



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년10월22일
(11) 등록번호 10-1320261
(24) 등록일자 2013년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/22 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-7023542
(22) 출원일자(국제) 2006년04월13일
심사청구일자 2011년03월30일
(85) 번역문제출일자 2007년10월12일
(65) 공개번호 10-2008-0003344
(43) 공개일자 2008년01월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2006/014008
(87) 국제공개번호 WO 2006/113402
국제공개일자 2006년10월26일
(30) 우선권주장
11/105,876 2005년04월14일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
W02004003158 A2
W02001053486 A1
W01999021998 A1
전체 청구항 수 : 총 8 항

(73) 특허권자
제넨테크, 인크.
미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
(72) 발명자
데스노이어스, 루크
미국 94133 캘리포니아주 샌프란시스코 스타턴 스
트리트 2050
필바로프, 엘렌
미국 94121 캘리포니아주 샌프란시스코 18쓰 애비
뉴 538
(74) 대리인
위혜숙, 양영준

심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 W I S P 활성의 조절 및 검출을 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

WISP-1 폴리펩티드의 활성(들)의 조절에 사용하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. WISP-1 길항제는 하나 이상
의 종류의 포유동물 세포에서 천연 인간 WISP-1 폴리펩티드에 의한 HAS2, HA, CD44 또는 RHAMM의 유도 또는 분비
를 억제하거나 중화시키는 항-WISP-1 항체, WISP-1 이뮤노어드헤신 및 WISP-1 변이체 (및 그의 융합 단백질)를
포함한다. 본 발명은 또한 천연 WISP-1 폴리펩티드와 관련된 포유동물 세포 또는 병리학적 상태의 시험관내, 동
일계내 및/또는 생체내 진단 및/또는 치료 방법을 제공한다.

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

WISP-1-도메인 1 폴리펩티드를 포함하며, 상기 WISP-1-도메인 1 폴리펩티드가

- a) 서열 1의 아미노산 24 내지 117로 이루어진 WISP-1-도메인 1 폴리펩티드; 및
- b) 서열 1의 아미노산 24 내지 117에 대해 95% 이상의 동일성을 갖는 폴리펩티드로 이루어진 WISP-1-도메인 1 폴리펩티드

로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드로 이루어진 것인, 포유동물에서 암을 치료하기 위한 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 WISP-1-도메인 1 폴리펩티드가 이뮤노글로불린의 Fc 영역에 융합된 것인 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 암이 췌장암, 결장암 또는 결장직장암, 유방암, 폐암, 또는 뇌암인 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 암이 췌장 선암종 또는 결장 선암종인 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 암 세포 성장 또는 전이를 억제하거나 감소시키는 것인 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 포유동물의 일차 폐 종양 부위로부터 이차적이거나 상이한 포유동물의 부위에서 폐암 세포 전이를 억제하거나 감소시키는 것인 조성물.

청구항 12

제6항에 있어서, 화학요법, 방사선, 프로드러그, 세포독성제, 성장 억제제 또는 사이토킨과 함께 상기 포유동물에게 투여되는 것인 조성물.

청구항 13

제6항에 있어서, 상기 폴리펩티드가 하나 이상의 종류의 포유동물 세포에서 천연 인간 WISP-1 폴리펩티드에 의한 HAS2, HA, CD44 또는 RHAMM의 유도 또는 분비를 억제하거나 중화시키는 것인 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 일반적으로 WISP 폴리펩티드, 특히 WISP-1 폴리펩티드의 활성(들)의 조절에 사용하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 또한 WISP-1 폴리펩티드와 관련된 포유동물 세포 또는 병리학적 상태의 시험 관내, 동일계내 및/또는 생체내 진단 및/또는 치료를 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 결합 조직 성장 인자 (CTGF)는 TGF- β 를 비롯한 많은 인자에 의해 섬유모세포에서 유도된 성장 인자이며, 형질 전환된 세포의 특성인 부착-비의존성 성장 (AIG)를 유도하는 TGF- β 의 능력에 필수적이다. CTGF는 또한 세포에 대해 분열촉진성 및 화학주성이며, 따라서 상피 조직 내의 성장 인자는 인간 조직의 정상적인 발생, 성장, 및 복구에 있어서 역할을 한다고 믿어진다. Cyr61, Nov, WISP-1, WISP2 및 WISP-3을 비롯한 CTGF와 관련된 5가지 단백질이 단리되고, 클로닝되고, 시퀀싱되고, CCN 유전자 족에 속하는 것으로 특성화되었다 (문헌 [Oemar and Luescher, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol., 17:1483-1489 (1997)]; [Brigstock, Endocrine Rev., 20:189-206 (1999)]). Cyr61을 코딩하는 유전자는 혈관신생, 종양 성장 및 혈관화를 촉진하는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Babic et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:6355-6360 (1998)]). nov 유전자는 본질적으로 배아 단계에서 신장에서 발현되며, 정상적인 신장에 비해 nov 발현의 변경은 조류 신장모세포종 및 인간 윌름스 종양 둘다에서 검출되었다 (문헌 [Martinerie et al., Oncogene, 9:2729-2732 (1994)]). Wt1은 인간 nov 발현을 하향조절하며, 하향조절은 정상 및 종양성 신장발생에서 중요한 요소를 나타낼 수 있다 (문헌 [Martinerie et al., Oncogene, 12:1479-1492 (1996)]).

[0003] CCN 족의 여러가지 구성원은 특정 황산화 글리코컨쥬게이트에서 다양한 가용성 또는 매트릭스 관련된 거대분자와 상호작용한다 (문헌 [Bork, FEBS Letters, 327:125-130]). 상피 상호작용은 헤파린-아가로스 상의 친화도 크로마토그래피에 의해 Cyr61 및 CTGF를 정제하는데 사용되었다 (문헌 [Frazier et al., J. Invest. Dermatol., 107:404-411 (1996)]; [Kireeva et al., Mol. Cell. Biol., 16:1326-1334 (1996)]). Cyr61은 그의 헤파린 술페이트에 대한 친화성으로 인해 세포의 매트릭스 및 세포 표면 둘다에서 분비되며 관련된다 (문헌 [Yang et al., Cell. Growth Diff., 2:351-357 (1991)]). 최근에, WISP-1은 2가지 분비된 더마탄 술페이트 프로테오글리칸인 데코린 및 비글리칸과 상호작용하는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Desnoyers, et al., J. Biol. Chem., 276:47599-47607 (2001)]).

[0004] 뮤린 단백질 ELM1은 저 전이성 세포에서 최근에 확인되었다 (문헌 [Hashimoto et al., J. Exp. Med., 187:289-296 (1998)]). 하기 개시된 WISP-1의 마우스 상동유전자인 elm1 유전자는 CNN 유전자 족의 또다른 구성원이다. 이는 K-1735 뮤린 흑색종 세포의 생체내 종양 성장 및 전이를 억제한다. 하기 기재된 WISP-2의 래트 상동유전자인 rCop-1에 대한 또다른 최근의 논문에는 세포 형질전환 후 상피 유전자의 발현의 소실이 기재되어 있다 (문헌 [Zhang et al., Mol. Cell. Biol., 18:6131-6141 (1998)]).

[0005] Wnt는 그의 구성원이 선충, 곤충, 연골 어류 및 척추동물에서 발견된 큰 유전자 족에 의해 코딩된다 (문헌 [Holland et al., Dev. Suppl., 125-133 (1994)]). Wnt는 많은 다양한 종이 다수의 보존된 Wnt 유전자를 갖기 때문에 다양한 발생학적 및 생리학적 프로세스에서 기능하는 것으로 여겨진다 (문헌 [McMahon, Trends Genet., 8:236-242 (1992)]; [Nusse and Varmus, Cell, 69:1073-1087 (1992)]). Wnt 유전자는 몇몇 원시 세포 종류에서 활성인 측분비 또는 자가분비 신호로서 기능하는 것으로 여겨지는 분비된 당단백질을 코딩한다 (McMahon, 상기 문헌 (1992)]; [Nusse and Varmus, 상기 문헌 (1992)]). Wnt 성장 인자 족은 cDNA 클로닝에 의해 마우스에서 확인된 10가지 초과 유전자 (Wnt-1, -2, -3A, -3B, -4, -5A, -5B, -6, -7A, -7B, -8A, -8B, -10B, -11, -12 및 -13) (예를 들어, 문헌 [Gavin et al., Genes Dev., 4:2319-2332 (1990)]; [Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:2268-2272 (1995)]; [Christiansen et al., Mech. Dev., 51:341-350 (1995)] 참조), 및 인간에서 확인된 9가지 이상의 유전자 (Wnt-1, -2, -3, -5A, -7A, -7B, -8B, -10B 및 -11) (예를 들어, 문헌 [Vant Veer et al., Mol. Cell. Biol., 4:2532-2534 (1984)] 참조)를 포함한다.

[0006] Wnt-1 원종양유전자 (int-1)는 최초로 바이러스 DNA 서열의 삽입으로 인한 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV)에

의해 유도된 유방 종양으로부터 확인되었다 (문헌 [Nusse and Varmus, Cell, 31:99-109 (1982)]). 성체 마우스에서, Wnt-1 mRNA의 발현 수준은 정자 발생의 후기 단계 동안 고환에서만 검출된다. Wnt-1 단백질은 약 42 KDa이며, 분비를 위한 신호 서열로서 기능할 수 있는 아미노-말단 소수성 영역을 함유한다 ([Nusse and Varmus, 상기 문헌, 1992]). Wnt-2의 발현은 마우스 태아 및 성체 조직에서 검출되며, 그의 분포는 Wnt-1에 대한 발현 패턴과 중첩되지 않는다. Wnt-3은 마우스 유방 종양발생과 관련된다. 마우스 배아에서 Wnt-3의 발현은 신경관 및 다리쪽에서 검출된다. Ptot-5a 전사체는 9.5 내지 14.5일에 발생하는 앞다리 및 뒷다리에서 검출되며, 가장 높은 수준은 다리의 원위 말단에서 꼭대기 외배엽에 집중되어 있다 ([Nusse and Varmus, 상기 문헌 (1992)]). 최근에, Wnt-x로 지칭되는 Wnt 성장 인자가 골 조직 및 골-유래된 세포에서 Wnt-x 발현의 검출과 함께 기재되었다 (W095/17416). 또한, 성숙 골모세포의 유지에 있어서 Wnt-x의 역할, 및 치료제로서 또는 골-관련된 질환을 치료하는 다른 치료제의 개발에서 Wnt-x 성장 인자의 용도가 기재되었다.

[0007] Wnt는 국소 세포 신호전달에 있어서 역할을 할 수 있다 (문헌 [Peifer and Polakis, Science, 287:1606-1609 (2000)]). 생화학적 연구는 많은 분비된 Wnt 단백질이 매질에서 자유롭게 확산가능하기보다는 세포 표면 또는 세포의 매트릭스와 관련되어 발견될 수 있음을 밝혀내었다 (문헌 [Papkoff and Schryver, Mol. Cell. Biol., 10:2723-2730 (1990)]; [Bradley and Brown, BMB0 J., 9:1569-1575 (1990)]).

[0008] Wnt 유전자에서 돌연변이의 연구는 성장 제어 및 조직 패턴에서 Wnt의 역할을 지시하였다. 초파리에서, 날개 없음 (wg)은 Wnt-관련된 유전자를 코딩하며 (문헌 [Rijsewik et al., Cell, 50:649-657 (1987)]), wg 돌연변이는 배아 외배엽의 패턴, 신경발생, 및 성충 디스크 생성을 변경시킨다 (문헌 [Morata and Lawrence, Dev. Biol., 56:227-240 (1977)]; [Baker, Dev. Biol., 125:96-108 (1988)]; [Klingensmith and Nusse, Dev. Biol., 166:396-414 (1994)]). 캐노르하브디티스 엘레강스 (Caenorhabditis elegans)에서, lin-44는 비대칭 세포 분열에 필요한 Wnt 동족체를 코딩한다 (문헌 [Herman and Horvitz, Development, 120:1035-1047 (1994)]). 마우스에서의 턱아웃 돌연변이는 Wnt가 뇌 발생 (문헌 [McMahon and Bradley, Cell, 62:1073-1085 (1990)]; [Thomas and Cappechi, Nature, 346:847-850 (1990)]), 및 신장에 대한 원시 배아의 생성 (문헌 [Stark et al., Nature, 372:679-683 (1994)]), 꼬리쪽 (문헌 [Takada et al., Genes Dev., 8:174-189 (1994)]), 및 다리쪽 (문헌 [Parr and McMahon, Nature, 374:350-353 (1995)])에 필수적임을 나타내었다. 유선에서 Wnt-1의 과발현은 유방 과다형성 ([McMahon, 상기 문헌 (1992)]; [Nusse and Varmus, 상기 문헌 (1992)]), 조속 폐포 발생 (문헌 [Bradbury et al., Dev. Biol., 170:553-563 (1995)]), 및 유선 암종 (문헌 [Li et al., Oncogene, 19:1002-1009 (2000)])을 초래할 수 있다.

[0009] Wnt-5a 및 Wnfc-5b는 7 내지 8일령 마우스 배아의 후방 및 외측 중배엽 및 체외 중배엽에서 발현된다 ([Gavin et al., 상기 문헌 (1990)]). 상기 배아 도메인은 AGM 영역, 및 다능성 조혈 전구체 및 HSC가 유래되는 난황낭에 기여한다 (문헌 [Dzierzak and Medvinsky, Trends Genet., 11:359-366 (1995)]; [Zon et al., in Gluckman and Coulombel, ed., Colloque, INSERM, 235:17-22 (1995)], [Joint International Workshop on Foetal and Neonatal Hematopoiesis and Mechanism of Bone Marrow Failure, Paris France, April 3-6, 1995]; [Kanatsu and Nishikawa, Development, 122:823-830 (1996)]에 제시됨). Wnt-5a, Wnt-10b, 및 다른 Wnt는 다리쪽에서 검출되었으며, 이는 Ptot-7b에 대해 나타난 바와 같은 초기 골 미세환경의 발생 및 패턴화에서 가능한 역할을 나타낸다 ([Gavin et al., 상기 문헌 (1990)]; [Christiansen et al., Mech. Devel., 51:341-350 (1995)]; [Parr and McMahon, 상기 문헌 (1995)]).

[0010] Wnt에 대한 검토를 위해, 문헌 [Cadigan and Nusse, Genes & Dev., 11:3286-3305 (1997)]을 참조한다.

[0011] 문헌 [Pennica et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 95:14717-14722 (1998)]에는 Wnt-1에 의해 형질전환된 마우스 유방 표피 세포주 C57MG에서 상향조절된 2가지 유전자 WISP-1 및 WISP-2, 및 제3의 관련된 유전자 WISP-3의 클로닝 및 특성화가 기재되어 있다 (또한, 1999년 5월 6일자로 공개된 WO 99/21998; 1999년 5월 6일자로 공개된 WO 99/21999 참조). 페니카(Pennica) 등은 상기 WISP 유전자가 Wnt-1 신호전달의 하류일 수 있으며 결장암에서 WISP 발현의 비정상적 수준은 결장 종양발생에 있어서 역할을 할 수 있음을 보고하고 있다. 최근에 WISP-1은 β -케테닌-조절된 유전자로서 확인되었으며, 그의 종양유전자 활성의 특성화는 WISP-1이 β -케테닌-매개된 종양발생에 기여할 수 있음을 입증하였다 (문헌 [Xu et al., Gene & Develop., 14:585-595 (2000)]). 정상 래트 신장 세포 (NRK-49F)에서의 WISP-1 과발현은 형태학적 형질전환을 유도하였고, 세포 성장을 가속화시켰으며, 포화 밀도를 증가시켰다. 또한, 상기 세포는 누드 마우스 내로 주사될 경우 종양을 용이하게 형성하며, 이는 WISP-1이 종양발생에서 일정 역할을 할 수 있음을 시사한다 ([Xu et al., 상기 문헌 2000]). WISP-1은 또한 형질전환된 인간 유방암 세포주 및 특정한 진보된 특징과 관련된 원발성 인간 유방암의 약 47%에서 과발현된다 (문헌 [Xie et al., Cancer Res., 61:8917-8923 (2001)]; [Saxena et al., Mol. Cell Biochem., 228:99-104

(2001)]; [Michaelson et al., Oncogene, 20:5093-5099 (2001).] 특정 WISP-1 변이체는 또한 인간 경화성 위암종 세포의 약 86%에서 과발현되는 것으로 보고되었다 (문헌 [Tanaka et al., Oncogene, 20:5525-5532 (2001)]).

[0012] 문헌 [Hurvitz et al., Nature Genetics, 23:94-97 (1999)]에는 무관한 개체에서 WISP3의 9가지 상이한 돌연변이가 보통염색체 열성 골격 장애인 진행성 가성류마티스성 형성이상 (PPD)과 관련됨이 밝혀진 WISP3과 관련된 연구가 기재되어 있다. RT-PCR에 의한 WISP3 발현은 허비츠(Hurvitz) 등에 의해 인간 윤활막세포, 인공 연골 세포, 및 골수-유래된 중간엽 전구체 세포에서 관찰되었다.

[0013] 1998년 5월 22일자로 공개된 PCT 출원 WO98/21236에는 성장 인자 상과의 26 kD 구성원을 코딩하는 인간 결합 조직 성장 인자 유전자-3 (CTGF-3)이 개시되어 있다. WO98/21236에는 CTGF-3 아미노산 서열이 인간 골모세포 cDNA 클론으로부터 유래되었으며, CTGF-3이 난소, 고환, 심장, 폐, 골격근, 부신 수질, 부신 피질, 흉선, 전립선, 소장 및 결장과 같은 다양한 조직에서 발현되었음이 개시되어 있다.

[0014] 히알루론산 (HA, 히알루로네이트 또는 히알루로난으로도 지칭됨)은 세포외 매트릭스의 중요한 성분인 것으로 문헌에 알려져 있다 (예를 들어, 문헌 [Hardingham et al., FASEB J., 6:861-870 (1992)]; [Laurent et al., FASBB J., 6:2397-2404 (1992)]). HA는 상처 치유, 염증 및 배아 형태발생 동안 세포 이동을 용이하게 하는 피부 및 중간엽 조직의 성분이다 (문헌 [Knudson et al., FASEB J., 7:1233-1241 (1993)]; [Knudson et al., CIBA Found. Symp., 143:150-169 (1989)]). HA는 또한 특정 종류의 전이에 있어서 역할을 하는 것으로 보고되었다 (문헌 [Naor et al., CD44: Structure, Function and Association with the Malignant Process, Advances in Cancer Research, Academic Press (1997), pages 241-319])). HA의 가장 많은 농도는 총 신체 HA의 50% 초과를 차지하는 피부 및 근-골격계에서 발견된다 (문헌 [Banerji et al., J. Cell Biol., 144:789-801 (1999)]).

[0015] 다양한 연구자가 HA에 결합하는 수용체에 대해 보고하였다. HA에 대해 확인된 수용체 중 하나는 CD44 단백질이다 (예를 들어, 문헌 [Culty et al., J. Cell Biology, 111:2765-2774 (1990)]; [Aruffo et al., Cell, 61:1303-1313 (1990)]; [Naor et al., CD44: Structure, Function and Association with the Malignant Process, Advances in Cancer Research, Academic Press (1997), pages 241-319)], [Ropponen et al., Cancer Res., 58:342-347 (1998)]; [Masaki et al., Cancer, 92:2539-2546 (2001)] 참조). CD44는 교대 스플라이싱 및 차등 글리코실화에 의한 단일 유전자로부터 생성된 세포-표면 당단백질의 족이다 (문헌 [Wielenga et al., Am. J. Pathology, 154:515-523 (1999)]). CD44는 세포 및 세포골격에 세포외 분자, 구체적으로 히알루로네이트를 결합시키는 세포 부착 수용체로서 기능하는 것으로 믿어진다 ([Wielenga et al., 상기 문헌]). CD44는 표피, 중간엽 및 림프양 세포 상에 발현된다 (문헌 [Lesley et al., Adv. Immunol., 54:271-335 (1994)]). 빌렌가(Wielenga) 등은 CD44 발현이 APC 또는 Tcf-4에서 유전적 검출을 갖는 마우스 및 인간의 장 점막에서 CD44 발현을 분석하는 특정 실험을 기초로, WNT 경로에 의해 조절될 수 있음을 보고하고 있다 ([Wielenga et al., 상기 문헌]).

[0016] 지금까지 특성화된 다른 HA 수용체로는 형질전환된 림프구의 표면 상에 일시적으로 발현되는 58 kD 세포내 단백질인 RHAMM (히알루론산 매개된 운동에 대한 수용체로도 지칭됨)을 들 수 있다 (문헌 [Hardwick et al., J. Cell Biol., 117:1343-1350 (1992)]; [Turley et al., Exp. Cell Res., 207:277-282 (1993)]). 섬유모세포에서의 RHAMM 발현은 전이를 촉진시키며 H-Ras 형질전환에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다 ([Hall et al., 상기 문헌]).

[0017] HA에 결합하는 또다른 수용체는 바네르지(Banerji) 등에 의해 기재되었다 ([Banerji et al., 상기 문헌]). 바네르지 등은 CD44 수용체에 대해 41%의 유사성을 갖는 322-잔기 제I형 통합 막 폴리펩티드인 "LYVE-1"로 지칭되는 림프관 벽 상의 수용체를 보고하고 있다. HA에 대한 CD44 수용체와는 달리, LYVE-1 단백질은 혈관에 부재한다. 또한, 레일린 (문헌 [Bono et al., Mol. Biol. Cell, 12:891-900 (2001)]) 및 HARE (문헌 [Zhou et al., J. Biol. Chem., 275:37733-37741 (2000)])가 HA 수용체로서 기재되었다.

[0018] 발명의 요약

[0019] 본 출원인은 놀랍게도 WISP-1이 HAS2 (히알루로난 신타제 2), CD44, 및 RHAMM mRNA 발현, CD44 단백질 합성, 및 HA 분비를 유도할 수 있음을 밝혀내었다. 이러한 분자의 유도 또는 분비는 암 세포 성장, 운동 및/또는 전이 가능성을 촉진하거나 증가시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 예를 들어 WISP-1 길항제 및 이러한 길항제의 사용 방법을 제공한다. 본원에 기재된 길항제는 다른 것들 중에서도 HAS2, HA, CD44 또는 RHAMM의 유도 또는

분비와 관련된 포유동물 암 세포, 또는 다른 병리학적 상태의 시험관내, 동일계내 또는 생체내 진단 또는 진료에 유용성이 있다.

- [0020] 본 발명의 실시양태에서, 단리된 WISP-1 길항제가 제공된다. 이러한 길항제는 WISP-1 항체와 같은 항체를 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 길항제는 HAS2, HA, CD44 또는 RHAMM의 WISP-1 유도 또는 분비를 차단하거나 중화시킬 수 있다. 이러한 길항성 항체는 예를 들어 모노클로날 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 또는 인간 항체일 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위해 고려되는 WISP-1 길항제로는 WISP-1 이뮤노어드헤신, WISP-1 변이체, 그의 공유적으로 변형된 형태, 또는 그의 융합 단백질을 들 수 있다. 예로서, 이러한 길항제로는 폐결화된 WISP-1, 또는 에피토프 태그 또는 류신 지퍼와 같은 이중 서열에 융합된 WISP-1을 들 수 있다. 방법은 길항제 분자의 단일 종류 또는 2종 이상의 길항제의 조합의 용도를 고려한다.
- [0021] 본 발명의 방법은 WISP-1에 의한 HAS2, HA, CD44 또는 RHAMM의 유도 또는 분비를 비롯한 WISP-1과 관련되거나 이로부터 초래된 포유동물에서의 병리학적 상태 또는 질환의 치료 방법을 포함한다. 치료 방법에서, WISP-1 길항제는 이러한 병리학적 상태 또는 질환을 앓고 있는 포유동물에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명은 암 세포(들)와 같은 포유동물 세포(들)을 HAS2, HA, CD44 또는 RHAMM의 WISP-1 유도 또는 분비를 감소시키거나, 중화시키거나 차단하는 유효량의 1종 이상의 WISP-1 길항제에 노출시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 세포는 세포 배양물 내에, 또는 포유동물, 예를 들어 암을 앓고 있는 포유동물에 존재할 수 있다.
- [0022] 본 발명은 또한 1종 이상의 WISP-1 길항제를 포함하는 조성물을 제공한다. 임의로, 본 발명의 조성물은 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함할 것이다. 바람직하게는, 조성물은 1종 이상의 WISP-1 길항제를 병리학적 상태 또는 질환을 치료하는 치료학적 유효양으로 포함할 것이다.
- [0023] 본 발명은 또한 1종 이상의 WISP-1 길항제를 포함하는 제조품 및 키트를 제공한다.
- [0024] 본 발명은 또한 HAS2, HA, CD44 또는 RHAMM의 WISP-1 유도 또는 분비를 차단하거나 중화시키는 것에 관한 길항제로서 작용하는 소분자 화합물, 폴리펩티드 또는 항체와 같은 후보 분자를 확인하는 스크리닝 분석의 수행 방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 보다 특정한 실시양태는 하나 이상의 종류의 포유동물 세포에서 천연 WISP-1 폴리펩티드에 의한 HAS2, HA, CD44 또는 RHAMM의 유도 또는 분비를 억제하거나 중화시키는 단리된 WISP-1 길항제를 포함하며, 상기 길항제는 항-WISP-1 항체, WISP-1 이뮤노어드헤신, WISP-1 변이체, 및 그의 융합 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다. 길항제는 도 9A 내지 9C의 아미노산 23 내지 367을 포함하는 천연 인간 WISP-1 폴리펩티드, 또는 본원의 서열 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 또는 11의 서열에 의해 코딩되는 아미노산을 포함하는 WISP-1의 하나 이상의 도메인에 결합하는 항-WISP-1 항체를 포함할 수 있다. 항-WISP-1 항체는 키메라, 인간화 또는 인간 항체일 수 있다.
- [0026] 본 발명은 또한 본원에 기재된 길항제 및 담체를 포함하는 조성물을 제공하며, 임의로 담체는 제약상 허용되는 담체이다.
- [0027] 본 발명은 또한 포유동물 세포를 유효량의 WISP-1 길항제에 노출시키는 것을 포함하는, 포유동물 세포에서의 HAS2, HA, CD44 또는 RHAMM의 WISP-1 유도 또는 분비의 억제 또는 중화 방법을 제공하며, 상기 WISP-1 길항제는 a) WISP-1 이뮤노어드헤신; b) 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 및 폴리옥시알킬렌으로 이루어진 군으로부터 선택된 비단백질성 중합체에 연결된 WISP-1 폴리펩티드; c) WISP-1 항체; 및 d) WISP-1 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0028] 방법에 사용되는 WISP-1 이뮤노어드헤신은 이뮤노글로불린의 Fc 영역에 융합된 WISP-1 서열을 포함할 수 있다. 방법에 사용되는 항-WISP-1 항체는 도 9A 내지 9C의 아미노산 23 내지 367을 포함하는 천연 인간 WISP-1, 또는 하기 실시예에 기재된 WISP-1의 하나 이상의 도메인에 결합할 수 있다. 방법에서, 포유동물 세포는 암 세포를 포함할 수 있으며, 임의로 세포는 결장암 또는 결장직장암 세포, 유방암 세포, 폐암 세포 또는 뇌암 세포 (예를 들어, 신경아교종 또는 아교모세포종)를 포함한다.
- [0029] 다른 실시양태에서, 유효량의 WISP-1 길항제를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 포유동물에서의 암의 치료 방법이 제공된다. 임의로, 상기 방법에서, 길항제는 하나 이상의 종류의 포유동물 세포에서 천연 인간 WISP-1 폴리펩티드에 의한 HAS2, HA, CD44 또는 RHAMM의 유도 또는 분비를 억제하거나 중화시킬 수 있으며, 상기 길항제는 항-WISP-1 항체, WISP-1 이뮤노어드헤신 및 WISP-1 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 임의로, 길항제는 암 세포 성장 또는 암 세포 전이를 억제하는 작용을 할 수 있다. 포유동물에서 암은 결장암 또는 결장직장암 세포, 유방암 세포, 폐암 세포 또는 뇌암 세포 (예를 들어, 신경아교종 또는 아교모세포종)를 포함

할 수 있다. 임의로, 방법에 사용되는 길항제(들)는 암 세포 성장 또는 전이를 억제하거나 감소시킨다. 또한, 방법에서, 화학요법, 방사선, 프로드러그, 세포독성제, 성장 억제제 또는 사이토킨도 포유동물에게 투여될 수 있다.

[0030] 보다 특정한 실시양태에서, 본원의 서열 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 또는 11의 서열에 의해 코딩되는 아미노산을 포함하는 WISP-1 폴리펩티드의 하나 이상의 도메인 (하기 실시예에 추가로 기재됨)에 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 임의로, 항체는 모노클로날 항체이다. 임의로, 모노클로날 항체는 ATCC에 수탁 번호 PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 또는 PTA-4627로 각각 기탁된 하이브리도마에 의해 분비된 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 또는 9C11 항체를 포함한다.

[0031] 또한, ATCC에 수탁 번호 PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 또는 PTA-4627로 각각 기탁된 하이브리도마 세포주에 의해 생산된 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 또는 9C11 모노클로날 항체가 결합하는 에피토프와 동일한 에피토프에 결합하는 항체가 제공된다.

[0032] 다른 특정한 실시양태에서, 모노클로날 항체 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 또는 9C11을 생산하며 ATCC에 수탁 번호 PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 또는 PTA-4627로 각각 기탁된 하이브리도마 세포주, 및 ATCC에 수탁 번호 PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 또는 PTA-4627로 각각 기탁된 하이브리도마에 의해 분비된 모노클로날 항체 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 또는 9C11이 제공된다.

[0033] 또한, WISP-1 폴리펩티드에 결합하며 ATCC 수탁 번호 PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 또는 PTA-4627로 기탁된 하이브리도마에 의해 생산된 모노클로날 항체의 상기 WISP-1 폴리펩티드에의 결합을 경쟁적으로 억제하는 항체를 포함하는 단리된 항-WISP-1 모노클로날 항체가 제공된다.

[0034] 또한, WISP-1 폴리펩티드에 특이적으로 결합하며, (a) ATCC에 수탁 번호 PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 또는 PTA-4627로 각각 기탁된 하이브리도마에 의해 분비된 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 또는 9C11 모노클로날 항체로부터 유래된 서열을 포함하는 키메라 또는 인간화 항-WISP-1 항체가 제공된다. 임의로, 이러한 항체는 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 또는 9C11 항체로부터 유래된 중쇄, 경쇄 또는 가변 영역을 포함할 수 있다.

[0035] 항-WISP-1 항체는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 및 폴리옥시알킬렌으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 비-단백질성 중합체에, 또는 세포독성제 또는 효소에, 또는 방사성동위원소, 형광 화합물 또는 화학 발광 화합물에 연결될 수 있다.

발명의 상세한 설명

I. 정의

[0069] "WISP 폴리펩티드"라는 용어는 그의 유전자가 적어도 Wnt-1에 의해 유도된 본원에 기재된 천연-서열 인간 및 마우스 WISP 단백질 및 변이체의 족을 지칭한다. 상기 용어는 WISP-1 및 그의 변이체를 포함한다. 이러한 WISP-1 단백질은 하기 및 1999년 5월 6일자로 공개된 PCT 출원 WO 99/21998, 2002년 5월 14일자로 허여된 US 6,387,657 B1, 및 문헌 [Pennica et al., Proc . Natl . Acad. Sci., 95:14717-14722 (1998)]에 추가로 기재되어 있다.

[0070] 본원에 사용된 "WISP-1 폴리펩티드", "WISP-1 상동체"라는 용어 및 그의 문법적 변형어는 천연-서열 WISP-1 단백질 및 변이체 (본원에 추가로 정의됨)를 포함한다. WISP-1 폴리펩티드는 인간 조직 종류 또는 또다른 공급원으로부터와 같은 다양한 공급원으로부터 단리되거나, 재조합 또는 합성적 방법에 의해, 또는 상기 및 유사한 기술의 임의의 조합에 의해 제조될 수 있다.

[0071] "천연-서열 WISP-1 폴리펩티드"라는 용어는 천연으로부터 유래된 WISP-1 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 천연-서열 WISP-1 폴리펩티드는 천연으로부터 단리될 수 있거나, 재조합 또는 합성적 수단에 의해 생성될 수 있다. "천연-서열 WISP-1 폴리펩티드"라는 용어는 구체적으로 본원에 개시된 WISP-1 폴리펩티드의 천연 발생 말단절단된 또는 분비된 형태, 천연 발생 변이체 형태 (예를 들어, 교대로 스플라이싱된 형태 또는 스플라이스 변이체), 및 WISP-1 폴리펩티드의 천연 발생 대립유전자 변이체를 포함한다. 본 발명의 일 실시양태에서, 천연-서열 WISP-1 폴리펩티드는 N-말단 메티오닌이 있거나 없는, 도 9의 아미노산 23 내지 367 또는 도 9의 아미노산 1 내지 367을 각각 포함하는 성숙 또는 전장 천연-서열 인간 WISP-1 폴리펩티드이다.

