



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년02월07일  
(11) 등록번호 10-2074141  
(24) 등록일자 2020년01월31일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 16/18 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)  
A61K 38/18 (2006.01) A61K 38/19 (2006.01)  
A61K 39/395 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)  
C07K 14/435 (2006.01) C07K 14/475 (2006.01)  
C07K 16/22 (2006.01) C07K 16/24 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 16/18 (2013.01)  
A61K 38/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7002826(분할)  
(22) 출원일자(국제) 2011년02월17일  
심사청구일자 2018년02월28일  
(85) 번역문제출일자 2018년01월29일  
(65) 공개번호 10-2018-0014239  
(43) 공개일자 2018년02월07일  
(62) 원출원 특허 10-2013-7024824  
원출원일자(국제) 2011년02월17일  
심사청구일자 2016년02월16일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/025321  
(87) 국제공개번호 WO 2012/112160  
국제공개일자 2012년08월23일  
(56) 선행기술조사문헌  
W02008112514 A1\*  
W02006089125 A2\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
후지레비오 다이어그노스틱스, 인코포레이티드  
미국 펜실베이니아 19355-1308 말번 그레이트 밸리  
파크웨이 201
- (72) 발명자  
헬스트롬 잉그거드  
미국 워싱턴주 98105 시애틀 엔이 서버 드라이브  
3925  
헬스트롬 칼-에릭  
미국 워싱턴주 98105 시애틀 엔이 서버 드라이브  
3925  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
장훈

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 이현지

(54) 발명의 명칭 HE4a의 결정을 위해 사용되는 조성물들 및 방법들

(57) 요약

본 발명은 개체에게서 난소암을 평가하는 HE/HE4a 마커들의 용도를 포함한다. 난소암들의 진단, 등급 결정 및 단계 결정하고, 난소암으로 진단되었던 개체의 예후 및 치료 유효도를 결정하기 위해 HE/HE4a 마커를 사용하는 조성물들 및 방법들도 역시 포함된다.

(52) CPC특허분류

*A61K 38/18* (2013.01)  
*A61K 38/19* (2013.01)  
*A61K 39/395* (2013.01)  
*A61K 48/00* (2013.01)  
*C07K 14/435* (2013.01)  
*C07K 14/475* (2013.01)  
*C07K 16/22* (2013.01)  
*C07K 16/24* (2013.01)  
*C07K 16/28* (2013.01)

(72) 발명자

**레이크래프트 존**

미국 캘리포니아주 94517 클레이턴 마운테어 플레  
이스 50

**페르메르 크리스티안**

스웨덴 에스에-42761 베스트라 프뮐룬다 로유르스  
가탄 7

**뢰이예르 에바**

스웨덴 에스에-42668 베스트라 프뮐룬다 스크리바  
레가탄 78

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

삭제

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

개체에서 난소암의 존재에 대해 검색(screening)하기 위해 생물학적 샘플에서 HE-4a 폴리펩타이드의 존재를 검출하는 방법으로서, 상기 방법은 이중-항체 샌드위치 검정으로서 구성되고, HE-4a 폴리펩타이드의 N-WFDC 도메인(여기서, 상기 도메인은 서열번호 17의 아미노산 서열로 이루어진다)에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체가 제1 항체로서 사용되고, HE-4a 폴리펩타이드의 C-WFDC 도메인(여기서, 상기 도메인은 서열번호 19의 아미노산 서열로 이루어진다)에 특이적으로 결합하는 단일클론 항체가 제2 항체로서 사용되고,

상기 방법은 상기 개체로부터 얻은 상기 생물학적 샘플을 상기 제1 항체 및 상기 제2 항체와 접촉시킴을 포함하고, 여기서 상기 샘플이, 상기 샘플에서 상기 제1 항체의 HE-4a 폴리펩타이드의 N-WFDC 도메인으로의 결합 및 상기 샘플에서 상기 제2 항체의 HE-4a 폴리펩타이드의 C-WFDC 도메인으로의 결합을 검출하기에 충분한 시간 및 조건 하에서 접촉되고, 여기서, 기준 수치(reference value)에 비해 증가된 수준의 HE-4a 폴리펩타이드가 난소암의 존재를 나타내는, 방법.

#### 청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 생물학적 샘플이 혈액, 혈청, 장액, 혈장, 림프, 소변, 뇌척수액, 침, 점막 분비물, 질 분비물, 조정된 배양 배지(conditioned culture medium) 또는 세척액(lavage fluid)을 포함하는, 방법.

#### 청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 항체가 이중특이적 항체, 인간화 항체 또는 그들의 항원-결합 단편인, 방법.

#### 청구항 8

제 5항에 있어서,

상기 제1 항체가 고체 지지체 상에 고정된, 방법.

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

제 5항에 있어서,

상기 개체가 난소암에 대해 치료를 받고 있는, 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

- [0001] 본 발명은 난소암의 검출, 진단, 등급 결정, 단계 결정, 예후 판정, 및 난소암이 의심된 및/또는 이를 앓고 있는 개체들의 치료 반응성을 예측하고 모니터링하기 위한 조성물들 및 방법들을 포함한다. 환자들로부터 획득된 시료들에서 전장의 HE4a의 존재를 결정하는 단계에 의해 난소암을 검출하는, 면역검정들, 결합 제제들, 및 항체들 또한 방법들도 역시 기재된다.

### 배경 기술

- [0002] WFDC2 (HE4/HE4a) 유전자 산물은 안정한 4-디설파이드 코아 단백질들의 패밀리의 구성원이다. HE4는 인간 부고환 조직 (인간 부고환 단백질 4; HE4)에서 처음 관찰되었던 분비 및 당화된 단백질이고, 난소암들을 포함하는 소정의 암들에서 과다발현된다. HE4/HE4a 단백질들 및 핵산들의 특성분석이, 예를 들면 Kirchhoff C., Habben I., Ivell R., Krull N. (1992년 3월), "주요 인간 부고환-특이 cDNA는 세포의 단백질분해효소 저해제들과 서열 상동성을 가지는 단백질을 인코딩한다", Biol. Reprod., 45(2): 350-7; Schummer M., Ng W.V., Bumgarner R.E., Nelson P.S., Schummer B., Bednarski D.W., Hassell L., Baldwin R.L., Karlan B.Y., Hood L. (1999년 12월), "난소 암종들에서 과다발현된 유전자들의 발견을 위한 21,500개의 난소 cDNAs 어레이의 비교 혼성화", Gene 238(2): 375-85; Kirchhoff C. (1998년), "부고환 단백질들의 분자적 특성분석", Rev. Reprod. 3(2): 86-95; Kirchhoff C., Osterhoff C., Habben I., et al. (1990년), "인간 부고환에서 특이적으로 발현된 mRNAs의 클로닝 및 분석", Int. J. Androl. 13 (2): 155-67; Hellstrom I, et al, Cancer Res. 2003년 7월 1일, 63(13): 3695-700에서 보고되어 왔다. 암세포들에서 HE4/HE4a의 과다발현은 본 단백질 및 그의 다양한 이소형들이 암을 검출하기 위한 또한 암을 가질 증가된 가능성을 가지는 환자들을 확인하기 위한 유용한 생물마커들이 될 수 있는 점을 제시한다. HE4/HE4a와 같은 분자적 마커들의 사용과 관련된 방법들 및 조성물은 미국 특허 제 7270960호; 미국 특허 제 20100311099호; 미국 특허 제 20080020473호; 미국 특허 제 20070286865호; 미국 특허 제 20100047818호; 제 20090104684호; 및 미국 특허 제 20030108965호를 포함하여 이전에 보고되어 왔으며, 이들 각각의 내용들은 본 명세서에서 그들의 전부가 통합되어 있다.

- [0003] HE/HE4a 단백질들은 대안의 스프라이싱으로 인한 서로 다른 이소형들 뿐만 아니라 서로 다른 양상들의 당화로부터 나온 서로 다른 당형태들 (glycoforms)을 가지는 것으로 보고되었다. 상기에 비추어, 당해 기술분야에서는 암의 진단을 위한 HE4a, 그들의 변이체들, 스프라이싱 이소형들 및 당형태들과 같은 생물마커들의 과다-발현을 검출할 수 있는 조성물들 및 결합 제제들 (예로, 항체들)에 대한 필요성이 있다.

### 발명의 내용

- [0004] 본 발명은 개체에게서 난소암을 진단하기 위한 또한 난소암을 가질 증가된 가능성을 가진 개체들을 확인하기 위한 조성물들 및 방법들을 포함한다. 본 조성물들은 난소 암종 상에서 과다-발현되는 HE/HE4a의 용해성 및 세포 표면 형태들과 특이적으로 결합하는 단일클론 항체들, 그들의 변이체들 및 단편들을 포함한다. 개시된 HE4a 항체의 결합 특징들을 가지는 단일클론 항체들도 역시 제공된다. HE4/HE4a 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주들도 역시 개시된다. 개시된 조성물들은 진단 방법들뿐만 아니라 난소암을 가질 증가된 가능성을 가진 개체들을 확인하기 위한 검색 방법들에서의 용도들을 가진다. 상세하게, 진단 방법들은 면역조직화학 (IHC) 검정법 또는 이중 샌드위치 엘라이자 검정법 (double sandwich ELISA assay)을 포함할 수 있다. 상기 개시된 HE4a 단일클론 항체들의 하나 이상을 포함하는, 본 발명의 방법들을 시행하기 위한 키트들도 역시 제공된다. HE4a 에피토프의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드들 및 항체들의 생산에서 이들 폴리펩타이드들을 사용하는 방법들도 역시 개시된다.

- [0005] 개체에서 난소암을 진단하기 위한 또한 난소암을 가질 증가된 가능성을 가진 개체들을 확인하기 위한 다양한 조성물들 및 방법들이 제공된다. 조성물들은 난소암 세포들에서 과다-발현되는 것으로 관찰된 단백질인 HE/HE4a와 결합할 수 있는 단일클론 항체들을 포함한다. 본 조성물들은 난소 암종 상에서 과다발현되는 HE4/HE4a의 용해성 및 세포 표면 형태들과 특이적으로 결합하는 단일클론 항체들, 그리고 그들의 변이체들 및 단편들을 포함한다. 본 개시의 HE4a 항체의 결합 특징들을 가지는 단일클론 항체들도 또한 제공된다. 본 개시의 단일클론 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주들도 역시 제공된다. 보다 상세하게, HE4a의 N-WFDC 도메인과 결합하는 단일클론 항체들을 생산하는 하이브리도마 세포주들도 역시 제공된다. 기술된 단일클론 항체들을 포함하는 키트들도 역시 기재된다. 본 발명은 HE4a 에피토프의 아미노산 서열들을 포함하는 폴리펩타이드들 및 이들 펩타

이드들을 항체들의 생산에서 사용하는 방법들도 역시 포함한다. 본 조성물들은 개체에서 난소암을 진단하기 위한 "샌드위치" 엘라자 방법들 또는 IHC에서 그리고 난소암을 가질 증가된 가능성을 가진 개체들을 확인하기 위한 검색 방법들의 특정한 용도를 발견하고 있다.

[0006] 한 가지 관점에서, 본 발명은 HE4a와 특이적으로 결합할 수 있는 단일클론 항체를 제공한다. 한 가지 구현예에서, 단일클론 항체는 ECACC에서 특허 기탁번호 제 10091401호로서 기탁된 하이브리도마 세포주 12A2에 의해 생산된다. 또 다른 구현예에서, 단일클론 항체는 ECACC에서 특허 기탁번호 제 (14E2 ECACC No \_\_\_\_ )호로서 기탁된 하이브리도마 세포주 14E2에 의해 생산된다. 또 다른 구현예에서, 단일클론 항체는 서열번호 17의 HE4a N-WFDC (E K T G V C P E L Q A D Q N C T Q E C V S D S E C A D N L K C C S A G C A T F C S L P N D)에서 개시된 아미노산 서열과 결합한다.

[0007] 또 다른 관점에서, 본 발명은 서열번호 HE4a N-WFDC에서 개시된 아미노산 서열과 결합하는 단일클론 항체 및 서열번호 19의 HE4a C-WFDC (K E G S C P Q V N I N F P Q L G L C R D Q C Q V D S Q C P G Q M K C C R N G C G K V S C V T P N F)에서 개시된 아미노산 서열과 결합하는 추가적인 단일클론 항체를 포함하는 난소암을 진단하는 키트를 제공한다. 포획 항체로서 제 1의 HE4a 항체인, 고체 지지체 상에 고정된 포획 항체; 및 태그 항체로서 검출가능한 물질로 표지된 제 2의 HE4a 항체:를 포함하는 키트로서, 상기 제 1의 또는 상기 제 2의 HE4a 항체가 단일클론 항체로서 ECACC에 특허 기탁번호 제 (14E2 ECACC No\_\_\_\_)호로서 기탁된 하이브리도마 세포주 14E2에 의해 생산되고 및/또는 서열번호 17의 HE4a N-WFDC (E K T G V C P E L Q A D Q N C T Q E C V S D S E C A D N L K C C S A G C A T F C S L P N D)에서 개시된 아미노산 서열과 결합하는 단일클론 항체인, 환자에게서 난소암을 진단하는 키트도 역시 제공된다.

[0008] 본 개시는 동물을 면역 반응을 나타내는 조건들 하에서 폴리펩타이드로 면역접종하는 단계로서, 폴리펩타이드는 서열번호 1, 3 및 5에서 개시된 아미노산 서열 (HE4a; HE4a V2; HE4a-V4) 및 그의 변이체들을 포함하는 단계; 상기 동물로부터 항체-생산 세포들을 분리하는 단계; 상기 항체-생산 세포들을 배양된 불멸화 세포들과 융합하여 단일클론 항체-생산 하이브리도마 세포들을 형성하는 단계; 상기 하이브리도마 세포들을 배양하는 단계; 배양액으로부터 단일클론 항체들을 분리하는 단계:를 포함하는, HE4a 단일클론 항체를 생산하는 방법도 역시 제공된다.

[0009] 본 개시는 (a) HE4a의 N-WFDC 도메인; (b) 서열번호 1 HE4a에 의해 인코딩되는 아미노산 서열과 결합하는 HE4a 결합 제제도 역시 제공한다. 한 가지 구현예에서, 결합 제제는 항-HE4a 항체 또는 HE4a 항원-결합 단편이다. 심화 구현예에서, 결합 제제는 HE4a N-WFDC (서열번호 17)와 선택적으로 결합한다. 보다 또 다른 구현예에서, 결합 제제는 다중클론, 단일클론, 이중특이적, 키메라 또는 인간화 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다. 또 다른 구현예에서, 결합 제제는 검출가능한 마커로 표지된다.

[0010] 본 발명은 ECACC에서 특허 기탁번호 제 10091401호로서 기탁된 하이브리도마 세포주 12A2에 의해 생산된 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 90%의 일치도를 가지는 정제된 아미노산 서열도 역시 포함한다.

[0011] 또 다른 관점에서, ECACC에서 특허 기탁번호 제 14E2 ECACC호로서 기탁된 하이브리도마 세포주 14E2에 의해 생산된 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 90%의 일치도를 가지는 정제된 아미노산 서열이 제공된다.

[0012] 본 개시는 a) 시료로부터 얻은 핵산을 전방 및 역방 프라이머를 포함하는 프라이머 세트와 증폭시키는 단계로서, 상기 프라이머 세트들은 서열번호 21 (V4F) 및 서열번호 23 (V4R), 서열번호 25 (V2F) 및 서열번호 27 (V2R)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 단계; b) 상기 증폭된 핵산을 분리하는 단계:를 포함하는, HE4a 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산 서열을 획득하는 방법도 역시 포함한다.

[0013] 본 발명은 결합 단백질의 아미노산 서열이 ECACC에서 특허 기탁번호 제 10091401호로서 기탁된 하이브리도마 12A2 또는 ECACC에서 특허 기탁번호 제 14E2 ECACC호로서 기탁된 세포주 14E2에 의해 생산된 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 90%의 일치도를 가지고, 서열번호 17의 HE4a N-WFDC (E K T G V C P E L Q A D Q N C T Q E C V S D S E C A D N L K C C S A G C A T F C S L P N D)에서 개시된 아미노산 서열과 결합하는, 서열번호 17의 HE4a N-WFDC의 서열과 결합하는 결합 단백질을 인코딩하는 분리된 핵산 분자도 역시 포함한다.

[0014] 또 다른 관점에서, 서열번호 17의 HE4a N-WFDC의 서열과 결합하는 결합 단백질을 인코딩하는 분리된 핵산 분자를 포함하는 벡터들 및 숙주 세포들이 제공된다.

[0015] 본 개시는 서열번호 17의 HE4a N-WFDC의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 수용체 폴리펩타이드와 접합된 이중유래

HE4a 폴리펩타이드를 포함하는 분리된 융합 단백질도 역시 제공한다. 한 가지 구현예에서, 분리된 융합 단백질은 서열번호 29 (W1F); 서열번호 31 (W1R); 서열번호 33 (W2F); 서열번호 35 (W2R)에 의해 인코딩된 프라이머들을 사용한 핵산 증폭에 의해 획득된다. 또 다른 구현예에서, 융합 단백질은 스프라이싱 변이체인 이중유래 HE4a 항원 폴리펩타이드를 포함한다.

[0016] 본 발명은 시료에서 용해성 형태로 자연적으로 생기고 항원성 결정기와 항체의 결합을 검출하기에 충분한 조건들 하에서 일정 시간 동안, 적어도 하나의 항체와 반응하는 항원성 결정기를 가지는 분자의 생물학적 시료에서의 존재를 결정하도록 개체로부터 얻은 생물학적 시료를 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 적어도 하나의 항체와 접촉시키는 단계; 및 다음으로 난소암의 존재를 검출하는 단계:를 포함하는, 개체에게서 난소암의 존재에 대해 확인하는 방법도 역시 포함한다. 한 가지 구현예에서, 생물학적 시료는 혈액, 혈청, 장액, 혈장, 림프, 소변, 뇌척수액, 침, 점막 분비물, 질 분비물, 복수액, 흉막액, 심장막액, 복막액, 복강액, 배양 배지, 조정된 배양 배지 및 세척액으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0017] 본 개시는 또한 항원성 결정기와 항체의 결합을 검출하기에 충분한 조건들 하에서 일정 시간 동안, 적어도 하나의 항체와 반응하는 항원성 결정기를 가지는 세포 표면 분자의 생물학적 시료에서의 존재를 결정하도록 개체로부터 얻은 세포를 포함하는 생물학적 시료를 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 적어도 하나의 항체와 접촉시키는 단계; 및 다음으로 난소암의 존재를 검출하는 단계:를 포함하는, 개체에게서 난소암의 존재에 대해 확인하는 방법을 제공한다. 한 가지 구현예에서, 항체는 검출가능하게 표지된다. 또 다른 구현예에서, 항체는 검출가능하게 표지되지 않고, 항원성 결정기와 항체의 결합의 검출은 간접적이다.

[0018] 본 발명은 HE4a 항원 폴리펩타이드와 제 1의 항체를 특이적으로 결합시키고 이에 의해 면역 복합체를 형성하기에 충분한 조건들 하에서 일정 시간 동안, 시료에서 분자의 존재를 결정하도록 개체로부터 얻은 생물학적 시료를 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 적어도 하나의 고정된 제 1의 항체와 접촉시키는 단계; 상기 제 1의 항체와 특이적으로 결합하지 않는 시료의 성분들을 제거하는 단계; 및 상기 면역 복합체를 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 적어도 하나의 제 2의 항체와 접촉시키는 단계:를 포함하는 방법으로서, 상기 제 2의 항체의 항원 조합 부위가 HE4a 항원 폴리펩타이드와 제 2의 항체의 특이적 결합을 검출하기에 충분한 조건들 하에서 일정 시간 동안, 상기 고정된 제 1의 항체의 항원 조합 부위를 경쟁적으로 저해하지 않고, 따라서 난소암의 존재를 검출하는 단계를 포함하는, 개체에게서 난소암의 존재에 대해 확인하는 방법도 역시 포함한다. 한 가지 구현예에서, 고정된 제 1의 항체는 12A2, 14E2, 2H5 및 3D8로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 한 가지 구현예에서, 제 2의 항체는 12A2, 14E2, 2H5 및 3D8로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 또 다른 구현예에서, 고정된 제 1의 항체는 14E2이다. 보다 또 다른 구현예에서, 제 2의 항체는 12A2이다.

[0019] 개체로부터 얻은 테스트 시료에서 HE4a 항원을 검출하는 단계; 상기 테스트 시료를 항체/항원 복합체들의 형성에 충분한 조건들 하에서 일정 시간 동안 HE4a N-WFDC와 결합하는 항원결합 도메인을 가지는 항체와 접촉시키는 단계; 및 상기 복합체들의 존재를 디스플레이 상에서 검출하는 단계로서, 테스트 시료에서 HE4a의 존재를 나타내는 복합체들의 존재가 난소암의 존재와 상관되는 단계:를 포함하는, 난소암을 가진 개체를 진단하는 방법도 역시 기재된다. 한 가지 구현예에서, 항체는 HE4a의 N-WFDC 아미노산들과 결합하는 항원-결합 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 ECACC에 특허 기탁번호 제 10091401호로서 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체이다.

[0020] 본 발명은 개체로부터 얻은 테스트 시료에서 HE4a 항원을 검출하는 단계; 상기 테스트 시료를 제 1의 항체/항원 복합체들의 형성에 충분한 조건들 하에서 일정 시간 동안 HE4a의 N-WFDC 아미노산들과 결합하는 항원결합 도메인을 가지는 제 1의 항체와 접촉시키는 단계; 상기 제 1의 항체/항원 복합체들에 결합체를 첨가하는 단계로서, 상기 결합체는 제 1의 항체/항원/제 2의 항체 복합체들을 형성하기에 충분한 조건들 하에서 일정 시간 동안, 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 신호 생성 화합물과 부착된 제 2의 항체를 포함하는 단계; 및 상기 신호 생성 화합물에 의해 생성된 신호의 존재를 디스플레이 상에서 검출하는 단계로서, 상기 테스트 시료에서 HE4a 항원의 존재를 나타내는 신호의 존재가 난소암의 존재와 상관되는 단계:를 포함하는, 난소암을 가진 개체를 진단하는 방법도 역시 포함한다. 한 가지 구현예에서, 항체는 HE4a의 N-WFDC 아미노산들과 결합하는 항원-결합 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 ECACC에 특허 기탁번호 제 10091401호로서 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체이다.

