)
비교 단백질	XXXXXXYYYYYYZZY	(길이 = 아미노산 15개)

아미노산 서열 동일성(%) =

(ALIGN-2에 의해 두 폴리펩티드 서열 사이에서 동일하게 매치되는 것으로 결정된 아미노산 잔기의 수) ÷ (TAT 폴리펩티드의 아미노산 잔기의 총 수) =

5 / 10 = 50%

표 4.

TAT-DNA	NNNNNNNNNNNNNN	(길이 = 뉴클레오티드 14개)
비교 DNA	NNNNNNLLLLLLLLL	(길이 = 뉴클레오티드 16개)

핵산 서열 동일성(%) =

(ALIGN-2에 의해 두 핵산 서열 사이에서 동일하게 매치되는 것으로 결정된 뉴클레오티드의 수) ÷ (TAT-DNA 핵산 서열의 뉴클레오티드의 총 수) =

6 / 14 = 42.9%

표 5.

TAT-DNA	NNNNNNNNNNNN	(길이 = 뉴클레오티드 12개)
비교 DNA	NNNNLLLVV	(길이 = 뉴클레오티드 9개)

핵산 서열 동일성(%) =

(ALIGN-2에 의해 두 핵산 서열 사이에서 동일하게 매치되는 것으로 결정된 뉴클레오티드의 수) ÷ (TAT-DNA 핵산 서열의 뉴클레오티드의 총 수) =

4 / 12 = 33.3%

II. 본 발명의 조성물 및 방법

A. 항-TAT 항체

한 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 치료제 및(또는) 진단제로서 사용할 수 있는 항-TAT 항체를 제공한다. 항체의 예로는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 인간화 항체, 이중특이적 항체 및 이중접합체 항체 등이 있다.

1. 폴리클로날 항체

폴리클로날 항체는 관련 항원과 면역보강제를 피하(sc) 또는 복강내(ip)로 여러회 주사함으로써 동물에서 제조하는 것이 바람직하다. 면역화될 중에서 면역원성을 나타내는 단백질에 관련 항원(특히, 합성 펩티드가 사용된 경우)을 접합시키는 것이 유용할 수 있다. 예를 들면, 이관능성 물질 또는 유도체화제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르(시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드(리신 잔기를 통한), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl_2 또는 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (여기서, R 및 R^1 은 상이한 알킬기임)을 사용하여, 키홀 림펫 해모시아닌(KLH), 혈청 알부민, 소의 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 관련 항원을 접합시킬 수 있다.

예를 들어, 상기 단백질 또는 접합체 100 μg 또는 5 μg (각각 토끼 또는 마우스에 대한 용량임)을 3배 부피의 프로인트(Freund's) 완전 면역보강제와 혼합한 다음 이 용액을 여러 부위에 피내 주사함으로써, 동물을 상기 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 면역화시킨다. 1개월 후, 프로인트 완전 면역보강제에 포함된 펩티드 또는 접합체의 최초 양의 1/5 내지 1/10을 여러 부위에 피하 주사함으로써 상기 동물을 부스팅(boosting)한다. 7일 내지 14일 후에, 상기 동물을 채혈하여 혈청의 항체 역가를 분석한다. 역가가 안정화될 때까지 동물을 부스팅한다. 접합체는 또한 재조합 세포 배양물에서 단백질 융합체로서 만들 수도 있다. 또한, 백반과 같은 응집제를 적합하게 사용하여 면역 반응을 증진시킨다.

2. 모노클로날 항체

모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법을 이용하여 제조하거나 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호 참조)으로 제조할 수 있다.

하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 기타 적절한 숙주 동물(예를 들어 햄스터)을 상기 기재된 바와 같이 면역화시켜, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합될 항체를 생성시키거나 생성시킬 수 있는 림프구를 유도한다. 별법으로, 림프구를 시험관내 면역화시킬 수도 있다. 면역화 후, 림프구를 단리한 후에 적합한 융합화제, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포주와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)].

이와 같이 생성된 하이브리도마 세포를 바람직하게는 융합되지 않은 모(母) 골수종 세포(융합 파트너로도 불림)의 성장이나 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에 접종하여 성장시킨다. 예를 들어 모 골수종 세포에 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(HGPRT 또는 HPRT)가 없는 경우에는, 상기 하이브리도마용 선별 배양 배지는 전형적으로, HGPRT-결핍 세포의 성장을 억제하는 물질인 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘(HAT 배지)을 포함할 것이다.

바람직한 융합 파트너인 골수종 세포는 효율적으로 융합되고, 선별된 항체 생성 세포에 의한 항체의 안정한 고수준 생성을 지지하는 세포이며, 융합되지 않은 모 세포로부터 상기 골수종 세포를 선별하는 선별 배지에 민감하다. 바람직한 골수종 세포주는 쥐 골수종 세포주, 예를 들어 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것(미국 캘리포니아주 샌디에고에 소재하는 셀크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center)로부터 입수가 가능함) 및 SP-2 및 유도체인 X63-Ag8-653 세포(미국 버지니아주 마나사스에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)으로부터 입수 가능함)이다. 인간 모노클로날 항체를 제조하기 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이중골수종 세포주 또한 문헌 [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)] 및 [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]에 기재되어 있다.

하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 대상으로 하여, 상기 항원에 대해 유래된 모노클로날 항체의 생성에 대해 분석한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성된 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전법으로 측정하거나, 또는 시험관내 결합 분석법, 예를 들어 방사성면역분석법(RIA) 또는 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA)으로 측정한다.

모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들면 문헌 [Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)]에 기재된 스캐차드 분석법(Scatchard analysis)으로 측정할 수 있다.

일단 원하는 특이성, 친화성 및(또는) 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 확인하면, 클론을 제한 희석 방법으로 서브클로닝하고 표준 방법으로 성장시킬 수 있다 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)]. 이러한 목적에 적합한 배양 배지의 예로는 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지 등이 있다. 또한, 예를 들어 하이브리도마 세포를 마우스에 복강내 주사함으로써 하이브리도마 세포를 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수 있다.

상기 서브클론에 의해 분리된 모노클로날 항체는 종래의 항체 정제 방법, 예를 들어 친화성 크로마토그래피 (예를 들어 단백질 A-세파로스 또는 단백질 G-세파로스를 사용함), 이온 교환 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 등을 통해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 분리시키는 것이 적합하다.

모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 종래 방법 (예를 들어 쥐 항체의 중쇄와 경쇄를 코딩하는 유전자와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함)을 이용하여 용이하게 분리 및 서열분석한다. 상기 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서 작용한다. 일단 분리되면, DNA를 발현 벡터내로 위치시킨 다음, 숙주 세포, 예를 들어 이. 콜라이 (*E. coli*) 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, 또는 달리 항체 단백질을 생성시키지 않는 골수종 세포로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체를 합성할 수 있다. 항체를 코딩하는 DNA를 박테리아에서 재조합 발현하는 것에 관해 살펴보기 위해서는 문헌 [Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993)] 및 [Plueckthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992)]을 참조한다.

추가 실시양태에서, 문헌 [McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 이용하여 제조한 항체 파지 라이브러리로부터 모노클로날 항체 또는 항체 단편을 분리할 수 있다. 문헌 ([Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)])에는 파지 라이브러리를 사용하여 쥐 항체와 인간 항체를 각각 분리하는 방법이 기재되어 있다. 그후에 간행된 문헌에는 체인 셔플링 (chain shuffling)에 의한 고 친화성 (nM 범위) 인간 항체의 제조 [Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)] 뿐만 아니라 매우 큰 파지 라이브러리를 제작하기 위한 전략으로서의 생체내 재조합과 조합 감염법이 기재되어 있다 [Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)]. 따라서, 이들 기술은 모노클로날 항체를 분리하기 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대한 이용가능한 대안이다.

항체를 코딩하는 DNA는 예를 들어 상동성 쥐 서열 대신에 인간 중쇄와 경쇄 불변 도메인 (C_H 및 C_L) 서열로 대체하거나 (미국 특허 제4,816,567호 및 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)]), 비-면역글로불린 폴리펩티드 (이중 폴리펩티드)에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 면역글로불린 코딩 서열에 융합함으로써 키메라 또는 융합 항체 폴리펩티드를 생산하도록 변형시킬 수 있다. 항체의 불변 도메인을 이러한 비-면역글로불린 폴리펩티드 서열로 대체시키거나, 또는 항체의 한 항원-결합 부위의 가변 도메인을 상기 폴리펩티드 서열로 대체시켜, 항원에 대한 특이성을 나타내는 한 항원-결합 부위, 및 상이한 항원에 대한 특이성을 나타내는 다른 항원-결합 부위를 포함하는 2가 키메라 항체를 제조할 수 있다.

3. 인간 및 인간화 항체

또한, 본 발명의 항-TAT 항체는 인간화 항체 또는 인간 항체를 포함할 수 있다. 비-인간 (예를 들어 쥐) 항체의 인간화 형태는 키메라 면역글로불린, 비-인간 면역글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 면역글로불린쇄 또는 그의 단편 (예를 들어 Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원 결합 하위서열)이다. 인간화 항체는, 수용자의 상보성 결정 영역 (CDR)의 잔기를 원하는 특이성, 친화성 및 능력을 갖는 마우스, 래트 또는 토끼와 같은 비-인간 종 (공여 항체)의 CDR로부터 유래된 잔기로 치환시킨 인간 면역글로불린 (수용 항체)을 포함한다. 몇몇 경우에, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 (framework) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 치환된다. 또한, 인간화 항체는 수용 항체에서도 발견되지 않고, 도입되는 CDR 또는 프레임워크 서열에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 통상적으로, 인간화 항체는 1개 이상, 통상적으로는 2개 이상의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 면역글로불린의 영역에 상응하며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 면역글로불린 컨센서스 (consensus) 서열의 영역에 해당한다. 또한, 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전형적으로는 인간 면역글로불린 영역의 적어도 일부를 포함하는 것이 가장 적합할 것이다 ([Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-329 (1988)] 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]).

비인간 항체를 인간화하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 통상적으로, 인간화 항체에는 비-인간 공급원으로부터 유래된 하나 이상의 아미노산 잔기가 도입되어 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 흔히 "임포트 (import)" 잔기로 언급되며,

전형적으로는 "임포트" 가변 도메인으로부터 얻는다. 인간화는 인간 항체의 상응하는 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 치환함으로써 본질적으로 윈터 (Winter) 등의 방법 ([Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988)], [Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)])에 따라 수행할 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 원형 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 서열이 비-인간 종 유래의 상응하는 서열에 의해 치환된 키메라 항체 (미국 특허 제4,816,567호)이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기를 설치류 항체의 유사한 부위로부터 유래된 잔기로 치환시킨 인간 항체이다.

경쇄 및 중쇄 가변 도메인 중에서 인간화 항체 제조에 사용하고자 하는 인간 가변 도메인을 선택하는 것은 항체가 인간 치료용으로 사용될 때 항원성 및 HAMA 반응 (인간 항-마우스 항체)을 감소시키는 데 매우 중요하다. 소위 "베스트-피트 (best-fit)" 방법에 따라, 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리를 대상으로 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 스크리닝한다. 설치류의 V 도메인 서열과 매우 유사한 인간 V 도메인 서열을 확인하고, 이 서열내의 인간 프레임워크 영역 (FR)은 인간화 항체에 수용된다 ([Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)], [Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901 (1987)]). 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군에 속하는 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정한 프레임워크 영역을 사용한다. 이와 동일한 프레임워크를 여러가지 상이한 인간화 항체를 만드는 데 사용할 수 있다 ([Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)], [Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)]).

또한, 항원에 대한 높은 결합 친화성 및 다른 유리한 생물학적 성질을 보유하도록 항체를 인간화하는 것도 중요하다. 이 목적을 달성하기 위해, 바람직한 방법에 따라, 모 서열 및 인간화 서열의 3차원적 모델을 이용하여 모 서열 및 다양한 이상적 인간화 산물의 분석 방법으로 인간화 항체를 제조한다. 3차원적 면역글로불린 모델은 통상적으로 당업자에게 이용되고 있고 공지되어 있다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3차원적 입체구조를 설명하고 보여주는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 이 디스플레이의 정밀검사는 후보 면역글로불린 서열의 기능화에 있어서 잔기의 가능한 역할 분석, 즉 항원에 대한 후보 면역글로불린의 결합력에 영향을 주는 잔기의 분석을 허용한다. 이러한 방법을 통해, FR 잔기는 원하는 항체 특성이 얻어지도록, 예를 들어 표적 항원에 대한 친화성이 증가되도록 수용 서열과 임포트 서열로부터 선별 및 조합될 수 있다. 일반적으로, 초가변 영역 잔기는 항원 결합에 영향을 주는 데 있어서 직접적으로 및 거의 실질적으로 관여한다.

인간화 항-TAT 항체의 다양한 형태도 고려된다. 예를 들어, 인간화 항체는 임의로는 면역접합체를 생성시키기 위해 1종 이상의 세포독성제와 접합되는 항체 단편, 예를 들어 Fab일 수 있다. 별법으로, 인간화 항체는 원형 IgG₁ 항체와 같은 원형 항체일 수 있다.

인간화에 대한 대안으로서, 인간 항체를 제조할 수 있다. 예를 들어, 면역화시킬 때, 내생성 면역글로불린 생성의 부재하에서 인간 항체의 전체 레파토리를 생성할 수 있는 형질전환 동물 (예를 들어, 마우스)을 제조하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식세포주 (germ-line) 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (J_H) 유전자를 모두 결실시키면 내생성 항체 생성이 완전히 억제된다고 기재된 바 있다. 인간 생식세포주 면역글로불린 유전자 배열을 이러한 생식세포주 돌연변이 마우스에 전달하면 항원이 들어왔을 때 인간 항체가 생성될 것이다. 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)], [Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)], [Bruggemann et al., Year in Immunol. 7:33 (1993)], 미국 특허 제5,545,806호, 동 제5,569,825호, 동 제5,591,669호 (모두 겐파름 (GenPharm)의 특허임), 동 제5,545,807호 및 WO 97/17852를 참조한다.

별법으로, 파지 디스플레이 기술 [McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)]을 이용하여 면역화되지 않은 공여자의 면역글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레파토리로부터 인간 항체 및 항체 단편을 시험관내 제조할 수 있다. 이 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자는 M13 또는 fd와 같은 섬유상 박테리오파지의 메이저 또는 마이너 코트 단백질 유전자 내로 인-프레임 (in-frame)으로 클로닝되고 파지 입자의 표면 상에 기능적 항체 단편으로서 디스플레이된다. 섬유상 입자가 파지 게놈의 단일 가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에, 항체의 기능성을 기초로 한 선별도 이 기능성을 보이는 항체를 코딩하는 유전자를 선별할 수 있게 한다. 따라서, 파지는 B-세포의 성질 중 일부 성질을 모방한다. 파지 디스플레이는 예를 들어 문헌 [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)]에 기재된 바와 같이 다양한 형식으로 수행할 수 있다. V-유전자 단편의 여러 공급원을 파지 디스플레이에 사용할 수 있다. 클락슨 (Clackson) 등은 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 작은 무작위 조합 라이브러리로부터 다양한 항-옥사졸론 항체 배열을 단리하였다 [Nature, 352:624-628 (1991)]. 면역화되지 않은 인간 공여자로부터 유래된 V 유전자의 레파토리를 제작할 수 있고, 다양한 항원 배열 (자가 항원을 포함함)에 대한 항체를 문헌 ([Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)] 또는 [Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)])에 기재된 기술에 따라 본질적으로 단리할 수 있다. 또한, 미국 특허 제5,565,332호 및 동 제5,573,905호를 참조한다.

상기 기재된 바와 같이, 인간 항체는 시험관내 활성화된 B 세포에 의해서도 생성될 수도 있다 (미국 특허 제5,567,610호 및 동 제5,229,275호 참조).

4. 항체 단편

특정 환경에서는 온전한 항체보다는 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 보다 작은 크기의 단편은 빠른 제거 (clearance)를 허용하고 충실성 중앙에 대한 접근을 개선할 수 있다.

항체 단편을 제조하기 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 원형 항체의 단백질분해를 통해 유래된 것이었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)] 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 이들 단편은 현재 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생성될 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두 이. 콜라이에서 발현되어 이. 콜라이로부터 분비될 수 있으므로, 이들 항체 단편을 용이하게 대량으로 제조할 수 있다. 항체 단편은 상기에서 논의한 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수할 수 있고, 화학적으로 커플링시켜 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]. 다른 접근법에 따르면, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리할 수 있다. 셀비지 (salvage) 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하며 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')₂ 단편은 미국 특허 제5,869,046호에 기재되어 있다. 항체 단편을 제조하기 위한 기타 기술은 당업자에게는 명백한 것이다. 다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185, 미국 특허 제5,571,894호 및 동 제 5,587,458호를 참조한다. Fv 및 scFv는 불변 영역이 없고 원형 결합 부위가 있는 유일한 단편이므로, 생체내에서 사용되는 동안 비특이적 결합을 감소시키는데 적합하다. scFv 융합 단백질은 scFv의 아미노-말단 또는 카르복시-말단에서 이펙터 단백질의 융합이 일어나도록 제작할 수 있다. 상기 문헌 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck]을 참조한다. 또한, 이러한 항체 단편은 예를 들어 미국 특허 제5,641,870호에 기재된 바와 같이 "선형 항체"일 수 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적이거나 이중특이적일 수 있다.

5. 이중특이적 항체

이중특이적 항체는 2종 이상의 상이한 에피토프에 대해 결합 특이성을 갖는 항체이다. 예시적 이중특이적 항체는 본원에 기재된 TAT 단백질의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이러한 항체들 중 다른 것들에서는 TAT 결합 부위가 다른 단백질에 대한 결합 부위와 함께 조합될 수 있다. 별법으로, 항-TAT 아암 (arm)은 T-세포 수용체 분자 (예를 들어, CD3)와 같은 백혈구 상의 유발 분자, 또는 FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) 및 FcγRIII (CD16)와 같은 IgG에 대한 Fc 수용체 (FcγR)에 결합하는 아암과 조합되어 세포의 방어 메커니즘을 TAT-발현 세포에 집중시키고 국한시킬 수 있다. 이중특이적 항체를 사용하여 TAT를 발현하는 세포에 세포독성제를 국한시킬 수도 있다. 이들 항체들은 TAT-결합 아암, 및 세포독성제 (예를 들어, 사포린, 항-인터페론-α, 빈카 알칼로이드, 리신 A 쇄, 메토타렉세이트 또는 방사성 동위원소 핵탄)에 결합하는 아암을 갖는다. 이중 특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로 제조할 수 있다.

WO 96/16673에는 이중특이적 항-ErbB2/항-FcγRIII 항체가 기재되어 있고, 미국 특허 제5,837,234호에는 이중특이적 항-ErbB2/항-FcγRI 항체가 개시되어 있다. 이중특이적 항-ErbB2/Fcα항체는 WO98/02463에 기재되어 있다. 미국 특허 제5,821,337호에는 이중특이적 항-ErbB2/항-CD3 항체가 개시되어 있다.

이중특이적 항체를 제조하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 통상적으로, 전장 이중특이적 항체의 제조는 2개의 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 동시발현을 바탕으로 하며, 여기서 2개의 쇄는 상이한 특이성을 갖는다 [Millstein et al., Nature, 305: 537-539 (1983)]. 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류로 인해, 이들 하이브리도마 (쿼드로마; quadroma)는 10가지 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생성시키며, 이중 하나만이 올바른 이중특이적 구조를 갖는다. 통상적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 올바른 분자의 정제는 다소 번거롭고, 생산 수율이 낮다. 유사한 방법이 WO 93/08829 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10: 3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

다른 접근법에 따라, 원하는 결합 특이성을 갖는 항체의 가변 도메인 (항체-항원 결합 부위)을 면역글로불린 불변 도메인 서열에 융합시킨다. 이러한 융합은 힌지, C_H2 및 C_H3 영역의 적어도 일부를 포함하는 Ig 중쇄 불변 도메인과의 융합이 바람직하다. 융합체 중 적어도 하나에 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (C_H1)이 존재하는 것이 바람직하다. 면역글로불린 중쇄 융합체를 코딩하는 DNA, 및 원한다면 면역글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별도의 발현 벡

터에 삽입하고, 적합한 숙주 세포에 동시 형질감염시킨다. 이것은 제작에 사용되는 3종의 폴리펩티드 쇄의 동일하지 않은 비율이 원하는 이중특이적 항체의 최적 수율을 제공하는 실시양태에서 3종의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조절하는 데 있어서 보다 높은 유연성을 제공한다. 그러나, 비율이 같은 2종 이상의 폴리펩티드 쇄가 높은 수율로 발현되거나 상기 비율이 원하는 폴리펩티드 쇄 조합의 수율에 별로 영향을 주지 않는 경우, 2종 또는 3종의 폴리펩티드 쇄에 대한 코딩 서열을 단일 발현 벡터에 삽입할 수 있다.

이러한 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한 아암에 있는, 제1 결합 특이성을 나타내는 하이브리드 면역글로불린 중쇄, 및 다른 아암에 있는 (제2의 결합 특이성을 제공하는) 하이브리드 면역글로불린 중쇄-경쇄 쌍으로 구성되어 있다. 이중특이적 분자의 절반에만 면역글로불린 경쇄가 존재하면 용이하게 분리되기 때문에, 이러한 비대칭 구조는 원치 않는 면역글로불린쇄 조합으로부터 원하는 이중특이적 화합물을 용이하게 분리할 수 있게 한다는 것이 밝혀졌다. 이 접근법은 WO 94/04690에 기재되어 있다. 이중특이적 항체를 제조하기 위한 보다 상세한 내용은 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986)]을 참조한다.

미국 특허 제5,731,168호에 기재된 다른 접근법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자 사이의 경계면을 조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 비율(%)을 최대화할 수 있다. 바람직한 경계면은 C_H3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이 방법에서는 제1 항체 분자의 경계면으로부터 1개 이상의 작은 아미노산 측쇄를 보다 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체한다. 큰 아미노산 측쇄를 작은 아미노산 측쇄 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 큰 측쇄에 대해 동일하거나 유사한 크기의 보충 "공동 (cavity)"을 제2 항체 분자의 경계면에 생성시킨다. 이는 이중이량체의 수율을 동종이량체와 같은 다른 원치 않는 최종-산물의 수율 보다 증가시키는 메카니즘을 제공한다.

이중특이적 항체에는 가교결합된 항체 또는 "이중접합체" 항체가 포함된다. 예를 들어, 이중접합체 항체들 중 하나는 아비딘에 커플링시키고 다른 하나는 바이오틴에 커플링시킬 수 있다. 이러한 항체들은 예를 들어 면역계 세포를 원치 않는 세포에 표적화시키는 데 사용하도록 제안된 바 있고 (미국 특허 제4,676,980호), HIV 감염의 치료용으로도 제안된 바 있다 (WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089). 이중접합체 항체는 임의의 편리한 가교결합 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 적합한 가교결합제는 당업계에 공지되어 있고, 다수의 가교결합 기술과 함께 미국 특허 제4,676,980에 개시되어 있다.

항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 제조하는 기술은 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 화학적 결합을 이용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science 229:81 (1985)]에는 원형 항체를 단백질 가수분해시켜 $F(ab')_2$ 단편을 제조하는 방법이 기재되어 있다. 이러한 단편은 디티올 착화제인 나트륨 아르세니트의 존재하에 환원되어 인접한 디티올을 안정화하고 분자간 디설피드 형성을 방해한다. 그 후에, 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시켰다. 이어서, Fab' -TNB 유도체 중 하나를 메르캅토에틸아민을 사용하여 환원시킴으로써 Fab' -티올로 재전환시키고 동물량의 다른 Fab' -TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성시켰다. 생성된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정화를 위한 물질로 사용할 수 있다.

최근 기술의 발전으로 인해 이. 콜라이로부터 Fab' -SH 단편을 직접 회수하여 화학적으로 결합시킴으로써 이중특이적 항체를 형성시킬 수 있게 되었다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med. 175:217-225 (1992)]에는 완전한 인간화 이중특이적 항체 $F(ab')_2$ 분자의 제조에 대해 기재되어 있다. 각각의 Fab' 단편은 이. 콜라이로부터 별도로 분비되었으며 시험관내 지정된 화학적 커플링 방법을 통해 연결하여 이중특이적 항체를 형성시켰다. 이와 같이 형성된 이중특이적 항체는 ErbB2 수용체를 과발현하는 세포 및 정상적인 인간 T 세포와 결합할 수 있을 뿐 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 유발할 수도 있었다.

또한, 재조합 세포 배양물로부터 이중특이적 항체 단편을 직접 만들고 분리하는 다양한 기술이 기재된 바 있다. 예를 들어, 류신 지퍼 (zipper)를 사용하여 이중 특이적 항체를 제조하였다 [Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)]. 유전자 융합에 의해, Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드를 2종의 상이한 항체의 Fab' 부분에 연결하였다. 항체 동종이량체의 한지 영역을 환원시켜 단량체를 형성한 다음, 다시 산화시켜 항체 이중이량체를 형성시켰다. 또한, 이 방법은 항체 동종이량체를 제조하기 위한 방법으로 이용할 수도 있다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디 (diabody)" 기술은 이중특이적 항체 단편을 제조하는 별법의 메카니즘을 제공한다. 이 단편은 링커에 의해 V_L 에 연결된 V_H 를 포함하는데, 이 링커는 너무 짧아서 동일한 쇄 상의 상기 두 도메인을 페어링 (pairing)시킬 수 없다. 따라서, 한 단편의 V_H 및 V_L 도메인은 또 다른 단편의 상보적인 V_H 및 V_L 도메인과 쌍을 이루어, 2개의 항원 결합 부위를 형성한다. 단쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 만드는 다른 방법이 또한 보고되었다 (문헌 [Gruber et al., J. Immunol. 152:5368 (1994)] 참조).

항체가가 2를 초과하는 항체도 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체도 제조할 수 있다 [Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991)].

6. 이중접합체 항체

이중접합체 항체도 본 발명의 범위에 포함된다. 이중접합체 항체는 2개의 공유결합된 항체로 구성된다. 이러한 항체는 예를 들어 면역계 세포를 원하지 않는 세포에 표적화시키기 위해 (미국 특허 제4,676,980호), HIV 감염의 치료를 위해 (WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089) 제안되었다. 이중접합체 항체는 가교결합제를 사용하는 방법을 포함하여 합성 단백질 화학에 공지된 방법을 이용하여 시험관내에서 제조할 수 있는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 면역독소는 디설피드 교환 반응을 이용하거나 또는 티오에테르 결합을 형성함으로써 제조할 수 있다. 상기 목적에 적합한 시약의 예로는 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토부티르이미데이트, 및 미국 특허 제4,676,980호 등에 개시된 시약 등이 있다.

7. 다가 항체

다가 항체는 2가 항체보다 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 더 빠르게 내재화될 수 있고(있거나) 이화될 수 있다. 본 발명의 항체는 항원 결합 부위가 3개 이상인 다가 항체 (IgM 클래스 이외의 다른 클래스; 예를 들어 4가 항체)일 수 있는데, 이러한 다가 항체는 항체의 폴리펩티드 쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 발현을 통해 용이하게 생성될 수 있다. 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 바람직한 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 힌지 영역으로 구성되어 있거나 이를 포함한다. 이 시나리오에서, 항체는 Fc 영역, 및 이 영역의 아미노-말단에 있는 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 본원의 바람직한 다가 항체는 3개 내지 약 8개, 바람직하게는 4개의 항원 결합 부위로 구성되어 있거나 이를 포함한다. 상기 다가 항체는 1개 이상의 폴리펩티드 쇄 (바람직하게는 2개의 폴리펩티드 쇄)를 포함하는데, 여기서 상기 폴리펩티드 쇄는 2개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어, 상기 폴리펩티드 쇄는 $VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc$ 를 포함할 수 있는데, 여기서 $VD1$ 은 제1 가변 도메인이고, $VD2$ 는 제2 가변 도메인이고, Fc 는 Fc 영역의 한 폴리펩티드 쇄이고, $X1$ 및 $X2$ 는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n 은 0 또는 1이다. 예를 들어, 폴리펩티드 쇄는 $VH-CH1$ -가교성 링커- $VH-CH1-Fc$ 영역 쇄; 또는 $VH-CH1-VH-CH1-Fc$ 영역 쇄를 포함할 수 있다. 본원의 다가 항체는 바람직하게는 2개 이상 (및 바람직하게는 4개)의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 본원의 다가 항체는 예를 들어 약 2개 내지 약 8개의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에서 고려되는 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드는 경쇄 가변 도메인을 포함하고 임의로서는 CL 도메인을 추가로 포함한다.

8. 이펙터 기능 조작

이펙터 기능에 대해 본 발명의 항체를 변형하여 예를 들어 항체의 항원-의존성 세포에 의해 매개된 세포독성 (ADCC) 및 (또는) 보체-의존성 세포독성 (CDC)를 강화시키는 것이 바람직할 수 있다. 이는 항체의 Fc 영역에 1개 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 시스테인 잔기를 Fc 영역에 도입하여 이 영역내 쇄간 디설피드 결합을 형성시킬 수 있다. 이와 같이 제조된 동종이량체 항체는 개선된 내재화 능력 및(또는) 증가된 보체에 의해 매개된 세포 사멸 및 항체-의존성 세포에 의해 매개된 세포독성 (ADCC)을 가질 수 있다. 문헌 ([Caron et al., J. Exp. Med., 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, J. Immunol., 148:2918-2922 (1992)])을 참조한다. 또한, 문헌 [Wolff et al. Cancer Research, 53: 2560-2565 (1993)]에 기재된 이중이관능성 가교-링커를 사용하여 항종양 활성이 증대된 동종이량체 항체를 제조할 수 있다. 별법으로, 이중의 Fc 영역을 갖는 항체를 조작하여 보체에 의한 용해능 및 ADCC 능력을 증대시킬 수 있다. 문헌 [Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989)]을 참조한다. 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 셀비지 수용체 결합 에피토프를 예를 들어 미국 특허 제5,739,277호에 기재된 바와 같이 항체 (특히, 항체 단편)에 혼입시킬 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "셀비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기를 증가시키는 역할을 하는 IgG 분자 (예를 들어 IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 또는 IgG_4)의 Fc 영역의 에피토프를 의미한다.

9. 면역접합체

또한, 본 발명은 세포독성제, 예를 들어 화학요법제, 성장억제제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 그의 단편) 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성접합체)와 접합된 항체를 포함하는 면역접합체에 관한 것이다.

상기 면역접합체의 생성에 유용한 화학요법제는 상기 기재되어 있다. 사용될 수 있는 효소적으로 활성인 독소 및 그의 단편에는 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 애틀기노사 (*Pseudomonas*

aeruginosa) 유래), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 파이톨라카 아메리카나 (*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*Saponaire officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신, 및 트리코테세네스가 포함된다. 여러 방사성핵종을 방사성접합된 항체의 제조에 이용할 수 있다. 그의 예로는 ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y 및 ^{186}Re 가 포함된다. 다양한 이관능성 단백질-커플링제, 예를 들어 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올)프로피오네이트(SPDP), 이미노티올란(IT), 이미노에스테르의 이관능성 유도체(예를 들어, 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르(예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드(예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물(예를 들어, 비스(p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체(예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트(예를 들어, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트), 및 비스-활성 불소 화합물(예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 항체와 세포독성제의 접합체를 만든다. 예를 들어, 문헌 (Vitetta et al., *Science*, 238:1098 (1987))에 기재된 바와 같이 리신 면역독소를 제조할 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산(MX-DTPA)은 방사성핵종과 항체를 접합시키는 전형적인 킬레이팅제이다(WO 94/11026을 참조함).

항체 및 1종 이상의 소분자 독소(예를 들어, 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 트리코텐 및 CC1065, 및 독성을 나타내는 이들 독소의 유도체)로 구성된 접합체도 본원에서 고려된다.

메이탄신 및 메이탄시노이드

한 실시양태에서, 본 발명의 항-TAT 항체 (전장 또는 단편)는 하나 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된다.

메이탄시노이드는 튜블린 중합을 억제하는 작용을 하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카산 관목 메이테누스 세라타 (*Maytenus serrata*)로부터 처음 분리되었다 [미국 특허 제3,896,111호]. 그 후, 특정 미생물도 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르와 같은 메이탄시노이드를 생산하는 것으로 밝혀졌다 [미국 특허 제4,151,042호]. 합성 메이탄시놀, 그의 유도체 및 유사체는 예를 들면, 미국 특허 제4,137,230호; 동 제4,248,870호; 동 제4,256,746호; 동 제4,260,608호; 동 제4,265,814호; 동 제4,294,757호; 동 제4,307,016호; 동 제4,308,268호; 동 제4,308,269호; 동 제4,309,428호; 동 제4,313,946호; 동 제4,315,929호; 동 제4,317,821호; 동 제4,322,348호; 동 제4,331,598호; 동 제4,361,650호; 동 제4,364,866호; 동 제4,424,219호; 동 제4,450,254호; 동 제4,362,663호; 및 동 제4,371,533호 (이들 특허의 내용은 이 거명을 통해 본원에 포함되는 것으로 함)에 기재되어 있다.

