(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0068877
(43) 공개일자 2014년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/22* (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-7003624
(22) 출원일자(국제) 2012년08월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2014년02월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/051220
(87) 국제공개번호 WO 2013/025944
국제공개일자 2013년02월21일
(30) 우선권주장
61/524,670 2011년08월17일 미국(US)

(71) 출원인
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(72) 발명자
청, 알리시아
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
페라라, 나폴레온
미국 94080 캘리포니아주 사우쓰 샌프란시스코 디엔에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
(74) 대리인
위혜숙, 양영준

전체 청구항 수 : 총 61 항

(54) 발명의 명칭 **불응성 종양에서의 혈관신생의 억제**

(57) 요 약

본 발명은 일반적으로 종양 혈관신생의 억제에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 IL-17 길항체, 예컨대 항-IL-17 항체 및 다른 길항체를 사용하는 항-혈관 내피 종양 인자 (VEGF) 치료에 불응성인 종양에서의 종양 혈관신생의 예방 또는 치료 및 종양 성장의 저해에 관한 것이다.

[대표도]

도 4

특허청구의 범위

청구항 1

혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 길항제로 이전에 치료받았던 종양을 갖는 인간 대상체에게 유효량의 IL-17 길항제를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 종양은 상기 VEGF 길항제를 사용한 치료에 불응성인 것인, 종양 혈관신생을 억제하는 방법.

청구항 2

VEGF 길항제로 이전에 치료받았던 종양을 갖는 인간 대상체에게 유효량의 IL-17 길항제를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 종양은 상기 VEGF 길항제를 사용한 치료에 불응성인 것인, 종양 성장을 저해하는 방법.

청구항 3

VEGF 길항제로 이전에 치료받았던 종양을 갖는 인간 대상체에게 유효량의 IL-17 길항제를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 종양은 상기 VEGF 길항제를 사용한 치료에 불응성인 것인, 종양 치료 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, VEGF 길항제가 항-VEGF 항체 또는 그의 단편인 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, VEGF 길항제가 항-VEGF 항체 또는 그의 단편인 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, VEGF 길항제가 항-VEGF 항체 또는 그의 단편인 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 항-VEGF 항체가 서열 1의 가변 중쇄 서열 및 서열 2의 가변 경쇄 서열을 포함하는 베바시주맙 또는 그의 단편 또는 변이체인 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 항-VEGF 항체가 서열 1의 가변 중쇄 서열 및 서열 2의 가변 경쇄 서열을 포함하는 베바시주맙 또는 그의 단편 또는 변이체인 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 항-VEGF 항체가 서열 1의 가변 중쇄 서열 및 서열 2의 가변 경쇄 서열을 포함하는 베바시주맙 또는 그의 단편 또는 변이체인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, IL-17 길항제가 항-IL-17 항체 또는 그의 단편 또는 항-IL-17 수용체 항체 또는 그의 단편인 방법.

청구항 11

제2항에 있어서, IL-17 길항제가 항-IL-17 항체 또는 그의 단편 또는 항-IL-17 수용체 항체 또는 그의 단편인 방법.

청구항 12

제3항에 있어서, IL-17 길항제가 항-IL-17 항체 또는 그의 단편 또는 항-IL-17 수용체 항체 또는 그의 단편인 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 항-IL-17 항체 또는 그의 단편이 IL-17A 또는 IL-17F 또는 IL-17A 및 IL-17F에 특이적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 항-IL-17 항체 또는 그의 단편이 IL-17A 또는 IL-17F 또는 IL-17A 및 IL-17F에 특이적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 상기 항-IL-17 항체 또는 그의 단편이 IL-17A 또는 IL-17F 또는 IL-17A 및 IL-17F에 특이적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 단편이 모노클로날 항체인 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 단편이 모노클로날 항체인 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 단편이 모노클로날 항체인 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 단편이 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 20

제17항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 단편이 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 단편이 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 상기 종양에서 평균 혈관 밀도를 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 감소시키는 것인 방법.

청구항 23

제2항에 있어서, IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 상기 종양에서 평균 혈관 밀도를 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 감소시키는 것인 방법.

청구항 24

제3항에 있어서, IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 상기 종양에서 평균 혈관 밀도를 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 감소시키는 것인 방법.

청구항 25

제22항에 있어서, 상기 종양 혈관신생의 억제가 상기 인간 대상체 내 상기 종양에서 평균 혈관 밀도를 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 적어도 5%, 또는 적어도 10%, 또는 적어도 15%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 25%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 35%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 45%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 55%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도

65% 또는 적어도 70%, 또는 적어도 75%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 적어도 99% 감소시키는 것인 방법.

청구항 26

제23항에 있어서, 상기 종양 성장의 저해가 상기 인간 대상체 내 상기 종양에서 평균 혈관 밀도를 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 적어도 5%, 또는 적어도 10%, 또는 적어도 15%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 25%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 35%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 45%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 55%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 65% 또는 적어도 70%, 또는 적어도 75%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 적어도 99% 감소시키는 것인 방법.

청구항 27

제24항에 있어서, 상기 종양 치료가 상기 인간 대상체 내 상기 종양에서 평균 혈관 밀도를 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 적어도 5%, 또는 적어도 10%, 또는 적어도 15%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 25%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 35%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 45%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 55%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 65% 또는 적어도 70%, 또는 적어도 75%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 적어도 99% 감소시키는 것인 방법.

청구항 28

제25항에 있어서, 상기 평균 혈관 밀도가 상기 종양 내 세포의 전체 면적에 걸쳐 상기 종양 내 CD31-양성 세포의 평균 면적을 취함으로써 측정되는 것인 방법.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기 평균 혈관 밀도가 상기 종양 내 세포의 전체 면적에 걸쳐 상기 종양 내 CD31-양성 세포의 평균 면적을 취함으로써 측정되는 것인 방법.

청구항 30

제27항에 있어서, 상기 평균 혈관 밀도가 상기 종양 내 세포의 전체 면적에 걸쳐 상기 종양 내 CD31-양성 세포의 평균 면적을 취함으로써 측정되는 것인 방법.

청구항 31

제2항에 있어서, 상기 종양 성장의 저해가 상기 인간 대상체에서 종양 부피를 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 적어도 5%, 또는 적어도 10%, 또는 적어도 15%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 25%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 35%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 45%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 55%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 65% 또는 적어도 70%, 또는 적어도 75%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 적어도 99% 감소시키는 것인 방법.

청구항 32

제3항에 있어서, 상기 종양 치료가 상기 인간 대상체에서 종양 부피를 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 적어도 5%, 또는 적어도 10%, 또는 적어도 15%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 25%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 35%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 45%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 55%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 65% 또는 적어도 70%, 또는 적어도 75%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 적어도 99% 감소시키는 것인 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 상기 종양 부피의 감소가 컴퓨터 축 단층촬영 (CAT 스캔), 자기 공명 영상화 (MRI), 양전자 방출 단층촬영 (PET) 또는 단일-광자 방출 컴퓨터 단층촬영 (SPECT)에 의해 측정되는 것인 방법.

청구항 34

제32항에 있어서, 상기 종양 부피의 감소가 컴퓨터 축 단층촬영 (CAT 스캔), 자기 공명 영상화 (MRI), 양전자 방출 단층촬영 (PET) 또는 단일-광자 방출 컴퓨터 단층촬영 (SPECT)에 의해 측정되는 것인 방법.

청구항 35

제1항에 있어서, 항-VEGF 항체 또는 그의 단편을 상기 인간 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 36

제2항에 있어서, 항-VEGF 항체 또는 그의 단편을 상기 인간 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 37

제3항에 있어서, 항-VEGF 항체 또는 그의 단편을 상기 인간 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 38

제35항에 있어서, 항-VEGF 항체가 서열 1의 가변 중쇄 서열 및 서열 2의 가변 경쇄 서열을 포함하는 베바시주맙 또는 그의 단편인 방법.

청구항 39

제36항에 있어서, 항-VEGF 항체가 서열 1의 가변 중쇄 서열 및 서열 2의 가변 경쇄 서열을 포함하는 베바시주맙 또는 그의 단편인 방법.

청구항 40

제37항에 있어서, 항-VEGF 항체가 서열 1의 가변 중쇄 서열 및 서열 2의 가변 경쇄 서열을 포함하는 베바시주맙 또는 그의 단편인 방법.

청구항 41

제1항에 있어서, 상기 인간 대상체를 화학요법 또는 방사선 요법에 적용하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 42

제2항에 있어서, 상기 인간 대상체를 화학요법 또는 방사선 요법에 적용하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 43

제3항에 있어서, 상기 인간 대상체를 화학요법 또는 방사선 요법에 적용하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 44

제1항에 있어서, 종양이 결장, 직장, 간, 폐, 전립선, 유방 또는 난소에 존재하는 것인 방법.

청구항 45

제2항에 있어서, 종양이 결장, 직장, 간, 폐, 전립선, 유방 또는 난소에 존재하는 것인 방법.

청구항 46

제3항에 있어서, 종양이 결장, 직장, 간, 폐, 전립선, 유방 또는 난소에 존재하는 것인 방법.

청구항 47

제1항에 있어서, 상기 IL-17 길항제의 투여 전에 상기 인간 대상체로부터 수득된 종양 샘플 또는 말초 혈액 샘플의 수 또는 빈도와 비교하여, 상기 인간 대상체로부터 수득된 종양 샘플에서 또는 말초 혈액 샘플에서 CD11b+Gr1+ 세포의 수 또는 빈도를 결정함으로써 상기 종양 혈관신생의 억제의 효능을 모니터링하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 48

제2항에 있어서, 상기 IL-17 길항제의 투여 전에 상기 인간 대상체로부터 수득된 종양 샘플 또는 말초 혈액 샘플의 수 또는 빈도와 비교하여, 상기 인간 대상체로부터 수득된 종양 샘플에서 또는 말초 혈액 샘플에서 CD11b+Gr1+ 세포의 수 또는 빈도를 결정함으로써 상기 종양 성장의 저해의 효능을 모니터링하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 49

제3항에 있어서, 상기 IL-17 길항제의 투여 전에 상기 인간 대상체로부터 수득된 종양 샘플 또는 말초 혈액 샘플의 수 또는 빈도와 비교하여, 상기 인간 대상체로부터 수득된 종양 샘플에서 또는 말초 혈액 샘플에서 CD11b+Gr1+ 세포의 수 또는 빈도를 결정함으로써 상기 종양 치료의 방법의 효능을 모니터링하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 50

제1항에 있어서, 유효량의 G-CSF 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 51

제2항에 있어서, 유효량의 G-CSF 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 52

제3항에 있어서, 유효량의 G-CSF 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 53

제50항에 있어서, 상기 G-CSF 길항제가 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편인 방법.

청구항 54

제51항에 있어서, 상기 G-CSF 길항제가 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편인 방법.

청구항 55

제52항에 있어서, 상기 G-CSF 길항제가 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편인 방법.

청구항 56

제53항에 있어서, 상기 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편이 모노클로날 항체인 방법.

청구항 57

제54항에 있어서, 상기 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편이 모노클로날 항체인 방법.

청구항 58

제55항에 있어서, 상기 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편이 모노클로날 항체인 방법.

청구항 59

제56항에 있어서, 상기 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편이 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 60

제57항에 있어서, 상기 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편이 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 방법.

청구항 61

제58항에 있어서, 상기 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편이 인간, 인간화 또는 키메라 항체인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본원은 35 USC 119(e) 하에 2011년 8월 17일에 출원된 미국 가출원 번호 61/524,670을 우선권 주장하며, 그 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **발명의 분야**

[0004] 본 발명은 일반적으로 종양 혈관신생의 억제에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 종양 혈관신생의 예방 또는 치료, 및 IL-17 길항제, 예컨대 항-IL-17 항체 및 다른 길항제를 사용하는, 항-혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 치료에 불응성인 종양에서 종양 성장의 저해에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 기존의 내피로부터의 새로운 혈관 형성을 포함하는 혈관신생이 다양한 장애의 발병기전과 관련이 있다는 것은 현재 널리 확립되어 있다. 이들은 고형 종양 및 전이, 아테롬성동맥경화증, 수정체후 섬유증식증, 혈관종, 만성 염증, 안내 신생혈관 증후군, 예컨대 증식성 망막병증, 예를 들어 당뇨병성 망막병증, 연령-관련 황반 변성 (AMD), 신생혈관 녹내장, 이식된 각막 조직 및 기타 조직의 면역 거부, 류마티스 관절염 및 건선을 포함한다. 문헌 [Folkman et al., J. Biol. Chem., 267: 10931-10934 (1992); Klagsbrun et al., Annu. Rev. Physiol., 53: 217-239 (1991); 및 Garner A., "Vascular diseases", Pathobiology of Ocular Disease. A Dynamic Approach, Garner A., Klintworth GK, eds., 2nd Edition (Marcel Dekker, NY, 1994), pp 1625-1710].

[0006] 종양 성장의 경우에, 혈관신생은 증식증에서 신생물로의 이행, 및 종양의 성장 및 전이를 위한 영양분의 제공에 결정적인 것으로 여겨진다. 문헌 [Folkman et al., Nature, 339: 58 (1989)]. 신생혈관화는 종양 세포가 정상 세포에 비해 성장 이익 및 증식 자율성을 수득하도록 한다. 종양은 이용가능한 모세관 층으로부터의 거리로 인해 수 mm^3의 크기로만 증식할 수 있는 단일 이상 세포로서 시작되는 것이 일반적이고, 장기간 동안 추가의 성장 및 확산 없이 '휴면상태'인 채로 있을 수 있다. 이어서, 일부 종양 세포가 혈관신생 표현형으로 전환되어 내피 세포를 활성화시키고, 이것이 증식하여 새로운 모세 혈관으로 성숙된다. 이러한 새로 형성된 혈관은 원발성 종양의 지속적인 성장을 허용할 뿐만 아니라, 전이성 종양 세포의 확산 및 콜로니 재형성을 허용한다. 따라서, 유방암 뿐만 아니라 여러 다른 종양에서 종양 절편 내의 미세혈관의 밀도와 환자 생존 사이의 상관관계가 관찰되었다. 문헌 [Weidner et al., N. Engl. J. Med, 324: 1-6 (1991); Horak et al., Lancet, 340: 1120-1124 (1992); Macchiarini et al., Lancet, 340: 145-146 (1992)]. 혈관신생 전환을 제어하는 정확한 메카니즘은 널리 이해되어 있지 않지만, 종양 덩이의 신생혈관화는 다수의 혈관신생 자극인자 및 억제제의 순수한 균형으로부터 발생하는 것으로 여겨진다 (문헌 [Folkman, 1995, Nat Med 1(1):27-31]).

[0007] 혈관 발생 과정은 엄격하게 조절된다. 현재까지, 대부분 주변 세포에 의해 생산되는 분비된 인자인 상당한 수의 분자가 EC 분화, 증식, 이동 및 코드-유사 구조로의 융합을 조절하는 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)는 혈관신생을 자극하고 혈관 투과성을 유도하는데 관여하는 핵심 인자로서 확인되었다. 문헌 [Ferrara et al., Endocr. Rev., 18: 4-25 (1997)]. 심지어는 단일 VEGF 대립유전자의 손실이 배아 치사를 초래한다는 발견은 혈관계의 발달 및 분화에서 이러한 인자가 수행하는 대체불가능한 역할을 나타낸다. 또한 VEGF는 종양 및 안내 장애와 연관된 신생혈관화의 핵심 매개자인 것으로 밝혀졌다. 문헌 [Ferrara et al., Endocr. Rev., 상기 문헌]. VEGF mRNA는 검사된 대다수의 인간 종양에서 과다발현된다. 문헌 [Berkman et al., J. Clin. Invest., 91: 153-159 (1993); Brown et al., Human Pathol., 26: 86-91 (1995); Brown et al., Cancer Res., 53: 4727-4735 (1993); Mattern et al., Brit. J. Cancer, 73: 931-934 (1996); Dvorak et al., Am. J. Pathol., 146: 1029-1039 (1995)].

[0008] 여러 종양 세포주의 성장을 상당히 저해한 항-VEGF 중화 항체를 사용한 치료는 VEGF 단독의 차단이 혈관 내피 성장 인자-유도된 혈관신생을 실질적으로 저해할 수 있음을 시사한다 (문헌 [Kim et al., Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo, Nature 362 (1993)] 참조). VEGF-A를 억제하는 것 뿐만 아니라, 또한 VEGF 수용체를 차단하는 것을 목표로 하는 전략은 종양 성장의 억제를 발생시킨다 ([Ellis and Hicklin, 2008], [Ferrara, 2004] 및 [Kerbel, 2008]). VEGF-트랩 (Trap) (아플리베르셉트; 레게네론 인크.(Regeneron Inc.)), VEGFR1 및 VEGFR2로부터 구조적 요소를 함유하는

키메라 가용성 수용체 (Holash et al., 2002)는 이종이식 모델에서 종양 성장을 억제하였고 현재 여러 종양의 치료를 위한 임상 시험 중에 있다.

[0009] VEGF 신호전달 경로를 표적화하는 다양한 소분자 억제제가 개발되었다. 이들은 수용체 티로신 키나제 (RTK) 억제제, 예컨대 Bay 43-9006 (소라페닙; 넥사바르(Nexavar)®) (Kupsch et al., 2005) 및 SU11248 (수니티닙; 수텐트(Sutent)®) (O'Farrell et al., 2003)을 포함한다. 소라페닙은 또한 VEGFR-2 및 -3, PDGFR-β, Flt-3 및 c-kit를 억제하는 raf 키나제 억제제이다 (Fabian et al., 2005). 소라페닙은 진행성 신세포 암종 (RCC) (Kane et al., 2006) 및 수술불가능한 간세포성 암종 (Lang, 2008)에 대해 FDA에 의해 승인받았다. 유사하게, 수니티닙은 VEGFR, PDGFR, c-kit 및 Flt-3을 비롯한 여러 경로를 억제하고 진행성 RCC (van der Veldt et al., 2008) 및 이마티닙-내성 위장 기질 종양 (Smith et al., 2004)에서 효능을 나타내었다.

[0010] VEGF 억제제는 진행성 암을 갖는 환자에서 임상 효능 및 생존 이점을 입증하였으나, 대부분의 환자는 결국 재발한다. 집중적 연구는 일반적으로 항혈관신생제, 특히 VEGF 차단제에 대한 감소된 반응의 기초가 되는 세포 및 분자 메카니즘을 를 밝히기 위해 진행 중이다 (문헌 [F. Shojaei and N. Ferrara, Refractoriness to antivascular endothelial growth factor treatment: role of myeloid cells, Cancer Res. 68 (2008), pp. 5501-5504]).

[0011] 항-VEGF에 대한 감소된 반응은 종양 및/또는 비-종양 (기질) 구획으로부터 기원할 수 있다. 종양 세포와 대조적으로, 기질 세포는 유전적으로 안정적이고, 염색체 이상을 나타내지 않는다 (Hughes, 2008). 기질은 섬유모세포, 혈관주위세포, 중간엽 줄기 세포 및 조혈 세포를 비롯한 세포의 이종 집단을 포함한다. 기질 세포는 여러 가능한 메카니즘, 예컨대 종양 혈관계에 대한 직접 기여 (문헌 [Santarelli et al., Incorporation of bone marrow-derived Flk-1-expressing CD34+ cells in the endothelium of tumor vessels in the mouse brain, Neurosurgery 59 (2006), pp. 374-382]), VEGF (Liang et al., 2006) 및 MMP9 (Coussens et al., 2000) 및 Sema4D (Sierra et al., 2008)의 방출을 통해 또는 면역 감시를 종양 세포로부터 빗나가게 함으로써 (Mantovani et al., 2008) 종양 성장을 지지한다.

[0012] 다수의 질환 및 장애에 있어 혈관신생의 역할을 고려할 때, 이러한 과정을 유발하는 하나 이상의 생물학적 효과를 감소시키거나 억제하는 수단을 갖는 것이 바람직하다. 특허 출원 및 공개를 포함하는 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그의 전문이 참조로 포함된다.

발명의 내용

[0013] 본 발명은 유효량의 IL-17 길항제를 투여함으로써 VEGF 길항제로 이전에 치료받았던 종양을 갖는 인간 대상체에서 종양 혈관신생을 억제하고, 종양 성장을 저해하고, 종양을 치료하는 방법을 제공한다.

[0014] 한 실시양태에서, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 길항제로 이전에 치료받았던 종양을 갖는 인간 대상체에게 유효량의 IL-17 길항제를 투여하는 것을 포함하는 종양 혈관신생을 억제하는 방법이 고려된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 고려된 방법에서, IL-17 길항제는 항-IL-17 항체 또는 그의 단편 또는 항-IL-17 수용체 항체 또는 그의 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항-IL-17 항체 또는 그의 단편은 IL-17A 또는 IL-17F 또는 IL-17A 및 IL-17F에 특이적으로 결합한다. 추가 실시양태에서, 상기 고려된 방법에서, 종양은 상기 VEGF 길항제를 사용한 치료에 불응성이다. 추가 실시양태에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체 또는 그의 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 서열 1의 가변 중쇄 서열 및 서열 2의 가변 경쇄 서열을 포함하는 베바시주맙 또는 그의 단편 또는 변이체이다. 한 실시양태에서, IL-17 항체 또는 그의 단편은 모노클로날 항체이다. 또 다른 실시양태에서, IL-17 항체 또는 그의 단편은 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다.

[0015] 한 실시양태에서, 상기 고려된 방법에서, IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편은 상기 종양에서 평균 혈관 밀도를 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 감소시킨다. 추가 실시양태에서 상기 고려된 방법에서, 상기 종양 혈관신생의 억제는 상기 인간 대상체 내 상기 종양에서 평균 혈관 밀도를 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 적어도 5%, 또는 적어도 10%, 또는 적어도 15%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 25%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 35%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 45%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 55%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 65% 또는 적어도 70%, 또는 적어도 75%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 적어도 99% 감소시킨다. 또 다른 실시양태에서, 상기 고려된 방법에서, 상기 평균 혈관 밀도는 상기 종양 내 세포의 전체 면적에 걸쳐 상기 종양 내 CD31-양성 세포의 평균 면적을 취함으로써 측정된다.

[0016] 또 다른 실시양태에서, 방법은 상기 인간 대상체에게 항-VEGF 항체 또는 그의 단편을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 상기 고려된 방법의 또 다른 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 서열 1의 가변 중쇄 서열 및 서열 2의 가변 경쇄 서열을 포함하는 베바시주맙 또는 그의 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 상기 인간 대상체를 화학요법 또는 방사선 요법에 적용하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 유효량의 G-CSF 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 G-CSF 길항제는 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편은 모노클로날 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편은 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다.

[0017] 한 실시양태에서, 상기 고려된 방법에서, 종양은 결장, 직장, 간, 폐, 전립선, 유방 또는 난소에 존재한다.

[0018] 또 다른 실시양태에서, 상기 고려된 방법은 상기 IL-17 길항제의 투여 전에 상기 인간 대상체로부터 수득된 종양 샘플 또는 말초 혈액 샘플의 수 또는 빈도와 비교하여, 상기 인간 대상체로부터 수득된 종양 샘플에서 또는 말초 혈액 샘플에서 CD11b+Gr1+ 세포의 수 또는 빈도를 결정함으로써 상기 종양 혈관신생의 억제의 효능을 모니터링하는 것을 추가로 포함한다.

[0019] 한 실시양태에서, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 길항제로 이전에 치료받았던 종양을 갖는 인간 대상체에게 유효량의 IL-17 길항제를 투여하는 것을 포함하는 종양 성장을 저해하는 방법이 고려된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 고려된 방법에서, IL-17 길항제는 항-IL-17 항체 또는 그의 단편 또는 항-IL-17 수용체 항체 또는 그의 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항-IL-17 항체 또는 그의 단편은 IL-17A 또는 IL-17F 또는 IL-17A 및 IL-17F에 특이적으로 결합한다. 추가 실시양태에서, 상기 고려된 방법에서, 종양은 상기 VEGF 길항제를 사용한 치료에 불응성이다. 추가 실시양태에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체 또는 그의 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 서열 1의 가변 중쇄 서열 및 서열 2의 가변 경쇄 서열을 포함하는 베바시주맙 또는 그의 단편 또는 변이체이다. 한 실시양태에서, IL-17 항체 또는 그의 단편은 모노클로날 항체이다. 또 다른 실시양태에서, IL-17 항체 또는 그의 단편은 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다.

[0020] 한 실시양태에서, 상기 고려된 방법에서, IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편은 상기 종양에서 평균 혈관 밀도를 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 감소시킨다. 추가 실시양태에서 상기 고려된 방법에서, 상기 종양 성장의 저해는 상기 인간 대상체에서 종양 부피를 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 적어도 5%, 또는 적어도 10%, 또는 적어도 15%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 25%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 35%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 45%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 55%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 65% 또는 적어도 70%, 또는 적어도 75%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 적어도 99% 감소시킨다. 또 다른 실시양태에서, 상기 종양 부피의 감소는 컴퓨터 축 단층촬영 (CAT 스캔), 자기 공명 영상화 (MRI), 양전자 방출 단층촬영 (PET) 또는 단일-광자 방출 컴퓨터 단층촬영 (SPECT)에 의해 측정된다.

[0021] 또 다른 실시양태에서, 방법은 상기 인간 대상체에게 항-VEGF 항체 또는 그의 단편을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 상기 고려된 방법의 또 다른 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 베바시주맙 또는 그의 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 상기 인간 대상체를 화학요법 또는 방사선 요법에 적용하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 유효량의 G-CSF 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 G-CSF 길항제는 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편은 모노클로날 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편은 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다.

[0022] 한 실시양태에서, 상기 고려된 방법에서, 종양은 결장, 직장, 간, 폐, 전립선, 유방 또는 난소에 존재한다.

[0023] 또 다른 실시양태에서, 상기 고려된 방법은 상기 IL-17 길항제의 투여 전에 상기 인간 대상체로부터 수득된 종양 샘플 또는 말초 혈액 샘플의 수 또는 빈도와 비교하여, 상기 인간 대상체로부터 수득된 종양 샘플에서 또는 말초 혈액 샘플에서 CD11b+Gr1+ 세포의 수 또는 빈도를 결정함으로써 상기 종양 성장의 저해의 효능을 모니터링하는 것을 추가로 포함한다.

[0024] 한 실시양태에서, 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 길항제로 이전에 치료받았던 종양을 갖는 인간 대상체에게 유효량의 IL-17 길항제를 투여하는 것을 포함하는 종양 치료 방법이 고려된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 고려된 방법에서, IL-17 길항제는 항-IL-17 항체 또는 그의 단편 또는 항-IL-17 수용체 항체 또는 그의 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항-IL-17 항체 또는 그의 단편은 IL-17A 또는 IL-17F 또는 IL-17A 및 IL-17F에 특이

적으로 결합한다. 추가 실시양태에서, 상기 고려된 방법에서, 종양은 상기 VEGF 길항제를 사용한 치료에 불응성이다. 추가 실시양태에서, VEGF 길항제는 항-VEGF 항체 또는 그의 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 서열 1의 가변 중쇄 서열 및 서열 2의 가변 경쇄 서열을 포함하는 베바시주맙 또는 그의 단편 또는 변이체이다. 한 실시양태에서, IL-17 항체 또는 그의 단편은 모노클로날 항체이다. 또 다른 실시양태에서, IL-17 항체 또는 그의 단편은 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다.

[0025] 한 실시양태에서, 상기 고려된 방법에서, IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편은 상기 종양에서 평균 혈관 밀도를 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 감소시킨다. 추가 실시양태에서 상기 고려된 방법에서, 상기 종양 치료는 상기 인간 대상체에서 종양 부피를 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 적어도 5%, 또는 적어도 10%, 또는 적어도 15%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 25%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 35%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 45%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 55%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 65% 또는 적어도 70%, 또는 적어도 75%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 적어도 99% 감소시킨다. 또 다른 실시양태에서, 상기 종양 부피의 감소는 컴퓨터 축 단층촬영 (CAT 스캔), 자기 공명 영상화 (MRI), 양전자 방출 단층촬영 (PET) 또는 단일-광자 방출 컴퓨터 단층촬영 (SPECT)에 의해 측정된다.

[0026] 또 다른 실시양태에서, 방법은 상기 인간 대상체에게 항-VEGF 항체 또는 그의 단편을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 상기 고려된 방법의 또 다른 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 서열 1의 가변 중쇄 서열 및 서열 2의 가변 경쇄 서열을 포함하는 베바시주맙 또는 그의 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 상기 인간 대상체를 화학요법 또는 방사선 요법에 적용하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 유효량의 G-CSF 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 상기 G-CSF 길항제는 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편은 모노클로날 항체이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 항-G-CSF 항체 또는 그의 단편은 인간, 인간화 또는 키메라 항체이다.

[0027] 한 실시양태에서, 상기 고려된 방법에서, 종양은 결장, 직장, 간, 폐, 전립선, 유방 또는 난소에 존재한다.

[0028] 또 다른 실시양태에서, 상기 고려된 방법은 상기 IL-17 길항제의 투여 전에 상기 인간 대상체로부터 수득된 종양 샘플 또는 말초 혈액 샘플의 수 또는 빈도와 비교하여, 상기 인간 대상체로부터 수득된 종양 샘플에서 또는 말초 혈액 샘플에서 CD11b+Gr1+ 세포의 수 또는 빈도를 결정함으로써 상기 종양 치료의 효능을 모니터링하는 것을 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 배양물에서 항-VEGF 내성 종양 세포 (EL4) 대 항-VEGF 감수성 종양 세포 (Tib6)의 분비된 단백질 프로파일을 입증한다. 도 1a는 Il-17이 시험관내 항-VEGF 내성 (EL4) 대 감수성 (Tib6) 종양 세포에서 발견되는 가장 풍부한 분비된 인자라는 것을 보여준다. 도 1b는 IL-6 및 G-CSF 수준이 항-VEGF 불응성 EL4 세포 및 정상 피부 섬유모세포 (NSF)의 공동-배양물에서 상승된다는 것을 보여준다.

도 2는 정상 피부 섬유모세포 (NSF)와 72시간 동안 공동-배양된 GFP-표지된 EL4 종양 세포, 이어서 섬유모세포로부터의 종양 세포의 FACS 단리 및 qRT-PCR에 의한 유전자 발현의 분석을 보여준다. 도 2a는 항-VEGF 내성 세포주 EL4와 공동-배양시의 정상 섬유모세포 대 단독-배양된 세포에서 관찰된 G-CSF (Csf3) 유도된 발현을 보여주고, 도 2b는 상기 세포에서 IL-6 유도된 발현을 보여주고, 도 2c는 상기 세포에서 IL-17 유도된 발현을 보여준다. 예비-분류 분석을 수행하여 FACS 분류에 의해 도입되는 잠재적 인공물을 제어하였다.

도 3은 IL-17 중화가 공동-배양물에서 EL4 종양 세포에 의해 유도된 섬유모세포에서 EL4 유도된 G-CSF 발현을 억제한다는 것을 보여준다.

도 4a 및 b는 대조군 항체 (항-돼지풀, 10 mg/kg, 복강내 (IP), 1주일에 2회) 또는 항-VEGF (10mg/kg, IP, 1주일에 2회)로 처리된 C57/BL6 WT 및 Il-17rc -/- 마우스에서 EL4 종양의 성장을 보여준다. 데이터는 평균 ± SEM으로 나타낸다. *는 항-VEGF로 처리된 WT 및 Il-17rc-/- 동물에서 EL4 종양 사이의 유의한 차이를 나타낸다 ($P<0.0001$).

도 5는 대조군 항-돼지풀 항체 (Rag, 10mg/kg) 또는 항-VEGF 항체 (B20, 10mg/kg)로 처리된 EL4-보유 WT 및 Il-17rc -/- 마우스에서 도 5a: mG-CSF, 도 5b: Bv8, 및 도 5c: IL-17A의 혈청 수준을 보여준다. 데이터는 평균 ± SD로 나타낸다.

도 6은 종양 보유 마우스로부터 단리되고, Gr1+/CD11b+ Ab로 염색되고, FACS에 의해 분류된 전혈 세포 (WBC)를 보여준다. 면역-저해 미성숙 골수 세포는 Gr1+/CD11b+ 이중-양성 세포로 정의된다.

도 7은 도 6에서와 동일한 데이터를 보여주며, 여기서 Gr1+/CD11b+ 이중-양성 세포의 수는 도 7a: 혈액, 도 7b: 비장, 및 도 7c: 종양에서 정량화된다. **p<0.0005, *p<0.5.

도 8은 LPS의 부재 또는 존재 하에 밤새 배양된 종양-보유 마우스의 비장으로부터 단리된 Gr1+ 세포, 이어서 혈관신생유발 유전자, 예컨대 Bv8 (도 8a) 및 종양 촉진 유전자, 예컨대 S100A8 (도 8b); MMP9 (도 8c); 및 S100A9 (도 8d)의 발현에 대한 qRT-PCR 분석을 보여준다.

도 9는 녹색으로 나타낸 바와 같은 항-CD31 (내피 세포), 청색으로 나타낸 바와 같은 항-데스민 (벽 세포), 및 적색으로 나타낸 바와 같은 항-평활근 액틴 (SMA)으로 면역염색된 대조군 항체 (항-돼지풀) 또는 항-VEGF 항체 (클론 B20)로 처리된, WT 및 IL-17rc KO 동물로부터 유래된 EL4 종양을 보여주고, 여기서 양성 염색은 이 종양 유형에서 세동맥에 해당한다.

도 10은 면역염색의 정량화가 도 9에서와 동일한, 세포의 전체 면적에 걸친 CD31-양성 세포의 평균 면적으로 나타낸 데이터를 보여준다. 적어도 5가지 상이한 마우스/군으로부터의 전체 종양 단면을 정량화에 사용하였다. *p<0.05. 오차 막대는 ± SEM으로 나타낸다.

도 11은 주변분비 IL-17 기능이 VEGF 치료에 감수성인 Tib6 세포주를 사용한 항-VEGF 치료에 대한 불응성에 필요하다는 것을 보여준다. 항-VEGF로 처리된 Tib6-neo 종양 세포주 (n=2) (실선) 및 mIL-17A를 안정하게 발현하는 Tib-6 종양 세포주 (Tib6-IL-17; n=4) (점선)의 종양 부피의 변화(상대 부피 (%)로서의 y-축)를 나타낸다. 데이터는 평균 ±SEM으로 나타낸다.

도 12는 C57BL/6 WT 마우스 (n=8) 및 *G-CSFR-/-* 마우스 (n=8)에서 EL4 종양의 성장 곡선을 보여준다. 패널 a는 종양 접종 24시간 후에 개시된 항-VEGF 또는 대조군 항-돼지풀 항체로의 처리를 도시한다. 종양 보유 WT 대 *G-CSFR-/-* 숙주에서 순환계에 진입하고 종양을 침윤한 CD11b+Gr1+ 세포 수준의 정량화를 유동 세포측정 분석에 의해 결정하였다 (패널 b). 모든 데이터는 평균 ±SEM으로 나타내고, *는 양측 스튜던트 t-검정에 의해 p<0.05를 나타낸다.