[0021] 본 개시는 개체로부터 얻은 테스트 시료에서 HE4a 항원을 검출하는 단계; 상기 테스트 시료를 항체/항원 복합체들의 형성에 충분한 조건들 하에서 일정 시간 동안 HE4a N-WFDC와 결합하는 항원결합 도메인을 가지는 항체와 접촉시키는 단계; 및 상기 복합체들의 존재를 디스플레이 상에서 검출하는 단계로서, 상기 테스트 시료에서



HE4a 항원의 존재를 나타내는 복합체들의 존재가 난소암의 단계들과 상관되는 단계:를 포함하는, 난소암을 가진 개체에 대한 예후 판정의 방법도 역시 포함한다. 한 가지 구현예에서, 항체는 HE4a의 N-WFDC 아미노산들과 결합하는 항원-결합 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 ECACC에 특허 기탁번호 제 10091401호로서 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체이다.

[0022] 본 발명은 개체로부터 얻은 테스트 시료에서 HE4a 항원을 검출하는 단계; 상기 테스트 시료를 제 1의 항체/항원 복합체들의 형성에 충분한 조건들 하에서 일정 시간 동안 HE4a의 N-WFDC 아미노산들과 결합하는 항원결합 도메인을 가지는 제 1의 항체와 접촉시키는 단계; 상기 제 1의 항체/항원 복합체들에 결합체를 첨가하는 단계로서, 상기 결합체는 제 1의 항체/항원/제 2의 항체 복합체들을 형성하기에 충분한 조건들 하에서 일정 시간 동안, 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 신호 생성 화합물과 부착된 제 2의 항체를 포함하는 단계; 및 상기 신호 생성 화합물에 의해 생성된 신호의 존재를 디스플레이 상에서 검출하는 단계로서, 상기 테스트 시료에서 HE4a 항원의 존재를 나타내는 신호의 존재가 난소암의 단계들과 상관되는 단계:를 포함하는, 난소암을 가진 개체에 대한 예후 판정의 방법도 역시 포함한다. 한 가지 구현예에서, 항체는 HE4a의 N-WFDC 아미노산들과 결합하는 항원-결합 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 ECACC에 특허 기탁번호 제 10091401호로서 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체이다.

[0023] 개체로부터 얻은 테스트 시료에서 HE4a 항원을 검출하는 단계; 상기 테스트 시료를 항체/항원 복합체들의 형성에 충분한 조건들 하에서 일정 시간 동안 HE4a N-WFDC와 결합하는 항원결합 도메인을 가지는 항체와 접촉시키는 단계; 및 상기 복합체들의 존재를 디스플레이 상에서 검출하는 단계로서, 상기 테스트 시료에서 HE4a 항원의 존재를 나타내는 복합체들의 존재가 치료에 대한 반응성과 상관되는 단계:를 포함하는, 난소암의 치료를 받는 개체를 모니터링하는 방법도 역시 기재된다. 한 가지 구현예에서, 항체는 HE4a의 N-WFDC 아미노산들과 결합하는 항원-결합 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 ECACC에 특허 기탁번호 제 10091401호로서 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체이다.

[0024] 본 개시는 또한 개체로부터 얻은 테스트 시료에서 HE4a 항원을 검출하는 단계; 상기 테스트 시료를 제 1의 항체/항원 복합체들의 형성에 충분한 조건들 하에서 일정 시간 동안 HE4a의 N-WFDC 아미노산들과 결합하는 항원결합 도메인을 가지는 제 1의 항체와 접촉시키는 단계; 상기 제 1의 항체/항원 복합체들에 결합체를 첨가하는 단계로서, 상기 결합체는 제 1의 항체/항원/제 2의 항체 복합체들을 형성하기에 충분한 조건들 하에서 일정 시간 동안, 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 신호 생성 화합물과 부착된 제 2의 항체를 포함하는 단계; 및 상기 신호 생성 화합물에 의해 생성된 신호의 존재를 디스플레이 상에서 검출하는 단계로서, 상기 테스트 시료에서 HE4a 항원의 존재를 나타내는 신호의 존재가 치료에 대한 반응성과 상관되는 단계:를 포함하는, 난소암의 치료를 받는 개체를 모니터링하는 방법을 제공한다. 한 가지 구현예에서, 항체는 HE4a의 N-WFDC 아미노산들과 결합하는 항원-결합 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 ECACC에 특허 기탁번호 제 10091401호로서 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 단일클론 항체이다.

[0025] 본 발명은 개체로부터 획득된 테스트 난소 조직 시료를 서열번호 HE4에 개시된 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하는 항체와 접촉시키는 단계; 상기 테스트 난소암 조직 시료에서 상기 폴리펩타이드와 결합하는 항체의 양을 검출하는 단계; 및 상기 테스트 난소암 조직 시료에서 상기 폴리펩타이드와 결합하는 항체의 양을 선결정된 컷오프 수치와 비교하는 단계를 포함하는 방법으로서, 상기 테스트 난소암 조직 시료에서 상기 폴리펩타이드와 결합하는 항체의 양이 선결정된 컷오프 수치를 초과할 때 테스트 난소암 조직 시료는 난소암에 대해 양성이고, 이에 의해 개체에서 난소암의 존재 또는 부재를 검출하는 단계를 포함하는, 환자에게서 난소암의 존재 또는 부재를 검출하는 방법도 역시 제공한다. 한 가지 구현예에서, 테스트 난소암 조직 시료에서 상기 폴리펩타이드와 결합하는 항체의 양은 면역조직화학을 사용하여 결정된다.

[0026] 본 명세서에서 기재된 방법들은 기술된 바와 같은 단백질들의 "4개-디설파이드 코아" 패밀리 구성인인 HE4/HE4a에 관한 것이다. 단백질들의 "4개-디설파이드 코아" 패밀리는 분지된 기능의 산- 및 열-안정한 소분자들의 불균질한 그룹을 포함하고, 인간 부고환 4개-디설파이드 코아 단백질, 또는 "HE4"를 포함하는 것이다 (Kirchhoff et al., 1991 Biol. Reprod. 45: 350-357; Wang et al., 1999 Gene 229: 101; Schummer et al., 1999 Gene 238: 375). HE4 cDNA는 인간 부고환으로부터 처음 분리되었고 (Kirchhoff et al., 1991 Biol. Reprod. 45: 350-357), 이후 HE4 cDNA는 난소 암종으로부터 제작된 cDNA 라이브러리들에서 높은 빈도로 검출되었다 (Wang et al., 1999 Gene 229: 101; Schummer et al., 1999 Gene 238: 375). HE4a의 개정된 서열이 Hellstrom et al., 2003, Canc. Res. 63: 3695-3700 및 미국 특허 제 7,270,960호에 기재되었다. HE4a는 이전의 출판물들에서 HE4라고 언급되었던 분자의 유추된 서열과 매우 유사하지만 이와는 구별되는 아미노산 서열을

나타낸다.

[0027] HE4 단백질의 많은 이소형들이 하기 표 1에서 상술된 바와 같이 보고되어 왔다. 당업자라면 본 개시의 HE4/HE4a 단일클론 항체가 각 이소형이 특정한 HE4/HE4a 항체의 적절한 에피토프 서열을 포함하는 한 하나 이상의 HE4 이소형과 결합할 수 있는 점을 인정할 것이다. 하기 표 1은 HE4 이소형들을 나타낸다.

**표 1**

HE4 이소형	기탁번호	서열 확인번호
1	NP_006094	서열번호 1
2	AAL37488	서열번호 3
3	AAL37487	서열번호 5
4	AAL37486	서열번호 7
5	AAL37485	서열번호 9
6	AAH46106	서열번호 11
7	AAO52683	서열번호 13
8	CAA44869	서열번호 15

[0028]

[0029] 본 명세서에서 사용되는 바, "개체"는 치료, 관찰 또는 실험의 목적이 되는 동물을 말한다. "동물"은 어류, 갑각류, 파충류 및 상새하계는 포유동물들과 같은 냉온 및 향온 척추동물들 및 무척추동물들을 포함한다. "포유동물"은 제한되지 않고도, 마우스, 래트들, 토끼들, 기니아 피그들, 개들, 고양이들, 양들, 염소들, 소들, 말들, 원숭이들, 침팬지들, 및 유인원들과 같은 영장류, 그리고 인간들을 포함한다.

[0030] 본 명세서에서 기재된 방법들은 소정의 암들을 가진 개체들에서 이러한 폴리펩타이드들의 증가된 수준들을 포함하는, 개체들에서 자연적으로 생기는 HE4a의 세포 표면 및/또는 용해성 형태들의 검출을 위한 조성물들 및 방법들도 역시 포함한다. 따라서, 본 개시는 이러한 세포 표면 및/또는 용해성 HE4a 폴리펩타이드들의 특이적 검출에 의해 개체에게서 악성 병태 (예로, 난소암)의 검출 및 진단에 유용한 조성물들 및 방법들을 제공한다.

[0031] 전장의 HE4a 항원의 결정을 위한 면역검정법들 및 단일클론 항체들의 생성의 설계, 또한 난소암의 혈청학적 진단, HE4a의 조직 분석에 의한 질환의 임상적 경과의 감시 및 난소암의 진단을 위한 면역검정법들 및 단일클론 항체들의 용도도 역시 제공된다. HE4a N-WFDC 도메인에 특이적인 에피토프들에 대한 새로운 단일클론 항체들의 확립, 및 이들 항체들을 HE4a C-WFDC 도메인에 대한 항체들과의 조합은 전장 HE4a의 결정을 위한 특이적 검정법들을 설계하는 것을 가능하게 하였다.

[0032] 본 명세서에서 기재된 방법들에 따르면, 인간 HE4a 항원 폴리펩타이드 (또는 HE4a 폴리펩타이드)는 개체 또는 생물학적 출처로부터 얻은 생물학적 시료에서 검출될 수 있다. 생물학적 시료들은 개체 또는 생물학적 출처로부터 얻은 혈액 시료, 생검 표본, 조직 체외이식편, 기관 배양, 생물학적 체액 또는 기타 다른 조직 또는 세포 조제물을 획득하여 제공될 수 있다. 개체 또는 생물학적 출처는 인간 또는 비-인간 동물, 일차 세포 배양 또는 이에 제한되는 것은 아니지만 염색체로 통합된 또는 에피솜 재조합 핵산 서열들을 포함할 수 있는 유전적으로 조작된 세포주들, 불멸화 또는 불멸화가능한 세포주들, 체세포 하이브리드 세포주들, 분화된 또는 분화가능한 세포주들, 형질전환된 세포주들 등을 포함하는 배양 적용된 세포주일 수 있다. 본 명세서에서 기재된 방법들의 소정의 구현예들에서, 개체 또는 생물학적 출처는 난소암을 가질 것으로 의심되거나 이를 가질 위험성이 있을 수 있다.

[0033] 일정 구현예들에서, 생물학적 시료는 개체 또는 생물학적 출처로부터 얻은 적어도 하나의 세포를 포함하고, 다



른 구현예들에서, 생물학적 시료는 또 다른 종양 마커를 포함하는 생물학적 체액이다. 생물학적 체액들은 전형적으로 생리학적인 온도들에서 액체들이고 개체 또는 생물학적 출처에 존재하거나, 이로부터 나오거나, 이로부터 발견되거나 다른 경우라면 이로부터 추출되는 자연적으로 생기는 체액들을 포함할 수 있다. 소정의 생물학적 체액들은 특정한 조직들, 기관들 또는 정작된 부위들로부터 유래하고, 소정의 다른 생물학적 체액들은 더욱 포괄적으로 또는 전신적으로 개체 또는 생물학적 출처에 위치될 수 있다. 생물학적 체액들의 비제한적인 예들은 혈액, 혈청 및 장액들, 혈장, 림프, 소변, 척수액, 침, 장액들, 혈장, 림프, 분비 조직들 및 기관들의 점막 분비물들, 질 분비물들, 유방 밀크, 눈물들을 포함하고, 비-고형 종양들과 연관된 체액들과 같은 복수액들도 역시 적합하다. 추가적인 예들로는 흉막, 심장막, 복막, 복강 및 기타 체강들 등의 체액들을 포함한다. 생물학적 체액들은 또한 개체 또는 생물학적 출처와 접촉되는 액체 용액들, 예를 들면 세포 또는 기관 조정된 배지를 포함하는 세포 및 기관 배양 배지, 세척액들 등을 포함할 수 있다. 다른 구현예들에서, 생물학적 시료는 혈액 혈청, 혈장, 또는 원심분리된 소변의 상청액과 같은 무-세포 액체 용액이다.

[0034] 소정의 다른 구현예들에서, 생물학적 시료는 미가공 세포를 포함하고, 소정의 다른 바람직한 구현예들에서, 생물학적 시료는 HE4a 항원 폴리펩타이드 또는 그의 단편 또는 변이체를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 세포 추출물을 포함한다. 본 명세서에서 기재된 방법들의 보다 다른 구현예들에서, 세포들은 분석을 위해 세포 내용물들을 제공하도록 검정하기 이전에 물리적으로 또는 화학적으로 파쇄되거나 용해된다.

[0035] 본 명세서에서 사용되는 바, 시료에서 "용해성 형태로 자연적으로 생기는 분자"는 용해성 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드, 아미노산, 또는 그의 유도체; 지질, 또는 지방산 등, 또는 그의 유도체; 탄수화물, 또는 당류 등 또는 그의 유도체; 핵산, 뉴클레오타이드, 뉴클레오사이드, 퓨린, 피리미딘 또는 관련 분자, 또는 그의 유도체 등; 또는 예를 들면 당단백질, 당지질, 지질단백질, 단백질지질과 같은 그들의 조합이라면 모두; 또는 본 명세서에서 제공된 바와 같은 생물학적 시료의 용해성 또는 무-세포 성분인 기타 다른 생물학적 분자일 수 있다. "용해성 형태로 자연적으로 생기는 분자"는 또한 본 명세서에서 제공된 바와 같은 생물학적 체액을 포함하는, 용액에 있거나 생물학적 시료에 존재하며, 미가공 세포의 표면에 결합되지 않은 분자를 말한다. 예를 들면, 용해성 형태로 자연적으로 생기는 분자는 용질에 제한될 필요는 없지만, 거대분자 복합체의 성분; 세포로부터 유출되거나, 분비되거나, 운반되는 물질; 콜로이드; 마이크로입자 또는 나노입자 또는 기타 미세한 현탁 입자; 등을 포함할 수 있다.

[0036] 개체에서 악성 병태 (예로, 난소암)의 존재는 개체에서, 예를 들면 신생형성, 종양, 비-접촉 저해된 또는 종양 원유전자로 형질전환된 세포들 등을 포함하는, 이형성, 암성 및/또는 형질전환된 세포들의 존재를 말한다. 제한 없이 설명하자면, 본 명세서에서 기재된 방법들의 맥락에서 악성 병태는 또한 HE4a 항원 폴리펩타이드 (또는 HE4a 폴리펩타이드)의 증가된 수준들이 개체로부터 얻은 생물학적 시료에서 검출가능한 방식으로 이러한 폴리펩타이드를 분비하거나, 유출하거나, 운반하거나, 방출할 수 있는 암 세포들의 개체에서의 존재를 말할 수 있다. 일정 구현예들에서, 예를 들면 이러한 암 세포들은 암종 세포들과 같은 악성 상피세포들이고, 일정 구현예들에서 이러한 암 세포들은, 예를 들면 흉막 내층, 심장막, 복막, 복강, 및 기타 체강들에서 발견되는 편평세포 상피 또는 중피 세포들의 형질전환된 변이체들인 악성 중피종 세포들이다.

[0037] 한 가지 구현예에서, 난소암의 존재를 의미하는 존재인 난소 종양 세포들은 일차 및 전이성 난소암 세포들을 포함할 수 있다. 악성을 분류하는 판정기준들은 일차 및 전이성 종양들로부터 나온 인간 난소 암종 세포주들의 확립 및 특성분석과 같이 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다. 다른 구현예들에서, 본 개시는 악성 병태가 중피종, 췌장 암종, 비-소세포 폐 암종, 또는 편평세포 암종들 및 샘암종들과 같은 다양한 암종들이라면 모두를 포함하고, 육종들 및 혈액학적 암들 (예로, 백혈병들, 림프종들, 골수종들 등)도 역시 포함하는 다른 형태의 암일 수 있는 점도 역시 참작한다. 이들 및 기타 악성 병태들의 분류는 당해 기술분야와 친숙한 당업자들에게 숙지되어 있고, 본 개시는 부당한 실험법이 없이도 이러한 악성 병태에서 HE4a 폴리펩타이드의 존재의 결정을 제공한다.

[0038] 기준 수치들이 본 명세서에서 포함된 실시예들에서 제공된다. 이러한 수치들은 본 명세서에서 기재된 방법들의 실행에 적합하다. 그러나 본 명세서에서 기재된 방법들의 사용이 이들 기준 수치들 또는 해당 데이터에 제한되지 않는 점을 주목해야 한다. 당업자들이라면 그들의 특정한 필요들을 위해 기준 수치를 획득할 수 있다. 이러한 기준 수치는 환자들이 악성일 것으로 의심된 난소암 종괴들에 대한 생검 절차들을 받을 때 환자들에서 HE4 발현을 분석하여 획득될 수 있다. 이러한 기준 수치들을 획득하는 방법들은 실시예들에서 제공된다. 또한, 다른 기준 수치들은 환자들의 특이적 카테고리들에 중점을 두도록 획득될 수 있다. 이러한 카테고리들은 연령, 유전적 배경, 암의 위험성, 의학적인 병력, 혈액형, 체중과 같은 신체적 특징들 및 기타 카테고리들을 포함할 수

있을 것으로 예측된다.

[0039] 본 명세서에서 제공되는 바, 개체에게서 악성 병태의 존재에 대해 확인하는 방법은 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 항체 또는 HE4a 폴리펩타이드에 특이적인 항체를 적용할 수 있다. HE4a 항원 폴리펩타이드 (또는 HE4a 폴리펩타이드)에 특이적인 항체들은 단일클론 항체들로서 또는 다중클론 항체들로서 바로 생성되거나, 당해 기술분야에서 잘 알려져 있는 방법들을 사용하여 원하는 특성들을 가지도록 설계된 유전적으로 조작된 면역글로불린들 (IgG)로서 생산될 수 있다. 예를 들어 제한 없이 설명하자면, 항체들은 재조합 IgGs, 면역글로불린 유래된 서열들을 가지는 키메라 융합 단백질들 또는 본 명세서에서 기재된 방법들에 따라 인간 HE4a 폴리펩타이드의 검출을 위해 사용될 수 있는 "인간화" 항체들 (예로, 미국 특허 제 5,693,762호; 제 5,585,089호; 제 4,816,567호; 제 5,225,539호; 제 5,530,101호를 참조하라)을 포함할 수 있다. 이러한 항체들은, 하기 기술된 바와 같은 HE4a 폴리펩타이드들로의 면역접종에 의한 것을 포함하여, 본 명세서에서 제공된 바와 같이 제조될 수 있다. 예를 들면, HE4a 폴리펩타이드들을 인코딩하는 핵산 서열들은 기재되어 있어, 당업자들이라면 면역원들로서 사용을 위해 이들 폴리펩타이드들을 일상적으로 제조할 수 있다. 예를 들면, 하기에 보다 자세하게 기술되는 12A2, 14E2, 2H5, 및 3D8과 같은 단일클론 항체들은 본 명세서에서 기재된 방법들에 따라 소정의 방법들을 실행하는 데 사용될 수 있다.

[0040] 용어 "항체들"은 HE4a 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하는 분자들인, 다중클론 항체들, 단일클론 항체들, F(ab')<sub>2</sub>, 및 Fab 단편들과 같은 그들의 단편들, 뿐만 아니라 자연적으로 생기거나 제조함으로써 생산된 결합 파트너들을 포함한다. 항체들은 HE4a 폴리펩타이드와 약  $10^4 \text{ M}^{-1}$  이상 또는 동등의, 바람직하게는 약  $10^5 \text{ M}^{-1}$  이상 또는 동등의, 더욱 바람직하게는 약  $10^6 \text{ M}^{-1}$  이상 또는 동등의, 보다 더 바람직하게는 약  $10^7 \text{ M}^{-1}$  이상 또는 동등의  $K_a$ 로 결합하는 경우 "면역특이적" 또는 특이적으로 결합하는 것으로 정의된다. 결합 파트너들 또는 항체들의 친화도들은 통상적인 기법들을 사용하여 바로 결정될 수 있다. HE4a 폴리펩타이드의 결합 파트너들로서 다른 단백질의 결정은 다른 단백질들 또는 폴리펩타이드들과 특이적으로 상호작용하는 단백질들을 확인하고 획득하는 많은 기지의 방법들이라면 모두, 예를 들면 미국 특허 제 5,283,173호 및 미국 특허 제 5,468,614호에서 기술된 바와 같은 예를 들면 효모 이중-하이브리드 검색 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 본 명세서에서 기술된 방법들은 HE4a 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하는 결합 파트너들 및 항체들을 제조하도록 HE4a 폴리펩타이드, 및 HE4a 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 기초로 하는 펩타이드들의 사용도 역시 포함한다.

[0041] 항체들은 일반적으로 당업자들에게 숙지되어 있는 다양한 기법들이라면 모두에 의해 제조될 수 있다. 한 가지 이러한 기법에서, HE4a 폴리펩타이드를 포함하는 면역원, 예를 들면 그의 표면 상에 HE4a 폴리펩타이드를 가지는 세포 또는 분리된 HE4a 폴리펩타이드는 적합한 동물 (예로, 마우스, 래트들, 토끼들, 양들 및 염소들) 내로, 바람직하게는 한 번 이상의 추가 자극 면역접종들을 도입한 선결정된 스케줄에 따라 초기에 주입되고, 동물들은 정기적으로 채혈된다. 다음으로 HE4a 폴리펩타이드에 특이적인 다중클론 항체들이, 예를 들면 적합한 고체 지지체와 결합된 폴리펩타이드를 사용하는 친화 크로마토그래피에 의해 이러한 항체들로부터 정제될 수 있다.