메이탄시노이드-항체 접합체

메이탄신 및 메이탄시노이드의 치료율을 향상시키기 위한 시도로서, 메이탄신 및 메이탄시노이드를 종양 세포 항원과 특이적으로 결합하는 항체에 접합시켰다. 메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체 및 그의 치료 용도는, 예를 들면 미국 특허 제5,208,020호; 동 제5,416,064호; 및 EP EP 0 425 235 B1에 기재되어 있고, 이들 특허의 내용은 이 거명을 통해 본원에 포함되는 것으로 한다. 문헌 [Liu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996)]에는 인간 결장직장암에 대한 모노클로날 항체 C242에 연결된 메이탄시노이드 (DM1로 명명됨)를 포함하는 면역접합체가 기재되어 있다. 이러한 접합체는 배양된 결장암 세포에 대해 강력한 세포독성을 나타내는 것으로 밝혀졌고, 생체내 종양 성장 분석에서 항종양 활성을 나타내었다. 문헌 [Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992)]에는 메이탄시노이드가 디술피드 링커를 통하여, 인간 결장암 세포주 상의 항원과 결합하는 쥐 항체 A7과 접합되어 있거나, 또는 HER-2/*neu* 종양유전자와 결합하는 또 다른 쥐 모노클로날 항체 TA.1과 접합되어 있는 면역접합체가 기재되어 있다. 이러한 TA.1-메이탄시노이드 접합체의 세포독성은, 세포 당 3×10^5 개의 HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3 상에서 시험관내 시험하였다. 이러한 접합체 약물은 메이탄시노이드 무함유 약물과 유사한 정도의 세포독성을 나타내었는데, 이때 세포독성은 항체 분자 당 메이탄시노이드 분자의 수를 증가시킴으로써 강화시킬 수 있었다. A7-메이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 보였다.

항-TAT 폴리펩티드 항체-메이탄시노이드 접합체 (면역접합체)

항-TAT 항체-메이탄시노이드 접합체는 상기 항체나 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의하게 저하시키지 않으면서 항-TAT 항체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 결합시킴으로써 제조한다. 한 분자의 독소/항체조차도 메이탄시노이드가 결합되어 있지 않은 항체를 사용할 때보다 세포독성을 상승시킬 것으로 예상되었다 하더라도, 항체 당 접합되어 있는 평균 3-4개의 메이탄시노이드 분자는 항체의 기능 또는 용해성에 부정적인 영향을 주지 않으면서 표적 세포의 세포독성을 상승시키는 효과를 나타내었다. 메이탄시노이드는 당업계에 널리 공지되어 있고, 공지된 기술에 의해 합성되거나

나 천연 공급원으로부터 분리될 수 있다. 적합한 메이탄시노이드는 예를 들어, 미국 특허 제5,208,020호, 및 상기 언급한 다른 특허 및 비특허 공보에 기재되어 있다. 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀, 및 방향족 환이 변형되거나 메이탄시놀 분자의 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예를 들면 다양한 메이탄시놀 에스테르이다.

항체-메이탄시노이드 접합체를 제조하는데 사용하는 다수의 연결기가 당업계에 있으며, 이 연결기에는, 예를 들면 미국 특허 제5,208,020호 또는 EP 특허 제0 425 235 B1호 및 문헌 [Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992)]에 기재된 것이 포함된다. 이러한 연결 기에는 상기 언급된 특허에 개시된 바와 같은, 디설피드 기, 티오에테르 기, 산 불안정 기, 광불안정 기, 펩티다제 불안정 기 또는 에스테라제 불안정 기가 포함되는데, 디설피드 및 티오에테르 기가 바람직하다.

상기 항체와 메이탄시노이드의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예를 들면 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디피미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어, 비스 (p-아지도벤조일)헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 만들 수 있다. 특히 바람직한 커플링제에는 디설피드 연결을 제공해주는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP) [Carlsson et al., *Biochem. J.* 173:723-737 (1978)] 및 N-숙신이미딜-4-(2-피리딜티오) 펜타노에이트 (SPP)가 포함된다.

링커는 연결 유형에 따라서, 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들면, 에스테르 연결은 통상적인 커플링 기술을 이용하여, 히드록실기와 반응시켜 형성할 수 있다. 이 반응은 히드록실기가 있는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실기가 있는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 실시양태에서는, 이러한 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.

칼리케아미신

또 다른 대상 면역접합체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자에 접합되어 있는 항-TAT 항체를 포함한다. 항생제 중 칼리케아미신 측은 서브-피코몰 농도에서 이중 가닥 DNA를 절단할 수 있다. 칼리케아미신 족의 접합체를 제조하는 것에 대해서는 미국 특허 제5,712,374호, 동 제5,714,586호, 동 제5,739,116호, 동 제5,767,285호, 동 제5,770,701호, 동 제5,770,710호, 동 제5,773,001호, 동 제5,877,296호 (모두 아메리칸 시아나미드사의 특허임)을 참조한다. 사용될 수 있는, 칼리케아미신의 구조적 유사체에는 γ_1^I , α_2^I , α_3^I , N-아세틸- γ_1^I , PSAG 및 θ_1^I 이 포함되지만, 이에 제한되지 않는다 (Hinman et al. *Cancer Research* 53: 3336-3342 (1993), Lode et al. *Cancer Research* 58: 2925-2928 (1998); 상기 미국 특허는 모두 아메리칸 시아나미드사의 특허임). 항체와 접합시킬 수 있는 또 다른 항-종양 약물은 안티폴레이트인 QFA이다. 칼리케아미신과 QFA 둘 다에 세포내 작용 부위가 있고, 이들은 원형질막을 용이하게 통과하지 못한다. 그러므로, 항체에 의해 매개되는 내재화를 통해 이들 제제를 세포내로 흡수시키면 이들의 세포독성 효과가 크게 상승된다.

기타 세포독성제

본 발명의 항-TAT 항체에 접합시킬 수 있는 다른 항종양제에는 BCNU, 스트렙타조이신, 빈크리스틴 및 5-플루오로우라실, 미국 특허 제5,053,394호, 제5,770,710호에 기재된, 총체적으로 LL-E33288 복합체로 공지된 작용제 군뿐만 아니라 에스페라미신 (미국 특허 제5,877,296호)이 포함된다.

사용할 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편에는 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래함), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디 (*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 파이톨라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 (*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 (*Saponaire officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테세네스가 포함된다 (1993년 10월 28일 공개된 WO 93/21232 참조).

본 발명은 항체와, 핵분해 활성을 나타내는 화합물 (예를 들어, 리보뉴클레아제, 또는 데옥시리보뉴클레아제와 같은 DNA 엔도뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 면역접합체도 고려한다.

종양의 선별적 파괴를 위해, 항체는 방사성이 높은 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성 동위원소를 사용하여 방사성 동위원소와 결합된 항-TAT 항체를 제조할 수 있다. 방사성 동위원소의 예에는 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} 및 Lu의 방사성 동위원소가 포함된다. 접합체를 진단에 사용하는 경우, 접합체는 신티그램 촬영 연구용 방사성 원자, 예를 들어 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 또는 I^{123} , 또는 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화 (MRI)로도 알려져 있음)용 스핀 표지, 예를 들어, 요오드-123, 요오드-131, 인듐-111, 불소-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망간 또는 철을 포함할 수 있다.

방사성 표지 또는 기타 표지는 공지된 방법으로 접합체에 도입시킬 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 생합성하거나, 예를 들어 수소 대신에 불소-19를 수반하는 적절한 아미노산 전구체를 사용하는 화학적 아미노산 합성으로 합성할 수 있다. $\text{tc}^{99\text{m}}$ 또는 I^{123} , Re^{186} , Re^{188} 및 In^{111} 과 같은 표지는 시스템인 잔기를 통해 펩티드에 부착할 수 있다. 이트륨-90은 라이신 잔기를 통해 부착할 수 있다. IODOGEN 방법 (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57)을 이용하여 요오드-123을 도입시킬 수 있다. 다른 방법은 문헌 ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]에 자세히 기재되어 있다.

항체와 세포독성제로 구성된 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예를 들면 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미노에스테르의 이관능성 유도체 (예를 들어, 디메틸 아디피미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예를 들어, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예를 들어, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예를 들어, 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예를 들어, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예를 들어, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 불소 화합물 (예를 들어, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 만들 수 있다. 예를 들면, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al. Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14-표지 1-이소티오시아네이트토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체와 방사성 뉴클레오타이드의 접합을 위한 예시적인 킬레이트제이다 (WO 94/11026 참조). 링커는 세포내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들면, 산 불안정 링커, 펩티다제-민감성 링커, 광-불안정성 링커, 디메틸 링커 또는 디설피드 함유 링커가 사용될 수 있다 [Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992); 미국 특허 제 5,208,020호].

별법으로, 항-TAT 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은, 예를 들면 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. DNA의 길이는 서로 인접해 있는 접합체의 두 부위, 또는 접합체의 원하는 성질을 파괴하지 못하는 링커 펩티드를 코딩하는 영역에 의해 분리되어 있는 접합체의 두 부위를 코딩하는 각 영역을 포함할 수 있다.

또 다른 실시양태에서는, 항체를 종양 예비표적화에 이용하기 위하여 "수용체" (예를 들어, 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있는데, 이러한 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 다음, 클리어링 (clearing)제를 사용하여 순환계로부터 결합되어 있지 않은 접합체를 제거한 후, 세포독성제 (예를 들어, 방사성 뉴클레오타이드)에 접합되는 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여한다.

10. 면역리포솜

본원에 개시된 항-TAT 항체를 면역리포솜으로 제제화할 수도 있다. "리포솜"은 약물을 포유동물에게 전달하는 데 유용한 다양한 유형의 지질, 인지질 및(또는) 계면활성제로 구성된 작은 소포체이다. 리포솜의 구성성분은 통상적으로 생물막의 지질 배열과 유사한 이중층 형성 배열로 배열되어 있다. 이 항체를 함유하는 리포솜은 당업계에서 공지된 방법, 예를 들어 문헌 [Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985)], [Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980)], 및 미국 특허 제4,485,045호 및 동 제4,544,545호, 및 1997년 10월 23일 공개된 WO 97/38731]에 기재된 방법으로 제조할 수 있다. 순환 시간이 증가된 리포솜은 미국 특허 제5,013,556호에 개시되어 있다.

특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민(PEG-PE)을 함유하는 지질 조성물을 사용하여 역상 증발법에 의해 제조할 수 있다. 정해진 공극 크기의 필터를 통해 리포솜을 밀어내어 소정의 직경을 갖는 리포솜을 수득한다. 문헌 [Martin et al., J. Biol. Chem., 257:286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 디설피드-교환 반응을 통해 본 발명의 항체의 Fab' 단편을 리포솜에 접합시킬 수 있다. 임의로는, 화학요법제를 리포솜내에 포함시킨다 (문헌 [Gabizon et al., J. National Cancer Inst., 81(19):1484 (1989)] 참조).

B. TAT 결합 올리고펩티드

본 발명의 TAT 결합 올리고펩티드는 바람직하게는 특히 본원에 기재된 TAT 폴리펩티드에 결합하는 올리고펩티드이다. TAT 결합 올리고펩티드는 공지된 올리고펩티드 합성 방법을 이용하여 화학적으로 합성하거나 재조합 기술을 이용하여 제조 및 정제할 수 있다. TAT 결합 올리고펩티드는 일반적으로 아미노산 약 5개 이상의 길이, 또는 아미노산 약 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 44개, 45개, 46개, 47개, 48개, 49개, 50개, 51개, 52개, 53개, 54개, 55개, 56개, 57개, 58개, 59개, 60개, 61개, 62개, 63개, 64개, 65개, 66개, 67개, 68개, 69개, 70개, 71개, 72개, 73개, 74개, 75개, 76개, 77개, 78개, 79개, 80개, 81개, 82개, 83개, 84개, 85개, 86개, 87개, 88개, 89개, 90개, 91개, 92개, 93개, 94개, 95개, 96개, 97개, 98개, 99개 또는 100개 이상의 길이이며, 이 올리고펩티드는 바람직하게는 특히 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드에 결합할 수 있다. TAT 결합 올리고펩티드는 공지된 기술을 이용하여 과도한 실험 없이 확인할 수 있다. 이에 대하여, 당업계에 공지된 폴리펩티드 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고펩티드에 대하여 올리고펩티드 라이브러리를 스크리닝하는 기술을 유의한다 (예를 들어, 미국 특허 제5,556,762호, 동 제5,750,373호, 동 제4,708,871호, 동 제4,833,092호, 동 제5,223,409호, 동 제5,403,484호, 동 제5,571,689호, 동 제5,663,143호; 및 문헌 [PCT 공개 번호 WO 84/03506 및 WO84/03564; [Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984)]; [Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)]; [Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)]; [Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)]; [Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378]; [Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832]; [Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352:624]; [Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581]; [Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363] 및 [Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668] 참조).

이에 대하여, 박테리오파지 (파지) 디스플레이는 공지된 기술이며, 이 기술로 큰 규모의 올리고펩티드 라이브러리를 스크리닝하여 폴리펩티드 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 라이브러리의 구성원을 확인할 수 있다. 파지 디스플레이는 변이체 폴리펩티드가 박테리오파지 입자의 표면상의 코트 단백질에 대한 융합 단백질로서 나타나는 기술이다 (Scott, J.K. and Smith, G. P. (1990) Science 249: 386). 파지 디스플레이의 유용성은 선택적으로 랜덤화된 단백질 변이체 (또는 랜덤하게 클로닝된 cDNA)의 큰 라이브러리가 높은 친화성을 갖는 표적 분자에 결합하는 서열들에 대하여 빠르고 효과적으로 정렬될 수 있다는 사실에 있다. 파지상의 펩티드 [Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378] 또는 단백질 ([Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832]; [Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624]; [Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581]; [Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363]) 라이브러리의 디스플레이는 특이적인 결합 특성을 갖는 것에 대하여 수백만의 폴리펩티드 또는 올리고펩티드를 스크리닝하기 위해 사용되어 왔다 (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668). 랜덤 돌연변이의 파지 라이브러리를 정렬시키는 것은 다수의 변이체를 제조하여 증식시키는 전략, 표적 수용체를 사용하여 친화성 정제하는 방법, 및 결합 증가의 결과를 평가하는 수단을 필요로 한다 [미국 특허 제5,223,409호, 동 제5,403,484호, 동 제5,571,689호 및 동 제5,663,143호].

대부분의 파지 디스플레이 방법이 섬유상 파지를 이용하지만, 람다형 파지 디스플레이 시스템 (WO 95/34683; U.S. 5,627,024), T4 파지 디스플레이 시스템 ([Ren, et al., Gene 215:439 (1998); Zhu et al., Cancer Research, 58(15):3209-3214 (1998)]; [Jiang et al., Infection & Immunity, 65(11):4770-4777 (1997)]; [Ren et al., Gene, 195(2):303-311 (1997)]; [Ren, Protein Sci., 5:1833 (1996)]; [Efimov et al., Virus Genes, 10:173 (1995)]) 및 T7 파지 디스플레이 시스템 ([Smith and Scott, Methods in Enzymology, 217, 228-257 (1993)]; U.S. 5,766,905)이 또한 알려져 있다.

현재까지 기본적인 파지 디스플레이 개념에 대한 많은 다른 개선 및 변형이 개발되어 왔다. 이러한 개선은 선택된 표적 분자에 결합하는 펩티드 라이브러리를 스크리닝하는 디스플레이 시스템의 능력 및 목적하는 특성에 대하여 이러한 단백질을 스크리닝하는 능력으로 기능성 단백질을 나타내는 능력을 증대시켰다. 파지 디스플레이 반응에 대한 조합 반응 장치가 개발되었으며 (WO 98/14277), 파지 디스플레이 라이브러리를 이용하여 이분자 상호작용 (WO 98/20169; WO 98/20159) 및 억제된 나선 펩티드의 특성 (WO 98/20036)을 분석 및 조절하였다. WO 97/35196은 파지 디스플레이 라이브러리를, 리간드가 표적 분자에 결합하는 제1 용액과 친화성 리간드가 표적 분자에 결합하지 않는 제2 용액과 접촉시켜 친화성 리간드를 분리함으로써 결합 리간드를 선택적으로 분리하는 방법을 기재하고 있다. WO 97/46251은 친화성 정제된 항체를 사용하여 랜덤 파지 디스플레이 라이브러리를 바이오패닝 (biopanning)한 다음, 결합 파지를 분리하고, 이어서 마이크로플레이트 웰을 사용하는 마이크로패닝 방법에 의해 고 친화성 결합 파지를 분리하는 방법을 기재하고 있다. 친화성 태그로서 스태필로코쿠스 아우레우스 단백질 A를 사용하는 것에 대하여 보고되었다 [Li et al. (1998) Mol Biotech.,

9:187]. WO 97/47314는 파지 디스플레이 라이브러리일 수 있는 조합 라이브러리를 이용하여 효소 특이성을 구별하는 기질 제외 라이브러리의 이용을 기재하고 있다. 파지 디스플레이를 이용하여 디터전트(detergent)로 사용하기에 적합한 효소를 선택하는 방법은 WO 97/09446에 기재되어 있다. 특이적 결합 단백질을 선택하는 다른 방법은 미국 특허 제 5,498,538호, 동 제 5,432,018호, 및 WO 98/15833에 기재되어 있다.

펩티드 라이브러리를 제조하고 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 방법은 또한 미국 특허 제 5,723,286호, 동 제 5,432,018호, 동 제 5,580,717호, 동 제 5,427,908호, 동 제 5,498,530호, 동 제 5,770,434호, 동 제 5,734,018호, 동 제 5,698,426호, 동 제 5,763,192호 및 동 제 5,723,323호에 개시되어 있다.

C. TAT 결합 유기 분자

TAT 결합 유기 분자는 바람직하게는 특이적으로 본원에 기재된 TAT 폴리펩티드에 결합하는, 본원에 정의된 올리고펩티드 또는 항체와는 다른 유기 분자이다. TAT 결합 유기 분자는 공지된 방법을 이용하여 확인하고, 화학적으로 합성할 수 있다(예를 들어, PCT 공개 WO 00/00823 및 WO 00/39585를 참조한다). TAT 결합 유기 분자는 일반적으로 크기가 약 2,000 달톤 미만이거나, 약 1,500, 750, 500, 250 또는 200 달톤 미만이며, 공지된 기술을 이용하여 불필요한 실험 없이도, 바람직하게는 특이적으로 본원에 기재된 TAT 폴리펩티드에 결합할 수 있는 유기 분자를 확인할 수 있다. 이에 대하여, 폴리펩티드 표적에 결합할 수 있는 분자에 대하여 유기 분자 라이브러리를 스크리닝하는 기술이 당업계에 잘 알려져 있음을 유의한다(예를 들어, PCT 공개 WO 00/00823 및 WO 00/39585를 참조한다). TAT 결합 유기 분자는 예를 들어 알데히드, 케톤, 옥심, 히드라존, 세미카르바존, 카르바지드, 1급 아민, 2급 아민, 3급 아민, N-치환된 히드라진, 히드라지드, 알콜, 에테르, 티올, 티오에테르, 디설피드, 카르복실산, 에스테르, 아마이드, 우레아, 카르바메이트, 카르보네이트, 케탈, 티오케탈, 아세탈, 티오아세탈, 아릴 할라이드, 아릴 술포네이트, 알킬 할라이드, 알킬 술포네이트, 방향족 화합물, 헤테로시클릭 화합물, 아닐린, 알켄, 알킨, 디올, 아미노 알콜, 옥사졸리딘, 옥사졸린, 티아졸리딘, 티아졸린, 엔아민, 술폰아미드, 에폭사이드, 아지리딘, 이소시아네이트, 술폰일 클로라이드, 디아조 화합물 또는 산 클로라이드 등일 수 있다.

D. 원하는 특성을 갖는 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 및 TAT 결합 유기 분자의 스크리닝

TAT 폴리펩티드에 결합하는 항체, 올리고펩티드 및 유기 분자의 제조 기술은 상기에 기재되어 있다. 원한다면, 특정한 생물학적 특징을 나타내는 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자를 추가로 선별할 수 있다.

본 발명의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자의 성장억제 효과는 당업자에게 공지된 방법, 예를 들어, TAT를 내재적으로 발현하거나 TAT 유전자로 형질감염 후 TAT를 발현하는 세포를 사용하여 측정할 수 있다. 예를 들어, 적절한 종양 세포주 및 TAT-형질감염 세포를 다양한 농도의 본 발명의 항-TAT 모노클로날 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자로 수 일(예를 들어, 2-7일) 동안 처리하고 크리스탈 바이올렛 또는 MTT로 염색하거나 다른 몇몇 비색 측정 분석법으로 분석할 수 있다. 증식을 측정하는 또 다른 방법은 본 발명의 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자가 존재하거나 부재하는 조건 하에서 처리된 세포에 의한 ^3H -티미딘 흡수를 비교하는 것이다. 처리 후, 세포를 모으고 DNA로 혼입된 방사화성량을 섬광계수기로 정량한다. 적절한 양성 대조군에는 선택된 세포주의 성장을 억제하는 것으로 알려진 성장억제 항체로 처리된 세포주가 포함된다. 생체내 종양 세포의 성장억제는 당업계에 알려진 다양한 방식으로 측정할 수 있다. 바람직하게는, 종양 세포는 TAT 폴리펩티드를 과발현하는 세포이다. 바람직하게는, 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자는 약 0.5 내지 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체 농도에서 처리되지 않은 종양 세포와 비교할 때 약 25-100%, 보다 바람직하게는 약 30-100%, 훨씬 더 바람직하게는 약 50-100% 또는 70-100% 만큼 시험관내 또는 생체내에서 TAT-발현 종양 세포의 세포 증식을 억제할 것이다. 성장억제는 세포 배양물 중에서 약 0.5 내지 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 약 0.5 nM 내지 200 nM의 항체 농도에서 측정할 수 있는데, 이때 상기 성장억제는 종양 세포를 항체에 노출시키고 1-10일 후 측정한다. 체중 1 kg 당 약 1 μg 내지 약 100 mg의 항-TAT 항체가 투여될 때 항체의 1차 투여로부터 약 5일 내지 3개월, 바람직하게는 약 5일 내지 30일 이내에 종양 크기 또는 종양 세포의 증식이 감소되는 경우, 항체가 생체내에서 성장억제 효과를 나타낸다고 한다.

세포 사멸을 유도하는 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자를 선별하기 위해서, 예를 들어 프로피듐 요오다이드(PI), 트립판 블루 또는 7AAD 흡수에 의해 나타나는 바와 같이, 막의 일체성이 손상된 정도를 대조군과 비교하여 평가할 수 있다. PI 흡수 분석은 보체 및 면역 이펙터 세포의 부재 하에 수행할 수 있다. TAT 폴리펩티드-발현 종양 세포는 배지 단독과 배양하거나, 적절한 항-TAT 항체(예를 들어, 약 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자를 함유하는 배지로 배양한다. 상기 세포를 3일 동안 인큐베이션시킨다. 각 처리를 수행한 후, 세포를 수세하고 35 mm 스트레이너-캡핑된 12×75 튜브내로 등분하여(튜브 당 1 ml, 처리 그룹 당 3 튜브) 세포 덩어리를 제거한다. 이어서, 튜브에 PI (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 넣는다. FACSCAN (등록상표) 유동세포계수기와 FACSCONVERT (등록상표)

CellQuest 소프트웨어 (벡톤 디킨슨; Becton Dickinson)를 사용하여 샘플을 분석할 수 있다. PI 흡수에 의해 측정된 바와 같이 통계학적 유의적 수준의 세포 사멸을 유도하는 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자를 세포 사멸 유도 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자로서 선별할 수 있다.

원하는 항체에 의해 결합된 TAT 폴리펩티드 상의 에피토프에 결합하는 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자를 스크리닝하기 위해, 문헌 [Antibodies. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 바와 같은 통상적인 교차-차단 분석을 수행할 수 있다. 이 분석은 시험 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자가 공지된 항-TAT 항체와 동일한 부위 또는 에피토프에 결합하는 지를 알아보는 데 사용할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 에피토프 맵핑은 당업계에서 공지된 방법으로 수행할 수 있다. 예를 들어, 항체 서열은 알라닌 스캐닝과 같은 방법으로 돌연변이화시켜 접촉 잔기를 확인할 수 있다. 돌연변이 항체는 먼저 폴리클로날 항체와의 결합에 대해 시험하여 적절하게 폴딩되는지를 확인한다. 다른 방법에서, TAT 폴리펩티드의 여러 영역에 상응하는 펩티드는 시험 항체와 함께, 또는 특성이 규명된 에피토프 또는 공지된 에피토프가 있는 항체 및 시험 항체와 함께 경쟁 분석에 사용할 수 있다.

E. 항체 의존적 효소에 의해 매개되는 전구약물 요법 (ADEPT)

본 발명의 항체는, 전구약물 (예를 들어, 펩티딜 화학요법제; WO 81/01145 참조)을 활성 항암제로 전환시키는 전구약물 활성화 효소에 항체를 접합시킴으로써, ADEPT에 사용할 수도 있다 [예를 들면, WO 88/07378 및 미국 특허 제 4,975,278호 참조].

ADEPT에 유용한 면역접합체의 효소 성분에는, 전구약물보다 높은 활성의 세포독성 형태로 전환시키는 방식으로 전구약물에 작용할 수 있는 효소가 포함된다.

본 발명의 방법에 유용한 효소에는 포스페이트 함유 전구약물을 자유 약물로 전환시키는 데 유용한 알칼리 포스파타제; 술포이트 함유 전구약물을 자유 약물로 전환시키는 데 유용한 아릴술포타제; 무독성 5-플루오로시토신을 항암제인 5-플루오로우라실로 전환시키는 데 유용한 시토신 데아미나제; 펩티드 함유 전구약물을 자유 약물로 전환시키는 데 유용한 프로테아제, 예를 들면, 세라타아 프로테아제, 썬모라이신, 서브틸리신, 카르복시펩티다제 및 카텡신 (예를 들어, 카텡신 B 및 L); D-아미노산 치환체를 함유하는 전구약물을 전환시키는 데 유용한 D-알라닐카르복시펩티다제; 글리코실화 전구약물을 자유 약물로 전환시키는 데 유용한 탄수화물 절단 효소, 예를 들면, β -갈락토시다제 및 뉴라미니다제; β -락탐으로 유도체화된 약물을 자유 약물로 전환시키는 데 유용한 β -락타마제; 및 아민 질소에서 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸 기로 유도체화된 약물을 각각 자유 약물로 전환시키는 데 유용한 페니실린 아미다제, 예를 들면, 페니실린 V 아미다제 또는 페니실린 G 아미다제가 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또는, 당업계에서 "아브자임 (abzyme)"으로도 공지되어 있는, 효소 활성을 나타내는 항체를 사용하여 본 발명의 전구약물을 자유 활성 약물로 전환시킬 수 있다 [Massey, *Nature* 328:457-458 (1987)]. 항체-아브자임 접합체를 본원에 기재된 바와 같이 제조하여 아브자임을 종양 세포 집단에 전달할 수 있다.

본 발명의 효소는 상기 논의된 헤테로-이관능성 가교결합제를 사용하는 것과 같이, 당업계에 널리 공지된 기술로 항-TAT 항체에 공유 결합시킬 수 있다. 별법으로, 본 발명의 효소의 적어도 기능 활성 부위에 연결된 본 발명의 항체의 항원 결합 영역을 적어도 포함하는 융합 단백질은, 당업계에 널리 공지된 재조합 DNA 기술을 이용하여 제작할 수 있다 [Neuberger et al., *Nature* 312:604-608 (1984)].

F. 전장 TAT 폴리펩티드

본 발명은 본원에서 TAT 폴리펩티드로 불리는 폴리펩티드를 코딩하는 새로 확인 및 단리된 뉴클레오티드 서열도 제공한다. 구체적으로, 다양한 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 cDNA (부분 및 전장 cDNA)가 하기 실시예에 더 자세히 개시된 바와 같이 동정 및 단리되었다.

하기 실시예에 개시된 바와 같이, 다양한 cDNA 클론을 ATCC에 기탁하였다. 이들 클론의 실제 뉴클레오티드 서열은 당업계의 통상적인 방법을 이용하여 기탁한 클론을 서열화함으로써 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 예상 아미노산 서열은 당업계의 통상적인 기술을 이용하여 뉴클레오티드 서열로부터 결정될 수 있다. TAT 폴리펩티드 및 본원에 기재된 코딩 핵산에 있어서, 몇몇 경우, 본 발명자들은 당시에 이용할 수 있는 서열 정보를 이용하여 확인할 수 있는 가장 좋은 리딩 프레임이 어떤 것인지를 찾았다.

G. 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드 변이체

본원에 기재되어 있는 항-TAT 항체 및 전장 천연 서열 TAT 폴리펩티드 외에, 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드 변이체를 제조할 수 있는 것으로 생각된다. 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드 변이체는 적절한 뉴클레오티드 변화를 코딩 DNA에 도입하고(하거나) 원하는 항체 또는 폴리펩티드를 합성하여 제조할 수 있다. 당업자라면 글리코실화 부위의 수 또는 위치의 변화 또는 막 앵커링 (anchoring) 특성의 변화와 같은 아미노산 변화가 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 번역후 프로세스를 변화시킬 수 있다는 것을 이해할 것이다.

본원에 기재되어 있는 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 변이체는 예를 들어 미국 특허 제5,364,934호에 개시된 보존적 및 비보존적 돌연변이 기술 및 지침을 사용하여 제조할 수 있다. 변이는 천연 서열 항체 또는 폴리펩티드와 비교할 때 항체 또는 폴리펩티드의 아미노산 서열이 변화된 항체 또는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 코돈의 치환, 결실 또는 삽입일 수 있다. 임의로는, 하나 이상의 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 하나 이상의 도메인에서 하나 이상의 아미노산을 임의의 다른 아미노산으로 치환함으로써 변이화시킨다. 어떤 아미노산 잔기가 원하는 활성에 유해한 효과를 주지 않으면서 삽입, 치환 또는 결실될 수 있는지는 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 서열을 공지의 상동 단백질 분자의 서열과 비교하고 상동성이 높은 영역에서 만들어진 아미노산 서열 변화의 수를 최소화함으로써 결정할 수 있다. 아미노산 치환은 하나의 아미노산을 유사한 구조 및(또는) 화학적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 치환, 예를 들어 류신의 세린으로의 치환, 즉 아미노산의 보존적 치환의 결과일 수 있다. 삽입 또는 결실은 임의로 약 1 내지 5개의 아미노산에서 발생할 수 있다. 허용되는 변이는 서열내에 아미노산을 체계적으로 삽입, 결실 또는 치환시키고, 전장 또는 성숙 천연 서열에 의해 나타나는 생성 변이체의 활성을 시험함으로써 결정할 수 있다.

본원은 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 단편들을 제공한다. 예를 들어 전장 천연 항체 또는 단백질과 비교할 때, 이 단편들은 N-말단 또는 C-말단이 잘릴 수 있거나 내부 잔기가 결실될 수 있다. 몇몇 단편은 본 발명의 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 원하는 생물학적 활성에 필수적이지 않은 아미노산 잔기를 갖지 않는다.

항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드 단편은 많은 통상의 기술 중 임의의 기술에 의해 제조할 수 있다. 원하는 펩티드 단편은 화학적으로 합성할 수 있다. 다른 방법은 효소적 분해 방법, 예를 들어 이 단백질을 특정 아미노산 잔기에 의해 정의되는 부위에서 단백질을 자르는 것으로 알려진 효소로 처리하거나 또는 이 DNA를 적합한 제한 효소로 잘라내고 원하는 단편을 단리함으로써 항체 또는 폴리펩티드 단편을 제조하는 것을 포함한다. 그러나, 또 다른 적합한 기술은 원하는 항체를 코딩하는 DNA 단편을 단리하고 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 증폭하는 것을 포함한다. DNA 단편의 원하는 말단부를 정의하는 올리고뉴클레오티드는 PCR에서 5' 및 3' 프라이머로 사용된다. 바람직하게는, 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드 단편은 본원에 개시된 천연 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드와 한가지 이상의 생물학적 및(또는) 면역학적 활성을 공유한다.

구체적인 실시양태에서, 대상물의 보존적 치환은 바람직한 치환이라는 표제로 표 6에 나타내었다. 이러한 치환에 의해 생물학적 활성이 변화하는 경우, 하기 표 6에서 예시적 치환으로서 명명되거나 아미노산 종류에 대해서 하기에서 보다 상세하게 설명된 보다 실질적인 변화를 도입하고 산물을 스크리닝하였다.

표 6.

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

항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 기능 또는 면역학적 동일성의 실질적인 변형은 (a) 치환 영역에서의 폴리펩티드 주쇄의 구조를, 예를 들어 시이트 또는 나선 형태로서 유지하거나, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성을 유지하거나, 또는 (c) 측쇄의 크기를 유지하는 데 있어서 그의 효과가 상당히 다른 치환을 선택함으로써 수행된다. 자연 발생적인 잔기는 공통적인 측쇄 특성에 따라 다음과 같은 군으로 구분된다:

- (1) 소수성: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;
- (3) 산성: asp, glu;
- (4) 염기성: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및
- (6) 방향족: trp, tyr, phe.

비보존적 치환은 상기 한 종류의 구성 성분을 다른 종류의 것으로 교환시킬 것이다. 또한, 이렇게 치환되는 잔기는 보존적 치환 부위에 도입될 수 있거나 또는 보다 바람직하게는 나머지 (비보존) 부위에 도입될 수 있다.

변이는 올리고뉴클레오타이드 매개 (부위 지정) 돌연변이유발법, 알라닌 스캐닝법 및 PCR 돌연변이유발법과 같은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 위치 지정 돌연변이유발법 [Carter et al., Nucl. Acids Res., **13**:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., **10**:6487 (1987)], 카세트 돌연변이유발법 [Wells et al., Gene, **34**:315 (1985)], 제한 선택 돌연변이유발법 [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, **317**:415 (1986)] 또는 다른 공지의 기술을 클로닝된 DNA에 실시하여 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 변이체 DNA를 제조할 수 있다.