도 13은 T_H17 세포가 종양 미세환경 내의 CD11b+Gr1+ 세포의 동원 및 활성화를 통해 항-VEGF 치료에 대한 내성을 매개한다는 것을 보여준다. 패널 a는 대조군 (α-RW) 및 항-VEGF 항체의 투여 후에 WT 및 *Il-17rc-/-* 마우스에서 시간 경과에 따른 동계 피하 루이스 폐 암종 (LLC) 종양 부피를 보여준다. 패널 b는 대조군, IL-17A (α-IL17A), 항-VEGF에 대한 중화 항체, 또는 α-IL17A 및 항-VEGF 조합의 투여 후에 동계 CT-26 종양 부피를 도시한다. 모든 데이터는 평균 ±SEM으로 나타내고, *는 양측 스튜던트 t-검정에 의해 p<0.05를 나타낸다.

도 14는 염색 및 유동 세포측정법에 의한 정량화 후에 WT 및 *Il-17rc-/-* (KO)에서 성장하는 LLC 종양으로부터의 CD4+ (패널 a) 및 CD4+IL-17A+IL-22+ 생산 종양 침윤 림프구 (TIL) (패널 b)의 백분율을 보여준다.

도 15 패널 a는 실시예 8에 기재된 바와 같은 CD4+ 및 CD8+ TIL의 정량화를 보여준다. CD3+ 집단으로부터 CD4+IL-17+IL-22+의 백분율을 유동 세포측정법에 의해 정량화하였다 (패널 b). α-RW 및 α-VEGF로의 투여 후에 WT 및 KO 숙주에서 IL-17A의 종양 수준을 ELISA에 의해 측정하였다 (패널 c). 모든 데이터는 평균 ±SEM으로 나타내고, *는 양측 스튜던트 t-검정에 의해 p<0.05를 나타낸다.

도 16은 ELISA에 의해 측정된 처리 후 LLC 종양 내의 G-CSF 수준 (패널 a), 이어서 종양 침윤 CD11b+Gr1+ 세포의 수 (패널 b), ELISA에 의해 측정된 종양 Bv8 수준 (패널 c)을 보여준다. 모든 데이터는 평균 ±SEM으로 나타내고, *는 양측 스튜던트 t-검정에 의해 p<0.05를 나타낸다.

도 17은 유동 세포측정법에 의해 정량화된 종양 연관 내피 세포의 수를 보여준다. 군당 n=5-8. 모든 데이터는 평균 ±SEM으로 나타내고, **는 양측 스튜던트 t-검정에 의해 p<0.005를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명을 상세하게 기재하기에 앞서, 본 발명이 특정한 조성물 또는 생물학적 시스템으로 제한되지 않으며, 이는 물론 달라질 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어가 단지 특정한 실시양태를 기재하려는 목적을 위한 것일 뿐, 제한하려는 의도를 갖지 않는 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 내용상 달리 명백히 지시되지 않는 한 복수 대상물을 포함한다. 따

라서, 예를 들어 "분자"에 대한 언급은 임의로 2개 이상의 이러한 분자의 조합 등을 포함한다.

[0031] **A. 정의**

[0032] 일반적으로, 폴리펩티드 "변이체" (즉, 본원에 기재된 모든 폴리펩티드의 변이체)는 상응하는 천연 서열 폴리펩티드와 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 생물학적 활성 폴리펩티드를 의미한다. 이러한 변이체는, 예를 들어 1개 이상의 아미노산 (자연 발생 아미노산 및/또는 비-자연 발생 아미노산) 잔기가 폴리펩티드의 N- 및/또는 C-말단에 부가 또는 결실된 폴리펩티드를 포함한다. 통상적으로, 변이체는 천연 서열 폴리펩티드와 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성, 또는 적어도 약 90%의 아미노산 서열 동일성, 또는 적어도 약 95% 또는 그 초과의 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다. 변이체는 또한 천연 서열의 폴리펩티드 단편 (예를 들어, 하위서열, 말단절단물 등), 전형적으로는 생물학적 활성 단편을 포함한다.

[0033] 본원에서 "아미노산 서열 동일성 퍼센트 (%)"는 서열들을 정렬하고 필요한 경우 갭을 도입하여 최대 서열 동일성 퍼센트를 달성하며, 서열 동일성의 일부로서 어떠한 보존적 치환물도 고려하지 않은 후에, 선택된 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기 백분율로서 정의된다. 아미노산 서열 동일성 퍼센트를 결정하는 목적을 위한 정렬은, 예를 들어 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 메갈린(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 당업계의 기술 수준 내의 다양한 방식으로 달성할 수 있다. 당업자는 정렬을 측정하기에 적절한 파라미터를 결정할 수 있으며, 이는 비교하고자 하는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데에 필요한 모든 알고리즘을 포함한다. 그러나, 본원의 목적상 % 아미노산 서열 동일성 값은 서열 비교용 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용함으로써 하기 기재된 바와 같이 수득하였다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc.)의 소유로서, 미국 저작권청 (20559 워싱턴 디.씨.)에 사용자 문서로 파일링되었으며, 이는 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되었고, 제넨테크, 인크. (캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)를 통해 공개적으로 이용가능하다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 작동 시스템, 예를 들어 디지털 UNIX V4.0D 상에서 사용하도록 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 변하지 않는다.

[0034] 본원의 목적상, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 이와의 또는 이에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성 (달리 언급하면, 주어진 아미노산 서열 B에 대한, 이와의 또는 이에 대한 특정 % 아미노산 서열 동일성을 갖거나 포함하는 주어진 아미노산 서열 A로서 표현될 수 있음)은 하기와 같이 계산한다:

[0035] X/Y의 분율 x 100

[0036] 여기서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 A 및 B의 프로그램 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 매치로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 전체 수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우에는 B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %가 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임을 이해할 것이다.

[0037] 본원에 사용된 경우의 용어 "길항제"는 본 발명의 단백질의 활성, 예를 들어 리간드의 경우에는 하나 이상의 수용체에 대한 그의 결합, 또는 수용체의 경우에는 하나 이상의 리간드에 대한 그의 결합을 중화, 차단, 억제, 폐기, 저하 또는 방해할 수 있는 분자를 지칭한다. 길항제는 항체 및 그의 항원-결합 단편, 단백질, 펩티드, 당단백질, 당펩티드, 당지질, 폴리사카라이드, 올리고사카라이드, 핵산, 생물유기 분자, 펩티드모방체, 약리학적 작용제 및 그의 대사물, 전사 및 번역 제어 서열 등을 포함한다. 길항제는 또한 본 발명의 단백질의 소분자 억제제, 및 단백질에 특이적으로 결합함으로써 그의 표적과의 결합을 봉쇄시키는 융합 단백질, 수용체 분자 및 유도체, 단백질의 길항제 변이체, 본 발명의 단백질에 대해 지시된 안티센스 분자, RNA 압타머, 및 본 발명의 단백질에 대한 리보자임을 포함한다.

[0038] "차단" 항체 또는 "길항제" 항체는 그가 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 항체이다. 특정 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다.

[0039] 본원에 사용된 용어 "종양 혈관신생을 억제하는"은 새로운 혈관 형성을 유도하거나 기존 혈관계를 동원하는 종양의 능력을 억제하는 종양의 능력의 억제를 지칭한다.

[0040] 본원에 사용된 용어 "종양 성장을 저해하는"은 치료 후에 추가로 성장하지 않고/거나 전이하지 않는 종양을 지칭한다. 종양 성장은 종양 혈관신생이 본원에 기재된 바와 같이 억제될 때 저해될 수 있다. 본원에 사용된 종양 성장의 저해는 상기 인간 대상체에서 종양 부피를 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 적어도 5%, 또는 적어도 10%, 또는 적어도 15%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 25%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 35%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 45%, 또는 적어도

50%, 또는 적어도 55%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 65% 또는 적어도 70%, 또는 적어도 75%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 적어도 99% 감소시킨다. 또한, 본원에 사용된 상기 종양 부피의 감소는 컴퓨터 축 단층촬영 (CAT 스캔), 자기 공명 영상화 (MRI), 양전자 방출 단층촬영 (PET) 또는 단일-광자 방출 컴퓨터 단층촬영 (SPECT)에 의해 측정되며, 이는 모두 당업계에 널리 공지된 기술이다.

[0041] 용어 "종양의 평균 혈관 밀도를 감소시키는"은 특정의 측정가능한 양에 의해 종양의 성장을 지지하는 종양 혈관계의 양 또는 밀도를 억제하거나 저해하는 것을 의미하며, 이는 유효량의 IL-17 길항제 또는 IL-17 항체 또는 그의 단편이 투여되지 않았던 인간 대상체에서의 종양과 비교하여 적어도 5%, 또는 적어도 10%, 또는 적어도 15%, 또는 적어도 20%, 또는 적어도 25%, 또는 적어도 30%, 또는 적어도 35%, 또는 적어도 40%, 또는 적어도 45%, 또는 적어도 50%, 또는 적어도 55%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 65% 또는 적어도 70%, 또는 적어도 75%, 또는 적어도 80%, 또는 적어도 85%, 또는 적어도 90%, 또는 적어도 95% 또는 적어도 99% 감소된다 (여기서, 혈관 밀도의 감소는 길항제에 의해 유발됨). 본원에 사용된 "평균 혈관 밀도"는 상기 종양 내 세포의 전체 면적에 걸쳐 상기 종양 내 CD31-양성 세포의 평균 면적을 취함으로써 측정된다.

[0042] 본원에 사용된 용어 "VEGF"는 천연 서열 혈관 내피 성장 인자 및 그의 변이체를 지칭한다.

[0043] 용어 "VEGF" 및 "VEGF-A"는 교환가능하게 사용되며, 문헌 [Leung et al. Science, 246:1306 (1989), Houck et al. Mol. Endocrin., 5:1806 (1991) 및 Robinson & Stringer, Journal of Cell Science, 144(5):853-865 (2001)]에 기재된 바와 같이 165-아미노산 혈관 내피 세포 성장 인자 및 관련 121-, 145-, 183-, 189- 및 206-아미노산 혈관 내피 세포 성장 인자를 그의 자연 발생 대립유전자 형태 및 프로세싱 형태 뿐만 아니라 그의 변이체와 함께 지칭한다. VEGF-A는 VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, 및 PlGF를 포함한 유전자 패밀리의 일부이다. VEGF-A는 주로 2종의 고친화도 수용체 티로신 키나제인 VEGFR-1 (Flt-1) 및 VEGFR-2 (Flk-1/KDR)에 결합하며, 후자는 VEGF-A의 혈관 내피 세포 유사분열촉진 신호의 주요 전달자이다. 용어 "VEGF" 또는 "VEGF-A"는 또한, 비-인간 종, 예를 들어 마우스, 래트 또는 영장류로부터의 VEGF를 지칭한다. 때때로, 특정 종으로부터의 VEGF는 인간 VEGF의 경우에는 hVEGF, 또는 뮤린 VEGF의 경우에는 mVEGF와 같은 용어로 표시된다. 용어 "VEGF"는 또한 165-아미노산 인간 혈관 내피 세포 성장 인자의 아미노산 8 내지 109 또는 아미노산 1 내지 109를 포함하는 폴리펩티드의 말단절단된 형태 또는 단편을 지칭하는데 사용된다. 임의의 이러한 형태의 VEGF에 대한 참고는 본원에서, 예를 들어 "VEGF (8-109)," "VEGF (1-109)" 또는 "$VEGF_{165}$"에 의해 확인할 수 있다. "말단절단된" 천연 VEGF에 대한 아미노산 위치는 천연 VEGF 서열에 표시된 바와 같이 넘버링된다. 예를 들어, 말단절단된 천연 VEGF에서의 아미노산 위치 17 (메티오닌)은 또한 천연 VEGF에서의 위치 17 (메티오닌)이다. 말단절단된 천연 VEGF는 KDR 및 Flt-1 수용체에 대해 천연 서열 VEGF와 대등한 결합 친화도를 갖는다.

[0044] "VEGF 길항제"는 하나 이상의 VEGF 수용체에 대한 VEGF 결합을 포함한 천연 서열 VEGF의 활성을 중화, 차단, 억제, 폐기, 저하 또는 방해할 수 있는 분자 (펩티딜 또는 비-펩티딜)를 지칭한다. VEGF 길항제는 VEGF에 특이적으로 결합함으로써 1종 이상의 수용체 (예를 들어, 가용성 VEGF 수용체 단백질, 또는 그의 VEGF 결합 단편, 또는 키메라 VEGF 수용체 단백질)에 대한 그의 결합을 봉쇄시키는 항-VEGF 항체 및 그의 항원 결합 단편, 수용체 분자 및 유도체, 항-VEGF 수용체 항체 및 VEGF 수용체 길항제, 예컨대 VEGFR 티로신 키나제의 소분자 억제제, 및 융합 단백질, 예를 들어 VEGF-트랩 (레제네론(Regeneron)), VEGF121-겔로닌 (페레진(Peregine))을 포함한다. VEGF 길항제는 또한 VEGF의 길항제, VEGF에 대해 지시된 안티센스 분자, RNA 압타머, 및 VEGF 또는 VEGF 수용체에 대한 리보자임도 포함한다. 본 발명의 방법에 유용한 VEGF 길항제는 VEGF에 특이적으로 결합하는 펩티딜 또는 비-펩티딜 화합물, 예컨대 항-VEGF 항체 및 그의 항원-결합 단편, VEGF에 특이적으로 결합하는 폴리펩티드 항체 변이체 또는 그의 단편, VEGF 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자의 최소 단편에 상보적인 안티센스 뉴클레오염기 올리고머, VEGF 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자의 최소 단편에 상보적인 소형 RNA, VEGF를 표적화하는 리보자임, VEGF에 대한 펩티바디, 및 VEGF 압타머를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, VEGF 길항제는 VEGF의 발현 수준 또는 생물학적 활성을 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 초과로 감소시키거나 억제한다. 또 다른 실시양태에서, VEGF 길항제에 의해 억제되는 VEGF는 VEGF (8-109), VEGF (1-109) 또는 $VEGF_{165}$이다.

[0045] 용어 "항-VEGF 항체" 또는 "VEGF에 결합하는 항체"는 충분한 친화도 및 특이성으로 VEGF에 결합할 수 있는 항체를 지칭하며, 이러한 항체는 VEGF를 표적화하는 데에 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하다. 예를 들어, 본 발명의 항-VEGF 항체는 VEGF 활성이 관여하는 질환 또는 상태를 표적화하고 방해하는데 있어서 치료제로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 6,582,959, 6,703,020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202,

WO2005/044853; EP 0666868B1; 미국 특허 출원 20030206899, 20030190317, 20030203409, 20050112126, 20050186208 및 20050112126; 문헌 [Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)]; 및 WO2005012359를 참조한다. 선택된 항체는 정상적으로, VEGF에 대한 충분히 강력한 결합 친화도를 가질 것이고, 예를 들어 이러한 항체는 100 nM-1 pM의 K_d 값으로 hVEGF에 결합할 수 있다. 항체 친화도는 예를 들어 표면 플라즈몬 공명 기반 검정 (예컨대, PCT 출원 공개 번호 WO2005/012359에 기재된 바와 같은 비아코어(BIAcore)™ 검정); 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA); 및 경쟁 검정 (예를 들어, RIA)에 의해 결정될 수 있다. 상기 항체를 대상으로 다른 생물학적 활성 검정을 수행하여, 예를 들어 치료제로서의 그의 효과를 평가할 수 있다. 이러한 검정은 당업계에 공지되어 있고, 항체에 대한 표적 항원 및 의도된 용도에 따라 달라진다. 그의 예는 HUVEC 억제 검정, 종양 세포 성장 억제 검정 (예를 들어, WO 89/06692에 기재된 바와 같음), 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC) 및 보체-매개 세포독성 (CDC) 검정 (미국 특허 5,500,362), 및 효능작용 활성 또는 조혈 검정 (WO 95/27062 참조)을 포함한다. 항-VEGF 항체는 통상적으로 다른 VEGF 상동체, 예컨대 VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D 또는 VEGF-E 또는 기타 성장 인자, 예컨대 P1GF, PDGF 또는 bFGF 어느 것에도 결합하지 않을 것이다. 한 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 하이브리도마 ATCC HB 10709에 의해 생산된 모노클로날 항-VEGF 항체 A4.6.1과 동일한 에피토프에 결합하는 모노클로날 항체; "베바시주맙 (BV)" ("rhuMAb VEGF" 또는 "아바스틴(AVASTIN)®"으로도 공지됨)로 공지된 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 문헌 [Presta et al. (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]에 따라 생성된 재조합 인간화 항-VEGF 모노클로날 항체를 포함한다. 베바시주맙은 돌연변이된 인간 IgG1 프레임워크 영역, 및 인간 VEGF의 그의 수용체에 대한 결합을 차단하는 뮤린 항-hVEGF 모노클로날 항체 A.4.6.1로부터의 항원-결합 상보성-결정 영역을 포함한다. 대다수의 프레임워크 영역을 포함하는 베바시주맙의 아미노산 서열의 대략 93%는 인간 IgG1로부터 유래되고, 서열의 약 7%는 뮤린 항체 A4.6.1로부터 유래된다. 베바시주맙은 분자량이 약 149,000 달톤이고 글리코실화된다. 베바시주맙 및 다른 인간화 항-VEGF 항체는 2005년 2월 26일에 허여된 미국 특허 번호 6,884,879에 추가로 기재되어 있다.

[0046] 본원에 제공되는 임의의 방법, 용도 및 조성물에서, 항-VEGF 항체는 본원에 기재된 바와 같은 VEGF 특이적 길항제, 예를 들어 VEGF 수용체 분자 또는 키메라 VEGF 수용체 분자로 대체될 수 있다. 본원에 제공되는 방법, 용도 및 조성물의 특정 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 베바시주맙이다. 항-VEGF 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 모노클로날 항체, 키메라 항체, 완전 인간 항체 또는 인간화 항체일 수 있다. 본 발명의 방법에 유용한 예시적인 항체는 베바시주맙 (아바스틴®), G6 항체, B20 항체 및 그의 단편을 포함한다. 특정 실시양태에서, 항-VEGF 항체는 하기 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역:

[0047] EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGYTFT NYGMNWVRQA PGKGLEWVGW

[0048] INTYTGEPTY AADFKRRFTF SLDTSKSTAY LQMNSLRAED TAVYYCAKYP

[0049] HYYGSSHWYF DVWGQGTLVT VSS (서열 1)

[0050] 및 하기 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역:

[0051] DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSASQDIS NYLNWYQQKP GKAPKVLIYF

[0052] TSSLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YSTVPWTFGQ

[0053] GTKVEIKR (서열 2)

[0054] 을 갖는다.

[0055] 일부 실시양태에서 항-VEGF 항체는 하기 아미노산 서열: GYTFTNYGMN (서열 3)을 포함하는 CDRH1, 하기 아미노산 서열: WINTYTGEPTYAADFKR (서열 4)을 포함하는 CDRH2, 하기 아미노산 서열: YPHYYGSSHWYFDV (서열 5)를 포함하는 CDRH3, 하기 아미노산 서열: SASQDISNYLN (서열 6)을 포함하는 CDRL1, 하기 아미노산 서열: FTSSLHS (서열 7)를 포함하는 CDRL2 및 아미노산 서열: QQYSTVPWT (서열 8)를 포함하는 CDRL3 을 포함한다.

[0056] 추가의 바람직한 항체는 PCT 출원 공개 번호 WO2005/012359에 기재된 바와 같은, G6 또는 B20 시리즈 항체 (예를 들어, G6-23, G6-31, B20-4.1)를 포함한다. 추가의 바람직한 항체에 대해서는 미국 특허 번호 7,060,269, 6,582,959, 6,703,020; 6,054,297; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; 미국 특허 출원 번호 2006009360, 20050186208, 20030206899, 20030190317, 20030203409 및 20050112126; 및 문헌 [Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)]을 참조한다.

[0057] 본 발명에 따른 "G6 시리즈 항체"는 PCT 공개 번호 WO2005/012359 (그의 전체 개시내용은 명백하게 본원에 참조

로 포함됨)의 도 7, 24-26 및 34-35 중 어느 하나에 따른 G6 항체 또는 G6-유래 항체의 서열로부터 유래된 항-VEGF 항체이다. 또한, PCT 공개 번호 WO2005/044853을 참조하고, 그의 전체 개시내용은 명백하게 본원에 참조로 포함된다. 한 실시양태에서, G6 시리즈 항체는 잔기 F17, Y21, Q22, Y25, D63, I83 및 Q89를 포함하는 인간 VEGF 상의 기능적 에피토프에 결합한다.

[0058] 본 발명에 따른 "B20 시리즈 항체"는 PCT 공개 번호 WO2005/012359 (그의 전체 개시내용은 명백하게 본원에 참조로 포함됨)의 도 27-29 중 어느 하나에 따른 B20 항체 또는 B20-유래 항체의 서열로부터 유래된 항-VEGF 항체이다. 또한, PCT 공개 번호 WO2005/044853, 및 미국 특허 출원 60/991,302 (이들 특허 출원의 내용은 명백하게 본원에 참조로 포함됨)를 참조한다. 한 실시양태에서, B20 시리즈 항체는 잔기 F17, M18, D19, Y21, Y25, Q89, I91, K101, E103 및 C104를 포함하는 인간 VEGF 상의 기능적 에피토프에 결합한다.

[0059] "조혈 줄기/전구 세포" 또는 "원시 조혈 세포"는 보다 열성적이거나 성숙한 혈액 세포 유형을 형성하기 위해 분화될 수 있는 것이다. "림프구 혈액 세포 계열"은 림프구 (B-세포 또는 T-세포)를 형성하기 위해 분화될 수 있는 조혈 전구체 세포이다. 마찬가지로, "림프구생성"은 림프구의 형성이다. "적혈구 혈액 세포 계열"은 적혈구 (적혈구 세포)를 형성하기 위해 분화될 수 있는 조혈 전구체 세포이고, "적혈구생성"은 적혈구의 형성이다.

[0060] 본원의 목적상 "골수 혈액 세포 계열"은 상기 정의된 바와 같은 림프구 및 적혈구 혈액 세포 계열 이외의 모든 조혈 전구 세포를 포괄하고, "골수생성"은 혈액 세포 (림프구 및 적혈구 이외)의 형성과 관련이 있다.

[0061] 골수 세포 집단은 Gr1+/CD11b+ (또는 CD11b+Gr1+) 또는 Gr1+/Mac-1+인 골수 면역 세포에서 풍부화된다. 이들 세포는 대식세포 계열의 골수 세포에 대한 마커 CD11b, 및 과립구에 대한 마커 Gr1을 발현한다. Gr1+/CD11b+는 예를 들어 Gr1+에 대한 항체를 사용하는 면역부착 패닝에 의해 선택될 수 있다.

[0062] "골수 세포 감소제" 또는 "골수 세포 감소 작용제"는 골수 세포 집단을 감소시키거나 제거하는 작용제를 지칭한다. 전형적으로, 골수 세포 감소제는 골수 세포, CD11b+Gr1+, 단핵구, 대식세포 등을 감소시키거나 제거할 것이다. 골수 세포 감소제의 예는 Gr1+ 길항제, CD11b 길항제, CD18 길항제, 엘라스타제 억제제, MCP-1 길항제, MIP-1알파 길항제 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0063] 본원에 사용된 경우에 용어 "Gr1 길항제"는 Gr1에 결합하여 Gr1의 생물학적 활성을 억제하거나 실질적으로 감소시키는 분자를 지칭한다. Gr1 길항제의 비제한적 예는 항체, 단백질, 펩티드, 당단백질, 당펩티드, 당지질, 폴리사카라이드, 올리고사카라이드, 핵산, 생물유기 분자, 펩티드모방체, 약리학적 작용제 및 그의 대사물, 전사 및 번역 제어 서열 등을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, Gr1 길항제는 인간 Gr1에 결합하는 항체, 특히 항-Gr1 항체 또는 그의 단편이다.

[0064] 본원에 사용된 경우에 용어 "CD11b 길항제"는 CD11b에 결합하여 CD11b의 생물학적 활성을 억제하거나 실질적으로 감소시키는 분자를 지칭한다. 통상적으로, 이러한 길항제는 그의 세포 표면에서 CD11b 서브유닛을 발현하는 세포 (예를 들어, 미성숙 골수 세포)가 내피에 결합하는 능력을 (부분적으로 또는 완전히) 차단할 것이다. CD11b 길항제의 비제한적 예는 항체, 단백질, 펩티드, 당단백질, 당펩티드, 당지질, 폴리사카라이드, 올리고사카라이드, 핵산, 생물유기 분자, 펩티드모방체, 약리학적 작용제 및 그의 대사물, 전사 및 번역 제어 서열 등을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, CD11b 길항제는 항체, 특히 인간 CD11b에 결합하는 항-CD11b 항체이다. 예시적인 CD11b 항체는 MY904 (미국 특허 4,840,793); 1B6c (문헌 [Zhang et al., Brain Research 698:79-85 (1995)] 참조); CBRN1/5 및 CBRM1/19 (WO94/08620)를 포함한다.

[0065] "URCGP"는 항-VEGF 내성 종양으로부터의 CD11b+Gr1+ 세포에서 상향조절되는 단백질을 지칭한다. URCGP는 호중구 엘라스타제, CD14, expi, Il-13R, LDLR, TLR-1, RLF, Endo-Lip, SOCS13, FGF13, IL-4R, IL-11R, IL-1RII, IFN TM1, TNFRSF18, WNT5A, 분비성 담체 막 1, HSP86, EGFR, EphRB2, GPCR25, HGF, 안지오포이에틴 유사-6, Eph-RA7, 세마포린 VIb, 뉴로트로핀 5, 클라우딘-18, MDC15, ECM 및 ADAMTS7B를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, URCGP는 IL-13R, TLR-1, Endo-Lip, FGF13 및/또는 IL-4R을 지칭한다.

[0066] "DRCGP"는 항-VEGF 내성 종양으로부터의 CD11b+Gr1+ 세포에서 하향조절되는 단백질을 지칭한다. DRCG는 THBS1, Crea7, 아쿠아포린-1, 용질 담체 패밀리 단백질 (SCF38), 아포지단백질 E (APOE), 지방산 결합 단백질 (FABP), NCAM-140, 피브로넥틴 유형 III, WIP, CD74, ICAM-2, 재기드1, Itga4, ITGB7, TGF-BII-R, TGFb IEP, Smad4, BMPR1A, CD83, 덱틴-1, CD48, E-셀렉틴, IL-15, 시토카인 신호 전달 4의 저해제, Cytor4 및 CX3CR1을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, DRCGP는 THBS1 및/또는 Crea7을 지칭한다.

[0067] "URRTP"는 항-VEGF 내성 종양에서 상향조절되는 단백질을 지칭한다. URRTP는 Notch2, DMD8, MCP-1, ITGB7, G-CSF, IL-8R, MIP2, MSCA, GM-CSF, IL-1R, Meg-SF, HSP1A, IL-1R, G-CSFR, IGF2, HSP9A, FGF18, ELM1, Ledgfa,

스캐빈저 수용체 유형 A, 대식세포 C-유형 렉틴, Pigr3, 대식세포 SRT-1, G 단백질-커플링된 수용체, ScyA7, IL-1R2, IL-1 유도성 단백질, IL-1베타 및 ILIX 전구체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, URRTP는 MSCA, MIP2, IL-8R 및/또는 G-CSF를 지칭한다.

[0068] "DRRTP"는 항-VEGF 내성 종양에서 하향 조절되는 단백질을 지칭한다. URRTP는 IL10-R2, Erb-2.1, 카베올린3, Semcap3, INTG4, THBSP-4, ErbB3, JAM, Eng, JAM, Eng, JAM-2, Pecam1, Tlr3, TGF-B, FIZZ1, Wfs1, TP 14A, EMAP, SULF-2, 세포외 매트릭스 2, CTFG, TFPI, XCP2, Ramp2, ROR-알파, 에프린 (Ephrin) B1, SPARC-유사 1, 및 세마포린 A를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, DRRTP는 IL10-R2, THBSP-4 및/또는 JAM-2를 지칭한다.

[0069] 용어 "생물학적 샘플"은 모든 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간으로부터의 신체 샘플을 지칭한다. 이러한 샘플은 생물학적 유체, 예컨대 혈액, 혈청, 혈장, 골수, 유리체액, 림프액, 활액, 여포액, 정액, 양수, 유즙, 전혈, 소변, 뇌척수액, 타액, 객담, 누액, 땀, 점액 및 조직 배양 배지 뿐만 아니라 조직 추출물, 예를 들어 균질화 조직, 및 세포 추출물을 포함한다. 본원에서 바람직한 생물학적 샘플은 혈청, 혈장, 소변 또는 골수 샘플이다.

[0070] 용어 "항체"는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 구체적으로는 모노클로날 항체 (전장 또는 무손상 모노클로날 항체 포함), 폴리클로날 항체, 다가 항체, 2개 이상의 무손상 항체로부터 형성된 다중특이적 항체 (예를 들어, 이중특이적 항체), 및 원하는 생물학적 활성을 나타내는 항체 단편 (하기 참고)을 포함한다.

[0071] 달리 나타내지 않는 한, 표현 "다가 항체"는 본 명세서 전반에 걸쳐 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함하는 항체를 나타내도록 사용된다. 다가 항체는 전형적으로 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖도록 조작되고, 일반적으로 천연 서열 IgM 또는 IgA 항체가 아니다.

[0072] "항체 단편"은 일반적으로 본래 항체의 항원 결합 부위를 포함하므로, 항원에 결합하는 능력을 보유하고 있는 본래 항체의 일부만을 포함한다. 이러한 정의에 포괄되는 항체 단편의 예는 하기를 포함한다: (i) VL, CL, VH 및 CH1 도메인을 갖는 Fab 단편, (ii) CH1 도메인의 C-말단에 1개 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fab 단편인 Fab' 단편, (iii) VH 및 CH1 도메인을 갖는 Fd 단편, (iv) VH 및 CH1 도메인을 갖고 CH1 도메인의 C-말단에 1개 이상의 시스테인 잔기를 갖는 Fd' 단편, (v) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인을 갖는 Fv 단편, (vi) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편 (문헌 [Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)]), (vii) 단리된 CDR 영역, (viii) 힌지 영역에서 디술피드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab' 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')2 단편, (ix) 단일 쇄 항체 분자 (예를 들어, 단일 쇄 Fv; scFv) (문헌 [Bird et al., Science 242:423-426 (1988); 및 Huston et al., PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988)]), (x) 동일한 폴리펩티드 쇄에서 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함하는, 2개의 항원 결합 부위를 갖는 "디아바디" (예를 들어, EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)] 참조), (xi) 상보적 경쇄 폴리펩티드와 함께 항원 결합 영역의 쌍을 형성하는 병렬식 Fd 절편 (VH-CH1-VH-CH1)의 쌍을 포함하는 "선형 항체" (문헌 [Zapata et al. Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)]; 및 미국 특허 번호 5,641,870).

[0073] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하도록 사용되고, 즉 이러한 집단을 구성하는 개별 항체는 일반적으로 소량으로 존재할 수도 있는, 예를 들어 자연 발생 돌연변이를 포함하거나 모노클로날 항체 제제의 생산 동안 생성되는 가능한 변이체 항체를 제외하고는 동일하고/하거나, 동일한 에피토프에 결합한다. 전형적으로 상이한 결정기 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 달리, 모노클로날 항체 제제의 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정기에 대해 지시된다. 따라서, 수식어 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 동종인 집단으로부터 수득된 항체의 특성을 나타내고, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 필요로 하는 것으로 간주되지 않아야 한다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법, 재조합 DNA 방법, 파지-디스플레이 방법, 및 인간 이뮤노글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유하는 트랜스제닉 동물을 이용하는 방법을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 기술에 의해 제조할 수 있고, 상기 방법 및 모노클로날 항체를 제조하기 위한 다른 예시적인 방법이 본원에 기재된다. 수식어 "모노클로날"은 항체의 특성이 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 것임을 나타내며, 임의의 특정한 방법에 의한 항체 생산을 필요로 하는 것으로 간주되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는, 예를 들어 하이브리도마 방법 (예를 들어, 문헌 [Kohler and Milstein, Nature, 256:495-97 (1975); Hongo et al., Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988);

Hammerling et al., Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)]), 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조), 파지-디스플레이 기술 (예를 들어, 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991); Sidhu et al., J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 및 Lee et al., J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004)] 참조), 및 인간 이뮤노글로불린 서열을 코딩하는 인간 이뮤노글로불린 유전자좌 또는 유전자의 일부 또는 전부를 갖는 동물에서 인간 또는 인간-유사 항체를 생산하는 기술 (예를 들어, WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; 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 번호 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 및 5,661,016; 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996); 및 Lonberg and Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)] 참조)을 비롯한 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0074] 본원에서 모노클로날 항체는 구체적으로 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정한 종으로부터 유래되거나 특정한 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이고, 쇄(들)의 나머지 부분은 또 다른 종으로부터 유래되거나 또 다른 항체 부류 또는 하위부류에 속하는 항체의 상응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체, 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 이러한 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 번호 4,816,567; 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)]).

[0075] 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대다수의 경우에, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역의 잔기가 바람직한 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비-인간 종 (공여자 항체)의 초가변 영역의 잔기로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기가 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서는 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 개선되도록 한다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린의 초가변 루프에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 또한, 인간화 항체는 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc) 중 적어도 일부, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 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. 또한, 문헌 [Vaswani and Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998); Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994); 및 미국 특허 번호 6,982,321 및 7,087,409를 참조한다. 또한, 문헌 [van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5:368-74 (2001)]을 참조한다. 인간 항체는 항원 시험접종에 반응하여 이러한 항체를 생성하도록 변형되었으나 내인성 유전자좌는 무력화시킨 트랜스제닉 동물, 예를 들어 면역화된 제노마우스에게 항원을 투여하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 제노마우스(XENOMOUSE)™ 기술에 관한 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584 참조). 또한, 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체에 관해서는 예를 들어 문헌 [Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]을 참조한다.

[0076] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 인간 항체이다. 인간 항체는 다양한 당업계의 공지된 기술을 이용하여 생산될 수 있다. 인간 항체는 일반적으로 문헌 [van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001) 및 Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008)]에 기재되어 있다.