[0042] HE4a 폴리펩타이드 또는 그의 변이체들에 특이적인 단일클론 항체들은 당업자에게 알려진 기법이라면 모두에 의해 제조될 수 있다. 예를 들면, 이들 방법들은 원하는 특이도를 가진 항체들을 생산할 수 있는 불멸화 세포주들의 제조가 관여할 수 있다. 이러한 세포주들은, 예를 들면 상기 기술된 바와 같이 면역접종된 동물로부터 획득된 비장 세포들로부터 생산될 수 있다. 다음으로 비장 세포들은, 예를 들면 면역접종된 동물과 유전적 동계인 것과 같은 골수종 세포 융합 파트너에 의해 불멸화된다. 예를 들면, 비장 세포들 및 골수종 세포들은 폴리에틸렌 글리콜과 같은 막 융합 촉진제 또는 비이온성 계면활성제로 수분 동안 조합된 다음 골수종 세포들을 제외한 하이브리드 세포들의 성장을 지원하는 선택 배지 상에 낮은 밀도로 도말될 수 있다. 선별 기법의 예로서 HAT (하이포산틴, 아미노프테린, 티미딘) 선별을 사용한다. 충분한 시간, 보통 약 1 내지 2주 이후에, 하이브리드들의 콜로니들이 관찰된다. 단일 콜로니들이 선택되고 폴리펩타이드에 대한 결합 활성을 위해 테스트된다. 높은 반응도 및 특이도를 가지는 하이브리도마들이 바람직하다. HE4a 폴리펩타이드와 특이적으로 결합하는 단일클론 항체들을 생성하는 하이브리도마들이 본 명세서에서 기술된 방법들에 의해 고찰된다.

[0043] 단일클론 항체들이 성장하는 하이브리도마 콜로니들의 상층액들로부터 분리될 수 있다. 또한, 마우스 또는 기타 적합한 숙주와 같은 적합한 척추동물 숙주의 복강 내로 하이브리도마 세포주들의 주입과 같은 다양한 기법들이 수율을 증진하도록 적용될 수 있다. 다음으로 단일클론 항체들이 복수액 또는 혈액으로부터 수확될 수 있다. 오염물들이 크로마토그래피, 젤 여과법, 침전법, 및 추출법과 같은 통상적인 기법들에 의해 항체들로부터 제거될 수 있다. 예를 들면, 항체들은 표준 기법을 사용하는 고정된 프로테인 G 또는 프로테인 A 상의 크로마토그

래피에 의해 정제될 수 있다.

[0044] 소정의 구현예들에서는, 항체들의 항원-결합 단편들의 용도가 사용될 수 있다. 이러한 단편들로는 표준 기법들을 사용하여 (예로, Fab 및 Fc 단편들을 수득하도록 파파인으로 소화에 의해) 제조될 수 있는 Fab 단편들을 포함한다. Fab 및 Fc 단편들은 표준 기법들을 사용하여 친화 크로마토그래피 (예로, 고정된 단백질 A 컬럼 상에서)에 의해 분리될 수 있다. 이러한 기법들은 당해 기술분야에서 잘 알려져 있고, 예로 Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston를 참조하라.

[0045] 소정의 관점들에서, HE4a 융합 단백질들이 제공된다. 다양한 효과기 단백질들을 인코딩하는 서열들과 프레임에 맞추어 연결된 DNA 서열들에 의해 인코딩된 면역글로불린 V-영역 도메인들의 덕분에 미리-선택된 항원들에 대한 특이적 결합 친화도들을 가지는 다중기능성 융합 단백질이, 예를 들면 유럽 특허 제 EP-B1-0318554호, 미국 특허 제 5,132,405호, 미국 특허 제 5,091,513호 및 미국 특허 제 5,476,786호에서 기재된 바와 같이, 당해 기술분야에서 숙지되어 있다. 이러한 효과기 단백질들은, 제한되는 것은 아니지만 바이오틴 모사체 서열, 검출가능한 표지 분체와의 직접적인 공유적 변형, 특이적 표지된 리포터 분자와의 비공유 결합, 검출가능한 기질의 효소적 변형 또는 고체상 지지체 상의 고정화 (공유 또는 비공유)을 포함하는, 당업자들과 친숙한 다양한 기법들이라면 모두에 의해 융합 단백질의 결합을 검출하는 데 사용될 수 있는 폴리펩타이드 도메인들을 포함한다.

[0046] 본 명세서에서 기재된 방법들에서 용도를 위한 단일 사슬 항체들은 파지 디스플레이와 같은 방법에 의해 (예로, 미국 특허 제 5,223,409호를 참조하라) 생성되고 선별될 수도 역시 있다. 간략하게, 본 방법에서 DNA 서열들은 M13과 같은 필라멘트성 파지의 유전자 III 또는 유전자 VIII 내로 삽입될 수 있다 (McLafferty, M. A., Kent, K. A., Ladner, R. C. & Markland, W. *Gene* 128, 29-36 (1993); Scott J.K., Smith G.P. Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science*. 1990 Jul 27;249(4967): 386-390; Smith G.P., Scott J.K. Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol.* 1993; 217: 228-257). 삽입된 DNA 서열들은 무작위로 생성될 수 있거나 HE4a 폴리펩타이드와의 결합을 위해 기지의 결합 도메인의 변이체들일 수 있다. 삽입된 서열에 의해 인코딩된 펩타이드는 박테리오파지의 표면 상에서 전시된다. HE4a 폴리펩타이드의 결합 도메인을 발현하는 박테리오파지는 고정된 HE4a 폴리펩타이드, 예를 들면 당해 기술분야에서 잘 알려진 방법들 및 본 명세서에서 기재된 핵산 코딩 서열들을 사용하여 제조된 재조합 폴리펩타이드와의 결합에 의해 선별된다. 미결합 파지는, 전형적으로 염이 없거나 낮은 염 농도로 10 mM 트리스, 1 mM EDTA를 포함하는 세척에 의해 제거된다. 결합 파지는 예를 들면 염 포함하는 완충액으로 용출된다. NaCl 농도는 모든 파지가 용출될 때까지 단계별로 증가된다. 전형적으로, 더 높은 친화도로 결합한 파지는 더 높은 염 농도들에 의해 방출될 것이다. 용출된 파지는 박테리아 숙주에서 증식된다. 심화 선별 시도들이 높은 친화도로 결합한 소수 파지를 선별하도록 수행될 수 있다. 다음으로 결합 파지에 있는 삽입체의 DNA 서열이 결정된다. 일단 결합 펩타이드의 예측된 아미노산 서열이 알려진 경우라면, 본 명세서에서 HE4a 폴리펩타이드에 특이적인 항체로서 사용에 충분한 펩타이드는 재조합 수단에 의해 또는 합성적으로 둘 중 하나로 만들어질 수 있다. 재조합 수단은 항체가 융합 단백질로서 생산될 때 사용된다. 펩타이드는 친화도 또는 결합을 최대화하기 위하여, 둘 이상의 유사하거나 비유사한 펩타이드들의 일렬 어레이로서도 역시 생성될 수 있다.

[0047] 본 개시에서는, 다양한 검정법 포맷들이 제공된다. HE4a 폴리펩타이드에 특이적인 항체와 반응성을 가진 항원성 결정기를 검출하기 위하여, 검출 시약은 본 명세서에서 기술된 바와 같이 또는 당해 기술분야에서 알려진 다양한 방법들이라면 모두에 의해 제조될 수 있는 항체이다. 시료에서 폴리펩타이드를 검출하도록 항체를 사용하는, 이에 제한되는 것은 아니지만 효소 결합된 면역흡착 검정법 (ELISA), 방사성면역검정법 (RIA), 면역형광측정법, 면역침전법, 평형 투석법, 면역확산법 및 기타 기법들을 포함하는 다양한 검정법이 존재한다. 예로, Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology, 1986, Blackwell Scientific, Boston를 참조하라. 예를 들면, 검정법은 웨스턴 블롯 포맷으로 수행될 수 있고, 여기에서 생물학적 시료로부터 얻은 단백질 조제물은 젤 전기영동이 시행되어, 적합한 막으로 이동되고 항체와 반응하도록 허용된다. 다음으로 막 상에서 항체의 존재는 당해 기술분야에서 잘 알려지고 하기에 기술된 바와 같이, 적합한 검출 시약을 사용하여 검출될 수 있다.

[0048] 또 다른 구현예에서, 검정법은 표적 HE4a 폴리펩타이드와 결합하고 이를 시료의 잔재로부터 제거하도록 고체 지지체 상에 고정된 항체의 사용이 관여한다. 결합된 HE4a 폴리펩타이드는 다음으로 구별된 HE4a 폴리펩타이드 항원성 결정기와 반응성을 가진 제 2의 항체, 예를 들면 검출가능한 리포터 분체를 포함하는 시약을 사용하여 검출될 수 있다. 비제한적인 예로서, 본 구현예에 따르면 고정된 항체 및 구별된 항원성 결정기들을 인식하는 제 2의 항체는 대표적인 단일클론 항체들 2H5 및 3D8 둘일 수 있다. 임의적으로, 경쟁적 검정법이 사용될 수 있고, 여기에서 HE4a 폴리펩타이드는 검출가능한 리포터 분체로 표지되고 시료와 고정된 항체의 배양 이후에 특



이적 항체를 고정된 HE4a 폴리펩타이드와 결합하도록 허용된다. 시료의 성분들이 항체와 표지된 폴리펩타이드의 결합을 저해하는 정도는 고정된 항체와 시료의 반응성을 지시하고, 그 결과로 시료에서 HE4a의 수준을 지시한다.

[0049] 항체가 부착될 수 있는, 마이크로타이터 플레이트에서 테스트 웰, 니트로셀룰로스 필터 또는 또 다른 적합한 막과 같은 고체 지지체는 당업자들에게 알려진 재료라면 모두일 수 있다. 임의적으로, 지지체는 유리, 유리섬유, 라텍스와 같은 비드 또는 디스크, 또는 폴리스티렌 또는 폴리비닐클로라이드와 같은 플라스틱일 수 있다. 항체는 당업자들에게 알려진 다양한 기법들을 사용하여 고체 지지체 상에 고정될 수 있고, 이는 특허 및 과학적 문헌에 충분히 기술되어 있다.

[0050] 소정의 구현예들에서, HE4a 항원 폴리펩타이드의 시료에서 검출을 위한 검정법은 이중-항체 샌드위치 검정법이다. 본 검정법은 먼저 고체 지지체, 보편적으로 마이크로타이터 플레이트의 웰 상에 고정되었던 HE4a 폴리펩타이드-특이 항체 (예로, 12A2, 14E2, 2H5 및 3D8와 같은 단일클론 항체)를 생물학적 시료와 접촉시키는 단계에 의해 수행될 수 있고, 시료에서 자연적으로 생기고 항체와 반응성을 가지는 항원성 결정기를 가지는 용해성 분자가 항원-항체 복합체 또는 면역 복합체를 형성하도록 고정된 항체와 결합하는 것이 (예로, 일반적으로 실온에서 30분 배양 시간이 충분함) 허용된다. 시료의 미결합 성분들은 다음으로 고정된 면역 복합체들로부터 제거된다. 다음, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제 2의 항체가 첨가되고, 여기에서 제 2의 항체의 항원 조합 부위는 고정된 제 1의 항체의 항원 조합 부위의 HE4a 폴리펩타이드와 결합을 경쟁적으로 저해하지 않는다 (예로, 고체 지지체 상에 고정된 단일클론 항체와 동일하지 않는 2H5 또는 3D8과 같은 단일클론 항체). 제 2의 항체는 본 명세서에서 제공된 바와 같이 검출가능하게 표지될 수 있어, 이것은 직접적으로 검출될 수 있다. 임의적으로, 제 2의 항체는 검출가능하게 표지된 (또는 "두 번째 단계") 항-항체의 사용을 통해, 또는 본 명세서에서 제공된 바와 같은 특이적 검출 시약을 사용하여 간접적으로 검출될 수 있다. 본 명세서에서 기재된 방법들은 면역검정법들과 친숙한 당업자들이라면 이중-항체 샌드위치 면역검정법에서 특정한 항원을 면역학적으로 검출하는 수많은 시약들 및 입체형태들이 존재하는 점을 이해할 바와 같이, 어떠한 특정한 검출 절차에 제한되지 않는다.

[0051] 상기 기술된 이중-항체 샌드위치 검정법을 사용하는 본 명세서에서 기재된 방법들의 소정의 구현예들에서, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제 1의, 고정된 항체는 다중클론 항체이고, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제 2의 항체는 다중클론 항체이다. 비-경쟁적 HE4a 항체들의 조합이라면 모두가 본 명세서에서 기재된 방법들과 함께 사용될 수 있을 것이다. 단일클론 항체들, 다중클론 항체들 및 그들의 조합을 포함함. 본 명세서에서 기재된 방법들의 소정의 구현예들에서, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제 1의, 고정된 항체는 단일클론 항체이고, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제 2의 항체는 다중클론 항체이다. 본 명세서에서 기재된 방법들의 소정의 다른 바람직한 구현예들에서, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제 1의, 고정된 항체는 단일클론 항체이고, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제 2의 항체는 단일클론 항체이다. 예를 들면, 이들 구현예들에서, 본 명세서에서 제공된 바와 같은 단일클론 항체들 12A2, 14E2, 2H5 및 3D8은 HE4a 폴리펩타이드들 상의 구별된 비경쟁적 항원성 결정기들 (예로, 에피토프들)을 인식하고, 이들 단일클론 항체들의 어떠한 쌍을 이룬 (pairwise) 조합도 적용될 수 있는 점을 주목해야 한다. 상세하게, 소정의 조합들이 특이적 전장의 HE4 변이체들 또는 스프라이싱 변이체들을 검출하는 데 유용하다. 본 명세서에서 기재된 방법들의 다른 구현예들에서, HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 고정된 항체 및 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 제 2의 항체는 당해 기술분야에서 알려지고 본 명세서에서 언급된 항체들의 종류들이라면 모두, 예를 들어 제한 없이 설명하자면 Fab 단편들, F(ab')<sub>2</sub> 단편들, 면역글로불린 V-영역 융합 단백질들 또는 단일 사슬 항체들일 수 있다. 당해 기술분야와 친숙한 당업자들이라면 본 명세서에서 기재된 방법들이 다른 항체 형태들, 단편들, 유도체들 등의 본 명세서에서 기재되고 청구된 방법들에서의 사용을 포괄하는 점을 이해할 것이다.

[0052] 소정의 구현예들에서, 제 2의 항체는 효소, 염료, 방사성핵종, 발광기, 형광기 또는 바이오틴 등과 같은 검출가능한 리포터 분체 또는 표지를 포함할 수 있다. 리포터 분체 또는 표지라면 모두가 이러한 신호가 세척 이후에 지지체 상에 남아있는 항체의 양과 직접적으로 관련되거나 비례적인 한 본 명세서에서 기재된 방법들과 함께 사용될 수 있다. 고체 지지체와 결합되어 남아있는 제 2의 항체의 양은 다음으로 특이적인 검출가능한 리포터 분체 또는 표지를 위해 적당한 방법을 사용하여 결정된다. 방사성 그룹들을 위해, 일반적으로 섬광 계수법 또는 자가방사선촬영 방법들이 적당하다. 항체-효소 결합체들은 다양한 커플링 기법들을 사용하여 (예로서, Scouten, W. H. (1987) A survey of enzyme coupling techniques. Methods in. Enzymology 135, 30-65를 참조하라) 제조될 수 있다. 분광분석 방법은 염료들 (예를 들면, 효소 반응들의 비색 산물들을 포함함), 발광기들 및 형광기들을 검출하는 데 사용될 수 있다. 바이오틴은 서로 다른 리포터기 (보편적으로 방사성 또는 형광성 그룹 또는 효소)와 결합하는 아비딘 또는 스트렙타아비딘을 사용하여 검출될 수 있다. 효소 리포터기는 일반적

으로 기질의 첨가에 의해 (일반적으로 특정한 기간 동안) 검출될 수 있고, 반응 산물들의 분광분석, 분광광도측정 또는 기타 분석이 이어진다. 표준들 및 표준 첨가들이 기지의 기법들을 사용하여 시료에서 항원의 수준을 결정하는 데 사용될 수 있다.

[0053] 또 다른 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 방법들은 생물학적 출처 또는 개체로부터 얻은 생물학적 시료에서 면역특이적으로 반응성을 가진 항체들이 검출에 의해 난소암의 존재를 검색하는, 본 명세서에서 제공된 바와 같은 HE4a 항원 폴리펩타이드의 용도를 참작한다. 본 구현예에 따르면, HE4a 항원 폴리펩타이드 (또는 본 명세서에서 제공된 바와 같은 절단된 HE4a 항원 폴리펩타이드를 포함하는 그의 단편 또는 변이체)는 검출가능하게 표지되고 생물학적 시료와 접촉되어, 시료에서 용해성 형태로 자연적으로 생기는 항체의 HE4a 항원 폴리펩타이드와의 결합을 검출한다. 예를 들면, HE4a 항원 폴리펩타이드는 바로 검출가능한 (예로, 방사선 표지된) 아미노산의 시험관내 해독과정 동안 도입과 같은 잘 알려진 방법들과 협력으로 본 명세서에서 기재된 서열들을 사용하여, 또는 상기에 기술된 분체들과 같은 기타 검출가능한 리포터 분체들을 사용하여 생합성으로 표지될 수 있다. 당업자라면 본 방법들의 구현에는 본 명세서에서 기재된 HE4a 융합 폴리펩타이드와 같은 소정의 HE4a 폴리펩타이드가 특정하게 면역원성을 가지는 펩타이드들을 제공하여 특이적이고 검출가능한 항체들을 유도할 수 있는 점을 참작하는 것으로 바로 이해할 것이다. 예를 들어 본 이론에 따르면, 소정의 HE4a 융합 폴리펩타이드는 아비드 면역 반응을 유발하는 "비-자가" 항원들을 재연할 수 있는 한편, 융합 도메인들이 결합된 HE4a 폴리펩타이드는 면역 체계에 의해 체액성 또는 세포-매개성 면역을 바로 발현하지 않는 "자가" 항원들과 더욱 유사한 것으로서 보여질 수 있다.

[0054] 본 명세서에서 기재된 방법들에 따른 악성 병태의 존재에 대해 확인하는 방법은 또한 개체로부터 얻은 생물학적 시료에서 하나 이상의 중앙 연관된 마커의 검출에 의해 증진될 수 있다. 이에 따라, 기재된 방법들은 HE4a 항원 폴리펩타이드에 특이적인 항체와 자연적으로 생기는 성분의 반응성을 검출하는 단계에 추가하여, 당해 기술 분야에서 기지의 확립된 방법들뿐만 아니라 기재된 방법들을 사용하는 악성 병태의 적어도 하나의 추가적인 용해성 마커의 검출도 역시 포함하는 검색의 방식을 제공한다. 상기에 주목된 바와 같이, 현재 바로 획득된 생물학적 체액들의 시료들에서 검출가능한 많은 용해성 중앙 연관된 항원들이 존재한다.

[0055] 난소암을 가진 증가된 가능성을 가진 환자들을 확인하기 위한 대표적인 검색 방법들은 일반적으로 난소암에서 선택적으로 과다발현되는 다수의 생물마커들의 발현을 환자 신체 시료에서 검출하는 단계를 포함한다. 생물마커들의 과다-발현은 환자가 난소암을 가지는 증가된 가능성을 지시한다. 본 개시의 방법들은, 예를 들면 첫 번째 검정 단계가 제 1의 생물마커 (예로, HE4/HE4a) 또는 생물마커들의 패널의 발현을 검출하도록 수행하는 "두 단계" 분석을 포함할 수 있다. 제 1의 생물마커 또는 생물마커들의 패널이 과다발현되는 경우라면, 두 번째 검정 단계는 제 1의 생물마커 또는 생물마커들의 패널의 발현을 검출하도록 수행한다. 제 1의 및 제 2의 생물마커 또는 생물마커들의 패널들의 과다-발현은 환자가 난소암을 가지는 증가된 가능성을 지시한다.

[0056] 임의적으로, HE4a 폴리펩타이드들을 인코딩하는 핵산 서열들은 표준 혼성화 및/또는 중합효소 연쇄반응 (PCR) 기법들을 사용하여 검출될 수 있다. 적합한 프로브들 및 프라이머들은 본 명세서에서 제공된 HE4a cDNA 서열들을 기초로 하여 당업자들에 의해 설계될 수 있다. 검정법들은 일반적으로 진핵 세포들, 박테리아들, 바이러스들, 이러한 유기체들 및 살아있는 유기체들 내에서 발견되는 체액들로부터 제조된 추출물들과 같은 생물학적 출처로부터 획득된 다양한 시료들이라면 모두를 사용하여 수행될 수 있다.

[0057] 실시예들에서 사용되는 표준 제조합 DNA 및 분자적 클로닝 기법들은 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다.

[0058] 본 명세서에서 기재된 HE4a 폴리펩타이드의 물리화학적 및 면역화학적 특성들로부터, 그리고 HE4a를 인코딩하는 지금까지 기재된 핵산 서열들을 사용하여, 당업자라면 잘 알려진 방법론들에 따라 특이적 항체들을 생산하고 특성분석하는 데 사용될 수 있는 제조합 HE4a 폴리펩타이드도 역시 제조할 수 있다. HE4a 폴리펩타이드들은 포유동물 세포들, 효모, 박테리아, 또는 기타 세포들에서 적당한 프로모터들의 조절 하에 발현될 수 있다. 무-세포 해독 시스템들도 역시 본 명세서에서 기재된 HE4a 폴리펩타이드 DNA 코딩 부위들로부터 유래된 RNAs를 사용하여 이러한 단백질을 생산하도록 적용될 수 있다. 원핵 및 진핵 숙주들과의 사용을 위한 적당한 클로닝 및 발현 벡터들이 이전에 기술되어 왔고 당업자들에 의해 잘 숙지되어 있다. 본 발명의 바람직한 구현예들에서, HE4a 폴리펩타이드들이 포유동물 세포들에서 발현된다.

[0059] 따라서, 본 발명은 HE4a 항원 폴리펩타이드를 인코딩하는 분리된 핵산 분자 또는 이러한 HE4a 폴리펩타이드-인코딩 핵산, 또는 이와 상보적인 서열을 가지는 핵산 분자와 혼성화할 수 있는 핵산 분자를 제공한다.