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

항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 적절한 구조를 유지하는 데 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기를 일반적으로 세린으로 치환하여 상기 분자의 산화적 안정성을 향상시키고 잘못된 가교결합을 방지할 수 있다. 역으로 말하면, 시스테인 결합을 상기 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드에 가하여 그의 안정성을 향상시킬 수 있다 (특히, 상기 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우).

특히 바람직한 유형의 치환 변이체는 모 (parent) 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기를 치환하는 것을 포함한다. 일반적으로, 추가로 개발시키기 위해 선택한 생성 변이체는 이들을 생성시킨 모 항체에 비해 개선된 생물학적 특성을 나타낼 것이다. 이러한 치환 변이체를 생성시키는 편리한 방법은 파지 디스플레이를 이용하는 친화성 성숙화를 포함한다. 간략하게 언급하면, 몇 개의 추가변 영역 부위 (예를 들어, 6 내지 7개 부위)를 각 부위에 가능한 모든 아미노산 치환부가 생성되도록 돌연변이화시킨다. 이로써 생성된 항체 변이체는, 각 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 산물과의 융합체로서 필라멘트상 파지 입자로부터 1가 방식으로 디스플레이된다. 이어서, 본원에 기재된 바와 같이 파지-디스플레이 변이체를 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 추가변 영역 부위를 동정하기 위해서는, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발을 수행하여, 항원 결합성에 상당히 기여하는 추가변 영역 잔기를 동정할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하여 상기 항체와 인간 TAT 폴리펩티드 간의 접촉점을 동정하는 것이 유리할 수 있다. 이러한 접촉 잔기와 이에 이웃하는 잔기가 본원에서 검토된 기술에 따라서 치환하기 위한 후보이다. 이러한 변이체가 일단 생성되면, 변이체 패널을 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 한가지 이상의 관련 분석법에서 우수한 성질을 나타내는 항체를 선별하여 더 개발할 수 있다.

항-TAT 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이들 방법에는 천연 공급원으로부터 단리하는 방법 (자연발생적 아미노산 서열 변이체의 경우) 또는 올리고뉴클레오타이드에 의해 매개된 (또는 위치 지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발, 및 항-TAT 항체의 앞서 제조된 변이체 또는 비-변이체 형태의 카세트 돌연변이유발에 의한 제조 방법이 포함되지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

H. 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드의 변형

항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드의 공유결합 변형은 본 발명의 범위에 포함된다. 공유결합 변형의 한 형태는 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 선택된 측쇄 또는 N 말단 또는 C 말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 표적 아미노산 잔기를 반응시키는 것을 포함한다. 이관능성 제제를 사용한 유도체화는, 예를 들어 항-TAT 항체 정제 방법에 사용하기 위한 수불용성 지지체 매트릭스 또는 표면에 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 가교결합시키거나 그 반대로 하는 데 유용하다. 통상 사용되는 가교결합제는 예를 들어 1,1-비스(디아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타르알데히드, N-히드록시숙신이미드 에스테르, 예를 들어 4-아지도살리실산과의 에스테르, 3,3'-디티오비스(숙신이미딜프로피오네이트)와 같은 디숙신이미딜 에스테르를 포함하는 동종이관능성 이미도에스테르, 비스-N-말레이미도-1,8-옥탄과 같은 이관능성 말레이미드 및 메틸-3-[(p-아지도페닐)디티오]프로피오이미데이트와 같은 물질을 포함한다.

다른 변형은 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기의 각각 대응하는 글루타미 및 아스파르틸 잔기로의 탈아미드화, 프롤린 및 리신의 히드록실화, 세린 또는 트레오닌 잔기의 히드록실기의 인산화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 알파-아미노기의 메틸화 [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86(1983)], N-말단 아민의 아세틸화 및 C-말단 카르복실기의 아미드화를 포함한다.

본 발명의 범위 내에 포함되는 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 공유결합 변형의 다른 유형은 항체 또는 폴리펩티드의 천연 글리코실화 패턴의 변화를 포함한다. 본원의 목적을 위한 "천연 글리코실화 패턴의 변화"는 천연 서열 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드에서 발견되는 하나 이상의 탄수화물 잔기의 결실(잠재적인 글리코실화 부위를 제거하거나 화학적 및/또는 효소적 방법에 의해 글리코실화를 결실시킴으로써) 및/또는 천연 서열 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위의 부가를 의미한다. 또한, 이 용어는 존재하는 다양한 탄수화물 잔기의 특성 및 비율의 변화를 비롯한 천연 단백질의 글리코실화에 있어서의 질적 변화를 포함한다.

항체 및 다른 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된 것이다. 'N-연결된'이란 탄수화물 잔기가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 말한다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 효소를 사용하여 탄수화물 잔기를 아스파라긴 측쇄에 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이들 트리펩티드 서열 중 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써, 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된

다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중 하나를 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착시키는 것을 의미하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시크실리신을 사용할 수도 있다.

항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드에 대한 글리코실화 부위의 부가는 상기 기재된 트리펩티드 서열들의 하나 이상을 포함하도록 아미노산 서열의 변화에 의해 편리하게 달성된다 (N-연결 글리코실화 부위의 경우). 변화는 본래의 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 서열에 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 치환에 의해 이루어질 수 있다 (O-연결 글리코실화 부위의 경우). 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 아미노산 서열은, 특히 원하는 아미노산으로 번역될 코돈을 생성시키도록 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 미리 선택된 염기에서 돌연변이화 시킴으로써 DNA 수준에서의 변화를 통하여 임의로 변화시킬 수 있다.

항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 상의 탄수화물 잔기의 수를 증가시키는 다른 수단은 글리코시드를 폴리펩티드에 화학적으로 또는 효소에 의해 커플링시키는 것이다. 이러한 방법은 예를 들어 1987년 9월 11일 공개된 WO 87/05330 및 문헌 [Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981)]에 기재되어 있다.

항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드에 존재하는 탄수화물 잔기의 제거는 화학적으로 또는 효소에 의해 또는 글리코실화 표적으로 기능하는 아미노산 잔기를 코딩하는 코돈의 돌연변이에 의한 치환에 의해 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화 기술은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Hakimuddin, et al., Arch. Biochem. Biophys., 259:52(1987)] 및 [Edge et al., Anal. Biochem., 118:131(1981)]에 기재되어 있다. 폴리펩티드 상의 탄수화물 잔기의 효소에 의한 절단은 다양한 엔도글리코시다제 및 엑소글리코시다제를 사용하여 달성할 수 있다 [Thotakura et al., Meth. Enzymol., 138:350(1987)].

항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 공유결합 변형의 다른 종류는 미국 특허 제4,640,835호, 동 제4,496,689호, 동 제4,301,144호, 동 제4,670,417호, 동 제4,791,192호 또는 동 제4,179,337호에 기재된 방식으로 다양한 비단백질성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌 중의 하나에 상기 항체 또는 폴리펩티드를 연결시키는 것을 포함한다. 항체 또는 폴리펩티드는 또한 예를 들면, 코아세르베이션 (coacervation) 기술 또는 계면 중합 반응 (예를 들면, 각각 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-미소캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 미소캡슐)에 의해 제조된 미소캡슐 내에 넣어 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들면, 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노-캡슐) 또는 마크로에멀전의 형태로 만들 수 있다. 이러한 기술이 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)]에 개시되어 있다.

또한, 본 발명의 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드는 다른 이종 폴리펩티드 또는 아미노산 서열에 융합된 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 포함하는 키메라 분자를 형성하는 방식으로 변형될 수 있다.

한 실시태양에서, 이러한 키메라 분자는 항-태그 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 에피토프를 제공하는 태그 폴리펩티드와 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 융합체를 포함한다. 에피토프 태그는 일반적으로 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 아미노 또는 카르복실 말단에 위치한다. 상기 에피토프 태그를 갖는 형태의 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 존재는 태그 폴리펩티드에 대한 항체를 사용하여 검출할 수 있다. 또한, 에피토프 태그를 도입하면 항-태그 항체 또는 에피토프 태그에 결합하는 다른 종류의 친화성 매트릭스를 사용한 친화성 정제에 의해 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 용이하게 정제할 수 있다. 다양한 태그 폴리펩티드 및 이들 각각의 항체는 당업계에 공지되어 있다. 그 예로는 폴리-히스티딘(poly-his) 또는 폴리-히스티딘-글리신 (poly-his-gly) 태그, flu HA 태그 폴리펩티드 및 그의 항체 12CA5 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)], c-myc 태그 및 그에 대한 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 및 9E10 항체 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3636 (1985)], 및 단순포진 바이러스 당단백질 D (gD) 태그 및 그의 항체 [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]를 들 수 있다. 다른 태그 폴리펩티드는 Flag-펩티드 [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)], KT3 에피토프 펩티드 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)], α-튜블린 에피토프 펩티드 [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)] 및 T7 유전자 10 단백질 펩티드 태그 [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)]를 포함한다.

다른 한 실시태양에서, 키메라 분자는 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드와 면역글로불린 또는 면역글로불린의 특정 영역의 융합체를 포함할 수 있다. 키메라 분자의 2가 형태("면역어드헤신"으로 언급하기도 함)의 경우, 융합체는 IgG 분자의 Fc 영역일 수 있다. 이 Ig 융합체는 바람직하게는 Ig 분자내 1개 이상의 가변성 영역의 부위를 항-TAT 항체 또는 TAT

폴리펩티드의 가용성(결실 또는 실활화된 막형단 도메인) 형태로 치환한 것을 포함한다. 특히 바람직한 한 실시태양에서, 면역글로불린 융합체는 IgG1 분자의 힌지, CH₂ 및 CH₃, 또는 힌지, CH₁, CH₂ 및 CH₃ 영역을 포함한다. 면역글로불린 융합체를 제조하는 방법에 대해서는 1995년 6월 27일 간행된 미국 특허 제5,428,130호를 참조한다.

I. 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드의 제조

하기 설명은 주로 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드 코딩 핵산을 함유하는 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 세포를 배양함으로써 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드를 제조하는 것에 관한 것이다. 물론, 당업계에 공지된 다른 방법을 고려하여 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드를 제조할 수 있다. 예를 들어, 적절한 아미노산 서열 또는 그의 일부는 고상 기술을 이용하는 직접적인 펩티드 합성법에 의해 제조할 수 있다 (문헌 [Stewart et al., *Solid-Phase Peptide Synthesis*, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154 (1963)] 참조). 시험관내 단백질 합성은 수동 방법 또는 자동 방법에 의해 수행될 수 있다. 자동 합성법은 예를 들어 어플라이드 바이오시스템즈 펩티드 합성기 (Applied Biosystems Peptide Synthesizer)(미국 캘리포니아주 포스터시티 소재)를 제조사의 지시에 따라 사용하여 수행할 수 있다. 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 다양한 부위를 별도로 화학적으로 합성하고 화학적 또는 효소적 방법을 이용하여 조합함으로써 원하는 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 제조할 수 있다.

1. 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 단리

항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 DNA는 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 mRNA를 보유하여 그를 검출가능한 수준으로 발현할 것으로 생각되는 조직으로부터 제조한 cDNA 라이브러리로부터 수득할 수 있다. 따라서, 인간 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 DNA는 인체 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 편리하게 수득할 수 있다. 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 코딩 유전자는 또한 게놈 라이브러리로부터 수득하거나 또는 공지된 합성 방법(예를 들어, 자동 핵산 합성 방법)에 의해 수득할 수 있다.

라이브러리는 목적 유전자 또는 이 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 확인하기 위해 설계된 프로브 (예를 들어, 약 20 내지 80개 이상의 염기로 구성된 올리고뉴클레오타이드)를 사용하여 스크리닝할 수 있다. 선택된 프로브를 사용한 cDNA 또는 게놈 라이브러리의 스크리닝은 예를 들어 문헌 [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]에 기재된 바와 같은 표준 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 단리하는 다른 수단은 PCR 방법을 이용하는 것이다 [Sambrook et al., 상기 문헌]; [Dieffenbach et al., *PCR Primer: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

cDNA 라이브러리를 스크리닝하는 기술은 당업계에 공지되어 있다. 프로브로서 선택된 올리고뉴클레오타이드 서열은 가양성 결과를 최소화하기 위해서 충분한 길이를 갖고 충분히 분명한 서열이어야 한다. 올리고뉴클레오타이드는 스크리닝되는 라이브러리에서 DNA에 혼성화시에 검출될 수 있도록 표지되는 것이 바람직하다. 표지 방법은 당업계에 공지되어 있고, ³²P-표지 ATP와 같은 방사성 표지, 비오틴화 또는 효소 표지의 사용을 포함한다. 중간정도 엄격성 및 높은 엄격성을 포함하는 혼성화 조건은 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]에서 제공된다.

상기 라이브러리 스크리닝 방법에서 확인된 서열은 GenBank와 같은 공용 데이터베이스 또는 개인 소유의 다른 서열 데이터베이스에 기탁되고 이들 데이터베이스로부터 입수될 수 있는 다른 공지의 서열과 비교하여 정렬시킬 수 있다. 분자의 한정된 영역내 또는 전장 서열에 걸친 서열 동일성 (아미노산 또는 뉴클레오타이드 수준에서)은 선행 기술의 공지된 방법 및 본원에서 설명된 방법을 이용하여 결정할 수 있다.

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

2. 숙주 세포의 선택 및 형질전환

숙주 세포는 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 생산을 위해 본원에서 설명한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질감염 또는 형질전환되고, 프로모터 유도, 형질전환체 선별 또는 목적 서열의 코딩 유전자 증폭에 적합하게끔 개질된 통상의 영양 배지 중에서 배양된다. 당업자라면 불필요한 실험을 수행하지 않고서도 배지, 온도, pH 등과 같은 배양 조건을 선택할 수 있

다. 일반적으로, 세포 배양물의 생산성을 최대화하기 위한 원칙, 프로토콜 및 실시되는 기술은 문헌 [Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) 및 Sambrook et al., 실험실 기술]에서 찾을 수 있다.

진핵세포 형질감염 방법 및 원핵세포 형질전환 방법, 예를 들어 CaCl_2 , CaPO_4 , 리포솜에 의해 매개된 방법 및 전기천공법은 당업자에게 공지되어 있다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 상기 세포에 적합한 표준 기술을 사용하여 수행된다. 문헌 [Sambrook et al., 실험실 기술]에 기재된 염화칼슘을 이용하는 칼슘 처리, 또는 전기천공법은 일반적으로 원핵 세포에 대해 사용된다. 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 사용한 감염은 문헌[Shaw et al., Gene, 23:315(1983) 및 1989년 6월 29일 공개된 WO 89/05859에 기재된 바와 같이 특정 식물 세포의 형질전환에 사용된다. 세포벽이 없는 포유동물 세포의 경우, 문헌[Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)]의 인산칼슘 침전법을 사용할 수 있다. 포유동물 세포 숙주 시스템 형질감염의 일반적인 특징은 미국 특허 제4,399,216호에 기재되어 있다. 효모 내로의 형질전환은 일반적으로 문헌[Van Solingen et al., J. Bact., 130:949(1977) 및 Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci.(USA), 76:3829(1979)]의 방법에 따라 수행된다. 그러나, 세포내로 DNA를 도입하는 다른 방법, 예를 들어 핵내 미세주입, 전기천공법, 원형 세포와 박테리아 원형질체 융합, 또는 다가양이온, 예를 들어 폴리브렌, 폴리오르니틴도 사용할 수 있다. 포유동물 세포의 형질전환을 위한 여러 기술에 대해서는 문헌[Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) 및 Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988)]을 참조한다.

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

전장 항체, 항체 단편, 및 항체 융합 단백질은 특히, 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않은 경우, 예를 들어 치료 항체가 세포독성제 (예를 들어, 독소)에 결합되어 있고 면역접합체 자체가 종양 세포의 파괴에 효과적인 경우 박테리아에서 제조할 수 있다. 순환하는 전장 항체의 반감기는 더 길다. 이. 콜라이에서 제조하는 것은 보다 빠르고 보다 저렴한 효율적인 방법이다. 항체 단편 및 폴리펩티드를 박테리아에서 발현하는 것은 예를 들어, 최적의 번역 및 분비를 위한 번역 개시 영역(TIR) 및 신호 서열을 개시하고 있는 미국 특허 제5,648,237호(Carter et. al.), 동 제5,789,199호(Joly et al.) 및 동 제5,840,523호(Simmons et al.)를 참조한다 (이들 특허의 내용은 이 거명을 통해 본원에 포함되는 것으로 함). 발현 후, 항체는 가용성 분액 형태로 이. 콜라이 세포 페이스트로부터 단리하고, 예를 들어, 이소타입에 따라 단백질 A 또는 G 결합을 통해 정제할 수 있다. 최종 정제는 예를 들어, CHO 세포에서 발현된 항체를 정제하기 위한 방법과 유사하게 수행할 수 있다.

원핵세포 외에, 섬유상 진균 또는 효모와 같은 진핵 미생물이 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 코딩 벡터의 클로닝 또는 발현 숙주로서 적합하다. 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*)는 일반적으로 사용되는 하등 진핵 숙주 미생물이다. 다른 미생물에는 시조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) [Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; 1985년 5월 2일 공개된 EP 139,383]; 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 숙주[미국 특허

허 제4,943,529호; Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)], 예를 들어 케이. 락티스(*K. lactis*) [MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt et al., J. Bacteriol., 154(2): 737-742 [1983]], 케이. 프라길리스 (*K. fragilis*)(ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(*K. bulgaricus*)(ATCC 16,045), 케이. 위케라미 (*K. wickerhamii*)(ATCC 24,178), 케이. 왈티이 (*K. waltii*)(ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸 (*K. drosophilorum*)[ATCC 36,906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135(1990)], 케이. 써모톨레란스 (*K. thermotolerans*) 및 케이. 막시아누스 (*K. marxianus*); 야로위아 (*yarrowia*)[EP 402,226]; 피치아 파스토리스 (*Pichia pastoris*)[EP 183,070; Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]]; 칸디다 (*Candida*); 트리코데르마 레에시아(*Trichoderma reesia*)[EP 244,234]; 뉴로스포라 크라사 [*Neurospora crassa*; Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]]; 시와니오마이세스 (*Schwanniomyces*), 예를 들어 시와니오마이세스 옥시덴탈리스 (*Schwanniomyces occidentalis*)[1990년 10월 31일 공개된 EP 394,538]; 및 섬유상 진균, 예를 들어 뉴로스포라 (*Neurospora*), 페니실리움 (*Penicillium*), 톨리포클라디움 (*Tolypocladium*) [1991년 1월 10일 공개된 WO 91/00357] 및 아스퍼길러스 (*Aspergillus*) 속주, 예를 들어 에이. 니둘란스 (*A. nidulans*)[Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn et al., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]] 및 에이. 니게르 (*A. niger*) [Kelly and Hynes, EMBO J., 4: 475-479 [1985]]가 포함된다. 메틸 영양요구성 효모가 적합하고, 한세놀라 (*Hansenula*), 칸디다 (*Candida*), 클로엑케라 (*Kloeckera*), 피치아 (*Pichia*), 사카로마이세스 (*Saccharomyces*), 토룰롭시스(*Torulopsis*) 및 로도토룰라(*Rhodotorula*)로 이루어지는 속으로부터 선택된, 메탄을 상에서 성장할 수 있는 효모를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이들 종류의 효모의 예인 구체적인 종의 목록은 문헌[C. Anthony, The Biochemistry of Methyloprophs, 269 (1982)]에 기재되어 있다.

글리코실화 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예에는 곤충 세포, 예를 들어 드로소필라 S2 및 스포도프테라 Sf9, 및 식물 세포, 예를 들어 면화, 옥수수, 감자, 대두, 페투니아, 토마토 및 담배의 세포가 포함된다. 수많은 배칼로바이러스(Baculovirus) 종 및 변이체, 및 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) (모충), 아에데스 애기프티 (*Aedes aegypti*) (모기), 아에데스 알보픽투스 (*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스터 (*Drosophila melanogaster*) (과실파리) 및 봄빅스 모리 (*Bombyx mori*) 숙주로부터 유래된 상응하는 허용가능한 곤충 숙주 세포가 동정되었다. 형질감염을 위한 다양한 바이러스 균주, 예를 들면 오토그라파 칼리포니카 (*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 입수 가능하며, 이러한 바이러스는 특히 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해 본 발명에 따른 바이러스로서 사용될 수 있다.

그러나, 가장 큰 흥미는 척추동물 세포에 있으며, 척추동물 세포를 배양물 (조직 배양물)에서 증식시키는 것은 통상적인 과정이 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40으로 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 [293 세포, 또는 현탁 배양물에서 성장시키기 위해 서브클로닝된 293 세포; Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)]; 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR [CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)]; 마우스 세르톨리 세포 [TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)]; 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카산 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유선 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)]; MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간암종 세포주 (Hep G2)이다.

숙주 세포를 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 생산을 위한 상기 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시킨 다음, 임의로는 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나 또는 원하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 변형된 통상의 영양 배지내에서 배양한다.

3. 복제가능 벡터의 선택 및 사용

항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 핵산(예를 들어, cDNA 또는 게놈 DNA)은 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능 벡터에 삽입할 수 있다. 다양한 벡터를 용이하게 구할 수 있다. 예를 들어, 벡터는 플라스미드, 코스미드, 바이러스 입자 또는 파지의 형태일 수 있다. 적합한 핵산 서열은 다양한 방법에 의해 벡터내에 삽입될 수 있다. 일반적으로, 당업계에 공지된 기술을 사용하여 DNA를 적합한 제한 엔도뉴클레아제 부위내에 삽입한다. 벡터 성분은 일반적으로 하나 이상의 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 성분, 프로모터 및 전사 종결 서열을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 상기 성분을 하나 이상 함유하는 적합한 벡터의 제조는 당업자에게 공지된 표준 라이게이션 기술을 이용한다.

TAT는 직접 재조합 방법에 의해 생산될 수 있을 뿐만 아니라 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에서 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드 또는 신호 서열일 수 있는 이중 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 생산될 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나 또는 벡터내로 삽입된 항-TAT 항체- 또는 TAT 폴리펩티드-코딩 DNA의 일부일 수 있다. 신호 서열은 예를 들어 알칼리 포스파타제, 페니실리나제, lpp 또는 열안정성 엔테로톡신 II 리더의 군으로부터 선택된 원핵생물 신호 서열일 수 있다. 효모에서의 분비를 위해, 신호 서열은 예를 들어 효모 인버타제 리더, α 인자 리더(사카로마이세스 (*Saccharomyces*) 및 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*) α -인자 리더(미국 특허 제5,010,182호)를 포함함) 또는 산 포스파타제 리더, 씨. 알비칸스 (*C. albicans*) 글루코아밀라제 리더 [1990년 4월 4일 공개된 EP 362,179] 또는 1990년 11월 15일 공개된 WO 90/13646에 기재된 신호 서열일 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열, 예를 들어 동일하거나 관련된 종의 분비 폴리펩티드로부터의 신호 서열 및 바이러스 분비 리더를 사용하여 단백질의 분비를 지시할 수 있다.

발현 및 클로닝 벡터 모두는 벡터가 선택된 1 종 이상의 숙주 세포에서 복제할 수 있도록 만드는 핵산 서열을 함유한다. 이러한 서열은 다양한 박테리아, 효모 및 바이러스에 대해 공지되어 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점은 대부분의 그람 음성 박테리아에 적합하고, 2 μ 플라스미드 복제 기점은 효모에 적합하고, 다양한 바이러스 복제 기점 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)은 포유동물 세포에서 벡터를 클로닝하는 데 유용하다.

발현 및 클로닝 벡터는 통상적으로 선별가능한 마커로도 불리우는 선별 유전자를 함유할 것이다. 대표적인 선별 유전자, 예를 들어 바실러스의 경우 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 앰피실린, 네오마이신, 메토타렉세이트 또는 테트라사이클린에 대한 내성을 부여하는 단백질, (b) 영양요구성 결함을 보완하는 단백질 또는 (c) 복합 배지로부터 이용할 수 없는 중요한 영양물질을 공급하는 단백질을 코딩한다.

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

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

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

성장 조건에 의해 조절되는 전사의 추가의 이점을 갖는 유도가능한 프로모터인 다른 효모 프로모터로는 알콜 데히드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사에 관련된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 및 말토스 및 갈락토스 이용에 작용하는 효소에 대한 프로모터 영역이 있다. 효모 발현에 사용하기에 적합한 벡터 및 프로모터는 추가로 EP 73,657에 기재되어 있다.

포유동물 숙주 세포내의 벡터로부터의 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 전사는 바이러스, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 포울폭스 바이러스 (1989년 7월 5일 공개된 UK 제2,211,504호), 아데노바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 2),

소 파필로마 바이러스, 조류 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이(Simian) 바이러스 40 (SV40)의 게놈으로부터 얻어진 프로모터, 이중 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 면역글로불린 프로모터 및 열-충격 프로모터로부터 얻어진, 숙주 세포 시스템에 적합한 프로모터에 의해 조절된다.

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

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

제조할 척추동물 세포 배양에서 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 합성에 적용하는 데 적합한 다른 방법, 벡터 및 숙주 세포는 문헌[Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060 및 동 117,058]에 기재되어 있다.

4. 숙주 세포의 배양

본 발명의 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 제조하기 위해 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 함스 (Ham's) F10 (Sigma), 최소 필수 배지 ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) 및 둘베코 변형 이글즈 배지 ((DMEM), Sigma)와 같은 시판되는 배지가 상기 숙주 세포를 배양하는 데 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz., 58: 44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem., 102:255 (1980), 미국 특허 제4,767,704호; 동 제4,657,866호; 동 제4,927,762호; 동 제4,560,655호; 또는 동 제5,122,469호; WO 90/03430; 동 87/00195; 또는 미국 특허 등록 제30,985호]에 기재된 배지 중의 어떠한 것도 상기 숙주 세포용 배양 배지로서 사용될 수 있다. 이들 배지 중 임의의 배지는 필요에 따라, 호르몬 및(또는) 기타 성장인자 (예를 들면, 인슐린, 트랜스페린 또는 상피 성장인자), 염 (예를 들면, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 인산염), 완충제 (예를 들면, HEPES), 뉴클레오티드 (예를 들면, 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예를 들면, 젠타마이신 (등록상표) 약물), 미량 원소 (통상, 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 이와 동등한 에너지 공급원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필수 보충물도, 당업계에 공지되어 있는 적절한 농도로 포함시킬 수 있다. 온도, pH 등의 배양 조건은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이미 이용되고 있는 조건이며, 이는 당업계의 숙련인에게는 자명할 것이다.

5. 유전자 증폭/발현의 검출

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

별법으로, 유전자 발현은 세포 또는 조직 절편의 면역조직화학적 염색과 같은 면역학적 방법 및 유전자 산물의 발현을 직접 정량하기 위한 세포 배양액 또는 체액의 분석을 통해 측정할 수 있다. 면역조직화학적 염색 및(또는) 샘플 유체의 분석에 유용한 항체는 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체일 수 있고, 이들은 임의의 포유동물에서 제조될 수 있다. 편리하게는, 천연 서열 TAT 폴리펩티드, 본원에서 제공되는 DNA 서열 기재의 합성 펩티드 또는 TAT-DNA에 융합되어 있으며 특정 항체 에피토프를 코딩하는 외생성 서열에 대한 항체를 제조할 수 있다.

6. 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드의 정제

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

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

재조합 기술을 이용할 경우, 항체는 세포내의 주변세포질에서 생성되거나 또는 배지로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생성되는 경우, 첫번째 단계로서 원심분리 또는 한외여과 등을 수행하여 숙주 세포 또는 그의 용해된 단편인 미립자 잔해 (debris)를 제거한다. 이. 콜라이의 주변세포질 공간으로 분비되는 항체를 분리하기 위한 방법은 문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]에 기재되어 있다. 간단하게 설명하면, 세포 페이스트를 아세트산나트륨 (pH 3.5), EDTA 및 페닐메틸설포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재하에 약 30분에 걸쳐 해동시킨다. 세포 잔해는 원심분리하여 제거할 수 있다. 항체가 배지로 분비되는 경우, 이러한 발현 시스템으로부터 수득한 상층액은 우선 아미콘 (Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘 (Millipore Pellicon) 한외여과 장치와 같은 시판되는 단백질 농축 여과기를 사용하여 농축시킨다. PMSF 등과 같은 프로테아제 억제제를 임의의 상기 단계에 포함시켜 단백질분해를 억제할 수 있고, 항생제를 포함시켜 외래 오염물의 성장을 방지할 수 있다.

세포로부터 제조된 항체 조성물은 예를 들어 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 및 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있으며, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화성 리간드로서 단백질 A가 적합한지는 항체에 존재하는 임의의 면역글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소타입에 따라 달라진다. 단백질 A를 사용하여 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 4$ 중쇄-기재의 항체를 정제할 수 있다 [Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)]. 단백질 G는 모든 마우스 이소타입 및 인간 $\gamma 3$ 에 대해 권장된다 [Guss et al., EMBO J 5:1567-1575 (1986)]. 친화성 리간드가 부착될 매트릭스는 대개의 경우에 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 세공 조절된 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠과 같이 기계적으로 안정한 매트릭스로 인해, 아가로스의 경우보다 유속이 더 빠르고 프로세싱 시간이 더 단축될 수 있다. 항체가 C_{H3} 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드 (Bakerbond) ABX (등록상표) 수지 (미국 뉴저지주 필립스버그에 소재하는 제이.티. 베이커 (J.T. Baker) 제품)가 정제에 유용하다. 회수될 항체에 따라, 이온 교환 컬럼 상에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상 크로마토그래피, 헤파린 세파로스 (등록상표) 상 크로마토그래피 또는 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예를 들어, 폴리아스파르트산 컬럼) 상 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전과 같은 다른 단백질 정제 기술도 이용할 수 있다.

임의의 예비 정제 단계 이후에, 대상 항체 및 오염물질을 함유하는 혼합물에 대해 약 2.5 내지 4.5의 pH 및 바람직하게는 낮은 염농도 (예를 들어 약 0 내지 0.25 M 염)의 용출 완충액을 사용하는, 낮은 pH의 소수성 상호작용 크로마토그래피를 수행할 수 있다.

J. 제약 제제

본 발명에 따라 사용되는 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드, TAT 결합 유기 분자 및(또는) TAT 폴리펩티드의 치료 제제는, 원하는 순도의 항체, 폴리펩티드, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]와 혼합함으로써, 동결건조된 제제 또는 수용액의 형태로 보관되도록 제조한다. 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량과 농도에서 수용자에게 무독성이고, 아세트산, 트리스, 인산, 시트르산 및 기타 유기 산 등의 완충액; 아스코르브산 및 메티오닌 등의 항산화제; 보존제 (예를 들어, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 알콜 또는 벤질 알콜; 메틸 파라벤 또는 프로필 파라벤 등의 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤

라틴 또는 면역글로불린; 폴리비닐피롤리돈 등의 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 라이신 등의 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린 등의 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; EDTA 등의 킬레이팅제; 트레할로스 및 염화나트륨 등과 같은 등장화제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨 등의 당; 폴리소르베이트 등의 계면활성제; 나트륨 등의 염 형성 카운터이온; 금속 착물 (예를 들어 Zn-단백질 착물) 및(또는) TWEEN (등록상표), PLURONICS (등록상표) 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 등의 비이온성 계면활성제 등이 있다. 바람직하게는, 상기 제제는 5 내지 200 mg/ml의 농도, 바람직하게는 10 내지 100 mg/ml의 농도의 항체를 포함한다.

필요한 경우, 본원의 제제는 치료될 특정 증상을 위한 1종 초과 활성 화합물, 바람직하게는 서로에 대해 유해한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 나타내는 화합물을 함유할 수도 있다. 예를 들어, 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자 이외에도 추가의 항체, 예를 들어 TAT 폴리펩티드 상의 다른 에피토프에 결합하는 제2 항-TAT 항체 또는 특정 암의 성장에 영향을 주는 성장 인자와 같은 몇몇 다른 표적에 대한 항체를 제제에 포함시키는 것이 바람직할 수 있다. 별법으로 또는 추가로, 조성물은 화학요법제, 세포독성제, 사이토카인, 성장억제제, 항-호르몬제 및(또는) 심보호제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 분자들은 의도한 목적에 효과적인 양으로 배합되는 것이 적합하다.

또한, 활성 성분은 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합 (예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-미소캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 미소캡슐)에 의해 제조된 미소캡슐에 넣어 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노-캡슐) 또는 마크로에멀전의 형태로 만들 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재되어 있다.

서방형 제제를 제조할 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예로는 상기 항체를 함유하는 고상 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스 등이 있는데, 이러한 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 미소캡슐 형태이다. 서방형 매트릭스의 예로는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 제 3,773,919호), L-글루탐산과 γ-에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 LUPRON DEPOT (등록상표) (락트산-글리콜산 공중합체와 류프폴리드 아세테이트로 구성된 주사가능한 미소구) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산 등이 있다.

생체내 투여에 사용될 제제는 멸균되어야만 한다. 이는 멸균 여과막을 통해 여과시킴으로써 용이하게 수행된다.