[0077] 인간 항체는 항원 접종에 반응하여 인간 가변 영역을 갖는 무손상 인간 항체 또는 무손상 항체를 생산하도록 변형된 트랜스제닉 동물에게 면역원을 투여하여 제조할 수 있다. 이러한 동물은 전형적으로 내인성 이뮤노글로불린 유전자좌를 대체하거나 또는 염색체외에 존재하거나 동물의 염색체로 무작위적으로 통합된 인간 이뮤노글로불린 유전자좌의 전부 또는 일부를 함유한다. 이러한 트랜스제닉 마우스에서, 내인성 이뮤노글로불린 유전자좌는 일반적으로 불활성화된다. 트랜스제닉 동물로부터 인간 항체를 얻는 방법의 검토에 대해서는, 문헌 [Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005)]을 참조한다. 또한, 예를 들어 미국 특허 번호 6,075,181 및 6,150,584 (제노마우스™ 기술 기재); 미국 특허 번호 5,770,429 (HUMAB® 기술 기재); 미국 특허 번호

7,041,870 (K-M 마우스(K-M MOUSE)® 기술 기재), 및 미국 특허 출원 공개 번호 US 2007/0061900 (벨로시마우스(VELOCIMOUSE)® 기술 기재)을 참조한다. 이러한 동물에 의해 생성된 무손상 항체로부터의 인간 가변 영역은 예를 들어 상이한 인간 불변 영역과 조합시켜 추가로 변형될 수 있다.

[0078] 인간 항체는 또한 하이브리도마-기반 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체의 생산을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주가 기재되어 있다. (예를 들어, 문헌 [Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 및 Boerner et al., J. Immunol., 147: 86 (1991)] 참조). 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 생성된 인간 항체는 또한 문헌 [Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)]에 기재되어 있다. 추가의 방법은, 예를 들어 미국 특허 번호 7,189,826 (하이브리도마 세포주로부터의 모노클로날 인간 IgM 항체 생산 기재) 및 문헌 [Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006)] (인간-인간 하이브리도마 기재)에 기재된 것을 포함한다. 인간 하이브리도마 기술 (트리오마(Trioma) 기술)은 또한 문헌 [Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) 및 Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)]에 기재되어 있다.

[0079] 인간 항체는 또한 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열을 단리하여 생성될 수 있다. 이어서, 이러한 가변 도메인 서열은 바람직한 인간 불변 도메인과 조합될 수 있다.

[0080] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 부분이 항체마다 서열에서 광범위하게 상이하며, 각각의 특정한 항체의 그의 특정한 항원에 대한 결합 및 특이성에 이용된다는 사실을 지칭한다. 그러나, 가변성이 항체의 가변 도메인 전반에 걸쳐 고르게 분포되어 있는 것은 아니다. 이는 경쇄 가변 도메인과 중쇄 가변 도메인 둘 다 내에 초가변 영역이라 지칭되는 3개의 절편에 집중되어 있다. 가변 도메인의 보다 고도로 보존된 부분은 프레임워크 영역 (FR)으로 지칭된다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각, 베타-시트 형태를 주로 채택하는 4개의 FR을 포함하고, 이들은 상기 베타-시트 구조를 연결하며 일부 경우에는 베타-시트 구조의 일부를 형성하는 루프를 형성하는 3개의 초가변 영역에 의해 연결된다. 각 쇄로부터의 초가변 영역은 FR에 의해 서로 근접하게 위치하고, 다른 쇄로부터의 초가변 영역과 함께 항체의 항원-결합 부위의 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 항체가 항원에 결합하는 것에 직접 관여하지는 않지만, 항체-의존성 세포 독성에서의 항체의 참여와 같은 다양한 이펙터 기능을 나타낸다.

[0081] 본원에 사용된 용어 "초가변 영역" 또는 "HVR"은 서열이 초가변성이고/거나 구조적으로 한정된 루프 ("초가변 루프")를 형성하는 항체 가변 도메인의 각각의 영역을 지칭한다. 일반적으로, 천연 4-쇄 항체는 6개의 HVR; VH 내의 3개 (H1, H2, H3) 및 VL 내의 3개 (L1, L2, L3)를 포함한다. HVR은 일반적으로 초가변 루프로부터의 및/또는 "상보성 결정 영역" (CDR)으로부터의 아미노산 잔기를 포함하며, 후자는 서열 가변성이 가장 높고/거나 항원 인식과 관련된다. 예시적인 초가변 루프는 아미노산 잔기 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), 및 96-101 (H3)에서 발생한다. (문헌 [Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). 예시적인 CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 24-34, L2의 50-56, L3의 89-97, H1의 31-35B, H2의 50-65 및 H3의 95-102에서 발생한다. (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]). VH 내의 CDR1을 제외하고, CDR은 일반적으로 초가변 루프를 형성하는 아미노산 잔기를 포함한다. CDR은 또한 항원에 접촉하는 잔기인 "특이성 결정 잔기" 또는 "SDR"을 포함한다. SDR은 단축-CDR 또는 a-CDR로 지칭되는 CDR의 영역 내에 함유된다. 예시적인 a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 및 a-CDR-H3)은 L1의 아미노산 잔기 31-34, L2의 50-55, L3의 89-96, H1의 31-35B, H2의 50-58 및 H3의 95-102에서 발생한다. (문헌 [Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)] 참조). 달리 나타내지 않는 한, HVR 잔기 및 가변 도메인에서의 다른 잔기 (예를 들어, FR 잔기)는 본원에서 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다. 다수의 HVR 설명이 사용되고 있고 본원에 포괄된다. 카바트(Kabat) 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 가변성을 기반으로 하며, 가장 통상적으로 사용된다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]). 대신, 코티아(Chothia)는 구조적 루프의 위치를 지칭한다 (문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). AbM HVR은 카바트 HVR과 코티아 구조적 루프 사이의 절충안을 나타내고, 옥스포드 몰레큘라(Oxford Molecular)의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다. "접촉" HVR은 이용가능한 복합체 결정 구조의 분석을 기반으로 한다. 각각의 이들 HVR로부터의 잔

기는 표 1에 기재된다.

표 1

카바트, AbM 및 코티아에 따른 HVR에 대한 잔기 비교

루프	카바트	AbM	코티아	접촉
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (카바트 넘버링)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (코티아 넘버링)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0082]

[0083] HVR은 하기와 같이 "확장된 HVR"을 포함할 수 있다: VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2) 및 89-97 또는 89-96 (L3), 및 VH에서 26-35 (H1), 50-65 또는 49-65 (H2) 및 93-102, 94-102 또는 95-102 (H3). 가변 도메인 잔기는 각각의 상기 정의에 대해 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.

[0084] "프레임워크" 또는 "FR"은 초가변 영역 (HVR) 잔기 이외의 가변 도메인 잔기를 지칭한다. 가변 도메인의 FR은 일반적으로 4개의 FR 도메인: FR1, FR2, FR3 및 FR4로 이루어진다. 따라서, HVR 및 FR 서열은 일반적으로 VH (또는 VL)에서 하기 순서로 나타난다: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

[0085] 용어 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링" 및 그의 변형은 카바트 등의 상기 문헌에서 항체 편집의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 사용된 넘버링 시스템을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 이용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 HVR의 단축 또는 이것으로의 삽입에 상응하는 보다 적은 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 후에 단일 아미노산 삽입 (카바트에 따른 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 후에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따른 잔기 82a, 82b 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 주어진 항체에 대해, 항체 서열을 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 상동성 영역에서 정렬하여 결정할 수 있다.

[0086] 본 명세서 및 특허청구범위 전반에 걸쳐, 가변 도메인 내의 잔기 (대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)를 언급하기 위해 카바트 넘버링 시스템이 일반적으로 사용된다 (예를 들어, [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)] 참조). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 인덱스"는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 영역 내의 잔기를 언급할 때 일반적으로 사용된다 (예를 들어, 명백하게 본원에 참조로 포함된 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)]에 보고된 EU 인덱스 참조). 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체의 가변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 카바트 넘버링 시스템에 의해 넘버링된 잔기를 의미한다. 본원에서 달리 언급되지 않는 한, 항체의 불변 도메인 내의 잔기 번호에 대한 언급은 EU 넘버링 시스템에 의한 잔기 넘버링을 의미한다 (예를 들어, 미국 가출원 번호 60/640,323에서 EU 넘버링에 대한 도면 참조).

[0087] 중쇄 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 항체 (이뮤노글로불린)는 상이한 부류로 지정될 수 있다. 5가지 주요 부류의 이뮤노글로불린, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 있고, 이들 중 일부는 하위부류 (이소형), 예를 들어 IgG_1 (비-A 및 A 동종이형 포함), IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1 및 IgA_2로 추가로 나뉠 수 있다. 상이한 부류의 항체에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 α, δ, ε, γ 및 μ로 불린다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린의 서브유닛 구조 및 3차원 입체형상은 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Abbas et al. Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (W.B. Saunders, Co., 2000)]에 일반적으로 설명되어 있다. 항체는 항체와 하나 이상의 다른 단백질 또는 펩티드의 공유 또는 비-공유 회합에 의해 형성되는, 더 큰 융합 분자의 일부일 수 있다.

[0088] 임의의 척추동물 종으로부터의 항체 (이뮤노글로불린)의 "경쇄"는 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카

파 (κ) 및 람다 (λ)로 지칭되는 명백하게 상이한 2가지 유형 중의 하나로 지정될 수 있다.

[0089] 용어 "Fc 영역"은 본래 항체를 파파인 소화시킴으로써 생성될 수 있는 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 규정하기 위해 사용된다. Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 변이체 Fc 영역일 수 있다. 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계는 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은 일반적으로 약 위치 Cys226, 또는 약 위치 Pro230의 아미노산 잔기로부터 Fc 영역의 카르복실-말단까지의 스트레치로 정의된다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은, 예를 들어 항체의 생산 또는 정제 동안 또는 항체의 중쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 조작에 의해 제거될 수 있다. 따라서, 무손상 항체의 조성물은 모든 K447 잔기가 제거된 항체 집단, K447 잔기가 제거되지 않는 항체 집단, 및 K447 잔기가 존재하는 항체와 존재하지 않는 항체들의 혼합물을 갖는 항체 집단을 포함할 수 있다. 이뮤노글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 2개의 불변 도메인인 CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하고, 임의로 CH4 도메인을 포함한다.

[0090] 본원에서 달리 나타내지 않는 한, 이뮤노글로불린 중쇄 내 잔기의 넘버링은 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에서와 같은 EU 인덱스의 넘버링이다. "카바트에서와 같은 EU 인덱스"는 인간 IgG1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다.

[0091] "Fc 영역 쇄"는 본원에서 Fc 영역의 2개의 폴리펩티드 쇄 중의 하나를 의미한다.

[0092] 인간 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인" ("Cg2" 도메인으로서 지칭되기도 함)은 통상적으로, 아미노산 잔기 위치 약 231에서부터 아미노산 잔기 위치 약 340까지 연장된다. CH2 도메인은 또 다른 도메인과 근접하게 쌍형성하지 않는다는 점에서 독특하다. 오히려, 2개의 N-연결된 분지형 탄수화물 쇄가 무손상 천연 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에 배치된다. 탄수화물이 도메인-도메인 쌍형성에 대한 대안을 제공하고 CH2 도메인의 안정화를 도울 수 있는 것으로 추정되었다. 문헌 [Burton, Molec. Immunol.22:161-206 (1985)]. 본원에서의 CH2 도메인은 천연 서열 CH2 도메인 또는 변이체 CH2 도메인일 수 있다.

[0093] "CH3 도메인"은 Fc 영역에서 CH2 도메인에 대해 C-말단인 잔기의 연장물을 포함한다 (즉, IgG의 아미노산 잔기 위치 약 341에서부터 아미노산 잔기 위치 약 447까지). 본원에서의 CH3 영역은 천연 서열 CH3 도메인 또는 변이체 CH3 도메인 (예를 들어, 그의 1개 쇄 내에 "돌출부"가 도입되고 그의 다른 쇄 내에 "함몰부"가 상응하게 도입된 CH3 도메인)일 수 있다 (본원에 참조로 도입된 미국 특허 번호 5,821,333 참조). 이러한 변이체 CH3 도메인을 사용하여 본원에서 기재된 바와 같은 다중특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항체를 제조할 수 있다.

[0094] "힌지 영역"은 일반적으로 인간 IgG1의 약 Glu216 또는 약 Cys226에서 약 Pro230까지의 스트레치로 정의된다 (문헌 [Burton, Molec. Immunol.22:161-206 (1985)]). 다른 IgG 이소형의 힌지 영역은 중쇄간 S-S 결합을 형성하는 첫번째 및 마지막 시스테인 잔기를 IgG1 서열과 동일한 위치에 배치하여 정렬될 수 있다. 본원에서의 힌지 영역은 천연 서열 힌지 영역 또는 변이체 힌지 영역일 수 있다. 변이체 힌지 영역의 2개의 폴리펩티드 쇄는 일반적으로 폴리펩티드 쇄 1개 당 1개 이상의 시스테인 잔기를 보유하고, 이에 따라 변이체 힌지 영역의 2개의 폴리펩티드 쇄는 2개의 쇄 사이에서 디술피드 결합을 형성할 수 있다. 본원에서의 바람직한 힌지 영역은 천연 서열 인간 힌지 영역, 예를 들어 천연 서열 인간 IgG1 힌지 영역이다.

[0095] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 하나 이상의 "이펙터 기능"을 보유한다. 예시적인 "이펙터 기능"은 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체, BCR)의 하향 조절 등을 포함한다. 이러한 이펙터 기능에는 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어, 항체 가변 도메인)과 조합될 것이 요구되고, 이러한 항체 이펙터 기능을 평가하기 위해 당업계에 공지된 다양한 검정을 이용하여 평가할 수 있다.

[0096] "천연 서열 Fc 영역"은 자연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 Fc 영역은 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역 (비-A 및 A 동종이형); 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연 서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역 뿐만 아니라 그의 자연 발생 변이체를 포함한다.

[0097] "무손상" 항체는 항원-결합 가변 영역, 뿐만 아니라 경쇄 불변 도메인 (C_L) 및 중쇄 불변 도메인 C_H1, C_H2 및 C_H3을 포함하는 것이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 무손상 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 갖는 것이 바람직하다.

[0098] "모 항체" 또는 "야생형" 항체는 본원에 개시된 항체 변이체에 비해 하나 이상의 아미노산 서열 변경이 결여된 아미노산 서열을 포함하는 항체이다. 따라서, 일반적으로 모 항체는 본원에 개시된 바와 같은 항체 변이체의 상응하는 초가변 영역의 아미노산 서열과 아미노산 서열 면에서 상이한 하나 이상의 초가변 영역을 갖는다. 모

폴리펩티드는 천연 서열 (즉, 자연 발생) 항체 (자연 발생 대립유전자 변이체 포함), 또는 자연 발생 서열의 기존 아미노산 서열 변형 (예컨대, 삽입, 결실 및/또는 다른 변경)이 있는 항체를 포함할 수 있다. 본원 전체에서, "야생형", "WT", "wt", 및 "모" 또는 "모계" 항체는 서로 교환가능하게 사용된다.

[0099] 본원에 사용되는 바와 같이, "항체 변이체" 또는 "변이체 항체"는 모 항체의 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 갖는 항체를 의미한다. 바람직하게는, 항체 변이체는 자연에서 발견되지 않는 아미노산 서열을 갖는 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 이러한 변이체는 모 항체와의 서열 동일성 또는 유사성이 반드시 100% 미만이다. 바람직한 실시양태에서, 항체 변이체의 아미노산 서열은 모 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인 중 하나의 아미노산 서열과의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성이 약 75% 내지 100% 미만이고, 보다 바람직하게는 약 80% 내지 100% 미만, 보다 바람직하게는 약 85% 내지 100% 미만, 보다 바람직하게는 약 90% 내지 100% 미만, 및 가장 바람직하게는 약 95% 내지 100% 미만이다. 일반적으로 항체 변이체는 그의 하나 이상의 초가변 영역 내에 또는 이에 인접하여 하나 이상의 아미노산 변경을 포함하는 것이다.

[0100] "변이체 Fc 영역"은 하나 이상의 아미노산 변형을 통해 천연 서열 Fc 영역과는 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교하여 적어도 1개의 아미노산 치환, 예를 들어 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환을 갖고, 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역 내에 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 전형적으로, 본원에서의 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 예를 들어 적어도 약 80%의 서열 동일성, 또는 적어도 약 90%의 서열 동일성, 또는 적어도 약 95% 또는 그 초과의 서열 동일성을 가질 것이다.

[0101] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭하고, 항체 이소형에 따라 달라진다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성 (CDC); Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0102] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성의 세포 (예를 들어, 자연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비된 Ig가, 상기 세포독성의 이펙터 세포가 항원 보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후, 표적 세포를 세포독소로 사멸시키도록 만드는 세포독성의 한 형태를 의미한다. ADCC를 매개하는 일차 세포인 NK 세포는 FcγRIII만을 발현하는 반면에, 단핵구는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII를 발현한다. 조혈 세포 상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. PNAS USA 95:652-656 (1998)]에 기재된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다.

[0103] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 특정 실시양태에서, 세포는 적어도 FcγRIII를 발현하고 ADCC 이펙터 기능(들)을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 자연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함하고, PBMC 및 NK 세포가 일반적으로 바람직하다. 이펙터 세포는 천연 공급원으로부터, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 혈액 또는 PBMC로부터 단리될 수 있다.

[0104] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 일부 실시양태에서, FcR은 천연 인간 FcR이다. 일반적으로, FcR은 IgG 항체에 결합하는 수용체 (감마 수용체)이고, FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII 하위부류의 수용체를 포함하며, 이들은 이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 대안적으로 스플라이싱된 형태를 포함한다. FcγRII 수용체는 FcγRIIA ("활성화 수용체") 및 FcγRIIB ("억제 수용체")를 포함하는데, 이들은 그의 세포질 도메인에서 주로 차이가 나는 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 FcγRIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재의 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 FcγRIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다. (예를 들어, 문헌 [Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 참조). FcR은 예를 들어 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); 및 de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에서 검토된다. 추후로 확인될 것을 포함하여 다른 FcR이 본원에서의 용어 "FcR"에 포괄된다.

[0105] 용어 "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 또한 모체 IgG에서 태아로의 전달 (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587

(1976) 및 Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]) 및 이뮤노글로불린의 항상성 조절을 담당하는 신생아 수용체 FcRn을 포함한다. FcRn에 대한 결합을 측정하는 방법은 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Ghetie and Ward., Immunol. Today 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15(7):637-640 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004)]; WO 2004/92219 (Hinton et al.) 참조).

[0106] 인간 FcRn 고친화도 결합 폴리펩티드의 인간 FcRn에 대한 생체내 결합 및 혈청 반감기는, 예를 들어 인간 FcRn을 발현하는 트랜스제닉 마우스 또는 형질감염된 인간 세포주에서, 또는 변이체 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드를 투여한 영장류에서 검정할 수 있다. WO 2000/42072 (Presta)는 FcR에 대한 결합이 개선되거나 감소된 항체 변이체를 기재하고 있다. 또한, 예를 들어 문헌 [Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)]을 참조한다.

[0107] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체 존재하의 표적 세포의 용해를 지칭한다. 고전적인 보체 경로의 활성화는 보체계의 제1 성분 (C1q)이 동족 항원에 결합된 항체 (적절한 하위부류의 항체)에 결합함으로써 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다. 변경된 Fc 영역 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 변이체 (변이체 Fc 영역을 갖는 폴리펩티드) 및 증가되거나 감소된 C1q 결합 능력을 갖는 폴리펩티드 변이체는 예를 들어 미국 특허 번호 6,194,551 B1 및 WO 1999/51642에 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Idusogie et al., J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)]을 또한 참조한다.

[0108] "친화도 성숙" 항체는 변경(들)을 보유하지 않는 모 항체와 비교하여 항원에 대한 항체의 친화도가 개선된, 그의 하나 이상의 CDR 내에 하나 이상의 변경을 갖는 항체이다. 한 실시양태에서, 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰의 친화도를 갖는다. 친화도 성숙 항체는 당업계에 공지된 절차에 의해 생산된다. 문헌 [Marks et al., Bio/Technology 10:779-783 (1992)]은 VH 및 VL 도메인 셔플링에 의한 친화도 성숙을 기재하고 있다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이유발은 문헌 [Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier et al. Gene 169:147-155 (1995); Yelton et al. J. Immunol. 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995); 및 Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)]에 의해 기재되어 있다.

[0109] 본원에서 "가요성 링커"는 폴리펩티드 결합(들)에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드를 지칭하고, 이는 이로써 연결된 2개 폴리펩티드 (예를 들어, 2개의 Fd 영역)에 대한 더 많은 회전상의 자유를 제공해준다. 이러한 회전상 자유는 가요성 링커에 의해 연결된 2개 이상의 항원 결합 부위가 각각 표적 항원(들)에 보다 효율적으로 접근하도록 허용한다. 적합한 가요성 링커 펩티드 서열의 예는 gly-ser, gly-ser-gly-ser (서열 34), ala-ser, 및 gly-gly-gly-ser (서열 35)를 포함한다.

[0110] "이량체화 도메인"은 2개 이상의 아미노산 잔기 (일반적으로 시스테인 잔기)의 연합 또는 2개 이상의 펩티드 또는 폴리펩티드 (이는 동일하거나 상이한 아미노산 서열을 가질 수 있다)의 회합에 의해 형성된다. 펩티드 또는 폴리펩티드는 공유 및/또는 비-공유 회합(들)을 통해 서로 상호작용할 수 있다. 본원에서 이량체화 도메인의 예는 Fc 영역; 힌지 영역; CH3 도메인; CH4 도메인; CH1-CL 쌍; 미국 특허 번호 5,821,333 (본원에 명백하게 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같은, 조작된 "노브(knob)" 및/또는 "돌출부"를 갖는 "인터페이스"; 류신 지퍼 (예를 들어, jun/fos 류신 지퍼 (문헌 [Kostelney et al., J. Immunol., 148: 1547-1553 (1992)] 참조); 또는 효모 GCN4 류신 지퍼); 이소류신 지퍼; 수용체 이량체 쌍 (예를 들어, 인터류킨-8 수용체 (IL-8R); 및 인테그린 이종이량체, 예컨대 LFA-1 및 GPIIIb/IIIa), 또는 이들의 이량체화 영역(들); 이량체성 리간드 폴리펩티드 (예를 들어, 신경 성장 인자 (NGF), 뉴로트로핀-3 (NT-3), 인터류킨-8 (IL-8), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), VEGF-C, VEGF-D, PDGF 구성원, 및 뇌-유래 향신경성 인자 (BDNF) (문헌 [Arakawa et al., J. Biol. Chem. 269(45): 27833-27839 (1994) 및 Radziejewski et al., Biochem. 32(48): 1350 (1993)] 참조), 또는 이들의 이량체화 영역(들); 디술피드 결합을 형성할 수 있는 한 쌍의 시스테인 잔기; 한 쌍의 펩티드 또는 폴리펩티드 (각각은 적어도 1개의 시스테인 잔기 (예를 들어, 약 1개, 2개 또는 3 내지 약 10개 시스테인 잔기)를 포함하므로 디술피드 결합(들)이 상기 펩티드 또는 폴리펩티드 사이에 형성될 수 있음 (이하 "합성 힌지")); 및 항체 가변 도메인을 포함한다. 본원에서 가장 바람직한 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 힌지 영역이다.

[0111] 항체의 "기능적 항원 결합 부위"는 표적 항원과 결합할 수 있는 것이다. 항원 결합 부위의 항원 결합 친화도는 항원 결합 부위가 유래된 모 항체만큼 강할 필요는 없지만, 항원에 결합하는 능력은 항원에 대한 항체 결합의 평가에 대해 공지된 다양한 방법 중 어느 하나를 이용하여 측정가능해야 한다. 또한, 본원에서의 다가 항체의 항원 결합 부위 각각의 항원 결합 친화도가 정량적으로 동일할 필요는 없다. 본원에서의 다량체성 항체의

경우, 기능적 항원 결합 부위의 수는 초원심분리 분석을 이용하여 평가할 수 있다. 이러한 분석 방법에 따라, 다량체 항체에 대한 표적 항원의 상이한 비를 조합하고, 기능적 결합 부위의 상이한 수를 추정하여 복합체의 평균 분자량을 계산한다. 이러한 이론적 값을 기능적 결합 부위의 수를 평가하기 위해 수득된 실제 실험 값과 비교한다.

[0112] 지정된 항체의 "생물학적 특징"을 갖는 항체는 그를 동일한 항원과 결합하는 다른 항체와 구별하는 항체의 하나 가지 이상의 생물학적 특징을 보유하는 것이다.

[0113] 관심 항체에 의해 결합된 항원 상의 에피토프에 결합하는 항체에 대한 스크리닝을 위해, 문헌 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 것과 같은 통상적인 교차-차단 검정을 수행할 수 있다.

[0114] 용어 "에피토프"는 단백질 항원 상의 (모노클로날 또는 폴리클로날) 항체에 대한 결합 부위를 지칭하기 위해 사용된다.

[0115] 본원에 사용된 "치료" (및 "치료하다" 또는 "치료하는"과 같은 그의 문법적 변형)는 치료되는 개체의 자연적 과정을 변경시키려는 임상적 개입을 지칭하고, 임상 병리상태의 예방을 위해 또는 그 과정 동안 수행될 수 있다. 바람직한 치료 효과는 질환의 발생 또는 재발 예방, 증상의 완화, 질환의 임의의 직접적 또는 간접적 병리학적 결과의 축소, 전이의 예방, 질환 질행 속도의 감소, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 완화 또는 개선된 예후를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 항체는 질환의 발생을 지연시키거나 또는 질환의 진행을 느리게 하기 위해 사용된다. 구체적으로, 치료는 세포 변성 또는 손상의 병리 상태, 예를 들어 골수 세포의 동원 및/또는 종양 혈관신생과 연관된 질환 또는 질환의 병리 상태를 직접적으로 예방하거나, 느리게 하거나 또는 달리 저하시킬 수 있다.

[0116] 작용제, 예를 들어 제약 제제의 "유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기에 유효한 양을 지칭한다.

[0117] 용어 "종양"은 악성이든 또는 양성이든 모든 신생물성 세포 성장 및 증식 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 지칭한다. 용어 "암", "암성", "세포 증식성 장애", "증식성 장애" 및 "종양"은 본원에 지칭된 바와 같이 상호 배타적이지 않다.

[0118] 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 비조절된 세포 성장/증식을 특징으로 하는 포유동물의 생리학적 상태를 지칭하거나 기재한다. 암의 예는 암종, 림프종 (예를 들어, 호지킨 및 비-호지킨 림프종), 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예는 편평세포암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포성암, 위장암, 췌장암, 신경교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간세포암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 백혈병 및 다른 림프증식성 장애, 및 다양한 유형의 두경부암을 포함한다.

[0119] 용어 "내성 종양"은 암 요법 과정 전반에 걸쳐 적어도 VEGF 길항제를 포함하는 암 요법에 대해 완전히 반응하지 않거나, 반응이 상실되거나 또는 반응이 감소된 암, 암성 세포 또는 종양을 지칭한다. 내성 종양은 또한, 본원에서 내성인 것으로 진단된 종양 (본원에서 "항-VEGF 내성 종양"으로서 지칭되기도 함)을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 적어도 VEGF 길항제를 포함하는 요법에 대해 감수성인 종양과 비교하여 내성 종양에서는 CD11b+Gr1+ 세포가 증가한다.

[0120] 용어 "항-신생물 조성물"은 하나 이상의 활성 치료제, 예를 들어 "항암제"를 포함하는, 암을 치료하는데 유용한 조성물을 지칭한다. 치료제 (항암제)의 예는, 예를 들어 화학요법제, 성장 억제제, 세포독성제, 방사선 요법에 사용되는 작용제, 항혈관신생제, 아폽토시스제, 항튜불린제, 독소, 및 암을 치료하기 위한 다른 작용제, 예를 들어 항-VEGF 중화 항체, VEGF 길항제, 항-G-CSF 길항제, 인터페론, 시토카인, 예컨대 IL-17 또는 IL-17 수용체 또는 VEGF 수용체 길항제 (예를 들어, 중화 항체), 및 다른 생물활성 및 유기 화학적 작용제 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 그의 조합이 또한 본 발명에 포함된다.

[0121] 용어 "세포증식억제제"는 시험관내 또는 생체내에서 세포의 성장을 정지시키는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 세포증식억제제는 S 기에서 세포의 백분율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 세포증식억제제의 추가의 예는 G0/G1 정지 또는 M-기 정지를 유도함으로써 세포 주기 진행을 차단하는 작용제를 포함한다. 인간화 항-Her2 항체 트라스투주맙 (헤르셉틴(HERCEPTIN)®)은 G0/G1 정지를 유도하는 세포증식억제제의 예이다. 전통적인 M-기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산, 및 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대

독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 특정 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C는 또한 S-기 정지로 이어진다. 추가의 정보는 문헌 [Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995)] (예를 들어, p. 13)에서 찾아볼 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목으로부터 유래된 항암 약물이다. 유럽 주목으로부터 유래된 도세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)®, 롱-프랑 로러(Rhone-Poulenc Rorer))은 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)®, 브리스톨-마이어스 스큅(Bristol-Myers Squibb))의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜불린 이량체로부터의 미세관 어셈블리를 촉진하고, 탈중합을 방지함으로써 미세관을 안정화시켜서 세포에서의 유사분열 억제를 유발한다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, ^{211}At, ^{131}I, ^{125}I, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{212}Bi, ^{32}P, 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 및 독소, 예컨대 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 소분자 독소 또는 효소 활성 독소, 예를 들어 그의 단편 및/또는 변이체를 포함한다.

[0122] "성장 억제제"가 본원에 사용되는 경우, 이것은 시험관내 및/또는 생체내 세포의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 세포의 백분율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 단계에서) 차단하는 작용제, 예컨대 G1 정지 및 M-기 정지를 유도하는 작용제를 포함한다. 전형적인 M기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁솔®, 및 토포 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토트렉세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C는 또한 S-기 정지로까지 이어진다. 추가의 정보는 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995)] (특히, p. 13)에서 찾아볼 수 있다.

[0123] "화학요법제"는 암의 치료에 유용한 화학적 화합물을 지칭한다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시클로스포스파미드 (시톡산(CYTOXAN)®); 알킬 술포네이트, 예컨대 부술판, 임프로술판 및 피포술판; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예컨대 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포르아미드, 트리에틸렌티오포스포르아미드 및 트리메틸로멜라민; 아세토게닌 (특히 불라타신 및 불라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)®); 베타-라파콘; 라파콜; 콜키신; 베툴린산; 캄프토테신 (합성 유사체 토포테칸 (하이캄틴(HYCAMTIN)®), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)®), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴 및 9-아미노캄프토테신 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카르마이신 (합성 유사체, KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마1I 및 칼리케아미신 오메가I1 (예를 들어, 문헌 [Nicolaou et al., Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)] 참조); CDP323, 경구 알파-4 인테그린 억제제; 다이네미신, 예컨대 다이네미신 A; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오카르지노스타틴 발색단 및 관련 색소단백질 에네디인 항생 발색단), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 칵티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (아드리아마이신(ADRIAMYCIN)®, 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 독소루비신 HCl 리포솜 주사 (독실(DOXIL)®), 리포솜 독소루비신 TLC D-99 (미오세트(MYOCET)®), PEG화 리포솜 독소루비신 (케릭스(CAELYX)®) 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 퓨로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물, 예컨대 메토트렉세이트, 겜시타빈 (겜자르(GEMZAR)®), 테가푸르 (유프토랄(UFTORAL)®), 카페시타빈 (젤로다(XELODA)®), 에포틸론 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 폴산 유사체, 예컨대 데노프테린, 메토트렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈,

6-메르캅토퓨린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토락톤; 항-부신, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 폴산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK® 폴리사카라이드 복합체 (JHS 내츄럴 프로덕츠(JHS Natural Products), 오레곤주 유진); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2'-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신 (엘디신(ELDISINE)®, 필데신(FILDESIN)®); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀 (탁솔®), 파클리탁셀의 알부민-조작된 나노입자 제제 (아브락산(ABRAXANE)™), 및 도세탁셀 (탁소테레®); 클로란부실; 6-티오구아닌; 메르캅토퓨린; 메토트렉세이트; 백금 작용제, 예컨대 시스플라틴, 옥살리플라틴 (예를 들어, 엘록사틴(ELOXATIN)®) 및 카르보플라틴; 미세관을 형성하는 튜불린 중합을 억제하는 빈카, 예컨대 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)®), 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)®), 빈데신 (엘디신®, 필데신®) 및 비노렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)®); 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 류코보린; 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산, 예컨대 벡사로텐 (탈그레틴(TARGRETIN)®); 비스포스포네이트, 예컨대 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)® 또는 오스탁(OSTAC)®), 에티드로네이트 (디드로칼(DIDROCAL)®), NE-58095, 졸레드론산/졸레드로네이트 (조메타(ZOMETA)®), 알렌드로네이트 (포사맥스(FOSAMAX)®), 파미드로네이트 (아레디아(AREDIA)®), 틸루드로네이트 (스켈리드(SKELID)®) 또는 리세드로네이트 (악토넬(ACTONEL)®); 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오티드, 특히 비정상적인 세포 증식과 연관된 신호전달 경로에서 유전자의 발현을 억제하는 것, 예컨대 예를 들어, PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예컨대 테라토프(THERATOPE)® 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어 알로벡틴(ALLOVECTIN)® 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)® 백신 및 박시드(VAXID)® 백신; 토포이소머라제 1 억제제 (예를 들어, 루르토테칸(LURTOTECAN)®); rmRH (예를 들어, 아바렐릭스(ABARELIX)®); BAY439006 (소라페닙; 바이엘(Bayer)); SU-11248 (수니티닙, 수텐트®, 화이자(Pfizer)); 페리포신, COX-2 억제제 (예를 들어, 셀레콕시브 또는 에토리콕시브), 프로테오솜 억제제 (예를 들어, PS341); 보르테조밉 (벨케이드(VELCADE)®); CCI-779; 티피파르닙 (R11577); 오라페닙, ABT510; Bcl-2 억제제, 예컨대 오블리메르센 나트륨 (게나센스(GENASENSE)®); 픽산트론; EGFR 억제제 (하기 정의 참조); 티로신 키나제 억제제 (하기 정의 참조); 세린-트레오닌 키나제 억제제, 예컨대 라파마이신 (시롤리무스, 라파뮨(RAPAMUNE)®); 파르네실트랜스퍼라제 억제제, 예컨대 로나파르닙 (SCH 6636, 사라사르(SARASAR)™); 및 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기 중 2종 이상의 조합물, 예컨대 CHOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 플레드니솔론의 조합 요법의 약어); 및 FOLFOX (5-FU 및 류코보린과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴™)을 사용한 치료 요법의 약어)를 포함한다.