[0060] 변이체들은 고유의 HE4a 항원 폴리펩타이드 또는 그의 일부를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열과 바람직하



게 적어도 약 70%의 일치도, 더욱 바람직하게는 적어도 약 80% 내지 85%의 일치도, 가장 바람직하게는 적어도 약 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 일치도를 나타낸다. 일치도 백분율은 NCBI 웹사이트 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>)에서 입수가능한 Align 또는 BLAST 알고리즘 (Altschul S.F. (1991) Amino acid substitution matrices from an information theoretic perspective. Journal of Molecular Biology 219: 555-565; Henikoff S., Henikoff J.G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992년 11월 15일;89(22): 10915-9)과 같은 당업자들에게 잘 알려진 컴퓨터 알고리즘들을 사용하여 서열들을 비교하여 바로 결정될 수 있다.

[0061] 소정의 변이체들은 고유의 유전자와 실질적으로 상동하다. 이러한 폴리뉴클레오타이드 변이체들은 고유의 HE4a 항원 (또는 상보적 서열)을 인코딩하는 자연적으로 생기는 DNA 또는 RNA 서열들과 적당하게 엄격한 조건들 하에서 혼성화할 수 있다. 적합한 적당하게 엄격한 조건들은, 예를 들면 다음의 단계들 또는 그들의 동등한 단계들을 포함한다:  $5\times\text{SSC}$ , 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0)의 용액에서 전세척하는 단계;  $50^{\circ}\text{C}$  내지  $60^{\circ}\text{C}$ ,  $5\times\text{SSC}$ 에서 밤샘 혼성화 단계; 이어서 0.1% SDS를 포함하는  $2\times 0.5\times$  및  $0.2\times\text{SSC}$  각각으로  $65^{\circ}\text{C}$ 에서 20분 동안 두 번 세척하는 단계. 추가적인 엄격도를 위해, 조건들은 예를 들면  $0.1\times\text{SSC}$  및 0.1% SDS로  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 15분 또는 동등한 기간 동안 세척하는 단계를 포함할 수 있다. 당업자라면 관심 있는 특정한 핵산을 위해 일정 방식으로 선택적인 적당하게 엄격한 혼성화 조건들을 작성하도록 일상적 문제로서 다양화될 수 있는 매개변수들을 바로 이해할 것이고 또한 이러한 조건들이 혼성화에 관여된 특정한 핵산 서열들의 함수일 수 있는 점을 이해할 것이다.

[0062] 본 발명에 따른 용도를 위한 HE4a 폴리펩타이드들, 또는 기타 다른 HE4a 폴리펩타이드들을 인코딩하는 핵산들은, 이에 제한되는 것은 아니지만: HE4a 폴리펩타이드의 코딩 서열만; HE4a 폴리펩타이드의 코딩 서열 및 추가적인 코딩 서열; HE4a 폴리펩타이드의 코딩 서열 (및 임의적으로 추가적인 코딩 서열) 및 인트론들 또는 HE4a 폴리펩타이드의 코딩 서열의 5' 및/또는 3' 비-코딩 서열들과 같은 비-코딩 서열을 포함할 수 있고, 이는 예를 들면 이에 제한될 필요는 없지만 조절되거나 조절가능한 프로모터, 인핸서, 기타 전사 조절 서열, 억제인자 결합 서열, 해독 조절 서열 또는 기타 다른 조절 핵산 서열을 더욱 포함할 수 있다. 따라서, 용어 "HE4a 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산"은 폴리펩타이드의 코딩 서열만 뿐만 아니라 추가적인 코딩 및/또는 비-코딩 서열(들)을 포함하는 핵산을 포함하는 핵산을 포괄한다.

[0063] 본 발명은 또한 HE4a 폴리펩타이드, 예를 들면 서열번호 HE4의 유추된 아미노산 서열을 가지는 인간 HE4a 폴리펩타이드의 단편들, 유사체들 및 유도체들을 인코딩하는 본 명세서에서 기술된 핵산의 변이체들에 관한 것이다. HE4a를 인코딩하는 핵산들의 변이체들은 핵산들의 자연적으로 생기는 대립인자 또는 스프라이싱 변이체들 또는 비-자연적으로 생기는 변이체들일 수 있다. 당해 기술분야에서 알려진 바와 같이, 대립인자 변이체는 인코딩된 HE4a 폴리펩타이드의 기능을 실질적으로 변경하지 않는 하나 이상의 뉴클레오타이드들의 치환, 결실 또는 첨가의 적어도 하나를 가질 수 있는 핵산 서열의 임의의 형태이다. HE4a의 변이체들 및 유도체들은 HE4a 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열들의 돌연변이들에 의해 획득될 수 있다. 고유의 아미노산 서열의 변경들은 많은 통상적인 방법들이라면 모두에 의해 달성될 수 있다. 돌연변이들은 고유 서열의 단편들과 라이게이션을 가능하게 하는 제한효소 부위들에 의해 끼여있는 변이 서열을 포함하는 올리고뉴클레오타이드들을 합성하여 특정한 좌위에 도입될 수 있다. 라이게이션에 이어서, 그 결과 얻은 재제작된 서열은 원하는 아미노산 삽입, 치환, 또는 결실을 가지는 유사체를 인코딩한다.

[0064] 임의적으로, 올리고뉴클레오타이드-유도된 부위-특이적 돌연변이화 절차들이 선결정된 코돈들이 당해 기술분야에서 잘 알려진 바와 같이 치환, 결실 또는 삽입에 의해 변경될 수 있는 변경된 유전자를 제공하도록 적용될 수 있다.

[0065] 아미노산 잔기들 또는 서열들의 다양한 첨가들 또는 치환들, 또는 생물학적 활성을 위해 필요하지 않은 말단 또는 내부 잔기들 또는 서열들의 결실들을 인코딩하는 동등한 DNA 제작물들도 역시 본 발명에 의해 포괄된다. 예를 들면, 생물학적 활성을 위해 필수적이지 않은 Cys 잔기들을 인코딩하는 서열들은 Cys 잔기들이 결실되거나 다른 아미노산들로 치환되도록 유도하기 위하여 변경될 수 있고, 탈변성 시 부정확한 분자내 디설파이드 결합들의 형성을 방지한다. 다른 동등물들은 KEX2 단백질분해효소 활성이 존재하는 효모 시스템에서 발현을 증진하도록 인접한 이염기성 아미노산 잔기들의 변형에 의해 제조될 수 있다. 예로서, 유럽 특허 제 EP 212,914호는 단백질에서 KEX2 단백질분해효소 프로세싱 부위들을 불활성화하도록 부위-특이적 돌연변이화의 사용을 기재하고 있다. KEX2 단백질분해효소 프로세싱 부위들은 Arg-Arg, Arg-Lys, 및 Lys-Arg 쌍들을 변경하여 이들 인접한 염기성 잔기들의 출현을 제거하도록 잔기들을 결실하거나 첨가하거나 치환하여 불활성화된다. Lys-Lys 쌍들은 KEX2 절단에 상당히 덜 민감하고, Arg-Lys 또는 Lys-Arg의 Lys-Lys로의 전환은 KEX2 부위들을 불활성화하는

보존적이고 바람직한 접근을 제공한다.

- [0066] 적당한 DNA 서열(들)은 다양한 절차들에 의해 선택된 숙주세포에 적당한 많은 잘 알려진 벡터들이라면 모두 내로 삽입될 수 있다. 일반적으로, DNA 서열은 당해 기술분야에서 알려진 절차들에 의해 적당한 제한효소 부위(들) 내로 삽입된다. 클로닝, DNA 분리, 증폭 및 정제를 위한 표준 기법들, DNA 라이게이즈, DNA 중합효소, 제한효소 등이 관여하는 효소적 반응을 위한 표준 기법들, 및 다양한 분리 기법들이 알려져 있고 당업자들에 의해 보편적으로 적용되는 것들이다.
- [0067] 포유동물 발현 시스템들의 예들로는 글루즈만 (Gluzman Y)에 의해 기술된 원숭이 신장 섬유모세포들의 COS-7 계열들을 포함한다. SV40-형질전환된 원숭이 세포들은 초기 SV40 돌연변이체들의 복제를 지원한다. Cell. 1981 Jan;23(1): 175-82, 또한 적합한 벡터를 발현할 수 있는 다른 세포주들은, 예를 들면 C127, 3T3, CHO, HeLa 및 BHK 세포주들이 있다. 포유동물 발현 벡터들은 복제 원점, 적합한 프로모터 및 인핸서, 그리고 기타 필요한 리보솜 결합 부위들, 폴리아데닐화 부위, 스프라이싱 공여자 및 수용자 부위들, 전사 종결 서열들, 및 5' 끼여있는 비전사 서열들도 포함할 것이다. 예를 들면, SV40 스프라이싱 및 폴리아데닐화 부위들로부터 유래한 DNA 서열들은 요구된 비전사된 유전적 요소들을 제공하는 데 사용될 수 있다. 숙주세포 내로 제작물의 도입은, 이에 제한되는 것은 아니지만 예를 들면 칼슘 포스페이트 형질전환법, DEAE-덱스트란 매개된 형질전환법, 또는 전기천공법을 포함하는, 당업자들과는 친숙한 다양한 방법들에 의해 효과를 낼 수 있다 (Davis, L.G., Dibner, M.D. and Battey, J.F.: Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier, New York, 1986).
- [0068] 본 발명의 HE4a 폴리펩타이드는 미변형된 폴리펩타이드일 수 있거나, 예를 들면 글리코실포스파티딜이노시톨 고정 변형 등, 포스파티딜이노시톨-특이적 포스포리파제 c 매개된 가수분해 등과 같은 포스포리파제 절단, 단백질 분해효소 절단, 탈인산화 또는 공유적 화학결합의 형성 또는 절단이 관여하는 변형과 같은 단백질 해독후 변형의 기타 다른 유형을 포함하는 당화, 인산화, 지방산화에 의해 해독후 변형되었던 폴리펩타이드일 수 있다.
- [0069] 용어 "단편", "유도체" 및 "유사체"는 HE4a 폴리펩타이드들, HE4a 항원 폴리펩타이드들 또는 HE4a 융합 단백질들을 언급할 때, 이러한 폴리펩타이드와 동일한 생물학적 기능 및/또는 활성을 필수적으로 보유하는 HE4a 폴리펩타이드라면 모두를 말한다. 따라서, 유사체는 차별적으로 해독후 변형된 HE4a 폴리펩타이드와 같은 HE4a 항원 폴리펩타이드 이소형 또는 스프라이싱 변이체와 같은 변이체를 포함할 수 있다. 당해 기술분야에서 잘 알려진 바와 같이, "스프라이싱 변이체"는 RNA 전사체의 차별적 세포내 프로세싱으로부터 나온 폴리펩타이드의 변이체 또는 대안의 형태들을 포함한다. 예를 들면, 두 개의 구별된 mRNA 종들은 그들이 단지 한 mRNA 종에서 특정한 엑손에 해당하는 서열의 전부 또는 일부의 포함 및 다른 종으로부터 그의 부재에 의해 달라지는 서로의 스프라이싱 변이체들일 수 있다. 당해 기술분야와 친숙한 당업자들이라면 이해할 바와 같이, 다른 구조적 관련성들이 일반적으로 스프라이싱 변이체들로서 고려되는 mRNA 종들 간에 존재할 수 있다. HE4a 폴리펩타이드는 또한 활성을 가진 HE4a 폴리펩타이드를 생산하도록 전구단백질 일부의 절단에 의해 활성화될 수 있는 전구단백질을 포함한다.
- [0070] HE4a 폴리펩타이드들 또는 HE4a 항원 폴리펩타이드들의 단편들, 유도체들 및 유사체들의 생물학적 기능들 및/또는 활성들은, 이에 제한되는 것은 아니지만 본 명세서에서 기재된 바와 같이 개체에게서 악성 병태의 존재에 대해 확인하는 방법에서 마커들로서 이러한 폴리펩타이드들의 용도를 포함한다. 예를 들면, 개체로부터 얻은 시료에서 용해성 형태로 자연적으로 생기고 HE4a 폴리펩타이드에 특이적인 적어도 하나의 항체와 반응성을 가진 항원성 결정기를 가지는 분자를 검출하여, 당업자라면 HE4a 폴리펩타이드의 생물학적 기능 및/또는 활성을 감시할 수 있다. 또한, 소정의 구현예들에서 본 발명의 검색 방법은 용해성 형태로 자연적으로 생기고 HE4a 폴리펩타이드에 특이적인 적어도 하나의 항체와 반응성을 가진 항원성 결정기를 가지는 검출가능한 분자의 상대적 양들, 수준들 및/또는 총량들 (amounts)을 (i) 악성 변태를 가질 것으로 의심된 제 1의 개체로부터 얻은 제 1의 생물학적 시료, 및 (ii) 악성 병태가 없는 것으로 알려진 제 2의 개체로부터 얻은 제 2의 생물학적 시료의 각각에서 비교하는 단계를 지향하는 점을 주목해야 한다. 이에 따라, 생물학적 시료에서 HE4a 폴리펩타이드의 상대적 정량적 존재는 이러한 기능 및/또는 활성에 반드시 제한되지는 않더라도 HE4a 폴리펩타이드의 생물학적 기능 및/또는 활성일 수 있다.
- [0071] HE4a 폴리펩타이드의 단편, 유도체 또는 유사체는 (i) 하나 이상의 아미노산 잔기들이 보존된 또는 비-보존된 아미노산 잔기들 (바람직하게는 보존된 아미노산 잔기)로 치환된 것; (ii) HE4a 폴리펩타이드의 정제를 위해 적용될 수 있는 아미노산들 또는 전구단백질 서열을 포함하는, 추가적인 아미노산들이 HE4a 폴리펩타이드와 융합된 것; 또는 (iii) 절단된 HE4a 폴리펩타이드일 수 있다. 이러한 단편들, 유도체들 및 유사체들은 본 명세서에서의 가르침들로부터 당업자들의 기술 범위 내인 것으로 판단된다.

- [0072] 절단된 HE4a 폴리펩타이드는 HE4a 폴리펩타이드의 전장 이하의 버전을 포함하는 HE4a 폴리펩타이드 분자라면 모두일 수 있다. 본 발명에 의해 제공되는 절단된 분자들은 전달된 생물학적 중합체들을 포함할 수 있고, 본 발명의 바람직한 구현예들에서 이러한 절단된 분자들은 절단된 핵산 분자들 또는 절단된 폴리펩타이드일 수 있다. 절단된 핵산 분자들은 기지의 또는 기술된 핵산 분자의 전장 이하의 길이의 뉴클레오타이드 서열을 가지고, 여기에서 이러한 기지의 또는 기술된 핵산 분자는 당업자가 전장의 분자로서 이를 고려하는 한 자연적으로 생기는, 합성 또는 재조합 핵산 분자일 수 있다. 따라서, 예를 들면 유전자 서열에 해당하는 절단된 핵산 분자들은 전장 이하의 유전자를 포함하고, 여기에서 유전자는 코딩 및 비-코딩 서열들, 프로모터들, 인핸서들 및 기타 조절 서열들, 끼여있는 서열들 등, 그리고 유전자의 부분으로서 인식되는 기타 기능성 및 비-기능성 서열들을 포함한다. 또 다른 예에서, mRNA 서열에 해당하는 절단된 핵산 분자들은 전장 이하의 mRNA 전사체를 포함하고, 이는 다양한 해독된 및 비-해독된 부위들 뿐만 아니라 기타 기능성 및 비-기능성 서열들을 포함할 수 있다. 다른 바람직한 구현예들에서, 절단된 분자들은 특정한 단백질의 전장 이하의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드들이다.
- [0073] 본 명세서에서 사용되는 바 "결실"은 당해 기술분야와 친숙한 당업자들에 의해 이해되는 바와 같이 그의 보편적인 의미를 가지고, 예를 들면 본 명세서에서 제공된 절단된 분자들의 경우와 같이 해당하는 전장의 분자와 대비하여 말단 또는 비-말단 부위 둘 중 하나로부터 서열의 하나 이상의 일부가 결여된 분자를 말할 수 있다. 핵산 분자들 또는 폴리펩타이드들과 같은 선형의 생물학적 중합체들인 전달된 분자들은 분자의 말단으로부터 결실 또는 분자의 비-말단 부위로부터 결실 둘 중 하나의 하나 이상을 가질 수 있고, 여기에서 이러한 결실은 1개 내지 1,500개 연속적 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기들, 바람직하게는 1개 내지 500개 연속적 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기들, 더욱 바람직하게는 1개 내지 300개 연속적 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기들의 결실을 일 수 있다.
- [0074] 당해 기술분야에서 알려진 바와 같이, 두 개의 폴리펩타이드들 간의 "유사도"는 폴리펩타이드의 아미노산 서열 및 그에 보존된 아미노산 치환들을 두 번째 폴리펩타이드의 서열과 비교하여 결정된다. 두 개의 폴리펩타이드 또는 뉴클레오타이드 서열들 간의 유사도, 또는 심지어 일치도 백분율은 BLAST 알고리즘과 같은 당업자들에게 잘 알려진 컴퓨터 프로그램을 사용하여 서열들을 비교하여 마로 결정될 수 있다. 기타 유용한 컴퓨터 알고리즘들의 예들로는, 예를 들면 프랑스 몽펠리에 인간 유전학 연구소의 진스트림 인터넷 웹사이트 ([www2.igh.cnrs.fr/home.eng.html](http://www2.igh.cnrs.fr/home.eng.html))에서 접근될 수 있는 Align 및 FASTA와 같은 프로그램들에서 사용될 수 있는 것들이다. 본 발명의 폴리펩타이드들의 단편들 또는 일부들은 펩타이드 합성에 의해 해당하는 전장의 폴리펩타이드를 생산하는 데 적용될 수 있고, 따라서 단편들은 전장의 폴리펩타이드들을 생산하기 위한 중간체들로서 적용될 수 있다.
- [0075] 용어 "분리된"은 물질이 그의 고유의 환경 (예로, 자연적으로 생기는 경우라면 천연의 환경)으로부터 제거된 것을 의미한다. 예를 들면, 살아있는 동물에 존재하는 자연적으로 생기는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 분리되지 않지만, 천연 시스템에서 공존하는 물질들의 일부 또는 모두로부터 분리된 동일한 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드는 분리된다. 이러한 폴리펩타이드들 또는 폴리뉴클레오타이드들은 조성물의 일부분일 수 있고, 또한 분리될 수 있어 이러한 조성물은 그의 천연 환경의 일부분은 아니다.
- [0076] 친화도 기법들은 상세하게 본 발명의 방법들에 따른 용도를 위해 HE4a 폴리펩타이드들을 분리하는 맥락에서 유용하고, 분리에 효과를 내록 HE4a 폴리펩타이드와 특이적 결합 상호작용을 사용하는 방법이라면 모두를 포함할 수 있다. 예를 들면, HE4a 폴리펩타이드들은 공유적으로 부착된 올리고당류 분체들을 포함할 수 있기 때문에, 액틴에 의해 탄수화물 결합을 허용하는 조건들 하에서 HE4a 폴리펩타이드의 적합한 고정된 액틴과 결합과 같은 친화 기법은 상세하게 유용한 친화 기법일 수 있다. 기타 유용한 친화 기법들로는 HE4a 폴리펩타이드를 분리하는 면역학적 기법들을 포함하고, 이들 기법들은 복합체들에 존재하는 항원 및 항원성 결정기들에 대한 항체 조합 부위들 간의 특이적 결합 상호작용에 의존한다. 면역학적 기법들로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 면역친화 크로마토그래피, 면역침전법, 고체상 면역흡착법 또는 기타 면역친화 방법들을 포함한다.
- [0077] 본 명세서에서 기술된 바, 본 발명은 HE4a와 융합된 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 이러한 HE4a 융합 단백질들은 추가적인 코딩 서열과 프레임에 맞추어 융합된 HE4a 코딩 서열을 가지는 핵산에 의해 인코딩되어, 예를 들어 제한 없이 설명하자면 HE4a 융합 단백질의 검출, 분리 및/또는 정제를 허용하는 추가적인 기능성 또는 비-기능성 폴리펩타이드 서열과 융합된 HE4a 폴리펩타이드 서열의 발현을 제공한다. 이러한 HE4a 융합 단백질들은 단백질-단백질 친화도, 금속 친화도 또는 전하 친화도-기초 폴리펩타이드 정제에 의해, 또는 단백질분해효소에 의해 절단가능한 융합 서열을 포함하는 융합 단백질의 특이적 단백질분해효소 절단에 의해 HE4a 융합 단백질의 검출, 분리 및/또는 정제를 허용할 수 있어 HE4a 폴리펩타이드가 융합 단백질로부터 분리가능하



다.