K. 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 및 TAT 결합 유기 분자를 사용한 진단 및 치료

암에서의 TAT 발현을 측정하기 위해서, 다양한 진단 분석법이 이용가능하다. 한 실시양태에서, TAT 폴리펩티드의 과발현은 면역조직화학법 (IHC)으로 분석할 수 있다. 종양 생검으로부터의 파라핀 포매(embedding) 조직 절편을 IHC로 분석하고, 다음과 같은 TAT 단백질 염색 강도 기준을 적용할 수 있다:

스코어 0: 어떠한 염색도 관찰되지 않거나 10% 미만의 종양 세포에서 막 염색이 관찰된다.

스코어 1+: 10% 초과 종양 세포에서 희미하게 가까스로 인지 가능한 막 염색이 검출된다. 이러한 세포는 이들의 막 일부에서만 염색된다.

스코어 2+: 10% 초과 종양 세포에서 약한 수준 내지 중간 수준의 완전한 막 염색이 관찰된다.

스코어 3+: 10% 초과 종양 세포에서 중간 내지 강한 수준의 완전한 막 염색이 관찰된다.

TAT 폴리펩티드 발현에 대하여 0 또는 1+의 스코어를 나타내는 종양은 TAT를 과발현하지 않는 것을 특징으로 할 수 있는 반면, 2+ 또는 3+의 스코어를 나타내는 종양은 TAT의 과발현을 특징으로 할 수 있다.

별법으로 또는 추가로, 포르말린으로 고정시키고 파라핀에 포매시킨 종양 조직에 대해 FISH 분석, 예를 들어 INFORM (등록상표) (미국 아리조나주에 소재하는 벤타나 (Ventana) 제품) 또는 PATHVISION (등록상표) (미국 일리노이주에 소재하는 비시스 (Vysis) 제품)을 수행하여 종양에서 TAT가 과발현되는 정도 (있을 경우)를 측정할 수 있다.

TAT 과발현 또는 증폭은, 예를 들어 검출할 분자에 결합하고 검출가능한 표지 (예를 들어 방사성 동위원소 또는 형광 표지)로 태그가 부착된 분자 (예를 들어 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자)를 투여하고 상기 표지가 집중되어 있는 위치에 대해 환자를 외부 스캐닝하는 생체내 진단 분석법을 이용하여 평가할 수 있다.

상기 기재된 바와 같이, 본 발명의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 다양한 비-치료 분야에 사용할 수도 있다. 본 발명의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 및 유기 분자는 TAT 폴리펩티드-발현 암의 진단 및 질병단계 분류 (예를 들어 방사성영상화)에 유용할 수 있다. 본 발명의 항체, 올리고펩티드 및 유기 분자는 세포로부터 TAT 폴리펩티드를 정제하거나 면역침전시킬 경우, TAT 폴리펩티드를 ELISA 또는 웨스턴 블랏 등을 통해 시험관내에서 검출하고 정량할 경우 또는 예를 들어 다른 세포의 정제를 위한 한 단계로서 혼합된 세포 집단으로부터 TAT-발현 세포를 사멸시키고 제거할 경우에도 유용하다.

현재, 암 치료법은 암의 단계에 따라 암성 조직을 제거하기 위한 수술, 방사선 요법 및 화학요법 중 하나 또는 상기 요법의 병행을 포함한다. 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자 요법은 화학요법의 독성 및 부작용을 잘 견디지 못하는 나이든 환자의 경우 및 방사선 요법의 사용이 제한된 전이성 질환의 경우에 특히 바람직할 수 있다. 본 발명의 종양 표적화 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 TAT-발현 암을 상기 질환의 초기 진단 후 또는 재발하는 동안 완화시키는 데 유용하다. 치료에 이용하는 경우, 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 단독으로 사용하거나, 또는 예를 들어 호르몬, 항-혈관신생제 또는 방사성 표지된 화합물과의 병행 요법 또는 수술, 냉동요법 및(또는) 방사선 요법과의 병행 요법으로 사용할 수 있다. 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자 치료제는 다른 형태의 통상적인 요법을 병행하면서 통상적인 치료 요법 전후에 연속 투여할 수 있다. TAXOTERE (도세탁셀), TAXOL (파클리탁셀), 에스트라무스틴 및 미토산트론 등과 같은 화학요법 약물은 암의 치료, 특히 매우 위험한 환자의 치료에 사용된다. 암을 치료하거나 완화시키기 위한 본 발명의 방법에서, 암 환자에게 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 투여하면서 1종 이상의 상기 화학요법제의 처치를 병행할 수 있다. 특히, 파클리탁셀 및 변형된 유도체 (예를 들어 EP 0600517 참조)를 사용한 병행 요법도 고려된다. 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 치료 유효 투여량의 화학요법제와 함께 투여될 것이다. 다른 실시양태에서, 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 화학요법제, 예를 들어 파클리탁셀의 활성 및 효능을 증대시키기 위한 화학요법을 병행하면서 투여한다. 의사용 탁상 편람 (PDR)에는 다양한 암의 치료에 사용되어 온 이들 화학요법제의 투여량이 개시되어 있다. 치료 효과적인 상기 화학요법제의 투약법 및 투여량은 치료받을 특정 암, 상기 질환의 정도 및 당업계의 담당 의사에게 공지된 기타 인자에 따라 달라질 것이며 의사가 결정할 수 있다.

특정의 한 실시양태에서, 세포독성제와 접합된 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 포함하는 접합체를 환자에게 투여한다. TAT 단백질에 결합된 면역접합체가 세포내로 도입될 경우에, 상기 면역접합체가 결합하는 암세포의 사멸에 대한 면역접합체의 치료 효능이 높아지는 것이 바람직하다. 바람직한 실시양태에서, 세포독성제는 암세포의 핵산을 표적으로 하거나 이를 방해한다. 이러한 세포독성제의 예는 앞서 기재하였고, 메이탄시노이드, 칼리케아미신, 리보뉴클레아제 및 DNA 엔도뉴클레아제 등이 있다.

항-TAT 항체, 그의 올리고펩티드 또는 유기 분자 또는 이들의 독소 접합체는 인간 환자에게 공지된 방법, 예를 들어 볼루스로서 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입에 의한 정맥내, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액낭내, 초내, 경구, 국소 투여되거나 흡입 경로에 의해 투여된다. 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자의 정맥내 또는 피하 투여가 바람직하다.

기타 치료 요법을 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자의 투여와 병행할 수 있다. 병행 투여 방법에는 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 사용하여 공동 투여하는 방법 및 임의의 순서로 연속해서 투여하는 방법이 포함되는데, 이때 두 (또는 모든) 활성 작용제가 이들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 시기가 있는 것이 바람직하다. 바람직하게는 이러한 병행 투여 요법으로 상승작용적인 치료 효과가 나타난다.

항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자의 투여는 특정 암과 관련된 다른 종양 관련 항원에 대해 지시된 항체의 투여와 병행하는 것이 바람직할 수도 있다.

다른 실시양태에서, 본 발명의 치료 처치는 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자와 1종 이상의 화학요법제 또는 성장억제제의 병행 투여를 포함하는데, 여기에는 다양한 화학요법제로 구성된 혼합물의 공동 투여가 포함된다. 화학요법제로는 에스트라무스틴 포스페이트, 프레드니무스틴, 시스플라틴, 5-플루오로우라실, 멜팔란, 시클로포스파미드, 히드록시우레아 및 히드록시우레아탁산 (예를 들어 파클리탁셀 및 도세탁셀) 및(또는) 안트라사이클린 항생제 등이 있다. 이러한 화학요법제의 제조법 및 투여 스케줄은 제조사의 지시에 따르거나 당업자에 의해 실험적으로 결정된 바에 따라서 이용될 수 있다. 이러한 화학요법용 제제 및 투여 스케줄은 문헌 [Chemotherapy Service Ed., M.C.Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)]에 기재되어 있다.

항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 항-호르몬 화합물, 예를 들어 타목시펜 등의 항-에스트로겐 화합물; 오나프리스톤 등의 항-프로게스테론 (EP 616 812 참조) 또는 플루타미드 등의 항-안드로겐 화합물과 배합될 수 있다 (상기 분자들은

이들에 대해 공지된 투여량으로 사용됨). 치료될 암이 안드로겐 비의존성 암인 경우, 환자는 미리 항-안드로겐 요법으로 치료받을 수 있고, 암이 안드로겐 비의존성이 된 후에 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자 (및 임의로는 본원에 기재된 기타 작용제)를 상기 환자에게 투여할 수 있다.

중증, 심보호제 (본 치료법과 관련된 심근부전증을 예방하거나 경감시키기 위함) 또는 1종 이상의 사이토카인을 환자에게 공동 투여하는 것이 유익할 수도 있다. 또한, 상기 치료법 이외에, 환자를 수술하여 암세포를 제거하고(하거나) 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자 요법 전에, 이 요법과 동시에, 또는 이 요법 후에 방사선 요법을 수행할 수 있다. 공동 투여되는 상기 임의의 작용제에 적합한 투여량은 현행 사용되는 투여량이며, 이는 상기 작용제와 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자의 조합 작용 (상승작용)으로 인해 낮아질 수 있다.

질환을 예방하거나 치료하기 위해서, 의사는 공지된 기준에 따라 투여량 및 투여 방식을 선택할 것이다. 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자의 적정 투여량은 상기 정의된 바와 같은 치료될 질환의 유형, 질환의 중증도와 경과 상태, 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 예방 목적으로 투여하는지 또는 치료 목적으로 투여하는지의 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자에 대한 환자의 반응도 및 담당의사의 판단에 따라 달라질 것이다. 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 환자에게 1회 투여하거나 일련의 치료 전반에 걸쳐 투여하는 것이 적합하다. 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 정맥내 주입 또는 피하 주사로 투여하는 것이 바람직하다. 질환의 유형과 중증도에 따라서, 환자에게 예를 들어 1회 이상의 개별 투여 또는 연속 주입으로 투여하기 위한 초기 후보 투여량은 체중 1 kg 당 항체 약 1 μ g 내지 약 50 mg (예를 들어 약 0.1 내지 15 mg/kg/1회 투여)일 수 있다. 투약법은 항-TAT 항체 약 4 mg/kg의 초기 로딩 투여량을 투여한 후, 항-TAT 항체 약 2 mg/kg의 유지 투여량을 매주 투여하는 것을 포함할 수 있다. 그러나, 다른 투약법이 유용할 수 있다. 전형적인 1일 투여량은 상기 언급한 인자들에 따라서 약 1 μ g/kg 내지 100 mg/kg 이상의 범위일 것이다. 상태에 따라서 수 일 또는 그 이상에 걸쳐 반복하여 투여하는 경우에는, 질환의 증상이 원하는 만큼 억제될 때까지 지속적으로 처치한다. 이러한 치료법의 진행 과정은 의사 또는 담당자에게 공지되어 있는 기준을 바탕으로 한 통상적인 방법 및 분석법으로 용이하게 모니터링할 수 있다.

항체 단백질을 환자에게 투여하는 것과는 별개로, 본원은 항체를 유전자 요법을 통해 투여하는 것을 고려한다. 이처럼 항체를 코딩하는 핵산을 투여하는 것은 "치료 유효량의 항체 투여"라는 표현에 포함된다. 예를 들면, 세포내 항체를 제조하는 유전자 요법의 이용에 관한 WO 96/07321 (1996년 3월 14일자로 공개됨)을 참조한다.

환자의 세포내로 핵산 (임의로는 벡터에 함유되어 있음)을 주입하기 위한 두 가지 주요 방법이 있다 (생체내 및 생체외). 생체내 전달의 경우에는, 통상적으로 환자에서 항체가 요구되는 부위에 핵산을 직접 주사한다. 생체외 처치인 경우에는, 환자의 세포를 꺼낸 후에 이들 단리된 세포내로 핵산을 도입하고 이와 같이 변형된 세포를 환자에게 직접 투여하거나, 예를 들어 다공성 막 안에 캡슐화시켜 환자에게 이식한다 (예를 들어 미국 특허 제4,892,538호 및 동 제5,283,187호 참조). 핵산을 살아있는 세포에 도입하는데 이용가능한 다양한 기술이 있다. 이러한 기술은 상기 핵산이 배양된 세포내로 시험관내 전달되는지, 아니면 의도된 숙주의 세포내로 생체내 전달되는지에 따라 달라진다. 핵산을 포유동물 세포에 시험관내 전달하는데 적합한 기술로는 리포솜 사용법, 전기천공법, 미세주입법, 세포 융합법, DEAE-텍스트란 사용법, 인산칼슘 침전법 등이 있다. 유전자의 생체외 전달에 통상적으로 사용되는 벡터는 레트로바이러스 벡터이다.

현재 바람직한 생체내 핵산 전달 기술로는 바이러스 벡터 (예를 들어, 아데노바이러스, 단순 포진 I 바이러스 또는 아데노게 바이러스) 및 지질-기반의 시스템 (유전자의 지질에 의해 매개된 전달에 유용한 지질은 예를 들어 DOTMA, DOPE 및 DC-Chol임)을 사용한 형질감염 등이 있다. 현재 공지된 유전자 마킹 및 유전자 요법 프로토콜에 대해 검토하기 위해서는 문헌 [Anderson et al., Science 256:808-813 (1992)]을 참조한다. 또한, WO 93/25673 및 이 문헌에서 인용된 참고문헌도 참조한다.

본 발명의 항-TAT 항체는 본원의 "항체"의 정의에 포함되는 다양한 형태일 수 있다. 따라서, 항체에는 전장 또는 원형 항체, 항체 단편, 천연 서열 항체 또는 아미노산 변이체, 인간화 항체, 키메라 항체 또는 융합 항체, 면역접합체 및 이들의 기능적 단편이 포함된다. 융합 항체에서, 항체 서열은 이중 폴리펩티드 서열에 융합된다. 항체는 원하는 이펙터 기능을 제공하도록 Fc 영역에서 변형될 수 있다. 하기 단락에서 보다 상세히 논의되어 있는 바와 같이, 세포 표면에 결합되어 있으며 적절한 Fc 영역을 포함하는 네이키드 (naked) 항체는 예를 들어 항체-의존성 세포에 의해 매개된 세포독성 (ADCC)을 통해 또는 보체-의존성 세포독성에 의한 보체의 동원 또는 기타 다른 메커니즘을 통해 세포독성을 유도할 수 있다. 별법으로, 이펙터 기능을 제거하거나 감소시켜 부작용 또는 치료 합병증을 최소화시키는 것이 바람직한 경우에는 특정한 다른 Fc 영역을 사용할 수 있다.

한 실시양태에서, 항체는 본 발명의 항체와 동일한 에피토프와의 결합 또는 실질적인 결합에 대해 경쟁한다. 구체적으로 생체내 중앙 표적화 특성 및 임의의 세포 증식 억제 특성 또는 세포 독성 특성 등을 포함하는 본 발명의 항-TAT 항체의 생물학적 특성을 보유하는 항체도 고려된다.

상기 항체를 제조하는 방법을 이하에 상세하게 기재한다.

본 발명의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 및 유기 분자는 포유동물의 TAT-발현 암을 치료하거나 상기 암의 하나 이상의 증상을 완화시키는데 유용하다. 이러한 암으로는 전립선암, 요도관의 암, 폐암, 유방암, 결장암 및 난소암, 더욱 구체적으로는 전립선 선암종, 신장 세포 암종, 결장직장 선암종, 폐 선암종, 폐 편평세포 암종 및 흉막 중피종 등이 있다. 암에는 상기 임의의 암의 전이성 암도 포함된다. 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 포유동물에서 TAT 폴리펩티드를 발현하는 암세포의 적어도 일부와 결합할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 시험관내 또는 생체내에서 세포 상의 TAT 폴리펩티드와 결합시에 TAT-발현 중앙 세포를 파괴 또는 사멸시키거나, 상기 중앙 세포의 성장을 억제하는데 효과적이다. 이러한 항체에는 네이키드 항-TAT 항체 (어떠한 작용제도 접합되어 있지 않음)가 포함된다. 네이키드 항체가 보유한 세포독성 또는 세포 성장억제 성질은 중앙 세포 파괴에 대해 이들 항체를 훨씬 더 강력하게 하는 세포독성제의 사용으로 더욱 강화될 수 있다. 예를 들면, 하기와 바와 같이 항체를 세포독성제와 접합시켜 면역접합체를 형성함으로써 항-TAT 항체에 세포독성을 부여할 수 있다. 세포독성제 또는 세포 성장억제제는 소분자인 것이 바람직하다. 칼리케아미신 또는 메이탄시노이드와 같은 독소 및 그의 유사체나 유도체가 바람직하다.

본 발명은 본 발명의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자 및 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 암을 치료하기 위한 목적상, 상기 조성물을 암의 치료가 필요한 환자에게 투여할 수 있는데, 이때 상기 조성물은 면역접합체로서 또는 네이키드 항체로서 존재하는 1종 이상의 항-TAT 항체를 포함할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 본 발명의 조성물은 이들 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를, 화학요법제를 비롯한 세포독성제 또는 성장억제제와 같은 다른 치료제와 배합하여 포함할 수 있다. 본 발명은 본 발명의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자 및 담체를 포함하는 제제도 제공한다. 한 실시양태에서, 상기 제제는 제약상 허용되는 담체를 포함하는 치료 제제이다.

본 발명의 다른 측면은 항-TAT 항체를 코딩하는 단리된 핵산이다. H 및 L쇄 모두 및 특히 초가변 영역 잔기를 코딩하는 핵산, 천연 서열 항체를 코딩하는쇄 및 상기 항체의 변이체, 변형체 및 인간화 형태를 코딩하는 핵산도 포함된다.

본 발명은 치료 유효량의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 TAT 폴리펩티드-발현 암을 치료하거나 상기 암의 하나 이상의 증상을 완화시키는데 유용한 방법도 제공한다. 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자 치료 조성물은 의사의 지시에 따라 단기 (단시간) 또는 장기 투여하거나 간헐적으로 투여할 수 있다. 또한, 본 발명은 TAT 폴리펩티드-발현 세포의 성장을 억제하고 상기 세포를 사멸시키는 방법도 제공한다.

또한, 본 발명은 1종 이상의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 포함하는 키트 및 제품을 제공한다. 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 함유하는 키트는 예를 들어 TAT 세포의 사멸 분석, 세포로부터 TAT 폴리펩티드의 정제 또는 면역침전에 사용한다. 예를 들어 TAT의 단리 및 정제를 위해서는, 상기 키트는 비드 (예를 들어 세파로스 비드)에 커플링된 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 함유할 수 있다. ELISA 또는 웨스턴 블랏으로 TAT를 시험관내 검출 및 정량하기 위한 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 함유하는 키트를 제공할 수 있다. 검출에 유용한 이러한 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 형광 또는 방사성 표지 등과 같은 표지와 함께 제공할 수 있다.

L. 제품 및 키트

본 발명의 다른 실시양태는 항-TAT 발현 암의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제품이다. 이러한 제품은 용기 및 이러한 용기 상에 부착되어 있거나 용기에 들어 있는 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기의 예로는 병, 바이알, 주사기 등이 있다. 이러한 용기는 유리 또는 플라스틱 등과 같은 다양한 재료로부터 제조될 수 있다. 상기 용기에는 암 증상의 치료에 효과적인 조성물이 들어 있으며, 멸균성 입구를 가질 수 있다 (예를 들어 이러한 용기는 피하 주사 바늘로 꿰뚫을 수 있는 마개를 갖는 정맥내 용액제 백 또는 바이알일 수 있음). 이러한 조성물 중의 1종 이상의 활성 작용제는 본 발명의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자이다. 라벨 또는 포장 삽입물에는 조성물이 암의 치료에 사용된다는 것이 표시되어 있다. 상기 라벨 또는 포장 삽입물은 암 환자에게 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자 조성물을 투여하기 위한 지침서를 추가로 포함할 것이다. 또한, 상기 제품은 제약상 허용되는 완충액, 예를 들어 박테리아 증식 억제성 주사용수 (BWI), 인산염 완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 제품은 상업적인 관점 및 사용자 관점에서 바람직한 기타 물질 (기타 완충액, 희석제, 여과제, 바늘 및 주사기를 포함함)을 추가로 포함할 수 있다.

다양한 목적, 예를 들어 TAT 발현 세포 사멸의 분석, 세포로부터 TAT 폴리펩티드의 정제 또는 면역침전에 유용한 키트도 제공한다. TAT 폴리펩티드의 분리 및 정제를 위해, 상기 키트는 비드 (예를 들어 세파로스 비드)에 커플링된 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 함유할 수 있다. 예를 들어 ELISA 또는 웨스턴 블랏으로 TAT 폴리펩티드를 시험관내 검출 및 정량하기 위한 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 함유하는 키트를 제공할 수 있다. 제품의 경우와 마찬가지로, 키트는 용기 및 상기 용기 상에 부착되어 있거나 용기에 들어 있는 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 상기 용기에는 1종 이상의 본 발명의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 포함하는 조성물이 들어 있다. 예를 들어 희석제 및 완충액, 대조군 항체를 함유하는 용기를 추가로 포함시킬 수 있다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물에 대한 설명서 뿐만 아니라 의도된 시험관내 또는 진단 용도로 사용하기 위한 지침서를 제공할 수 있다.

M. TAT 폴리펩티드 및 TAT 폴리펩티드 코딩 핵산의 용도

TAT 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 (또는 그의 상보체)은 분자생물학 분야에서 혼성화 프로브로서의 용도를 비롯하여 염색체 및 유전자 맵핑 및 안티센스 RNA 및 DNA 프로브의 제조에 있어서 다양한 용도를 갖는다. 또한, TAT 코딩 핵산은 본원에 기재된 재조합 기술에 의한 TAT 폴리펩티드의 제조에도 유용할 것이며, 여기서 TAT 폴리펩티드는 예를 들어 본원에 기재된 항-TAT 항체의 제조에 사용될 수 있다.

전장 천연 서열 TAT 유전자 또는 그의 일부는 본원에 개시된 천연 TAT 서열에 대해 원하는 서열 동일성을 갖는 전장 TAT cDNA 또는 다른 cDNA (예를 들어 TAT의 자연 발생적인 변이체 또는 다른 종으로부터의 TAT를 코딩하는 유전자)를 분리하기 위한 cDNA 라이브러리에 대한 혼성화 프로브로서 사용될 수 있다. 임의로는, 프로브는 염기 약 20개 내지 약 50개의 길이일 것이다. 혼성화 프로브는 전장 천연 뉴클레오티드 서열의 적어도 부분적으로는 신규한 영역 (여기서, 이 영역은 과도한 시행착오 없이 결정할 수 있음) 또는 천연 서열 TAT의 프로모터, 인핸서 요소 및 인트론을 포함하는 게놈 서열로부터 유래될 수 있다. 예를 들면, 스크리닝 방법은 공지된 DNA 서열을 사용하여 TAT 유전자의 코딩 영역을 분리하여 약 40개 염기의 선택된 프로브를 합성하는 단계를 포함할 것이다. 혼성화 프로브는 ^{32}P 또는 ^{35}S 와 같은 방사성 뉴클레오티드 또는 아비딘/바이오틴 커플링 시스템을 통해 상기 프로브에 커플링된 알칼리성 포스파타제 등과 같은 효소 표지를 비롯한 다양한 표지로 표지할 수 있다. 본 발명의 TAT 유전자의 서열에 상보적인 서열을 갖는 표지된 프로브를 사용하여 인간 cDNA, 게놈 DNA 또는 mRNA의 라이브러리를 스크리닝함으로써 상기 라이브러리 중에서 프로브가 혼성화되는 구성원을 결정할 수 있다. 혼성화 기술은 하기의 실시예에 보다 상세하게 기재되어 있다. 본원에 개시된 방법을 이용하여, 본원에 개시된 임의의 EST 서열을 프로브로서 유사하게 사용할 수 있다.

TAT-코딩 핵산의 다른 유용한 단편에는 표적 TAT mRNA (센스) 또는 TAT-DNA (안티센스) 서열에 결합할 수 있는 단일-가닥 핵산 서열 (RNA 또는 DNA)을 포함하는 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드가 포함된다. 본 발명에 따른 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드는 TAT-DNA의 코딩 영역의 단편을 포함한다. 이러한 단편은 일반적으로 약 14개 이상의 뉴클레오티드, 바람직하게는 약 14개 내지 30개의 뉴클레오티드를 포함한다. 주어진 단백질을 코딩하는 cDNA 서열에 기초하여 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드를 유도하는 능력은 예를 들어 문헌 ([Stein and Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988)] 및 [van der Krol et al. (BioTechniques 6:958, 1988)])에 기재되어 있다.

안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드와 표적 핵산 서열의 결합은 이중나선의 분해 증대, 전사 또는 번역의 조기 종결 등을 비롯한 여러가지 수단 중 하나 또는 다른 수단에 의해 표적 서열의 전사 또는 번역을 차단하는 이중나선을 형성시킨다. 이러한 방법은 본 발명에 포함된다. 따라서, 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용하여 TAT 단백질의 발현을 차단할 수 있으며, 여기서 TAT 단백질은 포유동물에서 암을 유도하는 역할을 수행할 수 있다. 추가로, 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오티드는 변형된 당-포스포디에스테르 주쇄 (또는 다른 당 연결부, 예를 들어 WO 91/06629에 개시된 당 연결부)를 갖는 올리고뉴클레오티드를 추가로 포함하며, 여기서 이러한 당 연결부는 내생성 뉴클레아제에 대한 내성이 있다. 내성이 있는 당 연결부를 갖는 이러한 올리고뉴클레오티드는 생체내에서 안정 (즉, 효소 분해에 대해 내성이 있음)하지만, 표적 뉴클레오티드 서열과 결합할 수 있는 서열 특이성을 보유한다.

안티센스 결합에 바람직한 유전자내 부위는 유전자의 오픈 리딩 프레임 (ORF)의 번역 개시/출발 코돈 (5'-AUG/5'-ATG) 또는 종결/정지 코돈 (5'-UAA, 5'-UAG 및 5'-UGA/5'-TAA, 5'-TAG 및 5'-TGA)이 혼입된 영역을 포함한다. 이들 영역은 mRNA 또는 유전자에서 번역 개시 또는 종결 코돈으로부터 어느 방향 (즉, 5' 또는 3')으로든 약 25개 내지 약 50개의 연속적인 뉴클레오티드를 포함하는 부위를 말한다. 안티센스 결합에 바람직한 다른 영역으로는 인트론; 엑손; 인트론-엑손 접합부; 오픈 리딩 프레임 (ORF) 또는 번역 개시 코돈과 번역 종결 코돈 사이의 영역인 "코딩 영역"; mRNA에서 5'-5' 트리포스페이트 연결부를 통해 mRNA의 가장 5'쪽 잔기에 연결된 N7-메틸화 구아노신 잔기를 포함하고 5' 캡 구조 그 자체 뿐 아니라 상기 캡에 인접한 처음 50개 뉴클레오티드를 포함하는 5' 캡; mRNA에서 번역 개시 코돈으로부터 5' 방

향의 부위여서 mRNA의 5' 캡 부위와 번역 개시 코돈 사이의 뉴클레오타이드 또는 유전자에서 그에 상응하는 뉴클레오타이드를 포함하는 5' 비번역 영역 (5' UTR) 및 mRNA에서 번역 종결 코돈으로부터 3' 방향의 부위여서 mRNA의 번역 종결 코돈과 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드 또는 유전자에서 그에 상응하는 뉴클레오타이드를 포함하는 3' 비번역 영역 (3' UTR) 등이 있다.

TAT 단백질의 발현 억제에 유용한 바람직한 안티센스 화합물의 구체적인 예로는 변형된 주쇄 또는 비-천연 뉴클레오시드간 연결부를 함유하는 올리고뉴클레오타이드 등이 있다. 변형된 주쇄를 보유하는 올리고뉴클레오타이드로는 주쇄에 인 원자를 보유하는 올리고뉴클레오타이드 및 주쇄에 인 원자를 보유하지 않는 올리고뉴클레오타이드 등이 있다. 본원 명세서의 목적상 그리고 당업계에서 이따금 언급되는 바와 같이, 뉴클레오시드간 주쇄에 인 원자를 보유하지 않는 변형된 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오시드로 간주될 수도 있다. 바람직한 변형 올리고뉴클레오타이드 주쇄의 예로는 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 메틸 및 기타 알킬 포스포네이트, 예를 들어 3'-알킬렌 포스포네이트, 5'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트, 포스포네이트, 포스포아미데이트, 예를 들어 3'-아미노 포스포아미데이트 및 아미노알킬포스포아미데이트, 티오노포스포아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 정상적인 3'-5' 연결부, 이들의 2'-5' 연결 유사체를 보유하는 셀레노포스페이트 및 보라노포스페이트, 및 1개 이상의 뉴클레오타이드간 연결부가 3'-3', 5'-5' 또는 2'-2' 연결부인 역전된 극성을 보유하는 것들 등이 있다. 역전된 극성을 보유하는 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 가장 3'쪽의 뉴클레오타이드간 연결부에 1개의 3'-3' 연결부, 즉 염기가 결실된 1개의 역전된 뉴클레오시드 잔기 (뉴클레오염기 (nucleobase)가 결실되어 있거나 그 대신에 히드록실기를 보유함)를 포함한다. 다양한 염, 혼합 염 및 유리 산 형태도 포함된다. 인-함유 연결부의 제조법을 교시하는 대표적인 미국 특허로는 미국 특허 제3,687,808호, 동 제4,469,863호, 동 제4,476,301호, 동 제5,023,243호, 동 제5,177,196호, 동 제5,188,897호, 동 제5,264,423호, 동 제5,276,019호, 동 제5,278,302호, 동 제5,286,717호, 동 제5,321,131호, 동 제5,399,676호, 동 제5,405,939호, 동 제5,453,496호, 동 제5,455,233호, 동 제5,466,677호, 동 제5,476,925호, 동 제5,519,126호, 동 제5,536,821호, 동 제5,541,306호, 동 제5,550,111호, 동 제5,563,253호, 동 제5,571,799호, 동 제5,587,361호, 동 제5,194,599호, 동 제5,565,555호, 동 제5,527,899호, 동 제5,721,218호, 동 제5,672,697호 및 동 제5,625,050호 (이들 문헌 각각은 이 거명에 의해 본원에 참고로 포함됨) 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.

인 원자를 내부에 포함하지 않는 바람직한 변형 올리고뉴클레오타이드 주쇄는 단쇄 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오시드간 연결부, 혼합된 이중원자 및 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오시드간 연결부 또는 1종 이상의 단쇄 이중원자 또는 헤테로시클릭 뉴클레오시드간 연결부에 의해 형성된 주쇄를 보유한다. 이들로는 모르폴리노 연결부 (부분적으로는 뉴클레오시드의 당 부분으로부터 형성됨)를 갖는 주쇄; 실록산 주쇄; 술폰, 술폰시드 및 술폰 주쇄; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 주쇄; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 주쇄; 리보아세틸 주쇄; 알켄 함유 주쇄; 술폰아미드 주쇄; 메틸렌이미노 및 메틸렌 히드라지노 주쇄; 술폰아미드 및 술폰아미드 주쇄; 아미드 주쇄 및 혼합된 N, O, S 및 CH₂ 성분 부분을 보유하는 기타 주쇄 등이 있다. 이러한 올리고뉴클레오시드의 제조법을 교시하는 대표적인 미국 특허로는 미국 특허 제5,034,506호, 동 제5,166,315호, 동 제5,185,444호, 동 제5,214,134호, 동 제5,216,141호, 동 제5,235,033호, 동 제5,264,562호, 동 제5,264,564호, 동 제5,405,938호, 동 제5,434,257호, 동 제5,466,677호, 동 제5,470,967호, 동 제5,489,677호, 동 제5,541,307호, 동 제5,561,225호, 동 제5,596,086호, 동 제5,602,240호, 동 제5,610,289호, 동 제5,602,240호, 동 제5,608,046호, 동 제5,610,289호, 동 제5,618,704호, 동 제5,623,070호, 동 제5,663,312호, 동 제5,633,360호, 동 제5,677,437호, 동 제5,792,608호, 동 제5,646,269호 및 동 제5,677,439호 (이들 문헌 각각은 이 거명을 통해 본원에 참고로 포함됨) 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.

다른 바람직한 안티센스 올리고뉴클레오타이드에서는, 뉴클레오타이드 단위의 당 및 뉴클레오시드 사이의 연결부 (즉, 주쇄)가 둘 다 새로운 기로 대체된다. 염기 단위는 적절한 핵산 표적 화합물과의 혼성화를 위해 유지된다. 이러한 올리고머 화합물 중에서 우수한 혼성화 성질을 보유하는 것으로 밝혀진 바 있는 올리고뉴클레오타이드 모방체를 펩티드 핵산 (PNA)이라 지칭한다. PNA 화합물에서, 올리고뉴클레오타이드의 당-주쇄는 아미드 함유 주쇄, 특히 아미노에틸글리신 주쇄로 대체된다. 뉴클레오염기는 보유되어 주쇄의 아미드 부분의 아자 질소 원자에 직접 또는 간접적으로 결합된다. PNA 화합물의 제조법을 교시하는 대표적인 미국 특허로는 미국 특허 제5,539,082호, 동 제5,714,331호 및 동 제5,719,262호 (이들 문헌 각각은 이 거명을 통해 본원에 참고로 포함됨) 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. PNA 화합물에 관한 추가의 교시는 문헌 [Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500]에서 찾을 수 있다.