[0124] 본원에 정의된 바와 같은 화학요법제는 암의 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 효과를 조절, 감소, 차단 또는 억제하는 작용을 하는 "항호르몬 작용제" 또는 "내분비 치료제"를 포함한다. 이들은 혼합된 효능제/길항제 프로파일을 갖는 항에스트로겐, 예를 들어 타목시펜 (놀바덱스(NOLVADEX)®), 4-히드록시타목시펜, 토레미펜 (파레스톤(FARESTON)®), 이독시펜, 드롤록시펜, 랄록시펜 (에비스타(EVISTA)®), 트리옥시펜, 케옥시펜, 및 선택적 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예컨대 SERM3; 효능제 특성을 갖지 않는 순수한 항에스트로겐, 예컨대 풀베스트란트 (파슬로덱스(FASLODEX)®) 및 EM800 (이러한 작용제는 에스트로겐 수용체 (ER) 이량체화를 차단하고/거나, DNA 결합을 억제하고/거나, ER 턴오버를 증가시키고/거나 ER 수준을 저해할 수 있음); 아로마타제 억제제, 예를 들어 스테로이드성 아로마타제 억제제, 예컨대 포르메스탄 및 엑세메스탄 (아로마신(AROMASIN)®), 및 비스테로이드성 아로마타제 억제제, 예컨대 아나스트라졸 (아리미덱스(ARIMIDEX)®), 레트로졸 (페마라(FEMARA)®) 및 아미노글루테티미드, 및 다른 아로마타제 억제제, 예를 들어 보로졸 (리비소르(RIVISOR)®), 메게스트롤 아세테이트 (메가세(MEGASE)®), 파드로졸 및 4(5)-이미다졸; 황체화 호르몬-방출 호르몬 효능제, 예를 들어 류프롤리드 (루프론(LUPRON)® 및 엘리가드(ELIGARD)®, 고세렐린, 부세렐린 및 트립테렐린; 성 스테로이드, 예를 들어 프로게스틴, 예컨대 메게스트롤 아세테이트 및 메드록시프로게스테론 아세테이트, 에스트로겐, 예컨대 디에틸스틸베스트롤 및 프레마린, 및 안드로겐/레티노이드, 예컨대 플루옥시메스테론, 모든

트랜스레티온산 및 펜레티니드; 오나프리스톤; 항프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향 조절제 (ERD); 항안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐루타미드 및 비칼루타미드; 및 상기한 것 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기한 것 중 2종 이상의 조합물을 포함하나 이에 제한되지는 않는 호르몬 그 자체일 수 있다.

[0125] 용어 "시토카인"은 세포간 매개자로서 또 다른 세포에 대해 작용하는, 한 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 일반 용어이다. 이러한 시토카인의 예는 림포카인, 모노카인 및 통상적인 폴리펩티드 호르몬이다. 이러한 시토카인은 특히 성장 호르몬, 예컨대 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소의 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 렐락신; 프로렐락신; 당단백질 호르몬, 예컨대 여포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH), 및 황체화 호르몬 (LH); 간 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 프로락틴; 태반 락토겐; 종양 괴사 인자-알파 및 -베타; 뮬러관 억제 물질; 마우스 고나도트로핀-관련 펩티드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자 (예를 들어, VEGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E); 태반 유래 성장 인자 (PlGF); 혈소판 유래 성장 인자 (PDGF, 예를 들어 PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFD); 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); 신경 성장 인자, 예컨대 NGF-알파; 혈소판-성장 인자; 형질전환 성장 인자 (TGF), 예컨대 TGF-알파 및 TGF-베타; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도성 인자; 인터페론, 예컨대 인터페론-알파, -베타 및 -감마, 콜로니 자극 인자 (CSF), 예컨대 대식세포-CSF (M-CSF); 과립구-대식세포-CSF (GM-CSF); 및 과립구-CSF (G-CSF); 인터류킨 (IL), 예컨대 IL-1, IL-1알파, IL-1베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20-IL-30; 세크레토글로빈/유테로글로빈; 온코스타틴 M (OSM); 종양 괴사 인자, 예컨대 TNF-알파 또는 TNF-베타; 및 기타 폴리펩티드 인자, 예를 들어 LIF 및 키트 리간드 (KL)를 포함한다. 본원에 사용된 용어 시토카인은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 시토카인의 생물학적 활성 등가물을 포함한다.

[0126] "혈관신생 인자 또는 혈관신생제"는 혈관 발생을 자극하는, 예를 들어 혈관신생, 내피 세포 성장, 혈관 안정성, 및/또는 혈관생성 등을 증진시키는 성장 인자이다. 예를 들어, 혈관신생 인자는 예를 들어 VEGF 및 VEGF 패밀리 구성원, PlGF, PDGF 패밀리, 섬유모세포 성장 인자 패밀리 (FGF), TIE 리간드 (안지오포이에틴), 에프린, ANGPTL3, ANGPTL4 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이는 또한 상처 치유를 가속화하는 인자, 예컨대 성장 호르몬, 인슐린-유사 성장 인자-I (IGF-I), VIGF, 표피 성장 인자 (EGF), CTGF 및 그의 패밀리의 구성원, 및 TGF-α 및 TGF-β를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Klagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003); Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003) (예를 들어, 혈관신생 인자를 열거한 표 1); 및 Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)]을 참조한다.

[0127] "항혈관신생제" 또는 "혈관신생 억제제"는 혈관신생, 혈관형성 또는 바람직하지 않은 혈관 투과성을 직접 또는 간접적으로 억제하는 소분자량 물질, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드, 단리된 단백질, 재조합 단백질, 항체, 또는 이들의 접합체 또는 융합 단백질을 지칭한다. 예를 들어, 항혈관신생제는 상기 정의된 바와 같은 혈관신생제에 대한 항체 또는 기타 길항제, 예를 들어 VEGF에 대한 항체, VEGF 수용체에 대한 항체, VEGF 수용체 신호전달을 차단하는 소분자 (예를 들어, PTK787/ZK2284, SU6668, 수텐트/SU11248 (수니티닙 말레이트), AMG706)이다. 항혈관신생제는 또한 천연 혈관신생 억제제, 예를 들어 안지오스타틴, 엔도스타틴 등을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Klagsbrun and D'Amore, Annu. Rev. Physiol., 53:217-39 (1991); Streit and Detmar, Oncogene, 22:3172-3179 (2003) (예를 들어, 악성 흑색종에서의 항혈관신생 요법을 열거하는 표 3); Ferrara & Alitalo, Nature Medicine 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., Oncogene, 22:6549-6556 (2003) (예를 들어, 항혈관신생 인자를 열거하는 표 2); 및 Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003) (예를 들어, 임상 시험에서 사용되는 항혈관신생제를 열거하는 표 1)]을 참조한다.

[0128] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "면역억제제"는 본원에서 치료할 포유동물의 면역계를 억제하거나 차폐시키는 작용을 하는 물질을 지칭한다. 이는 시토카인 생성을 억제하거나 자기-항원 발현을 하향-조절 또는 저해하거나 MHC 항원을 차폐시키는 물질을 포함한다. 이러한 작용제의 예는 2-아미노-6-아릴-5-치환된 피리미딘 (미국 특허 번호 4,665,077 참조), 비스테로이드성 항염증 약물 (NSAID), 간시클로비르, 타크롤리무스, 글루코코르티코이드, 예컨대 코르티솔 또는 알도스테론, 항염증제, 예컨대 시클로옥시게나제 억제제, 5-리폭시게나제 억제제, 또는 류코트리엔 수용체 길항제, 퓨린 길항제, 예컨대 아자티오프린 또는 미코페놀레이트 모페틸 (MMF), 알킬화제, 예컨대 시클로포스파미드, 브로모크립틴, 다나졸, 답손, 글루타르알데히드 (미국 특허 번호 4,120,649에 기재된 바와 같이, MHC 항원을 차폐시킴), MHC 항원 및 MHC 단편에 대한 항-이디오타입 항체, 시클로스포린 A, 스

테로이드, 예컨대 코르티코스테로이드 또는 글루코코르티코스테로이드 또는 글루코코르티코이드 유사체, 예를 들어 프레드니손, 메틸프레드니솔론 및 덱사메타손, 디히드로폴레이트 리덕타제 억제제, 예컨대 메토트렉세이트(경구 또는 피하), 히드록시클로로퀸, 술파살라진, 레플루노미드, 시토카인 또는 시토카인 수용체 항체, 예를 들어 항-인터페론-알파, -베타 또는 -감마 항체, 항-종양 괴사 인자-알파 항체 (인플릭시맙 또는 아달리무맙), 항-TNF-알파 이뮤노어드헤신 (에타네르셉트), 항-종양 괴사 인자-베타 항체, 항-인터류킨-2 항체 및 항-IL-2 수용체 항체, 항-LFA-1 항체, 예를 들어 항-CD11a 및 항-CD18 항체, 항-L3T4 항체, 이종 항-림프구 글로불린, 범-T 항체, 바람직하게는 항-CD3 또는 항-CD4/CD4a 항체, LFA-3 결합 도메인을 함유하는 가용성 펩티드 (1990년 7월 26일에 공개된 WO 1990/08187 참조), 스트렙토키나제, TGF-베타, 스트렙토도르나제, 숙주로부터의 RNA 또는 DNA, FK506, RS-61443, 데옥시스페르구알린, 라파마이신, T-세포 수용체 (미국 특허 번호 5,114,721 (Cohen et al.)), T-세포 수용체 단편 (문헌 [Offner et al., Science, 251: 430-432 (1991)]; WO 1990/11294; [Ianeway, Nature, 341: 482 (1989)]; 및 WO 1991/01133) 및 T-세포-수용체 항체 (EP 340,109), 예컨대 T10B9를 포함한다.

[0129] 하나 이상의 추가의 치료제와의 "조합" 투여는 동시 (공동) 투여 및 임의의 순서의 연속 투여를 포함한다.

[0130] "담체"는 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함하고, 대상체에게 비독성인 활성 성분 이외의 다른 제약 제제 내의 성분을 지칭한다. 제약상 허용되는 담체는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0131] 작용제, 예를 들어 제약 제제의 "유효량"은 필요한 투여량에서 필요한 기간 동안 원하는 치료 또는 예방 결과를 달성하기에 유효한 양을 지칭한다.

[0132] 본원에 사용된 바와 같이, 표현 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 교환가능하게 사용되고, 모든 이러한 명칭은 자손을 포함한다. 따라서, "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"라는 단어는 1차 대상 세포 및 전달 횟수와는 상관없이 그로부터 유래된 배양물을 포함한다. 고의적인 또는 우연한 돌연변이로 인해, DNA 내용 면에서 모든 자손이 정확하게 동일하지 않을 수 있음이 또한 이해된다. 용어 "자손"은 원래의 형질전환된 세포 또는 세포주에 대한 모든 후속 세대의 임의의 모든 후손을 지칭한다. 원래의 형질전환된 세포에서 스크리닝된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성이 있는 돌연변이체 자손이 포함된다. 특유의 명칭이 의도되는 경우, 이는 문맥으로부터 명백할 것이다.

[0133] **조성물 및 방법**

[0134] 본 발명은, 적어도 부분적으로, IL-17 경로가 하나 이상의 VEGF 길항제, 예를 들어 항-VEGF 항체의 투여를 포함한 치료에 대한 종양의 내성을 유발하는 종양 미세환경 내의 세포 및 분자 사건에 있어서 중요하고 잠재적으로 우세한 역할을 한다는 인식에 기초한다. 종양으로부터 숙주 기질 세포로의 IL-17 신호전달은 염증유발 및/또는 혈관신생유발 시토카인, 예컨대 G-CSF 및 Bv8의 수준을 조절할 수 있다.

[0135] 최근 연구는 CD11b+Gr1+ 골수 세포를 항-VEGF 요법에 대한 불응성을 매개하는데 직접적으로 관련시켰다. (문헌 [Shojaei et al., Nature Biotechnology 25:911-20 (2007)]). CD11b+Gr1+ 골수 세포의 동원 및 활성화로 인해, 항-VEGF 치료에 대한 내성을 유발할 수 있는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Shojaei et al. 2009]). 종양-보유 마우스로부터 단리된 골수-유래 CD11b+Gr1+ 골수 세포가 항-VEGF 치료에 대한 종양 내 내성을 부여할 수 있고, 항-VEGF-내성 종양 (그러나 항-VEGF-감수성 종양은 아님)으로부터의 조건화 배지는 CD11b+Gr1+ 세포의 이동을 자극한다는 것이 또한 밝혀졌다.

[0136] 본원에 개시된 실험 데이터는 IL-17이 종양 발생 동안 골수로부터 CD11b+Gr1+ 면역-저해 미성숙 골수 세포의 동원 및 종양 침윤을 조절할 수 있으며, 따라서 국부적으로 종양 혈관신생을 촉진할 수 있다는 것을 입증한다. 따라서, IL-17은 VEGF 길항제를 사용한 치료에 내성인 종양의 치료를 위한 유망한 표적이다.

[0137] **A. 항-IL-17 항체 제조**

[0138] 본 발명의 결합 및 활성 검정에 의해 확인된 항체는 재조합 DNA 기술을 비롯한 당업계에 공지된 방법에 의해 생산할 수 있다.

[0139] i) 항원 제조

[0140] 가용성 항원 또는 그의 단편 (임의로 또 다른 분자에 접합됨)이 항체를 생성시키기 위한 면역원으로 사용될 수 있다. 막횡단 분자, 예컨대 수용체의 경우에는, 그의 단편 (예를 들어, 수용체의 세포외 도메인)이 면역원으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 막횡단 분자를 발현하는 세포가 면역원으로 사용될 수 있다. 이러한 세포는 천

연 공급원 (예를 들어, 암 세포주)으로부터 유래될 수 있거나, 또는 막횡단 분자를 발현하도록 재조합 기술에 의해 형질전환된 세포일 수 있다. 항체의 제조에 유용한 다른 항원 및 그의 형태가 당업자에게 명백할 것이다.

[0141] (ii) 폴리클로날 항체

[0142] 폴리클로날 항체는 바람직하게는 관련 항원 및 아주반트의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 생성시킬 수 있다. 이관능성 또는 유도체화 작용제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통한 접합), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, $SOCl_2$, 또는 $R_1N=C=NR$ (식 중, R 및 R_1은 상이한 알킬기임)을 사용하여, 면역화될 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어 키홀 림펫 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 관련 항원을 접합시키는 것이 유용할 수 있다.

[0143] 예를 들어 단백질 또는 접합체 100 μg 또는 5 μg (각각, 토끼 또는 마우스의 경우)을 3 부피의 프로인트 완전 아주반트와 합하고, 상기 용액을 다중 부위에 피내로 주사함으로써, 동물을 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 면역화한다. 1개월 후에 프로인트 완전 아주반트 내의 펩티드 또는 접합체를 원래 양의 1/5 내지 1/10으로 다중 부위에 피하 주사하여 동물을 부스팅한다. 7 내지 14일 후, 동물에서 채혈하여, 혈청을 항체 역가에 대해 검정한다. 역가가 정체기에 도달할 때까지 동물을 부스팅한다. 바람직하게는, 상이한 단백질에 및/또는 상이한 가교 시약을 통해 접합되었으나 동일한 항원의 접합체로 동물을 부스팅한다. 접합체는 또한 재조합 세포 배양에서 단백질 융합체로서 제조될 수 있다. 또한, 명반과 같은 응집제를 적절하게 사용하여 면역 반응을 증진시킨다.

[0144] (iii) 모노클로날 항체

[0145] 모노클로날 항체를 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법을 이용하여 제조할 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (미국 특허 번호 4,816,567)에 의해 제조할 수 있다. 하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터 또는 마카크 원숭이를 상기 기재된 바와 같이 면역화시켜, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 도출한다. 대안적으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 이어서, 적합한 융제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 림프구를 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마 세포를 형성한다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]).

[0146] 이와 같이 제조된 하이브리도마 세포를, 바람직하게는 융합되지 않은 모 골수종 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에 시딩하여 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT) 효소가 결핍된 경우에, 하이브리도마용 배양 배지는 전형적으로 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이며 (HAT 배지), 이러한 물질들은 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지한다.

[0147] 바람직한 골수종 세포는 효율적으로 융합되고, 선택된 항체-생산 세포에 의한 항체의 안정한 고수준 생산을 지지하고, 배지, 예컨대 HAT 배지에 감수성인 것이다. 이들 중에, 바람직한 골수종 세포주는 뮤린 골수종 세포주, 예컨대 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center, 미국 캘리포니아주 샌디에고)로부터 입수가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것, 및 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection, 미국 메릴랜드주 록빌)으로부터 입수가능한 SP-2 또는 X63-Ag8-653 세포이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 또한 인간 모노클로날 항체 생산과 관련하여 기재된 바와 같다 (문헌 [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]).

[0148] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지를 항원에 대해 지시된 모노클로날 항체의 생산에 대해 검정한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산되는 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전 또는 시험관내 결합 검정, 예컨대 방사성면역검정 (RIA) 또는 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정한다.

[0149] 바람직한 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생산하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론을 한계 희석 절차에 의해 서브클로닝하고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]). 이러한 목적에 적합한 배양 배지는 예를 들어 D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 하이브리도마 세포가 동물에서 복수 종양으로서 생체내에서 성장될 수 있다.

[0150] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차, 예컨대 예를 들어, 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적합하게 분리된다.

[0151] 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA가 용이하게 단리되고 서열분석된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로 제공된다. 일단 단리되면, DNA를 발현 백터 내로 넣을 수 있고, 이후에 이를 달리 이뮤노글로불린 단백질을 생산하지 않는 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이 (E. coli) 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서의 모노클로날 항체의 합성을 수득한다. 항체의 재조합 생산은 하기에 보다 상세하게 기재될 것이다.

[0152] 추가 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편을 문헌 [McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 이용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다.

[0153] 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) 및 Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에는 파지 라이브러리를 사용하여 뮤린 및 인간 항체를 각각 단리하는 방법이 기재되어 있다. 이후의 간행물은 쇄 셔플링에 의한 고친화도 (nM 범위) 인간 항체의 생산 (문헌 [Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)]), 뿐만 아니라 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서의 조합 감염 및 생체내 재조합 (문헌 [Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)])을 기재한다. 따라서, 이러한 기술은 모노클로날 항체의 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행가능한 대안이다.

[0154] DNA는 또한, 예를 들어 상동성 뮤린 서열 대신에 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인에 대한 코딩 서열을 치환시키거나 (미국 특허 번호 4,816,567; 문헌 [Morrison, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)]), 이뮤노글로불린 코딩 서열을 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부와 공유 연결함으로써 변형시킬 수 있다.

[0155] 전형적으로, 이러한 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드는 항체의 불변 도메인에 대해 치환되거나 항체의 하나의 항원-결합 부위의 가변 도메인에 대해 치환되어, 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 또 다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체를 생성한다.

[0156] (iv) 인간화 및 인간 항체

[0157] 인간화 항체에는 비-인간 공급원으로부터의 1개 이상의 아미노산 잔기가 도입되어 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입" 잔기라 지칭되고, 전형적으로는 "유입" 가변 도메인으로부터의 것이다. 인간화는 설치류 CDR 또는 CDR 서열을 인간 항체의 상응하는 서열에 대해 치환함으로써 본질적으로 윈터(Winter) 및 동료들의 방법 (문헌 [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 수행될 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 부분이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체이다 (미국 특허 번호 4,816,567). 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 아마도 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.

[0158] 인간화 항체의 제조에 사용될 인간 가변 도메인 경쇄 및 중쇄 둘 다의 선택은 항원성 감소에 매우 중요하다. 소위 "최적-적합" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인 서열을 공지의 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 이어서, 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 서열이 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크 (FR)로서 수용된다 (문헌 [Sims et al., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정한 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정한 프레임워크를 이용한다. 여러 상이한 인간화 항체에 대해 동일한 프레임워크를 사용할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immnol., 151:2623 (1993)]).

[0159] 또한, 항체가 항원에 대해 높은 친화도를 보유하고 다른 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화하는 것이 중요하다. 이 목적을 달성하기 위해, 바람직한 방법에 따라, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 과정에 의해 제조된다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하고, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 입체형태적 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이를 조사하면

후보 이뮤노글로불린 서열의 기능에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린이 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석이 가능하다. 이러한 방식으로, FR 잔기는 수용자 서열 및 유입 서열로부터 선택 및 조합되어 원하는 항체 특성, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 친화도 증가를 달성할 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기가 항원 결합에 영향을 미치는데 직접적으로, 및 가장 실질적으로 관련된다.

[0160] 대안적으로, 면역화시에 내인성 이뮤노글로불린 생산의 부재 하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생산할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어 키메라 및 배선 돌연변이체 마우스의 항체 중쇄 연결 영역 (J_H) 유전자의 동형 접합성 결실이 내인성 항체 생성을 완전히 억제한다고 기재되어 있다. 인간 배선 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 이러한 배선 돌연변이체 마우스에게 전달하면, 항원 접종시에 인간 항체가 생산될 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., Year in Immuno., 7:33 (1993); 및 Duchosal et al. Nature 355:258 (1992)]을 참조한다. 인간 항체는 또한 파지-디스플레이 라이브러리로부터 유래될 수 있다 (문헌 [Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. MoL Biol., 222:581-597 (1991); Vaughan et al. Nature Biotech 14:309 (1996)]). 항체 파지 디스플레이 라이브러리로부터의 인간 항체의 생성이 하기에 추가로 기재된다.

[0161] (v) 항체 단편

[0162] 항체 단편 생산을 위한 다양한 기술이 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백질분해적 소화를 통해 유래되었다 (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, 현재 이러한 단편이 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생산될 수 있다. 예를 들어, 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 항체 단편이 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되고 화학적으로 커플링되어 F(ab')2 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 하기 실시예에 기재된 바와 같은 또 다른 실시양태에서, $F(ab')_2$는 $F(ab')_2$ 분자의 어셈블리를 촉진하기 위해 류신 지퍼 GCN4를 사용하여 형성된다. 또 다른 접근법에 따라, $F(ab')_2$ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 항체 단편의 생산을 위한 다른 기술이 숙련된 진료의에게 명백할 것이다. 다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단일 쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185를 참조한다.

[0163] (vi) 다중특이적 항체

[0164] 다중특이적 항체는 적어도 2개의 상이한 에피토프에 대한 결합 특이성을 갖고, 여기서 에피토프는 일반적으로 상이한 항원으로부터의 것이다. 이러한 분자는 일반적으로 2개의 상이한 에피토프에만 결합할 것이지만 (즉, 이중특이적 항체, BsAb), 추가의 특이성이 있는 항체, 예컨대 삼중특이적 항체가 본원에 사용되는 경우에 이러한 표현에 포괄된다. BsAb의 예는 1개의 아암이 IL-17에 대해 지시되고 또 다른 아암이 VEGF 또는 G-CSF에 대해 지시되는 것을 포함한다.

[0165] 이중특이적 항체의 제조 방법이 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 통상의 생산은 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공발현을 기초로 하며, 여기서 2개의 쇄는 상이한 특이성을 갖는다 (문헌 [Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)]). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 분류로 인해, 이들 하이브리도마 (쿼드로마)는 10가지 상이한 항체 분자들의 잠재적 혼합물을 생산하며, 이 중에서 오직 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는다. 일반적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 이루어지는 올바른 분자의 정제는 다소 번거롭고, 생성물 수율이 낮다. 유사한 절차가 WO 93/08829, 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다. 다른 접근법에 따르면, 원하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)을 갖는 항체 가변 도메인이 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 바람직하게는, 융합은 힌지의 적어도 일부, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인에 의한다. 융합체 중 적어도 하나에 존재하는, 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 바람직하다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합체 및 원하는 경우에 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 개별 발현 벡터 내로 삽입하고, 적합한 숙주 유기체 내로 공동-형질감염시킨다. 이것은 구축에 사용된 3종의 폴리펩티드 쇄의 동일하지 않은 비가 최적의 수율을 제공하는 실시양태에서 상기 3종의 폴리펩티드 단편의 상호 비를 조절하는데 있어서 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비의 적어도 2종의 폴리펩티드 쇄의 발현으로 높은 수율이 수득되는 경우, 또는 비가 특정한 유의성을 갖지 않는 경우, 2종 또는 모든 3종의 폴리펩티드 쇄에 대한 코딩 서열을 1개의 발현 벡터에 삽입할 수 있다.

[0166] 이러한 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 아암의 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른 쪽 아암의 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 이루어진다. 이중특이적 분자의 절반에만 이뮤노글로불린 경쇄가 존재하는 것이 용이한 분리 방법을 제공하기 때문에, 이러한 비대칭 구조는 바람직하지 않은 이뮤노글로불린 쇄 조합물로부터 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 접근법은 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체의 생성에 대한 추가의 상세내용에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0167] WO96/27011에 기재된 또 다른 접근법에 따르면, 한 쌍의 항체 분자 사이의 인터페이스를 조작하여 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이종이량체의 백분율을 최대화할 수 있다. 바람직한 인터페이스는 항체 불변 도메인의 CH3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 인터페이스로부터 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 보다 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 대체된다. 큰 아미노산 측쇄를 보다 작은 것 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)으로 대체함으로써 큰 측쇄(들)에 대해 동일하거나 유사한 크기의 보상 "함몰부"가 제2 항체 분자의 인터페이스 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 바람직하지 않은 최종-생성물에 비해 이종이량체의 수율을 증가시키는 메카니즘을 제공한다.

[0168] 이중특이적 항체는 가교된 또는 "이종접합체" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이종접합체 내의 항체 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 이러한 항체는, 예를 들어 바람직하지 않은 세포에 대한 면역계 세포의 표적화 (미국 특허 번호 4,676,980), 및 HIV 감염의 치료 (WO 91/00360, WO 92/200373)를 위해서 제안되었다. 이종접합체 항체는 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교제가 당업계에 널리 공지되어 있고, 수많은 가교 기술과 함께 미국 특허 번호 4,676,980에 개시되어 있다.

[0169] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성시키는 기술이 또한 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 이용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan et al., Science 229: 81 (1985)]은 무손상 항체를 단백질분해적으로 절단하여 $F(ab')_2$ 단편을 생성하는 절차를 기재한다. 이러한 단편을 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재 하에 환원시켜, 인접한 디티올을 안정화시키고 분자간 디술피드 형성을 방지한다. 이어서 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조에이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 이어서 Fab'-TNB 유도체 중 하나를 메르캅토에틸아민으로의 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성시킨다. 생산된 이중특이적 항체를 효소의 선택적 고정화를 위한 작용제로서 사용할 수 있다.

[0170] Fab'-SH 단편을 이. 콜라이로부터 또한 직접 회수할 수 있고, 화학적으로 커플링시켜 이중특이적 항체를 형성할 수 있다. 문헌 [Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217-225 (1992)]은 완전 인간화 이중특이적 항체 $F(ab')_2$ 분자의 생산을 기재한다. 각각의 Fab' 단편을 이. 콜라이로부터 개별적으로 분비시키고, 이중특이적 항체를 형성하도록 시험관내에서 지시된 화학 커플링 반응에 적용한다.

[0171] 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조 및 단리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되었다. 예를 들어, 류신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체가 생산된다. 문헌 [Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드가 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 유전자 융합체에 의해 연결된다. 항체 동종이량체가 힌지 영역에서 환원되어 단량체가 형성된 후에 재산화되어 항체 이종이량체가 형성된다. 이러한 방법은 항체 동종이량체의 생산에 또한 이용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편 제조를 위한 대안적 메카니즘을 제공하였다. 상기 단편은 동일 쇄 상의 2개의 도메인 사이의 쌍 형성을 허용하기에는 너무 짧은 링커에 의해 경쇄 가변 도메인 (VL)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (VH)을 포함한다. 따라서, 한 단편의 VH 및 VL 도메인이 또 다른 단편의 상보적인 VL 및 VH 도메인과 쌍을 형성하여, 2개의 항원-결합 부위가 형성된다. 단일-쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또 다른 전략이 또한 보고되었다. 문헌 [Gruber et al., J. Immunol, 152:5368 (1994)]을 참조한다.

[0172] 2가 초과의 원자가를 갖는 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Tuft et al. J. Immunol. 147: 60 (1991)].

[0173] (vii) 이펙터 기능 조작

[0174] 항체의 유효성을 개선하기 위해, 이펙터 기능과 관련하여 본 발명의 항체를 변형시키는 것이 바람직할 수 있다.

예를 들어, 시스테인 잔기(들)를 Fc 영역에 도입함으로써, 이러한 영역 내에 쇄간 디술피드 결합이 형성되도록 할 수 있다. 이와 같이 생성된 동종이량체 항체는 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체-매개 세포 사멸 및 항체-의존성 세포 세포독성 (ADCC)을 가질 수 있다. 문헌 [Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) 및 Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)]을 참조한다. 문헌 [Wolff et al. Cancer Research 53:2560-2565 (1993)]에 기재된 바와 같은 이종이관능성 가교제를 사용하여 항-종양 활성이 개선된 동종이량체 항체를 또한 제조할 수 있다. 대안적으로, 이중 Fc 영역을 갖는 항체를 조작할 수 있고, 이에 의해 보체 용해 및 ADCC 능력이 증진될 수 있다. 문헌 [Stevenson et al. Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)]을 참조한다.

[0175] (viii) 항체-샐비지 수용체 결합 에피토프 융합.

[0176] 본 발명의 특정 실시양태에서, 예를 들어 종양 투과를 증가시키기 위해, 무손상 항체보다는 항체 단편을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 경우에, 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해 항체 단편을 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 이는, 예를 들어 샐비지 수용체 결합 에피토프를 항체 단편 내로 혼입시킴으로써 (예를 들어, 항체 단편 내의 적합한 영역의 돌연변이에 의해, 또는 에피토프를 펩티드 태그 내로 혼입시킨 후에, 예를 들어 DNA 또는 펩티드 합성에 의해 항체 단편의 어느 한쪽 말단 또는 중간에 융합시킴으로써) 달성될 수 있다.

[0177] 바람직하게는, 샐비지 수용체 결합 에피토프는 Fc 도메인의 1 또는 2개의 루프로부터의 임의의 1개 이상의 아미노산 잔기가 항체 단편의 유사한 위치로 옮겨진 영역을 구성한다. 보다 더 바람직하게는, Fc 도메인의 1개 또는 2개의 루프로부터의 3개 이상의 잔기가 옮겨진다. 보다 더 바람직하게는, 에피토프는 (예를 들어, IgG의) Fc 영역의 CH2 도메인으로부터 취하고, 항체의 CH1, CH3 또는 V_H 영역, 또는 하나 초과의 이러한 영역으로 옮겨진다. 대안적으로, 에피토프가 Fc 영역의 CH2 도메인으로부터 취해지고, 항체 단편의 CL 영역 또는 VL 영역, 또는 둘 다로 옮겨진다.

[0178] (ix) 항체의 다른 공유 변형

[0179] 항체의 공유 결합 변형이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 이는 화학적 합성에 의해 또는 적용가능하다면 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 이루어질 수 있다. 항체의 표적화된 아미노산 잔기를 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시킴으로써 항체의 다른 유형의 공유결합 변형이 분자 내로 도입된다. 공유 변형의 예는 미국 특허 번호 5,534,615 (명확하게 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다. 항체의 바람직한 유형의 공유 변형은 항체를 미국 특허 번호 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 또는 4,179,337에 기재된 방식으로 다양한 비단백질성 중합체 중 하나, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌에 연결시키는 것을 포함한다.

[0180] 본 발명은 또한 세포독성제, 예컨대 화학요법제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 또는 그의 단편), 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성접합체)에 접합된 본원에 기재된 항체를 포함하는 면역접합체에 관한 것이다. 방사성접합체 항체의 생산을 위해 다양한 방사성핵종이 이용가능하다. 그 예는 예를 들어 ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y 및 ^{186}Re를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0181] 이러한 면역접합체의 생성에 유용한 화학요법제는 상기 기재되어 있다. 예를 들어, BCNU, 스트렙토조신, 빈크리스틴, 5-플루오로우라실 (미국 특허 5,053,394, 5,770,710에 기재된, 통칭하여 LL-E33288 복합체로 공지된 패밀리의 작용제), 에스페라미신 (미국 특허 5,877,296) 등 (또한, 본원에서의 화학요법제 하의 정의 참조)을 본 발명의 항체 또는 그의 단편에 접합시킬 수 있다.

[0182] 종양의 선택적 파괴를 위해서, 항체는 고도의 방사성 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성 동위원소가 방사성접합된 항체 또는 그의 단편의 생산에 이용가능하다. 그의 예는 예를 들어 ^{211}At, ^{131}I, ^{125}I, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{212}Bi, ^{32}P, ^{212}Pb, ^{111}In, Lu의 방사성 동위원소 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 상기 접합체가 진단용으로 사용되는 경우, 이것은 신티그래피 연구를 위한 방사능 원자, 예를 들어 ^{99m}tc 또는 ^{123}I, 또는 핵 자기 공명 (NMR) 영상화 (또한, 자기 공명 영상화, MRI라고도 공지됨)를 위한 스핀 표지, 예컨대 아이오딘-123, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망가니즈 또는 철을 포함할 수 있다.

[0183] 방사성- 또는 다른 표지는 공지의 방식으로 접합체에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 생합성될 수도 있거나, 또는 예를 들어 수소 대신에 플루오린-19를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 사용한 화학적 아미노산 합성에 의해 합성될 수도 있다. 표지, 예컨대 ^{99m}tc 또는 ^{123}I, ^{186}Re, ^{188}Re 및 $_{111}$In이 펩티드 내의 시스테인 잔

기를 통해 부착될 수 있다. 이트륨-90은 리신 잔기를 통해 부착될 수 있다. 아이오도겐 (IODOGEN) 방법 (문헌 [Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57])을 사용하여 아이오딘-123을 혼입시킬 수 있다. 예를 들어, 다른 방법을 상세하게 기재한 문헌 [Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy (Chatal, CRC Press 1989)]을 참조한다.

[0184] 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A 쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A 쇄 (슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨), 리신 A 쇄, 아브린 A 쇄, 모데신 A 쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피톨라카 아메리카나(*Phytolacca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 네노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 예를 들어, 1993년 10월 28일자로 공개된 WO 93/21232를 참조한다.

[0185] 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스 (p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조된다. 예를 들어 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al. Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 탄소-14-표지된 1-이소티오시아네이토벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 방사성뉴클레오티드를 접합시키기 위한 예시적인 킬레이트화제이다. WO94/11026을 참조한다. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산 불안정성 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광분해성 링커, 디메틸 링커 또는 디술피드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.

[0186] 대안적으로, 항-IL-17 항체, 및/또는 항-VEGF 항체 및/또는 항-GCSF 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 제조할 수 있다. DNA의 길이는 서로 인접하거나 접합체의 원하는 특성을 파괴하지 않는 링커 펩티드를 코딩하는 영역에 의해 분리된, 접합체의 2개 부분을 코딩하는 각각의 영역을 포함할 수 있다.