[0072] 본 발명의 또다른 실시양태에서, 천연-서열 WISP-1 폴리펩티드는 위치 184에서의 발린 잔기 또는 위치 202에서

의 알려진 잔기가 이소류신 또는 세린 잔기에 대해 각각 변화된, N-말단 메티오닌이 있거나 없는, 도 9의 아미노산 23 내지 367 또는 1 내지 367을 포함하는 전장 또는 성숙 천연-서열 인간 WISP-1 폴리펩티드이다. 본 발명의 또다른 실시양태에서, 천연-서열 WISP-1 폴리펩티드는 위치 184에서의 발린 잔기 및 위치 202에서의 알려진 잔기가 이소류신 또는 세린 잔기에 대해 각각 변화된, N-말단 메티오닌이 있거나 없는, 도 9의 아미노산 23 내지 367 또는 1 내지 367을 포함하는 전장 또는 성숙 천연-서열 인간 WISP-1 폴리펩티드이다.

[0073] 본 발명의 또다른 실시양태에서, 천연-서열 WISP-1 폴리펩티드는 N-말단 메티오닌이 있거나 없는, WO 99/21998에 나타난 바와 같은 서열 23, 24, 25, 26, 27, 28 또는 29를 비롯한 인간 WISP-1 스플라이스 또는 다른 천연-서열 변이체 중 하나를 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 것이다.

[0074] "WISP-1 변이체"라는 용어는 도 9에 나타난 유래된 아미노산 서열을 갖는 인간 성숙 WISP-1과 약 80% 이상, 바람직하게는 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89% 이상, 보다 바람직하게는 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 이상, 가장 바람직하게는 약 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 갖는 하기 정의된 바와 같은 활성 WISP-1 폴리펩티드, 또는 그의 가용성 단편을 의미한다. 이러한 변이체는 예를 들어 하나 이상의 아미노산 잔기가 도 9의 전장 또는 성숙 서열의 N- 또는 C-말단에 첨가되거나, 그로부터 결실된 WISP-1 폴리펩티드, 또는 하나 이상의 아미노산 잔기가 폴리펩티드의 내부 서열 또는 도메인으로부터 삽입되거나 결실된 WISP-1 폴리펩티드, 및 다른 종으로부터의 변이체를 포함하지만, 천연-서열 WISP-1 폴리펩티드는 제외한다. 바람직하게는, 이러한 변이체는 하기 정의된 바와 같이 길항제로서 작용하는 변이체이다.

[0075] "세포외 도메인", "ECD" 또는 "분비된" 단백질은 임의의 막관통 및 세포질 도메인이 본질적으로 없는 폴리펩티드의 형태를 지칭한다. 단백질 또는 폴리펩티드의 "분비된" 형태는 신호 서열을 포함할 수 있거나, 포함하지 않을 수 있다.

[0076] "엄격한 조건"은 (1) 세척용으로 낮은 이온 농도 및 높은 온도, 예를 들어 50℃에서 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산나트륨/0.1% 나트륨 도데실 술페이트를 사용하거나; (2) 42℃에서 750 mM 염화나트륨, 75 mM 시트르산나트륨을 갖는 pH 6.5에서의 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% 피콜(Ficoll)/0.1% 폴리비닐피롤리돈/50 mM 인산나트륨 완충액을 갖는, 포름아미드, 예를 들어 50% (vol/vol) 포름아미드와 같은 변성화제를 혼성화하는 동안 사용하거나; (3) 0.2 x SSC 및 0.1% SDS에서 42℃에서 세척으로, 42℃에서 50% 포름아미드, 5 x SSC (0.75 M NaCl, 0.075 M 시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 0.1% 피로인산나트륨, 5 x 덴하르츠(Denhardt) 용액, 초음파처리된 연어 정자 DNA (50 µg/mL), 0.1% SDS, 및 10% 텍스트란 술페이트를 사용하거나; (4) 55℃에서 10% 텍스트란 술페이트, 2 x SSC (염화나트륨/시트르산나트륨), 및 50% 포름아미드의 완충액을 사용한 후, 55℃에서 0.1 x SSC 함유 EDTA로 이루어진 고-엄격성 세척을 하는 것이다.

[0077] "온건하게 엄격한 조건"은 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]에 기재되어 있으며, 상기 기재된 것보다 덜 엄격한 세척 용액 및 혼성화 조건 (예를 들어, 온도, 이온 농도, 및 % SDS)의 사용을 포함한다. 온건하게 엄격한 조건의 예는 20% 포름아미드, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM 트리시트르산나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5 x 덴하르츠 용액, 10% 텍스트란 술페이트, 및 20 mg/mL 변성된 전단된 연어 정자 DNA를 포함하는 용액에서 37℃에서 밤새 인큐베이션한 후, 약 37 내지 50℃에서 1 x SSC에서 필터를 세척하는 것과 같은 조건이다. 당업자는 필요할 경우 프로브 길이 등과 같은 인자를 조정하기 위해, 온도, 이온 농도 등을 조정하는 방법을 인지할 것이다.

[0078] 본원에 개시된 다양한 폴리펩티드를 기재하는데 사용될 경우, "단리된"은 그의 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리되고/거나 회수된 폴리펩티드를 의미한다. 그의 천연 환경의 오염 성분은 폴리펩티드 또는 항체에 대한 진단 또는 치료 용도를 방해하지 않을 물질이며, 효소, 호르몬 및 기타 단백질성 또는 비단백질성 용질을 들 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 스피닝 컵 서열기에 의해 15 잔기 이상의 N-말단 또는 내부 아미노산 서열을 획득하는데 충분한 정도까지, 또는 (2) 쿠마시(Coomassie) 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용한 환원 또는 비환원 조건하에서의 SDS-PAGE에 의한 동종성까지 정제될 것이다. 단리된 폴리펩티드는, WISP 천연 환경의 하나 이상의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문에, 재조합 세포 내의 동일계내 폴리펩티드를 포함한다. 그러나, 통상적으로, 단리된 폴리펩티드는 하나 이상의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0079] "제어 서열"이라는 용어는 특정 숙주 유기체에서 작동적으로 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 지칭한다. 원핵생물에 적합한 제어 서열은 예를 들어 프로모터, 임의의 오퍼레이터 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호, 및 인핸서를 이용하는 것으로 공지되어 있다.

[0080] 핵산은 이것이 또다른 핵산 서열과의 기능적 관계에 놓일 경우 "작동적으로 연결된다." 예를 들어, 예비서열

또는 분비성 선도자는, 이것이 폴리펩티드의 분비에 참여하는 예비단백질로서 표현될 경우, 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동적으로 연결되거나, 프로모터 또는 인핸서는, 이것이 서열의 전사에 영향을 줄 경우 코딩 서열에 작동적으로 연결되거나, 리보솜 결합 부위는, 이것이 번역을 용이하게 하도록 위치될 경우 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 일반적으로, "작동적으로 연결된"은 연결된 DNA 서열이 인접하고, 분비성 선도자의 경우 인접하며 리딩 상에 있음을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접할 필요는 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서 라이게이션에 의해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않을 경우, 합성적 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커가 통상적인 실시예에 따라 사용된다.

[0081] "리포좀"은 약물 (예를 들어, 본원에 개시된 인슐린 및 인슐린 변이체)을 포유동물에게 전달하는데 유용한 다양한 종류의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제를 포함하는 작은 소포이다. 리포좀의 성분은 통상적으로 생물학적 막의 지질 배열과 유사한 이중층 형성으로 배열된다.

[0082] "아미노산" 및 "아미노산들"이라는 용어는 모든 천연 발생 L-알파-아미노산을 지칭한다. 상기 정의는 노르류신, 오르니틴 및 호모시스테인을 포함하는 것을 의도한다. 아미노산은 1-문자 또는 3-문자 명칭에 의해 확인된다.

[0083] Asp D 아스파르트산 Ile I 이소류신

[0084] Thr T 트레오닌 Leu L 류신

[0085] Ser S 세린 Tyr Y 티로신

[0086] Glu E 글루탐산 Phe F 페닐알라닌

[0087] Pro P 프롤린 His H 히스티딘

[0088] Gly G 글리신 Lys K 리신

[0089] Ala A 알라닌 Arg R 아르기닌

[0090] Cys C 시스테인 Trp W 트립토판

[0091] Val V 발린 Gln Q 글루타민

[0092] Met M 메티오닌 Asn N 아스파라긴

[0093] 서열 목록 및 도면에서, 특정 다른 1-문자 또는 3-문자 명칭은 서열 내의 주어진 위치에서 2개 이상의 아미노산 또는 뉴클레오타이드를 지칭하고 확인하는데 사용될 수 있다.

[0094] 본원에 확인된 폴리펩티드 서열에 관한 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성"은 서열을 정렬하고 겹을 도입하고, 필요할 경우 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성한 후, 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않으면서, 본원에 확인된 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 퍼센트로서 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성의 측정 목적용의 정렬은 당업자의 범위 내에 있는 다양한 방식으로, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 맥알라인(Megalign) (DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어를 이용하여 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯한, 정렬을 측정하는데 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적상, % 아미노산 서열 동일성 값은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용함으로써 하기 기재된 바와 같이 수득되며, ALIGN-2 프로그램에 대한 완전한 소스 코드는 하기 표에 제공된다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc.)에 의해 저술되었으며, 하기 표에 나타내어진 소스 코드는 미국 저작권 등록 제TXU510087호로 등록된, 20559 워싱턴 디.씨.에 소재하는 미국 저작권국에 사용자 문서로 출원되었다. ALIGN-2 프로그램은 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코에 소재하는 제넨테크, 인크.를 통해 공개적으로 이용가능하거나, 하기 표에 제공된 소스 코드로부터 편집될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 사용하기 위해 UNIX 작동 시스템, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D 상에 편집되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되며, 변하지 않는다.

[0095] 본원에 사용될 경우 "에피토프 태깅된"이라는 용어는 "태그 폴리펩티드"에 융합된 폴리펩티드를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 지칭한다. 태그 폴리펩티드는 항체가 제조될 수 있는 에피토프를 제공하는데 충분한 잔기를 갖는다. 태그 폴리펩티드는 또한 바람직하게는 항체가 다른 에피토프와 실질적으로 교차-반응하지 않도록 상당히 고유하다. 적합한 태그 폴리펩티드는 일반적으로 6개 이상의 아미노산 잔기, 통상적으로 약 8 내지 50 아미

노산 잔기 (바람직하게는, 약 10 내지 20 아미노산 잔기)를 갖는다.

- [0096] 본원에 사용된 "이뮤노어드헤신"이라는 용어는 이중 단백질 ("어드헤신")의 결합 특이성을 이뮤노글로불린 불변 도메인의 효과기 기능과 조합하는 항체-유사 분자를 나타낸다. 구조적으로, 이뮤노어드헤신은 항원 인지 및 항체의 결합 부위 이외인 (즉 "이중"임) 목적하는 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열 및 이뮤노글로불린 불변 도메인의 융합물을 포함한다. 이뮤노어드헤신 분자의 어드헤신 부분은 전형적으로 적어도 수용체 또는 리간드의 결합 부위를 포함하는 인접 아미노산 서열이다. 이뮤노어드헤신 내의 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열은 IgG-1, IgG-2, IgG-3, 또는 IgG-4 아형, IgA (IgA-1 및 IgA-2 포함), IgE, IgD 또는 IgM과 같은 임의의 이뮤노글로불린으로부터 수득될 수 있다.
- [0097] "길항제"라는 용어는 가장 넓은 의미로 사용되며, WISP-1 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 시험관내, 동일계내 또는 생체내에서 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나, 중화시키는 임의의 분자를 포함한다. WISP-1 폴리펩티드의 이러한 생물학적 활성의 예는 하나 이상의 종류의 포유동물 세포에서의 HAS2, HA, CD44 또는 RHAMM의 유도 또는 분비를 포함한다. 길항제는 직접적 또는 간접적 방식으로 기능할 수 있다. 예를 들어, 길항제는 예를 들어 WISP-1 폴리펩티드에 대한 그의 직접적 결합의 결과로서, WISP-1 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 시험관내, 동일계내 또는 생체내에서 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나, 중화시키는 기능을 할 수 있다. 길항제는 또한 예를 들어 또다른 효과기 분자의 차단 또는 억제의 결과로서, WISP-1 폴리펩티드의 하나 이상의 생물학적 활성을 시험관내, 동일계내 또는 생체내에서 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나, 중화시키는 기능을 간접적으로 할 수 있다.
- [0098] "WISP-1 길항제"라는 용어는 WISP-1의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나, 중화시키는 임의의 분자를 지칭하며, 항체, 이뮤노어드헤신, WISP-1 이뮤노어드헤신, WISP-1 융합 단백질, WISP-1의 공유적으로 변형된 형태, WISP-1 변이체 및 그의 융합 단백질, WISP-1 항체, 및 WISP-1의 고급 올리고머 형태 (이량체, 응집체) 또는 WISP-1의 동종중합체 또는 이종중합체 형태를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. WISP-1 길항제 분자가 WISP-1의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나, 억제하거나, 중화시키는 지 여부를 측정하기 위해, 분석을 수행하여 예를 들어 다양한 세포 (실시에에 기재된 바와 같음) 상에서, 또는 폐암 전이의 생체내 무인 모델에서 길항제 분자의 효과(들)를 평가할 수 있다. 다양한 분석은 시험관내 또는 생체내 분석 형식으로 수행될 수 있다. 바람직하게는, 본원에 기재된 방법에 사용되는 WISP-1 길항제는 본원에 기재된 것과 같은 분석에서 임의로 측정될 수 있는 하나 이상의 종류의 WISP-1 활성을 차단하거나 중화시킬 수 있을 것이다.
- [0099] "항체"라는 용어는 가장 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로 예를 들어 단일 모노클로날 항체, 다중에피토프 특이성을 갖는 항체 조성물, 단일쇄 항체, 및 항체의 단편을 포함한다. 본원에 사용된 "항체"는 비손상(intact) 이뮤노글로불린 또는 항체 분자, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체 (즉, 2개 이상의 비손상 항체로부터 형성된 이중특이적 항체), 및 이들이 본원에 기재된 임의의 목적하는 길항제성 특성을 나타내는 한 이뮤노글로불린 단편 (예를 들어, Fab, F(ab')₂, 또는 Fv)을 포함한다.
- [0100] 항체는 전형적으로 특이적 항원에 대한 결합 특이성을 나타내는 단백질 또는 폴리펩티드이다. 천연 항체는 통상적으로 2개의 동일한 경(L)쇄 및 2개의 동일한 중(H)쇄로 이루어진 이중사량체성 당단백질이다. 전형적으로, 각각의 경쇄는 하나의 공유 디설피드 결합에 의해 중쇄에 연결되는 반면, 디설피드 결합의 수는 상이한 이뮤노글로불린 이소형의 중쇄 사이에서 다양하다. 각각의 중쇄 및 경쇄는 또한 규칙적으로 이격된 쇠내 디설피드 브릿지를 갖는다. 각각의 중쇄는 하나의 말단에 많은 불변 도메인에 이어진 가변 도메인 (VH)을 갖는다. 각각의 경쇄는 하나의 말단에 가변 도메인 (VL) 및 그의 다른 말단에 불변 도메인을 가지며, 경쇄의 불변 도메인은 중쇄의 제1 불변 도메인과 함께 정렬되고, 경쇄 가변 도메인은 중쇄의 가변 도메인과 함께 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 계면을 형성하는 것으로 믿어진다 (문헌 [Chothia et al., J. Mol. Biol., 186:651-663 (1985)]; [Novotny and Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-4596 (1985)]). 임의의 척추동물 종으로부터의 항체의 경쇄는 그의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 카파 및 람다로 지칭되는 2개의 명백히 별개의 종류 중 하나에 할당된다. 그의 중쇄의 불변 도메인의 아미노산 서열에 따라, 이뮤노글로불린은 상이한 부류에 할당될 수 있다. 이뮤노글로불린의 5가지 주요한 부류: IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM가 있으며, 이들 중 몇몇은 하위부류 (이소형), 예를 들어 IgG-1, IgG-2, IgG-3, 및 IgG-4; IgA-1 및 IgA-2로 추가로 나누어질 수 있다. 상이한 부류의 이뮤노글로불린에 상응하는 중쇄 불변 도메인은 각각 알파, 델타, 엡실론, 감마 및 뮤로 지칭된다.
- [0101] "항체 단편"은 전장 항체의 일부분, 일반적으로 그의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예로

는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편; 디아바디; 선형 항체; 단일쇄 항체 분자; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 들 수 있다.

- [0102] "가변"이라는 용어는 가변 도메인의 특정 절편이 항체 사이에서 서열이 광범위하게 상이하다는 사실을 지칭한다. V 도메인은 항원 결합을 매개하며, 그의 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 정의한다. 그러나, 가변성은 가변 도메인의 110-아미노산 거리를 넘어 고르게 분포되지 않는다. 대신, V 영역은 각각 9 내지 12 아미노산 길이의 "초가변 영역"으로 지칭되는 극도의 가변성의 보다 짧은 영역에 의해 분리되는 15 내지 30 아미노산의 프레임워크 영역 (FR)으로 지칭되는 상대적으로 불변의 스트레치로 이루어진다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 각각 β -쉬트 구조를 연결하는 루프를 형성하고, 일부의 경우 그의 일부를 형성하는 3 개의 초가변 영역에 의해 연결된 β -쉬트 배열을 크게 채우는 4개의 FR을 포함한다. 각각의 쇄의 초가변 영역은 FR에 의해 가까이 근접하여 함께 홀딩되고, 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 결합하는데 직접적으로 관여하지 않지만, 항체 의존성 세포성 세포독성 (ADCC)의 참여와 같은 다양한 효과기 기능을 나타낸다.
- [0103] 본원에 사용된 "모노클로날 항체"라는 용어는 실질적으로 동종인 항체의 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉 집단에 포함되는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 가능한 천연-발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 지정된 매우 특이적이다. 또한, 전형적으로 상이한 결정자 (에피토프들)에 대해 지정된 상이한 항체를 포함하는 통상적인 (폴리클로날) 항체 제조물에 비해, 각각의 모노클로날 항체는 항원 상의 단일 결정자에 대해 지정된다.
- [0104] 본원에서 모노클로날 항체는 기원의 중, 또는 이뮤노글로불린 부류 또는 하위부류 명칭과 무관하게, 관심의 항체의 가변 (초가변 포함) 도메인과 불변 도메인을 (예를 들어, "인간화" 항체), 또는 경쇄와 중쇄를, 또는 하나의 종으로부터의 쇄를 또다른 종으로부터의 쇄와, 또는 융합물을 이중 단백질과 스플라이싱함으로써 생성된 키메라, 혼성 및 재조합 항체, 뿐만 아니라, 이들이 목적하는 생물학적 활성 또는 특성을 나타내는 한 항체 단편 (예를 들어, Fab, F(ab')₂, 및 Fv)을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호 및 문헌 [Mage et al., in Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.79-97 (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987)]을 참조한다.
- [0105] 따라서, 변형어 "모노클로날"은 항체의 실질적으로 동종인 집단으로부터 수득된 항체의 특징을 나타내며, 항체의 생성이 임의의 특정 방법에 의할 것을 요구하는 것으로 간주되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 예를 들어 하이브리도마 방법 (예를 들어, 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 의해 제조될 수 있거나; 미국 특허 제4,816,567호에 기재된 것과 같은 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어 문헌 [McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 이용하여 생성된 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다.
- [0106] 비-인간 (예를 들어, 무린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수여자의 초가변 영역 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 마우스, 래트, 토끼, 또는 비인간 영장류와 같은 비-인간 종으로부터의 초가변 영역 잔기 (공여자 항체)로 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수여자 또는 수용자 항체)이다. 일부 예에서, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기로 대체된다. 또한, 인간화 항체는 수여자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 결합 친화도와 같은 항체 성능을 추가로 개선하기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 하나 이상, 전형적으로 2개의 가변 도메인의 실질적으로 모두를 포함하며, 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린의 것과 상응하며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것과 상응하지만, FR 영역은 결합 친화도를 개선시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. FR에서 상기 아미노산 치환의 수는 전형적으로 중쇄에서 6개 이하, 및 경쇄에서 3개 이하이다. 인간화 항체는 또한 최적으로 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부분, 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 것을 포함할 것이다.
- [0107] "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체 및/또는 본원에 개시된 바와 같은 임의의 인간 항체 제조 기술을 이용하여 제조된 항체에 상응하는 아미노산 서열을 갖는 것이다. 인간 항체의 상기 정의는 하나 이상의 인간 중쇄 폴리펩티드 또는 하나 이상의 인간 경쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체, 예를 들어 무린 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩티드를 포함하는 항체를 포함한다. 인간 항체는 당업계에 공지된 다양한 기술을 이용하여 생성될 수 있다.

일 실시양태에서, 인간 항체는 파지 라이브러리로부터 선택되며, 파지 라이브러리는 인간 항체를 발현한다 (문헌 [Vaughan et al. *Mature Biotechnology*, 14:309-314 (1996)]; [Sheets et al. *PNAS*, (USA) 95:6157-6162 (1998)]; [Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991)]; [Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]). 인간 항체는 또한 인간 이뮤노글로불린 좌위를 트랜스제닉 동물, 예를 들어 내인성 이뮤노글로불린 유전자가 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 마우스 내로 도입함으로써 제조될 수 있다. 켈린지시, 인간 항체 생성이 관찰되며, 이는 유전자 재배열, 집합 및 항체 레퍼토리를 비롯한 모든 측면에서 인간에서 보여지는 것과 매우 흡사하다. 이러한 접근법은 예를 들어 미국 특허 제5,545,807호; 제5,545,806호; 제5,569,825호; 제5,625,126호; 제5,633,425호; 제5,661,016호, 및 하기 과학 간행물, 문헌 [Marks et al., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)]; [Lonberg et al., *Nature*, 368:856-859 (1994)]; [Morrison, *Nature*, 368:812-13 (1994)]; [Fishwild et al., *Nature Biotechnology*, 14:845-51 (1996)]; [Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14:826 (1996)]; [Lonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995)]에 기재되어 있다. 대안적으로, 인간 항체는 표적 항원에 대해 지정된 항체를 생산하는 인간 B 림프구 (이러한 B 림프구는 개체로부터 회수될 수 있거나, 시험관내에서 면역화될 수 있다)의 불멸화를 통해 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985)]; [Boerner et al., *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991)]; 및 미국 특허 제5,750,373호를 참조한다.

[0108] 본원에서 "Fc 영역"이라는 용어는 천연 서열 Fc 영역 및 변이체 Fc 영역을 비롯한 이뮤노글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 정의하는데 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 (본원에서 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따른 넘버링 시스템을 이용하여) 통상적으로 Fc 영역의 카르복실-말단에 대해 대략 위치 Cys226에서, 또는 대략 위치 Pro230으로부터의 아미노산 잔기로부터 신장되는 것으로 정의된다. 이뮤노글로불린의 Fc 영역은 일반적으로 2개의 불변 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하며, 임의로 CH4 도메인을 포함한다.

[0109] 본원에서 "Fc 영역 쇠"는 Fc 영역의 2개의 폴리펩티드 쇠 중 하나를 의미한다.

[0110] 인간 IgG Fc 영역의 "CH2 도메인" ("C_γ2" 도메인으로도 지칭됨)은 통상적으로 대략 위치 231에서의 아미노산 잔기로부터 대략 위치 340에서의 아미노산 잔기까지 확장된다. CH2 도메인은 또다른 도메인과 가깝게 쌍을 이루지 않는다는 점에서 고유하다. 오히려, 2개의 N-연결된 분지된 탄화수소쇄는 비손상 천연 IgG 분자의 2개의 CH2 도메인 사이에 개재된다. 탄화수소는 도메인-도메인 쌍에 대한 치환체를 제공하며 CH2 도메인의 안정화를 보조할 수 있다고 추측되었다 (문헌 [Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985)]). 본원에서 CH2 도메인은 천연 서열 CH2 도메인 또는 변이체 CH2 도메인일 수 있다.

[0111] "CH3 도메인"은 Fc 영역 내의 CH2 도메인에 대한 잔기 C-말단의 신장 (즉, IgG의 대략 위치 341에서의 아미노산 잔기에서부터 대략 위치 447에서의 아미노산 잔기까지)을 포함한다. 본원에서 CH3 영역은 천연 서열 CH3 도메인 또는 변이체 CH3 도메인 (예를 들어, 그의 하나의 쇠에 도입된 "돌기" 및 그의 다른 쇠에 상응하는 도입된 "공동"을 갖는 CH3 도메인; 미국 특허 제5,821,333호 참조)일 수 있다. 이러한 변이체 CH3 도메인은 본원에 기재된 바와 같은 다중특이적 (예를 들어, 이중특이적) 항체를 제조하는데 사용될 수 있다.

[0112] "힌지 영역"은 일반적으로 인간 IgG1의 대략 Glu216 또는 대략 Cys226으로부터 대략 Pro230까지의 신장으로서 정의된다 (문헌 [Burton, *Molec. Immunol.* 22:161-206 (1985)]). 다른 IgG 이소형의 힌지 영역은 동일한 위치에서의 중쇄간 S-S 결합을 형성하는 첫번째 및 마지막 시스테인 잔기를 위치시킴으로써 IgG1 서열과 함께 정렬될 수 있다. 본원에서 힌지 영역은 천연 서열 힌지 영역 또는 변이체 힌지 영역일 수 있다. 변이체 힌지 영역의 2개의 폴리펩티드 쇠는 일반적으로 폴리펩티드 쇠당 하나 이상의 시스테인 잔기를 보유하므로, 변이체 힌지 영역의 2개의 폴리펩티드 쇠는 2개의 쇠 사이에 디설피드 결합을 형성할 수 있다. 본원에서 바람직한 힌지 영역은 천연 서열 인간 힌지 영역, 예를 들어 천연 서열 인간 IgG1 힌지 영역이다.

[0113] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 하나 이상의 "효과기 기능"을 갖는다. 예시적인 "효과기 기능"으로는 C1q 결합; 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개된 세포독성 (ADCC); 포식작용; 세포 표면 수용체 (예를 들어, B 세포 수용체; BCR)의 하향 조절 등을 들 수 있다. 이러한 효과기 기능은 일반적으로 Fc 영역이 결합 도메인 (예를 들어, 항체 가변 도메인)과 결합될 것을 요구하며, 예를 들어 본원에 논의된 바와 같은 다양한 분석을 이용하여 평가될 수 있다.

[0114] "천연 서열 Fc 영역"은 천연에서 발견되는 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0115] "변이체 Fc 영역"은 하나 이상의 아미노산 변형, 바람직하게는 하나 이상의 아미노산 치환에 의해 천연 서열 Fc

영역의 그것과 상이한 아미노산 서열을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 Fc 영역은 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에 비해 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 약 1 내지 약 10개의 아미노산 치환, 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에 약 1 내지 약 5개의 아미노산 치환을 갖는다. 본원에서 변이체 Fc 영역은 바람직하게는 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 약 80% 이상의 상동성, 가장 바람직하게는 약 90% 이상의 상동성, 보다 바람직하게는 약 95% 이상의 상동성을 가질 것이다.

[0116] "항체-의존성 세포-매개된 세포독성" 및 "ADCC"는 Fc 수용체 (FcR)를 발현하는 비특이적 세포독성 세포 (예를 들어, 자연 킬러 (NK) 세포, 중성구 및 대식세포)가 표적 세포 상의 결합된 항체를 인식하고 이어서 표적 세포의 용해를 유발하는 세포-매개된 반응을 지칭한다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈 세포 상의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)]의 464면의 표 3에 요약되어 있다. 당해 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위해, 미국 특허 제5,500,362호 또는 제5,821,337호에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 분석을 수행할 수 있다. 이러한 분석에 유용한 효과기 세포의 예로는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 들 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 당해 분자의 ADCC 활성은 예를 들어 문헌 [Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)]에 기재된 바와 같은 동물 모델에서 생체내에서 평가될 수 있다.

[0117] "인간 효과기 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 효과기 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는 적어도 Fc γ RIII를 발현하며 ADCC 효과기 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예로는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 자연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 중성구를 들 수 있으며; PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. 효과기 세포는 그의 천연 공급원으로부터, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 혈액 또는 PBMC로부터 분리될 수 있다.

[0118] "Fc 수용체" 또는 "FcR"이라는 용어는 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재하는데 사용된다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 더욱이, 바람직한 FcR은 IgG 항체 (감마 수용체)에 결합하는 것이며, Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII 하위부류의 수용체, 및 상기 수용체의 대립유전자 변이체 및 별법으로 스플라이싱된 형태를 들 수 있다. Fc γ RRII 수용체로는 그의 세포질 도메인에서 주로 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는, Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 들 수 있다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기재 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인 내에 면역수용체 티로신-기재 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다 (검토를 위해 문헌 [M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)]을 참조한다). FcR은 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 검토되었다. 장래에 확인될 것들을 비롯한 다른 FcR은 본원에서 "FcR"이라는 용어에 포함된다. 상기 용어는 또한 모체 IgG를 태아에 전달하는 것을 담당하며 이뮤노글로불린의 항상성을 조절하는 신생아 수용체 FcRn을 포함한다 (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]).

[0119] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체의 존재하에서 표적을 용해시키는 분자의 능력을 지칭한다. 보체 활성화 경로는 보체 시스템 (C1q)의 제1 성분의 동족체 항원과 복합체화된 분자 (예를 들어, 항체)에의 결합에 의해 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 분석을 수행할 수 있다.

[0120] "친화도 성숙된" 항체는 변경(들)을 갖지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화도의 개선을 초래하는 하나 이상의 그의 추가변 영역 내에 하나 이상의 변경을 갖는 것이다. 바람직한 친화도 성숙된 항체는 표적 항원에 대한 나노몰 또는 심지어 피코몰 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙된 항체는 당업계에서 공지된 절차에 의해 제조된다. 문헌 [Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992)]에는 VH 및 VL 도메인 셔플링 (shuffling)에 의한 친화도 성숙이 기재되어 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 기재되어 있다.

[0121] "항체의 면역특이적 결합"에서 사용된 "면역특이적"이라는 용어는 예를 들어 항체의 항원-결합 부위 및 상기 항체에 의해 인식되는 특이적 항원 사이에 일어나는 항원 특이적 결합 상호작용을 지칭한다.

[0122] "암", "암성", "전이" 및 "악성"이라는 용어는 전형적으로 비조절된 세포 성장을 특징으로 하는 포유동물에서의 생리학적 상태를 지칭하거나 기재한다. 암의 예로는 선암종을 비롯한 암종, 림프종, 모세포종, 흑색종, 육종

및 백혈병을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 암의 보다 특정한 예로는 편평세포암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 위장관암, 호지킨 및 비-호지킨 림프종, 췌장암, 아교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암종 및 간세포암과 같은 간암, 방광암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 암종, 골수종 (예를 들어, 다발성 골수종), 타액선 암종, 신장 세포 암종 및 윌름스 종양과 같은 신장암, 기부 세포 암종, 흑색종, 전립선암, 외음암, 갑상선암, 고환암, 식도암, 및 다양한 종류의 두경부암을 들 수 있다. 본원에서 치료를 위한 바람직한 암으로는 유방암, 위암, 폐암, 결장암 또는 결장직장암, 신경아교종 및 아교모세포종을 들 수 있다.

[0123] 본 출원에 사용된 "프로드러그"라는 용어는 모 약물에 비해 암 세포에 대해 덜 세포독성인 제약 활성 물질의 전구체 또는 유도체 형태를 지칭하며, 효소적으로 활성화되거나 보다 활성인 모 형태로 전환될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986)] 및 [Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery, " Directed Drug Delivery, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985)]을 참조한다. 본 발명의 프로드러그로는 보다 활성인 무세포독성 약물로 전환될 수 있는 포스페이트-함유 프로드러그, 티오포스페이트-함유 프로드러그, 술페이트-함유 프로드러그, 펩티드-함유 프로드러그, D-아미노산-변형된 프로드러그, 글리코실화된 프로드러그, 베타-락탐-함유 프로드러그, 임의로 치환된 페녹시아세트아미드-함유 프로드러그 또는 임의로 치환된 페닐아세트아미드-함유 프로드러그, 5-플루오로시토신 및 다른 5-플루오로우리딘 프로드러그를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용하기 위한 프로드러그 형태로 유도체화될 수 있는 세포독성 약물의 예로는 하기 기재된 화학요법제를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0124] 본원에 사용된 "세포독성제"라는 용어는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/거나 세포의 파괴를 유발하는 물질을 지칭한다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 및 소분자 독소 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소적으로 활성인 독소와 같은 독소, 및 그의 단편 및/또는 변이체를 포함하는 것으로 의도된다.