바람직한 안티센스 올리고뉴클레오타이드에는 포스포로티오에이트 주쇄 및(또는) 이중원자 주쇄, 및 특히 상기 언급한 미국 특허 제5,489,677호에 기재된 -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- [메틸렌(메틸이미노) 또는 MMI 주쇄로 공지되어 있음], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- 및 -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- [여기서, 천연 포

스포디에스테르 주쇄는 $-O-P-O-CH_2-$ 로 나타냄] 및 상기 언급한 미국 특허 제5,602,240호의 아미드 주쇄가 혼입되어 있다. 또한, 상기 언급한 미국 특허 제5,034,506호의 모르폴리노 주쇄 구조를 보유하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드도 바람직하다.

변형된 올리고뉴클레오타이드는 1개 이상의 치환된 당 부분을 함유할 수도 있다. 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 2' 위치에 하기 중 하나를 포함한다: OH; F; O-알킬, S-알킬 또는 N-알킬; O-알케닐, S-알케닐 또는 N-알케닐; O-알키닐, S-알키닐 또는 N-알키닐 또는 O-알킬-O-알킬 (여기서, 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환되거나 비치환된 C_1 내지 C_{10} 알킬 또는 C_2 내지 C_{10} 알케닐 및 알키닐일 수 있음). 특히 바람직한 것은 $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ 및 $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ (여기서, n 및 m은 1 내지 약 10임)이다. 다른 바람직한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 2' 위치에 하기 중 하나를 포함한다: C_1 내지 C_{10} 저급 알킬, 치환된 저급 알킬, 알케닐, 알키닐, 알크아릴, 아르알킬, O-알크아릴 또는 O-아르알킬, SH, SCH_3 , OCN, Cl, Br, CN, CF_3 , OCF_3 , $SOCH_3$, SO_2CH_3 , ONO_2 , NO_2 , N_3 , NH_2 , 헤테로시클로알킬, 헤테로시클로알크아릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, RNA 절단기, 리포터 (reporter)기, 인터칼레이터 (intercalator), 올리고뉴클레오타이드의 약력학적 성질 개선을 위한 기 또는 올리고뉴클레오타이드의 약동학적 성질 개선을 위한 기 및 유사한 성질의 다른 치환체. 바람직한 변형체는 2'-O- $CH_2CH_2OCH_3$, 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로도 공지되어 있는 2'-메톡시에톡시 [Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504], 즉, 알콕시알콕시기를 포함한다. 추가의 바람직한 변형체는 2'-디메틸아미노옥시에톡시, 즉 하기 실시예에 기재된 바와 같은 $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$ 기 (2'-DMAOE라고도 공지되어 있음) 및 2'-디메틸아미노에톡시에톡시 (당업계에서 2'-O-디메틸아미노에톡시에틸 또는 2'-DMAEOE라고도 공지되어 있음), 즉 2'-O- $CH_2-O-CH_2-N(CH_3)_2$ 를 포함한다.

추가의 바람직한 변형체는 2'-히드록실기가 당 고리의 3' 또는 4' 탄소 원자에 연결되어 있어서 비시클릭 (bicyclic) 당 부분을 형성하는 잠긴 핵산 (Locked Nucleic Acid (LNA))을 포함한다. 연결부는 바람직하게는 2' 산소 원자 및 4' 탄소 원자를 연결하는 메틸렌 ($-CH_2-$)_n기 (여기서, n은 1 또는 2임)이다. LNA 및 그의 제조법은 WO 98/39352 및 WO 99/14226에 기재되어 있다.

다른 바람직한 변형체는 2'-메톡시 (2'-O- CH_3), 2'-아미노프로폭시 (2'-O- $CH_2CH_2CH_2NH_2$), 2'-알릴 (2'- $CH_2-CH=CH_2$), 2'-O-알릴 (2'-O- $CH_2-CH=CH_2$) 및 2'-플루오로 (2'-F)를 포함한다. 2'-변형은 아라비노 (상향) 위치 또는 리보 (하향) 위치일 수 있다. 바람직한 2'-아라비노 변형은 2'-F이다. 또한, 올리고뉴클레오타이드의 다른 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오타이드 또는 2'-5' 연결된 올리고뉴클레오타이드 당의 3' 위치 및 5' 말단 뉴클레오타이드의 5' 위치에서도 유사한 변형이 이루어질 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오타이드는 펜토피라노실 당 대신에 시클로부틸 부분과 같은 당 모방체를 보유할 수도 있다. 이러한 변형된 당 구조물의 제조법을 교시하는 대표적인 미국 특허로는 미국 특허 제4,981,957호, 동 제 5,118,800호, 동 제5,319,080호, 동 제5,359,044호, 동 제5,393,878호, 동 제5,446,137호, 동 제5,466,786호, 동 제 5,514,785호, 동 제5,519,134호, 동 제5,567,811호, 동 제5,576,427호, 동 제5,591,722호, 동 제5,597,909호, 동 제 5,610,300호, 동 제5,627,053호, 동 제5,639,873호, 동 제5,646,265호, 동 제5,658,873호, 동 제5,670,633호, 동 제 5,792,747호 및 동 제5,700,920호 (이들 문헌 각각은 이 거명을 통해 그 전문이 본원에 참고로 포함됨) 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.

올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오염기 (당업계에서는 종종 간단하게 "염기"로 언급되기도 함) 변형 또는 치환을 포함할 수도 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "변형되지 않은" 또는 "천연" 뉴클레오염기는 퓨린 염기인 아데닌 (A) 및 구아닌 (G) 및 피리미딘 염기인 티민 (T), 시토신 (C) 및 우라실 (U)을 포함한다. 변형된 뉴클레오염기는 다른 합성 및 천연 뉴클레오염기, 예를 들어 5-메틸시토신 (5-me-C), 5-히드록시메틸 시토신, 크산틴, 하이포크산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 기타 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 기타 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로필 ($-C\equiv C-CH_3$ 또는 $-CH_2-C\equiv CH$) 우라실 및 시토신 및 피리미딘 염기의 다른 알킬 유도체, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-히드록실 및 기타 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 기타 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노-아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌을 포함한다. 추가의 변형된 뉴클레오염기는 트리시클릭 피리미딘, 예를 들어 페녹사진 시티딘 (1H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조사진-2(3H)-온), 페노티아진 시티딘 (1H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조티아진-2(3H)-온), G-클램프 (clamp), 예를 들어 치환된 페녹사진 시티딘 (예를 들어 9-(2-아미노에톡시)-H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조사진-2 (3H)-온), 카르바졸 시티딘 (2H-피리미도[4,5-

b)인돌-2-온), 피리도인돌 시티딘 (H-피리도[3',2':4,5]피콜로[2,3-d]피리미딘-2-온)을 포함한다. 또한, 변형된 뉴클레오염기는 퓨린 또는 피리미딘 염기가 다른 헤테로사이클로 대체되어 있는 뉴클레오염기, 예를 들어 7-테아자-아데닌, 7-테아자구아노신, 2-아미노피리딘 및 2-피리돈을 포함할 수도 있다. 추가의 뉴클레오염기는 미국 특허 제3,687,808호에 개시된 뉴클레오염기, 문헌 [The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990]에 개시된 뉴클레오염기 및 문헌 [Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613]에 개시된 뉴클레오염기를 포함한다. 이들 뉴클레오염기 중 몇가지가 본 발명의 올리고머 화합물의 결합 친화성 증가에 특히 유용하다. 이들에는 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린, 예를 들어 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신 등이 포함된다. 5-메틸시토신 치환은 핵산 이중나선 안정성을 0.6 내지 1.2°C 만큼 증가시키는 것으로 밝혀진 바 있고 [Sanghvi et al, Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278], 이것이 바람직한 염기 치환이며, 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 함께일 경우에는 훨씬 더 특히 바람직한 염기 치환이다. 변형된 뉴클레오염기의 제조법을 교시하는 대표적인 미국 특허로는 미국 특허 제3,687,808호 뿐 아니라 미국 특허 제4,845,205호, 동 제5,130,302호, 동 제5,134,066호, 동 제5,175,273호, 동 제5,367,066호, 동 제5,432,272호, 동 제5,457,187호, 동 제5,459,255호, 동 제5,484,908호, 동 제5,502,177호, 동 제5,525,711호, 동 제5,552,540호, 동 제5,587,469호, 동 제5,594,121호, 동 제5,596,091호, 동 제5,614,617호, 동 제5,645,985호, 동 제5,830,653호, 동 제5,763,588호, 동 제6,005,096호, 동 제5,681,941호 및 동 제5,750,692호 (이들 문헌 각각은 이 거명을 통해 본원에 참고로 포함됨) 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.

안티센스 올리고뉴클레오티드의 또 다른 변형은 올리고뉴클레오티드에 올리고뉴클레오티드의 활성, 세포내 분포 또는 세포에 의한 흡수를 증대시키는 1개 이상의 부분 또는 접합체를 화학적으로 연결시키는 것이다. 본 발명의 화합물은 관능기, 예를 들어 1차 또는 2차 히드록실기에 공유 결합된 접합체 기를 포함할 수 있다. 본 발명의 접합체 기로는 인터칼레이터, 리포터 분자, 폴리아민, 폴리아미드, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에테르, 올리고머의 약동학적 성질을 증대시키는 기 및 올리고머의 약력학적 성질을 증대시키는 기 등이 있다. 전형적인 접합체 기로는 콜레스테롤, 지질, 양이온 지질, 인지질, 양이온성 인지질, 바이오틴, 페나진, 플레이트, 페난트리딘, 안트라퀴논, 아크리딘, 플루오레신, 로다민, 쿠마린 및 염료 등이 있다. 본 발명과 관련하여 약동학적 성질을 증대시키는 기로는 올리고머의 흡수를 개선시키는 기, 분해에 대한 올리고머의 내성을 증대시키는 기 및(또는) RNA와의 서열-특이적 혼성화를 강화시키는 기 등이 있다. 본 발명과 관련하여 약력학적 성질을 증대시키는 기로는 올리고머 흡수, 분포, 대사 또는 배출을 개선시키는 기 등이 있다. 접합체 부분으로는 지질 부분, 예를 들어 콜레스테롤 부분 [Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556], 콜산 [Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, 4, 1053-1060], 티오에테르, 예를 들어 핵산-S-트리틸티올 ([Manoharan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309], [Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770]), 티오콜레스테롤 [Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538], 지방족 쇠, 예를 들어 도데칸디올 또는 운데실 잔기 ([Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118], [Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330], [Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54]), 인지질, 예를 들어 디-핵사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸-암모늄 1,2-디-O-핵사데실-rac-글리세로-3-H-포스포네이트 ([Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654], [Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783]), 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 쇠 [Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973] 또는 아다만탄 아세트산 [Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654], 팔미틸 부분 [Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237] 또는 옥타데실아민 또는 핵산아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 부분 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 활성 약물 물질, 예를 들어 아스피린, 와르파린, 페닐부타존, 이부프로펜, 수프로펜, 펜부펜, 케토프로펜, (S)-(+)-프라노프로펜, 카르프로펜, 단실사르코신, 2,3,5-트리요오도벤조산, 플루페남산, 폴린산, 벤조티아디아지드, 클로로티아지드, 디아제핀, 인도메타신, 바르비투레이트, 세팔로스포린, 술과 약물, 항-당뇨병제, 항-박테리아제 또는 항생제 등에 접합될 수도 있다. 올리고뉴클레오티드-약물 접합체 및 이들의 제조법은 미국 특허 출원 제09/334,130호 (1999년 6월 15일자 출원) 및 미국 특허 제4,828,979호, 동 제4,948,882호, 동 제5,218,105호, 동 제5,525,465호, 동 제5,541,313호, 동 제5,545,730호, 동 제5,552,538호, 동 제5,578,717호, 동 제5,580,731호, 동 제5,580,731호, 동 제5,591,584호, 동 제5,109,124호, 동 제5,118,802호, 동 제5,138,045호, 동 제5,414,077호, 동 제5,486,603호, 동 제5,512,439호, 동 제5,578,718호, 동 제5,608,046호, 동 제4,587,044호, 동 제4,605,735호, 동 제4,667,025호, 동 제4,762,779호, 동 제4,789,737호, 동 제4,824,941호, 동 제4,835,263호, 동 제4,876,335호, 동 제4,904,582호, 동 제4,958,013호, 동 제5,082,830호, 동 제5,112,963호, 동 제5,214,136호, 동 제5,082,830호, 동 제5,112,963호, 동 제5,214,136호, 동 제5,245,022호, 동 제5,254,469호, 동 제5,258,506호, 동 제5,262,536호, 동 제5,272,250호, 동 제5,292,873호, 동 제5,317,098호, 동 제5,371,241호, 동 제5,391,723호, 동 제5,416,203호, 동 제5,451,463호, 동 제5,510,475호, 동 제5,512,667호, 동 제5,514,785호, 동 제5,565,552호, 동 제5,567,810호, 동 제5,574,142호, 동 제5,585,481호, 동 제5,587,371호, 동 제5,595,726호, 동 제5,597,696호, 동 제5,599,923호, 동 제5,599,928호 및 동 제5,688,941호 (이들 문헌 각각은 이 거명을 통해 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

주어진 화합물의 모든 위치가 균일하게 변형될 필요는 없으며, 사실상 상기 기재된 변형 중 하나 초과가 단일 화합물에 혼입될 수도 있고, 또는 심지어 올리고뉴클레오타이드내의 단일 뉴클레오타이드에 혼입될 수도 있다. 또한, 본 발명은 키메라 화합물인 안티센스 화합물도 포함한다. 본 발명과 관련하여 "키메라" 안티센스 화합물 또는 "키메라"는 각각이 1종 이상의 단량체 단위 (즉, 올리고뉴클레오타이드 화합물인 경우에는 1종 이상의 뉴클레오타이드)로 제조된, 화학적으로 별개인 영역을 2개 이상 함유하는 안티센스 화합물, 특히 올리고뉴클레오타이드이다. 전형적으로, 이들 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드가 변형되어 상기 올리고뉴클레오타이드에 뉴클레아제 분해에 대한 내성 증가, 세포에 의한 흡수 증가 및(또는) 표적 핵산에 대한 결합 친화성 증가를 부여하는 영역을 1 군데 이상 함유한다. 올리고뉴클레오타이드의 추가의 영역은 RNA:DNA 또는 RNA:RNA 하이브리드를 절단할 수 있는 효소에 대한 기질로서 기능할 수 있다. 예를 들면, RNase H는 RNA:DNA 이중나선의 RNA 가닥을 절단하는 세포내 엔도뉴클레아제이다. 따라서, RNase H의 활성화로 인해 RNA 표적이 절단되기 때문에, 유전자 발현의 올리고뉴클레오타이드 억제 효율이 크게 증대된다. 결과적으로, 키메라 올리고뉴클레오타이드를 사용할 경우에는, 더 짧은 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 동일한 표적 영역에 혼성화시키는 포스포로티오에이트 데옥시올리고뉴클레오타이드에 필적하는 결과를 종종 얻을 수 있다. 본 발명의 키메라 안티센스 화합물은 2종 이상의 올리고뉴클레오타이드, 변형된 올리고뉴클레오타이드, 올리고뉴클레오타이드 및(또는) 상기한 바와 같은 올리고뉴클레오타이드 모방체의 복합 구조물로서 형성될 수 있다. 바람직한 키메라 안티센스 올리고뉴클레오타이드에는 3' 말단에 1종 이상의 2' 변형된 당 (바람직하게는 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃)이 혼입되어 뉴클레아제 내성을 부여하고, 4개 이상의 연속적인 2'-H 당을 갖는 영역이 혼입되어 RNase H 활성을 부여한다. 이러한 화합물들은 당업계에서 하이브리드 또는 갭머 (gapmer)라고 지칭되어 왔다. 바람직한 갭머는 3'-말단 및 5'-말단에 4개 이상의 연속적인 2'-H 당을 갖는 1개 이상의 영역으로 분리된 2' 변형된 당 (바람직하게는 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) 영역이 있고, 바람직하게는 포스포로티오에이트 주쇄 연결부가 혼입되어 있다. 이러한 하이브리드 구조물의 제조법을 교시하는 대표적인 미국 특허로는 미국 특허 제5,013,830호, 동 제5,149,797호, 동 제5,220,007호, 동 제5,256,775호, 동 제5,366,878호, 동 제5,403,711호, 동 제5,491,133호, 동 제5,565,350호, 동 제5,623,065호, 동 제5,652,355호, 동 제5,652,356호 및 동 제5,700,922호 (이들 문헌 각각은 이 거명을 통해 그 전문이 본원에 참고로 포함됨) 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.

본 발명에 따라 사용되는 안티센스 화합물은 공지된 고상 합성 기술을 통해 편리하고 일상적으로 제조될 수 있다. 이러한 합성을 위한 장치는 여러 회사, 예를 들어 어플라이드 바이오시스템스 (Applied Biosystems) (미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재) 등이 판매하고 있다. 이러한 합성을 위해 당업계에 공지된 임의의 다른 수단을 추가로 또는 별법으로 이용할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드, 예를 들어 포스포로티오에이트 및 알킬화 유도체의 제조시에 유사한 기술을 사용한다는 것은 공지되어 있다. 본 발명의 화합물은 흡수, 분포 및(또는) 흡착을 보조하기 위해 다른 분자, 분자 구조물 또는 화합물들의 혼합물, 예를 들어 리포솜, 수용체 표적화된 분자, 경구용 제제, 직장용 제제, 국소 도포용 제제 또는 기타 제제와 혼합되거나 캡슐화되거나 접합되거나 또는 달리 결합될 수도 있다. 이와 같이 흡수, 분포 및(또는) 흡착을 보조하기 위한 제제의 제조법을 교시하는 대표적인 미국 특허로는 미국 특허 제5,108,921호, 동 제5,354,844호, 동 제5,416,016호, 동 제5,459,127호, 동 제5,521,291호, 동 제5,543,158호, 동 제5,547,932호, 동 제5,583,020호, 동 제5,591,721호, 동 제4,426,330호, 동 제4,534,899호, 동 제5,013,556호, 동 제5,108,921호, 동 제5,213,804호, 동 제5,227,170호, 동 제5,264,221호, 동 제5,356,633호, 동 제5,395,619호, 동 제5,416,016호, 동 제5,417,978호, 동 제5,462,854호, 동 제5,469,854호, 동 제5,512,295호, 동 제5,527,528호, 동 제5,534,259호, 동 제5,543,152호, 동 제5,556,948호, 동 제5,580,575호 및 동 제5,595,756호 (이들 문헌 각각은 이 거명을 통해 본원에 참고로 포함됨) 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.

센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 다른 예로는 유기 부분, 예를 들어 WO 90/10048에 기재된 부분 및 표적 핵산 서열에 대한 올리고뉴클레오타이드의 친화성을 증가시키는 다른 부분, 예를 들어 폴리-(L-라이신)과 공유결합으로 연결된 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 등이 있다. 또한, 엘립티신과 같은 인터칼레이팅제 및 알킬화제 또는 금속 착물을 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 부착하여 표적 뉴클레오타이드 서열에 대한 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오타이드의 결합 특이성을 변형시킬 수 있다.

예를 들어, CaPO₄에 의해 매개된 DNA 형질감염법, 전기천공법 등을 비롯한 임의의 유전자 전달 방법을 이용하거나 엡스타인-바 (Epstein-Barr) 바이러스와 같은 유전자 전달 벡터를 사용함으로써 표적 핵산 서열을 함유하는 세포에 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오타이드를 도입할 수 있다. 바람직한 한 방법에서, 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오타이드를 적합한 레트로바이러스 벡터에 삽입한다. 표적 핵산 서열을 함유하는 세포를 생체내 또는 생체외에서 제조한 레트로바이러스 벡터와 접촉시킨다. 적합한 레트로바이러스 벡터로는 쥐 레트로바이러스 M-MuLV, N2 (M-MuLV로부터 유래된 레트로바이러스) 또는 DCT5A, DCT5B 및 DCT5C (WO 90/13641 참조)로 지칭되는 이중 카피 벡터로부터 유래된 레트로바이러스 벡터 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.

또한, WO 91/04753에 개시된 바와 같이, 리간드 결합 분자와 접합체를 형성함으로써 표적 뉴클레오티드 서열을 함유하는 세포에 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 도입할 수도 있다. 적합한 리간드 결합 분자로는 세포 표면 수용체, 성장 인자, 다른 사이토카인 또는 세포 표면 수용체에 결합하는 다른 리간드 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 리간드 결합 분자의 접합은, 리간드 결합 분자가 그의 상응하는 분자 또는 수용체에 결합하는 능력을 실질적으로 방해하지 않거나, 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 그의 접합된 형태의 세포내 진입을 실질적으로 차단하지 않는다.

별법으로, WO 90/10448에 기재된 바와 같이, 올리고뉴클레오티드-지질 복합체를 형성함으로써 표적 핵산 서열을 함유하는 세포에 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 도입할 수 있다. 이러한 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드-지질 복합체는 세포내에서 내생성 리파아제에 의해 바람직하게 해리된다.

통상적으로, 안티센스 또는 센스 RNA 또는 DNA 분자의 길이는 뉴클레오티드 약 5개 이상, 다르게는 약 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 55개, 60개, 65개, 70개, 75개, 80개, 85개, 90개, 95개, 100개, 105개, 110개, 115개, 120개, 125개, 130개, 135개, 140개, 145개, 150개, 155개, 160개, 165개, 170개, 175개, 180개, 185개, 190개, 195개, 200개, 210개, 220개, 230개, 240개, 250개, 260개, 270개, 280개, 290개, 300개, 310개, 320개, 330개, 340개, 350개, 360개, 370개, 380개, 390개, 400개, 410개, 420개, 430개, 440개, 450개, 460개, 470개, 480개, 490개, 500개, 510개, 520개, 530개, 540개, 550개, 560개, 570개, 580개, 590개, 600개, 610개, 620개, 630개, 640개, 650개, 660개, 670개, 680개, 690개, 700개, 710개, 720개, 730개, 740개, 750개, 760개, 770개, 780개, 790개, 800개, 810개, 820개, 830개, 840개, 850개, 860개, 870개, 880개, 890개, 900개, 910개, 920개, 930개, 940개, 950개, 960개, 970개, 980개, 990개 또는 1,000개 이상이며, 이때 본 문맥에서 용어 "약"은 언급한 뉴클레오티드 서열 길이 \pm 이 길이의 10%를 의미한다.

또한, 상기 프로브를 PCR 기술에서 사용하여 밀접하게 관련된 TAT 코딩 서열의 확인을 위한 서열 풀(pool)을 생성시킬 수도 있다.

또한, TAT를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 사용하여 TAT를 코딩하는 유전자의 맵핑 및 유전적 질환이 있는 개체의 유전자 분석을 위한 혼성화 프로브를 구축할 수도 있다. 본원에서 제공되는 뉴클레오티드 서열은 제자리 혼성화, 공지된 염색체 마커에 대한 연관 분석 및 라이브러리를 사용한 혼성화 스크리닝 등과 같은 공지된 기술로 염색체 및 염색체의 특정 영역에 맵핑시킬 수 있다.

TAT에 대한 코딩 서열이 또 다른 단백질에 결합하는 단백질을 코딩하는 경우 (예를 들어 TAT가 수용체인 경우), TAT는 이러한 결합 상호작용에 관여하는 다른 단백질 또는 분자를 확인하기 위한 분석에 사용될 수 있다. 이러한 방법에 의해, 수용체/리간드 결합 상호작용의 억제제도 확인할 수 있다. 또한, 상기 결합 상호작용에 관여하는 단백질을 사용하여 상기 결합 상호작용의 펩티드 또는 소분자 억제제 또는 아고니스트를 스크리닝할 수도 있다. 또한, 수용체 TAT를 사용하여 상관 관계가 있는 리간드를 단리할 수도 있다. 스크리닝 분석을 설계하여 천연 TAT 또는 TAT에 대한 수용체의 생물학적 활성을 모방하는 리드 화합물을 밝혀낼 수 있다. 이러한 스크리닝 분석은 화합물 라이브러리에 대한 고처리 스크리닝 분석을 포함하며, 특히 소분자의 약물 후보 확인에 적합할 것이다. 고려되는 소분자는 합성 유기 또는 무기 화합물을 포함한다. 상기 분석은 당업계에 특성화된 단백질-단백질 결합 분석, 생화학적 스크리닝 분석, 면역분석 및 세포 기재 분석 등을 비롯한 다양한 포맷으로 수행될 수 있다.

또한, TAT 또는 그의 변형된 형태를 코딩하는 핵산을 사용하여 치료학적으로 유용한 시약의 개발 및 스크리닝에 유용한 트랜스제닉 동물 또는 "낙 아웃 (knock out)" 동물을 제조할 수 있다. 트랜스제닉 동물 (예를 들어 마우스 또는 래트)은 트랜스진 (transgene)을 함유하는 세포를 보유하는 동물인데, 트랜스진은 태아기, 예를 들어 배아 단계에서 상기 동물 또는 상기 동물의 조상에 도입된다. 트랜스진은 세포의 게놈내로 통합되는 DNA이며, 이 세포로부터 형질전환 동물이 발생한다. 한 실시양태에서, TAT를 코딩하는 cDNA를 사용하여 확립된 기술에 따라 TAT를 코딩하는 게놈 DNA를 클로닝할 수 있고, 이 게놈 서열을 사용하여 TAT를 코딩하는 DNA를 발현하는 세포를 함유하는 트랜스제닉 동물을 제조할 수 있다. 특히, 마우스 또는 래트 등과 같은 트랜스제닉 동물을 제조하는 방법은 당업계에 통상적인 것이 되었으며, 예를 들어 미국 특허 제4,736,866호 및 동 제4,870,009호에 기재되어 있다. 전형적으로, 조직 특이적 인핸서를 갖춘 TAT 트랜스진의 혼입에는 특정 세포가 표적이 된다. 배아 단계에서 동물의 배선에 도입된 TAT를 코딩하는 한 카피의 트랜스진을 포함하는 트랜스제닉 동물을 사용하여 TAT를 코딩하는 DNA의 발현 증가 효과를 조사할 수 있다. 이러한 동물은, 예를 들어 TAT의

과발현과 관련된 병리학적 증상으로부터 보호할 것으로 여겨지는 시약에 대한 시험 동물로서 사용할 수 있다. 본 발명의 이러한 측면에 따라, 동물에 상기 시약을 처치하면, 트랜스진을 보유하는 미처치 동물에 비해 병리학적 증상의 발생은 저하되며, 이는 상기 병리학적 증상에 대한 잠재적인 치료학적 개입을 지시한다.

별법으로, TAT의 비-인간 상동체를 사용하여 TAT를 코딩하는 내생성 유전자와 이 동물의 배아 간세포에 도입된, TAT를 코딩하는 변경된 게놈 DNA 사이의 상동성 재조합의 결과로서 TAT를 코딩하는 결합 또는 변형 유전자를 갖는 TAT "낙 아웃" 동물을 구축할 수 있다. 예를 들어, TAT를 코딩하는 cDNA를 사용하여 확립된 기술에 따라 TAT를 코딩하는 게놈 DNA를 클로닝할 수 있다. TAT를 코딩하는 게놈 DNA의 일부는 결실되거나, 통합을 모니터링하는데 사용될 수 있는 선별가능한 마커를 코딩하는 유전자와 같은 또 다른 유전자로 대체될 수 있다. 전형적으로, 벡터내에는 수천개의 염기의 비-변형된 인접 DNA (5' 및 3' 말단 모두에서)가 포함된다 (예를 들어 상동성 재조합 벡터에 대한 문헌 [Thomas and Capecchi, Cell, 51:503 (1987)] 참조). 상기 벡터는 (예를 들어 전기천공법에 의해) 배아 간세포주에 도입되고, 도입된 DNA와 내생성 DNA가 상동성 재조합된 세포를 선별한다 (예를 들어 문헌 [Li et al., Cell, 69:915 (1992)] 참조). 그 후에, 선별된 세포를 동물 (예를 들어 마우스 또는 래트)의 배반포에 주사하여 군집 (aggregation) 키메라를 형성시킨다 (예를 들어 문헌 [Bradley, Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152] 참조). 그 후에, 키메라 배를 적합한 가임신 대리모 동물에게 이식하여 "낙 아웃" 동물을 제조할 수 있다. 생식 세포내에 상동성 재조합된 DNA를 보유하는 자손을 표준 기술로 확인하고 그를 사용하여 모든 세포가 상동성 재조합된 DNA를 함유하는 동물을 육종할 수 있다. 낙 아웃 동물은 예를 들어 특정 병리학적 증상에 대한 방어 능력 및 TAT 폴리펩티드의 부재로 인한 병리학적 증상의 발생을 특징으로 할 수 있다.

TAT 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 유전자 요법에도 사용될 수 있다. 유전자 요법의 적용시에, 유전자는 세포내로 도입되어 치료 효과적인 유전자 산물의 생체내 합성을 달성하며, 예를 들어 결합있는 유전자를 대체한다. "유전자 요법"은 1회 처치에 의해 효과가 지속되는 통상적인 유전자 요법 및 치료 효과적인 DNA 또는 mRNA의 1회 또는 반복 투여를 포함하는 유전자 치료제의 투여를 모두 포함한다. 안티센스 RNA 및 DNA는 생체내에서 특정 유전자의 발현을 차단하기 위한 치료제로서 사용될 수 있다. 세포막을 통한 짧은 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 흡수는 한계가 있어서 이러한 올리고뉴클레오타이드의 세포내 농도가 낮음에도 불구하고, 이들이 세포내로 도입되어 억제제로 작용할 수 있음이 이미 밝혀져 있다 [Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4143-4146 (1986)]. 이러한 올리고뉴클레오타이드를 변형시킴으로써, 예를 들어 이들의 음으로 대전된 포스포디에스테르기를 비대전 기로 치환함으로써 이들의 흡수를 증대시킬 수 있다.

핵산을 살아있는 세포로 도입하는데 사용될 수 있는 다양한 기술이 있다. 이 기술은 핵산이 배양된 세포로 시험관내 전달되는가 또는 의도된 숙주의 세포로 생체내 전달되는가에 따라 달라진다. 핵산을 포유동물 세포로 시험관내 전달하는데 적합한 기술은 리포솜, 전기천공, 미세주입, 세포 융합, DEAE-텍스트란, 인산칼슘 침전 등의 사용을 포함한다. 현재 바람직한 생체내 유전자 전달 기술로는 바이러스 (전형적으로는 레트로바이러스) 벡터를 사용한 형질감염 및 바이러스 코트 단백질-리포솜 매개 형질감염 등이 있다 [Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205-210 (1993)]. 어떤 경우에는, 표적 세포를 표적화하는 작용제, 예를 들어 세포 표면 막 단백질 또는 표적 세포에 특이적인 항체, 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드 등을 핵산 공급원에 제공하는 것이 바람직하다. 리포솜이 사용되는 경우에는, 세포내이입 (endocytosis)에 관련된 세포 표면 막 단백질에 결합하는 단백질을 사용하여 표적화하고(하거나) 흡수를 용이하게 할 수 있으며, 이러한 단백질의 예로는 특정 세포 유형에 대해 친화성을 나타내는 캡시드 단백질 또는 그의 단편, 순환시 내재화가 일어나는 단백질에 대한 항체, 세포내 국소화를 표적으로 하고 세포내 반감기를 증대시키는 단백질 등이 있다. 수용체에 의해 매개된 세포내 이입 기술은 예를 들어 문헌 ([Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987)] 및 [Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)])에 기재되어 있다. 유전자 마킹 및 유전자 요법 프로토콜에 관해 검토하기 위해서는 문헌 [Anderson et al., Science 256, 808-813 (1992)]을 참조한다.

본원에 기재된 TAT 폴리펩티드 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산 분자는 염색체의 확인에 유용하다. 이와 관련하여, 계속해서 새로운 염색체 마커를 확인할 필요가 있는데, 이는 실제 서열 데이터를 바탕으로 하는 사용가능한 염색체 마킹 시약이 현재로서는 비교적 적기 때문이다. 본 발명의 TAT 핵산 분자 각각은 염색체 마커로 사용될 수 있다.

본 발명의 TAT 폴리펩티드 및 핵산 분자는 조직 타이핑 (tissue typing)에 진단용으로 사용할 수도 있으며, 이때 본 발명의 TAT 폴리펩티드는 다른 조직에 비해 한 조직에서, 바람직하게는 동일한 조직 유형의 정상 세포에 비해 질환에 걸린 조직에서 차별적으로 발현될 수 있다. TAT 핵산 분자는 PCR, 노던 분석, 서던 분석 및 웨스턴 분석용 프로브를 제조하는데 사용될 것이다.

본 발명은 TAT 폴리펩티드를 모방하는 화합물 (아고니스트)을 확인하거나 TAT 폴리펩티드의 효과를 방해하기 위한 화합물 (길항제)을 스크리닝하는 방법을 포함한다. 길항제 약물 후보에 관한 스크리닝 분석법을 설계하여 본원에서 확인된 유전자에 의해 코딩되는 TAT 폴리펩티드에 결합하거나 복합체를 형성하거나, 또는 코딩된 폴리펩티드와 다른 세포내 단

백질의 상호작용을 달리 방해하는, 예를 들어 세포에서의 TAT 폴리펩티드 발현을 억제하는 화합물을 확인한다. 이러한 스크리닝 분석법은 화합물질 라이브러리에 대해 고처리량 스크리닝할 수 있는 분석법을 포함하며, 이는 소분자 약물 후보의 확인에 특히 적합할 것이다.

상기 분석법은 당업계에서 특성화된 단백질-단백질 결합 분석법, 생화학적 스크리닝 분석법, 면역분석법 및 세포-기반의 분석법을 비롯한 다양한 포맷으로 수행될 수 있다.