[0187] 특정 실시양태에서, 항체를 종양 예비표적화에 이용하기 위해 "수용체" (예컨대, 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있고, 여기서의 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 후에 제거제를 사용하여 순환계로부터 미결합 접합체를 제거하고, 이어서 세포독성제 (예를 들어, 방사성뉴클레오티드)에 접합된 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여한다. 특정 실시양태에서, 항체 및 핵산분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예컨대 데옥시리보뉴클레아제, Dnase) 사이에 면역접합체가 형성된다.

[0188] 본 발명은 1개 이상의 메이탄시노이드 분자와 접합된 본 발명의 항체를 제공한다. 메이탄시노이드는 튜불린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타(*Maytenus serrata*)로부터 처음 단리되었다 (미국 특허 번호 3,896,111). 이후에, 특정 미생물이 또한 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생산하는 것으로 발견되었다 (미국 특허 번호 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체는 예를 들어 미국 특허 번호 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533에 개시되어 있다.

[0189] 본 발명의 항체는 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의하게 저하시키지 않으면서 메이탄시노이드 분자에 접합시킬 수 있다. 항체 분자당 평균 3-4개로 접합된 메이탄시노이드 분자는 항체의 기능 또는 용해성에 부정적인 영향 없이 표적 세포의 세포독성을 증진시키는 효능을 나타냈지만, 1개의 독소/항체 분자일지라도 네이키드 항체의 사용에 비해 세포독성을 증진시킬 것이라 예상된다. 메이탄시노이드는 당업계에 공지되어 있으며, 공지의 기술에 의해 합성될 수도 있고 천연 공급원으로부터 단리될 수도 있다. 적합한 메이탄시노이드는 예를 들어 미국 특허 번호 5,208,020 및 본원에서 상기 언급된 다른 특허 및 비특허 간행물에 개시되어 있다. 한 실시양태에서, 메이탄시노이드는 메이탄시놀, 및 메이탄시놀 분자의 방향족 고리 또는 기타 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예컨대 다양한 메이탄시놀 에스테르이다.

[0190] 항체-메이탄시노이드 접합체를 제조하는 것으로 당업계에 공지된 많은 연결기가 있으며, 예를 들어 미국 특허

번호 5,208,020 또는 EP 특허 0 425 235 B1, 및 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]에 개시된 것을 포함한다. 연결기는 상기 언급된 특허에 개시된 바와 같이 디술피드 기, 티오에테르 기, 산 불안정성 기, 광분해성 기, 펩티다제 불안정성 기 또는 에스테라제 불안정성 기를 포함하고, 디술피드 및 티오에테르 기가 바람직하다.

[0191] 항체 및 메이탄시노이드의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대, 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예컨대, 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대, 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대, 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대, 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대, 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대, 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조될 수 있다. 디술피드 연결부를 제공하기 위한 전형적인 커플링제는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP) (문헌 [Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978]]) 및 N-숙신이미딜-4-(2-피리딜티오)펜타노에이트 (SPP)를 포함한다.

[0192] 링커는 연결 유형에 따라 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연결은 통상적인 커플링 기술을 이용하여 히드록실 기와의 반응으로 형성될 수 있다. 반응은 히드록실 기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실 기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실 기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 상기 연결부는 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.

[0193] 또 다른 관심 면역접합체는 1개 이상의 칼리케아미신 분자와 접합된 본 발명의 항체를 포함한다. 칼리케아미신 패밀리의 항생제는 이중-가닥 DNA 절단물을 피코몰 미만의 농도로 생성시킬 수 있다. 칼리케아미신 패밀리의 접합체의 제조에 대해서는, 미국 특허 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (모두 아메리칸 시아나미드 캄파니(American Cyanamid Company))을 참조한다. 사용될 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체는 γ_1^I, α_2^I, α_3^I, N-아세틸-γ_1^I, PSAG 및 θ^I_1을 포함하나 이에 제한되지는 않는다 (문헌 [Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)]; 및 상기 언급된 아메리칸 시아나미드(American Cyanamid)의 미국 특허). 항체가 접합될 수 있는 또 다른 항종양 약물은 항폴레이트제인 QFA이다. 칼리케아미신 및 QFA는 둘 다 세포내 작용 부위를 갖고, 원형질막을 용이하게 통과하지 않는다. 따라서, 항체 매개 내재화를 통한 이들 작용제의 세포 흡수는 이들의 세포독성 효과를 크게 증진시킨다.

[0194] (x) 합성 항체 파지 라이브러리로부터의 항체의 생성

[0195] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 특유의 파지 디스플레이 접근법을 이용하여 생성되고 선택된다. 이러한 접근법은 단일 프레임워크 주형을 기초로 하는 합성 항체 파지 라이브러리의 생성, 가변 도메인 내의 충분한 다양성의 설계, 다양화된 가변 도메인이 있는 폴리펩티드의 디스플레이, 항원을 표적화하는 높은 친화도가 있는 후보 항체의 선택, 및 선택된 항체의 단리를 포함한다.

[0196] 파지 디스플레이 방법의 상세내용은, 예를 들어 WO03/102157 (2003년 12월 11일 공개)에서 확인할 수 있고, 상기 문헌의 전체 개시내용은 명확하게 본원에 참조로 포함된다.

[0197] 한 측면에서, 사용된 항체 라이브러리는 항체 가변 도메인의 하나 이상의 CDR 내의 용매 접근가능한 위치 및/또는 고도로 다양한 위치를 돌연변이시킴으로써 생성시킬 수 있다. 본원에 제공된 방법을 사용하여 일부 또는 모든 CDR을 돌연변이시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 내의 위치를 돌연변이시켜 단일 라이브러리를 형성시킴으로써 또는 CDRL3 및 CDRH3 내의 위치를 돌연변이시켜 단일 라이브러리를 형성시킴으로써 또는 CDRL3 및 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 내의 위치를 돌연변이시켜 단일 라이브러리를 형성시킴으로써 다양한 항체 라이브러리를 생성시키는 것이 바람직할 수 있다.

[0198] 예를 들어 CDRH1, CDRH2 및 CDRH3의 용매가 접근가능하고/하거나 고도로 다양한 위치에 돌연변이가 있는 항체 가변 도메인의 라이브러리가 생성될 수 있다. CDRL1, CDRL2 및 CDRL3 내에 돌연변이가 있는 또 다른 라이브러리가 생성될 수 있다. 또한 이러한 라이브러리들은 원하는 친화도의 결합제를 생성시키기 위해 서로 함께 사용될 수 있다. 예를 들어, 표적 항원에의 결합에 대한 중쇄 라이브러리의 1회 이상의 라운드의 선택 후에, 결합제의 친화도를 증가시키기 위한 추가의 라운드의 선택을 위해 경쇄 라이브러리가 중쇄 결합제의 집단 내로 교체될 수 있다.

[0199] 바람직하게는, 중쇄 서열의 가변 영역의 CDRH3 영역에서 원래의 아미노산을 변이체 아미노산으로 치환함으로써 라이브러리가 생성된다. 생성된 라이브러리는 서열 다양성이 주로 중쇄 서열의 CDRH3 영역 내에 있는 다수의 항체 서열을 함유할 수 있다.

[0200] 한 측면에서, 중쇄의 적어도 잔기 95-100a를 DVK 코돈 세트에 의해 코딩되는 아미노산으로 치환함으로써 라이브러리가 생성되고, 여기서 *DVK* 코돈 세트는 이러한 위치의 모두에 대한 변이체 아미노산의 세트를 코딩하는데 사용된다. 이러한 치환을 생성시키는데 유용한 올리고뉴클레오티드 세트의 예는 서열 $(DVK)_7$을 포함한다. 일부 실시양태에서, 잔기 95-100a를 *DVK* 및 *NNK* 코돈 세트 둘 다에 의해 코딩되는 아미노산으로 치환함으로써 라이브러리가 생성된다. 이러한 치환을 생성시키는데 유용한 올리고뉴클레오티드 세트의 예는 서열 $(DVK)_6(NNK)$을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 적어도 잔기 95-100a를 *DVK* 및 *NNK* 코돈 세트 둘 다에 의해 코딩되는 아미노산으로 치환함으로써 라이브러리가 생성된다. 이러한 치환을 생성시키는데 유용한 올리고뉴클레오티드 세트의 예는 서열 $(DVK)_5(NNK)$을 포함한다. 이러한 치환을 생성시키는데 유용한 올리고뉴클레오티드 세트의 또 다른 예는 서열 $(NNK)_6$을 포함한다. 본원에 기재된 기준에 따라 당업자가 적절한 올리고뉴클레오티드 서열의 또 다른 예를 결정할 수 있다.

[0201] 또 다른 실시양태에서, 상이한 CDRH3 설계가 고친화도 결합제의 단리 및 다양한 에피토프에 대한 결합제의 단리를 위해 이용된다. 이러한 라이브러리 내에 생성된 CDRH3의 길이의 범위는 아미노산 11 내지 13개이지만, 이와 상이한 길이가 또한 생성될 수 있다. *NNK*, *DVK* 및 *NVK* 코돈 세트, 뿐만 아니라 N 및/또는 C-말단에서의 보다 제한된 다양성을 사용함으로써 H3 다양성이 확장될 수 있다.

[0202] CDRH1 및 CDRH2에서 다양성이 또한 생성될 수 있다. CDR-H1 및 H2 다양성의 설계는 이전의 설계보다 천연 다양성에 보다 밀접하게 매치되는 다양성에 초점을 맞추는 변형과 함께 기재된 바와 같은 천연 항체 레퍼토리를 모방하기 위한 표적화 전략을 따른다

[0203] CDRH3에서의 다양성을 위해, H3의 길이가 상이한 다수의 라이브러리들을 개별적으로 구축한 후 조합하여 표적 항원에 대한 결합제를 선택할 수 있다. 기존에 기재되어 있고 본원에서 하기에 기재된 바와 같은 고체 지지체 선택 및 용액 분류 방법을 사용하여 다수의 라이브러리들을 풀링 및 분류할 수 있다. 다중 분류 전략을 사용할 수 있다. 예를 들어 한 변형은 고체에 결합된 표적 상에서 분류한 후, 융합 폴리펩티드 상에 존재할 수 있는 태그 (예를 들어, 항-gD 태그)에 대해 분류하고, 고체에 결합된 표적 상에서 또 다르게 분류하는 것을 수반한다. 대안적으로, 먼저 라이브러리를 고체 표면에 결합된 표적 상에서 분류할 수 있고, 이어서 용리된 결합제를 표적 항원의 농도를 감소시키면서 용액 상 결합을 사용하여 분류한다. 상이한 분류 방법들의 조합을 이용하는 것은 고도로 발현된 서열만 선택되는 것의 최소화를 제공하고, 다수의 상이한 고친화도 클론의 선택을 제공한다.

[0204] 표적 항원에 대한 고친화도 결합제를 라이브러리로부터 단리할 수 있다. H1/H2 영역에서의 다양성을 제한하는 것은 축중성을 약 10^4 내지 10^5배 감소시키고, 보다 많은 H3 다양성을 허용하는 것은 보다 높은 친화도의 결합제를 제공한다. CDRH3에서 상이한 유형의 다양성을 갖는 라이브러리를 이용하는 것 (예를 들어, DVK 또는 NVT를 이용하는 것)은 표적 항원의 상이한 에피토프에 결합할 수 있는 결합제의 단리를 제공한다.

[0205] 상기 기재된 바와 같이 풀링된 라이브러리로부터 단리된 결합제 중에서, 경쇄에서의 제한된 다양성을 제공함으로써 친화도가 추가로 개선될 수 있다는 것이 발견되었다. 경쇄 다양성은 CDRL1에서 하기와 같이 이 실시양태에서 발생한다: 아미노산 위치 28은 RDT에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 29는 RKT에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 30은 RVW에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 31은 ANW에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 32는 THT에 의해 코딩되고; 임의로, 아미노산 위치 33은 CTG에 의해 코딩되고; CDRL2에서: 아미노산 위치 50은 KBG에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 53은 AVC에 의해 코딩되고; 임의로, 아미노산 위치 55는 GMA에 의해 코딩되고; CDRL3에서: 아미노산 위치 91은 TMT 또는 SRT 또는 둘 다에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 92는 DMC에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 93은 RVT에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 94는 NHT에 의해 코딩되고; 아미노산 위치 96은 TWT 또는 YKG 또는 둘 다에 의해 코딩된다.

[0206] 또 다른 실시양태에서, CDRH1, CDRH2 및 CDRH3 영역에서 다양성을 갖는 라이브러리 또는 라이브러리들이 생성된다. 이러한 실시양태에서, 다양한 길이의 H3 영역을 사용하고, 주로 코돈 세트 *XYZ* 및 *NNK* 또는 *NNS*를 사용하여 CDRH3에서의 다양성이 생성된다. 라이브러리는 개별 올리고뉴클레오티드를 사용하여 형성되고 풀링될 수 있거나, 또는 올리고뉴클레오티드는 풀링되어 라이브러리의 하위세트를 형성할 수 있다. 이 실시양태의 라이브러

리는 고체에 결합된 표적에 대해 분류될 수 있다. 다중 분류로부터 단리된 클론을 특이성 및 친화도에 대해 ELISA 검정을 사용하여 스크리닝할 수 있다. 특이성에 대해서는, 원하는 표적 항원, 뿐만 아니라 다른 비표적 항원에 대해 클론을 스크리닝할 수 있다. 이어서, 표적 항원에 대한 결합제를 용액 결합 경쟁 ELISA 검정 또는 스팟 경쟁 검정에서 친화도에 대해 스크리닝할 수 있다. 상기 기재된 바와 같이 제조된 *XYZ* 코돈 세트를 이용하여 라이브러리로부터 고친화도 결합제를 단리할 수 있다. 이러한 결합제는 세포 배양에서 높은 수율로 항체 또는 항원 결합 단편으로 용이하게 생성될 수 있다.

[0207] 일부 실시양태에서, CDRH3 영역의 길이에서 보다 큰 다양성을 갖는 라이브러리를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 약 7 내지 19개 범위의 CDRH3 영역을 갖는 라이브러리를 생성하는 것이 바람직할 수 있다.

[0208] 이들 실시양태의 라이브러리로부터 단리된 고친화도 결합제는 박테리아 및 진핵 세포 배양에서 높은 수율로 용이하게 생성된다. gD 태그, 바이러스 코트 단백질 성분 서열과 같은 서열을 용이하게 제거하고/하거나, 높은 수율의 전장 항체 또는 항원 결합 단편의 생산을 제공하기 위해 불변 영역 서열을 포함하도록 벡터를 설계할 수 있다.

[0209] CDRH3 내에 돌연변이를 갖는 라이브러리가 다른 CDR, 예를 들어 CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1 및/또는 CDRH2의 변이체 버전을 함유하는 라이브러리와 조합될 수 있다. 따라서, 예를 들어 한 실시양태에서, CDRH3 라이브러리가 미리 정해진 코돈 세트를 사용하여 위치 28, 29, 30, 31, 및/또는 32에 변이체 아미노산이 있는 인간화 4D5 항체 서열과 관련하여 생성된 CDRL3 라이브러리와 조합된다. 또 다른 실시양태에서, CDRH3에 대한 돌연변이를 갖는 라이브러리가 변이체 CDRH1 및/또는 CDRH2 중쇄 가변 도메인을 포함하는 라이브러리와 조합될 수 있다. 한 실시양태에서, 위치 28, 30, 31, 32 및 33에 변이체 아미노산이 있는 인간화 항체 4D5 서열로 CDRH1 라이브러리가 생성된다. 미리 정해진 코돈 세트를 사용하여 위치 50, 52, 53, 54, 56 및 58에 변이체 아미노산이 있는 인간화 항체 4D5의 서열로 CDRH2 라이브러리가 생성될 수 있다.

[0210] (xi) 항체 변이체

[0211] 파지 라이브러리로부터 생성된 신규 항체를 추가로 변형시켜, 모 항체에 비해 개선된 물리적, 화학적 및/또는 생물학적 특성을 갖는 항체 돌연변이체를 생성할 수 있다. 이용된 검정이 생물학적 활성 검정인 경우, 바람직하게는, 선택된 검정에서의 항체 돌연변이체의 생물학적 활성이 이러한 검정에서의 모 항체의 생물학적 활성보다 적어도 약 10배 더 양호하고, 바람직하게는 적어도 약 20배 더 양호하며, 보다 바람직하게는 적어도 약 50배 더 양호하고, 종종 적어도 약 100배 또는 200배 더 양호하다. 예를 들어, 바람직하게는, 항-IL-17 항체 돌연변이체는 모 항체의 결합 친화도보다 적어도 약 10배 더 강하고, 바람직하게는 적어도 약 20배 더 강하고, 보다 바람직하게는 적어도 약 50배 더 강하고, 종종 적어도 약 100배 또는 200배 더 강한 IL-17에 대한 결합 친화도를 갖는다.

[0212] 항체 돌연변이체를 생성하기 위해, 하나 이상의 아미노산 변경 (예를 들어, 치환)이 모 항체의 초가변 영역 중 하나 이상에 도입된다. 대안적으로 또는 추가로, 프레임워크 영역 잔기 중 하나 이상의 변경 (예를 들어, 치환)이 모 항체에 도입될 수 있고, 이는 제2 포유동물 종으로부터의 항원에 대한 항체 돌연변이체의 결합 친화도 개선을 발생시킨다. 변형을 위한 프레임워크 영역 잔기의 예는 항원에 직접 비-공유 결합하고/거나 (문헌 [Amit et al. (1986) Science 233:747-753]); CDR의 입체형태와 상호작용하고/이에 영향을 미치고/거나 (문헌 [Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917]); V_L - V_H 인터페이스에 참여하는 것 (EP 239 400B1)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 이러한 프레임워크 영역 잔기 중 하나 이상의 변형은 제2 포유동물 종으로부터의 항원에 대한 항체의 결합 친화도 증진을 발생시킨다. 예를 들어, 약 1 내지 약 5개의 프레임워크 잔기가 본 발명의 이러한 실시양태에서 변경될 수 있다. 때때로, 이는 초가변 영역 잔기가 변경되지 않은 경우에도, 임상전 실험에서 사용하기에 적합한 항체 돌연변이체를 얻는데 충분할 수 있다. 그러나, 일반적으로, 항체 돌연변이체는 추가의 초가변 영역 변경(들)을 포함할 것이다.

[0213] 변경되는 초가변 영역 잔기는, 특히 모 항체의 출발 결합 친화도가 무작위로 생산된 항체 돌연변이체가 용이하게 스크리닝될 수 있도록 하는 경우에, 무작위로 변화될 수 있다.

[0214] 상기 항체 돌연변이체를 생성시키는 한 유용한 방법은 "알라닌 스캐닝 돌연변이 유발" (문헌 [Cunningham and Wells (1989) Science 244: 1081-1085])로 지칭된다. 여기서, 초가변 영역 잔기(들) 중 하나 이상이 알라닌 또는 폴리알라닌 잔기(들)로 교체되어, 제2 포유동물 종으로부터의 항원과 아미노산의 상호작용에 영향을 미친다. 그 후, 치환에 대해 기능적 감수성을 입증하는 초가변 영역 잔기(들)를 치환 부위에서 또는 치환 부위에

대해 추가의 또는 다른 돌연변이를 도입함으로써 정교하게 한다. 따라서, 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 부위는 미리 결정되지만, 돌연변이 그 자체의 성질을 미리 결정할 필요는 없다. 이러한 방식으로 생산된 ala-돌연변이체를 본원에 기재된 바와 같이 그의 생물학적 활성에 대해 스크리닝한다.

[0215] 일반적으로, 보존적 치환, 예를 들어 "바람직한 치환" 부분의 표제 아래에 하기 제시된 것으로 출발할 것이다. 이러한 치환이 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)를 변화시키면, 하기 표 2에 "예시적인 치환"으로 명명된 또는 아미노산 부류에 대해 하기 추가로 기재되는 보다 실질적인 변화가 도입되고, 생산물이 스크리닝된다.

표 2

바람직한 아미노산 치환

본래의 잔기	예시적인 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; 노르류신	leu
Leu (L)	노르류신; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; 노르류신	leu

[0216]

[0217] 항체의 생물학적 특성에서 보다 더 실질적인 변형은 (a) 치환 부위에서 폴리펩티드 백본의 구조를, 예를 들어 시트 또는 나선 입체형태로서 유지하는데에 대한 그의 효과, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성을 유지하는데에 대한 그의 효과, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는데에 대한 그의 효과가 상당히 상이한 치환을 선택함으로써 달성한다. 자연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성을 기반으로 하기 군으로 분류될 수 있다:

[0218] (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0219] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr, asn, gln;

[0220] (3) 산성: asp, glu;

[0221] (4) 염기성: his, lys, arg;

[0222] (5) 쇄 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

[0223] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0224] 비-보존적 치환은 이들 부류 중의 하나의 구성원을 또 다른 부류로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0225] 또 다른 실시양태에서, 변형을 위해 선택된 부위가 파지 디스플레이 (상기 참조)를 사용하여 친화도 성숙된다.

[0226] 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 아미노산 서열 돌연변이체를 코딩하는 핵산 분자가 제조된다. 이러한 방법은 모 항체의 앞서 제조된 돌연변이체 또는 비-돌연변이체 버전의 올리고뉴클레오티드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발, 및 카세트 돌연변이유발을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 돌연변이체를 제조하기 위한 바람직한 방법은 부위 지정 돌연변이유발이다 (예를 들어, 문헌 [Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488] 참조).

[0227] 특정 실시양태에서, 항체 돌연변이체에서 단일 초가변 영역 잔기만이 치환될 것이다. 다른 실시양태에서, 모 항체의 초가변 영역 잔기들 중 2개 이상, 예를 들어 약 2 내지 약 10개의 초가변 영역이 치환될 것이다.

[0228] 통상적으로, 생물학적 성질이 개선된 항체 돌연변이체는 모 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인의 아미노산 서열과의 아미노산 서열 동일성 또는 유사성이 적어도 75%, 보다 바람직하게는 적어도 80%, 보다 바람직하게는 적어도 85%, 보다 바람직하게는 적어도 90%, 가장 바람직하게는 적어도 95%인 아미노산 서열을 가질 것이다. 이러한 서열에 관한 동일성 또는 유사성은 본원에서, 서열을 정렬시키고 필요한 경우 최대 서열 동일성 비율을 달성하도록 갭을 도입시킨 후, 모 항체 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기 (즉, 동일한 잔기) 또는 유사한 후보 서열 내의 아미노산 잔기 (즉, 공통적인 측쇄 성질을 기초로 동일한 군으로부터의 아미노산 잔기, 상기 참조)의 백분율로 정의된다. N-말단, C-말단 또는 내부 확장, 결실, 또는 가변 도메인 외부로부터 항체 서열 내로의 삽입 중 어떤 것도 서열 동일성 또는 유사성에 영향을 미치는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0229] 항체 돌연변이체의 생산 후에, 모 항체와 비교하여 이러한 분자의 생물학적 활성을 결정한다. 상기 언급된 바와 같이, 이는 항체의 결합 친화도 및/또는 다른 생물학적 활성을 결정하는 것을 포함할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 항체 돌연변이체들의 패널을 제조하여, 항원 또는 그의 단편에 대한 결합 친화도에 대해 스크리닝한다. 이러한 초기 스크리닝으로부터 선택된 항체 돌연변이체 중 하나 이상에 하나 이상의 추가적인 생물학적 활성 검정을 임의로 적용하여, 증진된 결합 친화도를 갖는 항체 돌연변이체(들)이, 예를 들어 임상전 연구에, 실제로 유용한지를 확인한다.

[0230] 이와 같이 선택된 항체 돌연변이체(들)에, 종종 항체의 의도된 용도에 따라, 추가의 변형을 적용할 수 있다. 이러한 변형은 추가의 아미노산 서열 변경, 이종 폴리펩티드(들)에의 융합 및/또는 공유 변형, 예컨대 하기에 상세하게 설명되는 것을 포함할 수 있다. 아미노산 서열 변경과 관련하여, 예시적인 변형이 상기에 상세하게 설명되어 있다. 예를 들어, 항체 돌연변이체의 적합한 형태를 유지하는데 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기가 또한 치환되어 (일반적으로는 세린으로 치환됨), 분자의 산화 안정성을 개선하고, 비정상적인 가교를 방지할 수 있다. 반대로, 시스테인 결합(들)이 항체에 부가되어 그의 안정성을 개선할 수 있다 (특히, 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우). 아미노산 돌연변이체의 또 다른 유형에서는 글리코실화 패턴이 변경된다. 이는 항체에서 발견되는 1개 이상의 탄수화물 모이어티를 결실시키고/시키거나 항체에 존재하지 않는 1개 이상의 글리코실화 부위를 부가함으로써 달성될 수 있다. 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 나타낸다. 트리펩티드 서열, 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)이 아스파라긴 측쇄로 탄수화물 모이어티를 효소적으로 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이러한 트리펩티드 서열 중 어느 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된다. O-연결된 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중의 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신 또한 사용될 수 있다. 항체에 글리코실화 부위를 부가하는 것은 1개 이상의 상기 기재된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 변경은 원래의 항체의 서열에 대한 1개 이상의 세린 또는 트

레오닌 잔기의 부가 또는 치환에 의해 또한 달성될 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우).

[0231] 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 이에 부착된 탄수화물이 변경될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fc 영역에 부착된 푸코스가 없는 성숙한 탄수화물 구조를 갖는 항체가 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 (Presta, L.)에 기재되어 있다. 또한, US 2004/0093621 (교와 핫코 고교 캄파니, 리미티드(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))도 참조한다. 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물 내에 이분지 N-아세틸글루코사민 (GlcNAc)을 갖는 항체는 WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.) 및 미국 특허 번호 6,602,684 (Umana et al.)에 언급되어 있다. 항체의 Fc 영역에 부착된 올리고사카라이드 내에 적어도 1개의 갈락토스 잔기를 갖는 항체가 WO 1997/30087 (Patel et al.)에 보고되어 있다. 또한, 항체의 Fc 영역에 부착된 탄수화물이 변경된 항체에 관한 WO 1998/58964 (Raju, S.) 및 WO 1999/22764 (Raju, S.)를 참조한다. 변형된 글리코실화를 갖는 항원-결합 분자에 대한 US 2005/0123546 (Umana et al.)을 또한 참조한다.

[0232] 본원에서의 바람직한 글리코실화 변이체는 Fc 영역에 부착된 탄수화물 구조에 푸코스가 없는 Fc 영역을 포함한다. 이러한 변이체는 개선된 ADCC 기능을 갖는다. 임의로, Fc 영역은 ADCC를 보다 개선하는 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 Fc 영역의 위치 298, 333 및/또는 334 (잔기의 Eu 넘버링)에서의 치환을 추가로 포함한다. "탈푸코실화" 또는 "푸코스-결핍" 항체에 대한 공개의 예는 US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; 문헌 [Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)]을 포함한다. 탈푸코실화 항체를 생산하는 세포주의 예는 단백질 푸코실화가 결핍된 Lec13 CHO 세포 (문헌 ([Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. Arch. 249:533-545 (1986)]; 미국 특허 출원 번호 US 2003/0157108 A1 (Presta, L); 및 WO 2004/056312 A1 (Adams et al.), 특히, 실시예 11), 및 넉아웃 세포주, 예를 들어 알파-1,6-푸코실트랜스퍼라제 유전자, FUT8, 넉아웃 CHO 세포 (문헌 [Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)])를 포함한다.

[0233] (xii) 항체의 재조합 생산

[0234] 항체의 재조합 생산을 위해, 이를 코딩하는 핵산을 단리하여, 추가적인 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위한 복제가능한 벡터 내로 삽입한다. 통상의 절차를 사용하여 (예를 들어, 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용함으로써), 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA가 용이하게 단리되고 서열분석된다. 다수의 벡터가 이용가능하다. 벡터 성분은 일반적으로 신호 서열, 복제 기원, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하나 이에 제한되지는 않는다 (예를 들어, 명확하게 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 번호 5,534,615에 기재되어 있음).

[0235] 본원에서 벡터에 DNA를 클로닝하거나 여기서 발현시키기에 적합한 숙주 세포는 상기 기재된 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포이다. 이 목적을 위한 적합한 원핵생물은 유박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아세아에(Enterobacteriaceae), 예컨대 에스케리키아(Escherichia), 예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터(Enterobacter), 에르위니아(Erwinia), 클레브시엘라(Klebsiella), 프로테우스(Proteus), 살모넬라(Salmonella), 예를 들어 살모넬라 티피뮤리움(Salmonella typhimurium), 세라티아(Serratia), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(Serratia marcescans) 및 시겔라(Shigella), 뿐만 아니라 바실루스, 예컨대 비. 서브틸리스(B. subtilis) 및 비. 리케니포르미스(B. licheniformis) (예를 들어, 1989년 4월 12일에 공개된 DD 266,710에 개시된 비. 리케니포르미스 41P), 슈도모나스(Pseudomonas), 예컨대 피. 아에루기노사(P. aeruginosa) 및 스트렙토미세스(Streptomyces)를 포함한다. 한 바람직한 이. 콜라이 클로닝 숙주는 이. 콜라이 294 (ATCC 31,446)이지만, 다른 균주, 예컨대 이. 콜라이 B, 이. 콜라이 X 1776 (ATCC 31,537), 및 이. 콜라이 W3110 (ATCC 27,325)도 적합하다. 이들 예는 제한적이기보다는 예시적이다.

[0236] 원핵생물 뿐만 아니라, 진핵 미생물, 예컨대 사상 진균 또는 효모는 항체-코딩 벡터에 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로미세스 세레비지아에(Saccharomyces cerevisiae) 또는 통상적인 제빵 효모는 하등 진핵 숙주 미생물 중에서 가장 흔하게 사용된다. 그러나, 다수의 다른 속, 종 및 균주, 예컨대 쉬조사카로미세스 폼베(Schizosaccharomyces pombe); 클루이베로미세스(Kluyveromyces) 숙주, 예컨대 예를 들어 케이. 락티스(K. lactis), 케이. 프라길리스(K. fragilis) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(K. bulgaricus) (ATCC 16,045), 케이. 위케라미이(K. wickeramii) (ATCC 24,178), 케이. 왈티이(K. waltii) (ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸(K. drosophilarum) (ATCC 36,906), 케이. 써모톨레란스(K. thermotolerans) 및 케이. 마르시아누스(K. marxianus); 야로위아(yarrowia) (EP 402,226); 피키아 파스토리스(Pichia pastoris) (EP 183,070); 칸디다

(Candida); 트리코더마 레에시아(Trichoderma reesia) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(Neurospora crassa); 슈와니오미세스(Schwanniomyces), 예컨대 슈와니오미세스 옥시덴탈리스(Schwanniomyces occidentalis); 및 사상 진균, 예컨대 예를 들어 뉴로스포라, 페니실리움(Penicillium), 톨리포클라디움(Tolypocladium) 및 아스페르길루스(Aspergillus) 숙주, 예컨대 에이. 니둘란스(A. nidulans) 및 에이. 니거(A. niger)가 통상적으로 이용가능하고 본원에서 유용하다.

[0237] 글리코실화 항체의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 식물 및 곤충 세포를 포함한다. 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) (모충), 아에데스 아에깁티(Aedes aegypti) (모기), 아에데스 알보픽투스(Aedes albopictus) (모기), 드로소필라 멜라노가스터(Drosophila melanogaster) (과실파리) 및 봄빅스 모리(Bombyx mori)와 같은 숙주로부터의 다수의 바큘로바이러스 균주 및 변이체, 및 상응하는 허용 곤충 숙주 세포가 확인되어 있다. 다양한 형질감염용 바이러스 균주, 예를 들어 아우토그라파 칼리포르니카(Autographa californica) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 이용가능하고, 이러한 바이러스들은, 특히 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해, 본 발명에 따라 본원에서 바이러스로 사용될 수 있다. 목화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 식물 세포 배양물이 또한 숙주로서 사용될 수 있다.

[0238] 그러나, 척추동물 세포가 가장 흥미롭고, 배양물 (조직 배양물)에서의 척추동물 세포의 증식은 상용 절차가 되어 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (293 또는 현탁 배양하에 성장하도록 서브클로닝된 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니즈 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 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 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (문헌 [Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간종양 세포주 (Hep G2)이다.

[0239] 숙주 세포는 항체 생산을 위해 상기 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환되고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 또는 원하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기에 적절하게 변형된 종래의 영양 배지에서 배양된다.

[0240] 본 발명의 항체를 생산하는데 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지 중에서 배양될 수 있다. 상업적으로 입수가능한 배지, 예컨대 햄 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 ((MEM), (시그마)), RPMI-1640 (시그마) 및 둘베코 변형 이글 배지 ((DMEM), 시그마)가 숙주 세포의 배양에 적합하다. 또한, 문헌 [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem. 102:225 (1980)], 미국 특허 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 기재된 임의의 배지가 숙주 세포용 배양 배지로 사용될 수 있다. 임의의 이들 배지는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대, HEPES), 뉴클레오시드 (예컨대, 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대, 겐타마이신(GENTAMYCIN)™), 미량 원소 (통상적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 등가의 에너지원으로 보충될 수 있다. 또한, 임의의 다른 필요한 보충물을 당업자에게 공지된 적절한 농도로 포함시킬 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택된 숙주 세포와 함께 이전에 이용된 것이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0241] 재조합 기술을 이용하는 경우에, 항체는 세포내에서 생산되거나, 주변세포질 공간 내에서 생산되거나, 또는 배지 중으로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생성되는 경우, 첫번째 단계로서, 숙주 세포 또는 용해된 세포인 미립자 잔해물을, 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거한다. 항체가 배지 중으로 분비되는 경우에, 일반적으로 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 상업적으로 입수가능한 단백질 농축 필터, 예를 들어 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 이용하여 먼저 농축시킨다. 단백질분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제, 예컨대 PMSF를 임의의 이전 단계에 포함시킬 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위해 항생제를 포함시킬 수 있다.

[0242] 세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를 들어 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있으며, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화성

리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체 내에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 종 및 이소형에 따라 달라진다. 단백질 A를 사용하여 인간 γ1, γ2, 또는 γ4 중쇄를 기초로 하는 항체를 정제할 수 있다 (문헌 [Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 γ3에 대해 권장된다 (문헌 [Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)]). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 가장 흔하게는 아가로스이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 제어된 기공 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스로 달성할 수 있는 것보다 더 빠른 유량 및 더 짧은 가공 시간을 가능하게 한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABX™ 수지 (제이. 티. 베이커(J. T. Baker), 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼 상의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카 상의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스(SEPHAROSE)™ 상의 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예를 들어, 폴리아스파르트산 칼럼) 상의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE, 및 황산암모늄 침전도 회수되는 항체에 따라 이용가능하다.

[0243] **B. IL-17 길항제의 용도**

[0244] 본 발명의 IL-17 길항제는 단독으로 또는 종양 혈관신생의 억제를 위한 다른 치료제(들)와 조합하여 사용될 수 있다.