[0125] "화학요법제"는 암과 같은 상태의 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예로는 알킬화제, 예를 들어 티오테파 및 시클로포스파미드 (시톡산(CYTOXAN)(등록상표)); 알킬 술포네이트, 예를 들어 부술포, 임프로술포 및 피포술포; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카르보쿠온, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸라멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세트게닌 (특히 블라타신 및 블라타시논); 캄토테신 (합성 유사체 토포테칸 (히캄틴 (HYCAMTIN(등록상표)) 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토피신 (특히 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신 (합성 유사체 KW-2189 및 CB1-TM1 포함); 엘루테레로빈; 판크라티스타틴; 사르코티딘; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들어 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예를 들어 에네디인 항생제 (예를 들어 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 χ_1^I 및 칼리케아미신 θ_1^I (예를 들어 문헌 [Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994)] 참조); 디네미신 A를 비롯한 디네미신; 에스페라미신; 및 네오키노스타틴 크로모포르 및 관련 크로모포르테인 에네디인 항생제 크로모포르), 아클라시노마이신, 악티노마이신, 오프라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신 (모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신, 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 켈라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 조루비신; 항-대사물, 예를 들어 메토평렉세이트, 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어 데노프테린, 메토평렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-머캅토피린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 5-FU; 안드로젠, 예를 들어 칼루스테론; 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스타놀, 데스톨락톤; 항-아드레날린제, 예를 들어 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스타틴; 엽산 보충제, 예를 들어 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트랙세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 마이탄시노이드, 예를 들어 마이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모

피단물; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필산; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK(등록상표); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히 T-2 독신, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘; 우레탄; 빈데신; 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 탁솔(TAXOL)(등록상표) 파클리탁셀 (미국 뉴저지주 프린스턴에 소재하는 브리스톨-마이어스 스퀴브 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology)), 및 도세탁셀 (프랑스 안토니에 소재하는 룽-플랑 로러(Rhone-Poulenc Rorer)); 클로람부실; 겐시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토피린; 메토티렉세이트; 플라티늄 유사체, 예를 들어 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴; 플라티늄; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이반드로네이트; CPT-11; 토포이소메라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노산; 카페시타빈; 임의의 상기 것들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 들 수 있다. 또한, 상기 정의에는 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하는 작용을 하는 항-호르몬제, 예를 들어 타목시펜, 탈록시펜, 아로마타제 억제 4(5)-이미다졸, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤, 및 토레미펜 (파레스톤)을 비롯한 항-에스트로겐; 및 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드, 및 고세렐린과 같은 항-안드로겐; 및 임의의 상기 것들의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체가 포함된다.

[0126] 본원에서 사용될 경우 "성장 억제제"는 세포의 성장을 시험관내 또는 생체내에서 억제하는 화합물 또는 조성물을 지칭한다. 따라서, 성장 억제제는 S기의 유전자를 과발현하는 세포의 퍼센트를 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예로는 G1 정지 및 M-기 정지를 유도하는 제제와 같은 세포 주기 진행 (S 기 이외의 장소에서)을 차단하는 제제를 들 수 있다. 전통적인 M-기 차단제로는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁솔, 및 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신과 같은 토포이소메라제 II 억제제를 들 수 있다. 정지 G1이 또한 S-기 정지 내로 넘어가는 제제는 예를 들어 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토티렉세이트, 5-플루오로우라실 및 아라-C와 같은 DNA 알킬화제이다. 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 제13면에서 발견할 수 있다.

[0127] "사이토킨"이라는 용어는 세포내 매개자로서 또다른 세포에 작용하는, 하나의 세포 집단에 의해 방출된 단백질에 대한 일반적 용어이다. 이러한 사이토킨의 예로는 림포킨, 모노킨 및 전통적인 폴리펩티드 호르몬을 들 수 있다. 사이토킨 중에 포함되는 것은 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬 및 소 성장 호르몬과 같은 성장 호르몬, 파라갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 렐락신; 프로렐락신; 난포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH) 및 황체 호르몬 (LH)과 같은 당단백질 호르몬; 간 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 프롤락틴; 태반 락토겐; 종양 괴사 인자- α 및 - β ; 물리리안-억제 물질; 마우스 생식선자극호르몬-관련 펩티드; 인히빈; 악티빈; 혈관 표피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); NGF- β 와 같은 신경 성장 인자; 혈소판-성장 인자; TGF- α 및 TGF- β 와 같은 전환 성장 인자 (TGF); 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도 인자; 인터페론- α , - β 및 - γ 와 같은 인터페론; 대식세포-CSF (M-CSF)와 같은 콜로니 자극 인자 (CSF); 과립백혈구-대식세포-CSF (GM-CSF); 및 과립백혈구-CSF (G-CSF); 인터루킨 (IL), 예를 들어 IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; TNF- α 또는 TNF- β 와 같은 종양 괴사 인자; 및 LIF 및 kit 리간드 (KL)를 비롯한 기타 폴리펩티드 인자를 들 수 있다. 본원에 사용된 사이토킨이라는 용어는 천연 공급원으로부터 또는 재조합 세포 배양물 및 천연 서열 사이토킨의 생물학적 활성 등가물로부터의 단백질을 포함한다.

[0128] "치료"는 발달을 방지하거나 장애의 병리증상을 변경하는 의도로 수행되는 개입이다. 따라서, "치료"는 표적화된 병리학적 상태 또는 장애를 예방하거나 감소 (감소)시키는 것이 목적인 치료적 처치 및 예방적 또는 방지적 수단 둘다를 지칭한다. 치료가 필요한 것은 장애를 이미 갖는 것, 뿐만 아니라 장애가 예방되어야 할 것을 포함한다. 장애의 치료에서, 치료제는 장애의 병리학적 성분의 반응의 크기를 직접적으로 감소시키거나 증가시킬 수 있거나, 다른 치료제, 예를 들어 항생제, 항진균제, 항감염제, 화학요법제 등에 의한 치료에 대해 질환을 보다 감수성있게 할 수 있다.

[0129] "유효량"이라는 용어는 병리학적 상태의 검출가능한 개선 또는 감소를 유발하거나, 유도하거나, 초래하는 WISP-1 길항제의 최소 농도이다. 암의 치료 방법에서, 유효량은 암 세포 수 또는 종양 부피의 감소를 발하거나, 유도하거나, 초래하는 것이다. 또한, "치료 유효량"은 병리학적 증상을 적어도 약화시키는데 유효할 것인, 포유동물에게 투여되는 WISP-1 길항제의 최소 농도 (양)이다.

- [0130] "만성" 투여는 연장된 시기 동안 초기 치료 효과 (활성)을 유지하도록, 급성 방식에 반해 연속적 방식으로의 인자(들)의 투여를 지칭한다. "간헐적" 투여는 연속적으로 중단 없이 행해지는 것이 아니라, 오히려 사실상 순환성인 치료이다.
- [0131] 치료의 목적을 위한 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠 또는 애완 동물을 비롯한 포유동물로 분류되는 임의의 동물, 예를 들어 개, 말, 고양이, 소, 돼지, 햄스터 등을 지칭한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.
- [0132] 1종 이상의 추가의 치료제와 "조합된" 투여는 동시 (수반) 및 임의의 순서의 연속 투여를 포함한다.
- [0133] 본원에 사용된 "담체"는 사용되는 투여량 및 농도에서 그에 노출되는 세포 또는 포유동물에 대해 무독성인 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 종종, 생리학상 허용되는 담체는 pH 완충된 수용액이다. 생리학상 허용되는 담체의 예로는 포스페이트, 시트레이트 및 다른 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산을 비롯한 항산화제; 저분자량 (약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트화제; 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당 알코올; 나트륨과 같은 염-형성 카운터이온; 및/또는 트윈(TWIN), 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 플루로닉스(PLURONICS)(등록상표), 히알루론산 (HA)과 같은 비이온성 계면활성제를 들 수 있다.
- [0134] **II. 본 발명의 방법 및 조성물**
- [0135] 하기 실시예에 추가로 기재된 바와 같이, 본 출원인은 놀랍게도 섬유모세포에서의 WISP-1의 전위적 발현이 HA 생성을 촉발함을, 즉 증가된 HA 생성이 세포 표면 및 배양 배지에서의 그의 축적을 유도함을 밝혀내었다. 세포 표면 HA는 부착-비의존성 성장 및 종양유발성을 증진시킬 수 있으며 (문헌 [Kosaki et al., Cancer Res., 59:1141-1145 (1999)]), 세포 증식의 접촉 억제에 감소시킴으로써 세포 이동을 촉진시킬 수 있다 (문헌 [Ichikawa et al., J. Invest. Dermatol., 113:935-939 (1999)]; [Itano et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 99:3609-3614 (2002)]). 히알루로난 외피 형성은 또한 세포 전이 가능성과 상호관련되었다 (문헌 [Zhang et al., Cancer Res., 55:428-433 (1995)]; [Toole et al., J. Biol. Chem., 277:4593-4596 (2002)]). HA 신타제 (HAS1, HAS2 및 HAS3) 발현의 분석은, WISP-1은 HAS2 유도를 촉진한 반면, HAS1 및 HAS3 mRNA 수준은 변화하지 않았음을 밝혀내었다. HAS2는 성장 인자 및 사이토킨 상향-조절된 HA 합성의 주요한 표적이다 (문헌 [Pienimäki et al., J. Biol. Chem., 276:20428-20435 (2001)]). HAS2의 전위적 발현은 HA 분비를 증가시키며, 히알루로난 외피 형성을 유도한다 ([Kosaki et al., 상기 문헌]). 더욱이, HAS2는 심장 형태발생 동안 표피의 중배엽으로의 히알루로난-매개된 형질전환에 중요한 것으로 믿어진다 (문헌 [Camenisch et al., J. Clin. Invest., 106:349-360 (2000)]). 표피의 중간엽으로의 전이는 또한 종양 침습 및 전이에 중요하기 때문에, HAS2는 표피 종양 진행에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 간주된다 (문헌 [Boyer et al., Biochem. Pharmacol., 60:1091-1099 (2000)]; [Hay, Acta Anat., 154:8-20 (1995)]; [Arias, Cell, 105:425-431 (2001)]). 상기 결과는 WISP-1에 의해 유도된 HA 분비가 종양 침습 및 전이에 중요할 수 있음을 지시한다.
- [0136] WISP-1은 또한 2가지 HA 수용체인 CD44 및 RHAMM의 발현을 유도하였다. HA 수용체 발현을 유도하고, HA 생성을 증가시킴으로써, WISP-1은 자가분비 및/또는 측분비 루프를 활성화시킬 수 있다. CD44 및 RHAMM과 히알루로난의 상호작용은 시험관내 세포 운동 및 증식 및 생체내 종양 성장 및 전이를 촉진시킨다 (문헌 [Turley et al., J. Biol. Chem., 277:4589-4592 (2002)]; [Sy et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol., 213:129-153 (1996)]; [Hall et al., J. Neurooncol., 26:221-229 (1995)]).
- [0137] 세포 이동에 대한 WISP-1의 효과를 세포 상처 치유에서 및 저속도 현미경에 의해 분석하였고, 데이터는 WISP-1 발현이 세포 운동을 촉진시킴을 나타내었다. 또한, 단리된 세포는 증가된 이동을 나타내었으며, 이는 WISP-1이 자가분비 메커니즘을 통해 작용할 수 있음을 시사한다. 그러나, 정제된 재조합 WISP-1은 표면에 부착될 경우 HAS2 및 CD44 발현을 촉진시킨다. 이러한 유도는 또한 WISP-1이 그의 테코린과의 상호작용을 통해 속박된 경우 증가되었다. 유사하게, WISP-1은 표면이 결합된 경우 세포 운동을 촉진시켰으며, 이는 WISP-1이 기질에 속박된 경우 또한 측분비 메커니즘을 통해 작용할 수 있음을 시사한다. 본원의 실시예는 WISP-1 유도된 세포 운동이 CD44에 의해, 항-CD44 항체로 이동을 폐지함으로써 매개되었음을 나타낸다. WISP-1 유도된 세포 운동은 또한 WISP-1 항체에 의해 억제되었다. 더욱이, WISP-1 측각주성 활성화는, 이것이 정상 섬유모세포 및 결장 선암종 세포 이동 둘다를 유도하므로 단일 세포에 대해 제한되지 않았다.

- [0138] WISP-1이 Wnt-1 하류 효과기라고 믿어지기 때문에, C57MG/Wnt-1 세포주를 NRK/WISP-1 세포에서 발견된 표현형에 대해 분석하였다. Wnt-1의 WISP-1 하류에 대한 역할과 일치하게, C57MG/Wnt-1 세포는 HAS2 및 CD44를 과발현하며, 모 세포주에 비해 보다 높은 CD44 단백질 함량을 갖는다. 또한, C57/Wnt-1 세포는 배양물 내에서 자발적으로 산개되었으며, NRK/WISP-1H 세포와 유사한 탈-분화된 방추형 형태를 입증하였다.
- [0139] 발현 분석을 또한 MMTV-Wnt-1 유방 종양의 군에서 수행하였으며, 상승된 CD44 및 HAS2 발현이 MMTV-Wnt-1 트랜스제닉 마우스로부터의 모든 유방 종양에서 검출되었다. 상기 종양에서, WISP-1 발현은 기질 섬유모세포에 편재된 반면, CD44 및 HAS2는 종양 표피 세포에 의해 발현되었다. HAS2 발현에 부정적이지만, 종양주위 기질은 높은 수준의 HA를 함유한 반면, 종양 실질은 HA에 대해서 약하게만 염색되었다. 일반적으로 섬유모세포는 HA 생성을 담당하는 것으로 여겨지지만, 기질 HA의 기원은 명백히 공지되어 있지 않다. HAS2 발현이 실질에서만 발견되었기 때문에, 본원에 개시된 실험 결과는 종양 세포가 기질에서의 HA 합성 및 침착을 담당함을 시사한다. 종양주위 기질에서의 히알루로난 축적은 몇몇 종양 종류에 빈번히 마주치며, 난소, 유방, 전립선 및 결장 선암 종에 대해 이미 보고되었다 (문헌 [Ropponen et al., Cancer Res., 58:342-347 (1998)]; [Lipponen et al., Bur. J. Cancer, 37:849-856 (2001)]; [Auvinen et al., Am. J. Pathol., 156:529-536 (2000)]; [Anttila et al., Cancer Res., 60:150-155 (2000)]). 더욱이, HA의 높은 기질 수준은 빈약한 분화, 전이성 거동 및 불리한 예후와 관련되었다.
- [0140] HA 및 CD44가 종양 침습과 관련되기 때문에, WISP-1 발현 세포의 전이 가능성은 생체내에서 평가되었다. 꼬리 접종 후, NRK/WISP-1 세포는 주사된 마우스의 폐를 용이하게 콜로니화시켰고, 침습성 종양을 형성하였다. NRK/WISP-1 세포는 유의한 전이 가능성을 나타낸 반면, NRK 세포는 그렇지 않았다. 조직학적 관찰은 NRK/WISP-1 세포가 혈관구조를 집단화시키고 폐 기도를 침습함을 밝혀내었다. 폐 콜로니화는 주사된 세포의 수, 주사 후 시간 및 WISP-1 발현에 비례하였다. 또한, 본 출원인은 전이 가능성이 CD44 및 HAS2 발현 수준과 비례하며, CD44 항체 또는 WISP-1 항체에 의한, NRK/WISP-1H 세포로 접종된 마우스의 치료는 폐에서의 종양의 수 및 크기를 크게 감소시키는 밝혀내었다. 따라서, WISP-1의 수준은 히알루로난-CD44 메카니즘을 통해 폐 콜로니화를 촉진시켰다. 이는 폐 혈관구조에 대한 전이성 세포의 전이 및 체류, 종양 성장에 대한 CD44, 및 HA와의 그의 상호작용의 중요성을 입증하는 이전의 보고와 일치한다 ([Sy et al., 상기 문헌]; [Kogerman et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 94:13233-13238 (1997)]).
- [0141] APC 또는 β -카테닌 돌연변이에 의한 Wnt 경로의 활성화가 전형적으로 결장직장암과 관련될 수 있지만, 몇몇 라인의 증거는 이것이 유방 선암종을 비롯한 다른 종류의 암에 있어서 역할을 함을 시사한다 (문헌 [Polakis, Genes Dev., 14:1837-1851 (2000)]; [Brown, Breast Cancer Res., 3:351-355 (2001)]). APC 말단절단 및 증가된 β -카테닌 수준은 인간 유방암 세포주에서 발견되었다 (문헌 [Schlosshauer et al., Carcinogenesis, 21:1453-1456 (2000)]). APC 유전자의 체세포 돌연변이는 원발성 유방암에서 발견되었다 (문헌 [Furuuchi et al., Am. J. Pathol., 156:1997-2005 (2000)]). 또한, β -카테닌 활성화 돌연변이는 마우스 유방 선암종을 촉진시킨다 (문헌 [Michaelson et al., Oncogene, 20:5525-5532 (2001)]). Wnt-1 및 β -카테닌의 상승된 수준은 침습성 관상 유방 암종에서 발견되었으며, 빈약한 예후와 상호관련된다 (문헌 [Lin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 97:4262-4266 (2000)]). 따라서, 특정 유방 선암종에서 발견된 WISP-1 발현은 Wnt 경로 활성화로부터 초래되었음이 가능하다. 본 출원인은 또한 테크넨 분석에 의해 WISP-1이 유방 및 아교 종양과 같은 암에서 과발현됨을 밝혀내었다.
- [0142] 적어도 이러한 이유로, WISP-1 길항제는 암과 같은 다양한 병리학적 장애의 치료 및 진단에 특히 유용한 것이다. 따라서, 본 발명은 세포를 목적하는 양의 WISP-1 길항제에 노출시키는 것을 포함하는, 포유동물 세포에서의 WISP-1 활성의 조절, 차단 또는 중화 방법을 제공한다. 바람직하게는, 사용되는 WISP-1 길항제의 양은 암 세포 성장, 전이 또는 운동을 감소시키거나 억제하는데 유효한 양일 것이다. 이는 예를 들어 하기 및 실시예에 기재된 방법에 따라 생체내 또는 생체외에서 달성될 수 있다. 이러한 WISP-1 길항제로 치료되는 예시적인 상태 또는 장애는 임상적으로 암으로 지칭되는 포유동물에서의 상태를 포함한다.
- [0143] 또한, 진단 방법이 본원에 제공된다. 예를 들어, 길항제는 침습성 또는 전이성 암을 검출하는데 사용될 수 있다. 길항제 분자는 예를 들어 샘플에서의 전이성 암을 검출하거나 정량화하는 분석에 사용될 수 있다. 포유동물로부터 획득된 세포와 같은 샘플은 표지된 길항제의 존재하에서 인큐베이션될 수 있으며, 샘플에 결합된 표지된 길항제의 검출이 수행될 수 있다.
- [0144] 방법에 사용될 수 있는 길항제는 WISP-1 이뮤노어드레신, WISP-1을 포함하는 융합 단백질, WISP-1의 공유적으로 변형된 형태, WISP-1 변이체, 그의 융합 단백질, 및 WISP-1 항체를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 길

항제를 제조하는데 사용될 수 있는 다양한 기술이 본원에 기재되어 있다. 예를 들어, WISP-1 폴리펩티드의 제조를 위한 방법 및 기술이 기재되어 있다. 또한, 폴리펩티드, 및 WISP-1에 대한 항체의 변형도 기재되어 있다.

[0145] 본원에 기재된 전장 천연 서열 WISP-1 폴리펩티드 이외에, WISP-1 폴리펩티드 변이체가 제조될 수 있음이 고려된다. WISP-1 변이체는 적절한 뉴클레오티드 변화를 코딩 DNA 내로 도입함으로써, 및/또는 목적하는 폴리펩티드의 합성에 의해 제조될 수 있다. 당업자는 아미노산 변화가 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키거나 막 고정화 특징을 변경시키는 것과 같은, WISP-1 폴리펩티드의 번역후 프로세스를 변경시킬 수 있다.

[0146] 본원에 기재된 WISP-1 폴리펩티드에서의 변이는 예를 들어 보존을 위한 임의의 기술 및 지침, 및 예를 들어 미국 특허 제5,364,934호에 설명된 비-보존적 돌연변이를 이용하여 제조될 수 있다. 변이는 천연 서열 폴리펩티드에 비해 아미노산 서열의 변화를 초래하는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 코돈의 치환, 결실 또는 삽입일 수 있다. 임의로, 변이는 WISP-1 폴리펩티드의 하나 이상의 도메인에서 하나 이상의 아미노산을 임의의 다른 아미노산으로 치환함에 의해서이다. 아미노산 잔기가 목적하는 활성에 부정적인 영향 없이 삽입되거나, 치환되거나, 결실될 수 있는지를 결정하는 지침은, 기지의 상동성 단백질 분자의 서열과 WISP-1 폴리펩티드의 서열을 비교하고, 높은 상동성의 영역에서 이루어진 아미노산 서열 변화의 수를 최소화시킴으로써 발견될 수 있다. 아미노산 치환은 류신을 세린으로 대체하는 것, 즉 보존적 아미노산 대체와 같은, 하나의 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 특성을 갖는 또다른 아미노산으로 대체하는 결과일 수 있다. 삽입 또는 결실은 임의로 약 1 내지 5개의 아미노산의 범위일 수 있다. 허용되는 변이는 서열 내에서 아미노산의 체계적인 삽입, 결실 또는 치환을 행하고, 생성된 변이체를 전장 또는 성숙 천연 서열에 의해 나타내어지는 활성에 대해 시험함으로써 측정될 수 있다.

[0147] WISP-1 폴리펩티드 단편이 본원에 제공된다. 이러한 단편은 N-말단 또는 C-말단에서 말단절단될 수 있거나, 예를 들어 전장 천연 서열과 비교할 경우 내부 잔기가 결여될 수 있다. 특정 단편은 WISP-1 폴리펩티드의 목적하는 생물학적 활성에 필수적이지 않은 아미노산 잔기가 결여된다.

[0148] WISP-1 폴리펩티드 단편은 임의의 다수의 통상적인 기술에 의해 제조될 수 있다. 목적하는 펩티드 단편은 화학적으로 합성될 수 있다. 대안적인 접근법은 효소적 소화에 의해, 예를 들어 단백질을 특정 아미노산 잔기에 의해 정의된 부위에서 절단하는 것으로 알려진 효소로 단백질을 처리함으로써, 또는 DNA를 적합한 제한 효소로 소화시키고, 목적하는 단편을 단리함으로써 폴리펩티드 단편을 생성하는 것을 포함한다. 또다른 적합한 기술은 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 목적하는 폴리펩티드 단편을 코딩하는 DNA 단편을 단리하고 증폭시키는 것을 포함한다. DNA 단편의 목적하는 말단을 정의하는 올리고뉴클레오티드는 PCR에서 5' 및 3' 프라이머에서 사용된다.

[0149] 특정 실시양태에서, 관심의 보존적 치환이 바람직한 치환의 표제하에 하기 표에 나타나 있다. 이러한 치환은 생물학적 활성의 변화를 초래하며, 그 후, 표에, 또는 아미노산 부류에 대해 하기에 추가로 기재된 바와 같은 보다 실질적인 변화인 명명된 예시적인 치환이 도입되고, 생성물이 스크리닝된다.

[0150] 표

원래 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

[0151]

[0152] WISP-1 폴리펩티드의 기능 또는 면역학적 확인의 실질적인 변형은 (a) 치환의 영역에서의 폴리펩티드 골격의 구조, 예를 들어 쉬트 또는 나선 형태, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는 그의 효과에 있어서 유의하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다. 천연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성을 기준으로 하기 군으로 분류된다.

[0153] (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0154] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr;

[0155] (3) 산성: asp, glu;

[0156] (4) 염기성: asn, gin, his, lys, arg;

[0157] (5) 측쇄 배향에 영향을 주는 잔기: gly, pro; 및

[0158] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0159] 비-보존적 치환은 상기 부류 중 하나의 구성원을 또다른 부류에 대해 교환하는 것을 수반할 것이다. 이러한 치환된 잔기는 또한 보존적 치환 부위 내로, 또는 보다 바람직하게는 잔류하는 (비-보존된) 부위 내로 도입될 수 있다.

[0160] 변이는 올리고뉴클레오티드-매개된 (부위-지정) 돌연변이유발, 알라닌 스캐닝, 및 PCR 돌연변이유발과 같은 당 업계에 공지된 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 부위-지정 돌연변이유발 (문헌 [Carter et al., Nucl. Acids Res., 33:4331 (1986)]; [Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)]), 카세트 돌연변이유발 (문헌 [Wells et al., Gene, 34:315 (1985)]), 제한 선택 돌연변이유발 (문헌 [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)]) 또는 다른 공지된 기술이 WISP-1 폴리펩티드 변이체 DNA를 생성하기 위해 클로닝된 DNA 상에서 수행될 수 있다.

[0161] 스캐닝 아미노산 분석은 또한 인접한 서열 중에서 하나 이상의 아미노산을 확인하는데 사용될 수 있다. 바람직한 스캐닝 아미노산 중에는 상대적으로 작고 중성인 아미노산이 있다. 이러한 아미노산은 알라닌, 글리신, 세린 및 시스테인을 포함한다. 알라닌은 이것이 베타-탄소 위의 측쇄를 제거하며 변이체의 주요측 형태를 덜 변경시키기 때문에, 전형적으로 상기 군 중에서 바람직한 스캐닝 아미노산이다 (문헌 [Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]). 알라닌은 또한, 이것이 가장 흔한 아미노산이기 때문에 전형적으로 바람직

하다. 또한, 이는 숨겨진 위치 및 노출된 위치 둘다에서 빈번히 발견된다 (문헌 [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]). 알라닌 치환이 적당한 양의 변이체를 생성하지 않을 경우, isoteric 아미노산이 사용될 수 있다.

[0162] WISP-1 폴리펩티드의 적당한 형태를 유지하는데 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기는 또한 일반적으로 세린으로 치환되어 분자의 산화적 안정성을 개선시키고 비정상적인 가교를 방지할 수 있다. 반대로, 시스테인 결합(들)이 WISP-1 폴리펩티드에 첨가되어 그의 안정성을 개선시킬 수 있다.

[0163] 하기 기재는 일차적으로 WISP-1 폴리펩티드-코딩 핵산을 함유하는 벡터로 형질전환되거나 형질감염된 세포의 배양에 의한 WISP-1 폴리펩티드의 생성에 관한 것이다. 물론, 당업계에 공지된 대안적인 방법이 WISP-1 폴리펩티드를 제조하는데 사용될 수 있음이 고려된다. 예를 들어, 적절한 아미노산 서열 또는 그의 단편은 고상 기술을 이용한 직접적 펩티드 합성에 의해 생성될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W. H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969)]; [Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)] 참조). 시험관내 단백질 합성은 수동 기술을 이용하여 또는 자동화에 의해 수행될 수 있다. 자동화된 합성은 예를 들어 어플라이드 바이오시스템스 펩티드 합성기(Applied Biosystems Peptide Synthesizer) (캘리포니아주 포스터 시티 소재)를 이용하여 제조업자의 지시를 이용하여 달성될 수 있다. WISP-1 폴리펩티드의 다양한 부분은 별개로 화학적으로 합성되고, 화학적 또는 효소적 방법을 이용하여 조합되어 목적하는 WISP-1 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 기재된 방법 및 기술은 WISP-1 변이체, WISP-1의 변형된 형태 및 WISP-1 항체의 생성에 유사하게 적용가능하다.

[0164] 1. WISP-1 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 단리

[0165] WISP-1 폴리펩티드를 코딩하는 DNA는 WISP-1 폴리펩티드 mRNA를 가지며 이를 검출가능한 수준에서 발현하는 것으로 믿어지는 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 취득될 수 있다. 따라서, 인간 WISP-1 폴리펩티드 DNA는 편리하게는 인간 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 취득될 수 있다. WISP-1 폴리펩티드-코딩 유전자는 또한 게놈 라이브러리로부터 또는 공지된 합성적 절차 (예를 들어, 자동화된 핵산 합성)에 의해 취득될 수 있다.

[0166] 라이브러리는 그에 의해 코딩되는 관심의 유전자 또는 단백질을 확인하기 위해 설계된 프로브 (예를 들어, 약 20 내지 80 염기 이상의 올리고뉴클레오타이드)로 스크리닝될 수 있다. cDNA 또는 게놈 라이브러리를 선택된 프로브로 스크리닝하는 것은 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)]에 기재된 것과 같은 표준 절차를 이용하여 수행될 수 있다. WISP-1 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 단리하는 대안적인 수단은 PCR 방법론을 이용하는 것이다 ([Sambrook et al., 상기 문헌]; [Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]).

[0167] cDNA 라이브러리를 스크리닝하는 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다. 프로브로서 선택된 올리고뉴클레오타이드 서열은 충분한 길이이며 가 양성이 최소화되도록 충분히 명백해야 한다. 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 이것이 스크리닝될 라이브러리에서 DNA에 혼성화될 때 검출될 수 있도록 표지된다. 표지화 방법은 당업계에 널리 공지되어 있으며, ³²P-표지된 ATP와 같은 방사성표지의 사용, 비오틴닐화 또는 효소 표지화를 포함한다. 온건한 엄격성 및 높은 엄격성을 비롯한 혼성화 조건은 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 제공된다.

[0168] 이러한 라이브러리 스크리닝 방법에서 확인된 서열은 젠뱅크(GenBank)와 같은 공개적인 데이터베이스 또는 다른 사실 서열 데이터베이스에 기탁되고 이용가능한 다른 공지된 서열과 비교되고 정렬될 수 있다. 분자 또는 전장 서열 전반에 걸쳐 한정된 영역 내의 서열 확인 (아미노산 또는 뉴클레오타이드 수준에서)은 당업계에 공지되고 본원에 기재된 방법을 이용하여 측정될 수 있다.

[0169] 단백질 코딩 서열을 갖는 핵산은 최초로 본원에 개시된 유래된 아미노산 서열을 이용하고, 필요할 경우 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재된 바와 같은 통상적인 프라이머 확장 절차를 이용하여, 선택된 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크리닝하여 전구체를 검출하고, cDNA 내로 역전사되지 않을 수 있는 mRNA의 중간체를 프로세싱함으로써 취득될 수 있다.

[0170] 2. 숙주 세포의 선택 및 형질전환

[0171] 숙주 세포를 WISP-1 폴리펩티드 생성에 대해 본원에 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질감염시키거나 형질전환시키며, 적절하게는 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선별하거나, 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를

증폭하기 위해 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양한다. 배지, 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 과도한 실험 없이 당업자에 의해 선택될 수 있다. 일반적으로, 세포 배양물의 생산성을 최대화하는 원리, 프로토콜 및 실시 기술은 문헌 [Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991)] 및 [Sambrook et al., 상기 문헌]에서 발견될 수 있다.

[0172] 진핵 세포 형질감염 및 원핵 세포 형질전환 방법, 예를 들어 CaCl_2 , CaPO_4 , 리포솜-매개된 및 전기천공은 당업자에게 공지되어 있다. 사용되는 숙주 세포에 따라, 형질전환은 이러한 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. [Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재된 바와 같은 열화칼슘을 이용한 칼슘 처치, 또는 전기천공은 일반적으로 원핵생물에 대해 사용된다. 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)로의 감염은 문헌 [Shaw et al., Gene, 23:315 (1983)] 및 1989년 6월 29일자로 공개된 WO 89/05859에 기재된 바와 같이 특정 식물 세포의 형질전환에 대해 사용된다. 이러한 세포벽이 없는 포유동물 세포에 대해, 문헌 [Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)]의 인산칼슘 침전 방법이 이용될 수 있다. 포유동물 세포 숙주 시스템 형질감염의 일반적인 측면은 미국 특허 제4,399,216호에 기재되었다. 효모로의 형질감염은 전형적으로 문헌 [Van Solingen et al., J. Bact., 130:946 (1977)] 및 [Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3629 (1979)]의 방법에 따라 수행된다. 그러나, 핵 미세주사, 전기천공, 비손상 세포와의 박테리아 원형질체 융합, 또는 폴리양이온, 예를 들어 폴리브렌, 폴리오르니틴에 의해서와 같은 DNA의 세포 내로의 도입을 위한 다른 방법이 또한 이용될 수 있다. 포유동물 세포의 다양한 형질전환 기술에 대해서는, 문헌 [Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)] 및 [Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988)]을 참조한다.