길항제에 관한 모든 분석법의 공통점은 약물 후보와 본원에서 확인된 핵산에 의해 코딩되는 TAT 폴리펩티드의 2가지 성분이 상호작용하기에 충분한 조건 및 시간 동안 이들의 접촉을 요구한다는 점이다.

결합 분석법에서, 상호작용은 결합하는 것이며, 형성된 복합체는 반응 혼합물에서 분리하거나 검출할 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 확인된 유전자에 의해 코딩되는 TAT 폴리펩티드 또는 약물 후보는 공유결합 부착 또는 비공유결합 부착을 통해 고정, 예를 들어 미량역가 플레이트에 고정된다. 비공유결합 부착은 일반적으로 고체 표면을 TAT 폴리펩티드 용액으로 코팅하고 건조시켜 달성된다. 별법으로, 고정된 TAT 폴리펩티드에 특이적인 고정된 항체, 예를 들어 모노클로날 항체를 사용하여 그를 고체 표면에 앵커링 (anchoring)할 수 있다. 상기 분석은 검출가능한 표지로 표지되어 있을 수 있는 고정되지 않은 성분을 고정된 성분, 예를 들어 앵커링된 성분을 함유하는 코팅된 표면에 첨가함으로써 수행된다. 반응이 종결되었을 때, 미반응 성분은 예를 들어 세척을 통해 제거하고, 고체 표면에 앵커링된 복합체를 검출한다. 고정되지 않은 성분이 검출가능한 표지를 원래 보유하는 경우, 표면에 고정된 표지의 검출은 복합체 형성이 일어났음을 지시한다. 고정되지 않은 성분이 표지를 원래 보유하지 않는 경우, 예를 들어 고정된 복합체에 특이적으로 결합하는 표지된 항체를 사용하여 복합체 형성을 검출할 수 있다.

후보 화합물이 본원에서 확인된 유전자에 의해 코딩되는 특정 TAT 폴리펩티드와 상호작용하지만 결합하지는 않는 경우, 후보 화합물과 이 폴리펩티드의 상호작용은 단백질-단백질 상호작용을 검출하는 공지된 방법으로 분석할 수 있다. 이러한 분석법에는 통상의 방법, 예를 들어 가교결합법, 공동면역침전법 및 구배 또는 크로마토그래피 컬럼을 통한 공동정제법이 포함된다. 또한, 단백질-단백질 상호작용은 문헌 ([Fields and Song, Nature (London), 340:245-246 (1989)], [Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)], [Chevray and Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5789-5793 (1991)])에 기재된 효모-기반의 유전자 시스템을 사용하여 모니터링할 수 있다. 많은 전사 활성화자, 예를 들어 효모 GAL4는 물리적으로 구별되는 2개의 모듈형 도메인으로 구성되어 있는데, 한 도메인은 DNA-결합 도메인으로 작용하고, 나머지 한 도메인은 전사-활성화 도메인으로 기능한다. 상기 간행물에 기재된 효모 발현 시스템 (통상적으로, "2-하이브리드 시스템"이라고 지칭함)은 이러한 성질의 이점을 이용하며, 2종의 하이브리드 단백질을 사용하는데, 이 중 하나는 표적 단백질이 GAL4의 DNA-결합 도메인과 융합된 것이며, 다른 하나는 후보 활성화 단백질이 활성화 도메인과 융합된 것이다. GAL4-활성화된 프로모터의 조절하에서의 GAL1-lacZ 리포터 유전자 발현은 단백질-단백질 상호작용을 통한 GAL4 활성의 재구성에 따라 달라진다. 상호작용하는 폴리펩티드들을 함유하는 콜로니는 β -갈락토시다제에 대한 발색 기질을 사용하여 검출한다. 2-하이브리드 기술을 사용하여 2종의 특정 단백질들 사이의 단백질-단백질 상호작용을 확인하는 완성형 키트 (MATCHMAKER (등록상표))는 클론테크 (Clontech)에서 구입할 수 있다. 또한, 이 시스템을 확대 적용하여 특정 단백질 상호작용에 관여하는 단백질 도메인을 맵핑할 수 있을 뿐 아니라, 이러한 상호작용에 중대한 아미노산 잔기를 정확하게 알아낼 수 있다.

본원에서 확인된 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 유전자와 다른 세포내 또는 세포외 성분과의 상호작용을 방해하는 화합물은 다음과 같이 시험할 수 있다: 일반적으로, 상기 유전자 산물과 세포내 또는 세포외 성분을 함유하는 반응 혼합물을 이들 두 산물의 상호작용 및 결합을 허용하는 조건 및 시간하에 제조한다. 결합을 억제하는 후보 화합물의 능력을 시험하기 위해, 시험 화합물의 존재 및 부재하에 반응을 수행한다. 또한, 제3의 반응 혼합물에 양성 대조군으로서 기능하는 위약을 첨가할 수 있다. 혼합물에 존재하는 시험 화합물과 세포내 또는 세포외 성분 사이의 결합 (복합체 형성)을 상기 기재된 바와 같이 모니터링한다. 대조 반응물에서는 복합체가 형성되었으나 시험 화합물을 포함하는 반응 혼합물에서는 복합체가 형성되지 않은 것은 시험 화합물이 시험 화합물과 그의 반응 파트너와의 상호작용을 방해함을 지시한다.

길항제를 분석하기 위해, TAT 폴리펩티드를 특정 활성화에 대해 스크리닝할 화합물과 함께 세포에 첨가할 수 있으며, TAT 폴리펩티드의 존재하에 대상 활성을 억제하는 화합물의 능력은 이 화합물이 TAT 폴리펩티드에 대한 길항제임을 지시한다. 별법으로, 경쟁 억제 분석에 적절한 조건하에 TAT 폴리펩티드 및 잠재적인 길항제를 막-결합 TAT 폴리펩티드 수용체 또는 재조합 수용체와 혼합함으로써 길항제를 검출할 수 있다. TAT 폴리펩티드를 예를 들어 방사성 표지하여, 수용체에 결합하는 TAT 폴리펩티드 분자의 수를 이용하여 잠재적인 길항제의 효과를 측정할 수 있다. 당업자에게 공지된 여러 방법, 예를 들어 리간드 패닝법 및 FACS 분류법 [Coligan et al., Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991)]을 통해 수용체를 코딩하는 유전자를 확인할 수 있다. 바람직하게는 발현 클로닝법이 사용되는데, 여기서 폴리아데닐화 RNA는 TAT 폴리펩티드에 대해 반응성을 나타내는 세포로부터 제조되며, 이 RNA로부터 생성된 cDNA 라이브러

리를 푸울로 나누고, 이를 사용하여 TAT 폴리펩티드에 대한 반응성을 나타내지 않는 COS 세포 또는 다른 세포를 형질감염시킨다. 유리 슬라이드에서 성장시킨 형질감염된 세포를 표지된 TAT 폴리펩티드에 노출시킨다. 요오드화 또는 부위-특이적 단백질 키나아제에 관한 인식 부위의 도입을 비롯한 여러 방법을 통해 TAT 폴리펩티드를 표지할 수 있다. 슬라이드를 고정시키고 인큐베이션한 후에 자기방사법으로 분석한다. 양성 푸울을 확인하여 서브-푸울을 제조하고, 상호작용성 서브-푸울 및 재스크리닝 방법을 이용하여 다시 형질감염시킴으로써, 결국 추정 수용체를 코딩하는 단일 클론을 얻는다.

수용체를 확인하는 다른 방법으로, 표지된 TAT 폴리펩티드를 수용체 분자를 발현하는 세포막 또는 추출물 제제와 함께 광친화성 연결할 수 있다. PAGE를 통해 가교결합된 물질을 분석하고 X-선 필름에 노출시킨다. 수용체를 함유하는 표지된 복합체를 절단하고 펩티드 단편으로 분해하여 단백질 마이크로-서열분석 (microsequencing)을 수행할 수 있다. 마이크로-서열분석으로부터 수득한 아미노산 서열을 사용하여 동작성 (degenerate) 올리고뉴클레오타이드 프로브 한 세트를 설계함으로써 cDNA 라이브러리를 스크리닝하여 추정 수용체를 코딩하는 유전자를 확인한다.

다른 길항제 분석법에서, 후보 화합물의 존재하에 수용체를 발현하는 포유동물의 세포 또는 막 제제를 표지된 TAT 폴리펩티드와 함께 인큐베이션한다. 그 후에, 상기 상호작용을 증대시키거나 차단하는 화합물의 능력을 측정할 수 있다.

잠재적인 길항제의 더욱 구체적인 예로는 면역글로불린과 TAT 폴리펩티드의 융합체에 결합하는 올리고뉴클레오타이드 및 특히 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 및 항체 단편, 단쇄 항체, 항-이디오타입 (idiotypic) 항체 및 이러한 항체 또는 그의 단편의 키메라 형태 또는 인간화 형태 뿐 아니라 인간 항체 및 항체 단편을 비롯한 항체 등이 있으나 이에 제한되지 않는다. 별법으로, 잠재적인 길항제는 밀접하게 관련된 단백질, 예를 들어 수용체를 인식하지만 영향을 미치지 않아서 TAT 폴리펩티드의 작용을 경쟁적으로 억제하는 TAT 폴리펩티드의 돌연변이화된 형태일 수 있다.

또 다른 잠재적인 TAT 폴리펩티드 길항제는 안티센스 기술을 사용하여 제조한 안티센스 RNA 또는 DNA 구조물인데, 예를 들어 여기서의 안티센스 RNA 또는 DNA 분자는 표적화된 mRNA와 혼성화하여 단백질 번역을 방해함으로써 mRNA의 번역을 직접 차단하는 작용을 한다. 안티센스 기술을 사용하여 삼중나선 형성 또는 안티센스 DNA 또는 RNA를 통한 유전자 발현을 제어할 수 있는데, 이 방법들 모두가 폴리뉴클레오타이드와 DNA 또는 RNA의 결합을 바탕으로 한다. 예를 들어, 본원에서 성숙 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열의 5' 코딩 부분을 사용하여 염기쌍 약 10 내지 40 개 염기쌍 길이의 안티센스 RNA 올리고뉴클레오타이드를 설계한다. DNA 올리고뉴클레오타이드는 전사에 관여하는 유전자 영역에 대해 상보적일도록 설계하여 (삼중나선 - 문헌 ([Lee et al., Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979)], [Cooney et al., Science, 241:456 (1988)], [Dervan et al., Science, 251:1360 (1991)] 참조), 전사 및 TAT 폴리펩티드의 생산을 방지한다. 안티센스 RNA 올리고뉴클레오타이드는 생체내에서 mRNA와 혼성화하여 mRNA 분자의 TAT 폴리펩티드로의 번역을 차단한다 (안티센스 - 문헌 [Okano, Neurochem., 56:560 (1991)], [Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)] 참조). 또한, 상기 기재된 올리고뉴클레오타이드를 세포에 전달하여 안티센스 RNA 또는 DNA가 생체내에서 발현될 수 있도록 함으로써 TAT 폴리펩티드의 생산을 억제할 수 있다. 안티센스 DNA를 사용하는 경우, 전사-개시 부위, 예를 들어 표적 유전자 뉴클레오타이드 서열의 약 -10 위치와 +10 위치 사이로부터 유래된 올리고데옥시리보뉴클레오타이드가 바람직하였다.

잠재적인 길항제에는 활성 부위, 수용체 결합 부위 또는 TAT 폴리펩티드의 성장 인자 결합 부위 또는 다른 관련 결합 부위와 결합하여 TAT 폴리펩티드의 정상적인 생물학적 활성을 차단하는 소분자가 포함된다. 소분자의 예로는 작은 펩티드 또는 펩티드-유사 분자, 바람직하게는 가용성 펩티드 및 합성 비-펩티드 유기 또는 무기 화합물 등이 있으나 이에 제한되지 않는다.

리보자임은 RNA의 특이적 절단을 촉매할 수 있는 효소 RNA 분자이다. 리보자임은 상보적인 표적 RNA와 서열-특이적 혼성화한 후에 이를 엔도뉴클레아제형으로 절단하는 작용을 한다. 공지된 기술로 잠재적인 RNA 표적내의 특이적인 리보자임 절단 부위를 확인할 수 있다. 보다 상세한 내용은 예를 들어 문헌 [Rossi, Current Biology, 4:469-471 (1994)] 및 PCT 공개 WO 97/33551 (1997년 9월 18일자로 공개됨)을 참조한다.

전사 억제에 사용되는 삼중나선 형태의 핵산 분자는 단일-가닥이어야 하며, 데옥시뉴클레오타이드로 구성되어야 한다. 이러한 올리고뉴클레오타이드의 염기 조성은 그가 후그스틴 (Hoogsteen) 염기쌍 형성 규칙을 통해 삼중나선 형성을 촉진하도록 설계되어 있는데, 이때 통상적으로 이중나선 중 한쪽 가닥에 상당한 크기의 퓨린 또는 피리미딘 스트레치가 필요하다. 보다 상세한 내용은 예를 들어 상기한 PCT 공개 WO 97/33551을 참조한다.

이들 소분자들은 상기에서 논의한 임의의 한가지 이상의 스크리닝 분석법 및(또는) 당업자에게 공지된 임의의 다른 스크리닝 기술을 통해 확인할 수 있다.

본원에서는 단리된 TAT 폴리펩티드 코딩 핵산을 사용하여 당업계에 공지되어 있으며 본원에 기재된 기술로 TAT 폴리펩티드를 재조합적으로 생산할 수 있다. 즉, 생산된 TAT 폴리펩티드는 당업계에 공지되어 있으며 본원에 기재된 기술을 통한 항-TAT 항체 제조에 사용될 수 있다.

암을 비롯한 다양한 질환을 치료하기 위해, 본원에서 확인된 TAT 폴리펩티드와 특이적으로 결합하는 항체 뿐 아니라 상기 개시된 스크리닝 분석을 통해 확인된 다른 분자를 제약 조성물 형태로 투여할 수 있다.

TAT 폴리펩티드가 세포내에 있고 온전한 항체가 억제제로 사용되는 경우에는 내재화 항체가 바람직하다. 그러나, 리포펙션 (lipofection) 또는 리포솜을 사용하여 항체 또는 항체 단편을 세포내에 전달할 수도 있다. 항체 단편이 사용되는 경우, 표적 단백질의 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 최소의 억제 단편이 바람직하다. 예를 들어, 항체의 가변-영역 서열을 기초로, 표적 단백질 서열과 결합하는 능력을 지닌 펩티드 분자를 설계할 수 있다. 이러한 펩티드는 화학적으로 합성하고(하거나) 재조합 DNA 기술을 통해 제조할 수 있다. 예를 들어 문헌 [Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7889-7893 (1993)]을 참조한다.

또한, 본원의 제제는 치료할 특정 증상에 따라 필요한 경우에 1종 초과 of 활성 화합물, 바람직하게는 서로에게 유해한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 지닌 화합물들을 함유할 수도 있다. 별법으로 또는 추가로, 상기 조성물은 그의 기능을 증대시키는 작용제, 예를 들어 세포독성제, 사이토키인, 화학요법제 또는 성장억제제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 적합하게는 의도된 목적에 효과적인 양으로 배합되어 존재한다.

하기의 실시예는 단지 예시 목적일 뿐이며, 본 발명의 범위를 어떤 방식으로든 제한하고자 함이 아니다.

본원에 인용된 모든 특허 및 참고 문헌은 각각의 거명을 통해 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

실시예

실시예에서 언급한 시판 시약들은 달리 명시하지 않는 한 제조사의 지시에 따라 사용하였다. 하기 실시예와 명세서 전반에서 ATCC 기탁번호로 확인되는 세포들의 입수원은 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (미국 버지니아주 마나사스 소재)이다.

실시예 1: GeneExpress (등록상표)를 이용한 조직 발현 프로파일

다른 종양 및(또는) 정상 조직에 비해 특정 대상 종양 조직에서의 발현이 유의하게 상향조절되는 폴리펩티드 (및 그의 코딩 핵산)를 확인하기 위한 시도로서 유전자 발현 정보를 함유하는 독점 데이터베이스 (GeneExpress (등록상표), 미국 메릴랜드주 게터스버그에 소재하는 진 로직 인크. (Gene Logic Inc.) 제품)를 분석하였다. 구체적으로, 미국 메릴랜드주 게터스버그에 소재하는 진 로직 인크.를 통해 입수가능한 소프트웨어를 GeneExpress (등록상표) 데이터베이스와 함께 또는 제네펙, 인크. (Genentech, Inc.)에서 설계하여 개발한 독점 소프트웨어를 GeneExpress (등록상표) 데이터베이스와 함께 이용하여 GeneExpress (등록상표) 데이터베이스의 분석을 수행하였다. 이 분석에서 포지티브 히트 (positive hit)의 평가는, 예를 들어 정상적인 필수 및(또는) 정상적인 증식 조직에서의 조직 특이성, 종양 특이성 및 발현 수준 등을 비롯한 여러 기준을 기초로 한다. 다음은 GeneExpress (등록상표) 데이터베이스의 분석으로부터 측정된 조직 발현 프로파일이다. 다른 종양 및(또는) 정상 조직에 비해 특정 종양에서의 높은 조직 발현 및 발현의 유의한 상향조절을 나타내고, 임의로는 정상적인 필수 및(또는) 정상적인 증식 조직에서의 비교적 낮은 발현을 입증하는 분자들의 목록이다. 이와 같이, 하기에 열거한 분자는 포유동물에서의 암의 진단 및 치료를 위한 우수한 폴리펩티드 표적이다.

분자	발현이 상향조절되는 부위 :	비교 대상 :
DNA272579 (TAT420)	유방 종양	정상 유방 조직
DNA272579 (TAT420)	결장 종양	정상 결장 조직
DNA272579 (TAT420)	직장 종양	정상 직장 조직
DNA272579 (TAT420)	내피 종양	정상 내피 조직
DNA272579 (TAT420)	간 종양	정상 간 조직
DNA272579 (TAT420)	폐 종양	정상 폐 조직
DNA272579 (TAT420)	난소 종양	정상 난소 조직
DNA272579 (TAT420)	췌장 종양	정상 췌장 조직
DNA272579 (TAT420)	위 종양	정상 위 조직
DNA272579 (TAT420)	고환 종양	정상 고환 조직
DNA333440 (TAT421)	유방 종양	정상 유방 조직
DNA333440 (TAT421)	결장 종양	정상 결장 조직
DNA333440 (TAT421)	직장 종양	정상 직장 조직
DNA333440 (TAT421)	내피 종양	정상 내피 조직
DNA333440 (TAT421)	간 종양	정상 간 조직
DNA333440 (TAT421)	폐 종양	정상 폐 조직
DNA333440 (TAT421)	난소 종양	정상 난소 조직
DNA333440 (TAT421)	췌장 종양	정상 췌장 조직
DNA333440 (TAT421)	전립선 종양	정상 전립선 조직
DNA333440 (TAT421)	위 종양	정상 위 조직
DNA59610 (TAT136)	자궁 종양	정상 자궁 조직

실시예 2: 암 종양에서 TAT 폴리펩티드의 상향조절을 검출하기 위한 마이크로어레이(Microarray) 분석

흔히 수천개의 유전자 서열을 함유하는 핵산 마이크로어레이는 정상 대응조직에 비해 질병 조직에서 차별적으로 발현되는 유전자를 동정하는데 있어서 유용하다. 핵산 마이크로어레이를 사용하여, 시험 조직 샘플 및 대조군 조직 샘플로부터의 시험 및 대조군 mRNA 샘플을 역전사하고 표지하여 cDNA 프로브를 생성하였다. 이어서, cDNA 프로브를 고상 지지체에 고정된 핵산의 어레이에 혼성화시켰다. 어레이의 각 일원의 서열 및 위치가 인식되도록 어레이를 배열하였다. 예를 들어, 특정 질병 증상에서 발현되는 것으로 알려진 유전자를 선별하여 고상 지지체에 배열할 수 있다. 표지된 프로브와 특정 어레이 일원의 혼성화에 의해 프로브가 유도된 샘플이 상기 유전자를 발현한다는 것을 알 수 있다. 시험 (질병 조직) 샘플로부터의 프로브의 혼성화 신호가 대조군 (정상 조직) 샘플로부터의 프로브의 혼성화 신호보다 크다면, 질병 조직에서 과발현된 유전자 또는 유전자들이 확인된다. 이러한 결과는, 질병 조직에서 과발현된 단백질이 질병 상태의 존재에 대한 진단 마커로서 뿐만 아니라 질병 상태의 치료를 위한 치료 표적으로서도 유용하다는 것을 암시한다.

핵산 혼성화 방법 및 마이크로어레이 기술은 당업계에 잘 알려져 있다. 한 예에서, 혼성화용 핵산 및 프로브의 구체적인 제법, 슬라이드 및 혼성화 조건은 2001년 3월 30일 출원되었으며 이 거명을 통해 본원에 참고로 포함되는 PCT 특허 출원 일련 번호 제PCT/US01/10482호에 모두 상술되어 있다.

본 실시예에서, 특정 암 종양(들)에서 과발현되는 폴리펩티드를 확인하기 위한 시도로, 다양한 인간의 조직으로부터 유래된 암 종양을 상이한 조직 유형 및(또는) 비-암성 인간 조직으로부터 유래된 암 종양에 비해 상향조절된 유전자 발현에 대해 연구하였다. 특정 실험에서, 동일한 조직 유형의 암성 인간 종양 조직 및 비-암성 인간 종양 조직을 (때로는 동일한 환자로부터) 수득하여 TAT 폴리펩티드 발현에 대해 분석하였다. 또한, 다수의 상이한 임의의 인간 종양으로부터 암성 인간 종양 조직을 수득하여 간, 신장 및 폐를 비롯한 상피 기원의 비-암성 인간 조직을 넣어 제조된 "보편적인" 상피 대조 샘플과 비교하였다. 조직 풀(pool)로부터 단리된 mRNA는 상기 상이한 조직으로부터 발현된 유전자 산물의 혼합물을 나타낸다. 대조 샘플 풀을 이용하는 마이크로어레이 혼성화 실험은 2-색 분석에서 선형 플롯(plot)을 나타내었다. 이어서, 2-색 분석에서 형성된 선의 기울기를 이용하여 각 실험에서의 시험군:대조군 검출 비를 표준화하였다. 이어서, 다양한 실험으로부터 표준화된 비를 비교하여 유전자 발현이 밀집되는 부위를 확인하는 데 사용하였다. 따라서, "보편적인 대조군" 샘플 풀은 간단한 2-샘플 비교에서 상대적인 유전자 발현의 효과적인 결정을 가능하게 할 뿐만 아니라 다수의 실험에 걸친 다중-샘플 비교를 가능하게 한다.

본 실험에서는, 본원에 기재된 TAT 폴리펩티드-코딩 핵산 서열로부터 유래된 핵산 프로브를 사용하여 마이크로어레이를 제작하였으며, 다양한 종양 조직으로부터의 RNA를 사용하여 상기 마이크로어레이에 혼성화시켰다. 이 실험의 결과를 하기에 나타내었으며, 이는 본 발명의 다양한 TAT 폴리펩티드가 정상 대응 조직에 비해 다양한 인간 종양 조직에서 유의하게 과발현됨을 입증한다. 또한, 하기 나타낸 모든 분자는 "보편적인" 상피 대조군에 비해 그의 특정 종양 조직(들)에서 유의하게 과발현된다. 상기 기재된 바와 같이, 이러한 데이터는 본 발명의 TAT 폴리펩티드가 1종 이상의 암 종양의 존재를 진단하기 위한 마커로서 유용할 뿐만 아니라 상기 종양을 치료하기 위한 치료 표적으로 사용될 수 있음을 입증한다.

분자
DNA59610 (TAT136)

발현이 상향조절되는 부위 :
전립선 종양

비교 대상 :
정상 전립선 조직

실시예 3: 제자리 혼성화

제자리 혼성화는 세포 또는 조직 표본내의 핵산 서열을 검출하고 위치를 파악하게 하는 강력한 다용도 기술이다. 이는 예를 들어, 유전자 발현 부위의 확인, 전사체의 조직 분포 분석, 바이러스 감염의 확인 및 감염 위치의 파악, 특정 mRNA 합성에 있어서의 변화 수행, 및 염색체 맵핑의 보조에 유용할 수 있다.

PCR로 수득한 ^{33}P -표지된 리보프로브를 사용하여 문헌 [Lu and Gillett, Cell Vision 1:169-176 (1994)]의 프로토콜의 최적화된 버전에 따라 제자리 혼성화를 수행하였다. 요컨대, 포르말린에 의해 고정되어 파라핀에 포매된 인간 조직을 절개하고, 파라핀을 제거한 후, 37°C 에서 15분 동안 프로테이나제 K (20 g/ml)로 단백질을 제거하고, 제자리 혼성화를 위해 상기 문헌 [Lu and Gillett]에 기재된 바와 같이 추가로 가공하였다. PCR 산물로부터 ^{33}P -UTP로 표지된 안티센스 리보프로브를 수득하고, 55°C 에서 밤새 혼성화하였다. 상기 슬라이드를 코닥 (Kodak) NTB2 (상표명) 핵 트랙 에멀전 (nuclear track emulsion)에 담그고 4주 동안 노출시켰다.

^{33}P -리보프로브 합성

^{33}P -UTP (Amersham BF 1002, SA < 2000 Ci/mmol) $6.0\ \mu\text{l}$ (125 mCi)를 가속 진공 건조시켰다. 하기 성분을 건조된 ^{33}P -UTP가 함유된 각 튜브에 첨가하였다:

$5\times$ 전사 완충액 $2.0\ \mu\text{l}$

DTT (100 mM) $1.0\ \mu\text{l}$

NTP 혼합물 (2.5 mM: 10 mM GTP, CTP 및 ATP를 각각 $10\ \mu\text{l}$ 씩 + H_2O $10\ \mu\text{l}$) $2.0\ \mu\text{l}$

UTP (50 μM) $1.0\ \mu\text{l}$

Rnasin $1.0\ \mu\text{l}$

DNA 주형 (1 μg) $1.0\ \mu\text{l}$

H_2O $1.0\ \mu\text{l}$

RNA 중합효소 (PCR 산물의 경우에는 통상 T3 = AS, T7 = S) $1.0\ \mu\text{l}$

상기 튜브를 37°C 에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. RQ1 DNase $1.0\ \mu\text{l}$ 를 첨가한 후, 37°C 에서 15분 동안 인큐베이션하였다. TE (10 mM 트리스 (pH 7.6) $90\ \mu\text{l}$ 및 1 mM EDTA (pH 8.0))를 첨가하고, 상기 혼합물을 피펫으로 DE81 페이지 위에 떨어뜨렸다. 나머지 용액을 마이크로콘 (Microcon)-50 한외여과 장치에 로딩하고, 프로그램 10을 이용하여 6분 동안 회전시켰다. 이 여과 장치를 제2 튜브 위에 거꾸로 올려놓고, 프로그램 2를 이용하여 3분 동안 회전시켰다. 마지막 회수 회전 과정 후에, TE $100\ \mu\text{l}$ 를 첨가하였다. 최종 산물 $1\ \mu\text{l}$ 를 피펫으로 DE81 페이지 상에 떨어뜨리고, 바이오플라워 (Bioflour) II 6 ml 중에서 카운팅하였다.

프로브를 TBE/우레아 겔 상에서 러닝 (running)시켰다. 프로브 1 내지 $3\ \mu\text{l}$ 또는 RNA Mrk III $5\ \mu\text{l}$ 를 로딩 완충액 $3\ \mu\text{l}$ 에 첨가하였다. 95°C 가열 블록 (heat block)에서 3분 동안 가열한 후, 즉시 프로브를 얼음 위에 놓았다. 겔의 웰을 플러싱한 후, 샘플을 로딩하고 180 내지 250 볼트에서 45분 동안 러닝시켰다. 겔을 사란 (saran) 랩으로 싸고, -70°C 냉동기에서 1시간 내지 밤새 동안 신호증강 스크린의 XAR 필름에 노출시켰다.

^{33}P -혼성화

A. 동결된 절편의 예비처리

냉동기로부터 슬라이드를 꺼내 알루미늄 트레이 위에 놓고 실온에서 5분 동안 해동시켰다. 상기 트레이를 55℃의 인큐베이터에 5분 동안 놓아 두어 응축을 감소시켰다. 슬라이드를 발연 후드 (fume hood)에서 얼음 상의 4% 파라포름알데히드로 10분 동안 고정시키고, 실온에서 0.5×SSC (20×SSC 25 ml + SQ H₂O 975 ml)로 5분 동안 세척하였다. 37℃에서 10분 동안 프로테이나제 K 0.5 μg/ml (예열된 RNase-무함유 RNase 완충액 250 ml 중 10 mg/ml 원액 12.5 μl)로 단백질을 제거한 후, 상기 절편을 실온에서 10분 동안 0.5×SSC로 세척하였다. 이 절편을 70%, 95%, 100% 에탄올 중에서 각각 2분 동안 탈수하였다.

B. 파라핀-포매 절편의 예비처리

상기 슬라이드로부터 파라핀을 제거하고, SQ H₂O에 넣고, 실온에서 2×SSC로 각각 5분씩 2회 세척하였다. 인간 배아의 경우에는 프로테이나제 K (RNase-무함유 RNase 완충액 250 ml 중 10 mg/ml 용액 500 μl, 37℃, 15분) 20 μg/ml를 사용하여 절편으로부터 단백질을 제거하거나, 포르말린 조직의 경우에는 8×프로테이나제 K (RNase 완충액 250 ml 중의 100 μl, 37℃, 30분)를 사용하여 절편으로부터 단백질을 제거하였다. 그 후, 상기 기재된 바와 같이 0.5×SSC로 세정하고 탈수시켰다.

C. 예비혼성화

상기 슬라이드를 박스 (Box) 완충액 (4×SSC, 50% 포름아미드)으로 포화된 여과지가 안에 붙은 플라스틱 상자에 넣었다.

D. 혼성화

슬라이드 당 1.0×10⁶ cpm의 프로브 및 tRNA (50 mg/ml 원액) 1.0 μl를 95℃에서 3분 동안 가열하였다. 상기 슬라이드를 얼음 위에서 냉각시키고, 슬라이드 당 혼성화 완충액 48 μl를 첨가하였다. 볼텍싱 (vortex)한 후, ³³P 혼합물 50 μl를 슬라이드 상의 예비혼성화물 50 μl에 첨가하였다. 이 슬라이드를 55℃에서 밤새 인큐베이션하였다.

E. 세척

실온에서 2×SSC, EDTA (20×SSC 400 ml + 0.25 M EDTA 16 ml, 최종 부피 (V_f) = 4 L)로 10분씩 2회 세척한 후, 37℃에서 30분 동안 RNaseA (RNase 완충액 250 ml 중 10 mg/ml RNaseA 500 μl = 20 μg/ml)로 처리하였다. 슬라이드를 실온에서 2×SSC, EDTA로 10분씩 2회 세척하였다. 엄격한 세척 조건은 하기와 같다: 55℃, 0.1×SSC, EDTA (20×SSC 20 ml + EDTA 16 ml, V_f = 4 L)에서 2시간.

F. 올리고뉴클레오타이드

본원에 개시된 다양한 DNA 서열들에 대해 제자리 분석을 수행하였다. 상기 분석에 사용된 올리고뉴클레오타이드는 도면에 기재된 바와 같은 핵산 (또는 그의 상보체)과 상보적이도록 수득하였다.

G. 결과

본원에 개시된 다양한 DNA 서열들에 대해 제자리 분석을 수행하였다. 상기 분석의 결과는 다음과 같다.

(1) DNA59610 (TAT136)

9개의 자궁내막 선암종 샘플 중 5개에서는 상기 유전자에 대한 양성 발현이 관찰된 반면, 정상 자궁 조직에서의 발현은 음성이었다.

(2) DNA272579 (TAT420)

6개의 방광 암종 샘플 중 4개 (시험된 모든 정상 방광 조직 샘플은 발현에 대해 음성임), 6개의 유방 암종 샘플 중 5개, 7개의 결장직장 선암종 샘플 중 7개 (시험된 모든 정상 결장직장 조직 샘플은 발현에 대해 음성임), 7개의 난소 암종 샘플 중 4개 (시험된 모든 정상 난소 조직 샘플은 발현에 대해 음성임) 및 8개의 전립선 암종 샘플 중 6개 (분석된 모든 정상 방광 샘플도 발현에 대해 양성으로 시험됨)에서 상기 유전자에 대한 양성 발현이 관찰되었다.