[0245] 본 발명의 치료 방법에 대한 주요 표적은 VEGF 길항제, 특히 항-VEGF 항체를 이용한 치료에 대해 내성이 있는 것으로 밝혀졌거나 공지된 종양이다.

[0246] 본 발명의 방법에 의해 치료될 질환 및 장애의 예는 용어 "암" 및 "암성" 하에 본원에 기재된 것과 같은 신생물성 장애를 포함한다. 본 발명의 길항제로 치료할 수 있는 비-신생물 상태는 예를 들어 바람직하지 않은 또는 비정상적인 비대증, 관절염, 류마티스 관절염 (RA), 건선, 건선성 플라크, 사르코이드증, 아테롬성동맥경화증, 아테롬성동맥경화판, 심근경색증으로 인한 부종, 당뇨병성 및 기타 증식성 망막병증, 예를 들어 미숙아 망막병증, 수정체후 섬유증식증, 신생혈관 녹내장, 노화-관련 황반 변성, 당뇨병성 황반 부종, 각막 신생혈관화, 각막 이식 신생혈관화, 각막 이식편 거부, 망막/맥락막 신생혈관화, 각의 신생혈관증식 (피부 홍조), 안구 신생혈관 질환, 혈관 재협착, 동정맥 기형 (AVM), 수막종, 혈관종, 혈관섬유종, 갑상선 비대증 (그레이브스병 포함), 각막 및 기타 조직 이식, 만성 염증, 폐 염증, 급성 폐 손상/ARDS, 패혈증, 원발성 폐 고혈압, 악성 폐 삼출, 뇌부종 (예를 들어, 급성 졸중/폐쇄성 두부 손상/외상과 관련이 있음), 활막 염증, RA에서의 판누스 형성, 골화성 근염, 비대성 골 형성, 골관절염 (OA), 불응성 복수, 다낭성 난소 질환, 자궁내막증, 체액의 제3공간 질환 (췌장염, 구획 증후군, 화상, 장 질환), 자궁 유섬유종, 조산, 만성 염증, 예컨대 IBD (크론병 및 궤양성 결장염), 신장 동종이식편 거부, 염증성 장 질환, 신증후군, 바람직하지 않은 또는 비정상적인 조직 덩어리 성장 (비-암), 비만, 지방 조직 덩어리 성장, 혈우병성 관절, 비후성 반흔, 모발 성장의 억제, 오슬러-웨버 증후군, 화농성 육아종, 수정체후 섬유증식증, 경피증, 트라코마, 혈관 부착, 활막염, 피부염, 자간전증, 복수, 심막 삼출 (예컨대, 심막염과 관련이 있음), 및 흉막 삼출을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0247] 본 발명은 본 발명의 IL-17 길항제가 또 다른 요법과 조합하여 투여되는 조합 요법을 제공한다. 조합 치료는 특히 본원의 IL-17 길항제를 VEGF 길항제, 예컨대 항-VEGF 항체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 대안적으로, 조합 치료는 특히 본원의 IL-17 길항제를 G-CSF 길항제, 예컨대 항-G-CSF 항체와 조합하여 투여하는 것을 포함한다. 또한 또는 대안적으로, 본원의 IL-17 길항제는 다양한 신생물성 또는 비-신생물성 상태, 예컨대 염증성 세포-의존성 혈관신생 또는 종양발생을 치료하기 위한 하나 이상의 추가의 작용제, 예를 들어 골수 세포 감소제, 항암제 또는 치료제, 화학요법 및/또는 방사선 요법, 항혈관신생제 또는 항-신생혈관화 치료제와 조합하여 투여될 수 있다.

[0248] 한 실시양태에서, 신생물 또는 비-신생물 상태는 VEGF 길항제 치료에 대해 내성이 있는 비정상적인 또는 바람직하지 않은 혈관신생과 관련이 있는 병리적 장애를 특징으로 한다. 본 발명의 길항제는 해당 목적에 유효한 또 다른 작용제와 연속적으로 또는 조합하여, 동일한 조성물 내에 또는 개별 조성물로서 투여할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 본 발명의 다수의 길항제, 작용제 및/또는 효능제를 투여할 수 있다.

[0249] 이러한 길항제 및/또는 작용제의 투여는 동시에, 예를 들어 단일 조성물로서 또는 동일하거나 상이한 투여 경로를 이용하는 2가지 이상의 특유의 조성물로서 수행할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 투여는 임의의 순서로 순차적으로 수행될 수 있다. 특정 실시양태에서, 2종 이상의 조성물의 투여 사이에 수분 내지 수일에서 수주 내지 수개월 범위의 간격이 존재할 수 있다. 예를 들어, IL-17 길항제가 먼저 투여되고, 다양한 길항제 또는 작용제, 예를 들어 VEGF 및/또는 G-CSF 길항제가 이어서 투여될 수 있다. 그러나, 본 발명의 여러 길항제 또는 작용제를 동시 투여하거나 먼저 투여하는 것도 고려된다.

[0250] 투여된 치료제의 유효량은 의사 또는 수의사의 판단에 따를 것이다. 치료할 상태의 최대 관리를 달성하도록 투여량 투여 및 조정이 이루어진다. 용량은 사용될 치료제의 유형 및 치료될 특정 환자와 같은 인자에 따라 추가로 달라질 것이다. IL-17 길항제에 대한 적합한 투여량은 현재 이용되는 것들이고, 본 명의 I1-17 길항제 및 또 다른 길항제, 예컨대 예를 들어 VEGF 및/또는 G-CSF 길항제의 조합 작용 (상승작용)으로 인해 낮출 수 있다. 특정 실시양태에서, 억제제의 조합은 단일 억제제의 효능을 강화시킨다. 용어 "강화시킨다"는 통상의 또는 승인된 용량의 치료제의 효능 개선을 지칭한다. 또한, 본원에서 제약 조성물 표제 하의 섹션을 참조한다.

[0251] 암과 관련이 있는 항혈관신생 요법은 종양 성장을 지지하는 영양분 제공에 필요한 종양 혈관의 발달 억제를 목표로 하는 암 치료 전략이다. 혈관신생이 원발성 종양 성장 및 전이 둘 다에 관여하기 때문에, 본 발명이 제공하는 항혈관신생 치료는 원발성 부위에서의 종양의 신생물성 성장을 억제할 수 있을 뿐만 아니라, 또한 속발성 부위에서의 종양의 전이를 예방할 수도 있고, 따라서 다른 치료제에 의한 종양의 공격을 허용한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 항암제 또는 치료제는 항혈관신생제이다. 또 다른 실시양태에서, 항암제는 화학요법제이다.

[0252] 본원에 열거된 것, 예를 들어 정의 섹션에 열거된 것, 및 예를 들어 문헌 [Carmeliet and Jain, Nature 407:249-257 (2000); Ferrara et al., Nature Reviews:Drug Discovery, 3:391-400 (2004); 및 Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003)]에 열거된 것들을 비롯한 많은 항혈관신생제가 확인되어 있고 당업계에 공지되어 있다. 또한, 미국 특허 출원 US20030055006을 참조한다. 한 실시양태에서, 본 발명의 IL-17 길항제는 예를 들어 가용성 VEGF 수용체 (예를 들어, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, 뉴로필린 (예를 들어, NRP1, NRP2)) 단편, VEGF 또는 VEGFR을 차단할 수 있는 압타머, 중화 항-VEGFR 항체, VEGFR 티로신 키나제 (RTK)의 저분자량 억제제, VEGF에 대한 안티센스 전략, VEGF 또는 VEGF 수용체에 대한 리보자임, VEGF의 길항제 변이체, 및 그의 임의의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 항-VEGF 중화 항체 (또는 단편) 및/또는 또 다른 VEGF 길항제 또는 VEGF 수용체 길항제와 조합되어 사용된다. 대안적으로 또는 추가로, VEGF 길항제 및 본 발명의 다른 작용제 이외의 2종 이상의 혈관신생 억제제를 임의로 환자에게 공동-투여할 수 있다. 특정 실시양태에서, 1종 이상의 추가의 치료제, 예를 들어 항암제를 본 발명의 작용제, VEGF 길항제 및/또는 항혈관신생제와 조합하여 투여할 수 있다.

[0253] 본 발명의 특정 측면에서, 본 발명의 IL-17 길항제와의 조합 종양 요법에 유용한 다른 치료제는 기타 암 요법 (예를 들어, 수술, 방사선 치료 (예를 들어, 방사선 조사 또는 방사성 물질의 투여 포함), 화학요법, 본원에 열거되고 당업계에 공지된 항암제를 이용한 치료, 또는 그의 조합)을 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본원에 개시된 동일한 또는 2종 이상의 상이한 항원에 결합하는 2종 이상의 항체가 환자에게 공동-투여될 수 있다. 때때로, 예를 들어 G-CSF 항체와 같은 1종 이상의 시토카인을 환자에게 투여하는 것이 또한 유익할 수 있다.

[0254] 특정 측면에서, 본 발명은 유효량의IL-17 길항제 및 1종 이상의 화학요법제를 암에 걸리기 쉽거나 암에 걸린 것으로 진단된 환자에게 투여함으로써, 내성 종양 성장 또는 암 세포의 성장을 차단 또는 저하시키는 방법을 제공한다. 다양한 화학요법제가 본 발명의 조합 치료 방법에서 사용될 수 있다. 고려되는 화학요법제에 관한 예시적이며 비제한적 목록은 본원 "정의" 하에 제공된다.

[0255] 당업자에게 이해되는 바와 같이, 화학요법제의 적절한 용량은 일반적으로 화학요법제가 단독으로 또는 다른 화학요법제와 조합하여 투여되는 임상 요법에서 이미 사용된 용량 정도일 것이다. 치료할 상태에 따라 투여량에 변동이 발생할 것이다. 치료를 관리하는 의사는 개별 대상체에게 적절한 용량을 결정할 수 있을 것이다.

[0256] 본 발명은 또한 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 억제 또는 예방하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장은 1종 이상의 현재 이용가능한 요법 (예를 들어, 암 요법, 예컨대 화학요법, 방사선 요법, 수술, 호르몬 요법 및/또는 생물학적 요법/면역요법, 항-VEGF 항체 요법, 특히 특정한 암에 대한 표준 치료 요법)을 받고 있거나 이러한 요법으로 치료받은 환자에서 상기 요법이 상기 환자의 치료에 임상적으로 적절하지 못하거나 또는 환자가 상기 요법의 임의의 유익한 효과를 더이상 받지 못하여 이들 환자에게 추가의 효과적인 요법이 필요한 상태를 기재하는데 사용된다. 본원에 사용된 바와 같은, 상기 구문은 해당 요법에 반응하는 환자가 여전히 부작용으로 인해 고통받고 있고, 내성이 발생하며, 요법에 반응하지 않고, 요법에 대해 만족할 만한 수준으로 반응하지 않는 것 등을 설명하는, "비-반응성/치료 불응성" 환자의 상태를 지칭할 수도 있다. 다양한 실시양태에서, 암은 암 세포의 수가 유의하게 감소되지 않았거나 증가되었거나, 또는 종양 크기가 유의하게 감소되지 않았거나 증가되었거나, 또는 암 세포의 수 또는 크기에서 임의의 추가의 감소가 일어나지 못한 경우에 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장이다. 암 세포가 재발 종양 성장 또는 재발 암 세포 성장인지를 결정하는 것은 당업계에서 허용되고 있는 "재발" 또는 "치료 불응성" 또는 "비-반응성" 의미를 이용하여, 암 세포에 대한 치료 유효성을 평가하는 것으로 당업계에 공지된 모든 방법에 의

해 생체내 또는 시험관 내에서 수행할 수 있다. 항-VEGF 치료에 내성인 종양은 재발성 종양 성장의 예이다.

[0257] 본 발명은 대상체에서 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 차단 또는 감소시키기 위해 본 발명의 1종 이상의 길항제를 투여함으로써, 이러한 대상체에서 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 차단 또는 감소시키는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, IL-17 길항제는 암 치료제에 후속하여 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 IL-17 길항제를 암 요법, 예를 들어 화학요법과 동시에 투여한다. 대안적으로 또는 추가로, IL-17 길항제 요법은 또 다른 암 요법과 교대로 수행되며, 이들은 임의의 순서로 수행될 수 있다. 본 발명은 또한 암에 걸리기 쉬운 환자에서 암의 발병 또는 재발을 예방하기 위해 1종 이상의 억제 항체를 투여하는 방법을 포괄한다. 일반적으로, 대상체는 암 요법을 받았거나 암 요법을 병행하여 받고 있는 중이다. 한 실시양태에서, 암 요법은 항혈관신생제, 예를 들어 VEGF 길항제와의 조합 치료이다. 항혈관신생제는 당업계에 공지된 것, 및 본원에서 정의 표제 하의 섹션에 기재된 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 항혈관신생제는 항-VEGF 중화 항체 또는 단편 (예를 들어, 인간화 A4.6.1, 아바스틴® (제넨테크, 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코), Y0317, M4, G6, B20, 2C3 등)이다. 예를 들어 미국 특허 6,582,959, 6,884,879, 6,703,020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; 미국 특허 출원 20030206899, 20030190317, 20030203409, 및 20050112126; 문헌 [Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004)]; 및 WO2005012359를 참조한다. 추가의 작용제가 재발성 종양 성장 또는 재발성 암 세포 성장을 차단하거나 감소시키기 위해 IL-17 길항제와 조합하여 투여될 수 있다 (예를 들어, 본원의 조합 요법 표제 하의 섹션 참조).

[0258] 한 실시양태에서, 본 발명의 IL-17 길항제는, Gr1, 호중구 엘라스타제, MCP-1, MIP-1 알파, URCGP 또는 URRTP의 발현을 감소시키는 치료제를 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 골수 세포 감소제와 조합하여 투여될 수 있다. 본 발명의 IL-17 길항제와 조합하여 사용하기 위한 골수 세포 감소제는 구체적으로 Gr1 길항제, Cd11B 길항제, CD18 길항제, 엘라스타제 억제제, MCP-1 길항제, MIP-1 알파 길항제, 클로드로네이트를 단독으로 또는 임의의 조합으로 포함한다.

[0259] 또한, 본 발명의 IL-17 길항제를 호르몬, 방사선 및 화학요법제와 조합하여 투여함으로써, 암 세포가 이들 작용제 중의 하나 이상에 재감작화되도록 한 다음, 이를 투여 (또는 지속적 투여)하여 암을 치료 또는 관리 (전이 예방 포함)할 수 있다.

[0260] IL-17 길항제를 이용한 치료에 대한 종양 감수성은 URCGP, DRCGP, URRTP 또는 DRRTP를 코딩하는 핵산과 상동성인 하나 이상의 핵산 서열을 발현할 수 있는 세포를 포함하는 대상체로부터의 하나 이상의 시험 세포 집단을 제공함으로써 평가할 수 있다. 이들 서열의 발현을 참조 세포 집단과 비교한다. 참조 세포 집단에서 세포의 IL-17 길항제 감수성 상태가 공지되어 있는 한 어떠한 참조 세포 집단도 사용될 수 있다. 비교는 동시에 또는 일시적으로 개별 시간에 측정된 시험 샘플과 기준 샘플 상에서 수행할 수 있다. 후자의 예는 그의 감수성 상태가 공지되어 있는 세포에서 공지된 서열의 발현 수준에 관한 정보를 어셈블리하는, 편집된 발현 정보 (예를 들어, 서열 데이터베이스)를 사용하는 것이다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 참조 세포 집단에 CD11b+Gr1+ 골수 세포가 풍부화된다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 참조 세포 집단에 종양 세포가 풍부화된다.

[0261] VEGF 길항제를 사용한 치료에 대해 내성이 있는 종양은 또한 현재 계류 중인 출원 일련 번호 11/692,682 (2007년 3월 28일에 출원됨)에 제공된 진단 마커 세트를 이용하여 확인할 수 있다. 예를 들어, 마커 세트는 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 10개 이상, 12개 이상, 13개 이상, 14개 이상, 15개 이상, 20개 이상의 분자, 또는 전체 세트의 분자를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 단백질 또는 발현 및/또는 활성이 변경된 단백질을 코딩하는 핵산이고, 하기로부터 선택된다: Notch2, DMD8, MCP-1, ITGB7, G-CSF, IL-8R, MIP2, MSCA, GM-CSF, IL-1R, Meg-SF, HSP1A, IL-1R, G-CSFR, IL10-R1, Erb-2.1, 카베올린3, Semcap3, INTG4, THBSP-4, ErbB3, JAM, Eng, JAM, Eng, JAM-2, Pecam1, Tlr3, 호중구 엘라스타제, CD14, expi, Il-13R, LDLR, TLR-1, RLF, Endo-Lip, SOCS13, FGF13, IL-4R, THBS1, Crea7, 아쿠아포린-1, SCF38, APOE, FABP, IL-11R, IL-1RII, IFN TM1, TNFRSF18, WNT5A, 분비성 담체 막 1, HSP86, EGFR, EphRB2, GPCR25, HGF, 안지오포이에틴 유사-6, Eph-RA7, 세마포린 V1b, 뉴로트로핀 5, 클라우딘-18, MDC15, ECM, ADAMTS7B, NCAM-140, 피브로넥틴 유형 III, WIP, CD74, ICAM-2, 재기드1, ltga4, ITGB7, TGF-BII-R, TGFb IEP, Smad4, BMPR1A, CD83, 덱틴-1, CD48, E-셀렉틴, IL-15, 시토카인 신호전달 저해제 4, Cytor4, CX3CR1, IGF2, HSP9A, FGF18, ELM1, Ledgfa, 스캐빈저 수용체 유형 A, 대식세포 C-유형 렉틴, Pigr3, 대식세포 SRT-1, G 단백질-커플링 수용체, ScyA7, IL-1R2, IL-1 유도성 단백질, IL-1베타, ILIX 전구체, TGF-B, FIZZ1, Wfs1, TP 14A, EMAP, SULF-2, 세포외 매트릭스 2, CTFG, TFPI, XCP2, Ramp2, ROR-알파, 에프린 B1, SPARC-유사 1 및 세마포린 A. 본 발명의 한 실시양태에서, 단백질을 검출하는 항체가 제공된다. 한 실시양태에서, 분자는 CD11b+Gr1+ 세포로부터 유래되고, 예를 들어 IL-13R, TLR-1, Endo-Lip, FGF13, IL-4R, THBS1 및 Crea7을 포함한다. 또 다른 실

시양태에서, 분자는 저항성 종양으로부터 유래되고, 예를 들어 MSCA, MIP2, IL-8R, G-CSF, IL10-R2, THBSP-4 및 JAM-2를 포함한다.

[0262] **C. 제약 조성물 및 투여**

[0263] 본 발명의 IL-17 길항제, 예를 들어 항-IL-17 항체를 단독으로 또는 기타 치료제와 조합하여 공지된 방법, 예를 들어 볼루스로서 정맥내 투여 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입에 의해, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활막내, 척수강내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해 및/또는 피하 투여에 의해 인간 환자에게 투여한다.

[0264] 특정 실시양태에서, 본 발명의 치료는 IL-17 길항제와 VEGF 길항제 및/또는 하나 이상의 골수 세포 감소제 또는 화학요법제의 조합 투여를 포함한다. 한 실시양태에서, 추가의 항암제, 예를 들어 1종 이상의 상이한 항혈관신생제, 1종 이상의 화학요법제 등이 존재한다. 본 발명은 또한 다중 억제제, 예를 들어 동일한 항원에 대한 다중 항체 또는 본 발명의 상이한 단백질에 대한 다중 항체를 투여하는 것을 고려한다. 한 실시양태에서, 상이한 화학요법제 칵테일을 본원의 IL-17 길항제와 함께 투여한다. 조합 투여는 개별 제제 또는 단일 제약 제제를 사용하는 공투여 및/또는 임의의 순서의 연속 투여를 포함한다. 예를 들어, IL-17 길항제를 VEGF 또는 G-CSF 길항제 이전에, 그 후에, 그와 교대로 투여할 수 있거나, 또는 그와 동시에 투여할 수 있다. 한 실시양태에서, 양쪽 (또는 모든) 활성제가 동시에 이들의 생물학적 활성을 발휘하는 기간이 있다.

[0265] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 본 발명의 작용제의 적절한 투여량은 상기 정의된 바와 같은, 치료하고자 하는 질환의 유형, 질환의 중증도 및 과정, 억제제가 예방적 용도로 투여되는지 아니면 치료적 용도로 투여되는지의 여부, 기존의 요법, 환자의 임상 병력 및 억제제에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 좌우될 것이다. 억제제는 한번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 적합하게 투여된다. 조합 치료 요법에서, 본 발명의 조성물은 치료 유효량 또는 치료 상승작용적 양량으로 투여된다. 본원에 사용된 치료 유효량은 본 발명의 조성물의 투여 및/또는 IL-17 길항제 및 1종 이상의 다른 치료제의 공-투여로 인해 표적화하는 질환 또는 상태가 감소 또는 억제되는 양이다. 작용제들의 조합물의 투여 효과는 부가적일 수 있다. 한 실시양태에서, 투여 결과는 상승작용 효과이다. 치료 상승작용적 양은 특정한 질환과 연관된 증상 또는 상태를 상승적으로 또는 상당히 저하 또는 제거시키는 데에 필요한, IL-17 길항제 및 1종 이상의 기타 치료제, 예를 들어 IL-17 길항제 및 임의로 골수 세포 감소제, 화학요법제 및/또는 항암제의 양이다.

[0266] 질환의 유형 및 중증도에 따라, 예를 들어 1회 이상의 개별 투여에 의한 것이든 또는 연속 주입에 의한 것이든 간에 약 1 μg/kg 내지 50 mg/kg (예를 들어, 0.1-20 mg/kg)의 IL-17 길항제, VEGF 길항제, G-CSF 길항제, 골수 세포 감소제, 화학요법제 또는 항암제가 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량이다. 상기 언급된 요인에 따라, 전형적인 1일 투여량은 약 1 μg/kg 내지 약 100 mg/kg 또는 그 초과의 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우에, 상태에 따라 질환 증상의 원하는 억제가 일어날 때까지 치료를 지속한다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있다. 전형적으로, 임상의는 요구되는 생물학적 효과를 제공하는 투여량(들)에 도달할 때까지 본 발명의 분자(들)를 투여할 것이다. 본 발명의 요법의 진행은 통상의 기술 및 검정에 의해 용이하게 모니터링된다.

[0267] 예를 들어, 혈관신생 억제제, 예를 들어 항-VEGF 항체 (예를 들어, 아바스틴® (제넨테크)에 대한 제제 및 투여 스케줄은 제조업체의 지침에 따라 사용할 수 있거나 또는 숙련된 실시자에 의해 실험적으로 결정할 수 있다. 또 다른 예에서, 이러한 화학요법제에 대한 제제 및 투여 스케줄은 제조업체의 지침에 따라 사용할 수 있거나 또는 숙련된 실시자에 의해 실험적으로 결정할 수 있다. 화학요법을 위한 제조 및 투여 스케줄은 또한 문헌 [Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)]에도 기재되어 있다.

[0268] 본 발명의 치료 효능을 신생물성 또는 비-신생물성 장애를 평가하는데 통상적으로 사용되는 다양한 종점에 의해 측정할 수 있다. 예를 들어, 암 치료는, 예를 들어 (이에 제한되지는 않음) 종양 퇴행, 종양 중량 또는 크기 수축, 진행까지의 시간, 생존 기간, 무진행 생존, 전반적인 반응 속도, 반응률, 삶의 질, 단백질 발현 및/또는 활성에 의해 평가할 수 있다. 본원에 기재된 항혈관신생제는 종양 혈관계를 표적화하고, 반드시 신생물성 세포 자체를 표적화하는 것은 아니기 때문에 독특한 부류의 항암 약물을 나타내고, 따라서 약물에 대한 임상 반응의 독특한 측정법 및 정의를 필요로 할 수 있다. 예를 들어, 2차원 분석에서 50% 초과의 종양 수축이 반응을 선언하는 표준 컷-오프이다. 그러나, 본 발명의 억제제는 원발성 종양의 수축 없이도 전이성 확산을 억제할 수도 있고, 또는 단순히 종양증식억제 효과를 발휘할 수도 있다. 따라서, 예를 들어 혈관신생의 혈장 또는 소변 마커의 측정 및 방사선 영상화를 통한 반응의 측정을 포함하는, 요법의 효능을 결정하는 접근법을 이용할 수 있다.

[0269] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 상기 언급된 장애를 치료하거나 진단하는 데 유용한 물질을 함유하는 제조품이 제공된다. 상기 제조품은 용기, 라벨 및 포장 삽입물을 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 시린지 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성될 수 있다. 한 실시양태에서, 용기는 상태를 치료하는데 효과적인 조성물을 보유하고 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 정맥내 용액 백 또는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있음). 조성물 내의 적어도 한 가지 활성제는 VEGF 조절제이고, 적어도 제2 활성제는 골수 세포 감소제 및/또는 화학요법제이다. 용기 상의 또는 용기와 연관된 라벨은 조성물이 선택된 상태를 치료하는데 사용된다는 것을 나타낸다. 제조품은 제약상-허용되는 완충제, 예컨대 포스페이트-완충 염수, 링거액 및 덱스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다.

[0270] 본 발명의 추가 상세내용은 하기의 비제한적 실시예에 의해 예시된다. 하기 실시예에서, 스튜던트 t-검정은 모든 실험에서 유의차를 결정하는데 사용되었다. <0.05의 P 값은 유의한 것으로 간주되었다.

[0271] **실시예 1 - 항-VEGF 내성 및 항-VEGF 감수성 종양 세포의 분비된 단백질 프로파일**

[0272] 그의 미세환경의 확립 및 지시를 담당하는 종양 유래 인자를 확인하기 위해, 이전에 확립된 항-VEGF 내성 및 감수성 종양 세포주 사이의 분비된 단백질의 프로파일을 비교하였다. 마우스 종양 세포주 (EL4, Tib-6)는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (ATCC)으로부터 수득하였다. EL4는 항-VEGF-내성인 T-세포 림프종 세포주인 반면, Tib6은 항-VEGF-감수성인 B-세포 림프종 세포주이다. 이들은 둘 다 L-글루타민, 10% 태아 소 혈청 (FBS) (시그마, 미주리주 세인트 루이스)이 보충된 DMEM (인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아주 칼스배드)에서 배양하고, 37℃에서 5% CO_2, 80% 습도 인큐베이터에 유지하였다.

[0273] EL4 및 Tib-6 세포주 조건화 배지는 종양 세포주를 감소된 혈청 DMEM (1% FBS) 중 $1x10^6$개/ml의 밀도로 6-웰 플레이트에서 72시간 동안 성장시킨 후에 수집하였다. 세포 생존률 및 총 세포 수를 바이-셀(Vi-Cell) XR (베크만 쿨터(Beckman Coulter), 캘리포니아주 풀러톤)을 이용하여 측정함으로써 조건화 기간 동안 세포 수의 변화를 측정하였다. 모든 데이터를 조건화 기간 말에 세포 수에 의해 정규화하였다.

[0274] 조건화 배지 내에 함유된 종양 세포 분비된 인자는 32개 마우스 시토카인 및 성장 인자에 특이적인 항체의 패널을 사용하여 정보를 얻었다 (실시예 2에 기재된 바이오라드(BioRad) 시토카인 비드 검정). 종양 세포가 침윤된 기질 세포와 접촉하게 되는 생체내 조건을 모델링하기 위한 시도에서, 본 발명자들은 종양 및 주요 기질 세포 유형인 섬유모세포 사이의 상호작용을 연구하기 위해 공동-배양 검정을 이용하였다. 이는 세포-세포 상호작용을 연구하기 위해 가장 간단한 시스템이다. 마우스로부터 단리된 정상 피부 섬유모세포를 공동-배양 연구에 사용하여 생체내 셋팅을 가장 가깝게 모방하였다. 공동-배양 검정에서, 상이한 세포 유형이 접촉되거나 또는 매우 근접한 경우에 나타나는 어느 한 세포 유형의 유전자 발현의 검출 변화가 용이하게 검출된다.

[0275] 도 1a에 나타난 바와 같이, 결과는 Il-17이 시험관내 항-VEGF 내성 (EL4) 대 감수성 (Tib6) 종양 세포에서 발견되는 가장 풍부한 분비된 인자임을 입증한다. 도 1b는 IL-6 및 G-CSF 수준이 항-VEGF 불응성 EL4 세포 및 정상 피부 섬유모세포 (NSF)의 공동-배양물에서 상승된다는 것을 보여준다. 이러한 발견은 항-VEGF 내성 및 감수성 세포주가 그의 분비된 단백질 프로파일의 측면에서 상이하다는 것을 나타내며, 가장 주목할만한 것은 내성 EL4 세포주에서 가장 풍부하게 발현되는 시토카인으로서의 IL-17이다. 또한, 염증유발 시토카인, IL-6 및 G-CSF는 내성 종양 세포주와 NSF의 공동-배양시에 강하게 상향조절되고, 이는 종양 및 기질-섬유모세포 사이의 세포-세포 상호작용이 염증유발 시토카인의 발현을 유도할 수 있다는 것을 시사한다.

[0276] **실시예 2 - 종양 세포는 주변분비 메카니즘을 통해 섬유모세포에서 염증유발 유전자의 발현을 유도한다**

[0277] RNA 샘플 제조 및 정량적 역전사효소-PCR (qRT-PCR) 분석:

[0278] 전체 DNA-무함유 RNA를 제조업체의 프로토콜에 따라 RNeasy 키트 (퀴아젠(Qiagen), 독일)로 단리하였다다. 1-단계 정량적 역전사효소-PCR을 슈퍼스크립트(SuperScript) III 백금 1-단계 qRT-PCR 키트 (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드) 또는 택맨(TaqMan) 1-단계 RT-PCR 마스터 믹스 (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 캘리포니아주 포스터 시티)를 사용하여 50μL의 전체 부피로 수행하였다. 하기 택맨 유전자 발현 검정 프라이머 및 프로브 믹스를 하기 뮤린 유전자에 사용하였다: IL-17 (검정 ID: Mm00439619_m1), IL-6 (검정 ID: Mm01210733_m1), Bv8 (검정 ID: Mm00450080_m1), G-CSF (검정 ID: Mm00438334_m1), MMP-9 (검정 ID: Mm00442991_m1), S100a8 (검정 ID: Mm00496696_g1), S100a9 (검정 ID: Mm00656925_m1), GAPDH (검정 ID: Mm99999915_g1). 분석은 제조업체 제안된 프로토콜에 따라 표준 ABI 7500 기계 (인비트로젠) 상에서 수행하였

다.

[0279] 시토카인 비드 검정 및 ELISA:

[0280] EL4 세포 (1x106개 세포/ml) 및 정상 피부 섬유모세포 (NSF) ($3.3x10^5$개 세포)를 단독으로 또는 1:3 (NSF/EL4) 비로 함께 6-웰 플레이트에서 72시간 동안 3중 배양하고; 상청액을 수집하고, 바이오-플렉스 프로(Bio-Plex Pro)™ 마그네틱 시토카인, 케모카인, 및 성장 인자 검정 시스템 (바이오라드, 캘리포니아주 허큘레스)으로 분석하였다. 세포를 감소된 혈청 배지 (1% FBS)에서 배양하였다. 뮤린 IL-17A, G-CSF, IL-6 수준을 퀀티킨 (Quantikine) ELISA 키트 (R&D 시스템스(R&D Systems), 미네소타주 미네아폴리스)에 의해 측정하였다.

[0281] GFP-표지된 EL4 종양 세포를 72시간 동안 정상 피부 섬유모세포 (NSF)와 공동-배양한 후에, 섬유모세포부터의 종양 세포의 FACS 단리 및 qRT-PCR에 의한 유전자 발현의 분석을 수행하였다. G-CSF (Csf3) (도 2a에 나타낸 바와 같음) 및 IL-6 (도 2b에 나타낸 바와 같음) 발현이 유도되고, 이들은 항-VEGF 내성 세포주 EL4와 공동-배양시의 정상 섬유모세포 대 단독-배양 세포에서 관찰되었다. 예비-분류 분석을 FACS 분류에 의해 도입되는 잠재적 인공물을 제어하기 위해 수행하였다. G-CSF 및 IL-6 발현의 세포 공급원을 결정하기 위해, GFP 표지된 종양 세포를 비표지된 섬유모세포와 공동-배양한 후에 FACS 분류하고, qRT-PCR에 의해 이들 세포 유형에서의 유전자 발현의 변화를 프로파일링하였다. 이러한 데이터는 세포-세포 상호작용이 공동-배양시에 섬유모세포 구획 대 종양 세포에서 IL-6 및 G-CSF 둘 다의 유도를 발생시킨다는 것을 밝혀내었다. 유사하게, NSF를 EL4-조건화 배지로 자극한 경우에, 섬유모세포에서의 G-CSF 및 IL-6 발현의 유도가 또한 관찰되었으며 (데이터는 나타내지 않음), 이는 세포-세포 상호작용이 엄격하게 요구되지 않고, 종양 세포 분비된 인자가 NSF에서 G-CSF 및 IL-6의 상향조절을 도출하기에 충분하다는 것을 시사한다. 이 데이터는 함께 종양 세포가 주변분비 메카니즘을 통해 이웃 섬유모세포에게 G-CSF 및 IL-6을 비롯한 염증유발 시토카인의 발현 및 분비를 지시할 수 있다는 것을 시사한다.

[0282] **실시예 3 - IL-17 중화는 섬유모세포에서 EL4 유도된 G-CSF 발현을 억제한다**

[0283] NSF에서 관찰된 G-CSF 유도가 IL-17 의존성일 수 있는지 여부를 다루기 위해, EL4 조건화 배지를 실시예 1에 기재된 바와 같이 수집한 후에 IL-17에 대한 중화 항체와 예비-인큐베이션하여, 96-웰 클러스터에 플레이팅된 NSF에 대한 첨가 전에 표적화된 가용성 인자의 중화를 허용하였다. 다양한 농도의 IL-17 및 G-CSF의 2개의 다른 공지된 유도제 (TNF-α 및 IL-1β)에 대한 중화 항체를 EL4/섬유모세포와 24시간 동안 37℃에서 200 μl의 총 부피로 공동-배양하여 인큐베이션하였다. 이러한 인큐베이션 후에, 50 μL의 상청액을 각각의 웰로부터 수집하고, 50 μL의 ELISA 희석제로 희석하고, ELISA에 의해 mG-CSF 수준에 대해 시험하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, IL-17에 대한 중화 항체가 EL4/섬유모세포 공동-배양물의 조건화 배지에서 분비된 G-CSF 수준의 가장 유의한 감소를 제공하였으며, 이는 IL-17이 연관된 정상 섬유모세포에서 염증유발 시토카인 분비의 유도를 담당하는 우세한 종양-유래 인자일 수 있다는 것을 시사한다.