[0173] 본원에서 벡터에서 DNA를 클로닝하거나 발현하는데 적합한 숙주 세포로는 원핵, 효모 또는 고등 진핵 세포를 들 수 있다. 적합한 원핵생물은 그람-음성 또는 그람-양성 유기체와 같은 유박테리아, 예를 들어 이. 콜라이(*E. coli*)와 같은 장내세균과(*Enterobacteriaceae*)를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이. 콜라이 K12 균주 MM294 (ATCC 31,446); 이. 콜라이 X1776 (ATCC 31,537); 이. 콜라이 균주 W3110 (ATCC 27,325) 및 K5 772 (ATCC 53,635)와 같은 다양한 이. 콜라이 균주는 공개적으로 이용가능하다. 다른 적합한 원핵 숙주 세포로는 장내세균과, 예를 들어 에셰리키아(*Escherichia*), 예를 들어 이. 콜라이, 엔테로박터(*Enterobacter*), 에르위니아(*Erwinia*), 클레브시엘라(*Klebsiella*), 프로테우스(*Proteus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예를 들어 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 세라티아(*Serratia*), 예를 들어 세라티아 마르세스칸스(*Serratia marcescans*), 및 시겔라(*Shigella*), 및 바실러스(*Bacilli*), 예를 들어 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스(*B. licheniformis*) (예를 들어, 1989년 4월 12일자로 공개된 DD 266,710에 개시된 비. 리케니포르미스 41P), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예를 들어 피. 에루기노사(*P. aeruginosa*), 및 스트렙토마이세스(*Streptomyces*)를 들 수 있다. 상기 예는 제한적이라기 보다는 설명적이다. 균주 W3110은, 이것이 재조합 DNA 생성물 발효에 통상적인 숙주 균주이기 때문에, 바람직한 숙주 또는 모 숙주이다. 바람직하게는, 숙주 세포는 최소량의 단백질분해성 효소를 분비한다. 예를 들어, 균주 W3110은 숙주에 대해 내인성인 단백질을 코딩하는 유전자에서 유전적 돌연변이를 수행하도록 변형될 수 있으며, 이러한 숙주의 예로는 완전한 유전자형 tonA를 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 1A2; 완전한 유전자형 tonA ptr3를 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 9E4; 완전한 유전자형 tonA ptr3 phoA E15E (argF-lac) 169 degP ompT kan^r을 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 27C7 (ATCC 55,244); 완전한 유전자형 tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 HvG kan^r을 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 37D6; 비-카나마이신 저항성 degP 고갈 결실 돌연변이를 갖는 균주 37D6인 이. 콜라이 W3110 균주 40B4; 및 1990년 8월 7일자로 허여된 미국 특허 제4,946,783호에 개시된 돌연변이체 원형질막주위 프로테아제를 갖는 이. 콜라이 균주를 들 수 있다. 대안적으로, 시험관내 클로닝 방법, 예를 들어 PCR 또는 다른 핵산 중합효소 반응이 적합하다.

[0174] 원핵생물 이외에, 필라멘트성 진균 또는 효모와 같은 진핵 미생물이 WISP-1 폴리펩티드-코딩 벡터에 대한 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*)는 통상적으로 사용되는 하등 진핵 숙주 미생물이다. 다른 것으로는 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) (문헌 [Beach and Nurse, Nature, 290:140 (1981)]; 1985년 5월 2일자로 공개된 EP 139,383); 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 숙주 (미국 특허 제4,943,529호; 문헌 [Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)]), 예를 들어 케이. 락티스(*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; 문헌 [Lourencourt et al., J. Bacteriol., 154(2):737-742 (1983)]), 케이. 프라길리스(*K. fragilis*) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스(*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), 케이. 위케라미이(*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178), 케이. 왈티이(*K. waltii*) (ATCC 56,500), 케이. 드로소필라룸(*K. drosophilum*) (ATCC 36,906; 문헌 [Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135 (1990)]), 케이. 테르모톨레란스(*K. thermotolerans*), 및 케이. 마르크시아누스(*K. marxianus*); 약로위

아(yarrowia) (EP 402,226); 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) (EP 183,070; 문헌 [Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265-278 (1988)]); 칸디다(*Candida*); 트리코테르마 레에시아(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사(*Neurospora crassa*) (문헌 [Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 (1979)]); 슈와니오마이세스(*Schwanniomyces*), 예를 들어 슈와니오마이세스 옥시덴탈리스(*Schwanniomyces occidentalis*) (1990년 10월 31일자로 공개된 EP 394,538); 및 필라멘트성 진균, 예를 들어, 뉴로스포라(*Neurospora*), 페니실리움(*Penicillium*), 톨리포클라디움(*Tolypocladium*) (1991년 1월 10일자로 공개된 WO 91/00357), 및 아스페르길루스(*Aspergillus*) 속주, 예를 들어 에이. 니둘란스(*A. nidulans*) (문헌 [Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 (1983)]; [Tilburn et al., Gene, 26:205-221 (1983)]; [Yelton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 (1984)]) 및 에이. 니게르(*A. niger*) (문헌 [Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 (1985)])를 들 수 있다. Methylotropic 효모는 본원에 적합하며, 한센룰라(*Hansenula*), 칸디다, 클로에케라(*Kloeckera*), 피키아(*Pichia*), 사카로마이세스, 토룰롭시스(*Torulopsis*), 및 로도토룰라(*Rhodotorula*)로 이루어진 속으로부터 선택된 메탄올 상에서 성장할 수 있는 효모를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 부류의 효모의 예인 특정 종의 목록은 문헌 [C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982)]에서 발견될 수 있다.

[0175] 글리코실화된 WISP-1 폴리펩티드의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예로는 곤충 세포, 예를 들어 드로소필라(*Drosophila*) S2 및 스포도프테라(*Spodoptera*) Sf9, 뿐만 아니라, 식물 세포, 예를 들어 면화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 세포 배양물을 들 수 있다. 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) (모충), 애데스 에집티(*Aedes aegypti*) (모기), 애데스 알보픽투스(*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스테르(*Drosophila melanogaster*) (과일파리), 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)와 같은 숙주로부터의 많은 바쿨로바이러스 균주 및 변이체 및 상응하는 허용되는 곤충 숙주 세포가 확인되었다. 형질감염용의 다양한 바이러스 균주, 예를 들어 오토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) NPV의 L-I 변이체, 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 이용가능하며, 이러한 바이러스는 특히 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염용으로 본 발명에 따라 본원에서 바이러스로서 사용될 수 있다.

[0176] 그러나, 척추동물 세포에서 가장 흥미가 있으며, 배양물에서의 척추동물 세포의 증식은 통상적인 절차가 되었다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 주 (현탁액 배양물에서의 성장에 대해 서브클로닝된 293 또는 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 아기 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니스 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 (Sertoli) 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 간세포암 주 (Hep G2)이다.

[0177] 숙주 세포를 WISP-1 폴리펩티드 생성을 위한 상기-기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나 목적하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양한다.

[0178] 3. 복제가능한 벡터의 선택 및 사용

[0179] WISP-1 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 (예를 들어, cDNA 또는 게놈 DNA)은 클로닝 (DNA의 증폭)용 또는 발현용 복제가능한 벡터 내로 삽입될 수 있다. 다양한 벡터는 공개적으로 이용가능하다. 벡터는 예를 들어 플라스미드, 코스미드, 바이러스 입자 또는 파지의 형태일 수 있다. 적절한 핵산 서열은 다양한 절차에 의해 벡터 내로 삽입될 수 있다. 일반적으로, DNA는 당업계에 공지된 기술을 이용하여 적절한 제한 엔도뉴클레아제 부위(들) 내로 삽입된다. 벡터 성분은 일반적으로 하나 이상의 신호 서열, 복제 원점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터, 및 전사 종결 서열을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 하나 이상의 상기 성분을 함유하는 적합한 벡터의 구축은 당업자에게 공지된 표준 라이게이션 기술을 이용한다.

[0180] WISP-1은 직접적으로 뿐만 아니라, 폴리펩티드와 이중 폴리펩티드의 융합으로서 재조합적으로 생성될 수 있으며, 이는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에서 특이적 절단을 갖는 신호 서열 또는 다른 폴리펩티드

일 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나, 이는 벡터 내로 삽입된 WISP-1 폴리펩티드-코딩 DNA의 일부일 수 있다. 신호 서열은 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, Ipp, 또는 열-안정성 엔테로톡신 II 선도자의 군으로부터 선택된 원핵 신호 서열일 수 있다. 효모 분비를 위해, 신호 서열은 예를 들어 효모 인버타제 선도자, 알파 인자 선도자 (사카로마이세스 및 클루이베로마이세스 α -인자 선도자 (후자는 미국 특허 제5,010,182에 기재됨) 포함), 또는 1990년 11월 15일자로 공개된 WO 90/13646에 기재된 신호일 수 있다. 포유동물 세포 발현에서, 포유동물 신호 서열은 동일하거나 관련된 종의 분비된 폴리펩티드로부터의 신호 서열과 같은 단백질, 뿐만 아니라 바이러스 분비성 선도자의 직접적인 분비에 사용될 수 있다.

[0181] 발현 및 클로닝 벡터 둘다는 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포에서 복제될 수 있게 하는 핵산 서열을 함유한다. 이러한 서열은 다양한 박테리아, 효모 및 바이러스에 대해 널리 공지되어 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 원점은 대부분의 그람-음성 박테리아에 대해 적합하며, 2 μ 플라스미드 원점은 효모에 대해 적합하고, 다양한 바이러스 원점 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)은 포유동물 세포에서의 클로닝 벡터에 대해 유용하다.

[0182] 발현 및 클로닝 벡터는 전형적으로, 선택가능한 마커로도 지칭되는 선택 유전자를 함유할 것이다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토틱세이트 또는 테트라시클린에 대해 내성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보충하거나, (c) 복합 배지로부터 이용가능하지 않은 중요한 영양물, 예를 들어 바실러스에 대한 유전자 코딩 D-알라닌 라세마제를 공급하는 단백질을 코딩한다.

[0183] 포유동물 세포에 대한 적합한 선택가능한 마커의 예는 DHFR 또는 티미딘 키나제와 같은 WISP-1 폴리펩티드-코딩 핵산을 흡수하는데 충분한 세포의 확인을 가능하게 하는 것이다. 야생형 DHFR이 사용될 경우 적절한 숙주 세포는 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)]에 의해 기재된 바와 같이 제조되고 증식된 DHFR 활성이 결핍된 CHO 세포주이다. 효모에 사용하기에 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미드 YRp7에 존재하는 trp1 유전자이다 (문헌 [Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979)]; [Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979)]; [Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]). trp1 유전자는 트립토판에서 성장하는 능력이 결여된 효모의 돌연변이체 군주, 예를 들어, ATCC 번호 44076 또는 PEP4-1에 대한 선택 마커를 제공한다 (문헌 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]).

[0184] 발현 및 클로닝 벡터는 통상적으로 직접적 mRNA 합성에 대한 WISP-1 폴리펩티드-코딩 핵산 서열에 작동적으로 연결된 프로모터를 함유한다. 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식되는 프로모터는 널리 공지되어 있다. 원핵 숙주에 사용하기에 적합한 프로모터로는 β -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템 (문헌 [Chang et al., Mature, 275:615 (1978)]; [Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)]), 알칼리성 포스파타제, 트립토판 (trp) 프로모터 시스템 (문헌 [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980)]; EP 36,776), 및 tac 프로모터와 같은 혼성 프로모터 (문헌 [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)])를 들 수 있다. 박테리아 시스템에서 사용하기 위한 프로모터는 또한 WISP 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동적으로 연결된 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) (S. D.) 서열을 함유할 것이다.

[0185] 효모 숙주에 사용하기에 적합한 프로모터 서열의 예로는 3-포스포글리세레이트 키나제 (문헌 [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)]) 또는 다른 해당 효소 (문헌 [Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968)]; [Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)]), 예를 들어 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프룩토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소메라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오세포스페이트 이소메라제, 포스포글루코스 이소메라제 및 글루코키나제에 대한 프로모터를 들 수 있다.

[0186] 성장 조건에 의해 제어되는 전사의 추가의 이점을 갖는 유도성 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알코올 데히드로게나제 2, 이소시토크롬 C, 산 포스파타제, 질소 대사와 관련된 분해 효소, 메탈로티오네인, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 및 말토스 및 갈락토스 이용을 담당하는 효소에 대한 프로모터 영역이다. 효모 발현에 사용하기에 적합한 벡터 및 프로모터는 EP 73,657에 추가로 기재되어 있다.

[0187] 포유동물 숙주 세포에서의 벡터로부터의 WISP 폴리펩티드 전사는, 이러한 프로모터가 숙주 세포 시스템에 적합하다면, 예를 들어 폴리오마 바이러스, 폴록스 바이러스 (1989년 7월 5일자로 공개된 UK 2,211,504), 아데노바이러스 (예를 들어, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 시미안 바이러스(Simian Virus) 40 (SV40)과 같은 바이러스의 계놈으로부터, 이중 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터로부터, 및 열-쇼크 프로모터로부터 수득된 프로모터에 의해 제어된다.

- [0188] 고등 진핵생물에 의해 WISP-1 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 전사는 인헨서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가될 수 있다. 인헨서는 그의 전사를 증가시키는 프로모터에 대해 작용하는 통상적으로 약 10 내지 300 bp의 DNA의 시스-작용 요소이다. 현재, 많은 인헨서 서열이 포유동물 유전자로부터 공지되어 있다 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, 페토프로테인 및 인슐린). 그러나, 전형적으로, 진핵 세포 바이러스로부터의 인헨서가 이용될 것이다. 예로는 복제 원점의 후측 상의 SV40 인헨서 (bp 100 내지 270), 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 원점의 후측 상의 폴리오마 인헨서, 및 아데노바이러스 인헨서를 들 수 있다. 인헨서는 WISP-1 폴리펩티드 코딩 서열에 대해 위치 5' 또는 3'에서 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 부위 5'에 위치된다.
- [0189] 진핵 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 유기체로부터의 핵화된 세포)에 사용되는 발현 벡터는 또한 전사의 종결 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 통상적으로 5' 말단, 때때로 3', 진핵 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 비번역된 영역으로부터 이용가능하다. 상기 영역은 WISP-1 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA의 비번역된 부분에서 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오티드 절편을 함유한다.
- [0190] 재조합 척추동물 세포 배양에서 WISP 폴리펩티드의 합성에 적용하기에 적합한 다른 방법, 벡터 및 숙주 세포는 문헌 [Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981)]; [Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979)]; EP 117,060; 및 EP 117,058에 기재되어 있다.
- [0191] 4. 숙주 세포의 배양
- [0192] 본 발명의 WISP 폴리펩티드를 생성하는데 사용되는 포유동물 숙주 세포는 다양한 배지에서 배양될 수 있다. 햄 (Ham) F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 ((MEM), 시그마), RPMI-1640 (시그마) 및 돌베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ((DMEM), 시그마)와 같은 시판되는 배지가 숙주 세포를 배양하는데 적합하다. 또한, 당업계에 기재된 임의의 배지 (예를 들어, 문헌 [Ham and Wallace, 1979, Meth. Em. 58:44]; [Barnes and Sato 1980, Anal. Biochem. 102:255], 미국 특허 제4,767,704호; 제4,657,866호; 제4,927,762호; 또는 제4,560,655호; WO 90/03430; WO 87/00195; 미국 특허 Re. 30,985; 또는 미국 특허 제5,122,469호 (각각의 개시사항은 본원에 참고로 도입됨))이 숙주 세포를 위한 배양 배지로서 사용될 수 있다. 임의의 상기 배지는 필요할 경우 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예를 들어, 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예를 들어, 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충액 (예를 들어 HEPES), 뉴클레오시드 (예를 들어 아데노신 및 티미딘), 항체 (예를 들어 겐타마이신(Gentamycin)(상표명) 약물), 추적 요소 (마이크로몰 범위의 최종 농도로 통상적으로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨), 및 글루코스 또는 동등한 에너지원으로 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충물은 또한 당업자에게 공지된 적절한 농도에서 인큐베이션될 수 있다. 온도, pH 등과 같은 배양 조건은 발현을 위해 선택된 숙주 세포에 대해 이미 이용된 것들이며, 당업자에게 명백할 것이다.
- [0193] 5. 유전자 증폭/발현의 검출
- [0194] 유전자 증폭 및/또는 발현은 본원에 제공된 서열을 기초로, 적절하게 표지된 프로브를 이용하여, 예를 들어 mRNA의 전사를 정량화하는 통상적인 서던 블롯팅, 노던 블롯팅 (문헌 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]), 도트 블롯팅 (DNA 분석), 또는 동일계내 혼성화에 의해 샘플에서 직접적으로 측정될 수 있다. 대안적으로, DNA 이중나선, RNA 이중나선, 및 DNA-RNA 혼성 이중나선 또는 DNA-단백질 이중나선을 비롯한 특이적 이중나선을 인식할 수 있는 항체가 사용될 수 있다. 항체는 다시 표지될 수 있고, 이중나선이 표면에 결합되는 분석을 수행하여, 표면 상의 이중나선의 형성시 이중나선에 결합된 항체의 존재를 검출할 수 있다.
- [0195] 대안적으로, 유전자 발현은 유전자 생성물의 발현을 직접적으로 정량화하는 세포 또는 조직 섹션의 면역조직화학적 염색, 및 세포 배양물 또는 체액의 분석과 같은 면역학적 방법에 의해 측정될 수 있다. 샘플 체액의 면역조직화학적 염색 및/또는 분석에 유용한 항체는 모노클로날 또는 폴리클로날일 수 있으며, 임의의 포유동물에서 제조될 수 있다. 편리하게는, 항체는 본원에 제공된 DNA 서열을 기초로 천연 서열 WISP 폴리펩티드에 대해 또는 합성 폴리펩티드에 대해, 또는 WISP DNA에 융합되고 특이적 항원 에피토프를 코딩하는 외인성 서열에 대해 제조될 수 있다.
- [0196] 6. WISP 폴리펩티드의 정제
- [0197] WISP 폴리펩티드의 형태는 배양 배지로부터 또는 숙주 세포 용해물로부터 회수될 수 있다. 막-결합될 경우, 이는 적합한 세정 용액 (예를 들어 트리톤(Triton)-X 100)을 이용하여 또는 효소적 절단에 의해 막으로부터 방출

될 수 있다. WISP-1 폴리펩티드의 발현에 사용되는 세포는 동결-해동 사이클링, 초음파처리, 기계적 파괴 또는 세포 용해제와 같은 다양한 물리적 또는 화학적 수단에 의해 파괴될 수 있다.

[0198] WISP-1 폴리펩티드를 재조합 세포 단백질 또는 폴리펩티드로부터 정제하는 것이 바람직할 수 있다. 하기 절차는 적합한 정제 절차의 예시이다: 이온-교환 컬럼 상의 분별; 에탄올 침전; 역상 HPLC; 실리카 또는 DEAE와 같은 양이온-교환 수지 상의 크로마토그래피; 크로마토포커싱; SDS-PAGE; 황산암모늄 침전; 예를 들어 세파덱스(Sephadex) G-75를 이용한 겔 여과; IgG와 같은 오염물을 제거하는 단백질 A 세파로스(Sepharose) 컬럼; 및 WISP-1 폴리펩티드의 에피토프-태깅된 형태에 결합하는 금속 킬레이트화 컬럼에 의한 방법. 단백질 정제의 다양한 방법이 사용될 수 있으며, 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Deutscher, Methods in Bzymology, 182 (1990)]; [Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)]에 기재되어 있다. 선택된 정제 단계(들)는 예를 들어 사용되는 제조 공정의 성질 및 제조되는 특정 WISP-1 폴리펩티드에 의존할 것이다.

[0199] WISP-1의 가용성 형태는 본 발명의 방법에서 길항제로서 사용될 수 있다. WISP-1의 이러한 가용성 형태는 하기 기재된 바와 같은 (이뮤노글로불린, 에피토프 태그 또는 류신 지퍼에 융합시킴으로써와 같은) 변형을 포함할 수 있다. 이뮤노어드헤신 분자는 또한 본원의 방법에 사용하기 위해 고려된다. WISP-1 이뮤노어드헤신은 전장 폴리펩티드 뿐만 아니라 WISP-1 또는 그의 단편의 가용성 형태와 같은 다양한 형태의 WISP-1을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 분자는 WISP-1 폴리펩티드와 이뮤노글로불린 또는 이뮤노글로불린의 특정 영역의 융합을 포함할 수 있다. 이뮤노어드헤신의 2가 형태에 대해, 이러한 융합은 IgG 분자의 Fc 영역에 대해서일 수 있다. Ig 융합은 바람직하게는 Ig 분자 내의 하나 이상의 가변 영역 대신 폴리펩티드의 가용성 (막관통 도메인 결실되거나 불활성화된) 형태의 치환을 포함한다. 특히 바람직한 실시양태에서, 이뮤노글로불린 융합은 IgG1 분자의 힌지, CH2 및 CH3, 또는 힌지, CH1, CH2 및 CH3 영역을 포함한다. 이뮤노글로불린 융합의 생성을 위해, 또한 1995년 6월 27일자로 허여된 미국 특허 제5,428,130호 및 문헌 [Chamow et al., TIBTBCH, 14:52-60 (1996)]을 참조한다.

[0200] 가장 간단하고 가장 직접적인 이뮤노어드헤신 설계는 어드헤신 (예를 들어, WISP-1)의 결합 도메인(들)을 이뮤노글로불린 중쇄의 Fc 영역과 결합시킨다. 통상적으로, 본 발명의 이뮤노어드헤신을 제조할 경우, 어드헤신의 결합 도메인을 코딩하는 핵산은 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열의 N-말단을 코딩하는 핵산에 C-말단적으로 융합될 것이지만, N-말단 융합도 가능하다.

[0201] 전형적으로, 이러한 융합에서, 코딩된 키메라 폴리펩티드는 적어도 기능적으로 활성인 힌지인 이뮤노글로불린 중쇄의 불변 영역의 CH2 및 CH3 도메인을 보유할 것이다. 융합은 또한 불변 도메인의 Fc 부분의 C-말단, 또는 중쇄, 또는 경쇄의 상응하는 영역의 CH1에 대한 바로 N-말단에 대해 이루어진다. 융합이 이루어지는 정확한 부위는 중요하지 않으며, 특정 부위는 널리 공지되어 있고, 이뮤노어드헤신의 생물학적 활성, 분비, 또는 결합 특징을 최적화하기 위해 선택될 수 있다.

[0202] 바람직한 실시양태에서, 어드헤신 서열은 이뮤노글로불린 G1 (IgG1)의 Fc 영역의 N-말단에 융합된다. 전체 중쇄 불변 영역을 어드헤신 서열에 융합시키는 것이 가능하다. 그러나, 보다 바람직하게는, IgG Fc를 화학적으로 한정하는 과과인 절단 부위의 바로 상류의 힌지 영역에서 시작된 서열 (즉, 잔기 216, 중쇄 불변 영역의 제1 잔기를 114로 함), 또는 다른 이뮤노글로불린의 유사한 부위가 융합에 사용된다. 특히 바람직한 실시양태에서, 어드헤신 아미노산 서열은 IgG 중쇄의 (a) 힌지 영역 및 CH2 및 CH3 또는 (b) CH1, 힌지, CH2 및 CH3 도메인에 융합된다.

[0203] 이중특이적 이뮤노어드헤신에 대해, 이뮤노어드헤신은 다량체, 특히 이중이량체 또는 이중사량체로 집합된다. 일반적으로, 상기 집합된 이뮤노글로불린은 공지된 단위 구조를 가질 것이다. 염기성 4 체 구조 단위는 IgG, IgD, 및 IgE가 존재하는 형태이다. 4 체 단위는 고분자량 이뮤노글로불린에서 보고되어 있으며, IgM은 일반적으로 디설피드 결합에 의해 함께 홀딩된 4개의 기본적 단위의 오량체로서 존재한다. IgA 글로불린, 및 때때로 IgG 글로불린은 또한 혈청에서 다량체 형태로 존재할 수 있다. 다량체의 경우, 4개의 단위의 각각은 동일하거나 상이할 수 있다.

[0204] 본원의 범위 내의 다양한 예시적인 집합된 이뮤노어드헤신은 하기에 개략적으로 도표화되어 있다.

[0205] (a) AC_L-AC_L ;

[0206] (b) $AC_H-(AC_H, AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, 또는 V_LC_L-AC_H)$;

- [0207] (C) $AC_L-AC_H-(AC_L-AC_H, AC_L-V_HC_H, V_LC_L-AC_H, \text{ 또는 } V_LC_L-V_HC_H)$;
- [0208] (d) $AC_L-V_HC_H-(AC_H, \text{ 또는 } AC_L-V_HC_H, \text{ 또는 } V_LC_L-AC_H)$;
- [0209] (e) $V_LC_L-AC_H-(AC_L-V_HC_H, \text{ 또는 } V_LC_L-AC_H)$; 및
- [0210] (f) $(A-Y)_n-(V_LC_L-V_HC_H)_2$,
- [0211] 상기 식에서,
- [0212] 각각의 A는 동일하거나 상이한 부착 아미노산 서열을 나타내고;
- [0213] VL은 이뮤노글로불린 경쇄 가변 도메인이고;
- [0214] VH는 이뮤노글로불린 중쇄 가변 도메인이고;
- [0215] CL은 이뮤노글로불린 경쇄 불변 도메인이고;
- [0216] CH는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인이고;
- [0217] n은 1 초과인 정수이고;
- [0218] Y는 공유 가교제의 잔기를 나타낸다.
- [0219] 간략화의 이유로, 상기 구조는 중요한 특징만을 나타내며, 이는 이뮤노글로불린의 결합 (J) 또는 다른 도메인을 지시하지 않으며, 나타내어진 디설피드 결합도 아니다. 그러나, 이러한 도메인이 결합 활성화에 필요할 경우, 이는 이들이 이뮤노글로불린 분자에서 점령하는 통상적인 위치에 존재하도록 구축될 것이다.
- [0220] 대안적으로, 어드헤신 서열은 키메라 중쇄를 포함하는 이뮤노글로불린이 수득되도록 이뮤노글로불린 중쇄와 경쇄 서열 사이에 삽입될 수 있다. 상기 실시양태에서, 어드헤신 서열은 힌지 및 CH2 도메인 사이 또는 CH2 및 CH3 도메인 사이에서 이뮤노글로불린의 각각의 팔에 이뮤노글로불린 중쇄의 3' 말단에 융합된다. 유사한 구조물은 문헌 [Hoogenboom et al., Mol. Immunol., 28:1027-1037 (1991)]에 의해 보고되었다.
- [0221] 이뮤노글로불린 경쇄의 존재가 본 발명의 이뮤노어드헤신에 필요하지는 않지만, 이뮤노글로불린 경쇄는 어드헤신-이뮤노글로불린 중쇄 융합 폴리펩티드에 공유적으로 결합되거나, 어드헤신에 직접적으로 융합되어 존재할 수 있다. 전자의 경우, 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA는 전형적으로 어드헤신-이뮤노글로불린 중쇄 융합 단백질을 코딩하는 DNA와 공동발현된다. 분비 시, 혼성 중쇄 및 경쇄는 공유적으로 결합되어 2개의 디설피드-연결된 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍을 포함하는 이뮤노글로불린-유사 구조를 제공할 것이다. 이러한 구조의 제조에 적합한 방법은 예를 들어 1989년 3월 28일자로 허여된 미국 특허 제4,816,557호에 개시되어 있다. 이뮤노어드헤신은 가장 편리하게는 어드헤신 부분 인-프레임을 코딩하는 cDNA 서열을 이뮤노글로불린 cDNA 서열에 융합시킴으로써 구축된다. 그러나, 계능 이뮤노글로불린 단편에서의 융합이 또한 이용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Aruffo et al., Cell, 61:1303-1313 (1990)]; 및 [Stamenkovic et al., Cell, 66:1133-1144 (1991)] 참조). 융합의 후자의 형태는 발현을 위해 Ig 조절 서열의 존재를 필요로 한다. IgG 중쇄 불변 영역을 코딩하는 cDNA는 공개된 서열을 기초로 혼성화에 의해 또는 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 기술에 의해 비장 또는 말초 혈액 림프구로부터 유래된 cDNA 라이브러리로부터 단리될 수 있다. "어드헤신" 및 이뮤노어드헤신의 이뮤노글로불린 부분을 코딩하는 cDNA는 선택된 숙주 세포에서 효과적인 발현을 지정하는 플라스미드 벡터 내로 연계해서 삽입된다.
- [0222] 또다른 실시양태에서, WISP-1 또는 WISP-1 길항제는 미국 특허 제4,640,835호; 제4,496,689호; 제4,301,144호; 제4,670,417호; 제4,791,192호 또는 제4,179,337호에 설명된 방식으로 다양한 비단백질성 중합체 중 하나, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌에, 또는 폴리글루타메이트와 같은 다른 유사 분자에 수용체 폴리펩티드를 연결시킴으로써 공유적으로 변형될 수 있다. 이러한 폐길화된 형태는 당업계에 공지된 기술을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0223] 상기 분자의 류신 지퍼 형태는 또한 본 발명에 의해 고려된다. "류신 지퍼"는 그의 융합 상대 (예를 들어, 류신 지퍼가 융합되거나 연결되는 서열 또는 분자)의 이량체화 또는 삼량체화를 증진시키거나, 촉진시키거나, 유도하는 류신 풍부 서열을 지칭하는데 사용되는 당업계의 용어이다. 다양한 류신 지퍼 폴리펩티드가 당업계에 기재되었다. 예를 들어, 문헌 [Landschulz et al., Science, 240:1759 (1988)]; 미국 특허 제5,716,805호; WO 94/10308; [Hoppe et al., FBBS Letters, 344:1991 (1994)]; [Maniatis et al., Nature, 341:24 (1989)]을 참

조한다. 당업자는 류신 지퍼 서열이 WISP-1 또는 WISP-1 길항제 분자의 5' 또는 3' 말단에서 융합될 수 있음을 이해할 것이다.

- [0224] 본 발명의 WISP-1 폴리펩티드는 또한 또다른 이중 폴리펩티드 또는 아미노산 서열에 폴리펩티드를 융합시킴으로써 키메라 분자를 형성하는 방식으로 변형될 수 있다. 바람직하게는, 이러한 이중 폴리펩티드 또는 아미노산 서열은 키메라 분자를 올리고머화시키는 작용을 하는 것이다. 일 실시양태에서, 이러한 키메라 분자는 항-태그 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 에피토프를 제공하는 태그 폴리펩티드와 WISP-1 폴리펩티드의 융합을 포함한다. 에피토프 태그는 일반적으로 폴리펩티드의 아미노- 또는 카르복실-말단에 위치된다. 폴리펩티드의 이러한 에피토프-태깅된 형태의 존재는 태그 폴리펩티드에 대한 항체를 이용하여 검출될 수 있다. 또한, 에피토프 태그의 제공은 폴리펩티드가 항-태그 항체 또는 에피토프 태그에 결합하는 또다른 종류의 친화도 매트릭스를 이용한 친화도 정제에 의해 용이하게 정제될 수 있도록 한다. 다양한 tag 폴리펩티드 및 그의 각각의 항체는 당업계에 널리 공지되어 있다. 예로는 폴리-히스티딘 (poly-his) 또는 폴리-히스티딘-글리신 (poly-his-gly) 태그; flu HA 태그 폴리펩티드 및 그의 항체 12CA5 (문헌 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]); c-myc 태그 및 그에 대한 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 및 9E10 항체 (문헌 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]); 및 단순 헤르페스 바이러스 당단백질 D (gD) 태그 및 그의 항체 (문헌 [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)])를 들 수 있다. 다른 태그 폴리펩티드로는 Flag-펩티드 (문헌 [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]); KT3 에피토프 펩티드 (문헌 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]); .-튜불린 에피토프 펩티드 (문헌 [Skinner et al., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]); 및 T7 유전자 10 단백질 펩티드 태그 (문헌 [Lutz-Freyermuth et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)])를 들 수 있다.
- [0225] 항-WISP-1 항체는 또한 본원에 개시된 방법에 사용될 수 있음이 고려된다. 이러한 분자의 예로는 암 세포 성장, 전이 또는 운동을 감소시킬 수 있는 중화 또는 차단 항체를 들 수 있다. 항-WISP-1은 모노클로날 항체일 수 있다.
- [0226] 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler and Milstein, Nature, 256:495 (1975)]에 기재된 것과 같은 하이브리도마 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 하이브리도마 방법에서, 마우스, 햄스터, 또는 다른 적절한 숙주 동물은 전형적으로 면역화제에 특이적으로 결합할 항체를 생산하거나 생산할 수 있는 림프구를 유도하는 면역화제로 면역화된다. 대안적으로, 림프구는 시험관내에서 면역화될 수 있다.
- [0227] 면역화제는 전형적으로 WISP-1 폴리펩티드 또는 그의 융합 단백질, 예를 들어 WISP-1-IgG 융합 단백질을 포함할 것이다.
- [0228] 일반적으로, 말초 혈액 림프구 ("PBL")는 인간 기원의 세포가 요망될 경우 사용되거나, 비장 세포 또는 림프절 세포는 비-인간 포유동물 공급원이 요망될 경우 사용된다. 그 후, 림프구는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 적합한 융합화제를 이용하여 불멸화된 세포주로 융합되어 하이브리도마 세포를 형성한다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, (1986) pp. 59-103]). 불멸화된 세포주는 통상적으로 형질전환된 포유동물 세포, 특히 설치류, 소 및 인간 기원의 골수종 세포이다. 통상적으로, 래트 또는 마우스 골수종 세포주가 사용된다. 하이브리도마 세포는 바람직하게는 비융합된 불멸화된 세포의 성장 또는 생존을 억제하는 1종 이상의 물질을 함유하는 적합한 배양 배지에서 배양될 수 있다. 예를 들어, 부모 세포가 효소 히포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 결여될 경우, 하이브리도마를 위한 배양 배지는 전형적으로 물질이 HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지하는 히포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이다 ("HAT 배지").
- [0229] 바람직한 불멸화된 세포주는 효과적으로 융합하고, 선택된 항체-생산 세포에 의해 항체의 안정한 높은 수준 발현을 지지하는 것이며, HAT 배지와 같은 배지에 감수성이다. 보다 바람직한 불멸화된 세포주는 예를 들어 캘리포니아주 샌 디에고에 소재하는 살크 인스티튜트 세포 분포 센터(Salk Institute Cell Distribution Center), 및 버지니아주 마나사스에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)으로부터 수득될 수 있는 무린 골수종 주이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이중골수종 세포주는 또한 인간 모노클로날 항체의 생산에 대해 기재되었다 (문헌 [Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984)]; [Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]).
- [0230] 그 후, 하이브리도마 세포가 배양되는 배양 배지를 WISP-1에 대해 지정된 모노클로날 항체의 존재에 대해 분석할 수 있다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생산된 모노클로날 항체의 결합 특이성은 면역침전에 의해 또는 시험관내 결합 분석, 예를 들어 방사성면역분석 (RIA) 또는 효소-결합 면역흡착 분석 (ELISA)에 의해

측정된다. 이러한 기술 및 분석은 당업계에 공지되어 있다. 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson and Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980)]의 스캐차드(Scatchard) 분석에 의해 측정될 수 있다.