실시예 4: GEPIS에 의한 차별적인 TAT 폴리펩티드 발현의 확인 및 분석

상기 하나 이상의 실시예에서 기재된 바와 같이 종양 항원으로서 확인될 수 있는 TAT 폴리펩티드를 하기와 같이 분석하고 확인하였다. 발현된 서열 태그 (EST) DNA 데이터베이스 (LIFESEQ (등록상표), 인사이트 파마슈티칼스 (Incyte Pharmaceuticals), 미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재)를 검색하고, 대상 EST 서열을 GEPIS로 확인하였다. 실리코 내 (*in silico*)의 유전자 발현 프로파일링 (GEPIS)은 새로운 암 치료적 표적에 대해 대상 유전자를 특성화하는 제넨테크, 인크.가 개발한 생물정보학 도구이다. GEPIS는 대량의 EST 서열 및 라이브러리 정보를 이용하여 유전자 발현 프로필을 결정한다. GEPIS는 EST 데이터베이스에서의 유전자 발생 수와의 비례적 상관관계를 기초로 유전자의 발현 프로필을 결정할 수 있고, 엄격하고 통계학적으로 유의한 방식으로 LIFESEQ (등록상표) EST 관련 데이터베이스와 제넨테크 독점 정보를 통합하여 작동한다. GEPIS를 구성하여 매우 특이적인 분석 또는 광범위한 스크리닝 작업을 수행할 수 있지만, 본 실시예에서는 GEPIS를 신규 종양 항원을 확인하고 교차-입증하기 위해 사용하였다. 초기 스크리닝에서는, GEPIS를 특정 조직 또는 대상 조직 (종종 대상 종양 조직)에서의 발현과 관련된 LIFESEQ (등록상표) 데이터베이스로부터의 EST 서열을 확인하기 위해 사용하였다. 이어서, 상기 초기 스크리닝 (또는 관련된 여러 서열을 정렬시키고, 초기 스크리닝으로부터 수득한 EST 서열을 오버랩핑하여 수득한 컨센서스 (consensus) 서열)에서 확인된 EST 서열을 스크리닝하여 코딩된 단백질에 1개 이상의 막힘단 도메인이 존재함을 확인하였다. 최종적으로, GEPIS를 사용하여 다양한 대상 서열에 대한 완전한 조직 발현 프로필을 생성하였다. 상기 유형의 스크리닝 생물정보학을 이용하여, 다양한 TAT 폴리펩티드 (및 그의 코딩 핵산 분자)가 다른 암 및(또는) 정상적인 비-암성 조직에 비해 특정 유형의 암 또는 특정 암에서 유의하게 과발현됨을 확인하였다. GEPIS 히트 (hit)의 평가는 예를 들어 정상적인 본래 조직 및(또는) 정상적인 증식 조직에서의 조직 특이성, 종양 특이성 및 발현 수준을 비롯한 여러 기준을 기초로 한다. 하기 목록은 GEPIS에 의해 측정된 바와 같은 조직 발현 프로필이 다른 종양 및(또는) 정상 조직에 비해 특정 종양에서의 높은 조직 발현 및 발현의 유의한 상향조절을 입증하고, 임의로는 정상적인 본래 조직 및(또는) 정상적인 증식 조직에서의 상대적으로 낮은 발현을 입증하는 분자들이다. 이와 같이, 하기 나열한 분자들은 포유동물에서의 암 진단 및 치료를 위한 우수한 폴리펩티드 표적이다.

분자	발현이 상향조절되는 부위 :	비교 대상 :
DNA59610 (TAT136)	자궁 종양	정상 자궁 조직

실시예 5: 생체내 종양 증식 유도

본원에 개시된 다양한 TAT 폴리펩티드를 이들이 생체 내에서 종양 형성을 유도하는 능력에 대해 시험하였다. 특히, 미리 표준 기술을 이용하여 (1) 무(無)함유 (종양 성장에 대한 음성 대조군), (2) 발현 벡터만 (종양 성장에 대한 음성 대조군), (3) 발현 벡터에 클로닝된 Wisp-1 단백질을 코딩하는 핵산 (종양 성장에 대한 양성 대조군), (4) 발현 벡터에 클로닝된 DNA272579, 및 (5) 발현 벡터에 클로닝된 NA333440로 안정하게 형질감염시킨 5,000,000개의 쥐 293 세포를 아티믹 (athymic) 누드 마우스에 피하 주입하였다. 상기 주입된 마우스에서의 종양 발전 및 종양 부피를 주입 후 27일째까지 시간의 함수로 측정하였다. 상기 분석의 결과는 주입된 마우스에서의 종양의 발전이 음성 대조군 세포에서보다 Wisp-1-, DNA272579- 및 DNA333440-형질전환된 293 세포 중 한 가지를 주입한 마우스에서 상당히 빠르게 발생한다는 것을 나타낸다. 또한, 상기 분석은 Wisp-1-, DNA272579- 및 DNA333440-형질전환된 293 세포 중 어느 한 가지를 주입한 마우스에서의 평균 종양 부피가 음성 대조군 마우스에서보다 훨씬 크다는 것을 입증한다. 이러한 데이터는 DNA272579 및 DNA333440 둘 모두에 의해 코딩된 폴리펩티드가 생체 내에서 종양 증식을 증진시키는 기능을 한다는 것을 입증한다. 이에 따라, 이들은 암 진단 및 치료를 위한 우수한 표적으로 사용된다.

실시예 6: TAT mRNA 발현의 정량적 분석

이 분석에서는, 5' 뉴클레아제 분석 (예를 들어, TaqMan (등록상표)) 및 실시간 정량 PCR (예를 들어, ABI 프리즘 7700 시퀀스 검출 시스템 (등록상표) (퍼킨 엘머 (Perkin Elmer), 어플라이드 바이오시스템즈 디비전 (Applied Biosystems Division), 미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재)을 이용하여 다른 암성 종양 또는 비-암성 정상 조직과 비교할 때 암성 종양 또는 종양들에서 훨씬 유의하게 과발현된 유전자를 찾았다. 5' 뉴클레아제 분석 반응은 Taq DNA 중합효소의 5' 엑소뉴클레아제 활성을 이용하여 유전자 발현을 실시간으로 모니터링하는 형광 PCR-기반의 기술이다. 2개의 올리고뉴클레오타이드 프라이머 (이 프라이머의 서열은 대상 유전자 또는 EST 서열을 기초로 한 것임)를 사용하여 PCR 반응의 전형적인 앰플

리콘(amplicon)을 생성하였다. 제3 올리고뉴클레오타이드 또는 프로브는 2개의 PCR 프라이머 사이에 위치한 뉴클레오타이드 서열을 검출하도록 설계되었다. 프로브는 Taq DNA 중합효소에 의해 연장될 수 없으며 리포터 형광 염료 및 켄처(quencher) 형광 염료로 표지되었다. 리포터 염료로부터의 임의의 레이저 유도 방출은 2개의 염료가 프로브 상에 함께 가까이 위치할 때 켄칭 염료에 의해 켄칭되었다. PCR 증폭 반응 동안, Taq DNA 중합효소는 주형 의존성 방식으로 프로브를 절단하였다. 이렇게 생성된 프로브 단편을 용액 중에서 해리시키고, 방출된 리포터 염료의 신호가 제2 형광단의 켄칭 영향을 받지 않게 하였다. 합성된 새로운 분자 각각에 대해 1개의 리포터 염료 분자가 방출되며, 켄칭되지 않은 리포터 염료의 검출은 데이터의 정량적 해석의 기초를 제공하였다.

5' 뉴클레아제 방법은 실시간 정량 PCR 장치, 예를 들어 ABI 프리즘 7700 (상표명) 시퀀스 검출 시스템에서 실시하였다. 이 시스템은 써모사이클러 (thermocycler), 레이저, 전하 커플링 장치 (CCD), 카메라 및 컴퓨터로 구성되었다. 본 시스템은 써모사이클러에서 96 웰 포맷내의 샘플을 증폭시켰다. 증폭시키는 동안, 레이저로 유래된 형광 신호는 광섬유 케이블을 통해 모든 96 웰에 실시간으로 모아져 CCD에서 검출되었다. 본 시스템은 장치를 작동하고 데이터를 분석하기 위한 소프트웨어를 포함하였다.

스크리닝하기 위한 출발 물질은 매우 다양한 암 조직으로부터 단리한 mRNA이었다. mRNA는 정확하게, 예를 들어, 형광 측정기로 정량하였다. 음성 대조군으로서, RNA를 시험할 암 조직과 동일한 조직 유형의 다양한 정상 조직으로부터 단리하였다.

5' 뉴클레아제 분석 데이터는 먼저 Ct 또는 역치 사이클 (threshold cycle)로 표현하였다. 이는 리포터 신호가 기본 형광 수준 이상으로 축적될 때의 사이클로 정의된다. ΔCt 값은 암세포의 mRNA 양을 정상적인 인간의 mRNA의 양과 비교할 때 핵산 샘플 중에 포함된 특정 표적 서열의 상대적인 출발 카피수의 정량적 측정치로서 사용된다. 1 Ct 단위는 정상과 비교할 때 1 PCR 사이클 또는 대략 2배의 상대적 증가에 상응하고, 2 단위는 4배의 상대적 증가에 상응하고, 3 단위는 8배의 상대적 증가에 상응하기 때문에, 2종 이상의 다른 조직 간에 mRNA 발현의 상대적인 배수 증가를 정량적으로 측정할 수 있다. 상기 기술을 이용하여, 하기에 나열된 분자가 (동일한 조직 공여자 및 상이한 조직 공여자 둘 다로부터의) 정상 비-암성 대응 조직에 비해 특정한 종양에서 유의하게 과발현(즉, 2배 이상 발현)되는 것으로 밝혀졌고, 따라서 이들 분자는 포유동물에서의 암의 진단 및 치료를 위한 우수한 폴리펩티드 표적임을 나타낸다.

분자	발현이 상향조절되는 부위:	비교 대상:
DNA272579 (TAT420)	결장 종양	정상 결장 조직

실시예 7: 항체 생성 및 단백질 발현

본원에 기재된 표준 기술을 이용하여 2가지 모노클로날 항체 (본원에서는 2H4 및 1G4로 지칭함)를 제작하였으며, 이들은 DNA272579 (TAT420)에 의해 코딩된 폴리펩티드에 선택적으로 결합하는 것으로 나타났다. 이어서, 이들 모노클로날 항체를 표준 웨스턴 블랏 (Western Blot) 분석에 사용하여 정상적인 난소 및 유방 세포에 대한 유방암 및 난소암 세포주에서의 TAT420 발현 데이터를 획득하였다. 상기 웨스턴 블랏 실험으로부터 수득한 결과는 천연 TAT420 폴리펩티드가 하기 유방암 또는 난소암 세포주, 즉 HS578T, Igrov-1, MB231 및 OvCar-5에서는 상당히 많이 발현되는 반면, 정상적인 유방 및 난소 세포에서는 TAT420의 발현이 거의 관찰되지 않았음을 입증한다.

또한, 2H4 모노클로날 항체를 표준 면역조직화학 분석에 사용하여 정상적인 결장 조직에 대한 결정 선암에서의 TAT420 발현의 정성적 및 정량적 특성을 결정하였다. 상기 분석의 결과는 천연 TAT420가 시험된 6/10 결장 선암의 기질 섬유아세포에서는 상당히 많이 발현되는 반면, 정상적인 결장 조직에서는 유의한 TAT420 발현에 관찰되지 않았음을 나타낸다.

실시예 8: 혼성화 프로브로서 TAT의 용도

하기 방법은 TAT를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 혼성화 프로브로서의 용도, 즉 포유동물에서 종양의 존재를 진단하기 위한 혼성화 프로브로서의 용도를 기재하였다.

본원에 개시된 전장 또는 성숙 TAT의 코딩 서열을 포함하는 DNA는 인간 조직 cDNA 라이브러리 또는 인간 조직 게놈 라이브러리에서 상동성 DNA (예를 들면, TAT의 자연 발생적인 변이체를 코딩하는 것)를 스크리닝하기 위한 프로브로서도 사용할 수 있다.

이들 라이브러리 DNA를 함유하는 필터의 혼성화 및 세척을 다음과 같은 고염적 조건 하에 수행하였다. 방사선 표지된 TAT 유래 프로브와 필터의 혼성화를 50% 포름아미드, 5 ×SSC, 0.1% SDS, 0.1% 피로인산나트륨, 50 mM 인산나트륨, pH 6.8, 2 ×덴하르트 (Denhardt's) 용액 및 10% 텍스트란 술페이트로 구성된 용액 중에서 42℃에서 20 시간 동안 수행하였다. 필터를 42℃의 0.1 ×SSC 및 0.1% SDS의 수용액 중에서 세척하였다.

이어서, 전장 천연 서열 TAT를 코딩하는 DNA와의 바람직한 서열 동일성을 갖는 DNA를 당업계에 공지된 표준 기술을 이용하여 확인할 수 있다.

실시예 9: 이. 콜라이에서 TAT의 발현

이 실시예는 이. 콜라이 내의 재조합 발현에 의해 TAT의 비글리코실화된 형태를 제조하는 방법을 설명한다.

먼저, TAT를 코딩하는 DNA 서열을 선택된 PCR 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. 프라이머는 선택된 발현 벡터 상의 제한효소 부위에 상응하는 제한효소 부위를 함유해야 한다. 다양한 발현 벡터를 사용할 수 있다. 적합한 벡터의 예로는 엠 피실린 및 테트라사이클린 내성 유전자를 함유하는 pBR322 [이. 콜라이에서 유래; Bolivar et al., *Gene*, 2:95 (1977)]가 있다. 벡터를 제한효소로 절단하고 탈인산화시켰다. 이어서, PCR 증폭된 서열을 벡터에 라이게이션하였다. 벡터는 바람직한 항생제 내성 유전자, trp 프로모터, 폴리-His 리더 (처음 6 개의 STII 코돈, 폴리-His 서열 및 엔테로키나아제 절단 부위를 포함), TAT 코딩 영역, 램다 전사 종결 인자 및 argU 유전자를 코딩하는 서열을 포함할 것이다.

이어서, 상기 문헌 [Sambrook et al.]에 기재된 방법에 의해 라이게이션 혼합물을 사용하여 선택된 이. 콜라이 균주를 형질전환시켰다. LB 플레이트에서 성장할 수 있는 형질전환체를 확인한 후에 항생제 내성을 갖는 콜로니를 선별하였다. 플라스미드 DNA를 제한효소 분석법 및 DNA 서열분석을 이용하여 단리 및 확인할 수 있었다.

선별된 클론을 항생제가 보충된 LB 브로스과 같은 액체 배양 배지에서 밤새 성장시킬 수 있었다. 그 후, 밤새 배양한 배양액은 더 큰 규모의 배양물을 접종시키는 데 사용할 수 있었다. 이어서, 세포를 발현 프로모터가 작동되는 동안 원하는 광학 밀도까지 성장시켰다.

수시간 이상 동안 세포를 배양한 후에 원심분리로 세포를 회수할 수 있었다. 원심분리에 의해 수득한 세포 펠렛을 당업계에 공지된 여러가지 제제를 이용하여 용해시킨 후에, 단백질이 강하게 결합하는 조건 하에서 금속 킬레이팅 컬럼을 이용하여 용해된 TAT 단백질을 정제할 수 있었다.

하기 방법을 이용하여 TAT를 이. 콜라이에서 폴리-His 태그가 부착된 형태로 발현시킬 수 있었다. 우선, TAT를 코딩하는 DNA를 선택된 PCR 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. 프라이머는 선택된 발현 벡터 상의 제한효소 부위에 상응하는 제한효소 부위, 및 효율적이고 신뢰할 만한 번역 개시, 금속 킬레이트 컬럼에서의 신속한 정제, 및 엔테로키나아제를 사용한 단백질 분해 제거를 제공하는 다른 유용한 서열들을 함유하였다. 이어서 PCR 증폭된, 폴리-His 태그가 부착된 서열을 발현 벡터에 라이게이션시켜 이. 콜라이 숙주 [균주 52 (W3110 fuhA (tonA) lon galE rpoHts (htpRts) clpP (lacIq)를 기재로 한 숙주]를 형질전환시키는 데 사용하였다. 우선 형질전환체를, 50 mg/mL의 카르베니실린을 함유하는 LB 배지에서 O.D.₆₀₀이 3 내지 5에 도달할 때까지 30℃에서 진탕 배양하였다. 이어서, 배양액을 CRAP 배지 (물 500 mL 중에서 (NH₄)₂SO₄ 3.57 g, 시트르산나트륨·2H₂O 0.71 g, KCl 1.07 g, 디프코 (Difco) 효모 추출물 5.36 g, 셰필드 하이카제 (Sheffield hycase) SF 5.36 g, 및 110 mM MPOS, pH 7.3, 0.55% (중량/부피) 글루코스 및 7 mM MgSO₄를 혼합하여 제조함)로 50 내지 100 배 희석하고, 대략 20 내지 30 시간 동안 30℃에서 진탕 배양시켰다. 샘플을 취해 SDS-PAGE 분석법으로 발현을 확인하고, 대량 배양액을 원심분리하여 세포를 펠렛 형태로 수득하였다. 세포 펠렛을 정제 및 리폴딩 (refolding)시킬 때까지 동결시켰다.

0.5 내지 1 L 발효액으로부터 수득한 이. 콜라이 페이스트 (6 내지 10 g 펠렛)를 10배 부피 (중량/부피)의 7 M 구아니딘, 20 mM 트리스 (pH 8) 완충액에 재현탁시켰다. 고체 아황산나트륨 및 사티온산나트륨을 각각 최종 농도 0.1 M과 0.02 M 이 되도록 첨가하고, 용액을 4℃에서 밤새 교반하였다. 이 단계에서, 아황산염화에 의해 모든 시스테인 잔기가 차단된 변성 단백질이 생산되었다. 이 용액을 벡크만 (Beckman) 초원심분리기에서 40,000 rpm으로 30 분 동안 원심분리하였다. 상층액을 3배 내지 5배 부피의 금속 킬레이트 컬럼 완충액 (6 M 구아니딘, 20 mM 트리스, pH 7.4)으로 희석하고, 0.22 μm 필터로 여과시켜 투명하게 하였다. 투명해진 추출물을 금속 킬레이트 컬럼 완충액으로 평형화된 5 ml 쿼젠 (Qiagen) Ni-NTA 금속 킬레이트 컬럼에 로딩하였다. 컬럼을, 50 mM 이미다졸 (칼바이오켄 (Calbiochem), 유티롤 (Utrol) 등급)을

함유하는 추가의 완충액 (pH 7.4)으로 세척하였다. 250 mM 이미다졸을 함유하는 완충액으로 단백질을 용출시켰다. 원하는 단백질을 함유하는 분액을 모아 4℃에 보관하였다. 아미노산 서열을 기준으로 계산된 흡광 계수를 이용하여 280 nm에서 흡광도를 측정함으로써 단백질 농도를 측정하였다.

20 mM 트리스, pH 8.6, 0.3 M NaCl, 2.5 M 우레아, 5 mM 시스테인, 20 mM 글리신 및 1 mM EDTA로 구성된 새롭게 준비한 리폴딩 완충액으로 샘플을 천천히 희석하여 단백질을 리폴딩시켰다. 리폴딩 부피는 최종 단백질 농도가 50 내지 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 선택하였다. 리폴딩 용액을 4℃에서 12 내지 36 시간 동안 약하게 교반하였다. 최종 농도가 0.4% (대략 pH 3)가 되도록 TFA를 첨가하여 리폴딩 반응을 켜쳤다. 추가로 단백질을 정제하기 전에, 용액을 0.22 μm 필터로 여과시키고, 아세토니트릴을 최종 농도 2 내지 10%가 되도록 첨가하였다. 리폴딩된 단백질을, 10 내지 80%의 아세토니트릴 농도 구배로 용출시키면서 0.1% TFA의 이동 완충액을 이용하는 포로스 (Poros) R1/H 역상 컬럼 상에서 크로마토그래피하였다. A280 흡광도를 보이는 분액의 분취액을 SDS 폴리악릴아미드 겔에서 분석하여 균질하게 리폴딩된 단백질을 함유하는 분액을 모았다. 일반적으로, 적절하게 리폴딩된 단백질이 역상 수지와와의 상호작용으로부터 보호되는 소수성 내부가 있는 가장 조밀한 형태의 단백질이기 때문에, 대부분의 단백질들 중에서 적절하게 리폴딩된 단백질은 아세토니트릴의 가장 낮은 농도에서 용출된다. 응집된 단백질은 통상 보다 높은 아세토니트릴 농도에서 용출된다. 역상 단계는 원하는 형태의 단백질로부터 잘못 폴딩된 형태의 단백질을 분리할 뿐 아니라, 샘플로부터 내독소를 제거한다.

목적하는 폴딩된 TAT 폴리펩티드를 함유하는 분액을 모으고, 질소 스트림을 용액에 천천히 가하여 아세토니트릴을 제거하였다. 제제화 완충액으로 평형화되고 멸균 여과된 G25 수퍼파인 (Superfine) (파마시아; Pharmacia) 수지를 이용한 겔 여과법 또는 투석법을 이용하여 단백질을 0.14 M 염화나트륨 및 4% 만니톨을 포함하는 20 mM HEPES (pH 6.8)로 제제화하였다.

상기 기술을 이용하여 본원에 개시된 TAT 폴리펩티드 중 일부를 성공적으로 발현시키고 정제하였다.

실시예 10: 포유동물 세포에서 TAT의 발현

이 실시예는 포유동물 세포내의 재조합 발현에 의해 TAT의 잠재적으로 글리코실화된 형태를 제조하는 방법을 예시한다.

벡터 pRK5 (1989년 3월 15일자로 공개된 EP 307,247 참조)를 발현 벡터로 사용하였다. 임의로는, 상기 문헌 [Sambrook et al.]에 기재된 바와 같은 라이게이션 방법을 이용하여 TAT DNA를 선택된 제한효소 부위를 사용하여 pRK5에 라이게이션시켜, TAT DNA를 삽입하였다. 생성된 벡터를 pRK5-TAT로 지칭하였다.

한 실시양태에서, 선택된 숙주 세포는 293 세포일 수 있었다. 조직 배양 플레이트에서 소태아 혈청 및 임의로는 영양소 및(또는) 항생제가 보충된 DMEM과 같은 배지 중에 인간 293 세포 (ATCC CCL 1573)를 전면 배양하였다. pRK5-TAT DNA 약 10 μg 을 VA RNA 유전자를 코딩하는 DNA [Thimmappaya et al., *Cell*, 31: 543 (1982)] 약 1 μg 과 혼합하고, 500 μl 의 1 mM 트리스-HCl, 0.1 mM EDTA 및 0.227 M CaCl_2 에 용해시켰다. 이 혼합물에 500 μl 의 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM NaPO_4 를 적가하여 25℃에서 10 분 동안 침전물을 형성시켰다. 침전물을 현탁시키고 293 세포에 첨가하여 37℃에서 약 4 시간 동안 정치시켰다. 배양 배지를 흡인 제거하고 PBS 중의 20% 글리세롤 2 mL를 30 초 동안 가하였다. 이어서, 293 세포를 혈청 무함유 배지로 세척하고, 신선한 배지를 첨가하고, 약 5 일 동안 세포를 배양하였다.

형질감염으로부터 대략 24 시간 후, 배양 배지를 제거하고, 배양 배지(단독) 또는 200 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 의 ^{35}S -시스테인 및 200 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 의 ^{35}S -메티오닌을 포함하는 배양 배지로 교체하였다. 12 시간 동안 배양한 후, 조정 배지를 수집하여 회전 필터에서 농축시키고 15% SDS 겔에 로딩하였다. 처리된 겔을 건조시키고 선택된 기간동안 필름에 노출시켜 TAT 폴리펩티드의 존재를 확인할 수 있었다. 형질감염된 세포를 함유하는 배양액을 추가로 인큐베이션시키고 (혈청 무함유 배지에서), 배지를 선택된 생물분석법으로 시험하였다.

다른 기술로서, 문헌 [Sompariyac et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12:7575 (1981)]에 기재된 텍스트란 술페이트 방법을 이용하여 TAT를 293 세포에 일시적으로 도입시킬 수 있었다. 293 세포를 스피너 (spinner) 플라스크에서 최고 밀도가 되도록 성장시키고, pRK5-TAT DNA 700 μg 을 첨가하였다. 세포를 우선 원심분리하여 스피너 플라스크로부터 농축하고, PBS로 세척하였다. DNA-텍스트란 침전물을 4 시간 동안 세포 펠렛 상에서 인큐베이션하였다. 세포를 20% 글리세롤로 90 초간 처리하고 조직 배양 배지로 세척한 후, 조직 배양 배지, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 소 인슐린 및 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 소 트랜스페린을 함

유하는 스피너 플라스크에 다시 도입하였다. 약 4 일 후에 조정 배지를 원심분리하고 여과시켜 세포와 파쇄물을 제거하였다. 이어서, 발현된 TAT를 함유하는 샘플을 농축시키고, 선택된 임의의 방법, 예를 들어 투석 및(또는) 컬럼 크로마토그래피로 정제할 수 있었다.

다른 실시양태에서, TAT를 CHO 세포에서 발현시킬 수 있다. pRK5-TAT를 공지된 시약, 예를 들어 CaPO_4 또는 DEAE 텍스트란을 이용하여 CHO 세포내로 형질감염시킬 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 세포 배양물을 인큐베이션하고, 기존 배지를 배양 배지(단독) 또는 ^{35}S -메티오닌과 같은 방사선 표지를 함유하는 배지로 교체할 수 있다. TAT 폴리펩티드의 존재를 확인한 후에, 배양 배지를 혈청 무함유 배지로 교체할 수 있다. 바람직하게는, 약 6 일 동안 배양물을 인큐베이션하고, 조정 배지를 회수하였다. 이어서, 발현된 TAT를 함유하는 배지를 임의의 선택된 방법으로 농축하고 정제할 수 있었다.

또한, 에피토프 태그가 부착된 TAT는 숙주 CHO 세포에서 발현시킬 수 있다. TAT는 pRK5 벡터로부터 서브클로닝될 수 있다. 서브클론 인서트는 PCR을 통해 배칼로바이러스 발현 벡터내의 폴리-His 태그와 같은 선택된 에피토프 태그와 인 프레임으로 융합시킬 수 있다. 폴리-His 태그가 부착된 TAT 인서트는 안정한 클론을 선별하기 위해 DHFR과 같은 선별 마커를 함유하는 SV40 유래 벡터내에 서브클로닝할 수 있다. 최종적으로, CHO 세포는 (상기 기재된 바와 같이) SV40 유래 벡터로 형질감염시킬 수 있다. 발현을 확인하기 위해서 상기 기재된 바와 같은 방법으로 표지시킬 수 있다. 이어서, 폴리-His 태그가 부착되어 있는 발현된 TAT를 함유하는 배양 배지를 농축하고, Ni^{2+} -킬레이트 친화성 크로마토그래피와 같은 임의의 선택된 방법으로 정제할 수 있었다.

TAT는 또한 일시 발현 방법에 의해 CHO 및(또는) COS 세포에서 발현시킬 수 있거나, 다른 안정 발현 방법에 의해 CHO 세포에서 발현시킬 수 있었다.

하기 방법을 이용하여 CHO 세포에서의 안정한 발현을 수행하였다. 단백질은 각 단백질의 가용성 형태 (예를 들면, 세포 외 도메인)의 코딩 서열이 힌지, CH2 및 CH2 도메인을 함유하는 IgG1 불변 영역 서열에 융합된 IgG 제작용 (면역어드헤신: immunoadhesin)로서 발현되고(되거나) 폴리-His 태그가 부착된 형태로 발현된다.

PCR 증폭에 이어, 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, Johnn Wiley and Sons (1997)]에 기재된 표준 방법을 이용하여 각 DNA를 CHO 발현 벡터에 서브클로닝하였다. CHO 발현 벡터는 대상 DNA의 5' 및 3'에 상응하는 제한 부위를 갖도록 제작되어 cDNA가 편리하게 서틀링될 수 있게 된다. CHO 세포에서 발현에 사용되는 벡터는 문헌 [Lucas et al., Nucl. Acids Res. 24:9 (1774-1779 (1996))]에 기재된 바와 같으며, 대상 cDNA와 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR)를 발현시키기 위해 SV40 초기 프로모터/인핸서를 사용하였다. DHFR 발현은 형질감염 후 플라스미드가 안정적으로 유지되는 것을 선별할 수 있게 한다.

원하는 플라스미드 DNA 12 μg 을 시판되는 형질감염 시약 Superfect (등록상표) (퀴아젠), Dosper (등록상표) 또는 Eugene (등록상표) (베링거 만하임; Boehringer Mannheim)을 이용하여 대략 1,000만 개의 CHO 세포에 도입하였다. 상기 문헌 (Lucas et al.)에 기재된 방법에 따라 세포를 성장시켰다. 대략 3×10^7 개의 세포를 추후의 배양 및 생산을 위해 하기에 기재된 바와 같이 앰플에 동결시켰다.

플라스미드 DNA를 함유하는 앰플을 수조에 넣어 녹인 후, 볼텍싱하여 혼합하였다. 내용물을 배지 10 ml가 함유된 원심 분리 튜브에 피펫으로 넣고, 1,000 rpm에서 5 분 동안 원심분리하였다. 상층액을 흡인 제거하고, 세포를 선별 배지 (0.2 μm 투석 여과된 5% 소태아 혈청을 포함하는 0.2 μm 여과된 PS20) 10 ml에 재현탁시켰다. 이어서, 세포를 90 ml의 선별 배지를 함유하는 100 mL 스피너에 분주하였다. 1 내지 2 일 후, 세포를 150 mL 선별 배양 배지로 채워진 250 mL 스피너로 옮겨서, 37°C에서 배양하였다. 그 다음 2 내지 3 일 후에 250 mL, 500 mL 및 2,000 mL 스피너에 3×10^5 개 세포/mL를 시딩 (seeding)하였다. 세포 배지를 원심분리하고 생산 배지에 재현탁하여 신선한 배지로 교체하였다. 임의의 적합한 CHO 배지를 사용할 수 있지만, 실제로는 미국 특허 제5,122,469호 (1992년 6월 16일자로 허여됨)에 기재된 생산 배지를 사용하였다. 3 L 생산 스피너에 1.2×10^6 개 세포/mL가 되도록 시딩하였다. 시딩 당일, 세포 수와 pH를 측정하였다. 제1 일, 스피너로부터 샘플을 취하고, 여과된 공기를 살포하기 시작하였다. 제2 일, 스피너로부터 샘플을 취하고, 온도를 33°C로 바꾸고, 500 g/L-글루코스 30 ml 및 10% 소포제 0.6 ml (예를 들면, 35% 폴리디메틸실록산 유액, 다우 코닝 (Dow Corning) 365 의약 등급 유액)를 첨가하였다. 생산 과정 전반에 걸쳐, 필요한 경우 pH가 약 7.2로 유지되도록 조정하였다. 10 일 후 또는 생존률이 70% 미만으로 떨어질 때까지, 세포 배양액을 원심분리하여 회수하고, 0.22 μm 필터를 통해 여과시켰다. 여액을 4°C에 보관하거나, 즉시 컬럼 상에 로딩하여 정제할 수 있었다.

폴리-His 태그가 부착된 제작물의 경우, Ni-NTA 컬럼 (퀴아젠)을 이용하여 단백질을 정제하였다. 정제하기 전에 이미다졸을 5 mM 농도로 조정 배지에 첨가하였다. 0.3 M NaCl 및 5 mM 이미다졸을 함유하는 20 mM HEPES (pH 7.4) 완충액으로 평형화된 6 mL Ni-NTA 컬럼 상에 4℃에서 4 내지 5 mL/분의 유속으로 조정 배지를 펌핑하였다. 로딩 후, 컬럼을 추가의 평형 완충액으로 세척하고, 0.25 M 이미다졸을 함유하는 평형 완충액으로 단백질을 용출하였다. 이어서, 고도로 정제된 단백질을 25 mL의 G25 수퍼파인 (파마시아) 컬럼으로 10 mM HEPES, 0.14 M NaCl 및 4% 만니톨을 함유하는 보관 완충액 (pH 6.8)에서 염을 제거하고 -80℃에서 보관하였다.

면역어드헤신 (Fc를 함유함) 제작물은 다음과 같이 조정 배지로부터 정제하였다. 조정 배지를 20 mM 인산나트륨 완충액 (pH 6.8)으로 평형화된 5 mL 단백질 A 컬럼 (파마시아)에 펌핑하였다. 로딩 후, 컬럼을 평형화 완충액으로 전체적으로 세척한 후, 100 mM 시트르산 (pH 3.5)으로 용출하였다. 1 mL의 분액을 1 M 트리스 완충액 (pH 9) 275 μ l가 함유된 튜브에 모음으로써 용출된 단백질을 즉시 중화시켰다. 이어서, 폴리-His 태그가 부착된 단백질에 대해 상기 기재된 바와 같이 보관 완충액 중에서 고도로 정제된 단백질로부터 염을 제거하였다. SDS-폴리아크릴 아마이드 겔 및 에드만 분해법에 의한 N-말단 아미노산 서열분석으로 균일성을 측정하였다.

이러한 기술을 이용하여 본원에 개시된 TAT 폴리펩티드 중 일부를 성공적으로 발현시키고 정제하였다.

실시예 11: 효모에서의 TAT의 발현

하기 방법은 효모에서의 TAT의 재조합 발현을 기재하고 있다.

우선, ADH2/GAPDH 프로모터로부터의 TAT의 세포내 생산 또는 분비에 사용하기 위한 효모 발현 벡터를 제작하였다. TAT를 코딩하는 DNA 및 프로모터를 TAT의 세포내 발현을 지시하는 선택된 플라스미드의 적합한 제한효소 부위에 삽입하였다. TAT를 분비시키기 위해서는, ADH2/GAPDH 프로모터, 천연 TAT 신호 펩티드 또는 다른 포유동물의 신호 펩티드 또는 예를 들어 효모 알파-인자 또는 인버타제 (invertase) 분비 신호/리더 서열 및 링커 서열 (필요한 경우)을 코딩하는 DNA와 함께 TAT를 코딩하는 DNA를 선택된 플라스미드에 클로닝하여 TAT를 발현시켰다.

이어서, 효모 세포, 예를 들어 효모 균주 AB110을 상기 기재된 발현 플라스미드로 형질전환시키고, 선택된 발효 배지에서 배양할 수 있었다. 형질전환된 효모 상층액을 10% 트리클로로아세트산으로 침전시키고, SDS-PAGE로 분리한 후, 겔을 쿠마시 블루 (Coomassie Blue) 염료로 염색하여 분석할 수 있다.