[0284] **실시예 4 - 종양 미세환경 내의 IL-17 기능**

[0285] 암컷 마우스 (6- 내지 12-주령)를 지시된 바와 같이 이용하였다: C57B16.IL-17RC-/-, C57B16. WT 한배자손을 번식시키고, 특정 병원균-무함유 조건 하에 제넨테크, 인크.에서 유지하였다. 암컷 WT C57B16 마우스는 찰스 리버 래보러토리(Charles River Laboratory) (캘리포니아주 홀리스터)로부터 구입하였다다. 동물이 관련된 절차는 동물 실험 윤리 위원회 (제넨테크, 인크.)에 의해 검토 및 승인되고, 관련 규제 표준에 따른다. EL4 종양 세포를 실시예 1에 기재된 바와 같이 배양하였다.

[0286] 이 실험에 사용된 종양 마우스 모델은 하기에 기재된 바와 같다: 100 ul의 성장 인자-감소된 매트리겔 (BD 바이오사이언스(BD Biosciences)) 중 EL4 종양 세포 (2.0×10^6개)를 상이한 유전자형, 야생형 (C57/BL6 WT) 또는 IL-17 수용체 녹-아웃 (IL-17rc KO)의 마우스의 배측 옆구리에 피하 접종하였다. 항체를 해당 도면 범례에서 지시된 용량으로 1주일에 2회 IP 주사하였다. 대조군 항체, 항-돼지풀, 항-VEGF mAb B20-4.1.1 (Liang et al., 2006) 또는 항-IL-17A로의 처리는 종양 세포 접종 2일 후에 개시하였다. 모든 종양 성장 실험을 3회 이상 수행하였고, 실험실 동물의 관리 및 사용 지침에 따라 수행하였다. 종양 부피를 타원체 부피 공식 (0.5xLxW2, 여기서 L은 길이이고, W는 폭임)을 이용하여 격일로 계산하였다.

[0287] 도 4a는 대조군 항체 (항-돼지풀, 10 mg/kg, 복강내 (IP), 1주일에 2회) 또는 항-VEGF (10mg/kg, IP, 1주일에 2회)로 처리된 C57/BL6 WT 및 Il-17rc -/- 마우스 내의 EL4종양의 성장을 보여준다. 처리는 종양 세포 접종 48시간 후에 개시하였다. 데이터는 평균 ± SEM으로 나타낸다. 대조 처리군에서, 최종 EL4 종양 부피는 WT와 비

교시에 IL-17rc-/- 마우스에서 ~50% 감소하였고, 이는 숙주 기질에 대한 IL-17 신호전달이 종양 성장에서 중요한 역할을 수행한다는 것을 시사한다. 그리고 항-VEGF로의 단독요법이 WT 마우스에서의 EL4 종양 수축에 대해 약간의 효과를 나타낸 반면, IL-17rc-/- 마우스에서는 거의 ~80% 종양 성장 억제를 발생시켰다. 데이터는 평균 ± SEM으로 나타낸다. *는 항-VEGF로 처리된 WT 및 Il-17rc-/- 동물 내의 EL4 종양 사이의 유의한 차이를 나타낸다 ($P<0.0001$).

[0288] 도 4b는 대조군 항체 (항-돼지풀), 항-VEGF, 항-mIL-17 및 항-mIL-17/항-VEGF 조합으로 처리된 C57/BL6 WT 마우스에서의 EL4 종양의 성장을 보여준다. 모든 항체는 10mg/kg에서 복강내로 (IP) 1주일에 2회 투여하였다. 처리는 종양 세포 접종 48시간 후에 개시하였다. 데이터는 평균 ± SEM으로 나타낸다. 항-VEGF를 단독으로 투여한 경우에, 최종 종양 부피는 매우 약간 감소한 반면, 항-IL-17를 항-VEGF와 조합하여 투여한 경우에, 종양 부피는 ~50% 감소하였으며, 이는 IL-17의 억제가 항-VEGF 치료에 대해 감수성이 되도록 한다는 것을 추가로 시사한다. 데이터는 평균 ± SEM으로 나타낸다 (Shojaei et al. 2009). (*)는 항-VEGF 및 이와 항-mIL-17의 조합으로 처리된 EL4 종양 사이의 유의한 차이를 나타낸다 ($P<0.05$). 도 4a 및 4b는 함께 종양 미세환경에서의 IL-17 기능이 종양 성장을 촉진할 수 있고 항-VEGF 치료에 대한 내성에 필요할 수 있다는 것을 입증한다.

[0289] 또한, VEGF 억제에 대한 종양 내성을 매개하는데 있어 IL-17의 역할을 치료-감수성 종양 세포주, Tib-6을 마우스 IL-17A로 형질도입시킨 경우 (Tib6-IL17로 지칭됨)에 확인하였고, 면역결핍 (nu/nu) 수용자 마우스에서 항-VEGF 치료에 대한 그의 반응에 대해 시험하였다. 대조군, 네오마이신-형질도입된 Tib6 (Tib6-neo로 지칭됨) 종양 보유 마우스와 비교하여 유의하게 더 높은 수준의 두 순환 및 종양 IL-17A가 존재하였다. 이에 상응하여, 보다 높은 수준의 G-CSF가 또한 Tib6-IL17 종양에서 검출되었고, 이들 종양은 Tib6-neo 종양보다 생체내에서 보다 많은 CD11b+Gr1+ 세포를 동원하였다. 이식된 Tib6-IL-17 종양이 Tib6-neo 종양과 비교하여 종양 성장률의 유의한 증가를 나타내지 않았을지라도, 이들 종양은 시험된 2-Tib6/neo 대조군 클론과 비교하여 4-독립적인 안정한 Tib-6/IL-17 클론에서 항-VEGF 치료에 대해 유의하게 더 내성이었다 (도 11). 또한, nu/nu 마우스에서 이러한 기능-획득 데이터는 IL-17 이펙터 기능이 T-세포로부터의 추가의 투입과 상관없이 일어날 수 있다는 것을 나타내고, 이는 IL-17 기능이 단독으로 항-VEGF 치료에 대한 염증유발 네트워크 유도 내성을 매개하는데 필요하며 충분하다는 것을 시사한다.

[0290] **실시예 5 - EL4 종양 보유 마우스에서의 IL-17 신호전달 실험**

[0291] 나이브 및 종양 보유 마우스의 혈청 내의 순환성 시토카인 수준을 실시예 2에 기재된 바와 같이 결정하였다. Bv8 농도를 이전에 기재된 바와 같이 ELISA에 의해 측정하였다 (Shojaei et al. 2009). 이 실험에 사용된 종양 마우스 모델은 실시예 4에 기재된 바와 같다. 도 5a-c는 대조군 항-돼지풀 항체 (Rag, 10mg/kg) 또는 항-VEGF 항체 (B20, 10mg/kg)로 처리된 EL4-보유 WT 및 Il-17rc -/- 마우스 내의 mG-CSF, mBv8 및 mIL-17A의 혈청 수준을 보여준다. 데이터는 평균 ± SD로 나타낸다. 이 데이터는 IL-17 및 G-CSF의 수준이 종양-보유 대 나이브 마우스에서 시토카인 수준의 비교시에 종양의 존재와 연관이 있다는 것을 나타낸다. 둘째, G-CSF 및 혈관신생 유발 인자 Bv8이 둘 다 IL-17RC-/- 숙주에서 나이브 수준으로 돌아갔으므로 이들 인자 둘 다의 수준은 숙주 세포에 대한 IL-17 신호전달에 의존성인 것으로 나타났다. 또한, WT를 IL-17RC-/- 마우스와 비교시에 순환에서 발견되는 IL-17의 수준은 감소되지 않으며, 이는 IL-17 발현이 종양 고유의 것임을 시사한다. 이 실험 데이터는 함께 숙주 기질 세포에 대한 IL-17 신호전달이 종양 보유 마우스에서 염증유발/혈관신생유발 시토카인의 수준을 조절한다는 것을 입증한다.

[0292] 상기 기재된 바와 같은 EL4 종양 보유 마우스를 이용하여, 하기와 같이 WBC를 종양 보유 마우스로부터 단리하고, CD11b+Gr1+ 세포를 마우스 비장으로부터 단리하였다: 단세포 현탁액을 나이브 및 종양 보유 마우스로부터 단리된 비장으로부터 제조하고, CD11b+Gr1+ 집단을 제조업체에 의해 제공된 프로토콜에 따라 세포를 항-Gr-1-PE 접합체에 이어 항-PE 마이크로비드 (밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotech))로 1차 표지함으로써 분류하였다. 품질 대조를 위해, 분류된 세포의 분취액을 항-CD11b 및 항-Gr1로 염색하고, FACS 분석에 의해 분석하여 CD11b+Gr1+ 세포의 순도 (90% 초과)를 보장하였다.

[0293] 유동 세포측정법을 위해 골수 단핵 세포 (BMNC), 말초 혈액 단핵 세포 (PBMNC) 및 종양 세포를 종양이 이식된 마우스로부터 수확하였다. 대조군 및 항-VEGF-처리된 마우스로부터의 종양을 단리하고, 종양을 면도날로 작게 자르고, 기계적 분쇄 및 콜라게나제/디스파제 및 Dnase (로슈(Roche), 스위스 바젤)로의 소화에 의해 성장 배지 중 1mg/ml로 1시간 동안 37℃에서 균질화시켜 단세포 현탁액을 수득하였다. 적혈구는 ACK (론자(Lonza), 스위스 바젤) 용해 완충제를 사용하여 용해시킨 후에 래트 항-마우스 CD11b 및 Gr-1 항체 (BD 바이오사이언스, 캘리포니아주 산호세)로 염색하였다. 사멸 세포를 제외하기 위해, 프로피듐 아이오다이드 (시그마, 미주리주 세인

트 루이스)를 모든 샘플에 첨가한 후에 LSRIIB FACS 기기 (BD 바이오사이언시스) 상에서 데이터를 수득하고, 플루우조 소프트웨어 (트리 스타(Tree Star), 오레곤주 앳슈랜드)를 사용하여 분석하였다.

[0294] 면역-저해 미성숙 골수 세포는 CD11b+/Gr1+ 이중-양성 세포로 규정되고, 종양 확산과 연관된다 (문헌 [Gabrilovich & Nagaraj 2009]에서 검토됨). G-CSF 및 Bv8이 CD11b+Gr1+ 세포를 동원 및 이동시키고 항-VEGF 항체에 대한 종양 내성을 부여하는 것으로 보고되었으므로 (Shojaei et al. 2009), EL4 종양 보유 마우스 내의 상승된 G-CSF 및 Bv8 수준이 마찬가지로 항-VEGF에 대한 내성을 매개하는데 있어 CD11b+Gr1+ 세포의 동원을 담당하는지 여부를 연구하였다. 면역-저해 미성숙 골수 세포는 Gr1+/CD11b+ 이중-양성 세포로서 규정되고 (도 6), 도 7a-c에 나타난 바와 정량화되며, 나이브 마우스와 비교하여 종양 보유 마우스에서의 유동 세포측정 분석에 의해 결정시에 CD11b+Gr1+ 세포의 순환계로의 이동을 입증한다. 또한, CD11b+Gr1+ 이동은 종양-보유 IL-17RC-/- 마우스의 순환계에서 발견되는 CD11b+Gr1+ 세포의 유의한 감소에 의해 나타난 바와 같이 종양 미세환경에 대한 IL-17 신호전달에 의존한다. 이전 연구가 비장 CD11b+Gr1+ 세포가 종양 확산에 기연한다고 제안하였으므로 (Kusmartsev & Gabrilovich 2002), (Bronte et al. 2000), 종양 보우 마우스의 비장을 조사하였고, WT 숙주와 비교하여 IL-17RC-/-에서 비장 CD11b+Gr1+ 세포의 감소가 관찰되었다. 도 7a-c의 유동 세포측정법 결과 정량화는 또한 WT 숙주와 비교하여 보다 적은 CD11b+Gr1+ 세포가 IL-17RC-/- 내의 종양에 동원된다는 것을 입증한다. 이 실험 데이터는 함께 숙주 기질에 대한 IL-17 신호전달이 EL4 종양 보유 마우스에서 CD11b+Gr1+ 면역-저해 미성숙 골수 세포의 이동 및 종양 침윤에 요구될 수 있다는 것을 입증한다.

[0295] **실시예 6 - IL-17은 종양 촉진 기능에 필요할 수 있다**

[0296] 내성 종양 보유 마우스로부터의 비장 CD11b+Gr1+ 세포에 기인한 종양 촉진 표현형을 추가로 조사하고 IL-17 신호전달이 숙주 CD11b+Gr1+ 세포의 표현형을 프라이밍하는데 소정의 역할을 수행하는지 여부에 대한 추가의 이해를 얻기 위해, Gr1+ 세포를 EL4 종양-보유 마우스의 비장으로부터 단리하여, 실시예 5에 기재된 바와 같이 수행하였다. 비장 CD11b+Gr1+ 세포 순도의 검증 후에, 이들 세포를 LPS의 부재 또는 존재 하에 밤새 배양한 다음 혈관신생유발 유전자, 예컨대 Bv8 (도 8a)의 발현을 qRT-PCR에 의해 및 종양 촉진 유전자, 예컨대 S100A8 (도 8b), S100A9 (도 8d) 및 MMP9 (도 8c)의 발현을 qRT-PCR에 의해 분석하였다. WT 종양-보유 마우스의 CD11b+Gr1+ 세포는 IL-17RC-/- 숙주의 비장에서 발견되는 CD11b+Gr1+ 세포와 비교하여 보다 높은 수준의 이러한 하위세트의 종양-촉진 유전자를 발현시켰으며, 이는 IL-17이 숙주 CD11b+Gr1+ 세포의 종양 촉진 표현형을 결정하는 역할을 하는 프라이밍 신호로서 작용할 수 있고, IL-17 신호전달이 숙주 CD11b+Gr1+ 세포의 항-VEGF 내성 표현형에 기여한다는 것을 시시한다.

[0297] 항-VEGF 불응성을 매개하는데 있어 G-CSF에 대한 요구를 시험하기 위해, 항-VEGF 내성 세포주, EL4를 동계 G-CSF 수용체 녹아웃 C57BL/6 수용자 (Csf3r-/-, 이하 GCSFR KO로 지칭됨)에 이식하였고, 여기서 모든 기질 숙주 세포는 G-CSF 신호전달이 결여되어 있었다. G-CSF 신호전달이 EL4 종양의 성장을 변경시키는 것으로 나타나지 않은 반면, 이 신호전달 축이 실제로 항-VEGF 치료에 대한 종양 불응성 뿐만 아니라 골수로부터 CD11b+Gr1+ 세포의 이동 및 종양 미세환경으로의 동원을 매개하는데 필요하다는 것이 관찰되었다 (도 12a-c). 이 데이터는 함께 CD11b+Gr1+의 종양 미세환경으로의 이동 및 동원을 통해 항-VEGF 내성을 매개하는데 있어 IL-17-G-CSF 신호전달 캐스케이드에 대한 필요를 명백하게 입증한다.

[0298] **실시예 7 - 평균 혈관 밀도 측정**

[0299] 대조군 항체 (항-돼지풀) 또는 항-VEGF 항체 (B20)로 처리된, WT 및 IL-17rc KO 동물로부터 유래된 EL4 종양을 하기와 같이 면역염색하였다. 종양 샘플을 옵티멈 컷팅 템퍼러처(Optimum Cutting Temperature) (OCT, 사쿠라 파인텍(Sakura Finetek))에 포매시키고, 드라이-아이스 욕조에서 동결시켰다. 종양 절편을 크라이오스태트 (라이카 마이크로시스템(Leica Microsystem))에서 절단 (10 um)하였다. 절편을 20℃에서 1시간 동안 건조시킨 후에 아세톤에 10분 동안 -20℃에서 고정시켰다. 공기-건조시킨 후에, 2% BSA/PBS (잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch), 펜실베니아주 웨스트 그로브) 중 10% 정상 당나귀 혈청에서 1시간 동안 20℃에서 인큐베이션한 다음 2% BSA/PBS 중 1.5% 정상 혈청에 희석한 항체로 면역-염색하여 비특이적 결합 부위를 차단하였다. 종양 절편을 하기 1차 항체: 래트 항-마우스 CD31 항체 (클론 MEC13.3; BD 파밍겐(BD Pharmingen)) (1:100으로 밤새 4℃에서), 항-토끼 데스민 (클론 GTX15200, 제네텍스(Genetex)) (1:400으로), 및 항-마우스 평활근 액틴 (SMA)-Cy3 접합체 (시그마) (1:400으로 밤새 4℃에서)로 염색한 후에 2차 항체: 항-래트-알렉사-488 접합체 및 항-토끼-알렉사 647 접합체 (인비트로젠) (2시간 동안 20℃에서)로 염색하였다. 슬라이드를 DAPI로 대조 염색하고, 세척하고, DAKO 형광 마운팅 배지 (다코사이토메이션(DakoCytomation))에 마운팅하였다. 면역형광 영상을 자이스 액시오이매이저(Zeiss AxioImager) Z2 업라이트 현미경 (자이스) 및 티슈노스틱스(TissueGnostics)

슬라이드 스캐너 (티슈노스틱스, 오스트리아 비엔나) 상에서 수집하였다. 도 9는 면역염색된 조직을 보여준다.

[0300] 면역염색의 정량화는 세포의 전체 면적 상의 CD31-양성 세포의 평균 면적으로 나타내고, 하기와 같이 수행하였다. 종양 평균 혈관 밀도 (MVD) 측정값을 20x 대물렌즈를 이용하여 CD31 염색된 절편의 티슈노스틱스 슬라이드 스캐너 상에 포획된 디지털 영상으로부터 정량화하였다. 염색된 혈관에 상응하는 픽셀을 데피니언스 티슈 스튜디오(Definiens Tissue Studio) 소프트웨어 (데피니언스, 뉴저지주)를 이용하여 선택하였다. 전체 종양 단면 및 군 당 총 5개의 종양을 분석하였다. 전체 사진 면적 및 총면적에 비한 응집 픽셀 혈관 면적을 % 양성 세포 면적/전체 표면적으로 보고하였다. 도 10은 MVD로 표현된 종양-혈관신생 측정값의 정량화를 보여준다. 내성 종양 내의 MVD는 WT 숙주와 비교하여 IL-17RC-/-에서 유의하게 감소하였으며 ($p<0.05$), 이는 IL-17rc KO 마우스에서 종양 성장의 억제를 수반하는 감소된 MVD가 대조군 및 항-VEGF 처리군 둘 다에서 감소된 MVD를 수반한다는 것을 시사한다. 이러한 데이터는 숙주 미세환경에 대한 I1-17 신호전달이 새로운 혈관 성장을 촉진한다는 것을 나타낸다.

[0301] **실시예 8 - 항-VEGF 반응에 대한 TH17-세포 매개 효과**

[0302] IL-17은 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 TH17 하위세트 (Tc17)에 의해 생산된다. TH17 세포의 침윤이 인간 폐 및 결장직장 암에서의 불량한 예후와 연관되기 때문에, 동계 마우스 폐 및 결장 암 모델에서 항-VEGF 치료에 반응한 종양 침윤 TH17 세포의 효과를 시험하였다.

[0303] 마우스 종양 세포주 CT-26은 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션으로부터 수득하고, RPMI (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드)에서 배양하였다. 배지에 L-글루타민, 10% 태아 소 혈청 (FBS) (시그마, 미주리주 세인트 루이스)을 보충하였다. CT-26을 배양하고, 37℃에서 5% CO2, 80% 습도 인큐베이터에 유지하였다. 100㎕의 성장 인자-감소 매트리겔 (BD 바이오사이언스) 중 CT-26 종양 세포 (2.0×10^6개)를 C57B16.WT 또는 C57B16.*IL-17RC-/-* (KO) 마우스의 배측 옆구리에 피하 접종하였다. 항체를 1주일에 2회 IP 주사하였다. 대조군 항체, 항-돼지풀, 항-VEGF mAb B20-4.1.1 (Liang et al., 2006) 또는 항-IL-17A 또는 항-IL-17F로의 처리를 종양 세포 접종 2일 후에 개시하였다. 모든 종양 성장 실험은 3회 이상 수행하였고, 실험실 동물의 관리 및 사용에 대한 지침에 따라 수행하였다. 종양 부피를 타원체 부피 공식 (0.5xLxW2, 여기서 L은 길이이고, W는 폭임)을 이용하여 격일로 계산하였다.

[0304] 결장직장암 세포주, CT-26에서의 종양 성장의 유의한 감소가 항-IL17 및 항-VEGF 조합 대 항-VEGF 단독으로 처리시에 관찰되었을 뿐만 아니라 항-VEGF 처리 후에 루이스 폐 암종 (LLC)-보유 *I1-17rc-/-* 대 WT 한배자손에서의 종양 부담의 유의한 감소가 관찰되었다 (도 13a 및 b).

[0305] CT-26 종양 세포를 종양이 이식된 마우스로부터 수확하였다. 대조군- 및 항-VEGF-처리된 마우스로부터의 종양을 단리하고, 종양을 면도날로 작게 자르고, 기계적 분쇄 및 콜라게나제/디스파제 및 Dnase (로슈, 스위스 바젤)로의 소화에 의해 성장 배지 중 1mg/ml로 1시간 동안 37℃에서 균질화시켜 단세포 현탁액을 수득하였다. 사멸 세포를 제외하기 위해, 프로피듐 아이오다이드 (시그마, 미주리주 세인트 루이스)를 모든 샘플에 첨가한 후에 LSRIIB FACS 기기 (BD 바이오사시언시스) 상에서 데이터를 수득하고 플로우조(FlowJo) 소프트웨어 (트리스타, 오레곤주 앳슈랜드)를 이용하여 분석하였다 (도 14a-b 및 도 15b). 뮤린 IL-17A 및 G-CSF를 퀀티킨 ELISA 키트 (R&D 시스템스, 미네소타주 미네아폴리스)에 의해 측정하였다. 뮤린 Bv8 수준을 제넨테크에서 개발한 ELISA 검정을 이용하여 측정하였다. (도 15c 및 도 16a 및 c). 종양 침윤 CD11b+Gr1+ 세포의 백분율을 세포 유동측정법에 의해 결정하였다. (도 16b).

[0306] TIL 분석을 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다. LLC 종양 침윤 CD3+ T-세포의 수준이 WT 및 KO 숙주 사이에서 상이하지 않다는 것이 관찰되었다 (각각 생존 종양 세포의 1.24% ±0.18% 및 1.28% ±0.22%). 그러나, 항-혈관신생 요법이 종양 림프구 침윤 30-32를 증가시킬 수 있다는 것을 나타내는 최근의 보고와 일치하게, 항-VEGF 처리가 CD8+ T 세포보다 10배 더 많은 CD4+가 존재하였을지라도 종양 침윤 CD4+ 및 CD8+ 둘 다의 수를 증가시키는 것이 관찰되었다 (도 15a-c). 그리고 이들 성숙 T-세포 하위집단은 둘 다 IL-17을 발현하는 것으로 알려진 반면, IL-17 발현은 LLC 종양에서 CD4+ 세포에 의해 제한되었다 (도 14a-b 및 도 15a-c). 모든 IL-17+CD4+ 세포는 또한 성숙 및 최종 분화된 TH17 세포에 대한 특징적 시토카인인 IL-22를 발현하였다 (도 14a-b). LLC 종양에서 IL17+IL-22+CD4+ 집단의 증가가 항-VEGF 처리시에 관찰되었다. 이들 TIL의 유병률은 종양 미세환경에서 IL-17 및 G-CSF 수준 둘 다의 증가 뿐만 아니라 CD11b+Gr1+ 골수 세포의 동원 및 혈관신생유발 인자, Bv8의 종양내 수준의 증가와 일치하였다 (도 16c). 그러나 TH17 종양 침윤의 하류 효과는 단지 WT 종양-보유 숙주에서 무손상 IL-17 신호전달의 존재 하에서만 관찰되었다 (도 16a-c).

[0307] 최근 연구는 이들 연구의 대부분이 재조합 IL-17 단백질 또는 IL-17 유전자의 종양으로의 레트로바이러스 형질도입을 이용하여 수행되었을지라도 IL-17이 종양 혈관신생을 촉진하는데 소정의 역할을 수행한다고 제안하였다 (문헌 [Tartour, E. et al. Interleukin 17, a T-cell-derived cytokine, promotes tumorigenicity of human cervical tumors in nude mice. Cancer Res 59, 3698-704 (1999); Numasaki, M. et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. Blood 101, 2620-7 (2003)]). 동계 LLC 종양 모델에서 종양 혈관계 촉진에 대한 내인성 종양-침윤 TH17 세포의 효과를 조사하였다. 이를 위해, WT와 비교하여 IL-17RC KO 숙주에서 항-VEGF 처리에 의한 종양 연관 내피 세포의 증진된 고갈이 관찰되었으며, 이는 TH17 세포가 VEGF 차단에도 불구하고 지속적인 혈관신생을 유사하게 촉진할 수 있다는 것을 나타낸다 (도 16a-c). 이러한 데이터는 함께 항-VEGF 요법에 대한 내성을 추가로 매개하기 위해 염증유발 시토카인 G-CSF의 발현 및 혈관신생유발 CD11b+Gr1+ 세포의 동원을 매개하는데 있어 숙주 미세환경 내의 종양 침윤 TH17 세포 및 IL-17 신호전달에 대한 필요에 대한 증거를 제공한다.

[0308] Bronte V, Apolloni E, Cabrelle A, Ronca R, Serafini P, et al. 2000. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. Blood 96: 3838-46.

[0309] Gabrilovich DI, Nagaraj S. 2009. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol 9: 162-74.

[0310] Kusmartsev S, Gabrilovich DI. 2002. Immature myeloid cells and cancer-associated immune suppression. Cancer Immunol Immunother 51: 293-8.

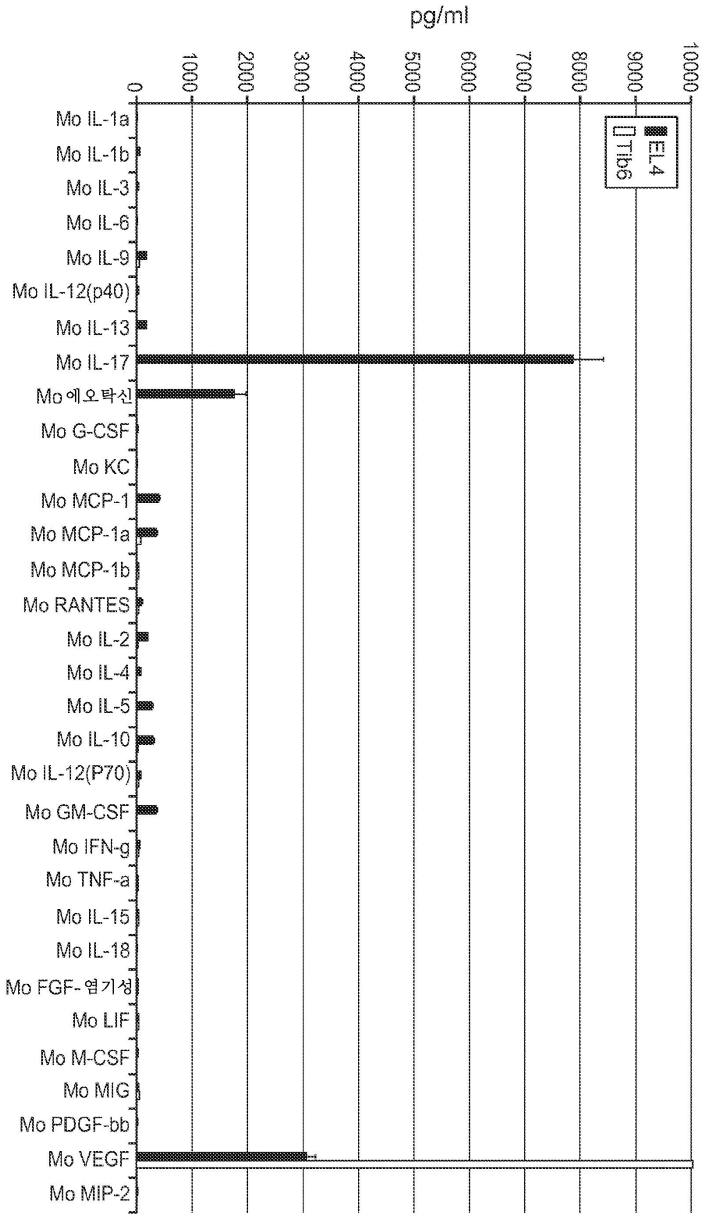
[0311] Shojaei F, Wu X, Qu X, Kowanetz M, Yu L, et al. 2009. G-CSF-initiated myeloid cell mobilization and angiogenesis mediate tumor refractoriness to anti-VEGF therapy in mouse models. Proc Natl Acad Sci USA 106: 6742-7.

[0312] 명세서 전반에 걸쳐 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 명확하게 본원에 포함된다. 본 발명이 구체적 실시양태로 간주되는 것을 참조로 기재되었지만, 본 발명이 이러한 실시양태로 제한되지는 않는 것으로 이해되어야 한다. 이와 반대로, 본 발명은 하기 특허청구범위의 취지 및 범위 내에 포함되는 다양한 변형 및 등가물을 포함하는 것으로 의도된다.

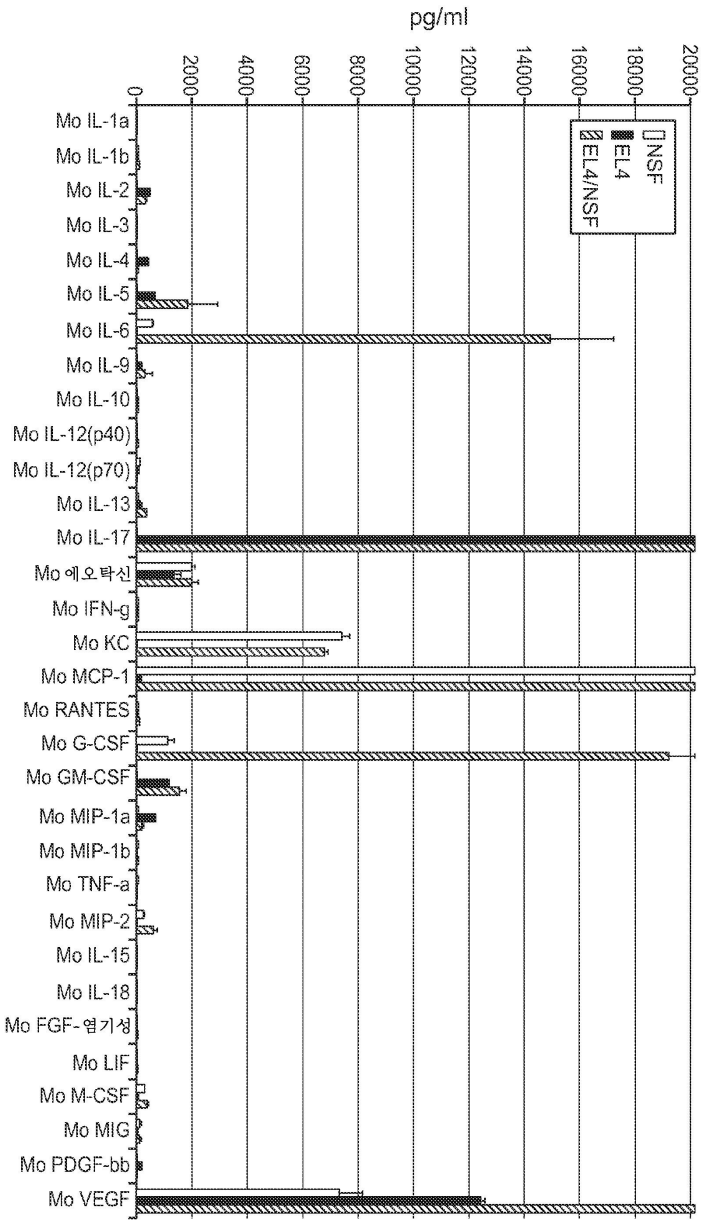
[0313] 특허청구범위를 포함한 본원 전반에 걸쳐, 용어 "포함하는"은 포괄적이고, 제약을 두지 않은 번역 문구로서 사용되며, 이는 부가의 언급되지 않은 요소 또는 방법 단계를 배제하는 것은 아니다.