[0231] 목적하는 하이브리도마 세포를 확인한 후, 클론을 희석 절차를 제한함으로써 서브클로닝하고, 표준 방법에 의해 성장시킬 수 있다 ([Goding, 상기 문헌]). 상기 목적에 적합한 배양 배지로는 예를 들어 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 또는 RPMI-1640 배지를 들 수 있다. 대안적으로, 하이브리도마 세포는 포유동물에서의 복수와 같은 생체내에서 성장될 수 있다.

[0232] 서브클론에 의해 분리된 모노클로날 항체는 예를 들어 단백질 A-세파로스, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 또는 친화도 크로마토그래피와 같은 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차에 의해 배양 배지 또는 복수로부터 분리되거나 정제될 수 있다.

[0233] 모노클로날 항체는 또한 미국 특허 제4,816,567호에 기재된 것과 같은 재조합 DNA 방법에 의해 제조될 수 있다. 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 이용하여 (예를 들어, 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 이용함으로써) 용이하게 분리되고 시퀀싱될 수 있다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서 기능한다. 일단 분리되면, DNA는 발현 벡터 내로 위치될 수 있고, 그 후 이를 이. 콜라이 세포, 시미안 COS 세포, 차이니스 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 다르게는 이뮤노글로불린 단백질을 생성하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주 세포 내로 형질감염시켜 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체의 합성을 얻을 수 있다. DNA는 또한 예를 들어 동종 무린 서열 대신 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인을 코딩 서열로 치환함으로써, 또는 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 이뮤노글로불린 코딩 서열에 공유적으로 결합시킴으로써 변형될 수 있다 (문헌 [Morrison, et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 81, 6851 (1984)]).

[0234] 전형적으로, 이러한 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드로 항체의 불변 도메인을 치환하거나, 이들로 항체의 하나의 항원-결합 부위의 가변 도메인을 치환하여, 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원-결합 부위 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 또다른 항원-결합 부위를 포함하는 키메라 이가 항체를 생성한다.

[0235] 키메라 또는 혼성 항체는 또한 가교제를 포함하는 것을 비롯한 합성적 단백질 화학에 공지된 방법을 이용하여 시험관내에서 제조될 수 있다. 예를 들어, 이뮤노톡신은 디설피드 교환 반응을 이용하여 또는 티오에테르 결합을 형성함으로써 구축될 수 있다. 상기 목적에 적합한 시약의 예로는 이미노티올레이트 및 메틸-4-머캅토부트리이미데이트를 들 수 있다.

[0236] 단일쇄 Fv 단편은 또한 문헌 [Iliades et al., FBBS Letters, 409:437-441 (1997)]에 기재된 것과 같이 제조될 수 있다. 다양한 링커를 이용한 이러한 단일쇄 단편의 커플링은 문헌 [Kortt et al., Protein Engineering, 10:423-433 (1997)]에 기재되어 있다. 항체의 재조합 생성 및 조작을 위한 다양한 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다. 당업자에 의해 전형적으로 이용되는 이러한 기술의 예시적인 예는 하기에 보다 상세히 기재되어 있다.

[0237] (i) 인간화 항체

[0238] 일반적으로, 인간화 항체는 비-인간 공급원으로부터 그 내로 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 상기 비-인간 아미노산 잔기는 종종 "유입" 잔기로 지칭되며, 이는 전형적으로 "유입" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는 본질적으로 윈터(Winter) 및 공동-연구자의 방법에 따라, 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 인간 항체의 상응하는 서열을 치환함으로써 수행될 수 있다 (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)]).

[0239] 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 실질적으로 보다 적은 비손상 인간 가변 도메인이 비-인간 종으로부터의 상응하는 서열에 의해 대체된 키메라 항체이다. 실제로, 인간화 항체는 전형적으로 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체에서 유사한 부위로부터의 잔기에 의해 치환된 인간 항체이다.

[0240] 항체가 항원에 대한 고 친화도 및 다른 바람직한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화되는 것은 또한 중요하다. 상기 목적을 달성하기 위해, 바람직한 방법에 따르면, 인간화 항체를 모 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하여 모 서열 및 다양한 개념적인 인간화 생성물의 분석의 방법에 의해 제조한다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 이용가능하며, 당업자에게 익숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 형태적 구조를 예시 및 제시하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 상기 디스플레이의 점검은 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능화에 있어서 잔기의 가능한 역할의 분석, 즉 후보 이뮤노글로불린의 그의 항원에 결합하는 능력에 영향을 주는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방식으로, FR 잔기를 선택하고, 수여자 및 도입 서열로부터 결

합하여 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도와 같은 목적하는 항체 특징이 달성되도록 할 수 있다. 일반적으로, CDR 잔기는 직접적으로, 그리고 가장 실질적으로 항원 결합에 영향을 주는 것에 관여한다.

[0241] (ii) 인간 항체

[0242] 인간 모노클로날 항체는 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있다. 인간 모노클로날 항체에 대한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는 예를 들어 문헌 [Kozbor, J. Immunol. 133, 3001 (1984)], 및 [Brodeur, et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)]에 의해 기재되었다.

[0243] 면역화시 내인성 이뮤노글로불린 생성의 부재하에서 인간 항체의 완전 레퍼토리를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)를 생산하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 생식 계열 돌연변이체 내의 항체 중쇄 결합 영역 (J_H)의 동종접합성 결실이 내인성 항체 생산의 완전한 억제를 초래한다고 기재되었다. 이러한 생식 계열 돌연변이체 마우스 내의 인간 생식 계열 이뮤노글로불린 유전자 어레이의 전달은 항원 접종시 인간 항체의 생산을 초래할 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)]을 참조한다.

[0244] 문헌 [Mendez et al. Nature Genetics 15:146-156 [1997]은 기술을 추가로 개선시켰으며, 항원으로 쉐린지될 경우 고 친화도 완전 인간 항체를 생성하는 "제노마우스(Xenomouse) II"로 명명된 트랜스제닉 마우스의 주를 생성하였다. 이는 상기 기재된 바와 같은 내인성 J_H 절편 내로의 결실을 갖는 메가베이스 인간 중쇄 및 경쇄 좌위의 마우스 내로의 생식-계열 통합에 의해 달성되었다. 제노마우스 II는 대략 66 V_H 유전자, 완전 D_H 및 J_H 영역 및 3개의 상이한 불변 영역 (μ , δ 및 χ)을 함유하는 1,020 kb의 인간 중쇄 좌위를 가지며, 또한 32 V_K 유전자, J_K 절편 및 C_K 유전자를 함유하는 800 kb의 인간 κ 좌위를 갖는다. 상기 마우스에서 생산된 항체는 유전자 재배열, 집합체 및 레퍼토리를 비롯한 모든 관점에서 인간에서 보여지는 것과 매우 흡사하다. 인간 항체는 무린 좌위에서 유전자 재배열을 방지하는 내인성 J_H 절편에서의 결실로 인한 내인성 항체에 비해 선호적으로 발현된다.

[0245] 대안적으로, 파지 제시 기술 (문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)]을 이용하여 인간 항체 및 항체 단편을 비면역화된 공여자로부터의 이뮤노글로불린 가변 (V) 도메인 유전자로부터 시험관내에서 생산할 수 있다. 상기 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자를 프레임 내에서 M13 또는 fd와 같은 필라멘트성 박테리오파지의 주요 또는 부 코딩 단백질 유전자 내로 클로닝하고, 파지 입자의 표면 상에 기능적 항체 단편으로서 제시한다. 필라멘트성 입자가 파지 게놈의 단일-가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 특성을 기재로 하는 선별은 또한 상기 특성을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자의 선별을 초래한다. 따라서, 파지는 B-세포의 특성의 일부를 모방한다. 파지 제시는 다양한 형태로 수행될 수 있으며, 그의 검토를 위해서는 예를 들어 문헌 [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)]을 참조한다. V-유전자 절편의 몇몇 공급원은 파지 제시에 사용될 수 있다. 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)]에서는 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 작은 무작위 조합 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이를 단리하였다. 비면역화된 인간 공여자로부터의 V 유전자의 레퍼토리를 구축할 수 있으며, 항원의 다양한 어레이에 대한 항체 (자가-항원 포함)은 문헌 [Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)], 또는 [Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라 본질적으로 단리할 수 있다. 천연 면역 반응에서, 항체 유전자는 고속으로 돌연변이를 축적한다 (체세포 과다돌연변이). 도입된 변화의 일부는 보다 높은 친화도를 부여할 것이며, 고-친화도 표면 이뮤노글로불린을 제시하는 B 세포는 후속 항원 쉐린지 동안 선호적으로 복제되고 분화된다. 상기 천연 프로세스는 "사슬 셔플링(chain shuffling)"으로 공지된 기술을 이용함으로써 모방될 수 있다 (문헌 [Marks et al., Bio/Technol. 10, 779-783 [1992]]). 상기 방법에서, 파지 제시에 의해 수득된 "일차" 인간 항체의 친화도는 중쇄 및 경쇄 V 영역 유전자를 비면역화된 공여자로부터 수득된 V 도메인 유전자의 천연 발생 변이체의 레퍼토리 (레퍼토리)로 실질적으로 대체함으로써 개선될 수 있다. 상기 기술은 nM 범위의 친화도로 항체 및 항체 단편의 생성을 가능하게 한다. 매우 큰 파지 항체 레퍼토리 ("모든 라이브러리의 어머니"로도 공지됨)의 제조를 위한 전략은 문헌 [Waterhouse et al., Nucl. Acids Res. 21, 2265-2266 (1993)]에 의해 기재되었다. 유전자 셔플링은 또한 설치류 항체로부터 인간 항체를 유도하는데 사용될 수 있으며, 인간 항체는 출발 설치류 항체에 대한 유사한 친화도 및 특이성을 갖는다. "에피토프 각인"으로도 지칭되는 상기 방법에 따르면, 파지 제시 기술에 의해 수득된 설치류 항체의 중쇄 또는 경쇄 V 도메인 유전자는 설치류-인간 키메라를 생성하는 인간 V 도메인 유전자의 레퍼토리로 대체된다. 항원에 대한 선택은 기능적 항원-결합 부위를 복구할 수 있는 인간 가변의 단리를 초래하며, 즉 에피토프

프는 상대의 선택을 지배한다 (각인시킨다). 잔류하는 설치류 V 도메인을 대체하기 위해 프로세스가 반복될 경우, 인간 항체가 수득된다 (1993년 4월 1일자로 공개된 PCT 특허 출원 WO 93/06213). CDR 그래프팅에 의한 설치류 항체의 전통적인 인간화와 다르게, 상기 기술은 설치류 기원의 프레임워크 또는 CDR 잔기를 갖지 않는 완전한 인간 항체를 제공한다.

[0246] 하기 논의된 바와 같이, 본 발명의 항체는 임의로 단량체성 항체, 이량체성 항체, 및 항체의 다량 형태를 포함할 수 있다. 당업자는 당업계에 공지된 기술에 의해 이러한 이량체 또는 다량 형태를 구축할 수 있다. 다량 항체의 제조 방법은 또한 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 하나의 방법은 이뮤노글로불린 경쇄 및 변형된 중쇄의 재조합 발현을 포함한다. 중쇄는 중쇄 가교를 방지하도록 일반적으로 fc 영역의 임의의 위치에서 말단 절단된다. 대안적으로, 관련된 시스템인 잔기는 또다른 아미노산 잔기로 치환되거나, 가교를 방지하도록 결실된다.

[0247] (iii) 이중특이적 항체

[0248] 이중특이적 항체는 2개 이상의 상이한 항원에 대한 결합 특이성을 갖는 모노클로날, 바람직하게는 인간 또는 인간화 항체이다. 본 경우에, 결합 특이성 중 하나는 WISP-1에 대한 것이다. 예를 들어, WISP-1 또는 WISP-1 변이체 및 또다른 CNN 족 구성원 (예를 들어, WISP-2, WISP-3, CTGF, Cyr61, 또는 Nov) 또는 CD44와 같은 다른 분자에 특이적으로 결합하는 이중특이적 항체는 본 발명의 범위 내에 있다.

[0249] 이중특이적 항체의 제조 방법은 당업계에 공지되어 있다. 전장 이중특이적 항체의 전통적인 제조는 2개의 쇄가 상이한 특이성을 갖는 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍의 공동발현에 기재한다 (문헌 [Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983)]). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위적 구분 때문에, 상기 하이브리도마 (과드로마)는 단지 하나만이 정확한 이중특이적 구조를 갖는 10개의 상이한 항체 분자의 잠재적인 혼합물을 생산한다. 통상적으로 친화도 크로마토그래피 단계에 의해 수행되는 정확한 분자의 정제는 다소 번거로우며, 생성물 수율은 낮다. 유사한 절차는 WO 93/08829 (1993년 5월 13일자로 공개됨) 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO, 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0250] 상이하고 더욱 바람직한 접근법에 따르면, 목적하는 결합 특이성을 갖는 항체 가변 도메인 (항체-항원 결합 부위)는 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 융합은 바람직하게는 힌지, CH2 및 CH3 영역의 적어도 일부를 포함하는 이뮤노글로불린 중쇄 불변 도메인을 갖는다. 이는 하나 이상의 융합물에 존재하는 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)을 갖는 것이 바람직하다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합물, 및 필요할 경우 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA는 별개의 발현 벡터 내로 삽입되며, 적합한 숙주 유기체 내로 공동-형질감염된다. 이는 구축에 사용되는 3개의 폴리펩티드 쇄의 비동일한 비율이 최적 수율을 제공하는 실시예에서, 3개의 폴리펩티드의 상호 비율을 조정하는 큰 융통성을 제공한다. 그러나, 2개 이상의 폴리펩티드 쇄의 동일한 비율의 발현이 높은 수율을 초래할 경우 또는 비율이 특정 유의성이 없는 경우, 하나의 발현 벡터 내의 2개 또는 모든 3개의 폴리펩티드 쇄에 대한 코딩 서열을 삽입하는 것이 가능하다. 상기 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 하나의 팔에 제1 결합 특이성을 갖는 혼성 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른 팔에 혼성 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공함)으로 이루어진다. 상기 비대칭 구조는, 이중특이적 분자의 단지 절반 내의 이뮤노글로불린 경쇄의 존재가 용이한 분리 방법을 제공하기 때문에, 목적하는 이중특이적 화합물의 원하지 않는 이뮤노글로불린 쇄 조합물로부터의 분리를 용이하게 한다. 상기 접근법은 1994년 3월 3일자로 공개된 WO 94/04690에 개시되어 있다.

[0251] 이중특이적 항체를 생성하는 보다 상세한 내용에 대해서는 예를 들어 문헌 [Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0252] (iv) 헤테로컨쥬게이트 항체

[0253] 헤테로컨쥬게이트 항체는 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 헤테로컨쥬게이트 항체는 2개의 공유적으로 결합된 항체로 이루어진다. 이러한 항체는 예를 들어 면역계 세포를 원하지 않는 세포에 표적화시키고 (미국 특허 제 4,676,980호), HIV 감염의 치료를 위한 것으로 제안된다 (WO 91/00360, WO 92/200373 및 EP 03089). 헤테로컨쥬게이트 항체는 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 적합한 가교제는 당업계에 널리 공지되어 있으며, 다수의 가교 기술과 함께 미국 특허 제4,676,980호에 개시되어 있다.

[0254] (v) 항체 단편

[0255] 특정 실시양태에서, 항-WISP-1 항체 (뮤린, 인간 및 인간화 항체, 및 항체 변이체 포함)는 항체 단편이다. 항체 단편의 제조를 위한 다양한 기술이 발달되었다. 전통적으로, 상기 단편은 비손상 항체의 단백질분해성 소화

를 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, 상기 단편은 현재 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 별법으로, Fab'-SH 단편을 이. 콜라이로부터 직접적으로 회수하고, 화학적으로 커플링시켜 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 또다른 접근법에 따르면, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접적으로 단리될 수 있다. 항체 단편을 제조하는 다른 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 예를 들어, 소화는 파파인을 이용하여 수행될 수 있다. 파파인 소화의 예는 1994년 12월 22일자로 공개된 WO 94/29348 및 미국 특허 제4,342,566호에 기재되어 있다. 항체의 파파인 소화는 전형적으로 각각 단일 항원 결합 부위를 갖는 Fab 단편으로 지칭되는 2개의 동일한 항원 결합 단편, 및 잔여 Fc 단편을 생성한다. 펩신 처리는 2개의 항원 결합 부위를 가지며 여전히 항원을 가교시킬 수 있는 F(ab')₂ 단편을 생성한다.

- [0256] Fab 단편은 또한 경쇄의 불변 도메인 및 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)을 함유한다. Fab' 단편은 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 중쇄 CH1 도메인의 카르복시 말단에 소수의 잔기가 첨가된 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 하나 이상의 유리 티올기를 갖는 Fab'에 대한 본원의 지칭이다. F(ab')₂ 항체 단편은 원래 그들 사이에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로서 생성되었다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링도 공지되어 있다.
- [0257] 항체는 그의 불변 영역에서 보존된 위치에서 글리코실화된다 (문헌 [Jefferis and Lund, Chem. Immunol. 65:111-128 (1997)]; [Wright and Morrison, TibTECH 15:26-32 (1997)]). 이뮤노글로불린의 올리고당류 측쇄는 단백질의 기능 (문헌 [Boyd et al., Mol. Immunol. 32:1311-1318 (1996)]; [Wittwe and Howard, Biochem. 29:4175-4180 (1990)]), 및 형태에 영향을 주며 당단백질의 3차원 표면을 제시할 수 있는 당단백질의 부분 사이의 분자내 상호작용 ([Hefferis and Lund, 상기 문헌]; [Wyss and Wagner, Current Opin. Biotech. 7:409-416 (1996)])에 영향을 준다. 올리고당류는 또한 특이적 인식 구조를 기초로 특정 분자에 대해 주어진 당단백질을 표적화하는 기능을 할 수 있다. 예를 들어, 아가락토실화된 IgG에서, 올리고당류 잔기는 CH2내 공간으로부터 '플립'되며, 말단 N-아세틸글루코사민 잔기는 만노스 결합 단백질에 결합하는데 이용가능하게 된다고 보고되었다 (문헌 [Malhotra et al., Nature Med. 1:237-243 (1995)]). 차이니스 햄스터 난소 (CHO) 세포에서 생성된 CAMPATH-1H (인간 림프구의 CDw52 항원을 인식하는 재조합 인간화 무린 모노클로날 IgG1 항체)로부터 올리고당류의 글리코펩티다제에 의한 제거는 완전 매개된 용해 (CMCL)의 완전한 감소를 초래한 반면 (문헌 [Boyd et al., Mol. Immunol. 2:1311-1318 (1996)]), 뉴라미니다제를 이용한 시알산 잔기의 선택적 제거는 DMCL의 소실을 초래하지 않았다. 항체의 글리코실화는 또한 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)에 영향을 주는 것으로 보고되었다. 특히, 이등분화 GlcNAc의 형성을 촉매하는 글리코실트랜스퍼라제인 β (1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII)의 테트라시클린-조절된 발현을 갖는 CHO 세포는 개선된 ADCC 활성을 갖는 것으로 보고되었다 (문헌 [Umana et al., Mature Biotech. 17:176-180 (1999)]).
- [0258] 항체의 글리코실화 변이체는 항체의 글리코실화 패턴이 변경된 변이체이다. 변경은 항체에서 발견된 하나 이상의 탄수화물 잔기를 결실시키고, 하나 이상의 탄수화물 잔기를 항체에 첨가하고, 글리코실화의 조성 (글리코실화 패턴), 글리코실화의 정도 등을 변화시키는 것을 의미한다. 글리코실화 변이체는 예를 들어 하나 이상의 글리코실화 부위를 항체를 코딩하는 핵산 서열에서 제거하고/거나, 변화시키고/거나 첨가함으로써 제조될 수 있다.
- [0259] 항체의 글리코실화는 전형적으로 N-연결 또는 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 부분이 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착되는 것을 지칭한다. 트리펩티드 서열인 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (여기서, X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 부분의 아스파라긴 측쇄에의 효소적 부착을 위한 인식 서열이다. 따라서, 폴리펩티드 내에 상기 트리펩티드 서열 중 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 부위를 생성한다. O-연결된 글리코실화는 당, 즉 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록실리신도 사용될 수 있다.
- [0260] 글리코실화 부위의 항체에의 첨가는 편리하게는 이것이 하나 이상의 상기 기재된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위에 대해). 변경은 또한 원래 항체의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 첨가 또는 그것으로의 치환에 의해 이루어질 수 있다 (O-연결

된 글리코실화 부위에 대해).

- [0261] 항체의 글리코실화 (글리코실화 패턴 포함)는 또한 기초적인 뉴클레오타이드 서열을 변경시킴 없이 변경될 수 있다. 글리코실화는 항체를 발현하는데 사용되는 숙주 세포에 크게 의존한다. 재조합 당단백질의 발현에 사용되는 세포 종류, 예를 들어 잠재적 치료제로서의 항체가 천연 세포에 드물기 때문에, 항체의 글리코실화 패턴의 유의한 변화가 예상될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Hse et al., J. Biol. Chem. 272:9062-9070 (1997)]). 숙주 세포의 선택 이외에, 항체의 재조합 생성 동안 글리코실화에 영향을 주는 인자로는 성장 방식, 배지 유형, 배양 밀도, 산소화, pH, 정제 계획 등을 들 수 있다. 올리고당류 제조에 관여하는 특정 효소를 도입하거나 과발현하는 것을 비롯한 특정 숙주 유기체에서 달성된 글리코실화 패턴을 변경시키는 다양한 방법이 제안되었다 (미국 특허 제5,047,335호; 제5,510,261호 및 제5,278,299호). 글리코실화, 또는 특정 종류의 글리코실화는 예를 들어 엔도글리코시다제 H (엔도 H)를 이용하여 당단백질로부터 효소적으로 제거될 수 있다. 또한, 재조합 숙주 세포는 유전학적으로 조작될 수 있으며, 예를 들어 특정 종류의 다당류를 가공하는데 결합하도록 할 수 있다. 상기 및 유사한 기술은 당업계에서 널리 공지되어 있다.
- [0262] 항체의 글리코실화 구조는 액틴 크로마토그래피, NMR, 질량 분광법, HPLC, GPC, 당당류 조성 분석, 연속적 효소적 소화, 및 전하를 기초로 다당류를 분리하는 고 pH 음이온 교환 크로마토그래피를 이용하는 HPAEC-PAD를 비롯한 탄수화물 분석의 통상적인 기술에 의해 용이하게 분석될 수 있다. 분석 목적을 위한 다당류의 방출 방법은 또한 공지되어 있으며, 효소적 처리 (통상적으로 펩티드-N-글리코시다제 F/엔도-β-갈락토시다제를 이용하여 수행됨), 주로 O-연결된 구조를 방출하는 엄격한 알칼리성 환경을 이용한 제거, 및 N- 및 O-연결된 다당류 둘다를 방출하는 무수 히드라진을 이용한 화학적 방법을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0263] 트리아바디(Triaboy)는 또한 본 발명의 범위 내에 있다. 이러한 항체는 예를 들어 [Iliades et al., 상기 문헌] 및 [Kortt et al., 상기 문헌]에 기재되어 있다.
- [0264] 본 발명의 항체는 세포독성제 (독소 분자와 같은), 또는 프로드러그 (예를 들어, 펩티드 화학요법제, WO81/01145 참조)를 활성 항암 약물로 전환시키는 프로드러그-활성화 효소에 항체를 컨쥬게이션시킴으로써 변형될 수 있다. 예를 들어, WO 88/07378 및 미국 특허 제4,975,278호를 참조한다. 상기 기술은 "항체 의존성 효소 매개된 프로드러그 요법 (ADEPT)"으로도 지칭된다.
- [0265] ADEPT에 유용한 이뮤노컨쥬게이트의 효소 성분은 이를 그의 보다 활성인 세포독성 형태로 전환시키도록 하는 방식으로 프로드러그에 작용할 수 있는 임의의 효소를 포함한다. 본 발명의 방법에 유용한 효소로는 포스페이트-함유 프로드러그를 유리 약물로 전환시키는데 유용한 알칼리성 포스파타제; 술포이트-함유 프로드러그를 유리 약물로 전환시키는데 유용한 아릴술포타제; 무독성 5-플루오로시토신을 항암 약물인 5-플루오로우라실로 전환시키는데 유용한 시토신 데아미나제; 펩티드-함유 프로드러그를 유리 약물로 전환시키는데 유용한 프로테아제, 예를 들어 세라티아 프로테아제, 테르몰리신, 서브틸리신, 카르복시펩티다제 및 카텝신 (예를 들어, 카텝신 B 및 L); 카스파제-3과 같은 카스파제; D-아미노산 치환기를 함유하는 프로드러그를 전환시키는데 유용한 D-알라닐카르복시펩티다제; 글리코실화된 프로드러그를 유리 약물로 전환시키는데 유용한 탄수화물-절단 효소, 예를 들어 베타-갈락토시다제 및 뉴라미니다제; 베타-락탐으로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 베타-락타마제; 및 그의 아민 질소에서 각각 페녹시아세틸 또는 페닐아세틸기로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 페니실린 아마이드제, 예를 들어 페니실린 V 아마이드제 또는 페니실린 G 아마이드제를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 대안적으로, 당업계에 "아브자임(abzyme)"으로도 공지된 효소적 활성을 갖는 항체는 본 발명의 프로드러그를 유리 활성 약물로 전환시키는데 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Massey, Nature 328:457-458 (1987)] 참조). 항체-아브자임 컨쥬게이트는 아브자임의 중앙 세포 집단에의 전달에 대해 본원에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.
- [0266] 효소는 이중이관능성 가교 시약의 사용과 같은 당업계에 널리 공지된 기술에 의해 항체에 공유적으로 결합될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 효소의 적어도 기능적으로 활성인 부분에 연결된 본 발명의 항체의 적어도 항원 결합 영역을 포함하는 융합 단백질은 당업계에 널리 공지된 재조합 DNA 기술을 이용하여 구축될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Neuberger et al., Nature, 312:604-608 (1984)] 참조).
- [0267] 추가의 항체 변형은 본원에서 고려된다. 예를 들어, 항체는 다양한 비단백질성 중합체 중 하나, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리옥시알킬렌, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 폴리프로필렌 글리콜의 공중합체에 연결될 수 있다. 항체는 또한 예를 들어 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐)에서, 또는 매크로에멀전에서, 코아세르베이션 기술에 의해, 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐 (예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및

폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐) 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)]에 개시되어 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)]에 개시되어 있다. 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 제5,739,277호에 기재된 바와 같은 항체 (특히, 항체 단편) 내로 구출 수용체 결합 에피토프를 혼입시킬 수 있다. 본원에 사용된 "구출 수용체 결합 에피토프"라는 용어는 IgG 분자의 생체내 혈청 반감기의 증가를 담당하는 IgG 분자 (예를 들어, IgG1, IgG2/IgG3, 또는 IgG4)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다.

[0268] 제제

[0269] 본원에 기재된 WISP-1 길항제는 담체 중에서 임의로 사용된다. 적합한 담체 및 그의 제제는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th ed., 1980, Mack Publishing Co., edited by Oslo et al.]에 기재되어 있다. 전형적으로, 제약상 허용되는 염의 적절한 양은 제제를 등장성이 되도록 하기 위해 담체에 사용된다. 담체의 예로는 살린, 링거 용액 및 텍스트로스 용액을 들 수 있다. 담체의 pH는 바람직하게는 약 5 내지 약 8, 보다 바람직하게는 약 7.4 내지 약 7.8이다. 예를 들어 투여 경로 및 투여될 활성제의 농도에 따라 특정 담체가 보다 바람직할 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 담체는 동결건조된 제제 또는 수용액의 형태일 수 있다.

[0270] 허용가능한 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수여자에게 무독성이며, 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 보존제 (예를 들어 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 당류; 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 비롯한 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트화제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 카운터-이온; 및/또는 트윈(TWEEN)(상표명), 플루로닉스(PLURONICS)(상표명) 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제를 들 수 있다.

[0271] 제제는 또한 치료될 특정 증상에 필요한 1종 이상의 활성 화합물, 바람직하게는 서로 악영향을 주지 않는 보충적 활성을 갖는 것들을 함유할 수 있다.

[0272] 본원에 기재된 길항제는 또한 예를 들어 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어 리포솜, 알부민 미소구, 마이크로에멀전, 나노-입자 및 나노캡슐)에서, 또는 매크로에멀전에서, 코아세르베이션 기술에 의해, 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Oslo, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

[0273] 생체내 투여에 사용되는 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0274] 서방형 제제는 제조될 수 있다. 서방형 제제의 적합한 예는 매트릭스가 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐 형태인 항체를 함유하는 고형 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함한다. 서방형 매트릭스의 예로는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드 (미국 특허 제3,773,919호), L-글루탐산과 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예를 들어 루프론 데포(LUPRON DEPOT)(상표명) (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 미소구) 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 들 수 있다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜산과 같은 중합체는 100일 동안에 걸쳐 분자의 방출을 가능하게 하는 반면, 특정 히드로겔은 보다 짧은 시간 동안 단백질을 방출한다.

[0275] 치료 방식

[0276] 본원에 기재된 분자는 암과 같은 다양한 병리학적 상태의 치료에 유용하다. 상기 상태는 본원에 기재된 하나 이상의 길항제의 투여에 의해 치료될 수 있다.

[0277] 본원에 기재된 다양한 병리학적 상태의 포유동물에서의 진단은 숙련된 실시자에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어 포유동물에서의 암 또는 면역 관련된 질환의 진단 또는 검출을 가능하게 하는 진단 기술은 당업계에 이용가능하다. 예를 들어, 암은 촉진, 혈액 분석, x-선, NMR 등을 포함하나 이에 제한되지 않는 기술을 통해 확인될

수 있다.