- [0078] 따라서, HE4a 융합 단백질들은 친화 태그 폴리펩타이드 서열들을 포함할 수 있고, 이는 리간드와의 특이적 친화 상호작용을 통해 HE4a의 검출 및 분리를 용이하게 하도록 HE4a에 첨가된 폴리펩타이드들 또는 펩타이드들을 말한다. 리간드는 친화 태그가 본 명세서에서 제공된 바와 같이 특이적 상호작용을 통해 상호작용할 수 있는 분자, 수용체, 반대수용체, 항체 등이라면 모두일 수 있다. 이러한 펩타이드로는, 예를 들면 미국 특허 제 5,011,912호 및 T.P. Hopp, B. Gallis and K.S. Prickett (1988) A short polypeptide marker sequence useful in protein identification and purification. Bio/Technology 6: 1204-1210에서 기술된 폴리-His 또는 항원성 확인 펩타이드들, 또는 XPRESS™ 에피토프 태그 (인비트로젠사, Carlsbad, Calif.)를 포함한다. 친화 서열은 박테리아 숙주의 경우에 마커와 융합된 성숙한 폴리펩타이드의 정제를 제공하도록, 예를 들면 pBAD/His (인비트로젠사) 또는 pQE-9 벡터에 의해 공급된 바와 같은 헥사-히스티딘 태그일 수 있거나, 예를 들면, 친화도 서열은 포유동물 숙주, 예로 COS-7 세포들이 사용될 때 헤마글루티닌 (HA) 태그일 수 있다. HA 태그는 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질로부터 유래한 항체 정의된 에피토프에 해당한다 (Wilson IA, Niman HL, Houghten RA, Cherenson AR, Connolly ML, Lerner RA. The structure of antigenic determinant in a protein. Cell. 1984년 7월; 37(3): 767-78).
- [0079] HE4a 융합 단백질은 상세한 구현예들에서 또한 하기에 더욱 자세하게 기술된 바와 같이, HE4a의 검출, 분리 및/또는 정제를 용이하게 하도록 HE4a에 첨가된 면역글로불린 불변 영역 폴리펩타이드들을 더욱 포함할 수 있다. 면역글로불린 불변 영역 폴리펩타이드는 바람직하게 HE4a 폴리펩타이드의 C-말단과 융합된다. 비-제한적인 이론에 따르면, 본 명세서에서 제공된 바와 같은 HE4a 융합 단백질들에서 면역글로불린 (Ig) 불변 영역 도메인들의 포함은 장점들, 예를 들면 특정한 숙주들에서 사용될 때 특정한 Ig 영역들의 면역원성/비-면역원성 특성들과 연관된 장점들 (예로, "자가" vs "비-자가"), 또는 융합 단백질의 분리 및/또는 검출을 용이하게 하는 장점들을 제공할 수 있다. Ig 융합 단백질들의 이들 및 기타 장점들은 당해 기술분야와 친숙한 당업자들에 의해 이해될 것이다. 항체-유래 폴리펩타이드들의 다양한 부분들 (Fc 도메인을 포함함)과 융합된 이종유래 폴리펩타이드들을 포함하는 융합 단백질들의 일반적인 제조는, 예로 Ashkenazi A., Marsters S.A., Capon D.J., Chamow S.M., Figari I.S., Pennica D., Goeddel D.V., Palladino M.A., Smith D.H., Protection against endotoxic shock by a tumor necrosis factor receptor immunoadhesin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991년 12월 1일; 88(23): 10535-9 and Byrn et al. (Byrn R.A., Mordenti J., Lucas C., Smith D., Marsters S.A., Johnson J.S., Cossum P., Chamow S.M., Wurm F.M., Gregory T. et al.,) Biological properties of a CD4 immunoadhesin. Nature. 1990년 4월 12일; 344(6267): 667-70에 의해 기술되었다. HE4a:Fc 융합 단백질을 인코딩하는 유전자 융합이 적당한 발현 벡터 내로 삽입된다. 본 발명의 소정의 구현예들에서, HE4a:Fc 융합 단백질들은 사슬간 디설파이드 결합들이 Fc 폴리펩타이드들 사이에 형성되고 이량체 HE4a 융합 단백질들을 수득하는 더욱 항체 분자들처럼 조립되도록 허용될 수 있다.
- [0080] HE4a를 인코딩하는 서열들과 프레임에 맞추어 결합된 DNA 서열들에 의해 인코딩된 면역글로불린 V-영역 도메인들을 포함하는 융합 폴리펩타이드들의 덕분에 미리-선택된 항원들에 대한 특이적 결합 친화도들을 가지는 HE4a 융합 단백질들도 역시, 본 명세서에서 제공된 바와 같은 그들의 변이체들 및 단편들을 포함하여 본 발명의 범위 내에 속한다. 면역글로불린 V-영역 융합 폴리펩타이드들을 가지는 융합 단백질들의 제작을 위한 일반적인 전략들은, 예를 들면 유럽 특허 제 EP 0318554호; 미국 특허 제 5,132,405호; 미국 특허 제 5,091,513호; 및 미국 특허 제 5,476,786호에 기재되고 있다.
- [0081] 본 발명의 핵산은 원하는 친화도 특성들을 가지는 기타 폴리펩타이드들, 예를 들면 글루치온-S-전이효소와 같은 효소와 융합된 HE4a 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질도 역시 인코딩할 수 있다. 또 다른 예로서, HE4a 융합 단백질들은 *Staphylococcus aureus* 프로테인 A 폴리펩타이드와 융합된 HE4a 폴리펩타이드도 역시 포함할 수 있고; 프로테인 A 인코딩하는 핵산들 및 면역글로불린 불변 영역들에 대한 친화도를 가지는 융합 단백질들을 제작하는 데 그들의 용도가 일반적으로, 예를 들면 미국 특허 제 5,100,788호에 기재되어 있다. HE4a 융합 단백질들의 제작을 위한 다른 유용한 친화 폴리펩타이드들로는, 예를 들면, 국제특허출원 제 WO 89/03422호; 미국 특허 제 5,489,528호; 미국 특허 제 5,672,691호; 국제특허출원 제 WO 93/24631호; 미국 특허 제 5,168,049호; 미국 특허 제 5,272,254호 및 그 밖에 기재된 바와 같이 스트렙타비딘 융합 단백질들, 및 아비딘 융합 단백질들 (예로, 유럽 특허 제 EP 511,747호를 참조하라)을 포함할 수 있다. 본 명세서 및 인용된 참고문헌들에서 제공된 바와 같이, HE4a 폴리펩타이드 서열들은 전장의 융합 폴리펩타이드 서열들일 수 있고, 또한 임의적으로 그들의 변이체들 또는 단편들일 수 있는 융합 폴리펩타이드 서열들과 융합될 수 있다.

- [0082] 본 발명은 융합 단백질을 세포 핵으로, 세포질 세망 (ER)의 내강에 정착하도록, 고전적인 ER-골지 분비 경로를 통해 세포로부터 분비되도록 (예로, von Heijne, G. (1990) The Signal peptide. J. Membr. Biol. 115, 195-201를 참조하라), 세포질 막 내로 도입되도록, 막통과 세포 표면 수용체의 세포질 도메인을 포함하는 특이적 세포질 성분과 연관되도록, 또는 당업자들과는 친숙할 다양한 기지의 세포내 단백질 선별 기작들이라면 모두에 의해 특정한 세포하 위치로 인도되도록 유도하는 폴리펩타이드 서열들을 포함하는 HE4a 융합 단백질들도 역시 참작하고 있다 (예로서, Rothman J.E., Mechanisms of intracellular protein transport. Nature. 1994 Nov 3;372(6501): 55-63., Advani R.J., Bae H.R., Bock J.B., Chao D.S., Doung Y.C., Prekeris R., Yoo J.S., Scheller R.H., Seven novel mammalian SNARE proteins localize to distinct membrane compartments. J. Biol. Chem. 1998). 이에 따라, 이들 및 관련 구현예들은 관심 있는 폴리펩타이드를 선정의된 세포내, 막 또는 세포외 정착으로 표적화를 지향하는 본 조성물들 및 방법들에 의해 포괄된다.
- [0083] 본 발명은 또한 본 발명의 핵산들을 포함하는 벡터들 및 제작물들에 관한 것이고, 상세하게는 상기에서 제공된 바와 같이 본 발명에 따른 HE4a 폴리펩타이드를 인코딩하는 어떠한 핵산들이라도 포함하는 "재조합 발현 제작물들"; 본 발명의 벡터들 및/또는 제작물들로 유전적으로 조작된 숙주 세포들; 그리고 본 발명의 HE4a 폴리펩타이드 및 융합 단백질, 또는 그들의 단편들 또는 변이체들의 재조합 기법들에 의한 생산에 관한 것이다. HE4a 단백질들은 적당한 프로모터들의 조절 하에서 포유동물 세포들, 효모, 박테리아, 또는 기타 세포들에서 발현될 수 있다. 무-세포 해독 시스템들도 역시 본 발명의 DNA 제작물들로부터 유래한 RNAs를 사용하여 이러한 단백질들을 생산하는 데 적용될 수 있다.
- [0084] 일반적으로, 재조합 발현 벡터들은 복제 원점 및 숙주세포의 형질전환을 허용하는 선택가능한 마커들, 예로 대장균의 앰피실린 저항성 유전자 및 *S. cerevisiae* TRP1 유전자, 그리고 하류의 구조적 서열의 전사를 유도하도록 높게 발현되는 유전자로부터 유래한 프로모터를 포함할 것이다. 이러한 프로모터들은, 무엇보다도 3-포스포글리세레이트 키나제 (PGK),  $\alpha$ -인자, 산 포스파타제, 또는 열충격 단백질들과 같은 당분해 효소들을 인코딩하는 오페론들로부터 유래될 수 있다. 이중유래 구조적 서열은 적당한 단계에서 해독 개시 및 종결 서열들과 조립된다. 선택적으로, 이중유래 서열은 원하는 특징, 예로 발현된 재조합 산물의 안정화 또는 단순화된 정제를 주는 N-말단 확인 펩타이드를 포함하는 융합 단백질을 인코딩할 수 있다.
- [0085] 박테리아 용도를 위해 유용한 발현 제작물들은 발현 벡터 내로 원하는 단백질을 인코딩하는 구조적 DNA 서열을 기능성 프로모터로 작동가능한 해독 상에서 적합한 해독 개시 및 종결 신호들과 함께 삽입하여 제작된다. 제작물은 벡터 제작물의 유지를 입증하도록, 또한 원하는 경우 숙주 내에서 증폭을 제공하도록 하나 이상의 표현형적 선택가능한 마커들 및 복제 원점을 포함할 수 있다. 형질전환에 적합한 원핵 숙주들로는, 다른 것들도 역시 선택의 문제로서 적용될 수 있긴 하더라도 대장균, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* 그리고 *Pseudomonas*, *Streptomyces*, 및 *Staphylococcus* 속 내의 다양한 종들을 포함한다. 기타 다른 플라스미드 또는 벡터도 그들이 숙주에서 복제가능하고 생존가능한 한 사용될 수 있다.
- [0086] 대표적이지만 비-제한적인 예로서, 박테리아 용도를 위한 유용한 발현 벡터들은 잘 알려진 클로닝 벡터 pBR322 (ATCC 37017)의 유전적 요소들을 포함하는 시판되는 플라스미드들로부터 유래한 선택가능한 마커 및 박테리아의 복제 원점을 포함할 수 있다. 이러한 시판되는 벡터들로는, 예를 들면 pKK223-3 (파마시아 파인 케미칼사, Uppsala, 스웨덴) 및 GEM1 (프로메가 바이오텍사, Madison, Wis., 미국)을 포함한다. 이들 pBR322 "골격" 부분들은 적당한 프로모터 및 발현될 구조적 서열과 조합된다.
- [0087] 적합한 숙주 품종의 형질전환 및 적당한 세포 밀도로의 숙주 품종의 성장에 이어서, 선택된 프로모터는, 본 명세서에서 제공된 바와 같이 조절되는 프로모터인 경우라면 적당한 수단 (예로, 온도 변화 또는 화학적 유도)에 의해 유도되고 세포들은 추가적인 기간 동안 배양된다. 전형적으로 세포들은 원심분리에 의해 수확되고, 물리적 또는 화학적 수단에 의해 파쇄되며, 그 결과로 얻은 조추출물은 심화 정제를 위해 보유된다. 단백질들의 발현에 적용된 미생물 세포들은 냉도-해동 순환, 초음파 파쇄, 물리적 파쇄, 또는 세포 용해제들의 사용을 포함하는 편리한 방법이라면 모두에 의해 파쇄될 수 있다; 이러한 방법들은 당업자들에게 잘 알려져 있다.
- [0088] 따라서, 예를 들면 본 명세서에서 제공된 바와 같은 본 발명의 핵산들은 다양한 발현 벡터 제작물의 어느 하나 내에 HE4a 폴리펩타이드를 발현하는 재조합 발현 제작물로서 포함될 수 있다. 이러한 벡터들 및 제작물들은 염색체성, 비염색체성 및 합성 DNA 서열들, 예로 SV40의 유도체들; 박테리아 플라스미드; 파지 DNA; 배컬로바이러스; 효모 플라스미드들; 플라스미드들의 조합들로부터 유래한 벡터들; 그리고 파지 DNA, 백시니아와 같은 바이러스성 DNA, 아데노바이러스, 조류 폭스 바이러스, 및 유사광견병 바이러스를 포함한다.
- [0089] 적당한 DNA 서열(들)은 다양한 절차들에 의해 벡터 내로 삽입될 수 있다. 일반적으로, DNA 서열은 당해 기술분



야에서 알려진 절차들에 의해 적당한 제한효소 부위(들) 내로 삽입된다. 클로닝, DNA 분리, 증폭 및 정제를 위한 표준 기법들, DNA 라이게이즈, DNA 중합효소, 제한효소 등이 관여하는 효소적 반응을 위한 표준 기법들, 및 다양한 분리 기법들이 알려져 있고 당업자들에 의해 보편적으로 적용된다. 많은 기지의 표준 기법들의 하나 이상이라면 어떠한 것도 사용될 수 있다.

[0090] 발현 벡터에서 DNA 서열은 mRNA 합성을 유도하도록 적당한 발현 조절 서열들 (예로, 프로모터 또는 조절되는 프로모터)의 적어도 하나와 작동적으로 연결된다. 이러한 발현 조절 서열들의 대표적인 예들로는 LTR 또는 SV40 프로모터, 대장균 lac 또는 trp, 파지 람다 P<sub>L</sub> 프로모터 및 원핵 또는 진핵 세포들 또는 그들의 바이러스들에서 유전자들의 발현을 조절하는 것으로 알려진 다른 프로모터들을 포함한다. 프로모터 부위들은 CAT (클로르암페니콜 전이효소) 벡터들 또는 선택가능한 마커들을 가진 다른 벡터들을 사용하여 원하는 유전자라면 모두로부터 선택될 수 있다. 두 개의 적당한 벡터들은 pKK232-8 및 pCM7이다. 특정한 명명된 박테리아 프로모터들로는 lac, lacZ, T3, T7, gpt, 람다 P<sub>R</sub>, P<sub>L</sub> 및 trp를 포함한다. 진핵성 프로모터들은 CMV 중간 초기, HSV 티미딘 키나제, 초기 및 후기 SV40, 레트로바이러스로부터 얻은 LTRs, 및 마우스 메탈로티오네인-I을 포함한다. 적당한 벡터 및 프로모터의 선택은 당업자의 수준에 바로 속하고, HE4a 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산과 작동적으로 연결된 적어도 하나의 프로모터 또는 조절되는 프로모터를 포함하는 소정의 특정하게 바람직한 재조합 발현 제작용 물질들의 제조는 본 명세서에서 기술되고 있다.

[0091] 상기에서 주목된 바와 같이, 소정의 구현예들에서 벡터들은 레트로바이러스 벡터와 같은 바이러스성 벡터일 수 있다. 예를 들면, 레트로바이러스성 플라스미드 벡터들이 유래될 수 있는 레트로바이러스들로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 몰로니 마우스 백혈병 바이러스, 비장 괴사 바이러스, 라우 육종 바이러스와 같은 레트로바이러스들, 하비 육종 바이러스, 조류 백혈증 바이러스, 기봉 유인원 백혈병 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 아데노바이러스, 골수증식성 육종 바이러스, 유선 종양 바이러스를 포함한다.

[0092] 바이러스성 벡터는 하나 이상의 프로모터들을 포함한다. 적용될 수 있는 적합한 프로모터들로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 레트로바이러스 LTR; SV40 프로모터; Miller, et al., *Biotechniques* 7: 980-990 (1989)에서 기술된 인간 사이토메갈로바이러스 (CMV), 또는 기타 다른 프로모터 (예로, 이에 제한되는 것은 아니지만 히스톤, pol III, 및 β-액틴 프로모터들을 포함하는 진핵세포성 프로모터들과 같은 세포성 프로모터들)을 포함한다. 적용될 수 있는 다른 프로모터들로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 아데노바이러스 프로모터들, 티미딘 키나제 (TK) 프로모터들, 및 B19 파코바이러스 프로모터들을 포함한다. 적합한 프로모터의 선택은 본 명세서에서 포함된 가르침으로부터 당업자에게는 명백할 것이고, 상기에 기술된 바와 같이 조절되는 프로모터들 또는 프로모터들 둘 중 하나 중에서 나올 수 있다.

[0093] 레트로바이러스 플라스미드 벡터는 생산자 세포주들을 형성하도록 포장 세포주들을 형질감염시키는 데 적용된다. 형질전환될 수 있는 포장 세포들의 예들로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 PE501, PA317, Ψ-2, Ψ-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, ΨCRE, ΨCRIP, GP+E-86, GP+envAm12, 및 DAN 세포주들을 본 명세서에서 그의 전부가 참고문헌으로 통합되어 있는 Miller, *Human Gene Therapy*, 1: 5-14 (1990)에서 기술된 바와 같이 포함한다. 본 벡터는 포장 세포들을 당해 기술분야에서 알려진 수단이라면 모두를 통해 형질감염시킬 수 있다. 이러한 수단으로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 전기천공법, 리포솜들의 사용, 및 칼슘 포스페이트 침전법을 포함한다. 한 가지 대안으로, 레트로바이러스성 플라스미드 벡터는 리포솜 내로 피막화되거나 지질과 결합되고, 다음으로 숙주로 투여될 수 있다.

[0094] 생산자 세포주는 HE4a 폴리펩타이드들 또는 융합 단백질들을 인코딩하는 핵산 서열(들)을 포함하는 감염성 레트로바이러스 벡터 입자들을 생성한다. 이러한 레트로바이러스성 벡터 입자들은 다음으로 시험관내 또는 생체내들 중 하나에서 진핵 세포들을 형질감염시키는 데 적용될 수 있다. 형질감염된 진핵 세포들은 HE4a 폴리펩타이드들 또는 융합 단백질들을 인코딩하는 핵산 서열(들)을 발현할 것이다. 형질감염될 수 있는 진핵 세포들은, 이에 제한되는 것은 아니지만 배아 줄기 세포들, 배아 암종 세포들, 뿐만 아니라 조혈 줄기 세포들, 간세포들, 섬유모세포들, 근모세포들, 각질세포들, 내피세포들, 기관지 상피 세포들, 및 다양한 기타 배양-적응된 세포주들일 수 있다.

[0095] 바이러스성 벡터가 재조합 HE4a 발현 제작물을 제조하는 데 사용되는 본 발명의 구현예의 또 다른 예로서, 바람직한 구현예에서, HE4a 폴리펩타이드들 또는 융합 단백질들의 발현을 유도하는 재조합 바이러스 제작물에 의해 형질감염된 숙주 세포들은 바이러스 출아과정 동안 바이러스 입자들에 의해 도입되는 숙주세포 막의 일부들로부터 유래한 발현된 HE4a 폴리펩타이드들 또는 융합 단백질들을 포함하는 바이러스 입자들을 생산할 수 있다. 또 다른 바람직한 구현예에서, HE4a를 인코딩하는 핵산 서열들은 배칼로바이러스 서플 벡터 내로 클론되고, 이는

다음으로 예를 들면 *Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology* Vol. 39, C. D. Richardson, Editor, Human Press, Totowa, N.J., 1995; Piwnica-Worms, "Expression of proteins in Insect Cells Using Baculoviral Vectors, 제 16장의 섹션 II에서: *Short Protocols in Molecular Biology*, 제 2판, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1992, p16-32 내지 1648에서 기술된 바와 같이, Sf9 숙주 세포들을 감염시키는 데 사용된 재조합 배큘로바이러스 발현 제작물을 생성하도록 배큘로바이러스와 재조합된다.

[0096] 또 다른 관점에서, 본 발명은 상기 기술된 재조합 HE4a 발현 제작물들을 포함하는 숙주 세포들에 관한 것이다. 숙주 세포들은, 예를 들면 클로닝 벡터, 서틀 벡터 또는 발현 제작물일 수 있는 본 발명의 벡터들 및/또는 발현 제작물들로 유전적으로 조작 (형질감염, 형질전환 또는 형질전환)된다. 벡터 또는 제작물은, 예를 들면 플라스미드, 바이러스성 입자, 파지 등의 형태로 있을 수 있다. 조작된 숙주 세포들은 프로모터들을 활성화하거나, 형질전환체를 선별하거나, HE4a 폴리펩타이드들 또는 HE4a 융합 단백질들을 인코딩하는 유전자들과 같은 특정한 유전자들을 증폭하기 위해 적당한 경우 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양될 수 있다. 발현을 위해 선택된 특정한 숙주 세포들을 위한 온도, pH 등과 같은 배양 조건들은 당업자에게 바로 명백해질 것이다.

[0097] 숙주세포는 포유동물 세포와 같은 고등 진핵세포, 또는 효모 세포와 같은 하등 진핵세포일 수 있거나, 숙주세포는 박테리아 세포와 같은 원핵세포일 수 있다. 본 발명에 따른 적당한 숙주 세포들의 대표적인 예들로는, 이에 제한되는 것은 아니지만 대장균, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*와 같은 박테리아 세포들; 효모와 같은 곰팡이 세포들; *Drosophila* S2 및 *Spodoptera* S9와 같은 곤충 세포들; CHO, COS 또는 293 세포들과 같은 동물 세포들; 아데노바이러스들; 식물 세포들, 또는 시험관내 증식에 이미 적응되거나 새로이 확립된 적합한 세포라면 모두를 포함한다. 적당한 숙주의 선택은 본 명세서에서의 가르침들로부터 당업자들의 기술 범위 내인 것으로 판단된다.