도면

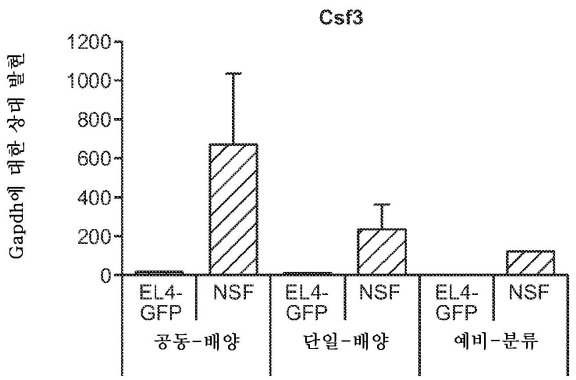
도면1a


pg/ml
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000
8000
9000
10000
EL4
Tib6
Mo IL-1a
Mo IL-1b
Mo IL-3
Mo IL-6
Mo IL-9
Mo IL-12(p40)
Mo IL-13
Mo IL-17
Mo 에오탁신
Mo G-CSF
Mo KC
Mo MCP-1
Mo MCP-1a
Mo MCP-1b
Mo RANTES
Mo IL-2
Mo IL-4
Mo IL-5
Mo IL-10
Mo IL-12(P70)
Mo GM-CSF
Mo IFN-g
Mo TNF-a
Mo IL-15
Mo IL-18
Mo FGF-염기성
Mo LIF
Mo M-CSF
Mo MIG
Mo PDGF-bb
Mo VEGF
Mo MIP-2

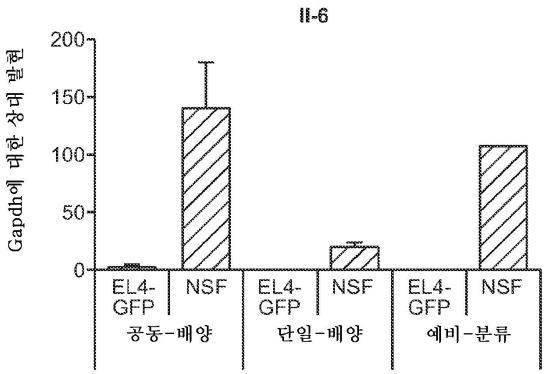
도면1b


pg/ml
0
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000
20000
NSF
EL4
EL4/NSF
Mo IL-1a
Mo IL-1b
Mo IL-2
Mo IL-3
Mo IL-4
Mo IL-5
Mo IL-6
Mo IL-9
Mo IL-10
Mo IL-12(p40)
Mo IL-12(p70)
Mo IL-13
Mo IL-17
Mo 에오탁신
Mo IFN-g
Mo KC
Mo MCP-1
Mo RANTES
Mo G-CSF
Mo GM-CSF
Mo MIP-1a
Mo MIP-1b
Mo TNF-a
Mo MIP-2
Mo IL-15
Mo IL-18
Mo FGF-염기성
Mo LIF
Mo M-CSF
Mo MIG
Mo PDGF-bb
Mo VEGF

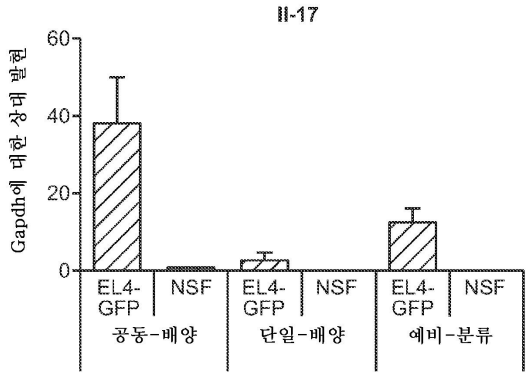
도면2a


Csf3
Gapdh에 대한 상대 발현
1200
1000
800
600
400
200
0
EL4-GFP
NSF
EL4-GFP
NSF
EL4-GFP
NSF
공동-배양
단일-배양
예비-분류

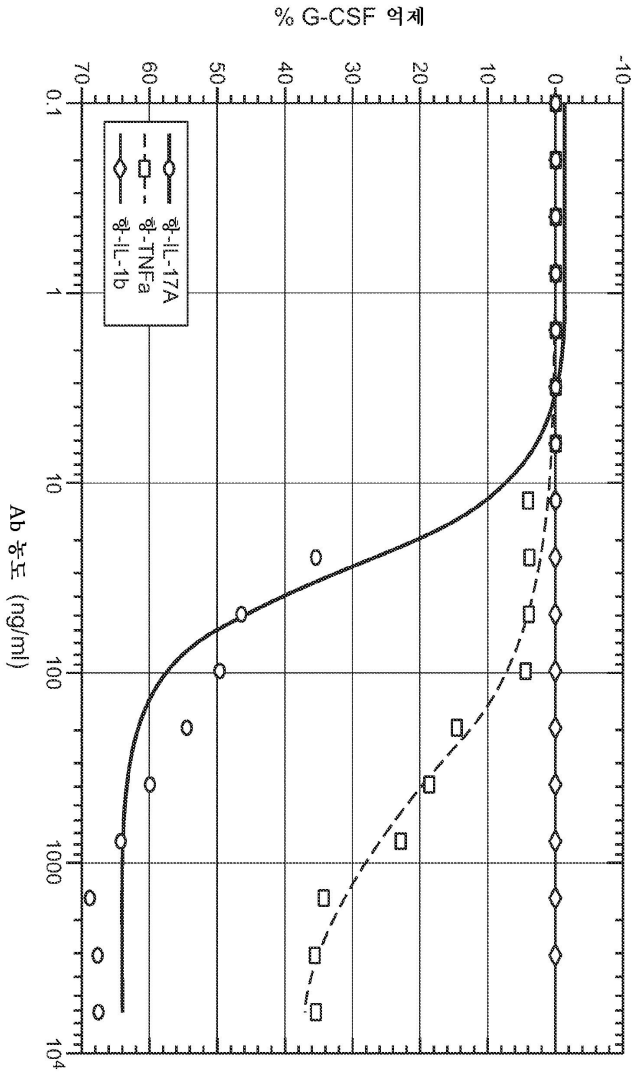
도면2b


Il-6
Gapdh에 대한 상대 발현
200
150
100
50
0
EL4-GFP
NSF
EL4-GFP
NSF
EL4-GFP
NSF
공동-배양
단일-배양
예비-분류

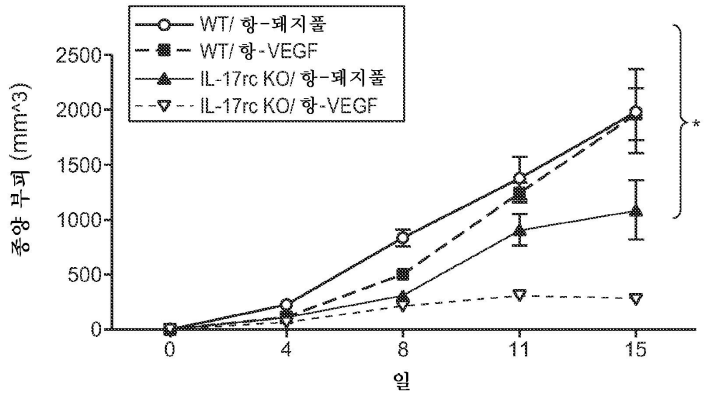
도면2c


Il-17
Gapdh에 대한 상대 발현
60
40
20
0
EL4-GFP
NSF
EL4-GFP
NSF
EL4-GFP
NSF
공동-배양
단일-배양
예비-분류

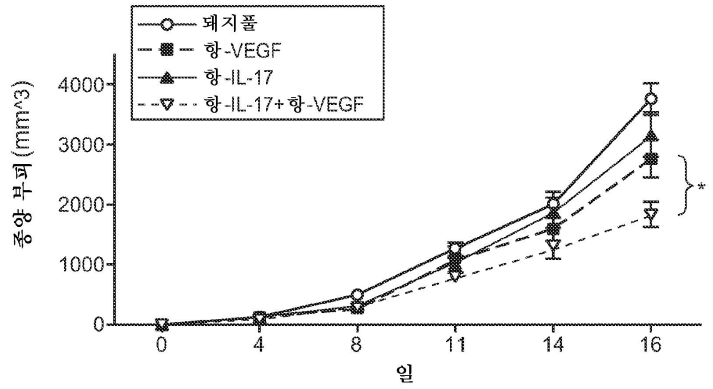
도면3


% G-CSF 억제
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
0.1
1
10
100
1000
10^4
Ab 농도 (ng/ml)
항-IL-17A
항-TNFa
항-IL-1b

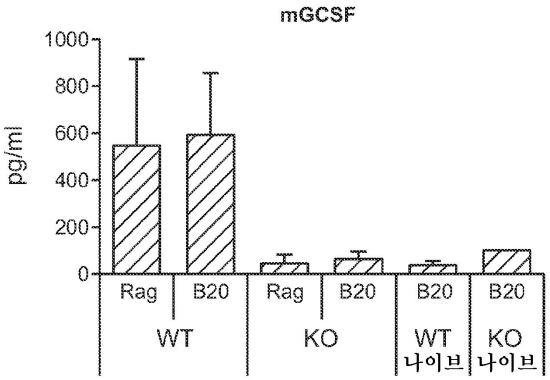
도면4a


WT/ 항-돼지폴
WT/ 항-VEGF
IL-17rc KO/ 항-돼지폴
IL-17rc KO/ 항-VEGF
종양 부피 (mm^3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
4
8
11
15
일
*

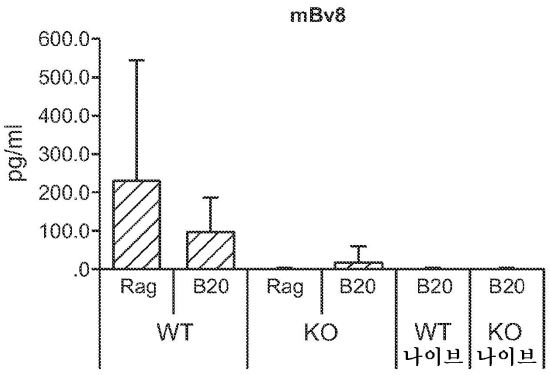
도면4b



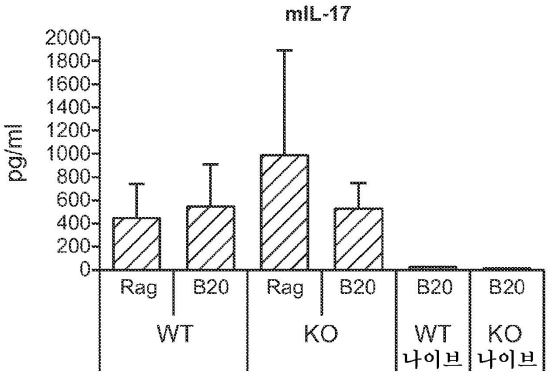
도면5a



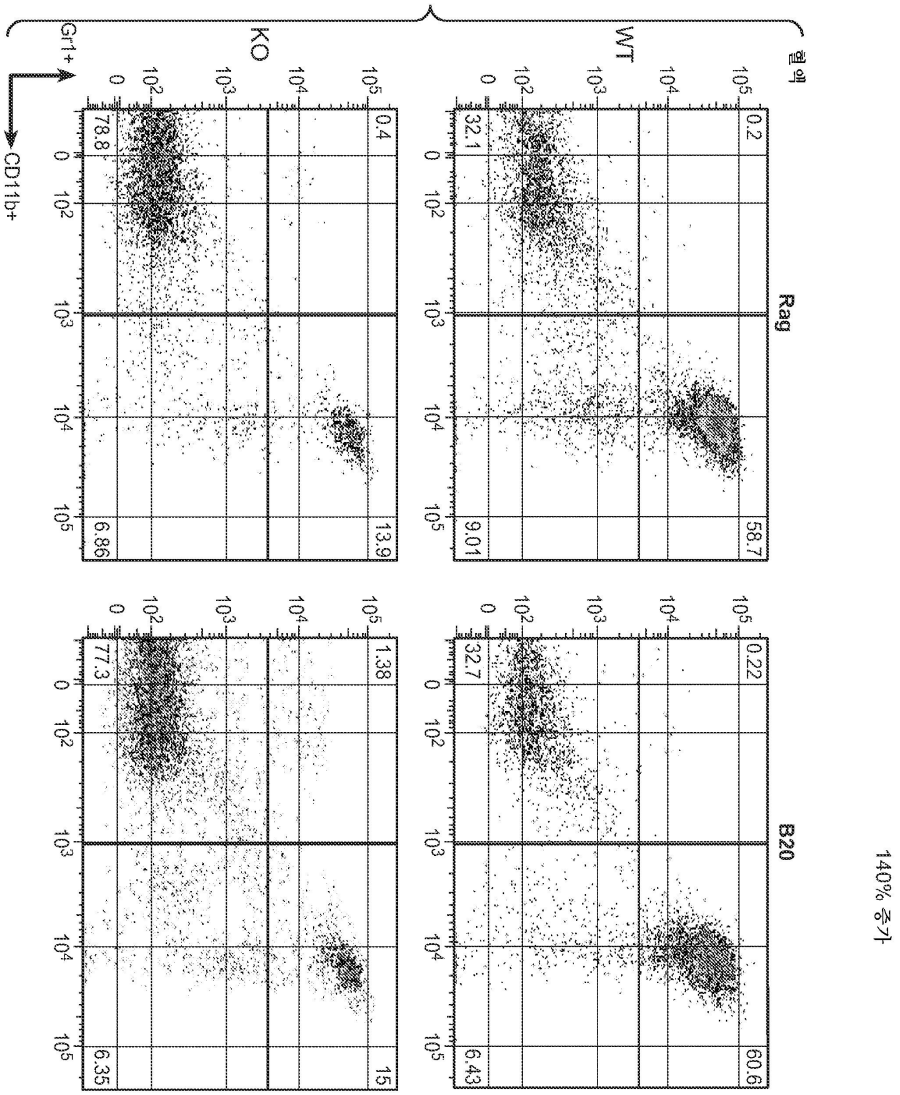
도면5b



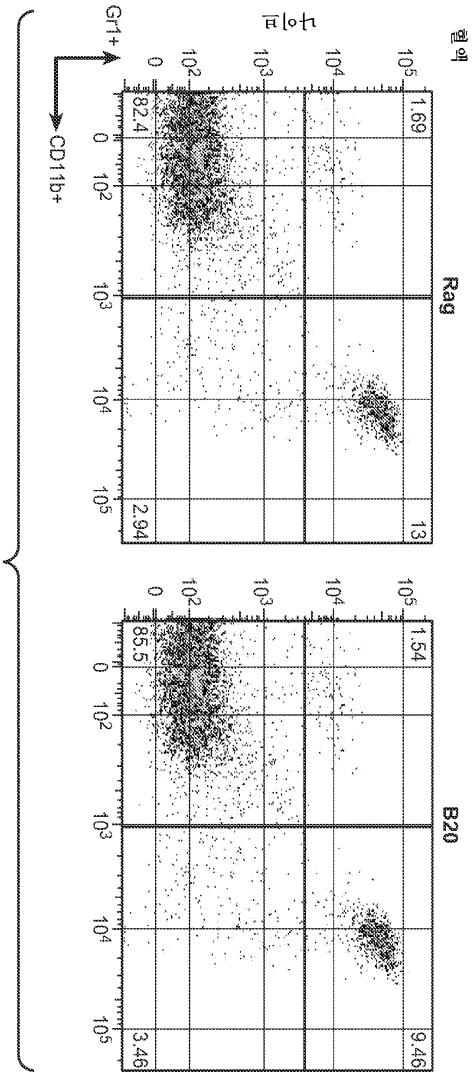
도면5c


mIL-17
pg/ml
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
Rag
B20
Rag
B20
B20
B20
WT
KO
WT
나이브
KO
나이브

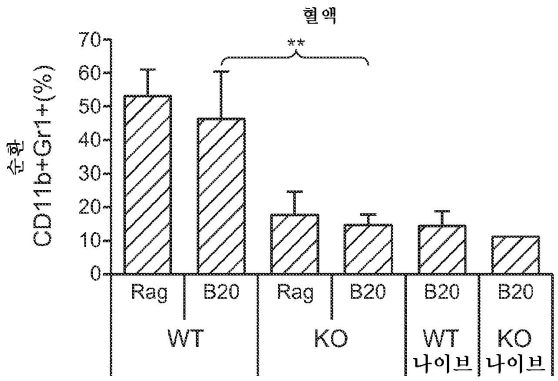
도면6a


혈액
WT
KO
Gr1+
CD11b+
Rag
B20
78.8
0.4
6.86
13.9
32.1
0.2
9.01
58.7
77.3
1.38
6.35
15
32.7
0.22
6.43
60.6
140% 증가

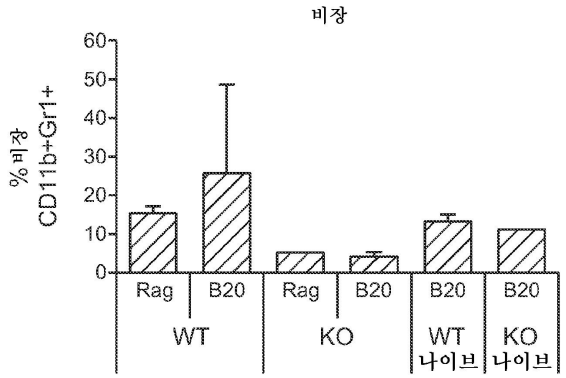
도면6b


혈액
Gr1+
CD11b+
0
10^2
10^3
10^4
10^5
82.4
1.69
2.94
13
Rag
85.5
1.54
3.46
9.46
B20

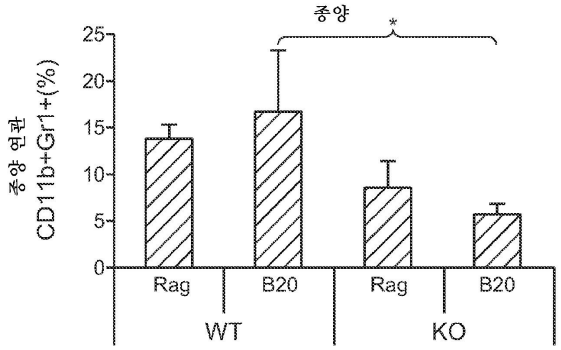
도면7a


혈액
**
순환 CD11b+Gr1+(%)
70
60
50
40
30
20
10
0
Rag
B20
Rag
B20
B20
B20
WT
KO
WT 나이브
KO 나이브

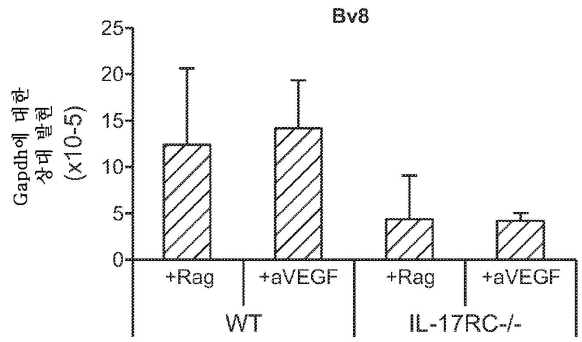
도면7b



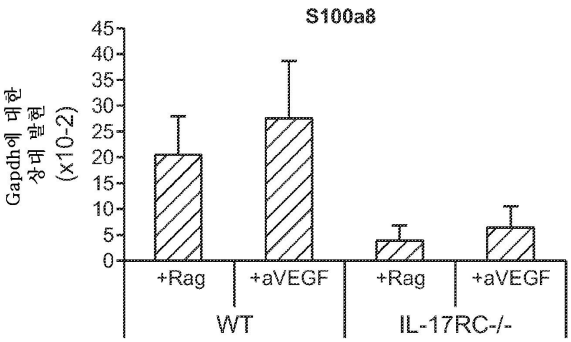
도면7c



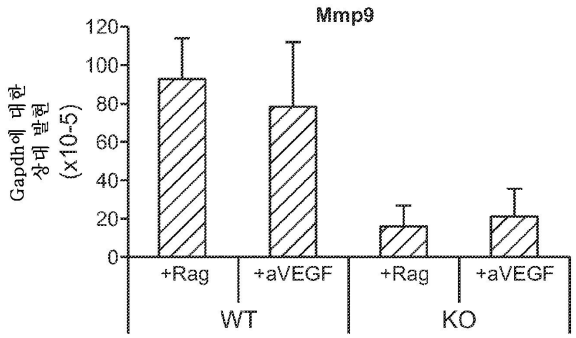
도면8a



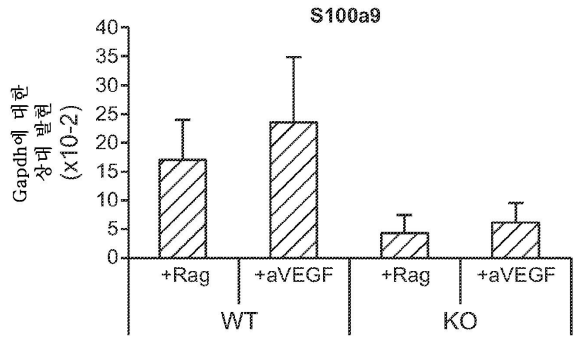
도면8b



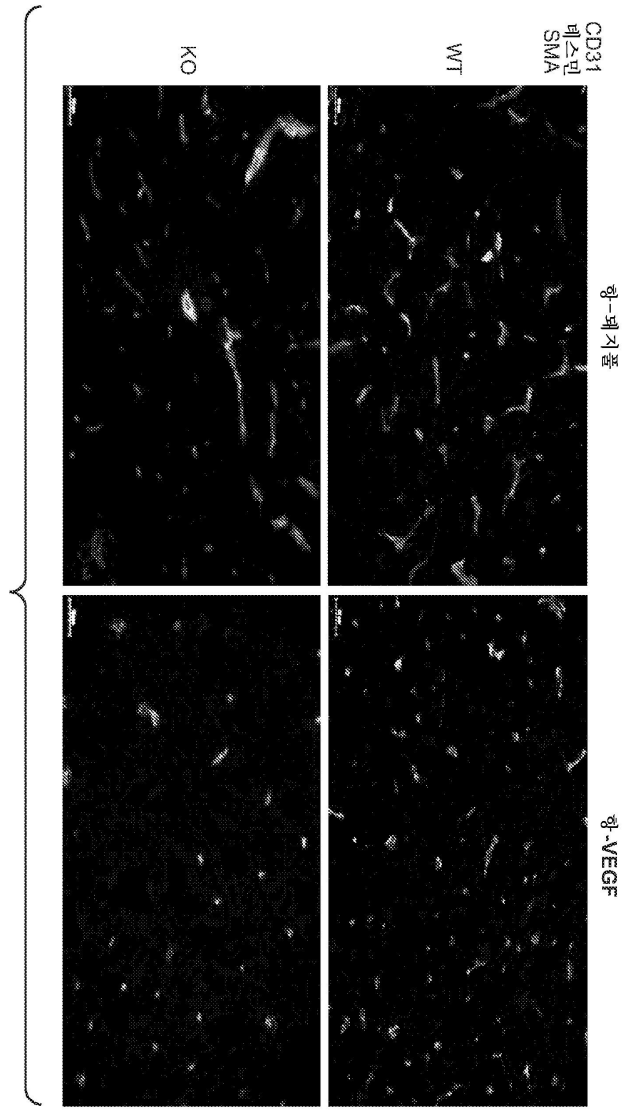
도면8c


Mmp9
Gapdh에 대한 상대 발현 (x10-5)
120
100
80
60
40
20
0
+Rag
+aVEGF
+Rag
+aVEGF
WT
KO

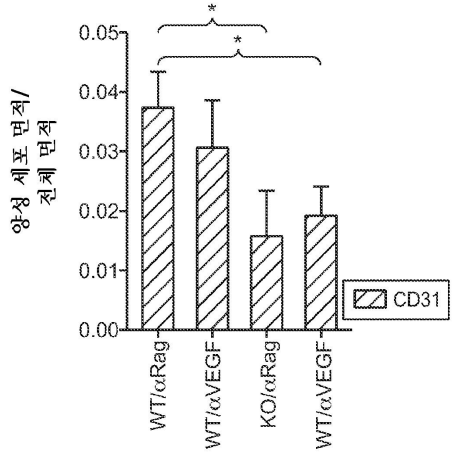
도면8d


S100a9
Gapdh에 대한 상대 발현 (x10-2)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
+Rag
+aVEGF
+Rag
+aVEGF
WT
KO

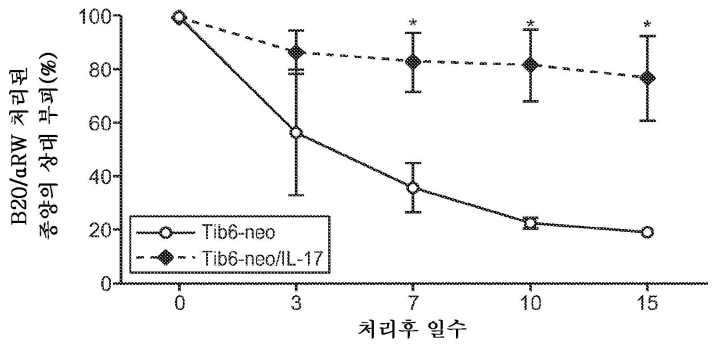
도면9


KO
WT
CD31
메스핀
SMA
항-혈청
항-VEGF

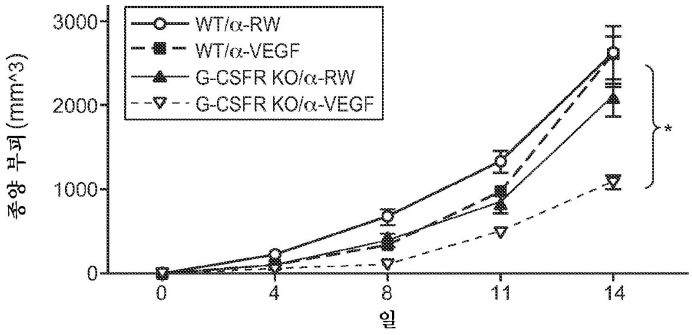
도면10


양성 세포 면적/
전체 면적
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
*
*
CD31
WT/αRag
WT/αVEGF
KO/αRag
WT/αVEGF

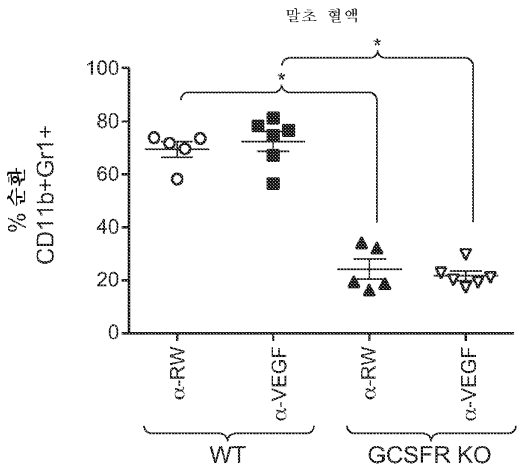
도면11



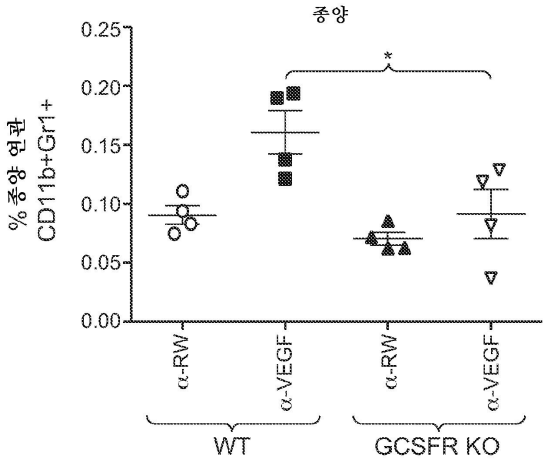
도면12a



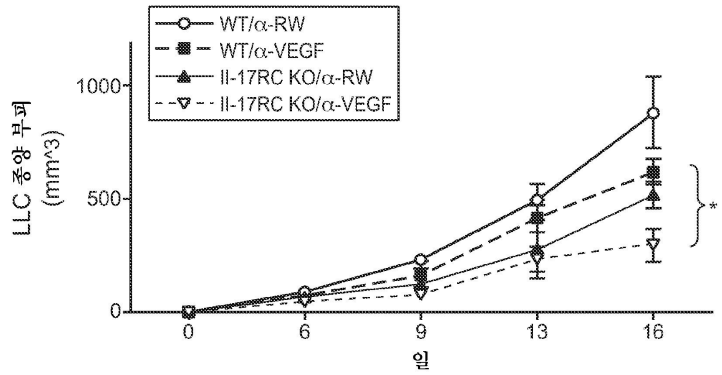
도면12b



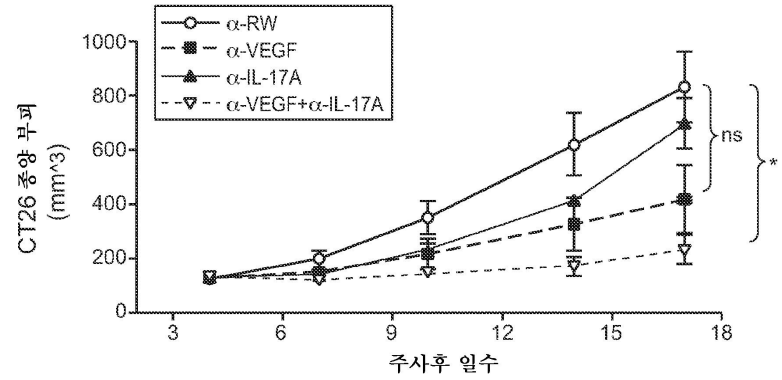
도면12c



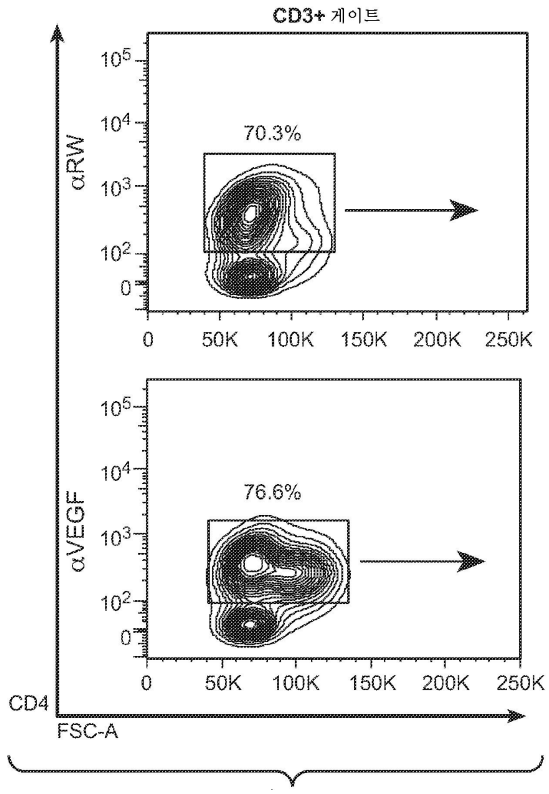
도면13a



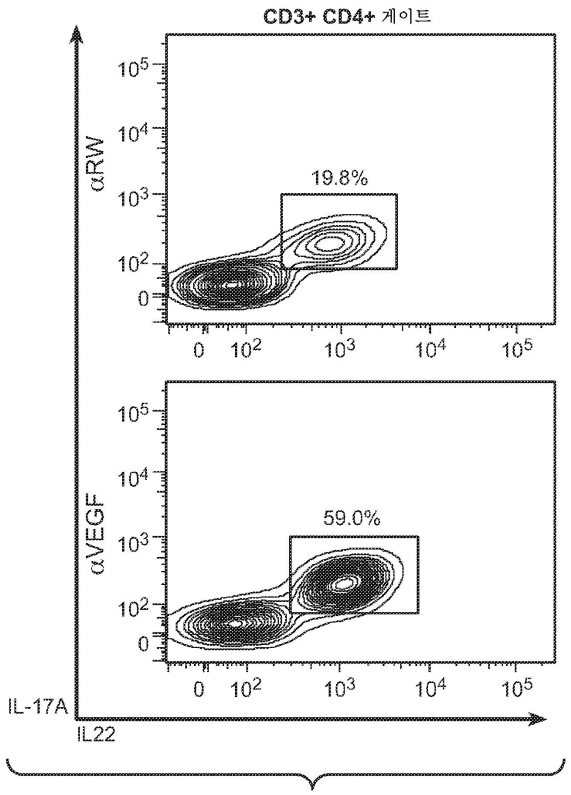
도면13b



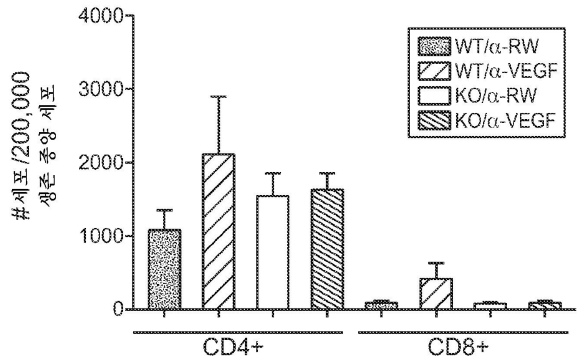
도면14a


CD3+ 게이트
αRW
70.3%
αVEGF
76.6%
CD4
FSC-A
0
50K
100K
150K
200K
250K

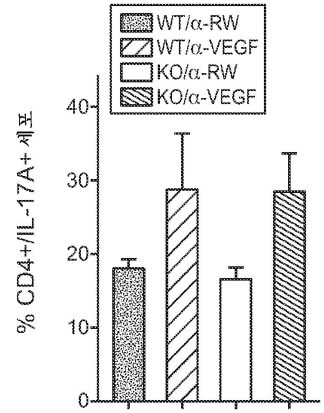
도면14b


CD3+ CD4+ 게이트
αRW
19.8%
αVEGF
59.0%
IL-17A
IL22

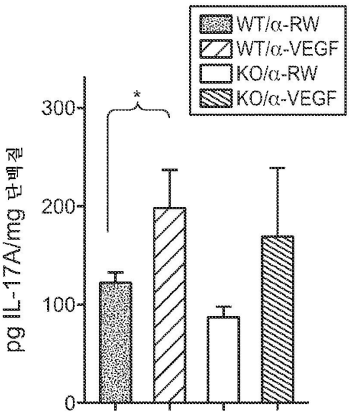
도면15a



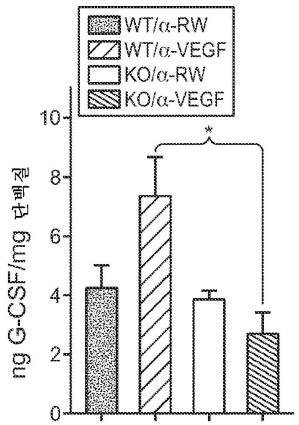
도면15b



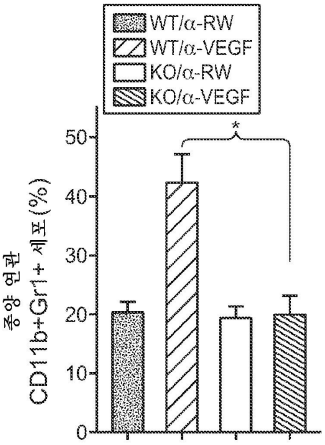
도면15c



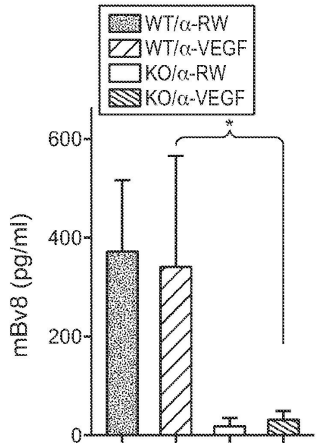
도면16a



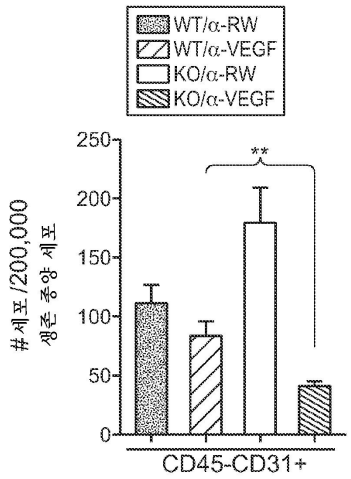
도면16b



도면16c



도면17



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Genentech, Inc. et al.

<120> Inhibition of Angiogenesis in Refractory Tumors

<130> P4729R1-WO

<141> 2012-08-16

<150> US 61/524,670

<151> 2011-08-17

<160> 8

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> humanized antibody variable heavy chain

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr
50 55 60

Ala Ala Asp Phe Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser
65 70 75
Lys Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser
95 100 105
Ser His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
110 115 120
Val Ser Ser

<210> 2
<211> 108
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> humanized antibody variable light chain
<400> 2
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

80 85 90
Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105
Ile Lys Arg

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn

5 10

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

1 5 10 15

Lys Arg

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 5

Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Phe Thr Ser Ser Leu His Ser

5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp Thr

5