- [0278] 길항제(들)는 볼루스로서의 정맥내 투여 또는 시간에 걸친 연속적 주입에 의해, 또는 근육내, 복막내, 뇌척수내, 피하, 동맥내, 척수내, 경막내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해서와 같은 공지된 방법에 따라 투여될 수 있다. 임의로, 투여는 다양한 시판되는 장치를 이용한 미니-펌프 주입을 통해 수행될 수 있다. 길항제는 또한 당업계에 기재된 유전자 요법 기술을 이용하여 사용될 수 있다.
- [0279] 길항제의 투여를 위한 유효 투여량 및 스케줄은 실험적으로 결정될 수 있으며, 이러한 결정은 당업자의 범위 내에 있다. 단일 또는 다회 투여량이 사용될 수 있다. 현재, 단독으로 사용되는 길항제의 유효 투여량 또는 양은 1일당 체중의 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 약 100 mg/kg 이상의 범위일 수 있다. 투여량의 중간 비례축소는 예를 들어 문헌 [Mordenti et al., Pharmaceut. Res., 8:1351 (1991)]에 개시된 바와 같은 당업계에 공지된 방식으로 수행될 수 있다.
- [0280] 그의 길항제의 생체내 투여가 이용될 경우, 정상 투여량은 투여 경로에 따라 1일당 포유동물 체중의 약 10 ng/kg 내지 100 mg/kg , 바람직하게는 약 1 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 10 mg/kg/일 로 다양할 수 있다. 특정 투여량 및 전달 방법에 대한 지침은 문헌에 제공되며, 예를 들어 미국 특허 제4,657,760호; 제5,206,344호; 또는 제5,225,212호를 참조한다. 상이한 제제는 하나의 기관 또는 조직을 표적화하는 투여가 예를 들어 또다른 기관 또는 조직에 대한 것과 상이한 방식으로 전달을 필요로 할 수 있는, 상이한 치료 화합물 및 상이한 장애에 유효할 것임이 예상된다. 당업자는 투여되어야 하는 길항제의 투여량이 예를 들어 작동제 또는 길항제를 투여받을 포유동물, 투여 경로, 및 포유동물에게 투여되는 다른 약물 또는 요법에 따라 다양할 것임을 이해할 것이다.
- [0281] 세포의 종류 및/또는 질환의 중증도에 따라, 예를 들어 하나 이상의 별개의 투여에 의해서든지, 또는 연속적 주입에 의해서든지, 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 15 mg/kg (예를 들어 0.1 내지 20 mg/kg)의 길항제 항체가 투여를 위한 초기 후보 투여량이다. 전형적인 일일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 100 mg/kg , 또는 그 이상의 범위일 수 있다. 수 일 또는 그 이상에 걸쳐 반복된 투여에 대해, 치료는 질환 증상의 목적하는 억제가 일어날 때까지 지속된다. 그러나, 다른 투여량 처방이 유용할 수 있다.
- [0282] 단일 종류의 길항제는 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 예를 들어, WISP-1 이뮤노어드헤신 분자가 투여될 수 있다. 대안적으로, 숙련된 실시자는 방법에서 길항제의 조합, 예를 들어 WISP-1 이뮤노어드헤신 및 WISP-1 항체의 조합을 이용하는 것을 선택할 수 있다. 추가의 요법이 방법에 사용될 수 있음이 고려된다. 하나 이상의 다른 요법으로는 당업계에 공지되고 상기 섹션 I에 특히 추가로 정의된 방사선 요법, 사이토킨(들), 성장 억제제(들), 화학요법제(들), 세포독성제(들), 티로신 키나제 억제제, ras 파르네실 트랜스퍼라제 억제제, 혈관신생 억제제, 및 시클린-의존성 키나제 억제제의 투여를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 리투산(Rituxan)(상표명) 또는 헤르셉틴(Herceptin)(상표명)과 같은 종양 항원을 표적화하는 치료적 항체, 뿐만 아니라 항-VEGF와 같은 항-혈관신생 항체가 있다.
- [0283] 화학요법제에 대한 제제 및 투여량 스케줄은 제조업자의 지시에 따라, 또는 숙련된 실시자에 의해 실험적으로 결정된 바와 같이 사용될 수 있다. 이러한 화학요법에 대한 제제 및 투여량 스케줄은 문헌 [Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)]에 기재되어 있다. 화학요법제는 예를 들어 길항제의 투여를 선행하거나 후행할 수 있거나, 그와 동시에 주어질 수 있다. 또한, 길항제는 예를 들어 타목시펜과 같은 항-에스트로겐 화합물, 또는 오나프리스톤과 같은 항-프로게스테론과 이러한 분자에 대해 공지된 투여량으로 조합될 수 있다 (EP 616812 참조).
- [0284] 또한, CD20, CD11a, CD18, CD40, CD44, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, 혈관 내피 인자 (VEGF), 또는 다른 TNFR 족 구성원 (예를 들어, DR4, DR5, OPG, TNFR1, TNFR2)에 결합하는 항체와 같은 다른 항원에 대한 항체를 투여하는 것이 요망될 수 있다. 대안적으로 또는 부가적으로, 본원에 개시된 동일한 또는 2개 이상의 상이한 항원에 결합하는 2개 이상의 항체는 환자에게 공동투여될 수 있다. 때때로, 1종 이상의 사이토킨을 환자에게 투여하는 것이 유익할 수 있다. 일 실시양태에서, 본원의 길항제는 성장 억제제와 공동-투여된다. 예를 들어, 성장 억제제가 먼저 투여된 후, 본 발명의 길항제가 투여될 수 있다.
- [0285] 길항제 및 하나 이상의 다른 요법은 함께 또는 연속적으로 투여될 수 있다. 길항제의 투여 후, 처리된 세포를 시험관내에서 분석할 수 있다. 생체내 치료가 있을 경우, 치료되는 동물은 숙련된 실시자에게 널리 공지된 다양한 방식으로 모니터링될 수 있다.
- [0286] 제조품
- [0287] 본 발명의 또다른 실시양태에서, 상기 기재된 장애의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제조품이 제공된다. 제조

폼은 용기 및 라벨을 포함한다. 적합한 용기로는 병, 바이알, 주사기 및 시험관을 들 수 있다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로부터 형성될 수 있다. 용기는 상태의 치료에 유용한 조성물을 가질 수 있으며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 정맥내 용액 백 또는 피하 주사 바늘에 의해 천공가능한 스톱퍼를 갖는 바이알일 수 있음). 조성물 내의 활성제는 길항제(들)를 포함할 수 있다. 용기 상의 또는 용기에 결합된 라벨은 조성물이 선택의 상태의 치료에 사용됨을 지시한다. 제조품은 인산염-완충 염수, 링거 용액 및 텍스트로스 용액과 같은 제약상 허용되는 완충제를 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석제, 충전제, 바늘, 주사기, 및 사용을 위한 지시서를 갖는 패키지 삽입물을 비롯한, 상업적 및 사용자 관점에서 요망되는 다른 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0288] 하기 실시예는 설명의 목적으로만 제공되며, 어떤 식으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것을 의도하지 않는다.

[0289] 본 명세서에 인용된 모든 특허 및 참고 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 도입된다.

실시예

[0290] 실시예에 지칭된 시판되는 시약은 달리 지시되지 않는다면 제조업자의 지시에 따라 사용되었다. ATCC 수탁 번호에 의한 하기 실시예 및 명세서 전반에 걸쳐 확인된 세포의 공급원은 버지니아주 마나사스에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션이다. 달리 언급되지 않는다면, 본 발명은 상기, 및 하기 교재에 기재된 것과 같은 재조합 DNA 기술의 표준 절차를 이용한다: 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press N. Y., 1989]; [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y., 1989]; [Innis et al., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., N. Y., 1990]; [Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988]; [Gait, M.J., Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1984]; [R.I. Freshney, Animal Cell Culture, 1987]; [Coligan et al., Current Protocols in Immunology, 1991].

[0291] 하기 실시예에 지칭된 분석 및 재료의 기재는 하기에 제공된다.

[0292] 단백질 및 항체: 전장 인간 WISP-1-Fc 융합 단백질을 발현시키고, 이전에 기재된 바와 같이 정제하였다 (문헌 [Desnoyers et al., J. Biol. Chem., 276:47599-47607 (2001)]). 정제된 마우스 항-래트 CD44 항체 (클론 OX49)는 BD 바이오사이언스(BD Bioscience) (매사추세츠주 베드포드 소재)로부터의 것이었다. 마우스 IgG2a 이소형 대조군 항체는 파밍겐(Pharmingen)으로부터의 것이었다. FITC 컨쥬게이션된 마우스 항-래트 CD44는 세로테크(Serotec) (노쓰 캐롤라이나주 랠라이 소재)로부터의 것이고, FITC 컨쥬게이션된 마우스 IgG1 이소형 대조군 항체는 DAKO (덴마크 소재)로부터의 것이었다. 래트 항-마우스 CD44 (클론 KM114)은 파밍겐으로부터의 것이었다. 액틴 항체 (클론 C4)는 아이씨엔 바이오메디칼스(ICN biomedical) (오하이오주 오클라 소재)로부터의 것이었다. 2002년 5월 14일자로 허여된 미국 특허 제6,387,657호의 실시예에 기재된 프로토콜 및 시약을 이용하여 무린 항-인간 WISP-1 모노클로날 항체를 생성하고, 면역원으로서 WISP-1-Fc, 및 선별하였다. 5가지 이러한 모노클로날 항체는 하기 언급된 바와 같이 출원인에 의해 ATCC에 기탁되었다.

[0293] 세포 및 조직 표본: NRK-49F 및 SW480 세포주 (ATCC, 버지니아주 마나사스 소재)를 10% 소 태아 혈청 (FBS)으로 보충된 고 글루코스 둘베코 변형 이글스 배지 (HGMEM)에 보관하였다. 모 C57MG, C57MG 발현 Wnt-1 (C57MG/Wnt-1), hWISP-1의 보다 높은 수준을 발현하는 NRK-49F (NRK/WISP-1H), hWISP-1의 보다 낮은 수준을 발현하는 NRK-49F (NRK/WISP-1L) 및 빈 벡터를 함유하는 NRK-49F (NRK/대조군)을 아놀드 레빈(Arnold Levine) (프린스턴 대학교(Princeton University), 뉴저지주 프린스턴 소재)으로부터 취득하고, $2.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 푸로마이신 (문헌 [Xu et al., Genes Dev., 14:585-595 (2000)])을 함유하는 배지에 보관하였다. 해롤드 바르무스(Harold Varmus) (국립 암 연구소(National Cancer Institute), 국립 보건 연구소(National Institutes of Health), 메릴랜드주 베테스다 소재)로부터 취득된 Wnt-1 트랜스제닉 마우스를 잭슨 래버러토리스(Jackson Laboratories) (매사추세츠주 바 하버 소재)로부터 취득된 p53 널 마우스로 사육하여 Wnt-1 트랜스제닉/p53 널아웃 마우스를 생성하였다. 유방 종양 및 유관 표피의 시편을 분석용 마우스로부터 검사하였다.

[0294] 입자 배제 분석: 적혈구 침강 분석을 약간의 변형과 함께 이전에 기재된 바와 같이 사용하였다 (문헌 [Knudson et al., J. Cell Sci., 99:227-235 (1991)]). NRK/WISP-1 (WISP-1로 형질감염된 정상 래트 신장 섬유모세포; 문헌 [Xu et al., Genes Dev., 14:585-595 (2000)] 참조) 및 NRK/대조군 세포 (정상 래트 신장 섬유모세포; 뉴저지주 프린스턴에 소재하는 프린스턴 대학교의 아놀드 레빈으로부터 취득됨) (1×10^5 개 세포/웰)를 팔콘

(Falcon) 6 웰 플레이트 (백톤 디킨슨(Becton Dickinson), 뉴저지주 프랭클린 레인스로 소재)에 씨딩하고, 10% 소 태아 혈청 (PBS) (라이프 테크놀로지스(Life Technologies), 메릴랜드주 게티스버그 소재)으로 보충된 고 글루코스 둘베코 변형된 이글스 배지에서 37℃, 5% CO₂에서 밤새 보관하였다. 다음날, 배지를 제거하고, 750 μ l PBS/0.1% BSA (보링거 만하임(Boehringer Mannheim), 인디애나주 인디애나폴리스 소재) 중 10⁸개 양 RBC (인터-셀 테크놀로지스(Inter-Cell Technologies), 뉴저지주 호프웰 소재)를 첨가하고, 15분 동안 고정하였다. 세포를 니콘 디아포트(Nikon Diaphot) 300 도립형 현미경을 사용하여 관찰하고, 디지털 영상을 소니(SONY) DKC-5000 디지털 포토 카메라 (일본)를 사용하여 획득하였다.

[0295] 배양된 세포의 히알루로난 염색: 히알루로난 염색을 이전에 기재된 바와 같이 약간의 변형과 함께 수행하였다 (문헌 [Pienimäki et al., J. Biol. Chem., 276:20428-20435 (2001)]). NRK/WISP-1 및 NRK/대조군 세포 (8 내지 10 X 10³)를 8 웰 플라스틱 챔버 슬라이드에 플레이팅하고, 37℃, 5% CO₂에서 밤새 보관하였다 (상기 기재된 바와 같음). 다음날, 세포를 인산염 완충 염수 (PBS)로 세척하고, PBS 중 4% 파라포름알데히드로 실온에서 20분 동안 고정하였다. 세포를 PBS로 세척하고, 비-특이적 결합 부위를 1% 소 혈청 알부민 (BSA) 및 0.1% 트리톤 X-100 (칼바이오켄(Calbiochem), 캘리포니아주 라졸라 소재)을 함유하는 증류수로 30분 동안 포화시켰다. 비오틴화된 HA 결합 단백질 (HA-BP) (세이가가꾸 아메리카(Seikagaku America), 메사추세츠주 팔마우스 소재) (PBS/3% BSA 중 5 μ g/mL)을 첨가하고, 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 세포를 PBS로 세척하고, TBS 및 1%/BSA 중 1:1000 FITC-컨쥬게이션된 스트렙타비딘 (DAKO, 캘리포니아주 카프린테리아 소재)과 함께 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 PBS에 세척하고, 1 μ g/mL 회흐스트(Hoechst) 33342 (몰리클라 프로브스(Molecular Probes), 오레곤주 유진 소재)를 함유하는 벡타실드(Vectashield) (캘리포니아주 벨링엄 소재)를 사용하여 탑재하고, 니콘 이클립스(Nikon Eclipse) 800 형광 현미경하에서 육안관찰하였다. 영상을 애플(Apple) G3 컴퓨터로 인터페이스된 -40℃에서 작동하는 포토메트리스(Photometries) 300 CCD 카메라로 획득하였다. 동일한 절차를 또한 이용하여 Wnt-1 트랜스제닉 마우스로부터 유방 종양의 동결된 섹션을 염색하였다.

[0296] 실시간 RT-PCR: 상대적 RNA 발현 수준을 이전에 보고된 바와 같이 실시간 RT-PCR을 이용하여 측정하였다 (문헌 [Winer et al., Anal. Biochem., 270:41-49 (1999)]). 총 RNA를 제조업자의 프로토콜 (몰리클라 리서치 센터(Molecular Research Center))을 이용하여 트리-시약으로 세포로부터 추출하였다. 특이적 프라이머 및 형광발생 프로브를 설계하고, 이를 이용하여 증폭하고, 유전자 발현 수준을 정량화하였다. 유전자의 특이적 신호를 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제 하우스키핑 유전자의 것으로 정규화시켰다.

[0297] 각각의 조건에 대한 데이터 세트 (3개)의 평균을 구하였다. 모든 테크맨 RT-PCR 시약은 어플라이드 바이오시스템스(Applied Biosystems) (캘리포니아주 포스터 시티 소재)로부터 구입하였다. 유전자 발현에 대한 재조합 WISP-1의 효과를 시험하기 위해, 페트리 디쉬 (35 mm)를 PBS 중 75 μ g mL⁻¹ hWISP-1-Fc로 4℃에서 밤새 코팅하였다. 다음날, 세포 (3 X 10⁵ 세포/디쉬)를 코팅된 표면 상에 플레이팅하고, 발현 분석을 18시간 후에 수행하였다. 특정한 경우, 코팅된 표면을 세척하고, 세포를 씨딩하기 전 실온에서 추가의 2시간 동안 처리하였다.

[0298] FACS 분석: 세포를 트립신화에 의해 수거하고, PBS로 세척하고, 1 μ g mL⁻¹ FITC 컨쥬게이션된 항-CD44 (세로테크, 노쓰 캐롤라이나주 랠리 소재) 또는 이소형 대조군 Ab (DAKO, 덴마크 소재)를 함유하는 PBS 1% BSA/20% 글루코스에서 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 동일한 완충액으로 세척하고, EPICS XL-MCL (코울터(Coulter), 플로리다주 마이애미 소재) 상에서 분석하였다.

[0299] 웨스턴 블롯: NRK/C 및 NRK/WIH을 10 cm² 플레이트에서 융합하도록 배양하였다. 세포를 PBS로 세척하고, TBS 중 1% 트리톤-X100 300 μ l로 5분 동안 추출하였다. 아세톤 10 부피를 추출물에 첨가함으로써 단백질을 침전시켰다. 샘플을 환원시키고, 변성시키고, 4 내지 20% 구배 SDS 폴리아크릴아미드 겔 상에 로딩하였다. 겔을 PVDF 막에 옮기고, 항-레트 CD44 항체 (OX49) 또는 항-마우스 CD44 (KM114)로 1 μ g/mL 농도에서 프로빙하고, HRP-컨쥬게이션된 항-마우스 IgG 이차 항체 및 아머샴(Amersham) ECL 검출 시약을 이용하여 검출하였다. 샘플 중의 액틴 검출물은 로딩 대조군으로 사용하였다.

[0300] 산개 분석: 세포를 24 웰 플레이트에 저농도 (-1000 세포/웰)로 플레이팅하고, 3일에 걸쳐 콜로니를 형성시켰다. 세포를 디프-퀵(Diff-Quik) (데이드 베링(Dade Behring), 덴마크 뉴욕 소재)을 이용하여 염색하고, 콜로니를 현미경하에서 관찰하였다.

[0301] 세포 상처 치유 분석: 세포 이동을 약간의 변형과 함께 이전에 기재된 세포 상처 치유 분석을 이용하여 평가하

였다 (문헌 [Pienimäki et al., J. Biol. Chem., 276:20428-20435 (2001)]). 간략히, 세포를 이들이 융합에 도달할 때까지 배양하였다. 하나의 선 (약 1 mm)을 일회용 황색 팁이 구비된 마이크로피펫을 이용하여 세포층에 그렸다. 제거된 영역에 대한 세포 이동을 저속도 현미경에 의해 15시간에 걸쳐 모니터링하였다. 상기 기간 후 세포에 의해 새롭게 점령된 영역을 단계식 마이크로미터로 보정된 NIH 영상 소프트웨어를 이용하여 측정하였다.

[0302] 저속도 현미경: 세포를 HGMEM/10% FBS에 플레이팅하고, 그의 무작위 이동을 저속도 현미경을 이용하여 15시간 동안 관찰하였다. 세포에 의해 덮인 거리를 단계식 마이크로미터로 보정된 NIH 영상 소프트웨어를 이용하여 측정하였다.

[0303] 이동 분석: 측각주성을 이전에 기재된 바와 같이 변형된 보이든 챔버 시스템을 이용하여 측정하였다 (문헌 [Bourguignon et al., J. Biol. Chem., 275:1829-1838 (2000)]). 8 μ m 다공성 24-웰 포맷 PET 막 필터 (팔콘)의 하부면을 PBS 중 단백질 50 μ l (50 μ g mL⁻¹)로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 코팅된 삽입물을 혈청-무함유 배지에서 세정하고, 0.5 mL HGMEM/10% PBS 중 0.5 X 10⁵ NRK 세포를 상부 챔버에 첨가하였다. 하부 챔버를 동일한 배지 0.75 mL로 충전하고, 플레이트를 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 상부 챔버를 면봉으로 닦고, 삽입물의 하부면으로 이동된 세포를 디프-퀵 염색 키트 (데이드 베링 인크.)로 염색하고, 현미경하에서 계수하였다. 각각의 조건에 대한 데이터 세트 (3개)의 평균을 구하였다. 특정한 경우, 코팅된 삽입물을 세척하고, 실온에서 추가의 2시간 동안 처리하였다.

[0304] 동일계내 혼성화: PCR 프라이머를 NM_018865의 nt 440-1180으로부터 스패닝된 뮤린 WISP-1의 740 bp 단편 (상부- 5' GGCTGCCATCTGTGACCCA (서열 12) 및 하부- 5' CATAGGACCT GCCGGGAGAA A (서열 13)) 또는 NM_018865의 nt 204-910으로부터 스패닝된 뮤린 WISP-1의 706 bp 단편 (상부- 5' GCCGTGGCAGTCCTGAGGG (서열 14) 및 하부- 5' CAGCACCGGG CATTGACGTT A (서열 15)) 또는 M27129의 nt 144-608로부터 스패닝된 뮤린 CD44의 464 bp 단편 (상부- 5' TGGAGAAAAATGGCCGCTAC A (서열 16)) 및 하부-5' TGGGGTGCTC TTCTCGATGG (서열 17)) 또는 NM_008216의 nt 927-1557로부터 스패닝된 뮤린 HAS2의 630 bp 단편 (상부- 5' GGACAAATCGGCCACGTACA T (서열 18) 및 하부- 5' CTGTCTCAT CGGGTCTGC (서열 19))을 증폭하기 위해 설계하였다. 프라이머는 증폭된 생성물로부터 각각 센스 또는 안티센스 프로브의 시험관내 전사를 가능하게 하도록 27-뉴클레오타이드 T7 또는 T3 RNA 폴리머라제 개시 부위를 코딩하는 연장물을 포함한다 (문헌 [Lu et al., Cell Vision, 1:169-176 (1994)]). 모든 조직을 4% 포르말린에서 고정하고, 파라민-삽입하였다. 3 내지 5 μ m 두께의 섹션을 탈파라핀화시키고, 프로테이나제 K 4 mg/mL에서 37°C에서 30분 동안 탈단백질화시키고, 이전에 기재된 바와 같이 동일계내 혼성화에 대해 추가로 가공하였다 (문헌 [Holcomb et al., EMBQ J., Aug 2000 1;19(15):4046-55]). ³³P-UTP 표지된 센스 및 안티센스 프로브를 섹션에 55°C에서 밤새 혼성화시켰다. 20 mg/mL RNase A에서 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 55°C에서 0.1 X SSC에서 2시간 동안 고 엄격성 세척 및 등급화된 에탄올을 통한 탈수에 의해 비혼성화된 프로브를 제거하였다. 슬라이드를 NBT2 핵 트랙 현탁액에 디핑하고, 4°C에서 4주 동안 건조제를 함유하는 밀폐된 플라스틱 슬라이드 박스에서 노출시키고, 현상하고, 헤마톡실린 및 에오신으로 반대염색하였다.

[0305] 실시예 1

[0306] 고 (NRK/WISP-1H) 또는 저 (NRK/WISP-1L) 수준의 WISP-1을 발현하는 안정한 섬유모세포 세포주 및 빈 벡터를 함유하는 대조군 세포주 (NRK/대조군)를 이용하여 HA 생성에 대한 WISP-1의 효과를 평가하였다. 입자 배제 분석에 의해 입증된 바와 같이, NRK/WISP-1H 세포는 침강 적혈구를 제외할 수 있는 큰 히알루로난 세포주외 외피를 축적하였다 (도 1a). NRK/WISP-1L은 보다 작은 세포주외 매트릭스를 축적한 반면 (도 1b), 히알루로니다제로 처리된 NRK/WISP-1H 세포 (데이터는 도시하지 않음) 또는 NRK/대조군 (도 1c)은 둘러싸인 매트릭스가 없었다. 세포 표면 축적된 HA의 축적을 또한 비오틴화된 HA 결합 단백질 (bHABP)을 이용한 형광 염색에 의해 평가하였다. 염색은 NRK/WISP-1H 세포 표면에서의 HA 축적을 나타낸 반면 (도 1d), NRK 대조군 세포에서는 염색이 검출되지 않았다 (도 1e).

[0307] HA 분비에 대한 WISP-1의 효과를, 시간 경과에 따른 NRK/WISP-1H의 배양 배지에서의 HA의 축적을 NRK/대조군 세포와 비교함으로써 평가하였다. 24시간 후, NRK/WISP-1H 배지에서의 HA 농도는 NRK/대조군 세포 배지에서 3.5 배 더 컸으며, 144시간 후 8배로 점차적으로 증가하였다 (도 1f). 이들 결과는 함께 NRK 세포에서의 WISP-1 발현이 세포 표면에서 및 배양 배지에서 HA 축적을 촉진시킴을 나타낸다.

[0308] 실시예 2

- [0309] WISP-1 촉발된 HA 생성을 담당하는 효소를 확인하기 위해, NRK/WISP-1H, NRK/WISP-1L 및 NRK/대조군 세포에서의 공지된 HA 신타제 (HAS1, HAS2 및 HAS3)의 발현을 분석하였다. HAS2 발현은 WISP-1 생성 세포에서 10배까지 증가된 반면, HAS1 및 HAS3 mRNA 수준은 대조군과 동일하였다 (도 2a). CD44 및 RHAMM mRNA 수준은 또한 NRK/WISP-1 세포주에서 증가된 반면, 히알루로니다제 발현은 변화되지 않았다 (도 2a). 더욱이, HAS2, CD44 및 RHAMM mRNA 수준은 WISP-1 발현에 비례하였다. FACS 분석 (도 2b) 및 웨스턴 블롯 (도 2c)에 의해 입증된 바와 같이, NRK/WISP-1H 세포에서의 CD44 mRNA 발현의 증가는 CD44 단백질 수준의 4배 증가를 초래하였다.
- [0310] 실시예 3
- [0311] HA는 2가지 세포 표면 수용체, CD44 및 RHAMM와 상호작용함으로써 세포 이동을 자극하는 것으로 나타났다 ([Hall et al., 상기 문헌]; [Bourguignon et al., 상기 문헌]). WISP-1이 HA 생성 및 CD44 및 RHAMM 발현 둘 다를 증가시켰기 때문에, WISP-1 발현 세포의 운동을 평가하였다 (저밀도로 플레이팅될 경우, NRK/대조군 세포는 증식되고, 잘 한정된 콜로니를 형성하였다 (도 3a). 증식하는 NRK/WISP-1L 세포는 성장하는 콜로니로부터 벗어난 일부 세포로서 덜 한정된 군을 형성하였다 (도 3b). NRK/WISP-1H 콜로니는 보이지 않았으며, 세포는 무작위 패턴으로 산개되었다 (도 3c). 대조군 (도 3d)에 비해, WISP-1 발현 세포는 또한 높은 운동의 확장된 라멜리포디아 특징을 갖는 과다 연장된 형태를 나타내었다 (도 3e). 저속도 현미경을 이용하여, 대조군 세포에 비해 NRK/WISP-1H의 이동 거리의 4배 증가를 관찰하였다 (도 3f). NRK/WISP-1H는 또한 세포 상처 치유 분석에서 이동 면적의 2.5배 증가를 나타내었다 (도 3g). 이들 결과는 함께 WISP-1 발현이 세포 이동을 촉진시킬 수 있음을 입증한다.
- [0312] 실시예 4
- [0313] WISP-1의 전위적 첨가가 HAS2 발현 및 세포 이동을 촉진시킬 수 있는지 여부를 측정하기 위해, 정제된 재조합 WISP-1-IgG를 이용한 분석을 수행하였다 ([Desnoyers et al., 상기 문헌]). 배양 배지에의 WISP-1 첨가는 HAS2 발현을 촉진시키지 않았다 (테이타는 도시하지 않음). NRK 세포가 WISP-1-IgG 코팅된 표면 상에 플레이팅될 경우, HAS2 발현은 비코팅된 플라스틱 상에 또는 무관한 IgG 키메라 단백질 (TNFR-IgG) 코팅된 표면 상에 플레이팅된 세포에 비해 증가하였다 (도 4a). 데코린 단독은 HAS2 발현을 촉진시키지만, 상기 유도는 코팅된 표면이 WISP-1과 함께 인큐베이션된 후 추가로 3배 증가하였다. NRK 세포 이동에 대한 전위적 WISP-1 첨가의 효과를 또한 검사하였다. 트랜스웰 분석에서, WISP-1-IgG는 필터의 하부 표면 상에 코팅될 경우 NRK 세포의 촉각 주성 이동을 유도하였다 (도 4b). 무관한 IgG 키메라 단백질 (TNFR-IgG)의 코팅 또는 WISP-1-IgG의 하부 챔버에의 첨가는 이동을 촉진시키지 않았다. CD44 또는 WISP-1 항체 (도 4b)는 WISP-1에 의해 유도된 촉각 주성 이동을 억제하였다. 더욱이, WISP-1 촉각 주성 활성화는, 이것이 결장 선암종 세포주인 SW480 세포의 이동을 또한 촉진시켰기 때문에 섬유모세포에 제한되지 않았다 (도 4c). 이들 결과는 함께 전위적 WISP-1 첨가가 CD44 매개된 메카니즘을 통해 HAS2 발현을 증가시키고 세포 이동을 촉진시킴을 입증한다. 완전히 이해된 것은 아니지만, WISP-1 제시는, 이것이 상기 활성을 유발하는 기질에 속박될 필요가 있기 때문에 이동에 중요할 수 있다고 믿어진다.
- [0314] 실시예 5
- [0315] WISP-1이 Wnt-1의 하류 효과기라고 믿어지기 때문에, Wnt-1로 안정하게 형질감염된 유방 표피 세포주 (C57MG/Wnt-1)에서의 WISP-1, HAS2 및 CD44 발현을 분석하였다. 대조군 세포주 (C57MG)와 비교할 경우, C57MG/Wnt-1 세포는 WISP-1, HAS2 및 CD44 mRNA 발현의 각각 2.7배, 5.8배 및 3배 증가를 나타내었다 (도 5a). 웨스턴 블롯에서 입증된 바와 같이, C57/Wnt-1 세포는 또한 CD44 단백질 함량의 6배 증가를 나타내었다 (도 5b). 더욱이, 대조군 세포주와 달리, Wnt-1 발현 세포는 뚜렷한 콜로니를 형성하지 못하였고, 저밀도에서 배양할 경우 산개되었다 (도 5c). 상기 결과는 HAS2 및 CD44 발현 및 세포 운동이 WISP-1 발현이 Wnt-1에 의해 촉발된 세포주에서 상승됨을 나타낸다.
- [0316] 실시예 6
- [0317] 유방 표피에서의 Wnt-1 발현은 트랜스제닉 마우스에서 종양 발달을 촉진시킨다 (문헌 [Li et al., Oncogene, 19:1002-1009 (2000)]; [Tsukamoto et al., Cell, 55:619-625 (1988)]). WISP-1이 Wnt-1의 추정적인 하류 효과기이기 때문에, MMTV-Wnt-1 트랜스제닉 마우스로부터의 자발적인 유방 종양에서 HAS2 및 CD44의 mRNA 발현을 측정하였다. 유관 표피와 비교할 경우, HAS2 mRNA 발현은 분석된 모든 유방 종양에서 2.5 내지 5.5배 증가하였다 (n=5; 도 5d). 유사하게, CD44 mRNA 발현은 모든 종양에서 2.2 내지 4.2배 유도되었다 (n=5, 도 5e). 상기 결과는 HAS2 및 CD44이 WISP-1을 발현하는 MMTV-Wnt-1 트랜스제닉 마우스 유방 종양에서 과발현됨을 나타낸다.

다.

[0318] 실시예 7

[0319] 동일계내 혼성화는 MMTV-Wnt-1 트랜스제닉 마우스 유방 종양의 종양주위 기질에서 상승된 WISP-1 발현을 입증하였다 (도 6a, b). 반대로, HAS2 (도 6c 내지 d) 및 CD44 (도 6 e 내지 f) 발현은 종양 표피 세포에서만 발견되었다. 종양 실질에서의 CD44의 편재화를 면역조직화학에 의해 확인하였다 (도 6g). 연결 단백질 염색은 종양 기질과 결합된 히알루로난의 축적을 나타내었다 (도 6h). 가장 높은 염색 강도는 종양 소엽 바로 근처에서 발견된 반면, 보다 약한 염색은 정상 유관 표피에 편재되었다. 상기 발견은 WISP-1이 히알루론산 및 CD44를 포함하는 종양 및 기질 세포 사이의 상호작용을 조절할 수 있다는 제안과 일치한다.

[0320] 실시예 8

[0321] 형질전환된 세포주의 전이 및 성장 가능성을 이전에 기재된 바와 같이 평가하였다 (문헌 [Welch et al., Cancer Res., 60:1552-1556 (2000)]). 9주령 스위스 nu/nu 마우스를 사용하였다. 간략히, 세포를 트립신화에 의해 수거하고, PBS로 2회 세척하였다. 각각의 마우스에게 5×10^4 또는 2.5×10^5 세포를 함유하는 현탁액 $100 \mu\text{l}$ 을 측면 꼬리 정맥 내로 주사하였다. 주사후 2, 3, 및 4주에, 마우스를 사인-자기 공명 영상 (MRI)을 이용하여 폐 병변의 출현에 대해 검사하고, 부검을 수행하였다. 폐를 보인(Bouin) 고정제에서 관류시키고, 절제하고, H&E 염색된 섹션을 폐 종양 콜로니화의 평가를 위해 생성하였다.

[0322] 좌측 폐의 종단면, 및 우측 폐의 두개엽, 내엽, 미엽, 및 부엽의 단일 횡단면을 평가하였다. 조직학적으로, 침범된 폐는 폐 사이질을 침윤하는 방추형 신생물 세포를 가졌다. 그러나, 변화의 중증도가 다양하였기 때문에, 하기 등급화 시스템을 수립하였다.

[0323] I = 폐 사이질의 최소 병발 - 폐의 10 내지 20%가 침범된다. 방추형 신생물 세포의 소(nest) 및 클러스터는 폐 사이질을 다초점성으로 파괴하였다. 침범된 병소는 통상적으로 흉막 표면을 따라 사이질 내로 확장된다. 혈관 또는 대기도는 침범되지 않는다.

[0324] II = 폐 사이질의 온건한 병발 - 폐의 20 내지 50%가 침범된다. 방추형 신생물 세포의 소 및 클러스터는 폐 사이질을 다초점성으로 파괴하였다. 일부 혈관 또는 대기도는 방추형 세포로 충전된다. 방추형 세포는 빈번히 흉막 아래에서 사이질로 확장되면서 넓은 밴드 또는 큰 덩어리를 형성한다. 위에 놓인 중피는 둥그스름하다 (반응성).

[0325] III = 폐 사이질의 중증 병발 - 폐의 50 내지 100%가 침범된다. 방추형 신생물 세포의 소 및 클러스터는 폐 사이질을 다초점성으로 파괴하였다. 혈관 및 대기도는 방추형 세포로 충전된다. 방추형 세포는 흉막 아래에서 사이질로 확장되면서 넓은 밴드 또는 큰 덩어리를 형성한다. 방추형 세포는 종종 약한 호염기성 내지 양쪽친화성 무세포 물질에 삽입된다. 위에 놓은 중피는 둥그스름하다 (반응성). 기체 교환을 위한 최소의 비침범된 영역이 남아 있다.