[0098] 다양한 포유동물 배양 시스템들도 재조합 단백질을 발현하는 데 역시 적용될 수 있다. 따라서 본 발명은 부분적으로 HE4a를 인코딩하는 핵산 서열과 작동적으로 연결된 적어도 하나의 프로모터를 포함하는 재조합 발현 제작물을 포함하는 숙주세포를 배양하여 재조합 HE4a 폴리펩타이드를 생산하는 방법을 지향한다. 소정의 구현예들에서, 프로모터는 본 명세서에서 제공된 바와 같이 조절되는 프로모터, 예를 들면 테트라사이클린-억제가능한 프로모터일 수 있다. 소정의 구현예들에서, 재조합 발현 제작물은 본 명세서에서 제공된 바와 같이 재조합 바이러스성 발현 제작물이다. 포유동물 발현 시스템들의 예들로는 글루즈만 (Gluzman Y.)에 의해 기술된 원숭이 신장 섬유모세포들의 COS-7 계열들을 포함한다. SV40-형질전환된 원숭이 세포들은 초기 SV40 돌연변이체들의 복제를 지원하고 (Cell, 1981년 7월;23(1): 175-82), 적합한 벡터를 발현할 수 있는 다른 세포주들은 예를 들면 C127, 3T3, CHO, HeLa 및 BHK 세포주들이다. 포유동물 발현 벡터들은 복제 원점, 적합한 프로모터 및 인핸서, 그리고 기타 필요한 리보솜 결합 부위들, 폴리아데닐화 부위, 스프라이싱 공여자 및 수여자 부위들, 전사 종결 서열들, 및 5' 끼여있는 비전사 서열들, 예를 들면 MRA 발현 제작물들의 제조에 관하여 본 명세서에서 기술된 바와 같이 포함할 것이다. SV40 스프라이싱 및 폴리아데닐화 부위들로부터 유래한 DNA 서열들은 요구된 비전사된 유전적 요소들을 제공하는 데 사용될 수 있다. 숙주세포 내로 제작물의 도입은, 이에 제한되는 것은 아니지만 예를 들면 칼슘 포스페이트 형질전환법, DEAE-덱스트란 매개된 형질전환법, 또는 전기천공법을 포함하는, 당업자들과는 친숙한 다양한 방법들에 의해 효과를 낼 수 있다 (Davis, L.G., Dibner, M.D. and Battey, J.F.: Basic Methods in Molecular Biology. Elsevier, New York, 1986).

[0099] 발현된 재조합 HE4a 항원 폴리펩타이드들 (또는 HE4a 폴리펩타이드들), 또는 이로부터 유래한 융합 단백질들은 미가공 숙주 세포들; 세포막, 세포내 소포체들 또는 기타 세포성 소기관들과 같은 미가공 소기관들; 또는 이에 제한되는 것은 아니지만 세포 균질물, 또는 용출물, 단층 및 다층 라멜라 막 소포체들 또는 기타 조제물들을 포함하는 파쇄된 세포 조제물들의 형태로의 면역원들로서 유용할 수 있다. 임의적으로, 발현된 재조합 항원 폴리펩타이드들 또는 융합 단백질들은 암모늄 설페이트 또는 에탄올 침전법, 산 추출법, 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그래피, 포스포셀룰로스 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피, 면역친화 크로마토그래피를 포함하는 친화 크로마토그래피, 하이드록시아파타이트 크로마토그래피, 및 렉틴 크로마토그래피를 포함하는 방법들에 의해 재조합 세포 배양액들로부터 회수되고 정제될 수 있다. 단백질 재접힘 단계들이 필요한 경우 성숙한 단백질의 입체형태를 완성하는 데 사용될 수 있다. 마지막으로, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)가 최종 정제 단계들을 위해 적용될 수 있다. 발현된 재조합 HE4a 항원 폴리펩타이드들 (또는 HE4a 폴리펩타이드들) 또는 융합 단백질들도 역시 일상적인 항체 검색을 위한 많은 검정 입체형태들의 어느 것으로도 표적 항원들로서 유용할 수 있고, 이는 당업자들에 의해 바로 수행될 수 있다.

[0100] 본 발명의 방법에서 사용될 특이적 항체의 생산을 위한 면역원이 되는 HE4a 항원 폴리펩타이드들 (또는 HE4a 폴

리펩타이드들)은 따라서 자연적으로 정제된 산물, 또는 화학적 합성 절차들의 산물일 수 있거나, 원핵성 숙주 또는, 바람직하게는 진핵성 숙주로부터 나온 재조합 기법들에 의해 생산될 수 있다. 재조합 생산 절차에서 적용되는 숙주에 의존하여, 관심있는 폴리펩타이드들은 당화되거나, 다른 경우라면 당해 기술분야에서 알려진 바와 같이 또한 본 명세서에서 제공된 바와 같이 해독후 변형될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0101]

도 1은 HE4a 도메인 및 인간/마우스 IgG를 포함하는 대표적인 HE4a 융합 단백질 구현예를 나타낸 것이다.

도 2는 단일클론 항체 구현예들 (12A2 및 14E2 항체들)의 전장의 HE4a, HE4a의 HE4a-V4 및 HE4a-V2 도메인들에 대한 일정 결합 특이도들을 나타낸 것이다. 본 예에서, MAbs 12A2 및 14E2는 HE4a-V2 도메인이 아닌 HE4a-V4 변이체 및 전장의 HE4a와 결합하고, 12A2 및 14E2 MAb가 HE4a N-WFDC 도메인과 결합하는 점을 가리킨다.

도 3은 기준 단일클론 항체들 (2H5 및 3D8 항체들)의 융합 단백질들에 대한 결합 특이도들을 나타낸 것이다. 본 예에서, 기준 MAbs는 HE4a-V4 도메인이 아닌 HE4a-V2 변이체 및 전장의 HE4a와 결합하고, 그들이 HE4a N-WFDC 도메인에 있는 에피토프들을 인식하는 점을 가리킨다.

도 4는 N-WFDC 및 C-WFDC HE4a 도메인들을 포함하는 HE4a의 뉴클레오타이드 및 펩타이드 서열들을 나타낸 것이다.

도 5는 대표적인 단일클론 항체들 (12A2)의 N-WFDC 및 C-WFDC에 대한 결합 상호작용을 나타낸 것이다. 본 예에서, 12A2의 결합 특이도는 MAb가 HE4a N-WFDC 파지 pVIII 융합 단백질과만 반응하였던 파지 엘라이자 포맷을 사용하여 도시된다.

도 6은 14E2 MAb의 변성 및 환원된 HE4a-hIg 융합 단백질의 반응도를 나타낸 것이다. 변성 및 환원된 HE4a-hIg 융합 단백질의 결합이 14E2 MAb가 HE4a 단백질의 선형 에피토프를 인식하는 점을 가리켰다.

도 7은 포획 MAb로서 14E2 및 검출 MAb로서 3D8 또는 12A2 MAB를 사용하는 샌드위치 면역검정법들의 용량-반응 곡선을 나타낸 것이다. 14E2 및 12A2 MAB 조합의 결과들은 그들이 동시에 결합하여 HE4a N-WFDC 도메인의 독립적인 에피토프들을 검출할 수 있는 점을 가리켰다.

도 8은 2H5 MAB와 조합으로 12A2 및 14E2 MAB의 일정 대표적인 샌드위치 면역검정법들 및 결합을 나타낸 것이다. 본 예에서, MAB 12A2 및 14E2는 전장의 HE4a와만 반응하였던 한편, MAB 조합 3D8 및 2H5는 FL HE4a 및 HE4a-V2 변이체 둘 다와 반응하였다. 결과는 또한 12A2 및 14E2 MAB가 HE4a N-WFDC 도메인에서 노출된 에피토프를 인식하는 증거들을 지지한다.

도 9는 전장의 HE4a EIA의 용량-반응 곡선을 나타낸 것이다. 본 검정법은 포획 항체로서 2H5 MAB 및 검출 MAB로서 HRP 결합된 12A2 MAB를 기초로 하였다. 절차는 실시예 3에서 기술된 바와 같이 수행되었다.

도 10은 건강한 개체들, 비악성 산부인과 질환들 및 난소암을 가진 환자들에서 실시예 3에서 기술된 바와 같이 FL HE4a EIA에서 결정된 HE4a 수준들을 나타낸 것이다.

도 11은 난소암의 임상적 경과를 감시하기 위한 대표적인 전장의 HE4a 면역검정법을 나타낸 것이다. (SD = 안정한 질환; R = 반응성; PD = 진행성 질환). 본 예에서, 전장의 HE4a는 진단된 난소암을 가진 환자들의 질환의 임상적 경과를 추적하는 데 전장의 HE4a가 유용할 것으로 도시된다.

도 12는 HE4a N-WFDC 도메인에 특이적인 대표적인 MAB를 사용하여 비악성 및 악성 난소 조직들의 IHC를 나타낸 것이다. 본 예에서, 대표적인 12A2 MAB는 난소암에서 암 세포들과 강하게 결합하지만, 양성 종양들에서 세포들과는 결합하지 않았다. A: 장액 샘암종; B: 장액 샘암종; C: 자궁내막 난소 암종; D: 장액 샘암종; E: 섬유종; F: 섬유난포막종.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0102]

본 개시의 주제 문제는 지금 다음의 실시예들을 참조하여 기술된다. 이들 실시예들은 단지 설명의 목적으로만 제공되고, 주제 문제는 이들 실시예들에 제한되지 않으며, 오히려 본 명세서에서 제공된 가르침의 결과로서 분명한 모든 변화들을 포괄한다.

[0103]

#### 실시예들

[0104]

본 명세서에서 기술된 실험들 이전에, 면역세포화학 (IHC) 검정법 포맷을 사용하여 개체로부터 얻은 시료에서

HE4a의 N-WFDC 도메인의 최적의 측정을 허용하는 공개된 프로토콜이 존재하지 않았다. 본 개시의 관점들 및 구현예들은 12A2 및 14E2 단일클론 항체들이 전장의 HE4/HE4a의 존재를 평가하는 데 동시에 또는 조합으로 사용될 때 놀랍고도 예기치 않은 유용성 및 효능을 가지는 예기치 않은 발견으로부터 유래한다.

[0105] 본 명세서에서 기술된 실험들에서는, 예기치 않은 증진된 / 강화된 효능을 허용하는 여러 인자들이 발견되었다. 예를 들면, 2H5/3D8과의 소정의 조합들로 12A2/14E2 항체들을 사용하여, 더욱 특이적인 전장의 HE4 인식 및 결합 프로파일들이 획득될 수 있다. 또한, 테스트 난소암 시료들에서 HE4의 (전장의 HE4 시료들을 포함함) 분석 과정 동안, 2H5 또는 3D8과의 조합으로 12A2 또는 14E2 항체들의 사용은, IHC, 그 결과로 나온 해당하는 임상적 데이터 및/또는 질환 상관성을 포함하는 대표적인 진단적 검정법에서 예기치 않은 감소된 기저값 및/또는 놀랍게도 HE4 프로파일들의 평가에서 개선된 해상도를 나타내었다.

[0106] 예로서, HE4 단일클론 Ab의 생산에서 면역접종을 위한 재조합 HE4 융합 단백질들이 개발되었다.

[0107] 실시예 1

[0108] 재조합 전장의 HE4ahIg/mIg, HE4a-V4HIg/mIg 및 HE4a-V2- hIg/mIg 융합 단백질들의 생산: 고-처리량 HE4a cDNA 클론으로부터 융합 제작물의 제작까지 HE4a (WFDC2) cDNA의 증폭

[0109] HE4a (WFDC2) 유전자는 마우스를 면역접종하고 단일클론 항체들 (MAbs)를 획득하기 위하여 융합 단백질을 제작 하도록 IgG를 인코딩하는 유전자들과 조합되었다. 마우스가 융합 단백질들에 대해 마우스 Ig 말단으로 면역화 되었고 하이브리도마들이 융합 단백질들에 대해 인간 Ig 말단으로 검색되었다. 연속하여, 이중 결정기 (샌드위치) ELISA가 현상되었다.

[0110] HE4a의 mRNA 서열이 키르코프 등 (Kirchoff et al., 15, 22)에 의해 원래 발표되고 진뱅크 (기탁번호 제 X63 187호)에서 기탁된 바와 같이 HE4a를 인코딩하는 cDNA를 클론하도록 설계된 올리고뉴클레오타이드 프라이머를 위한 기초를 제공하였다. HE4a cDNA를 클론하기 위하여, RNA가 난소 종양들, 정상 부고환 그리고 4007 및 OVCAR3 (24)를 포함하는 여러 난소 종양 세포주들로부터 TRIzol (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)를 제조사의 지침들에 따라 제조되었다. cDNA는 1 내지 3 $\mu$ g의 RNA, 무작위 육량체들, 및 슈퍼스크립트II 역 전사효소 (Life Technologies, Inc.)를 제조사의 지침들에 따라 사용하여 제조되었다. HE4a cDNA는 표준 조건 들을 사용하여 무작위 감작된 cDNA로부터 PCR 증폭되었다. 전장의 HE4a를 위한 기대된 크기의 PCR 산물들이 획득된 다음 클론되었다. 서열 분석은 키르코프 등의 서열과 대비한 차이들을 확인하였고 진뱅크에 기탁된 (기탁 번호 제 AY212888호) HE4a를 위한 교정된 서열이 융합 단백질들을 제작하는 데 사용되었다. 서열 확인된 전장의 E4a 유전자를 포함하는 cDNA 단편들이 pSPORT 내로 클론되었고, 본 플라스미드 DNA는 융합 클론들의 제작을 위한 PCR 주형으로서 사용되었다.

[0111] 인간 또는 마우스 IgG Fc 도메인과 융합된 완전한 HE4a 유전자 산물을 도입한 융합 단백질들이 제작되었다. 클로닝을 위한 적당한 제한효소 부위들을 인코딩하고 최종 제작물을 위해 단백질 도메인들의 필요한 프레임에 맞춘 융합들을 만드는 프라이머들이 설계되었다. 5' 프라이머 (서열번호 XX: 5'-GTTGTTAAGC TTGCCGCCAT GCCTGCTGT CGCTAGGC-3')는 HindIII 부위, 첫 번째 ATG와 인접한 발현을 개선하는 코작 서열, 및 HE4a 서열을 기초로 하는 HE4a 리더 펩타이드의 일부를 포함하였다. 3' 프라이머 (서열번호 XX: 5'-GTTGTTGGAT CCGAAATTGG GAGTGACACA GGACAC-3')는 인간/마우스-Ig 말단 cDNA와 융합을 위한 프레임을 맞춘 BamHI 부위를 STP 코돈 바로 전에 절단된 HE4a 코딩 서열의 3' 말단과 함께 포함하였다. PCR 증폭 반응들이 제조사의 지침들에 따라 (ExTaq; Takara Bio, Inc., Otsu, Shiga, Japan) 주형으로서 100 ng의 HE4a/pSPORT 플라스미드 및 30회의 증폭 (94 $^{\circ}$ C에서 1분, 55 $^{\circ}$ C에서 1분, 및 72 $^{\circ}$ C에서 30초)을 사용하여 수행되었다. 전장의 HE4a를 위한 기대된 크기 (400 bp)의 PCR 산물들이 획득된 다음 QIAquick PCR 정제 키트 (Qiagen, Valencia, CA)를 사용하여 정제되었다. 정제된 PCR 단편들은 제한효소로 소화되었고 QIAEx II 젤 추출 키트 (Qiagen)를 사용하여 정제되었으며, 이전에 기술된 바와 같이 pCDNA3의 유도체인 포유동물 발현 벡터 pD18 내로 마우스 IgG2a Fc (mIgG2a) 및 인간 IgG1 Fc (hIgG1)와 융합으로 라이게이션되었다. 도 1은 FL HE4a-mIgG2a 및 FL HE4a-hIgG1 cDNA 제작물들이 pD18의 복수의 클로닝 부위 내로 HindIII-XbaI 단편으로서 삽입되는 방식을 모식적으로 나타낸다.

[0112] 라이게이션 산물들은 DH5 $\alpha$  박테리아 세포들 내로 형질전환되었고, 형질전환체들은 FL HE4a-mIgG2a 및 FL HE4a-hIgG1 융합 유전자 삽입체들의 존재에 대해 검색되었고 서열 분석에 의해 확인되었다. 또한, 단백질 발현이 이들 분리물들로부터 얻은 플라스미드 DNA를 기술된 바와 같이 DEAE-텍스트란 기법에 의해 COS7 세포들을 일시적으로 형질전환하는 데 사용하여 검증되었다. 배양 상청액들이 72시간 이후에 수확되었고 단백질 아가로스 (Repligen, Cambridge, MA), 환원화 SDS-PAGE 전기영동, 및 웨스턴 블롯으로 면역침전법에 의해 검색되었다.



웨스턴 블롯들은 염소 항인간 IgG 호스래디쉬 퍼옥시다제 결합체 (Caltag, Burlingame, CA)를 1:5000에서 사용하여 프로브화 되었고, 증진된 화학발광 현상과정 (Amersham, Little Chalfont, United Kingdom)이 이어졌다. IgG1 Fc 말단 (pD18-HE4a-hIgG 플라스미드)와 융합으로 서열 확인된 HE4a 유전자를 가진 플라스미드 DNA가 빙글 등의 출판물에서 기술된 HE4a 스프라이싱 변이체들 HE4a-V4 및 HE4a-V2의 증폭 및 클로닝을 위한 주형으로서 사용되었다 (Bingle L., Singleton V., Bingle C. D. The putative ovarian tumour marker gene HE4 (WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. Oncogene, 21: 2768-2773, 2002). HE4a-V4 및 HE4a-V2 스프라이싱 변이체들은 상기 전장의 HE4a를 위해 기술된 바와 같이 마우스 및 인간 IgG Fc와 융합으로 클론되었다. 증폭에 사용된 뉴클레오타이드 프라이머들은 하기에 나열된다.

[0113] HE4a-V4의 경우:

[0114] 전방 프라이머 서열번호 3:

[0115] 5'-GTTGTTACCGGTGCAGCAGAGAAGACTGGCGTGTGCCCC-3'

[0116] 역방 프라이머 서열번호 4:

[0117] 5'-AATCTCCAGAGCCTCCGTGTCTTTAGGTGCCAGTGAACAGTGCATTGGGCAGAGAGCA-3'

[0118] HE4a-V2의 경우:

[0119] 전방 프라이머 서열번호 5:

[0120] 5'-GTTGTTACCGGTGCAAAGGAGGGTCTCTGCCCCAG-3'

[0121] 역방 프라이머 서열번호 6:

[0122] 5'-GTTGTTGGATCCGAAATTGGGAGTGACACAGGA-3'

[0123] HE4aIg 융합 단백질들의 생산

[0124] 전장 HE4a-mIgG2a 및 HE4a-hIgG1 cDNA 제작물들 그리고 HE4a-V4 및 HE4a-V2 스프라이싱 변이체들을 가진 해당 하는 제작물들의 안정한 세포주들이 확립되었다. CHO-DG44 세포들이 관심있는 융합 단백질들의 높은 수준들을 발현하는 안정한 세포주들을 제작하는 데 사용되었다. 안정한 CHO 세포주들이 플라스미드 제작물들의 고사본수 전기천공 및 제조함 인슐린 (Life Technologies, Inc.), 소듐 피루베이트 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA), L-글루타민 (Invitrogen Corp.), 2×비필수 아미노산들 (Invitrogen Corp.), 및 100 nM 메토틱세이트 (Sigma, St. Louis, MO)를 포함하는 302 CHO 배지 media (JRH Biosciences, Denver, PA)로 제한 희석에 의한 메토틱세이트-저항성 클론들의 선별에 의해 제작되었다. 다음으로 저항성 클론들로부터 얻은 배양 상청액들은 높은 생산 계열들에 대해 검색하도록 IgG 샌드위치 ELISA에 의해 검정되었다. 사용된 상청액들은 대규모 배양액들로부터 수확되었고, IgG 융합 단백질이 프로테인 A 친화 크로마토그래피에 의해 정제되었고, 이후에 융합 단백질은 웨스턴 블롯팅에 의해 검토했다 (데이터 미도시). HE4a-hIgG1 융합 단백질은 환원된 젤들 또는 웨스턴 블롯들 상에서 예측된 아미노산 서열을 기초로 하여 기대된 Mw 36,000보다 큰 Mw 48,000의 외관상 분자량으로 이동하였고, 분자가 당화되었던 점을 제시하고 있다. 안정한 형질전환체들이 BALB/c 마우스의 면역접종을 위해 충분한 단백질을 생산하는 데 사용되었다.

[0125] 예로서, HE4a N-WFDC 도메인에 특이적인 하이브리도마들 및 단일클론 항체들이 개발되었다.

[0126] 실시예 2

[0127] HE4a N-WFDC 도메인에 특이적인 하이브리도마들 및 단일클론 항체들의 확립

[0128] BALB/c 마우스가 HE4a-V4 mIgG로 격주로 5번 또한 FL HE4a로 6번 면역접종되었다. 최종 면역접종 이후 3일째, 마우스가 희생되었고, 하이브리도마들이 이전에 메소텔린을 위해 기술된 바와 같이 만들어졌다. 하이브리도마 상청액들은 HE4a-V4 hIgG 상에서 검색되었고, 하이브리도마들 12A2 및 14E2은 HE4a-V4 hIgG와의 그들의 반응성을 기초로 하여 선별되었다. 하이브리도마들은 표준 절차들에 따라 두 번 클론되었고, 선택된 클론들은 HE4a N-WFDC MAb를 생산하는 데 사용되었다. 단일클론 항체들이 DMEM, 5% 우태아혈청을 넣은 회전병들에서의  $10^4$ 개 세포들/mL의 접종에 의한 하이브리도마 클론들의 시험관내 배양에 의해 생산되었고 10 내지 14일 동안 성장하도록 허용되었다. 다음으로 단일클론 항체들은 제조사의 추천사항에 따른 프로테인 A 친화 크로마토그래피에 의



해 배양 배지로부터 정제되었다.

[0129] 실시예 3

[0130] E4a N-WFDC 도메인에 대한 mAb의 결합 특이도의 특성분석

[0131] 3.1 hIgG HE4a 융합 단백질들의 반응도

[0132] 12A2 및 14E2 MAb의 특이도가 다음으로 FL HE4a, HE4a-V4 및 HE4a-V2 hIgG 융합 단백질들 상에서 엘라이자로 테스트되었다. 12A2 및 14E2 MAb는 카보네이트-바이카보네이트 완충액 (C-3041; Sigma)에 넣은 MAb's (10 $\mu$ g/mL)의 배양에 의해 마이크로타이터 플레이트의 웰들에서 코팅되었다. 상청액의 제거 이후에, 웰들은 200  $\mu$ L/웰의 GSC 차단 완충액 (Genetic Systems, Seattle)으로 2시간 동안 실온에서 차단되었다. 이것은 0.1% 트윈을 포함하는 PBS로 200  $\mu$ L/웰의 네 번의 세척으로 이어졌다.

[0133] MAb 코팅된 웰들은 다음으로 100  $\mu$ L/웰의 FL HE4a, HE4a-V4 및 HE4a V2와 2시간 동안 배양되었다. 다음으로 결합된 hIgG HE4a 융합 단백질은 HRP 결합된 항-hIgG1와의 배양 및 OD 450 nm의 결정에 의해 검출되었다.