이어서, 원심분리에 의해 발효 배지로부터 효모 세포를 제거하고 선택된 카트리지 필터를 사용하여 배지를 농축시킴으로써 재조합 TAT를 단리하고 정제할 수 있었다. TAT를 함유하는 농축액을 선택된 컬럼 크로마토그래피 수지를 사용하여 추가로 정제할 수 있다.

상기 기술을 이용하여 본원에 개시된 TAT 폴리펩티드 중 일부를 성공적으로 발현시키고 정제하였다.

실시예 12: 배큘로바이러스-감염 곤충 세포내에서의 TAT의 발현

하기 방법은 배큘로바이러스-감염 곤충 세포내에서의 TAT의 재조합 발현에 대하여 기재하고 있다.

TAT의 코딩 서열을 배큘로바이러스 발현 벡터에 함유된 에피토프 태그의 상류에 융합시켰다. 상기 에피토프 태그는 폴리-His 태그 및 면역글로불린 태그 (IgG의 Fc 영역과 유사한 것)를 포함하였다. 시판되는 플라스미드, 예를 들어 pVL1393 (노바젠; Novage)으로부터 유래된 플라스미드를 비롯한 다양한 플라스미드를 사용할 수 있다. 요컨대, TAT 코딩 서열 또는 TAT 코딩 서열의 원하는 부분, 예를 들어 TAT 단백질이 세포외에 존재하는 경우, 막횡단 단백질의 세포외 도메인을 코딩하는 서열 또는 성숙 단백질 코딩하는 서열을 5' 및 3' 영역에 상보적인 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭시켰다. 5' 프라이머는 인접 (선택된) 제한효소 부위를 포함할 수 있다. 이어서, 산물을 선택된 제한효소로 절단하여 발현 벡터에 서브클로닝하였다.

재조합 배큘로바이러스는, 리포펙틴 (GIBCO-BRL로부터 구입)을 이용하여 상기 플라스미드 및 BaculoGold (상표명) 바이러스 DNA (파밍겐; Pharmingen)를 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) ("Sf9") 세포 (ATCC CRL 1711)에 동시에 형질감염시킴으로써 제조하였다. 28℃에서 4 내지 5 일 동안 배양한 후, 방출된 바이러스를 회수하여 추후 증폭에 사용하였다. 바이러스 감염 및 단백질 발현은 문헌 [O'Reilley et al., Baculovirus expresstion vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)]에 기재된 바와 같이 수행하였다.

이어서, 폴리-His 태그가 부착되어 있는 발현된 TAT는 예를 들어 Ni^{2+} -킬레이트 친화성 크로마토그래피로 다음과 같이 정제할 수 있었다. 추출물을 문헌 [Rupert et al., *Nature*, 362: 175-179 (1993)]에 기재된 바와 같이 재조합 바이러스-감염 Sf9 세포로부터 수득하였다. 요컨대, Sf9 세포를 세척하여 초음파 처리 완충액 (25 mL HEPES (pH 7.9); 12.5 mM MgCl_2 ; 0.1 mM EDTA; 10% 글리세롤; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl)에 재현탁시키고, 빙상에서 20 초 동안 2회 초음파 처리하였다. 초음파 처리물을 원심분리하여 투명하게 하고, 상층액을 로딩 완충액 (50 mM 인산, 300 mM NaCl, 10% 글리세롤 (pH 7.8))에 50 배 희석하고 0.45 μm 필터를 통해 여과하였다. 층부피가 5 ml인 Ni^{2+} -NTA 아가로스 컬럼 (퀴아젠으로부터 구입)을 준비하여 물 25 mL로 세척하고, 로딩 완충액 25 ml로 평형화시켰다. 여과시킨 세포 추출물을 분 당 0.5 ml씩 컬럼에 로딩하였다. 컬럼을 로딩 완충액으로 A_{280} 기준값까지 세척하고, 이 시점에서 분액을 수집하기 시작하였다. 다음으로, 2차 세척 완충액 (50 mM 인산; 300 mM NaCl, 10% 글리세롤, pH 6.0)으로 컬럼을 세척하여 비특이적으로 결합된 단백질을 용출시켰다. A_{280} 이 기준값에 다시 도달한 후, 컬럼을 2차 세척 완충액 중의 0 내지 500 mM 이미다졸로 구배로 전개시켰다. 1 ml의 분액을 수집하고, SDS-PAGE 및 은 염색 또는 알칼리 포스포타제에 접합된 Ni^{2+} -NTA (퀴아젠)를 사용한 웨스턴 블랏에 의해 분석하였다. His₁₀ 태그가 부착되어 있는 용출된 TAT를 함유하는 분액을 모아 로딩 완충액에 대해 투석하였다.

별법으로, IgG 태그가 부착된 (또는 Fc 태그가 부착된) TAT의 정제는 공지된 크로마토그래피 기술, 예를 들어 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 수행할 수 있었다.

상기 기술을 이용하여 본원에 기재된 TAT 폴리펩티드 중 일부를 성공적으로 발현시키고 정제하였다.

실시예 13: TAT에 결합하는 항체의 제조

이 실시예는 TAT에 특이적으로 결합할 수 있는 모노클로날 항체의 제조 방법을 설명한다.

모노클로날 항체를 제조하는 기술은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 상기 문헌 (Goding)에 기재되어 있다. 사용될 수 있는 면역원에는 정제된 TAT, TAT를 함유하는 융합 단백질 및 세포 표면 상에 재조합 TAT를 발현하는 세포가 포함된다. 당업자는 과도한 실험 없이 면역원을 선택할 수 있다.

프로인트 (Freund) 완전 면역보강제 중에 유화된 TAT 면역원 1 내지 100 μg 을 피하 또는 복강내 주사하여 마우스, 예를 들어 Balb/c를 면역화시켰다. 별법으로, 면역원을 MPL-TDM 면역보강제 (리비 이뮤노케미칼 리서치 (Ribi Immunochemical Research), 미국 몬타나주 해밀튼 소재) 중에 유화시켜 동물의 뒷발바닥에 주사하였다. 이어서, 면역화된 마우스를 10 내지 12 일 후에 선택된 면역보강제 중에 유화된 추가 면역원으로 부스팅하였다. 그 이후, 수주 동안 마우스를 추가 면역화 주사로 부스팅할 수도 있다. 안와 후방 채혈법으로 마우스로부터 혈청 샘플을 주기적으로 채취하여 ELISA 분석에서 시험함으로써 항-TAT 항체를 검출하였다.

적합한 항체 역가가 검출된 후, 항체에 대해 "양성"인 동물에게 TAT를 최종 정맥주사할 수 있었다. 3 내지 4 일 후에 마우스를 희생시키고 비장 세포를 회수하였다. 이어서, 비장 세포를 선택된 쥐 골수종 세포주, 예를 들어 ATCC 기탁번호 CRL 1597로부터 입수가 가능한 P3X63AgU.1과 융합시켰다 (35% 폴리에틸렌 글리콜 사용). 융합은 비-융합 세포, 골수종 하이브리드 및 비장세포 하이브리드의 증식을 억제하는 HAT (하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘) 배지를 함유하는 96 웰 조직 배양 플레이트에 플레이팅될 수 있는 하이브리도마 세포를 생성시켰다.

하이브리도마 세포를 TAT와의 반응성에 대해 ELISA로 스크리닝하였다. TAT에 대한 원하는 모노클로날 항체를 분비하는 "양성" 하이브리도마 세포를 결정하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

유전적으로 순계 Balb/c 마우스가 항-TAT 모노클로날 항체를 함유하는 복수를 생성하도록 양성 하이브리도마 세포를 복강내 주사할 수 있었다. 별법으로, 하이브리도마 세포는 조직 배양 플라스크 또는 롤러병에서 성장시킬 수 있다. 복수 내에서 생성된 모노클로날 항체는 황산암모늄 침전에 이어 수행된 겔 배제 크로마토그래피를 통해 정제할 수 있다. 별법으로, 항체의 단백질 A 또는 단백질 G의 결합을 기초로 하는 친화성 크로마토그래피를 이용할 수도 있다.

실시예 14: 특이적 항체를 사용한 TAT 폴리펩티드의 정제

천연 또는 재조합 TAT 폴리펩티드를 단백질 정제 분야의 다양한 표준 기술을 통해 정제할 수 있다. 예를 들면, 프로(pro)-TAT 폴리펩티드, 성숙 TAT 폴리펩티드 또는 프리(pre)-TAT 폴리펩티드를, 대상 TAT 폴리펩티드에 특이적인 항체를 이용하는 면역친화성 크로마토그래피로 정제하였다. 일반적으로, 면역친화성 컬럼은 항-TAT 폴리펩티드 항체를 활성화된 크로마토그래피 수지에 공유결합적으로 커플링시킴으로써 제작하였다.

폴리클로날 면역글로불린은 면역 혈청으로부터 황산암모늄 침전법 또는 고정화 단백질 A (파마시아 LKB 바이오테크놀로지 (Pharmacia LKB Biotechnology), 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재) 상에서의 정제법에 의해 면역 혈청으로부터 수득하였다. 이와 유사하게, 모노클로날 항체는 황산암모늄 침전법 또는 고정화 단백질 A 상의 크로마토그래피에 의해 마우스 복수액으로부터 수득하였다. 부분 정제된 면역글로불린을 CnBr-활성화 세파로스 (SEPHAROSE) (등록상표) (파마시아 LKB 바이오테크놀로지)와 같은 크로마토그래피 수지에 공유결합적으로 부착시켰다. 항체를 수지에 커플링시키고, 수지를 차단하고, 유도체 수지를 제조업자의 지시에 따라 세척하였다.

이러한 면역친화성 컬럼은 TAT 폴리펩티드를 가용성 형태로 함유하는 세포로부터 분액을 제조하여 TAT 폴리펩티드를 정제하는 데 사용하였다. 상기 제제는 디터전트의 첨가 또는 당업계에 공지되어 있는 다른 방법에 의해 온전한 세포를 용해시키거나 차등 원심분리를 통해 수득된 세포내 분획을 용해시켜 얻는다. 별법으로, 신호 서열을 함유하는 가용성 TAT 폴리펩티드는 세포가 성장하는 배지내로 유용한 양으로 분비될 수 있다.

가용성 TAT 폴리펩티드 함유 제제를 면역친화성 컬럼에 통과시키고, 컬럼을 TAT 폴리펩티드의 선택적인 흡수를 허용하는 조건 (예를 들면, 디터전트의 존재하의 고이온 농도 완충액)하에 세척하였다. 이어서, 컬럼을 항체/TAT 폴리펩티드 결합을 방해하는 조건 (예를 들면, 대략 pH 2 내지 3과 같은 저 pH 완충액 또는 고농도의 카오트로프 (chaotrope), 예를 들어 우레아 또는 티오시아네이트 이온)하에 용출시키고, TAT 폴리펩티드를 수집하였다.

실시예 15: 시험관내 종양 세포 사멸 분석

대상 TAT 폴리펩티드를 발현하는 포유동물 세포는 표준 발현 벡터 및 클로닝 기술을 이용하여 수득할 수 있었다. 별법으로, 대상 TAT 폴리펩티드를 발현하는 다수의 종양 세포주는 ATCC 등을 통해 공개적으로 이용가능하며, 표준 ELISA 또는 FACS 분석을 이용하여 통상적으로 확인할 수 있었다. 이어서, 항-TAT 폴리펩티드 모노클로날 항체 (및 독소가 접합된 그의 유도체)를 시험관내 TAT 폴리펩티드 발현 세포를 사멸시키는 항체의 능력을 측정하는 분석에 사용할 수 있었다.

예를 들어, 대상 TAT 폴리펩티드를 발현하는 세포를 상기 기재한 바와 같이 수득하고, 96 웰 디쉬 (dish)에 놓았다. 한 분석에서, 항체/독소 접합체 (또는 네이키드 항체)를 4일 동안 세포 배양에 포함시켰다. 제2의 독립적인 분석에서, 상기 세포를 1시간 동안 항체/독소 접합체 (또는 네이키드 항체)와 배양한 후에 세척하고, 항체/독소 접합체 없이 4일 동안 배양하였다. 이어서, 프로메가 (Promega) (Cat# G7571)의 셀타이터-글로 (CellTiter-Glo) 발광 세포 생존성 분석을 이용하여 세포 생존성을 측정하였다. 비처리 세포를 음성 대조군으로 사용하였다.

실시예 16: 생체내 종양 세포 사멸 분석

접합되거나 비접합된 항-TAT 폴리펩티드 모노클로날 항체의 효능을 시험하기 위하여, 항-TAT 항체를 누드 마우스의 복막내에 주사한 다음 24 시간 후에 종양 촉진 세포를 상기 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다. 나머지 연구기간 동안에는 항체 주사를 주당 2회 계속하였다. 이후, 종양 부피를 주당 2회 측정하였다.

앞서 기술한 명세서는 당업자가 본 발명을 실시할 수 있도록 하기에 충분한 것으로 생각된다. 기탁된 양태는 본 발명의 특정 측면의 예시로서 의도되는 것이므로 본 발명은 기탁된 제작물의 범위에 제한되지 않고, 기능적으로 동등한 임의의 제작물은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본원에서 물질의 기탁은 본원에 포함된 기재 내용이 본 발명의 최선의 양식을 포함한 임의의 측면을 실시하기에 부적절하다는 것을 의미하지는 않으며, 특히 청구 범위의 범위를 명세서에서 나타내는 구체적인 설명에 제한하려는 것으로 해석되어서는 안된다. 실제로, 앞서의 상세한 설명으로부터 본원에 나타내고 기술된 것 이외에 본 발명의 다양한 변형이 당업자에게는 명백하며, 이는 첨부된 특허 청구의 범위내에 포함되는 것이다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

- (a) 도 6 (서열 6)에 나타난 폴리펩티드;
- (b) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 6 (서열 6)에 나타난 폴리펩티드;
- (c) 연결된 신호 펩티드가 있는, 도 6 (서열 6)에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;
- (d) 연결된 신호 펩티드가 없는, 도 6 (서열 6)에 나타난 폴리펩티드의 세포외 도메인;
- (e) 도 3 (서열 3)에 나타난 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 또는
- (f) 도 3 (서열 3)에 나타난 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드

를 발현하는 세포를 상기 단백질에 결합하는 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자와 접촉시키는 것을 포함하며, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 상기 단백질에 결합함으로써 상기 세포의 성장을 억제하는 것인, 상기 세포의 성장을 억제하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 상기 항체가 항체 단편인 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 항체가 키메라 항체 또는 인간화 항체인 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 증식억제제에 접합된 것인 방법.

청구항 6.

제1항에 있어서, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 세포독성제에 접합된 것인 방법.

청구항 7.

제6항에 있어서, 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 핵분해 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 8.

제6항에 있어서, 세포독성제가 독소인 방법.

청구항 9.

제8항에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 (maytansinoid) 및 칼리케아미신 (calicheamicin)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 10.

제8항에 있어서, 독소가 메이탄시노이드인 방법.

청구항 11.

제1항에 있어서, 상기 항체가 박테리아에서 제조된 것인 방법.

청구항 12.

제1항에 있어서, 상기 항체가 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 제조된 것인 방법.

청구항 13.

제1항에 있어서, 상기 세포가 암 세포인 방법.

청구항 14.

제13항에 있어서, 상기 암 세포가 방사선 처치 또는 화학요법에 추가로 노출되는 것인 방법.

청구항 15.

제13항에 있어서, 상기 암 세포가 자궁암 세포 및 전립선암 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 16.

제1항에 있어서, 상기 세포의 사멸을 유발하는 방법.

도면

도면1

TTCGCCCTTCTGTGCTCTGCCTCTGAGGAGACCAATGSCCAGTATCTGAGTACCTGCTGCTCCTGCTGGCCAC
CCTAGCTGTGGCCCTGGCCTGGAGCCCCAAGGAGGAGGATAGGATAATCCGGGTGGCATCTATAACGCAGAGCC
TCAATGATGAGTGGGTACAGCGTGCCTTCACTTCGCCATCAGCGAGTATAACAAGGCCACCAAGATGACTAC
TACAGACGTCCTGCGGGTACTAAGAGCCAGGCAACAGACCGTTGGGGGGTGAATTACTTCTTCGACGTAGA
GGTGGGCCGAACCATATGTACCAAGTCCAGCCCACTTGGACACCTGTGCCTTCCATGAACAGCCAGAAGTGC
AGAAGAAACAGTTGTGCTCTTTCGAGATCTACGAAGTCCCTGGGAGAACAGAAGTCCCTGGTGAATTCAGG
TGTCAAGAAGCCTAGGGAAGGCGA

도면2

GCCTCCGAGGAGACCAATGSCCTGGCCCTGTGCACCTGCTGCTCCTGCTGGCCACCCAGGCTGTGGCCCTGGC
CTGGAGCCCCCAGGAGGAGACAGGATAATCGAGGGTGGCATCTATGATGCAGACCTCAATGATGAGCGGGTAC
AGCGTGGCCTTCACTTTGTATCAGCGAGTATAACAAGGCCACTGAAGATGAGTACTACAGACGCTCTGCTGCGG
GTGTACGAGCCAGGAGCAGATCGTGGGCGGGTGAATTACTTCTTCGACATAGAGGTGGGCCGAACCATATG
TACCAAGTCCAGCCCACTTGGACACCTGTGCCTTCCATGAACAGCCAGAAGTGCAGAGAAACAGTTGTGCT
CTTTCAGATCTACGAAGTTCCTGGGAGGACAGAAATGTCCCTGGTGAATTCAGGTGTCAAGAAGCCTAGGGA
TCTGTGCCAGGGAGTCACTGACACCTCCTACTCCACCCCTTGTAGTGTCCACCCCTGGACTGGTGGCC
CCCACCTGTGGGAGGTCTCCCATGCACTGCGAGGAGAGACAGAGAAGGTGCAGGAGGCTTTGTTGC
TCAGCAGGGACTCTGCCCTCCCTCCTTTTGCTTCTCATAGCCCTGGTACATGGTACACACACCCCCACC
TCCTGCAATTAAACAGTAGCATCACCTC

도면3

GGAAGGCAGCGGCAGCTCCACTCAGCCAGTACCCAGATACGCTGGGAACCTTCCCCAGCCATGGCTTCCCTGGG
GCAGATCCTCTTCTGGAGCATAATTAGCATCATCATTATTCTGGCTGGAGCAATTGCATCATCATTGGCTTTG
GTATTTAGGGAGACACTCCATCAGTCACTACTGTGCCTCAGCTGGGAACATTGGGAGGATGGAATCCTG
AGCTGCACTTTTGAACCTGACATCAAACTTCTGATATCGTGATACAATGGCTGAAGGAAGGTGTTTTAGGCTT
GGTCCATGAGTTCAAAGAAGGCAAGATGAGCTGTGCGAGCAGGATGAAATGTTTCAAGGCCGGACAGCAGTGT
TTGTGATCAAGTGATAGTTGGCAATGCCTCTTTGCGGCTGAAAAACGTGCAACTCACAGATGCTGGCACCTAC
AAATGTTATATCATCCTTCTAAAGGCAAGGGGAATGCTAACCTTGAGTATAAACTGGAGCCTTCAGCATGCC
GGAAGTGAATGTGGAATAATGCCAGCTCAGAGACCTTGCGGTGTGAGGCTCCCGATGGTTCCCCAGCCCA
CAGTGGTCTGGGCATCCAAGTTGACCAGGGAGCCAACCTCTCGGAAGTCTCCAATACCAGCTTTGAGCTGAAC
TCTGAGAATGTGACCATGAAGTTGTGTCTGTCTACAATGTTACGATCAACAACACATACTCCTGTATGAT
TGAAAAAGACATTTGCCAAAGCAACAGGGGATATCAAAGTGACAGAATCGGAGATCAAAAGGCGGAGTCACCTAC
AGCTGTCAAACTCAAAGGCTTCTGTGTCTCTCTTTCTTTGCCATCAGCTGGGCACCTTCTGCCTCTCAGC
CCTTACCTGATGCTAAATTAATGTGCCTTGGCCACAAAAAGCATGCAAGTCATTGTTACAACAGGGATCTAC
AGAACTATTACACCAGATATGACCTAGTTTATATTTCTGGGAGGAATGAATCATATCTAGAAGTCTGG
AGTGAGCAAACAAGAGCAAGAAACAAAAAGAGCCAAAGCAGAAGGCTCCAATATGAACAAGATAAATCTATC
TTCAAAGACATATTAGAAGTTGGGAAAATAATTATGTGAAGTACAGCAAGTGTGTTAAGAGTGATAAGTAAAT
GCACGTGGAGACAAGTGCATCCCAGATCTCAGGACCTCCCCCTGCCTGTACCTGGGGAGTGAGAGGACAGG
ATAGTGCATGTTCTTTGTCTCTGAATTTTATGTTATGTGCTGAATGTTGCTCTGAGGAAGCCCTGGAAAG
TCTATCCCAACATATCCACATCTTATATCCACAAATTAAGCTGTAGTATGTACCCTAAGACGCTGCTAATGA
CTGCCACTTCGCAACTCAGGGGCGGCTGCATTTTAGTAATGGGTCAAATGATTCACTTTTATGATGCTTCCAA
AGGTGCCTTGGCTTCTTCCCACTGACAAATGCCAAGTTGAGAAAAATGATCATAATTTTAGCATAAACAG
AGCAGTCGGGACACCGATTTTATAAATAAACTGAGCACCTTCTTTTAAACAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

도면4

MAQYLSTLLLLLATLAVALAWSPKEDRIIPGGIYNADLNDEWVQRALHFAISEYNKATKDDYYRRPLRVLRAR
QQTVGGVNYFFDVEVGRTICTKSQPNLDTCAFHEQPELQKKQLCSFEIYEVPWENRRSLVNSRCQEA

신호 서열
아미노산 1-20

티로신 키나아제 인산화 부위
아미노산 57-64

N-미리스토일화 부위
아미노산 32-37, 33-38

Myb DNA-결합 도메인 반복 신호 1
아미노산 21-29

시스타틴 도메인
아미노산 32-137

도면5

MAWPLCTLLLLLATQAVALLAWSQPEEDRIIEGGIYDADLNDERVQRALHFVISEYNKATEDEYYRLLRVLRAR
EQIVGGVNYFFDIEVGRTICTKSQPNLDTCAFHEQPELQKKQLCSFQIYEVPWEDRMSLVNSRCQEA

신호 서열
아미노산 1-20

티로신 키나아제 인산화 부위
아미노산 28-35, 57-64

N-미리스토일화 부위
아미노산 33-38

Myb DNA-결합 도메인 반복 신호 1
아미노산 21-29

시스타틴 도메인
아미노산 32-137

도면6

MASLGQILFWSIISIIIIILAGAIALIIGFGISGRHSITVTTVASAGNIGEDGILSCTFEPDIKLSDIVIQLKE
GVLGLVHEFKEGKDELSEQDEMFRGRTAVFADQVIVGNASLRLKNVQLTDAGTYKCYIITSKGKGNANLEYKTG
AFSMPEVNVNDYNASSETLRCEAPRWFPQPTVVWASQVDQGANFSEVSNTSFELNSENVTMKVVSPLYNTINNT
YSCMIENDIAKATGDIKVTESI KRRSHLQLLNSKASLCVSSFFAISWALLPLSPYMLK

신호 펩티드
아미노산 1-28

막횡단 도메인
아미노산 258-281

N-글리코실화 부위
아미노산 112-116, 160-164, 190-194, 196-200, 205-209, 216-220, 220-224

N-미리스토일화 부위
아미노산 52-58, 126-132, 188-194

면역 글로불린 도메인
아미노산49-132

<110> GENENTECH, INC.
GRETCHEN FRANTZ
KENNETH HILLAN
PAUL POLAKIS
BENI WOLF
THOMAS WU
ZEMIN ZHANG

<120> IDENTIFICATION OF CELLULAR POLYPEPTIDES DIFFERENTIALLY EXPRESSED
BY TUMOR CELLS

<130> P5035R1-PCT

<140> PCT/US04/03607

<141> 2004-02-05

<150> US 60/445,396

<151> 2003-02-05

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 469

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ttcgcccttc tgtgctctgc ctctgaggag accatggccc agtatctgag taccctgctg 60

ctcctgctgg ccaccctagc tgtggccctg gcctggagcc ccaaggagga ggataggata 120

atccccgggtg gcatctataa cgcagacctc aatgatgagt gggtagacg tgcccttcac 180
 ttcgccatca gcgagtataa caaggccacc aaagatgact actacagacg tccgctgcgg 240
 gtactaagag ccaggcaaca gaccgttggg ggggtgaatt acttcttcga cgtagaggtg 300
 ggccgaacca tatgtaccaa gtcccagccc aacttggaca cctgtgcctt ccatgaacag 360
 ccagaactgc agaagaaaca gttgtgctct ttcgagatct acgaagttcc ctgggagAAC 420
 agaaggtccc tgggtgaattc caggtgtcaa gaagcctagg gaagggcga 469

<210> 2
 <211> 694
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 gcctccgagg agaccatggc ctggccccctg tgcaccctgc tgctcctgct ggccaccag 60
 gctgtggccc tggcctggag cccccaggag gaggacagga taatcgaggg tggcatctat 120
 gatgcagacc tcaatgatga gcgggtacag cgtgcccttc actttgtcat cagcgagtat 180
 aacaaggcca ctgaagatga gtactacaga cgctgctgc ggggtgctacg agccagggag 240
 cagatcgtgg gcggggtgaa ttacttcttc gacatagagg tgggccgaac catatgtacc 300
 aagtcccagc ccaacttgga cacctgtgcc ttocatgaac agccagaact gcagaagaaa 360
 cagttgtgct ctttccagat ctacgaagtt ccctgggagg acagaatgtc cctggtgaat 420
 tccagggtgc aagaagccta gggatctgtg ccaggaggatc aactgacca cctcctactc 480
 ccaccccttg tagtgctccc acccctggac tgggtggcccc caccctgtgg gaggtctccc 540
 catgcacctg cagcaggaga agacagagaa ggctgcagga ggcctttggt gctcagcagg 600
 ggactctgcc ctccctcctt ctttttgctt ctcatagccc tggtagatgg tacacacacc 660
 cccacctcct gcaattaaac agtagcatca cctc 694

<210> 3
 <211> 1658
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 ggaaggcagc ggcagctcca ctcagccagt accagatac gctgggaacc ttccccagcc 60

atggcttccc tggggcagat cctcttctgg agcataatta gcatcatcat tattctggct	120
ggagcaattg cactcatcat tggctttggt atttcaggga gacactccat cacagtcact	180
actgtcgcct cagctgggaa cattggggag gatggaatcc tgagctgcac ttttgaacct	240
gacatcaaac tttctgatat cgtgatacaa tggctgaagg aaggtgtttt aggcttggtc	300
catgagttca aagaaggcaa agatgagctg tgggagcagg atgaaatgtt cagaggccgg	360
acagcagtgt ttgctgatca agtgatagtt ggcaatgcct ctttgcggtt gaaaaacgtg	420
caactcacag atgctggcac ctacaaatgt tatatcatca cttctaaagg caaggggaat	480
gctaaccttg agtataaaac tggagccttc agcatgccgg aagtgaatgt ggactataat	540
gccagctcag agaccttgcg gtgtgaggct ccccgatggt tccccagcc cacagtggtc	600
tgggcatccc aagttgacca gggagccaac ttctcggaag tctccaatac cagctttgag	660
ctgaactctg agaatgtgac catgaagggt gtgtctgtgc tctacaatgt tacgatcaac	720
aacacatact cctgtatgat tgaaaatgac attgccaaag caacagggga tatcaaagt	780
acagaatcgg agatcaaaag gcggagtcac ctacagctgc taaactcaaa ggcttctctg	840
tgtgtctctt ctttctttgc catcagctgg gcacttctgc ctctcagccc ttacctgatg	900
ctaaaataat gtgccttggc cacaaaaaag catgcaaagt cattgttaca acagggatct	960
acagaactat ttcaccacca gatatgacct agttttatat ttctgggagg aaatgaattc	1020
atatctagaa gtctggagtg agcaaacaag agcaagaaac aaaaagaagc caaaagcaga	1080
aggctccaat atgaacaaga taaatctatc ttcaaagaca tattagaagt tgggaaaata	1140
attcatgtga actagacaag tgtgttaaga gtgataagta aaatgcacgt ggagacaagt	1200
gcatccccag atctcaggga cctccccctg cctgtcacct ggggagtgag aggacaggat	1260
agtgcattgt ctttgtctct gaattttttag ttatatgtgc tgtaatgttg ctctgaggaa	1320
gcccttgga agtctatccc aacatatcca catcttatat tccacaaatt aagctgtagt	1380
atgtacccta agacgtgct aattgactgc cacttcgcaa ctcaggggag gctgcatttt	1440
agtaatgggt caaatgattc actttttatg atgcttccaa aggtgccttg gcttctcttc	1500
ccaactgaca aatgccaaag ttgagaaaaa tgatcataat tttagcataa acagagcagt	1560
cggggacacc gattttataa ataaactgag caccttcttt ttaaacaaaa aaaaaaaaaa	1620
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1658


```

<210>      4
<211>     141
<212>     PRT
<213>     Homo sapiens

<400>      4
Met Ala Gln Tyr Leu Ser Thr Leu Leu Leu Leu Leu Ala Thr Leu Ala
  1              5              10              15

Val Ala Leu Ala Trp Ser Pro Lys Glu Glu Asp Arg Ile Ile Pro Gly
      20              25              30

Gly Ile Tyr Asn Ala Asp Leu Asn Asp Glu Trp Val Gln Arg Ala Leu
      35              40              45

His Phe Ala Ile Ser Glu Tyr Asn Lys Ala Thr Lys Asp Asp Tyr Tyr
      50              55              60

Arg Arg Pro Leu Arg Val Leu Arg Ala Arg Gln Gln Thr Val Gly Gly
      65              70              75              80

Val Asn Tyr Phe Phe Asp Val Glu Val Gly Arg Thr Ile Cys Thr Lys
      85              90              95

Ser Gln Pro Asn Leu Asp Thr Cys Ala Phe His Glu Gln Pro Glu Leu
      100             105             110

Gln Lys Lys Gln Leu Cys Ser Phe Glu Ile Tyr Glu Val Pro Trp Glu
      115             120             125

Asn Arg Arg Ser Leu Val Asn Ser Arg Cys Gln Glu Ala
      130             135             140

```

```

<210>      5
<211>     141
<212>     PRT
<213>     Homo sapiens

<400>      5
Met Ala Trp Pro Leu Cys Thr Leu Leu Leu Leu Leu Ala Thr Gln Ala
  1              5              10              15

Val Ala Leu Ala Trp Ser Pro Gln Glu Glu Asp Arg Ile Ile Glu Gly
      20              25              30

Gly Ile Tyr Asp Ala Asp Leu Asn Asp Glu Arg Val Gln Arg Ala Leu
      35              40              45

```

His Phe Val Ile Ser Glu Tyr Asn Lys Ala Thr Glu Asp Glu Tyr Tyr
50 55 60

Arg Arg Leu Leu Arg Val Leu Arg Ala Arg Glu Gln Ile Val Gly Gly
65 70 75 80

Val Asn Tyr Phe Phe Asp Ile Glu Val Gly Arg Thr Ile Cys Thr Lys
85 90 95

Ser Gln Pro Asn Leu Asp Thr Cys Ala Phe His Glu Gln Pro Glu Leu
100 105 110

Gln Lys Lys Gln Leu Cys Ser Phe Gln Ile Tyr Glu Val Pro Trp Glu
115 120 125

Asp Arg Met Ser Leu Val Asn Ser Arg Cys Gln Glu Ala
130 135 140

<210> 6
<211> 282
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile
1 5 10 15

Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser
20 25 30

Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile
35 40 45

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

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

His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met
85 90 95

Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn
100 105 110

Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr
115 120 125

Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu

130	135	140																	
Tyr	Lys	Thr	Gly	Ala	Phe	Ser	Met	Pro	Glu	Val	Asn	Val	Asp	Tyr	Asn				
145					150					155					160				
Ala	Ser	Ser	Glu	Thr	Leu	Arg	Cys	Glu	Ala	Pro	Arg	Trp	Phe	Pro	Gln				
				165					170					175					
Pro	Thr	Val	Val	Trp	Ala	Ser	Gln	Val	Asp	Gln	Gly	Ala	Asn	Phe	Ser				
			180					185					190						
Glu	Val	Ser	Asn	Thr	Ser	Phe	Glu	Leu	Asn	Ser	Glu	Asn	Val	Thr	Met				
	195						200					205							
Lys	Val	Val	Ser	Val	Leu	Tyr	Asn	Val	Thr	Ile	Asn	Asn	Thr	Tyr	Ser				
210						215					220								
Cys	Met	Ile	Glu	Asn	Asp	Ile	Ala	Lys	Ala	Thr	Gly	Asp	Ile	Lys	Val				
225					230					235					240				
Thr	Glu	Ser	Glu	Ile	Lys	Arg	Arg	Ser	His	Leu	Gln	Leu	Leu	Asn	Ser				
				245					250					255					
Lys	Ala	Ser	Leu	Cys	Val	Ser	Ser	Phe	Phe	Ala	Ile	Ser	Trp	Ala	Leu				
			260					265					270						
Leu	Pro	Leu	Ser	Pro	Tyr	Leu	Met	Leu	Lys										
	275						280												