[0326] NRK/WISP-1H, NRK/WISP-1L 및 NRK/대조군 세포로 접종된 누드 마우스의 폐 콜로니화의 결과가 도 7 및 10에 요약되어 있다. NRK/WISP-1H 또는 NRK/WISP-1L로 접종된 마우스에서, 세포는 시간- 및 투여량-의존성 방식으로 폐 덩어리를 형성하였다. 가장 중증 병변은 2.5×10^5 NRK/WISP-1H로 주사된 마우스에서 나타났으며, 주사후 4주에 부검하였다. 주사후 2 및 3주에, 마우스는 덜 중증이지만 진행성 종양 형성을 가졌다 (등급 I 내지 II; 상기 등급화 시스템 참조). 2.5×10^5 NRK/WISP-1L 세포로 접종된 마우스는 정상이거나 최소 신생물 침윤을 가진 반면 (등급 I), 0.5×10^5 NRK/WISP-1H 세포로 접종된 마우스는 증가된 신생물 침윤을 나타내었다 (등급 I 내지 II). 조직학적 관찰은 NRK/대조군 세포로 접종된 동물의 폐가 정상이었음을 나타내었다 (도 7a 내지 c). NRK/WISP-1 주사된 동물에서, 신생물 방추형 세포는 종종 약한 호염기성 내지 양쪽친화성 무세포 물질에 끼워진, 폐의 흉막 내에, 그로부터 돌출된, 또는 그 하부에 작은 클러스터를 형성하였다 (등급 I; 도 7d 내지 f). 보다 중증으로 침범된 동물에서, 신생물 세포는 흉막 하부에 넓은 융합성 밴드를 형성하였다 (등급 II; 도 7g 내지 i). 가장 중증으로 침범된 동물에서, 혈관 및 대기도는 방추형 세포로 충전되었다 (등급 III; 도 7j 내지 l). MRI 분석은 조직학적 등급 II 및 등급 III 침습을 갖는 동물에서의 흉막을 따라 우측 폐 및 좌측 폐의 윤곽을 따른 증가된 밀도 (과다신호)를 나타내었다. MRI 상의 병변의 중증도는 조직학적 스코어와 일치하였다 (도 7a, d, g, j). 상기 결과는 WISP-1 발현이 세포 전이성 성장 가능성을 촉진시킴을 나타낸다.

[0327] 실시예 9

- [0328] NRK/WISP-1H 세포 (2.5×10^5 세포)를 누드 마우스의 꼬리 정맥에 접종하였다. 세포 접종일에 시작하여, 마우스에게 CD44 항체 10 mg/kg, 이소형 대조군 항체, 또는 완충액 (PBS) 만을 일주일에 2회 복막내 주사하였다. 폐를 고정하고, 4주 후에 총 해부학적 분석에 대해 절제하였다.
- [0329] 4주 후, CD44 항체 처리된 동물 (n=5)에서 발견된 병변의 중증도는 정상 내지 등급 I로 다양한 반면, 대조군 항체 또는 염수로 처리된 모든 (n=10) 동물은 등급 III 병변을 가졌다 (도 8a). CD44 항체로 처리된 동물의 폐에서 전이성 병소의 평균 면적은 대조군 항체로 처리된 동물에 비해 99%까지 감소되었다 ($p < 0.00003$) (도 8b).
- [0330] 실시예 10
- [0331] 특정 WISP-1 항체의 결합 특이성을 검사하는 분석을 수행하였다. 전장 마우스 WISP-1 (젠뱅크 수탁 번호 NM_018865) 및 전장 인간 WISP-1 (젠뱅크 수탁 번호 AF100779; 도 9)를 WISP-1 서열의 하류에서 인간 IgG₁ Fc 영역을 코딩하는 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 생성된 재조합 융합 단백질 (WISP-1-Fc)을 Sf9 곤충 세포를 이용한 바쿨로바이러스 발현 시스템에서 합성하고, 단백질 A-세파로스 4 패스트 플로우 (아머샴 파마시아 바이오 테크(Amersham Pharmacia Biotech)) 상의 친화도 크로마토그래피에 의해 혈청-무함유 제어된 배지로부터 정제하여 균질화시켰다. 전장 인간 WISP-1을 또한 이. 콜라이 균주에서 아미노 말단 헥사-히스티딘 태그 (WISP-1-His)로 발현시켰다. 세포 용해물을 Ni^{2+} -NTA 아가로스 컬럼 (키아젠(Qiagen)) 상의 크로마토그래피에 적용하였다. WISP-1-His를 0 내지 500 mM 이미다졸 구배로 용리하였다. 그 후, 용출된 WISP-1-His를 함유하는 분획을 풀링하고, 투석하였다. 포유동물 발현 시스템으로부터의 인간 WISP-1을, 인간 WISP-1으로 안정하게 형질감염된 NRK 세포 (아놀드 레빈; 프린스턴 대학교; 뉴저지주 프린스턴 소재)를 SDS-PAGE 샘플 완충액으로 용해시킴으로써 수득하였다. 대조군 세포 용해물을 빈 벡터로 안정하게 형질감염된 NRK 세포로 생성하였다.
- [0332] 다양한 발현 시스템으로부터의 WISP-1 (50 ng)을 SDS 폴리아크릴아미드 겔 상에서 전기영동하고, 폴리비닐리드플루오라이드 (PVDF) 막 상으로 전기-이동시키고, 상이한 WISP-1 모노클로날 항체로 프로빙하였다.
- [0333] WISP-1에 특이적으로 결합된 WISP-1 항체 3D11.D7 (본원에서 "3D11"로도 지칭됨), 11C2.C10 (본원에서 "11C2"로도 지칭됨), 9C11.C7 (본원에서 "9C11"로도 지칭됨) 및 5D4.F6 (본원에서 "5D4"로도 지칭됨)은 바쿨로바이러스, 박테리아 및 포유동물 발현 시스템으로부터 생성되었다 (도 11a). 상기 항체는 바쿨로바이러스로부터의 유린 WISP-1에 결합하지 않았으며, 대조군 용해물로부터의 임의의 단백질이 인식되지 않았다. WISP-1 항체 6F8, 3A7, 10H12, 3A11, 6E3, 3H10, 5G1, 및 10B1은 바쿨로바이러스 발현 시스템으로 생성될 경우에만 인간 및 유린 WISP-1 둘다에 의해 인식되었다 (도 11b). 상기 항체는 박테리아 또는 포유동물 발현 시스템에서 생성될 경우 인간 WISP-1을 인식하지 않았다. 클론 9C10으로부터의 항체는 웨스턴 블롯 후 임의의 단백질에 결합하지 않았다.
- [0334] 상기 결과는 WISP-1 항체 3D11, 11C2, 9C11 및 5D4가 인간 WISP-1을 특이적으로 인식하며 웨스턴 블롯에 의한 WISP-1 검출에 사용될 수 있음을 시사한다.
- [0335] 실시예 11
- [0336] WISP-1 항체 11C2, 9C11, 5D4 및 3D11에 의해 인식되는 에피토프를 확인하는 분석을 수행하였다. 전장 인간 WISP-1 (젠뱅크 수탁 번호 AF100779)을 WISP-1 서열의 하류에서 6 히스티딘을 코딩하는 pIRESpuro2 발현 벡터 (클론테크 래버러토리스(Clontech Laboratories), 캘리포니아주 팔로 알토 소재) 내로 클로닝하였다. 결실 돌연변이를 또한 인간 WISP-1의 1, 2 또는 3개의 도메인을 제거함으로써 생성하였다. 생성된 구조물을 또한 pIRESpuro2 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 상이한 WISP-1 구조물을 확인하는데 사용된 명명법은 이들이 함유하는 도메인을 지칭하며 (도 12B 참조), 도메인 1은 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질 도메인 (IFGBP)이고, 도메인 2는 본 비레브란트(von Willebrand) 인자 C (VWFC) 도메인이고, 도메인 3은 트롬보스폰딘 (TSP) 도메인이고, 도메인 4는 C-말단 (CT) 도메인이다. 가변 영역은 도메인 2와 3 사이에 있다. 상기 WISP-1의 도메인 및 영역은 도 12A에 예시되어 있다.
- [0337] WISP-1의 상기 도메인을 코딩하는 서열은 하기와 같다.

[0338] WISP-1 구조물의 서열

도메인 1:

GAATTACCATGAGGTGGTTCTGCGCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTC
CTGGCCACGGCCCTCTCTCCAGCCCTACGACCATGGACTTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCC
TCACGCCCCAATTCTGCAAGTGCCCATGTGAGTGCCCGCCATCCCCACCCCGCTGCCCGCTGGGGGTC
AGCCTCATCACAGATGGCTGTGAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAGCAGCTTGGGGACAACTGCACGGAG
GCTGCCATCTGTGACCCCCACGGGGCTCTACTGTGACTACAGCGGGGACCGCCGAGGTACGCAATA
GGAGTGTGTGCACAGGCGGCCGCACACCACCATCACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGCATAGATAA
CTGATCCAGTGTGCTGGAATTAATC (서열 3)

도메인 2:

GAATTACCATGAGGTGGTTCTGCGCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTC
CTGGCCACTGCAGTGTGCGGTGTGGCTGCGTCTGGATGGGGTGCCTACAACAACGCCAGTCCTTC
CAGCCTAAGTGAAGTAACTGCACGTGCATCGACGGCGCGGTGGGCTGCACACCACTGTGCCTCCGA
GTGCGCCCCCGCTCTCTGTTGCCCCACCGCGCGCGTGAGCATACCTGGCCACTGCTGTGAGCAG
TGGGTATGTGCGGCCGCACACCACCATCACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGCATAGATAAC (서열

4)

도메인 3:

GAATTACCATGAGGTGGTTCTGCGCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTC
CTGGCCACTGCAGCATGGCAGGAACTGCATAGCCTACACAAGCCCTGGAGCCCTTGCTCCACCAGC
TGCGGCCTGGGGTCTCCACTCGGATCTCCAATGTTAACGCCCACTGCTGGCCTGAGCAAGAGAGCCGC
CTCTGCAACTTGGGCCATGCGATGTGGACATCCATACACTCATTAAGGCGGCCGCACACCACCATCAC
CATCACCATCACTAAGTGAGGCCGCATAGATAACTGATCCAGTGT (서열 5)

도메인 4:

GAATTACCATGAGGTGGTTCTGCGCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTC
CTGGCCACTGCAGGGAAGAAGTGTCTGGCTGTGTACCAGCCAGAGGCATCCATGAACCTTCACACTTGCG
GGCTGCATCAGCACACGCTCCTATCAACCCAAGTACTGTGGAGTTTGATGGACAATAGGTGCTGCATC
CCCTACAAGTCTAAGACTATCGACGTGCTCTTCCAGTGTCTGATGGGCTTGGCTTCTCCGCCAGGTC
CTATGGATTAAATGCCTGCTTCTGTAACCTGAGCTGTAGGAATCCCAATGACATCTTGTGACTTGGAA
TCCTACCTGACTTCTCAGAAATTGCCAACGCGGCCGCACACCACCATCACCATCACCATCACTAAGTG
AGGCCGCATAGATAACTGATCCAGTGTG (서열 6)

도메인 1, 2:

GAATTACCATGAGGTGGTTCTGCGCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTC
CTGGCCACGGCCCTCTCTCCAGCCCTACGACCATGGACTTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCC
TCACGCCCCAATTCTGCAAGTGCCCATGTGAGTGCCCGCCATCCCCACCCCGCTGCCCGCTGGGGGTC
AGCCTCATCACAGATGGCTGTGAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAGCAGCTTGGGGACAACTGCACGGAG
GCTGCCATCTGTGACCCCCACGGGGCTCTACTGTGACTACAGCGGGGACCGCCGAGGTACGCAATA
GGAGTGTGTGCACAGGTGGTGGTGTGGGCTGCGTCTGGATGGGGTGCCTACAACAACGCCAGTCC
TTCCAGCCTAAGTGAAGTAACTGCACGTGCATCGACGGCGCGGTGGGCTGCACACCACTGTGCCTC
CGAGTGCGCCCCCGCTCTCTGTTGCCCCACCGCGCGCGTGAGCATACCTGGCCACTGCTGTGAG
CAGTGGGTATGTGCGGCCGCACACCACCATCACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGCATAGATAAC
(서열 7)

도메인 1, 2, 3:

GAATTACCATGAGGTGGTTCTGCGCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTC
CTGGCCACGGCCCTCTCTCCAGCCCTACGACCATGGACTTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCC
TCACGCCCCAATTCTGCAAGTGCCCATGTGAGTGCCCGCCATCCCCACCCCGCTGCCCGCTGGGGGTC
AGCCTCATCACAGATGGCTGTGAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAGCAGCTTGGGGACAACTGCACGGAG
GCTGCCATCTGTGACCCCCACGGGGCTCTACTGTGACTACAGCGGGGACCGCCGAGGTACGCAATA
GGAGTGTGTGCACAGGTGGTGGTGTGGGCTGCGTCTGGATGGGGTGCCTACAACAACGCCAGTCC
TTCCAGCCTAAGTGAAGTAACTGCACGTGCATCGACGGCGCGGTGGGCTGCACACCACTGTGCCTC
CGAGTGCGCCCCCGCTCTCTGTTGCCCCACCGCGCGCGTGAGCATACCTGGCCACTGCTGTGAG
CAGTGGGTATGTGAGGACGACGCCAAGAGGCCACGCAAGACCGCACCCCGTGACACAGGAGCCTTCGAT
GCTGTGGGTGAGGTGGAGGCATGSCACAGGAACTGCATAGCCTACACAAGCCCTGGAGCCCTTGCTCC
ACCAGCTGCGGCCCTGGGGGCTCTCACTCGGATCTCCAATGTTAACGCCCACTGCTGGCCTGAGCAAGAG
AGCCGCCCTCTGCAACTTGGGCCATGCGATGTGGACATCCATACACTCATTAAGGCGGCCGCACACCAC

[0340]

CATCACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGCA TAGATAACTGATCCAGTGTGCTGGA (서열 8)

도메인 1, 2, 4:

GAATTACCATGAGGTGGTTCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTC
CTGGCCACGGCCCTCTCTCCAGCCCCACGACCATGGACTTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCC
TCACGCCCCCAATTCTGCAAGTGGCCATGTGAGTGCCCGCCATCCCCACCCGCTGCCGCTGGGGTTC
AGCCTCATCACAGATGGCTGTGAGTGCTGTAAAGATGTGCGCTCAGCAGCTTGGGGACAACAGCAGGAG
GCTGCCATCTGTGACCCCCACCGGGCCTCTACTGTGACTACAGCGGGGACCGCCGAGGTACGCAATA
GGAGTGTGTGCACAGGTGGTGGTGTGGGCTGCGTCTGGATGGGGTGGCTACAACAACGGCCAGTCC
TTCCAGCCTAACTGCAAGTACAACAGCAGTGCATCGACGCGCGGTGGGCTGCACACCACTGTGCTC
CGAGTGCGCCCCCGCTCTCTGGTGCCCCACCGCGCGCGTGAGCATACCTGGCCACTGTCTGTGAG
CAGTGGGTATGTCTGCAGGCAGGGAAGAAGTGTCTGGCTGTGTACCAGCCAGAGGCATCCATGAATTC
ACATTGCGGGCTGCATCAGCACACGCTCCTATCAACCAAGTACTGTGGAGTTTGCATGGACAATAGG
TGCTGCATCCCTACAAGTCTAAGACTATCGACGTGCTTCCAGTGTCTGATGGGCTTGGCTTCTCC
CGCCAGGTCTTATGGATTAAATGCTGCTTCTGTAACTGAGCTGTAGGAATCCCAATGACATCTTTGCT
GACTTGGAACTCTACCTGACTTCTCAGAAATTGCCAACGCGGCCGACACCAACCATCACCATCACCAT
CACTAAGTGAGGCCGCA TAGATAACTGATCCAGTGTGCTGGAATTAATTGCTGTCTGCGAGGGCCAGC
TGTTGGGGTGAGTACTCCCTCTCAAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTA (서열 9)

도메인 1, 3, 4:

GAATTACCATGAGGTGGTTCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTC
CTGGCCACGGCCCTCTCTCCAGCCCCACGACCATGGACTTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCC
TCACGCCCCCAATTCTGCAAGTGGCCATGTGAGTGCCCGCCATCCCCACCCGCTGCCGCTGGGGTTC
AGCCTCATCACAGATGGCTGTGAGTGCTGTAAAGATGTGCGCTCAGCAGCTTGGGGACAACAGCAGGAG
GCTGCCATCTGTGACCCCCACCGGGCCTCTACTGTGACTACAGCGGGGACCGCCGAGGTACGCAATA
GGAGTGTGTGCGCATGTCTGGGTGAGGTGGAGGCATGGCAGGAACTGCATAGCCTACACAAGCCCC
TGGAGCCCTTGCTCCACAGCTGCGGCCTGGGGGTCTCCACTCGGATCTCCAATGTTAAACGCCAGTGC
TGGCCTGAGCAAGAGAGCCGCTCTGCAACTTGCAGCCATGCGATGTGGACATCCATACACTCATTAAG
GCAGGGAAGAAGTGTCTGGCTGTGTACCAGCCAGAGGCATCCATGAATTCACACTTGCAGGGCTGCATC
AGCACAGCTCCTATCAACCAAGTACTGTGGAGTTTGCATGGACAATAGGTGCTGCATCCCCTACAAG
TCTAAGACTATCGAGTGTCTTCCAGTGTCTGATGGGCTTGGCTTCTCCCGCAGGTCTATGGATT
AATGCTGCTTCTGTAACTGAGCTGTAGGAATCCCAATGACATCTTTGCTGACTTGGAACTCTACCT
GACTTCTCAGAAATTGCCAACGCGGCCGACACCAACCATCACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGCA
TAGATAAC (서열 10)

도메인 2, 3, 4:

GAATTACCATGAGGTGGTTCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGC
ACCGTCTTGGCCACTGCAAGTGTGCGGTGGGCTGCGTCTGGATGGGGTGGCTACAACAACGCCAG
TCCTTCCAGCCTAACTGCAAGTACAACAGCAGTGCATCGACGCGCGGTGGGCTGCACACCACTGTGC
CTCCGAGTGCGCCCCCGCTCTCTGGTGCCCCACCGCGCGCTGAGCATACCTGGCCACTGCTGT

[0341]

GAGCAGTGGGTATGTGAGGACGAGCCCAAGAGGCCAGCAAGACCGACCCCGTGACACAGGAGCCTTC
GATGCTGTGGGTGAGGTGGAGGCATGGCACAGGAATGCATAGCCTACACAAGCCCTGGAGCCCTTGC
TCCACAGCTGCGGCCTGGGGTCTCCACTCGGATCTCCAATGTTAACGCCAGTGTGGCCTGAGCAA
GAGAGCCGCTCTGCAACTTGGGCCATGCGATGTGGACATCCATACACTCATTAAAGCAGGGAAGAAG
TGTCTGGCTGTGTACCAGCCAGAGGCATCCATGAATTCACACTTGGGGCTGCATCAGCACACGCTCC
TATCAACCAAGTACTGTGAGTTTGCATGGACAATAGGTGCTGCATCCCCTACAAGTCTAAGACTATC
GACGTGTCTTCCAGTGTCTGATGGGCTTGGCTTCTCCGCGAGGTCTATGGATTAAATGCTGCTTC
TGTAACCTGAGCTGTAGGAATCCCAATGACATCTTGTGACTTGGAACTCTACCTGACTTCTCAGAA
ATTGCCAACGCGGCCGACACCAACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGCA TAGATAACTGATC
CAGTGTGCTGGAATTAATTGCTGTCTGCGA (서열 11)

[0342]

[0343]

세포 (HEK 293T)를 상이한 구조물로 형질감염시키고, 배양 배지를 48시간 후에 수집하였다. 배양 배지 1 ml를 코발트-아가로스 20 μ l과 함께 1시간 동안 인큐베이션하고, 원심분리하고, 세척하였다. 흡착된 단백질을, 펠릿을 SDS-PAGE 샘플 완충액 20 μ l에서 100℃에서 5분 동안 가열함으로써 용리하였다. 샘플을 전기영동하고, PVDF 상으로 전기-이동시키고, 상이한 WISP-1 항체로 프로빙하였다.

[0344]

항체 11C2, 9C11 및 5D4는 도메인 2와 3 사이에 위치한 가변 영역의 최초 19개 아미노산을 함유하는 WISP-1 구조물만을 인식하였다 (도 12C; 12E; 12G). WISP-1 항체 3D11은 도메인 1을 함유하는 WISP-1 구조물만을 인식

하였다 (아미노산 24 내지 117; 도 12D; 12F).

[0345] 상기 결과는 항체 11C2, 9C11 및 5D4가 WISP-1의 가변 영역을 특이적으로 인식하는 반면, 항체 3D11은 WISP-1의 도메인 1을 특이적으로 인식함을 나타낸다.

[0346] 실시예 12

[0347] WISP-1 항체 9C10.F5 (본원에서 "9C10"로도 지칭됨)에 의해 인식되는 에피토프를 확인하는 분석을 수행하였다.

[0348] 다양한 WISP-1 결실 구조물로 형질감염된 HEK 293T 세포로부터의 배양 배지 (상기 실시예 11에 기재된 바와 같음)를 WISP-1 항체 9C10 1 μg 및 단백질 A-아가로스 20 μl 로 실온에서 1시간 동안 점종하였다. 면역착물을 원심분리에 의해 침전시키고, 펠렛을 SDS-PAGE 샘플 완충액 20 μl 에서 100°C에서 5분 동안 가열함으로써 용리하였다. 샘플을 전기영동하고, PVDF 상으로 전기-이동시키고, WISP-1 항체 11C2로 프로빙하였다.

[0349] 항체 9C10은 WISP-1의 도메인 1을 함유하는 구조물만을 면역침전시켰다 (도 13). 상기 결과는 항체 9C10이 WISP-1의 도메인 1을 특이적으로 인식하며 면역침전에 사용될 수 있음을 입증한다.

[0350] 실시예 13

[0351] WISP-1 항체 9C10 (카르보네이트 완충액 중 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 100 μl , pH 9.6)을 4°C에서 밤새 맥시소르브(Maxisorb) 플레이트에 코팅하였다. 플레이트를 PBS/3% BSA 200 μl 로 1시간 동안 차단하였다. 표준 곡선을 WISP-1-Fc (PBS/3% BSA 중 100 μl)의 연속 희석으로 만들고, 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 플레이트를 100 μl PBS/0.05% 트윈으로 세척하고, PBS/3% BSA 중 WISP-1 항체 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 100 μl) (비오틴화된 11C2 또는 55B)를 1시간 동안 인큐베이션하였다. 비오틴화된 11C2에 대해, 플레이트를 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HRP-컨쥬게이션된 스트렙타비딘과 함께 추가로 인큐베이션하였다. 55B에 대해, 플레이트를 세척하고, HRP-컨쥬게이션된 당나귀 항-토끼 IgG와 함께 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션의 마지막에, 웰을 0.05% 트윈-20을 함유하는 PBS 200 μl 로 6회 세척하고, 신호를 양고추냉이 퍼옥시다제 색소생성 기질 TMB (키르케가드 앤드 페리 래버러토리스 (Kirkegaard & Perry Laboratories)) 100 μl 을 이용하여 육안관찰하였다. 반응을 1 M 인산 100 μl 로 정지시키고, 450 nm에서의 OD를 측정하였다. 비-특이적 결합을 미세역가 웰 코팅을 제거함으로써 병행 인큐베이션에서 측정하였다. WISP-1-Fc 또는 WISP-1 항체가 제거될 경우 신호는 생성되지 않았다.

[0352] 포획용 항체 9C10 및 검출용 항체 11C2 및 55B를 이용하여, 0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 만큼 낮은 WISP-1의 농도에서 검출할 수 있는 ELISA를 수행하였다 (도 14). 상기 ELISA는 혈청과 같은 생물학적 유체에서 WISP-1 단백질을 검출하는데 유용할 수 있다.

[0353] 실시예 14

[0354] 맥시소르브 플레이트를 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 헤파린 (시그마(Sigma)) 50 μl /웰로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 비특이적 결합 부위를 PBS/3% BSA 200 μl 로 1시간 동안 차단하였다. 그 후, 플레이트를 WISP-1 항체의 연속 희석의 존재하에서 PBS/3% BSA 중 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hWISP-1-Fc 50 μl 로 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS/0.05% 트윈으로 세척하고, PBS/3% BSA 중 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HRP 컨쥬게이션된 항-인간 IgG-Fc와 함께 1시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. 플레이트를 세척하고, HRP 기질 (TMB) 100 μl 를 첨가하였다. 색상 전개를 1 M 인산 100 μl 로 정지시키고, 450 nm에서 OD를 측정하였다.

[0355] WISP-1 항체 11C2, 5D4 및 9C11은 각각 1.9, 2.5 및 3.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 IC_{50} 으로 헤파린에의 WISP-1 결합을 억제하였다 (도 15). 항체 3D11은 시험된 가장 높은 농도 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)에서 62%의 최대 억제로 헤파린에의 WISP-1 결합을 온건하게 감소시켰다. 항체 9C10은 WISP-1 헤파린 결합을 약화시키지 않았으며, 이는 무관한 항체 대조군과 유사한 억제 곡선을 나타낸다.

[0356] 상기 결과는 가변 영역을 인식하는 항체가 헤파린에의 WISP-1 결합을 억제할 수 있음을 입증한다. 2가지 WISP-1 항체가 헤파린에의 WISP-1 결합에 대한 효과가 거의 없거나 전혀 없기 때문에, 현재 도메인 1은 상기 상호작용에 덜 참여하는 것으로 믿어진다.

[0357] 실시예 15

[0358] 촉각주성을 변형된 보이든 챔버 시스템을 이용하여 측정하였다. 8 μm 다공성 24-웰 포맷 PET 막 필터 (백톤 디킨슨, 뉴저지주 프랭클린 레이크 소재)의 하부면을 PBS 중 단백질 50 μl (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 4°C에서 밤새 코팅하였다. 정상 래트 신장 세포 (NRK; 5×10^4 /0.5 mL HGMEM/10% FBS)를 상부 챔버에 첨가하고, 하부 챔버

를 동일한 배지로 충전하고, 플레이트를 37℃에서 인큐베이션하였다. 다음날, 상부 챔버를 면봉으로 닦고, 삽입물의 하부면으로 이동된 세포를 염색하고, 현미경하에서 계수하였다. 각각의 조건에 대한 데이터 세트 (3개)의 평균을 구하였다. 특정한 경우, 코팅된 삽입물을 세척하고, 실온에서 추가의 2시간 동안 처리하였다.

[0359] 트랜스웰 분석에서, 필터의 하부 표면 상에 코팅된 WISP-1-IgG는 NRK 세포의 측각주성 이동을 유도하였다 (도 16A). 무관한 IgG 키메라 단백질 (TNFR-Fc)의 코팅 또는 WISP-1-IgG의 하부 챔버에의 첨가는 이동을 촉진시키지 않았다. 코팅된 WISP-1-Fc의 존재하에서, 5가지 상이한 WISP-1 항체 (9C10, 11C2, 3D11, 9C11, 5D4)는 세포 이동을 현저하게 억제하였다. 코팅된 WISP-1-Fc의 부재하에서, 상기 항체는 세포 이동에 대한 임의의 효과를 나타내지 않았다. 상기 결과는 WISP-1 항체가 WISP-1의 존재하에서 세포 이동을 조절할 수 있음을 입증한다. 세포 이동을 차단함으로써, WISP-1 항체는 암 진행을 예방하는데 있어서 중요한 치료적 역할을 할 수 있다.

[0360] 하기 실시예에 논의된 3D11, 9C10, 11C2, 5D4, 및 9C11 항체의 특징 및 특성의 요약은 도 16B에 제공된다.

[0361] 실시예 16

[0362] 9주령 스위스 nu/nu 암컷 마우스에게 2.5×10^5 개 세포를 함유하는 현탁액 100 μ l을 측면 꼬리 정맥 내로 주사하였다. 접종일에 시작하여, 마우스를 WISP-1 항체 (9C11, 11C2, 5D4, 9C10, 3D11) 또는 이소형 대조군 항체의 복막내 주사 (10 mg/kg)에 의해 일주일에 2회 처리하였다. 3주 후, 폐를 4% 중성 완충 포르말린으로 관류시키고, 절제하고, H&E 염색된 섹션을 생성하였다. 좌측 폐의 종단면, 및 우측 폐의 두개엽, 내엽, 미엽, 및 부엽의 단일 횡단면을 평가하였다. 각각의 슬라이드에 대해, 전이성 병소의 수를 계수하고, 전이성 병소의 평균 면적을 SPOT RT 소프트웨어 (다이나그노스틱 인스트루먼트즈 인코포레이티드(Diagnostic Instruments Incorporated), 캘리포니아주 벌링엄 소재)를 이용하여 측정하였다. 면적 (μm^2)을 폐의 4개의 섹션에서 5개 이상의 개별 전이성 병소에 대해 측정하였다.

[0363] 3주 후, WISP-1 항체 처리된 동물에서 발견된 병소의 중증도는 대조군에 비해 매우 약화되었다 (도 17a, b). WISP-1 항체로 처리된 마우스 (n=5)에서 발견된 전이성 병소의 절절의 수 및 평균 면적은 대조군 항체로 처리된 동물에 비해 감소되었다 (도 17c, d). 또한, WISP-1 항체 처리시, 병변에 의해 덮인 총 폐 면적은 이소형 대조군 항체로 처리된 동물에 비해 82 내지 97%까지 감소되었다 (도 17e). 상기 결과는 전이에 관련된 종양 부하를 감소시키는데 있어서 WISP-1 항체의 생체내 효능을 입증한다. WISP-1 항체의 액틴의 메카니즘이 완전히 이해되어 있지는 않지만, 그의 효능은 조직 부위에서 암 세포의 성장 감소 능력 및/또는 운동, 침습 및 씨딩의 억제 능력에 의해 매개될 수 있다고 믿어진다.

[0364] 실시예 17

[0365] 전장 마우스 WISP-1 (젠뱅크 수탁 번호 NM_018865)를 pRK 포유동물 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 생성된 구조물 (pRK-WISP-1; 18 μ g)을, Eugene6 (로슈(Roche))을 제조업자의 지시에 따라 이용하여, 4T1 마우스 유방 선암 종 세포주 (미시간주 디트로이트에 소재하는 바바라 안 카르마노스 암 연구소(Barbara Ann Karmanos Cancer Institute)의 프레드 밀러(Fred Miller) 박사로부터 취득됨)에서 2 μ g pSVi-푸로마이신 플라스미드와 공동-형질 감염시켰다. 2일 후, 세포를 2 μ g/mL 푸로마이신에서 선별하였다. 2주 후, 클론을 단리하고, WISP-1 발현을 면역형광에 의해 평가하였다. 동일한 절차를 이용하여 빈 벡터를 이용한 대조군 세포주를 생성하였다. 생성된 4T1/대조군 및 4T1/WISP-1 세포주를 10% FBS 및 3 μ g/mL 푸로마이신을 함유하는 이스코브(Iscove) 배지에 보관하였다.

[0366] 4T1/대조군, 4T1/WISP-1L, 4T1/WISP-1H, NRK/대조군, NRK/WISP-1L 및 NRK/WISP-1H 세포주에서의 WISP-1 발현을, 인간 및 마우스 WISP-1 유전자 사이에 구별되지 않는 프라이머 및 프로브를 이용하여 반-정량적 RT-PCR (태크맨)에 의해 측정하였다.

[0367] WISP-1은 4T1/대조군 세포주에서 발현되지 않았다. 4T1/WISP-1H 세포주에서의 WISP-1 발현은 4T1/WISP-1L에서 보다 2배 높았지만, NRK/WISP-1H에서보다 700배 낮았다 (도 18).

[0368] 실시예 18

[0369] 4T1 세포 산개에 대한 WISP-1 효과를 평가하기 위해, 100,000개의 4T1/대조군, 4T1/WISP-1L 또는 4T1/WISP-1H 세포를 10% 소 태아 혈청을 함유하는 이스코브 배지에서 6 웰 플레이트에 씨딩하였다. 저밀도에서 플레이팅될 경우, 4T1/대조군 세포는 증식하고, 잘 한정된 콜로니를 형성하였다 (도 19). 증식하는 4T1/WISP-1L 세포는 성

장하는 콜로니로부터 벗어난 일부 세포만큼 덜 한정된 군을 형성하였다 (도 19). 4T1/WISP-1H 콜로니는 나타나지 않았으며, 세포는 무작위 패턴으로 산개되었다 (도 19). 이들 결과는 함께 WISP-1 발현이 세포 이동을 촉진 시킴을 시사한다.