[0134] 12A2 및 14E2 MAb는 전장의 HE4a 및 HE-V4와 반응하였고, 그들이 HE4a N-WFDC 도메인에 특이적인 점을 가리켰다 (도 2).

[0135] 3D8 및 2H5 MAb의 특이도도 역시 동일한 방법론을 사용하여 기준 MAb's로서 테스트되었다.

[0136] 3.2 파지 융합 단백질들로서 전시된 HE4a 도메인들과의 반응도

[0137] HE4a N-WFDC 도메인에 대한 12A2 및 14E2 MAb의 특이도는 또한 파지 외부 단백질 pVIII을 가진 융합 단백질들로서 발현된 HE4a N-WFDC 도메인 및 HE4a C-WFDC 도메인에 대한 반응도를 파지 엘라이자로 테스트하여 검증되었다.

[0138] OvCar-3 세포들로부터 분리된 mRNA로부터 제조된 cDNA는 파지 디스플레이 벡터 f88-4에서의 클로닝을 위한 C- 및 N-말단 WFDC 부위들을 코딩하는 유전자 부분들의 PCR 증폭을 위한 주형으로서 작용하였다. 표 2에 나열된 PCR 프라이머 쌍들이 아미노산 잔기들 31 내지 75번 (N-WFDC) 및 76 내지 124번 (C-WFDC)의 코딩 부위들의 증폭을 위해 각각 제작되었다. 5'-말단들에서 pVIII 신호 펩타이드 및 pVIII 성숙한 외부 단백질과 융합으로 클로닝을 위해 HindIII 및 PstI의 제한효소 부위들이 삽입되었다. 표 2는 HE4a N- 및 C-WFDC의 증폭에 사용되는 PCR 프라이머들을 나타낸다.

표 2

프라이머	서열	WFDC
W1F	5'-TGCTAAGCTTTGCCGAGAAGACTGGCGTGTGCCC-3'	N-WFDC
W1R	5'-CCTTCTGCAGGATCATTTGGGCAGAGAGCAG-3'	N-WFDC
W2F	5'-TGCTAAGCTTTGCCAAGGAGGGTTCCTGCCCCCA-3'	C-WFDC
W2R	5'-CCTTCTGCAGGGAATTGGGAGTGACACAGGA-3'	C-WFDC

[0139]

[0140] WFDC 부위들은 1  $\mu$ M의 각각의 전방 및 역방 프라이머, 75 mM 트리스-HCl (25 $^{\circ}$ C에서 pH 8.8), 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% (v/v) 트윈 20, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.02 u/ $\mu$ L Taq-중합효소 (Abgene, Surrey, UK) 및 0.1 mM의 각각의 테옥시 뉴클레오타이드를 포함하는 반응 혼합물의 25  $\mu$ L의 최종 부피에서 다음의 30회 반복된 온도 순환으로 0.5  $\mu$ L의 cDNA로부터 별도로 증폭되었다: 95 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C 및 72 $^{\circ}$ C에서 30초 배양들.

[0141] PCR 산물들 및 HindIII 및 PstI으로 소화된 f88-4는 다함께 라이게이션되었고 대장균 JM109 내로 형질전환되었으며 이후에 클론들은 테트라사이클린을 가진 LB 플레이트들 상에서 선별되었다. 각각의 제작물의 두 개의 클론들이 대장균 JM109에서 증폭되었고 이증가당 DNA가 DNA 서열결정을 위해 제조되었다. DNA 서열결정은 Big dye 터미테이터 v1.1 순환 시퀀싱 키트 및 f88-4 벡터 특이적 프라이머를 사용하여 수행되었다. 서열결정 반응들은 분석을 위해 CyberGene AB (Huddinge, Sweden)에 보냈다. 미가공 서열 데이터는 무료 소프트웨어 크로마스 버

전 1.45 (Technelysium Pty Ltd., Australia)을 사용하여 분석되었다. 뉴클레오타이드 서열결정은 리더 펩타이드 및 성숙한 파지 외부 단백질 pVIII와 프레임에 맞춘 삽입을 확인하였다. HE4a 삽입체들은 HE4a 서열 (기탁 번호 제 AY212888호)과의 일치도를 보여주었다 (도 4).

[0142] 파지 엘라이자

[0143] 서열 확인된 파지 클론들은 증폭되었고, 정제되었고, PEG/NaCl로 농축되었고, 파지 엘라이자 검정법에서 항원으로 사용을 위해 PBS에 녹인 1% BSA로 희석되었다. PBS에 녹인 1% BSA로 1 ug/mL로 희석된 MAb 3D8 및 2H5 그리고 100 uL의 클론 배지에 넣은 MAb 12A2는 염소 항 마우스 IgG (Jackson Immuno Research)로 코팅된 웰들 (100 uL/웰)에 고정되었다. 플레이트들은 밀봉되었고 실온에서 밤샘 보관되었다. HE4a MAb로 코팅된 웰들은 세 번 세척되었고 100 uL/웰 부피의 파지 입자들이 첨가되었다. 2시간 배양 이후에, 웰들은 세척되었고 토끼 항-M13 항체 (손수 확립됨)가 첨가되었다. 배양 및 세척 이후에, HRP 표지된 돼지 항-토끼 항체 (Dako)가 첨가되었다. 최종 세척 이후에, TMB 기질이 첨가되었고 플레이트는 5분 배양 이후에 620 nm에서 측정되었다 (도 5).

[0144] N-WFDC 및 C-WFDC 도메인들을 사용한 파지 엘라이자 연구들은 파지 단백질 pVIII를 가진 융합 단백질들을 전시하였고, HE4a-V2, HE4a-V4 및 FL HE4a hIgG1 융합 단백질들에 대한 반응도는 12A2 및 14E2 MAb가 HE4a N-WFDC 도메인에 특이적인 점을 검증하였다.

[0145] 3.3 12A2 및 14E2 MAb's에 의해 인식된 에피토프들의 특성분석

[0146] 12A2 및 14E2 MAb에 의해 인식되는 에피토프들의 유형, 예로 선형 또는 입체형태 의존성 에피토프들은 변형된 및 환원된 HE4a 항원에 대한 항체들의 반응성을 테스트하여 결정되었다. 전장의 HE4a-hIgG1를 생산하는 안정한 세포주로부터 얻은 사용된 배지는 미희석되고 5번 희석되어, 70°C에서 변형되었고 환원화 조건들 하에서 SDS-PAGE로 분리되었다. 단백질들은 PVDF 막 상에 표준 기법들에 따라 블롯팅되었다. 일차 HE4a 항체들과 막을 배양한 이후에, 결합된 항체들은 HRP 돼지 항-마우스 항체 (Dako)에 의해 추적되었다. HRP 항체는 에머삼™ ECL™ 검출 시스템들을 사용한 화학발광에 의해 검출되었다.

[0147] MAb 12A2는 변성된 및 환원된 HE4a 항원 (데이터 미도시)에 대한 반응성을 전혀 보여주지 않았고 항체가 입체형태 의존성 에피토프를 인식하는 점을 가리켰다. 한편 MAb 14E2는 당화된 HE4a-hIgG1 융합 분자의 기대된 크기인 대략 48 kDa 의 밴드에 특이적 염색을 보여주었다. 더 높은 항원 농도를 가진 레인에서는, 약 두 배 크기의 밴드가 관찰되었다. 본 밴드는 Fc 부분에서 디설파이드 결합들이 완전하게 부서지지 않은 항원의 이량체를 재연하고 있다, 웨스턴 블롯 데이터는 MAb 14E2가 선형의 에피토프를 인식하였던 점을 가리킨다 (도 6).

[0148] 3.4 확립된 HE4 N-WFDC 특이적 항체들의 독립적인 에피토프들

[0149] 변성되고 환원된 HE4a 항원에 대한 12A2 및 14E2 MAb의 반응성에서의 차이는 두 개의 항체들이 HE4a N-WFDC 도메인의 두 개 독립적인 에피토프들을 인식하였던 점을 가리킨다.

[0150] 12A2 및 14E2 MAb에 의한 HE4a N-WFDC 도메인에서 독립적인 에피토프들의 인식은 또한 샌드위치 면역검정법에서 12A2 및 14E2 MAb를 조합하여 검증되었다. MAb 14E2가 포획 MAb로서 검출 항체로서 HRP 표지된 MAb 12A2 및 HE4a 항원과의 용량 반응 곡선의 결정과 조합으로 사용되었다. 농축된 하이브리도마 배지에서 MAb 14E2가 염소 항-마우스 항체 (Jackson ImmunoResearch Lab)로 코팅된 마이크로웰들에서 포획되었다. 세척 이후에, HE4a EIA 키트 (Fujirebio Diagnostics Inc)로부터 얻은 25 uL의 HE4a 항원 (0 내지 900 pM)이 첨가되었고 이후에 HRP-표지된 12A2 MAb가 첨가되었다. 대조군 실험으로 평행한 전개가 14E2 MAb 고체상 및 HE4a EIA에서 사용된 HRP 표지된 추적자 MAb 3D8로 수행되었다. MAb 3D8는 C-말단 WAP 부위를 표적하는 것으로 알려져 있고 따라서 MAb 14E2와의 샌드위치 EIA 쌍을 형성해야 한다. 배양 및 세척 단계들 이후에, TMB 기질이 첨가되었고 흡광도가 30분 배양 단계 이후에 620 nm에서 분석되었다. MAb 3D8 및 12A2 둘 다는 MAb 14E2와 용량-반응 곡선을 보여주었다 (도 7).

[0151] 12A2 MAb 및 14E2 MAb의 샌드위치 면역검정법의 양성 용량 반응 곡선은 환원된 HE4a 항원과 그들의 서로 다른 반응성에 추가하여, MAb 14E2 및 MAb 12A2가 HE4a N-WFDC 도메인에 특이적 독립적인 에피토프들을 인식하는 점을 증명하였다.

[0152] 전장의 HE4a에 특이적인 면역검정법들도 역시 개발되었다.

[0153] 실시예 4

- [0154] 전장의 HE4a에 특이적인 면역검정법들의 확립
- [0155] 전장의 HE4a (FL HE4a)에 특이적 검정법들이 N-WFDC 및 C-WFDC 도메인에 특이적인 항체들을 사용하여 설계되었다.
- [0156] 본 발명의 한 가지 관점에서, HE4a N-WFDC 도메인에 특이적인 항체들은 전장의 HE4a에 특이적인 면역검정법의 설계를 허용하도록 HE4a C-WFDC 도메인에 특이적인 항체와 조합되었고, 반면 HE4a N-WFDC, HE4a C-WFDC 도메인들 또는 HE4a-V4 또는 HE4a-V2 변이체들의 어느 하나를 검출하는 데 실패하였다.
- [0157] 처음 실험에서, HE4a C-WFDC 도메인 (Hellstrom et al; The HE4 (WFDC2) Protein Is a Biomarker for Ovarian Carcinoma; *Cancer Res* 2003sus 7월 1일, 63: 3695)에 대해 반응성을 가진 본 발명에 따른 12A2 MAb 및 14E2MAb가 포획 항체로서 HE4a C-WFDC 도메인에 대한 반응성을 가진 2H5 MAb를 검출 항체로서 사용하는 샌드위치 검정법에서 사용되었다. 샌드위치 검정법들에서, 서로 다른 포획 MAbs가 실시예 2에서 기술된 바와 동일한 절차를 사용하여 마이크로타이터 웰들에 고정되었고 FL HE4a, HE4a-V4 및 HE4a-V2 도메인의 hIgFc 융합 단백질들과 배양되었다. 결합된 HE4a 단백질들은 다음으로 바이오틴화된 2H5 MAb와 배양에 의해 검출되었고 스트렙트아비딘 HRP와의 배양 및 OPD HRP 기질과의 배양 이후에 OD 450 nm의 결정이 이어졌다. 샌드위치 검정법은 2H5 MAb와의 조합으로 12A2 MAb 또는 14E2 MAb의 조합이 FL HE4a 융합 단백질을 검출하는 한편, 3D8 MAb 및 2H5 MAb의 조합은 FL HE4a 및 HE4a.V2 변이체 둘 다를 검출하였던 점을 보여주었다 (도 8).
- [0158] FL HE4a에 특이적인 면역검정법의 설계를 위한 바람직한 입체형태에서, 2H5 MAb가 포획 항체로서 12A2 MAb가 검출 항체로서 사용되었다. 2H5 MAb는 표준 절차들을 사용하여 바이오틴-NHRS 카프로에이트 에스테르 (Sigma Chemical Co, US)로 바이오틴화되었고 포획 항체로서 사용되었다. 12A2 MAb는 니콘 절차의 변형에 따라 HRP와 결합되었다. 바이오틴화된 2H5 MAb 및 HRP 결합된 12A2 MAb는 다음의 프로토콜에 따라 한-단계 EIA에서 사용되었다.
- [0159] 검정 절차
- [0160] 1. 25  $\mu$ L의 FL HE4a-hIgG 재조합 항원 (PBS, 60 g/L BSA, pH 7.2에 녹인 0 내지 1000 pM) + 100  $\mu$ L의 바이오틴 2H5 MAb, 1  $\mu$ g/mL 및 HRP 12A2 MAb, 스트렙트아비딘 코팅된 마이크로타이터 플레이트들 (Kaivogen Oy, Turku, 핀란드) 상에서 검정 완충액에 녹인 1  $\mu$ g/mL을 첨가한다.
- [0161] 2. 진탕하면서 1시간 $\pm$ 10분 동안 배양한다.
- [0162] 3. 5 mM 트리스 완충액, 0.05 % 트윈 40, pH 7.75로 6번 세척한다.
- [0163] 4. 100  $\mu$ L의 TMB (Neogen, US)를 첨가한다.
- [0164] 5. 30분 $\pm$ 5분 동안 배양한다.
- [0165] 6. 엘라이자 해독기에서 OD 620 nm를 결정한다.
- [0166] PBS, 60g/L BSA로 희석된 HE4a-hIgG를 사용한 용량-반응 곡선의 예는 도 9에 나타나 있다. 검정법의 민감도는 < 5 pM이었고, 이는 건강한 개체들에서 관찰되는 수치보다 유의하게 더 낮았다. 따라서 본 검정법은 건강한 개체들 및 기지의 또는 의심된 난소암을 가진 개인들에서 FL HE4a의 결정에 적합할 것이다.
- [0167] 본 연구의 목적은 새로운 12A2 MAb의 적합성을 대표적인 검정법 포맷에서 전장의 HE4의 존재를 평가하는 데 있어 그들의 능력들을 측정하여 평가하는 것이다.
- [0168] 실시예 5
- [0169] 전장의 HE4a에 특이적인 면역검정법들을 사용한 난소암의 진단
- [0170] 본 개시의 한 가지 관점에서, 항체들이 난소암의 혈청학적 진단을 위한 면역검정법들을 설계하는 데 사용되었다. 실시예 3에서 기술된 바와 같이 12A2 MAb와 조합으로 2H5 MAb를 사용한 FL HE4a의 면역검정법은 건강한 개인들, 비악성 산부인과 질환을 가진 환자들 및 난소암을 가진 환자들로부터 얻은 혈청 시료들에서 전장의 HE4a의 농도들을 결정하는 데 사용되었다.
- [0171] FL HE4a의 수준들은 비악성 산부인과 질환을 가진 환자들 또는 건강한 개체들과 대비하여 난소암을 가진 환자들에서 유의하게 더 높았다 ( $p < 0.001$ ) (표 3, 도 10). 표 3은 건강한 개체들, 비악성 산부인과 질환을 가진 개인들 및 난소암을 가진 환자들에서 HE4a 수준들을 나타낸다.

표 3

	n	HE4A pM 평균	95% CI		SE	SD
건강한 개인	50	84	77	to 91	3,4	24,4
산부인과 질환 개인	82	122	98	to 146	11,9	108,5
난소암 환자	25	2967	319	to 5614	1282,8	6413,8

[0172]

[0173] 본 연구의 목적은 새로운 12A2 MAb/전장의 HE4 검정법 포맷의 적합성을 난소암의 경과를 결정하고 감사하는 데 그들의 능력들을 측정하여 평가하는 것이다.

[0174] 실시예 6

[0175] FL HE4a의 결정에 의한 난소암에서 질환의 경과를 감시하는 단계

[0176] 본 발명의 또 다른 관점에서, 실시예 3에 따른 FL HE4a의 결정을 위한 면역검정법들이 진단된 난소암을 가진 환자들에서 질환의 임상적 경과를 추적하는 데 사용되었다.

[0177] 난소암을 가진 세 명의 환자들에서 FL HE4a 수준들이 도 11에서 질환의 임상적 경과 동안 관찰되었다. FL HE4a 수준들은 질환의 임상적 경과를 따랐으며, 난소암의 치료법의 효과뿐만 아니라 재발성 질환의 검출에도 적합할 것이다.

[0178] 예로서, 본 연구의 목적은 조직 시료들에서 HE4를 결정하는 데 새로운 12A2 MAb/전장의 HE4 검정법의 적합성을 평가하는 것이다.

[0179] 실시예 7

[0180] 조직 절편들에서 HE4a의 결정에 의한 난소암의 진단

[0181] 본 발명의 추가적인 관점에서, 난소암의 진단 방법이 의심된 난소암을 가진 환자로부터 획득된 조직들 또는 세포들과 HE4a의 N-WFDC 도메인에 특이적인 항체들을 배양하는 단계 및 조직 또는 세포들과 항체들의 결합에 의해 제공된다.

[0182] 조직 어레이 슬라이드들 (Super Bio Chips)이 제조사의 지침에 따라 탈파라핀화되었다. 항원 복구를 위해, 슬라이드들은 10 mM 시트레이트 완충액 pH 6.0에서 10분 동안 전자레인지에 돌렸다. 내인성 퍼옥시다제가 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 5분 동안 배양에 의해 소멸되었다. 바람직한 입체형태로, 조직 절편들은 12A2 MAb와 실온에서 1시간 동안 배양되었다. 결합된 12A2 MAb의 영상화를 위해 EnVision+ 시스템-HRP (Dako AS, Denmark)가 제조사의 지침들에 따라 사용되었다. 슬라이드들은 헤마톡실린 (Dako Cytomation)으로 반대염색되었고, 표본제작되었으며 현미경으로 분석되었다. 서로 다른 난소암 절편들 (도 12A 내지 12D)은 HE4a N-WFDC에 대해 염색되었던 한편 비-암성 조직들로부터 얻은 조직들은 음성이었다 (도 12E 내지 12F).

[0183] 모든 특허들, 출판물들, 과학적 논문들, 웹사이트들, 및 본 명세서에서 참조하거나 언급된 기타 문헌들 및 재료들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 당업자들의 기술 수준들을 가리키고, 각각의 이러한 참고된 문헌 및 재료는 이것이 개별적으로 그의 전부가 참고문헌으로 통합되거나 본 명세서에서 그의 전부가 개시되었던 것과 동일한 정도로 본 명세서에 의해 참고문헌으로 통합되어 있다. 본 출원인들은 본 명세서 내로 이러한 특허들, 출판물들, 과학적 논문들, 웹사이트들, 전자적으로 입수가능한 정보, 및 기타 참조된 재료들 또는 문헌들이라면 모두로부터 나온 어떠한 및 모든 재료들 및 정보를 물리적으로 통합하도록 권리를 보유하고 있다.

[0184] 적용되었던 용어들 및 표현들은 제한이 아닌 상세한 설명의 용어들로서 사용되고, 이러한 용어들 및 표현들의 사용에서 관찰되고 기술된 특징들 또는 그들의 일부들의 동등물이라면 어느 것도 배제하는 의도는 전혀 없지만, 다양한 변형들이 청구된 바와 같이 본 발명의 범위 내에서 가능한 것으로 인식된다. 따라서, 본 발명이 바람직한 구현예들 및 선택적 특징들에 의해 상세하게 기재되었더라도, 본 명세서에서 기재된 개념들의 변형 및 변화는 당업자들에 의해 재선택될 수 있고, 또한 이러한 변형들 및 변화들이 첨부된 청구항들에 의해 정의된 바와

같이 본 발명의 범위 이내에 속하는 것으로 고려되는 점이 이해될 것이다.

[0185] 본 발명은 광범위하게 또한 일반명으로 본 명세서에서 기술되었다. 일반명 개시 내에 속하는 더 협소한 종들 및 소일반명 그룹들의 각각도 역시 본 발명의 부분을 형성한다. 이것은 배제된 재료가 본 명세서에서 재인용되는지 여부와는 상관없이, 속명으로부터 나온 개체 문제라면 모두를 배제하는 단서 또는 부정적 제한을 가진 본 발명의 일반명 상세한 설명을 포함한다.

[0186] 다른 구현예들이 다음의 청구항들 내에 속한다. 또한, 본 발명의 특징들 또는 관점들이 마쿠시 그룹들의 견지에서 기술되는 경우, 당업자들이라면 본 발명이 마쿠시 그룹의 개별 구성원 또는 구성원들의 소그룹의 견지에서도 역시 기술되는 것으로 인식될 것이다.

## 수탁번호

[0187]

기탁기관명 : 유러피안 콜렉션 오브 셀 컬처스

수탁번호 : ECACC10091401

수탁일자 : 20100914

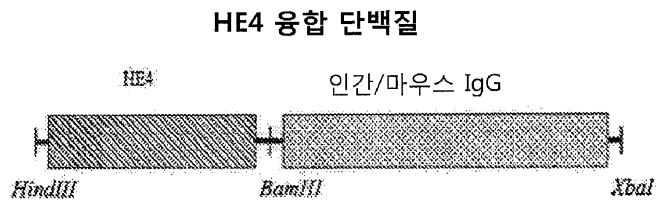
기탁기관명 : 유러피안 콜렉션 오브 셀 컬처스

수탁번호 : ECACC11022202

수탁일자 : 20110222

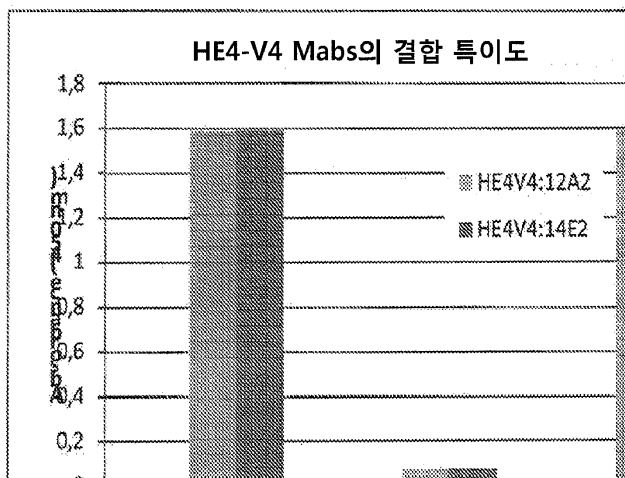
## 도면

### 도면1

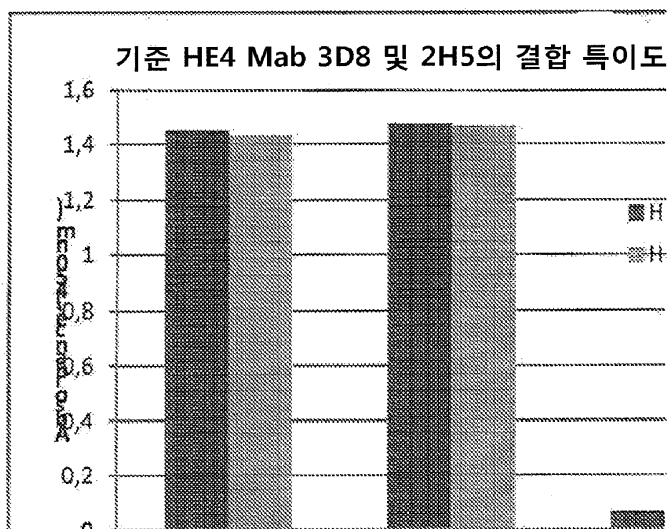




도면2



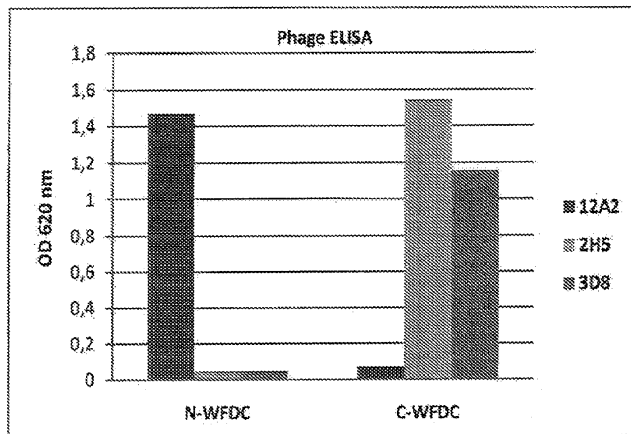
도면3



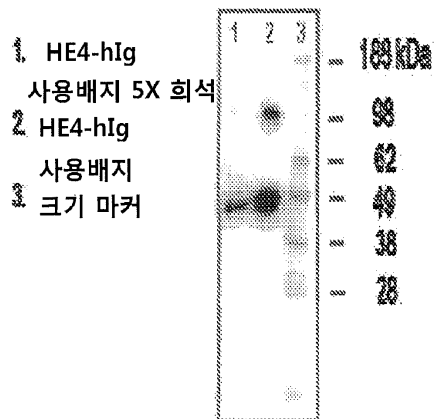
도면4

[illegible]

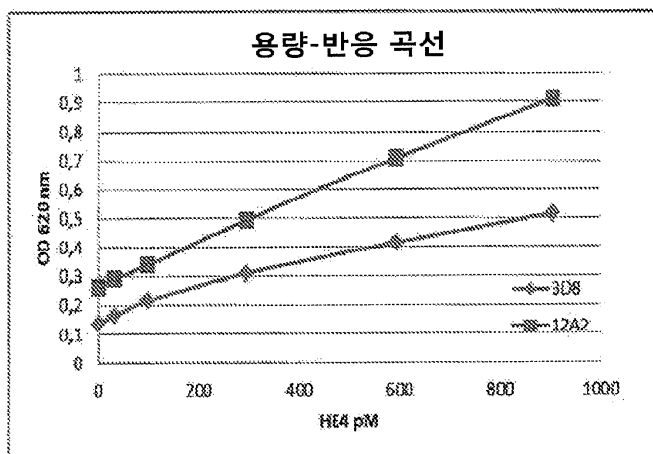
도면5



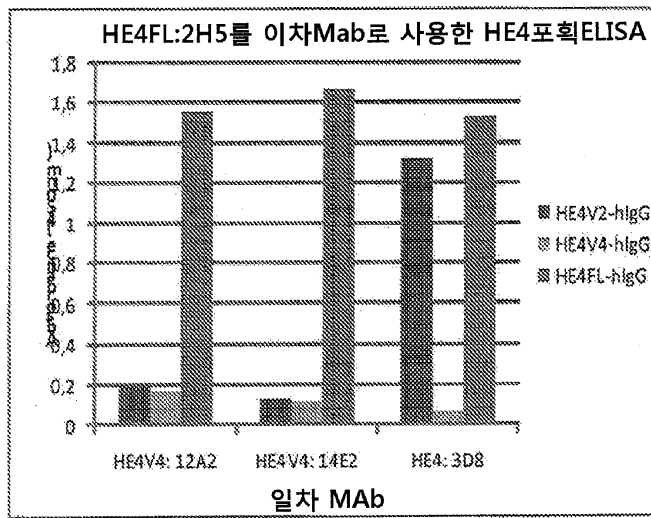
도면6



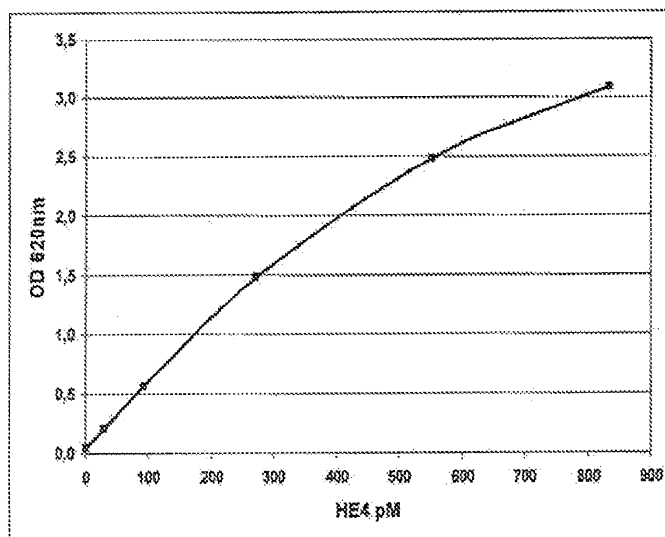
도면7



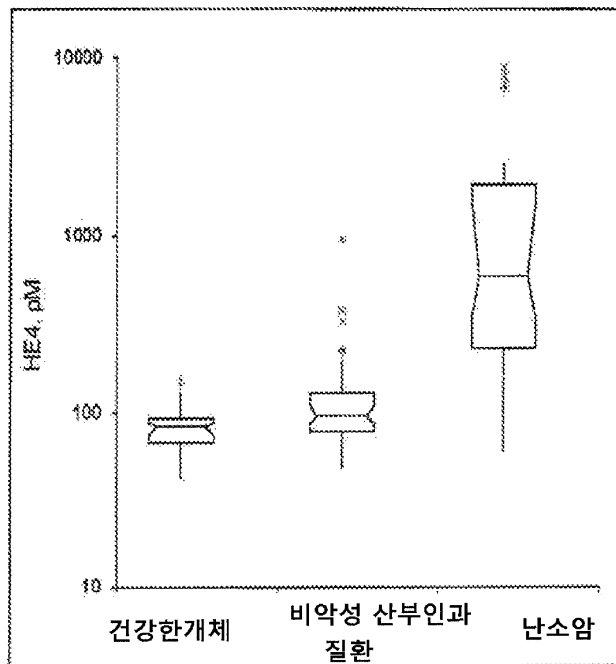
도면8



도면9

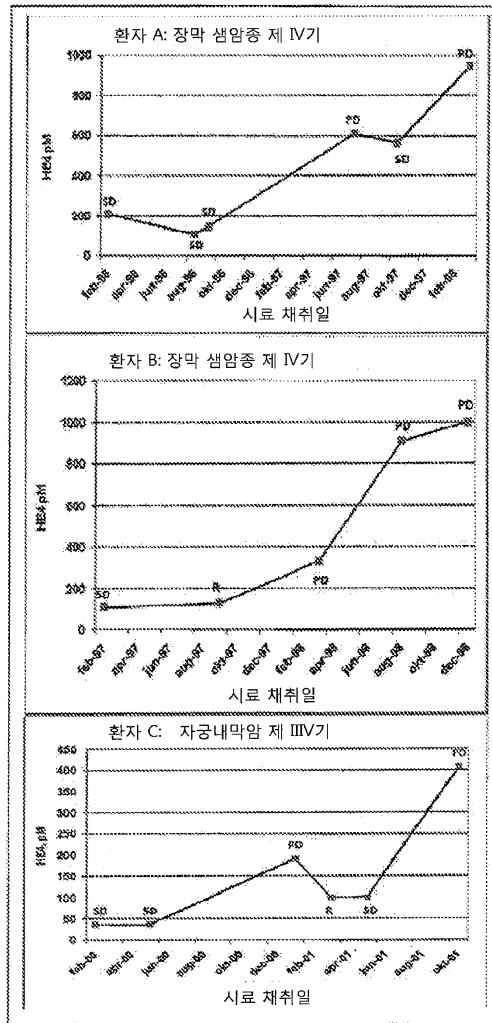


도면10

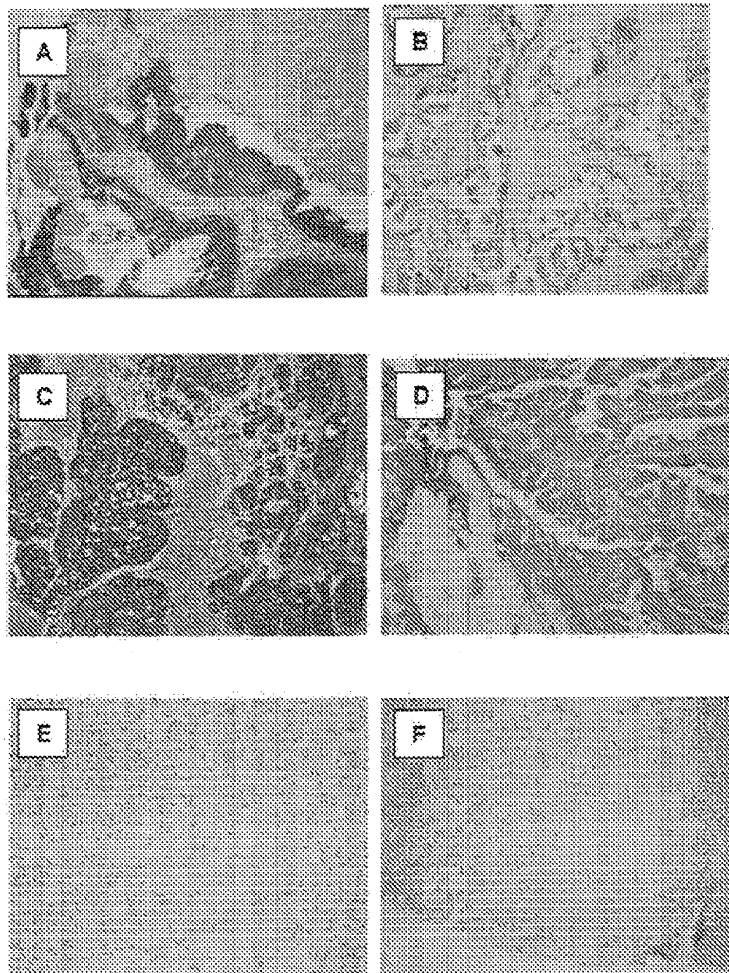




도면11



도면12



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> FUJIREBIO DIAGNOSTICS, INC

<120> COMPOSITIONS AND METHODS OF USE FOR THE DETERMINATION OF HE4a

<130> D4496-00901

<160> 39

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> WAP four-disulfide core domain protein 2 precursor

<400> 1

Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser  
1 5 10 15  
Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys  
20 25 30  
Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu  
35 40 45  
Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala  
50 55 60  
Gly Cys Ala Thr Phe Cys Ser Leu Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser Cys  
65 70 75 80  
Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp Gln

85 90 95  
Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg Asn  
100 105 110  
Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe  
115 120

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer

<400> 2

gttgtaagc ttgccgcat gcctgcttgt cgcctaggc

39

<210> 3

<211> 102

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> WAP domain containing protein HE4-V4

<400> 3

Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser  
1 5 10 15

Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys  
20 25 30  
Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu  
35 40 45  
Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala  
50 55 60  
Gly Cys Ala Thr Phe Cys Ser Leu Pro Asn Ala Leu Phe His Trp His  
65 70 75 80  
Leu Lys Thr Arg Arg Leu Trp Glu Ile Ser Gly Pro Arg Pro Arg Arg  
85 90 95  
Pro Thr Trp Asp Ser Ser  
100

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
primer

<400> 4

gtgtgttgat ccgaaattgg gagtgacaca ggacac

36

<210> 5

<211> 73

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> WAP domain containing protein HE4-V3

<400> 5

Met Leu Gln Val Gln Val Asn Leu Pro Val Ser Pro Leu Pro Thr Tyr  
1 5 10 15  
Pro Tyr Ser Phe Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Gly Ser Cys Pro Gln Val  
20 25 30

Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp Gln Cys Gln Val  
35 40 45



Asp Ser Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg Asn Gly Cys Gly  
50 55 60  
Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe  
65 70  
<210> 6  
<211> 485  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
<220><221> CDS  
<222> (37)..(408)  
<400> 6  
gagagaaagc ggccgcaccc cgcccgcat agcacc atg cct gct tgt cgc cta 54  
Met Pro Ala Cys Arg Leu  
1 5  
ggc ccg cta gcc gcc gcc ctc ctc ctc agc ctg ctg ctg ttc ggc ttc 102  
Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser Leu Leu Leu Phe Gly Phe  
10 15 20  
acc cta gtc tca ggc aca gga gca gag aag act ggc gtg tgc ccc gag 150  
Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys Thr Gly Val Cys Pro Glu  
25 30 35  
ctc cag gct gac cag aac tgc acg caa gag tgc gtc tcg gac agc gaa 198  
Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu Cys Val Ser Asp Ser Glu  
40 45 50  
tgc gcc gac aac ctc aag tgc tgc agc gcg ggc tgt gcc acc ttc tgc 246  
Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala Gly Cys Ala Thr Phe Cys  
55 60 65 70  
tct ctg ccc aat gat aag gag ggt tcc tgc ccc cag gtg aac att aac 294  
Ser Leu Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser Cys Pro Gln Val Asn Ile Asn  
75 80 85  
ttt ccc cag ctc ggc ctc tgt cgg gac cag tgc cag gtg gac agc cag 342  
Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp Gln Cys Gln Val Asp Ser Gln  
90 95 100

tgt cct ggc cag atg aaa tgc tgc cgc aat ggc tgt ggg aag gtg tcc 390

Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg Asn Gly Cys Gly Lys Val Ser

105 110 115

tgt gtc act ccc aat ttc tgagctccgg ccaccaccag gctgagcagt 438

Cys Val Thr Pro Asn Phe

120

gaagatagaa agtttctgcc tggccctgca gcgtgttaca gcccacc 485

<210> 7

<211> 76

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> WAP domain containing protein HE4-V2

<400> 7

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

1 5 10 15

Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Asp Lys Glu Gly Ser Cys

20 25 30

Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp Gln

35 40 45

Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg Asn

50 55 60

Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe

65 70 75

<210> 8

<400> 8

000

<210> 9

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> WAP domain containing protein HE4-V1

<400> 9

Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser  
 1                    5                    10                    15  
 Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys  
                   20                    25                    30

Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu  
                   35                    40                    45  
 Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala  
                   50                    55                    60  
 Gly Cys Ala Thr Phe Cys Leu Leu Cys Pro Asn Gly Gln Leu Ala Glu  
 65                    70                    75                    80

<210> 10

<400> 10

000

<210> 11

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> WAP four-disulfide core domain 2

<400> 11

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

Gly Cys Ala Thr Phe Cys Ser Leu Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser Cys  
 65                    70                    75                    80  
 Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp Gln  
                   85                    90                    95  
 Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg Asn

100 105 110  
 Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe  
 115 120  
 <210> 12  
 <400  
 > 12  
 000  
 <210> 13  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220><223> HE4 protein  
 <400> 13  
 Met Pro Ala Cys Arg Leu Gly Pro Leu Ala Ala Ala Leu Leu Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Phe Gly Phe Thr Leu Val Ser Gly Thr Gly Ala Glu Lys  
 20 25 30  
 Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr Gln Glu  
 35 40 45  
 Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala  
 50 55 60  
 Gly Cys Ala Thr Phe Cys Ser Leu Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser Cys  
 65 70 75 80  
 Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp Gln  
 85 90 95  
 Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg Asn  
 100 105 110  
 Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe  
 115 120  
 <210> 14  
 <400> 14  
 000  
 <210> 15



<211> 125

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> HE4 protein

<400> 15

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys Ser Ala

50 55 60

Gly Cys Ala Thr Phe Cys Leu Leu Cys Pro Asn Asp Lys Glu Gly Ser

65 70 75 80

Cys Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly Leu Cys Arg Asp

85 90 95

Gln Cys Gln Val Asp Thr Gln Cys Pro Gly Gln Met Lys Cys Cys Arg

100 105 110

Asn Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn Phe

115 120 125

<210> 16

<400> 16

000

<210> 17

<211> 45

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> HE4a N-WFDC

<400> 17

Glu Lys Thr Gly Val Cys Pro Glu Leu Gln Ala Asp Gln Asn Cys Thr

1 5 10 15

Gln Glu Cys Val Ser Asp Ser Glu Cys Ala Asp Asn Leu Lys Cys Cys

20 25 30

Ser Ala Gly Cys Ala Thr Phe Cys Ser Leu Pro Asn Asp

35 40 45

<210> 18

<400> 18

000

<210> 19

<211> 49

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><223> HE4a C-WFDC

<400> 19

Lys Glu Gly Ser Cys Pro Gln Val Asn Ile Asn Phe Pro Gln Leu Gly

1 5 10 15

Leu Cys Arg Asp Gln Cys Gln Val Asp Ser Gln Cys Pro Gly Gln Met

20 25 30

Lys Cys Cys Arg Asn Gly Cys Gly Lys Val Ser Cys Val Thr Pro Asn

35 40 45

Phe

<210> 20

<400> 20

000

<210> 21

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

HE4a-V4: Forward primer

<400> 21

gttgttaccg gtgcagcaga gaagactggc gtgtgcccc

39

<210> 22

<400> 22

000

<210> 23

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

HE4a-V4 Reverse primer

<400> 23

aatctcccag agcctccgtg tctttagggtg ccagtggaac agtgcattgg gcagagagca 60

<210> 24

<400> 24

000

<210> 25

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

HE4a-V2: Forward primer

<400> 25

gttggtaccg gtgcaaagga gggttcctgc ccccag 36

<210> 26

<400> 26

000

<210> 27

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

HE4a-V2: Reverse primer

<400> 27

gttggtggat ccgaaattgg gagtgacaca gga 33

<210> 28

<400> 28

000

<210> 29

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

PCR primer used to generate N-WFDC domain

<400> 29

tgctaagctt tgccgagaag actggcgtgt gcc 34

<210> 30

<400> 30

000

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

PCR primer used to generate N-WFDC domain

<400> 31

ccttctgcag gatcattggg cagagagcag 30

<210> 32

<400> 32

000

<210> 33

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

PCR primer used to generate C-WFDC domain

<400> 33

tgctaagctt tgccaaggag gggtcctgcc ccca 34

<210> 34

<400> 34

000



<210> 35  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 PCR primer used to generate C-WFDC domain  
 <400> 35  
 ccttctgcag ggaaattggg agtgacacag ga 32

<210> 36  
 <400> 36  
 000

<210> 37  
 <211> 583  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220><223> HE4 mRNA for extracellular proteinase inhibitor homologue  
 <400> 37  
 ccctgcacc ccgcccgga tagcacatg cctgcttgc gcctaggccc gctagccgcc 60  
 gccctcctcc tcagcctgct gctgttcggc ttaccctag tctcaggcac aggagcagag 120  
 aagactggcg tgtgccccga gctccagct gaccagaact gcacgcaaga gtgcgtctcg 180  
 gacagcgaat gcgccgacaa cctcaagtgc tgcagcgagg gctgtgccac cttctgcctt 240  
 ctctgcccc atgataagga gggttcctgc cccaggtga acattaactt tccccagctc 300

ggcctctgtc gggaccagtg ccaggtggac acgcagtgtc ctggccagat gaaatgctgc 360  
 cgcaatggct gtgggaaggt gtctgtgtc actcccaatt tctgaggtcc agccaccacc 420  
 aggctgagca gtgaggagag aaagtttctg cctggccctg catctggttc cagccacact 480  
 gccctccct tttcgggac tctgtattcc ctcttggggg gaccacagct tctcccttc 540  
 ccaaccaata aagtaaccac tttcagcaaa aaaaaaaaaa aaa 583

<210> 38  
 <400> 38  
 000

<210> 39  
 <211> 486  
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> HE4 protein (WFDC2) mRNA, complete cds

<400> 39

tgagagaaag cggccgcacc ccgcccggca tagcaccatg cctgcttgtc gcctaggccc	60
gctagccgcc gccctectcc tcagcctgct gctgttcggc ttcaccctag tctcaggcac	120
aggagcagag aagactggcg tgtgccccga gctccaggct gaccagaact gcacgcaaga	180
gtgcgtctcg gacagcgaat gcgccgacaa cctcaagtgc tgcagcgcgg gctgtgccac	240
cttctgctct ctgcccattg ataaggaggg ttcttgcccc caggtgaaca ttaactttcc	300
ccagctcggc ctctgtcggg accagtgccca ggtggacagc cagtgtcctg gccagatgaa	360
atgctgccgc aatggctgtg ggaagggtgc ctgtgtcact cccaatttct gagctccggc	420
caccaccagg ctgagcagtg aagatagaaa gtttctgcct ggccctgcag cgtgttacag	480
cccacc	486