[0370] 실시예 19

[0371] 4T1 세포 침습에 대한 WISP-1 효과를 또한 8 μ m 다공성 24-웰 포맷 PET 막 필터 (팔콘)의 매트릭셀 코팅된 변형된 보이든 챔버 시스템을 이용하여 평가하였다. 4T1/대조군, 4T1/WISP-1L 또는 4T1/WISP-1H 세포 (100,000개 세포)를 0.5 mL 이스코브 배지에서 상부 챔버에 첨가하였다. 하부 챔버를 5% 소 태아 혈청을 함유하는 동일한 배지 0.75 mL로 충전하고, 플레이트를 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 상부 챔버를 면봉으로 닦고, 삼입물의 하부면으로 이동한 세포를 디프-쿼 염색 키트 (데이드 베링 인크.)로 염색하고, 현미경하에서 계수하였다. 각각의 조건에 대한 데이터 세트 (3개)의 평균을 구하였다. 4T1/WISP-1H 및 4T1/WISP-1L 세포는 4T1/대조군에 비해 각각 12배 및 6배 침습 증가를 입증하였다 (도 20). 상기 결과는 WISP-1이 종양발생 유방 표피 세포 침습을 촉진시키며 전이에 있어서 역할을 할 수 있음을 시사한다.

[0372] 실시예 20

[0373] 1.5×10^5 개 세포 (4T1/대조군 1, 4T1/대조군 2, 4T1/WISP-1L 또는 4T1/WISP-1H)를 6 내지 8주령 암컷 BALB/c 마우스 (6 마리 마우스/군)의 제4 유방 지방대에 주사하여 유방 상피 세포 종양발생에 대한 WISP-1의 효과를 평가하였다. 종양 체적을 일주일에 3회 측정하였다. 주사후 31일에, 마우스를 희생시키고, 종양을 절제하여 칭량하였다.

[0374] 4T1/WISP-1L 세포 (도 21a; □) 및 4T1/WISP-1H 세포 (도 21a; ■)를 접종한 마우스에서는 4T1/대조군 1 및 4T1/대조군 2 세포 (도 21a; ○ 및 ●)를 접종한 마우스에 비해 종양이 보다 빠르게 성장하였다. 31일 후에, 4T1/WISP-1L 및 4T1/WISP-1H를 접종하여 형성된 종양은 4T1/대조군 세포를 접종하여 형성된 종양보다 4배 더 크고 (도 21a), 3배 더 무거웠다 (도 21b). 이러한 결과는 WISP-1이 유방 상피 종양 세포의 증식을 증가시킬 수 있음을 시사한다.

[0375] 실시예 21

[0376] 4T1/대조군, 4T1/WISP-1L 및 4T1/WISP-1H 세포를 접종하여 형성된 종양에서의 HAS2 및 CD44의 발현을 측정하였다. 4T1/대조군 세포 종양에 비해, 4T1/WISP-1 세포 종양에서 CD44 발현이 5 내지 23배 증가하였다 (도 22). 이에 반해, HAS2 발현은 분석한 모든 종양에서 동일하였다. 이러한 결과는 WISP-1이 4T1 세포를 접종한 마우스에서 CD44의 발현을 증가시킨다는 것을 시사한다. 이들 종양에서의 CD44의 과발현은 전이 촉진을 유발할 수 있다.

[0377] 실시예 22

[0378] 마우스 유방 지방대에 4T1 세포를 접종하고 (실시예 20 참조), 마이크로 컴퓨터 X선 단층촬영 및 조직학적 방법에 의해 전이성 증식의 정도를 조사함으로써 유방 상피 세포 전이에 대한 WISP-1 효과를 평가하였다. 31일 후에, 4T1/WISP-1L 또는 4T1/WISP-1H 세포를 접종한 마우스에서는 4T1/대조군을 주사한 마우스 (도 23a 및 23c)에 비해 광범위한 폐 전이 (도 23b 및 23d)가 나타났다. 4T1/WISP-1L과 4T1/WISP-1H 세포 사이의 전이 가능성에서는 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 4T1/대조군 세포를 접종한 마우스에서는 평균 질량이 0.68 g인 폐 병소가 평균 2.11개 나타난 반면, 4T1/WISP-1 세포를 접종한 마우스에서는 평균 질량이 12.46 g인 폐 병소가 평균 20.25개 나타났다. 또한, 4T1/WISP-1 세포를 주사한 마우스의 폐에 대한 평균 조직학적 스코어는 0.92인데 비해 NRK/대조군 세포를 주사한 마우스에 대한 스코어는 0.11이었다.

[0379] 또한, 면역조직화학적 방법을 이용하여, 4T1/WISP-1 폐 전이성 병소에서 CD44가 높은 수준으로 발현되는 것을 관찰하였다 (도 23e). 이들 종양에서, CD44는 4T1/WISP-1 세포의 원형질 막에 집중되었다 (도 23f). 이들 결과는 함께 WISP-1이 4T1 세포의 전이 가능성을 촉진하여 폐 전이성 병소의 수 (10배) 및 크기 (18배)를 증가시킨다는 것을 입증한다. 또한, CD44의 증가된 발현은 4T1/WISP-1이 폐에 전이된 후에도 유지된다.

[0380] 4T1/대조군 1 또는 4T1/WISP-1 세포를 접종한 마우스를 임상 관찰한 결과 WISP-1 발현이 추가의 이차적 부위에서의 전이를 촉진한다는 것이 입증되었다. 4T1/WISP-1H를 접종한 마우스 중 2 마리에서 신장에 퇴색된 백색 덩어리가 있음이 발견된 반면, 다른 마우스에서는 신장 종양의 증거가 발견되지 않았다.

[0381] 실시예 23

- [0382] 상기 기재된 인간 WISP-1 전장 및 결실 돌연변이 구조물을 정상적인 래트 신장 세포 (NRK-49F)에 형질감염시켰다. 48시간 후에, 배양 배지에 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 푸로마이신을 보충하였다. 2주 후에, 발현 세포의 집단을 분석하고, 생성된 세포주를 고 글루코스 돌베코 변형된 이글스 배지 (HGMEM) (10% 태아 소 혈청 (PBS) 및 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 푸로마이신을 보충함)에 보관하였다.
- [0383] NRK/대조군, NRK/WISP-1_1234, NRK/WISP-1_134, NRK/WISP-1_234, NRK/WISP-1_123 및 NRK/WISP-1_124 세포주에서의 WISP-1 발현을 반-정량적 RT-PCR (태크맨)에 의해 측정하였다. 결과를 NRK/WISP-1_1234에서의 WISP-1 발현에 대한 배수로 표현하였다 (도 24A). NRK/WISP-1_134 및 NRK/WISP-1_234에서의 WISP-1 발현은 각각 NRK/WISP-1_1234에서의 발현에 비해 0.035배 및 0.09배 높았다. NRK/WISP-1_123은 NRK/WISP-1_1234에 비해 16.1배, NRK/WISP-1_124는 7.6배 높았다.
- [0384] 6 내지 8주령 암컷 누드 마우스 (10 마리 마우스/군)에 5×10^6 개 세포 (NRK/대조군, NRK/WISP-1_1234, NRK/WISP-1_123, NRK/WISP-1_124, NRK/WISP-1_134, NRK/WISP-1_234 세포)를 피하 주사하여 WISP-1-촉진된 종양 발생에 대한 특정 도메인의 기여도를 평가하였다. 종양 체적을 매주 측정하였다. 35일 후에, 마우스를 희생시키고, 종양을 절제하여 조직학적으로 분석하였다.
- [0385] NRK/WISP-1_1234 (도 24B; ▲), NRK/WISP-1_134 (도 24B; ●) 및 NRK/WISP-1_234 세포 (도 24B; ■)를 접종한 결과 종양이 생성되었다. 그러나, NRK/WISP-1_123 (도 24B; □), NRK/WISP-1_124 (도 24B; ○) 및 NRK/대조군 (도 24B; △)을 접종하였을 때에는 종양이 생성되지 않았다. 35일 후에, NRK/WISP-1_234 세포에 의해 형성된 종양의 크기는 NRK/WISP-1_1234 세포에 의해 형성된 종양의 크기와 유사하였다. 그러나, NRK/WISP-1_134 세포에 의해 형성된 종양은 NRK/WISP-1_1234 세포에 의해 형성된 종양 보다 2.5배 더 컸다. 이러한 결과는 WISP-1-촉진된 NRK 종양발생에 도메인 1 및 2는 필요하지 않으나 도메인 3 및 4가 필요하다는 것을 시사한다. 본 발명의 WISP-1 길항제는 바람직하게는 WISP-1의 도메인 3 및/또는 4에 결합하고/하거나 차단할 수 있을 것으로 여겨진다.
- [0386] 또한, 결과는 WISP-1의 도메인 2의 결실이 그의 종양발생 가능성을 증가시킬 수 있음을 시사한다.
- [0387] 절제된 종양을 조직학적으로 분석한 결과 (도 25), NRK/WISP-1_234 종양으로부터의 신생물 세포가 NRK/WISP-1_1234 종양으로부터의 신생물 세포와 표현형이 유사한 것으로 나타났다. 이들 종양에서, 세포는 섬유모세포성의 분화된 방추형으로 나타났다. 그러나, NRK/WISP-1_134 종양으로부터의 신생물 세포는 표현형이 상이하였으며, 이들은 덜 분화되고, 종종 여러 개의 핵을 가지며, 다중 유사분열 모양의 존재에 의해 입증된 바와 같이 활발한 유사분열 속도를 갖는다 (화살표 표시). 또한, 신생물 세포는 NRK/WISP-1_134 종양에 여러 개의 인접한 혈관에 침습하였다 (도 26). 이들 결과는 WISP-1_134 발현이 생체내 성장 및 침습 가능성을 촉진시킴으로써 NRK 세포에 종양형성 능력을 부여할 수 있음을 시사한다. 또한, 상기 구조물의 발현은 공격적인 신생물 세포의 표현형 변형 특성을 유도한다.
- [0388] 실시예 24
- [0389] 촉진된 4T1 세포 침습에 대한 특정 WISP-1 도메인의 기여도를 8 μm 다공성 24-웰 포맷 PET 막 필터 (BD 바이오사이언시스)를 갖는 매트릭셀 코팅된 변형된 보이든 챔버 시스템을 이용하여 평가하였다. 앞서 언급된 WISP-1 구조물 (WISP-1_1234, WISP-1_134, WISP-1_123, WISP-1_12, WISP-1_23, WISP-1_3, WISP-1_1 및 WISP-1_4)을 안정하게 발현시키는 HEK 293 세포 (20×10^6 개)를 5% 태아 소 혈청을 함유하는 50:50 배지 (DME 및 Ham's F-12 배지의 1:1 혼합물) 0.75 mL을 포함하는 하부 챔버에 시딩하고, 플레이트를 37 °C에서 밤새 정치시켰다. 다음날, 4T1 세포 (100,000개 세포)를 혈청-무함유 50:50 배지 0.5 mL을 포함하는 상부 챔버에 첨가하고, 플레이트를 37 °C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 상부 챔버를 면봉으로 닦고, 삼입물의 하부 측면으로 이동한 세포를 디프-퀵 염색 키트 (데이드 베링 인크.)로 염색하고, 현미경하에서 계수하였다. 각각의 조건에 대한 데이터 세트 (3개)의 평균을 구하고, 결과를 빈 벡터로 형질감염시킨 HEK 293 세포를 하부 챔버에 플레이트링한 대조군에 대한 침습 배수로 표현하였다. 4T1 세포는 WISP-1_1234, WISP-1_134 또는 WISP-123 구조물을 발현하는 HEK 293 세포를 하부 챔버에 시딩한 경우에 침습 정도가 4배 증가하는 것으로 입증되었다 (도 27). WISP-1_12 구조물을 발현하는 HEK 293 세포는 4T1 세포 침습이 단지 2.5배 증가하였다. WISP-1_23, WISP-1_3, WISP-1_1 또는 WISP-1_4를 발현하는 HEK 293 세포를 하부 챔버에 플레이트링하는 경우에 4T1 세포 침습의 증가 정도가 가장 낮았다. 이러한 결과는 WISP-1-촉진된 4T1 세포 침습에 도메인 1이 필요하다는 것을 시사한다. 또한, 이 데이터는 WISP-1의 도메인 1만으로는 4T1 세포 침습을 촉진하기에 충분하지 않을 수도 있다는 것을 보여준다.

- [0390] 실시예 25
- [0391] WISP-1-촉진된 4T1 세포 침습에 대한 WISP-1의 도메인 1의 길항 활성을 평가하기 위한 분석을 수행하였다. WISP-1의 도메인 1을 발현 벡터에서 인간 IgG1 Fc 영역 서열의 바로 위에 클로닝하였다. 생성된 재조합 융합 단백질 (WISP-1-도메인 1-Fc)을 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포를 사용하는 포유동물 발현 시스템에서 합성하고, 단백질 A-세파로스 4 패스트 플로우 (아마섬 파마시아 바이오테크) 상에서의 친화성 크로마토그래피에 의해 조건 배지로부터 정제하여 균질화시켰다. 또한 아미노 말단 6-히스티딘 태그가 부착된 WISP-1의 도메인 1 (WISP-1-도메인-1-His)을 CHO 발현 시스템에서 발현시키고, Ni^{2+} -NTA 아가로스 컬럼 (키아젠) 상에서의 친화성 크로마토그래피에 의해 배양 상층액으로부터 정제하여 균질화시켰다. 이어서, 용출된 WISP-1-도메인-1-His를 함유하는 분획을 모아 투석하였다.
- [0392] WISP-1-촉진된 4T1 세포 침습에 대한 정제된 가용성 WISP-1-도메인-1의 길항 효과를 8 μm 다공성 24-웰 포맷 PET 막 필터 (BD 바이오사이언시스)를 갖는 매트릭셀 코팅된 변형된 보이든 챔버 시스템을 이용하여 평가하였다. 4T1/대조군 또는 4T1/WISP-1 세포 (100,000개 세포)를 0.5 ml 이스코브 배지가 포함된 상부 챔버에 첨가하였다. 하부 챔버는 5% 태아 소 혈청을 함유하는 동일한 배지 0.75 mL로 채웠다. 다양한 농도의 WISP-1-도메인-1-Fc 또는 WISP-1-도메인-1-His를 상부 및 하부 챔버에 첨가하고, 플레이트를 37 °C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날, 상부 챔버를 면봉으로 닦고, 삽입물의 하부 측면으로 이동한 세포를 디프-퀵 염색 키트 (데이드 베링 잉크.)로 염색하고, 현미경하에서 계수하였다. 각각의 조건에 대한 데이터 세트 (3개)의 평균을 구하였다. 그 결과를 4T1/ 대조군 세포에 비해 상대적 침습 배수로 표현하였다. WISP-1-도메인-1-His 및 WISP-1-도메인-1-Fc는 WISP-1-촉진된 4T1 침습에 대해 투여량-의존적으로 길항 활성을 나타내는 것으로 입증되었다 (도 28). WISP-1-도메인-1-His 및 WISP-1-도메인-1-Fc는 모두 겔보기 IC_{50} 값이 0.01 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다. 이러한 결과는 정제된 WISP-1-도메인-1이 WISP-1-촉진된 세포 침습에 대해 길항 작용을 한다는 것을 시사한다.
- [0393] 실시예 26
- [0394] 인간 췌장 선암종의 HPAC 이종이식 모델에서의 WISP-1 발현을 평가하기 위한 동물 연구를 수행하였다. 5×10^6 개 인간 췌장 선암종 세포 (HPAC 세포주, 카탈로그 번호 CRL-2119; ATCC - 미국 버지니아주 매나서스 소재)를 6 내지 8주령 암컷 누드 마우스에 피하 주사하였다. 21일 후에, 마우스를 희생시키고, 종양을 절제하고, 인간 WISP-1 특이적 프로브 및 마우스 WISP-1 특이적 프로브 (도 29)를 사용하는 동일계내 혼성화에 의해 WISP-1 발현을 분석하였다. 그 결과 종양 기질에 상응하는 영역에서 마우스 WISP-1이 강하게 발현되는 것이 입증되었다. 반면, 절제된 종양에서 인간 WISP-1의 발현은 관찰되지 않았다. 또한, 이들 종양에서 종양 기질에 대해 강한 α -평활근 액틴 및 약한 비멘틴 면역조직화학 염색이 관찰되었다. 이러한 결과는 누드 마우스에 대한 HPAC 세포의 접종이 WISP-1이 발현되는 마우스 근섬유모세포 기질의 참여를 유도한다는 것을 나타낸다.
- [0395] 실시예 27
- [0396] 종양 성장 지연에 있어 WISP-1-도메인-1의 생체내 효능을 평가하기 위한 동물 연구를 수행하였다. 발현 벡터 (pIRES puro2; 클론테크 레버터토리스, 미국 캘리포니아주 팔로 알토 소재)에 클로닝된 인간 WISP-1₁, WISP-1₁₂ 구조물을 HPAC 인간 췌장 선암종 세포주에 형질감염시켰다. 48시간 후에, 배양 배지에 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 푸로마이신을 보충하였다. 2주 후에, 발현 세포 집단을 분석하고, 생성된 세포주를 10% 태아 소 혈청 (FBS) 및 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 푸로마이신을 보충한 50:50 배지 (DME 및 Ham's F-12 배지의 1:1 혼합물)에 보관하였다.
- [0397] 5×10^6 개 세포 (HPAC/WISP-1₁₂, HPAC/WISP-1₁ 세포)를 6 내지 8주령 암컷 누드 마우스 (10 마리 마우스/군)에 피하 주사하여 종양 성장 지연에 있어 WISP-1-도메인-1의 생체내 효능을 평가하였다. 종양 부피를 제25일까지 일주일에 2회 측정하였다. 그 결과, HPAC 세포에서 WISP-1₁ 또는 WISP-1₁₂가 발현되면 이들의 생체내 성장이 지연된다는 것이 입증되었다. HPAC/WISP-1₁₂ 및 HPAC/WISP-1₁ 세포의 종양 체적은 HPAC 대조군 세포 종양에 비해 각각 12% 및 54% 더 작았다. 이러한 결과는 HPAC 세포에 의해 발현된 WISP-1-도메인-1 및 WISP-1-도메인-12가 마우스 WISP-1 종양 촉진 활성을 길항시킴으로서 이들의 종양 성장을 지연시킬 수 있음을 나타낸다.
- [0398] 실시예 28
- [0399] 원발성 인간 췌장 선암종에서의 WISP-1 발현을 평가하기 위한 동일계내 혼성화 연구를 수행하였다. 종양 마이크로어레이(TMA)를 이용한 결과, 68% 스코어 (125/184)의 샘플이 WISP-1 발현에 대해 양성인 것으로 나타났다. 또한, 이들 샘플에서 WISP-1 발현은 기질 분획으로 제한되었다 (도 31). 이러한 결과는 WISP-1 발현의 발생률

이 인간 원발성 췌장 종양의 기질 분획에서 높게 나타난다는 것을 보여준다.

[0400] 실시예 29

[0401] 원발성 결장 선암종에서의 WISP-1 발현을 평가하기 위한 면역조직화학적 염색을 수행하였다. 원발성 인간 선암 종의 15개 샘플로 이루어진 패널을 WISP-1 특이적인 폴리클로날 염소 항체 (알앤드대 시스템스(R&D systems); 카탈로그 번호 AF1627)를 사용하여 WISP-1에 대해 염색하였다. WISP-1은 100% (15/15)의 분석 샘플에서 검출되었다. 모든 경우에, WISP-1은 종양 주변의 기질 분획에 위치하였다 (도 32). 이러한 결과는 WISP-1이 주로 인간 결장 선암종의 기질 분획에 존재한다는 것을 나타낸다.

[0402] WISP-1 구조물:

도메인 2,3:

GAATTACCATGAGGTGGTTCTGCCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTC
CTGGCCACTGCAGTGGTTCGGTGGGCTGCGTCTGGATGGGGTGCCTACAAACAGGCCAGTCTCTTC
CAGCCTAACTGCAAGTACAACCTGCACGTGCATCGACGGCGCGGTGGGCTGCACACCCTGTGCCCTCCGA
GTGCGCCCCCGCGTCTCTGGTGGCCCCACCCGCGCGCGTGAGCATACCTGGCCACTGCTGTGAGCAG
TGGGTATGTGAGGACGACGCGCAAGAGGCCACGCAAGACCGCACCCCGTGACACAGGAGCCTTCGATGCT
GTGGGTGAGGTGAGGCATGGCACAGGAAGTGCATAGCCTACACAAGCCCCCTGGAGCCCTTGCTCCACC
AGCTGCGGCCCTGGGGTCTCCACTCGGATCTCCAATGTTAACGCCAGTGCTGGCCTGAGCAAGAGAGC
CGCTCTGCAACTTGCGGCCATGCGATGTGGACATCCATACACTCATTAAAGCGGCCGCACACCCAT
CACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGATAGATAACTGATCCAGTGTGCTGGAATTAATTCGCTGTCT
GCGA (서열 21)

도메인 1-IgG:

CCTCGGTTCTATCGATTGAATTCACCATGAGGTGGTTCTGCCCCTGGACGCTGGCAGCAGTG
ACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTCTTGGCCACGGCCCTCTCTCCAGCCCCACGACCATGGACTTTACT
CCAGCTCCACTGGAGGACCTCTCACGCCCCAATTCTGCAAGTGGCCATGTGAGTGCCCGCCATCC
CCACCCGCTGCCGCTGGGGGTGAGCCTCATCACAGATGGCTGTGAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAG
CAGCTTGGGGACAACCTGCACGGAGGCTGCCATCTGTGACCCCAACGGGGCTCTACTGTGACTACAGC
GGGGACCGCCCGAGGTACGCAATAGGAGTGTGTGCACAGGTGGTTCGGTGTGGGGGTCAACGACAAACT
CACACATGCCACCGTGCCGACGACCTGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTCTTCCCCCAAA
CCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCACGAA
GACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG
GAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCCACCGTCTGCACACGAGTGGCTGAAT
GGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAACCATCTCCAAA
GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAAC
CAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT
GGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCGCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTCTAC
AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG
GCTCTGCACAACCACTACACGCAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGTGCAGCGGCCCTAG
AGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCATGGCCC (서열 22)

[0403] 재료의 기탁

[0404] 하기 재료를 미국 20110-2209 버지니아주 마나사스 유니버시티 볼바드에 소재하는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC)에 기탁하였다.

재료	ATCC 기탁 번호	기탁일
3D11.D7	PTA-4624	2002년 9월 4일
11C2.C10	PTA-4628	2002년 9월 4일
9C10.F5	PTA-4626	2002년 9월 4일
5D4.F6	PTA-4625	2002년 9월 4일
9C11.C7	PTA-4627	2002년 9월 4일

[0406] 상기 기탁은 특허 절차 및 감독의 목적을 위한 미생물 기탁의 국제 승인에 관한 부다페스트 조약 (부다페스트 조약)의 규정하에 수행되었다. 이는 기탁일로부터 30년 동안 기탁물의 살아 있는 배양물의 보관을 보장한다. 기탁물은 부다페스트 조약의 관점하에서 ATCC에 의해 이용가능하게 될 것이며, 어느 것이 먼저 나오든, 적절한 미국 특허의 허여시 또는 임의의 미국 또는 외국 특허 출원의 공개시 공중에게 기탁물의 배양물의 후손의 영구 적이며 비제한된 이용가능성을 보장하며, 35 USC '122 및 그에 따른 장관의 규칙 (886 OG 638에 대한 특정 언급

을 갖는 37 CFR '1.14 포함)에 따라 표제화된 미국 특허 상표청 장관에 의해 결정된 것에 대한 후손의 이용가능성을 보장하는 제넨테크, 인크.와 ATCC 사이의 동의를 이룬다.

[0408] 본 출원의 양수인은 적합한 조건하에서 배양될 경우 기탁된 재료의 배양물이 죽거나 소실되거나 파괴되어야 할 경우, 재료는 통지시 또다른 동일물로 즉시 대체될 것임을 동의하였다. 기탁된 재료의 이용가능성은 임의의 정부의 권한하에서 그의 특허법에 따라 등록된 권리를 위반하여 본 발명을 실시하는 자격으로서 간주되지 않아야 한다.

[0409] 상기 기재된 기재는 당업자가 본 발명을 실시하는데 충분한 것으로 고려된다. 본 발명은 제시된 실시예에 의해 범위가 제한되지 않는다. 사실, 본원에 제시 및 기재된 것 이외의 본 발명의 다양한 변형이 상기 기재로부터 당업자에게 명백할 것이며, 이는 첨부된 특허청구범위 내에 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1A-1F는 히알루로난 생성의 WISP-1 축진을 나타낸다. 입자 배제 분석은 NRK/WISP-1H (A) 및 NRK/WISP-1L (B)의 표면에서 히알루로난 외피를 입증하지만, NRK/대조군 (C)로부터는 부재한다. NRK/WISP-1H (D) 및 NRK/대조군 (E)는 bHABP로 히알루로난에 대해 염색되었다. F, NRK/WISP-1H 및 NRK/대조군 배지에서 HA 축적의 시간 과정.

[0037] 도 2A 내지 2C는 WISP-1이 HAS2, CD44 및 RHAMM mRNA 발현 및 CD44 단백질 발현을 증가시킴을 나타낸다. A, NRK/WISP-1H, NRK/WISP-1L 및 NRK/대조군 세포에서의 HAS1, HAS2, HAS3, CD44, RHAMM 및 히알루로니다제 (Hyal) mRNA 발현의 실시간 RT-PCR 분석. 결과는 NRK/대조군 세포에서의 발현에 대한 배수 유도로서 주어진다. B, NRK/WISP-1H 및 NRK/대조군 세포에서의 CD44 발현의 유동 세포 분석. 그늘진 영역은 이차 항체 단독의 형광 강도를 나타낸다. C, NRK/WISP-1H 및 NRK/대조군 세포에서의 CD44 단백질의 웨스턴 블롯 분석. 액틴 염색은 로딩 대조군으로서 사용되었다.

[0038] 도 3A 내지 3G는 WISP-1 발현이 세포 운동을 증가시키며 세포 형태를 변형시킴을 나타낸다. NRK/대조군 세포 (A)는 저 밀도에서 평판배양될 경우 한정된 콜로니를 형성한 반면, NRK/WISP-1L (B) 및 NRK/WISP-1H 세포 (C)는 산개되었다. NRK/WISP-1H (E)는 NRK/대조군 세포 (D)에 비해 라멜리포디아를 갖는 탈분화된 방추형 형태를 나타내었다. F, NRK/WISP-1H 및 NRK/대조군 세포의 무작위 이동을 저속도 현미경을 사용하여 15시간에 걸쳐 측정하였다. 결과는 하나의 필드에서 전형적인 세포의 평균 이동 거리를 나타낸다. G, NRK/WISP-1H 및 NRK/대조군 세포의 운동을 세포 상처 치유 분석에 의해 평가하고, 저속도 현미경을 사용하여 15시간 후에 측정하였다. 데이터는 전형적인 실험의 결과를 나타낸다.

[0039] 도 4A 내지 4C는 WISP-1 첨가가 NRK 세포의 HAS2 mRNA 발현 및 축각주성 이동을 유도함을 나타낸다. A, 코팅된 표면 상에 씨딩된 NRK 세포에서의 HAS2 및 CD44 발현의 실시간 RT-PCR 분석. 특정한 경우, 코팅된 기질을 WISP-1과 함께 추가로 인큐베이션하였다 (처리군). 결과는 비-코팅된, 비-처리된 표면 상에 평판배양된 NRK 세포에서의 발현에 대한 배수 유도로서 주어진다. 변형된 보이든(Boyden) 챔버 필터의 하부면을 코팅하고, NRK 세포 (B) 또는 SW480 세포 (C)를 상부 챔버에 첨가하였다. 특정한 경우, 하부 챔버에 직접적으로 첨가하였다. 삽입물의 하부면으로 이동한 세포를 계수함으로써 세포 운동을 평가하였다.

[0040] 도 5A 내지 5E는 C57MG/Wnt-1 세포 및 MMTV-Wnt-1 트랜스제닉 마우스 유방 종양에서의 WISP-1, HAS2 및 CD44 과발현, 및 증가된 세포 운동을 나타낸다. A, C57MG/Wnt-1 및 C57MG/대조군 세포에서의 WISP-1, HAS2 및 CD44 과발현의 실시간 RT-PCR 분석. 결과는 C57MG/대조군 세포에서의 발현에 대한 배수 유도로서 주어진다. B, C57MG/Wnt-1 및 C57MG/대조군 세포에서의 CD44 함량의 웨스턴 블롯 분석. 액틴 염색은 로딩 대조군으로서 사용되었다. C, C57MG/대조군 세포는 저밀도에서 평판배양될 경우 뚜렷한 콜로니를 형성한 반면, C57MG/Wnt-1 세포는 산개되었다. MMTV-Wnt-1 트랜스제닉 마우스의 유방 종양에서의 HAS2 (D) 및 CD44 (E)의 반-정량적 RT-PCR 분석. 결과는 정상적인 유선 조직에서의 발현에 대한 상대 배수 유도로서 표현된다.

[0041] 도 6A 내지 6H는 MMTV-Wnt-1 트랜스제닉 유방 종양에서의 WISP-1, HAS2 및 CD44 발현 및 HA 축적을 나타낸다. MMTV-Wnt-1 트랜스제닉 마우스 유방 종양에서의 WISP-1 (A, B), HAS2 (C, D) 및 CD44 (E, F)의 동일계내 혼성화, CD44 (G)의 면역조직화학, 및 히알루로난의 bHABP 형광 염색 (H), t, 종양, s, 기질.

[0042] 도 7A 내지 7L은 WISP-1 발현이 전이성 폐 콜로니화 및 종양 성장을 촉진시킴을 나타낸다. WISP-1의 효과를 누드 마우스의 꼬리 정맥에서 NRK/대조군, NRK/WISP-1L 또는 NRK/WISP-1H 세포를 주사함으로써 분석하였다. 주사

후 다양한 시간에, 폐를 MRI에 의해 영상화하고 (A, D, G, J), 검사하고, 그의 총 출현 (B, E, H, K) 및 조직학적 특징 (C, F, I, L)을 기록하였다. 종양에 의한 폐 침습의 중증도를 정상 (A, B, C); 등급 I (D, E, F); 등급 II (G, H, I) 또는 등급 III (J, K, L)으로 등급화하였다.

[0043] 도 8A 내지 B는 CD44 항체가 NRK/WISP-1H 세포 전이를 방지함을 나타낸다. NRK/WISP-1H 세포 (2.5×10^5 세포)를 누드 마우스의 꼬리 정맥에 주사하였다. 마우스를 10 mg/kg의 CD44 항체, 이소형 대조군 항체로, 또는 완충액 만으로 (PBS) 1주에 2회 처치하였다. 폐를 4주 후에 총 해부학적 분석에 대해 검사하였다. 정상 폐의 사진은 비교용으로 나타나 있다.

[0044] 도 9A 내지 9C는 천연 인간 WISP-1의 뉴클레오타이드 (서열 2) 및 추정 아미노산 서열 (서열 2)을 나타낸다.

[0045] 도 10은 NRK 전이 가능성에 대한 WISP-1 발현의 효과를 나타낸다.

[0046] 도 11A 내지 B는 다양한 WISP-1 구조물 및 제조물에 대한 WISP-1 항체의 결합 특성을 나타낸다.

[0047] 도 12A 내지 G는 WISP-1 폴리펩티드의 다양한 도메인의 다이어그램, 및 WISP-1 항체 11C2, 5D4, 9C11 및 3D11에 의해 각각 인식되는 에피토프를 확인하기 위해 수행된 분석의 결과를 나타낸다. 도 12C는 서열 20에 제공된 아미노산 서열을 예시한다.

[0048] 도 13은 WISP-1 항체 9C10에 의해 인식되는 에피토프를 확인하기 위해 수행된 분석에 대한 결과를 나타낸다.

[0049] 도 14는 WISP-1 항체에 의한 WISP-1의 검출을 입증하는 ELISA의 결과를 나타낸다.

[0050] 도 15는 WISP-1의 가변 영역을 인식하는 WISP-1 항체가 헤파린에의 WISP-1 결합을 억제할 수 있음을 입증하는 ELISA 결합 분석의 결과를 나타낸다.

[0051] 도 16A 내지 B는 WISP-1 항체에 의한 NRK 세포의 촉각주성의 억제를 검출하는 분석 (16A) 및 WISP-1 항체의 특성 및 특징을 요약하는 도표 (16B)의 결과를 나타낸다.

[0052] 도 17A 내지 E는 WISP-1 항체의 효과의 생체내 연구의 결과를 나타낸다. 3주 후, WISP-1 항체 처치된 동물에서 발견된 병변의 중증도는 대조군에 비해 매우 약화되었다 (도 17a, b). WISP-1 항체로 처치된 마우스 ($n = 5$)에서 발견된 전이성 병소의 결절의 수 및 평균 면적은 대조군 항체로 처치된 동물에 비해 감소되었다 (도 17c, d). 병변에 의해 덮힌 총 폐 면적은 이소형 대조군 항체로 처치된 동물에 비해 82 내지 97%까지 감소되었다 (도 17e).

[0053] 도 18은 반-정량적 RT-PCR (태크맨(Taqman))에 의해 측정된 바와 같은 4T1/대조군, 4T1/WISP-1L, 4T1/WISP-1H, NRK/대조군, NRK/WISP-1L, 및 WISP-1H 세포주에서의 WISP-1의 발현을 나타내는 막대 도표이다.

[0054] 도 19는 4T1/대조군, 4T1/WISP-1L, 및 4T1/WISP-1H 세포주의 콜로니 형성에 대한 시험관내 분석의 결과를 나타낸다.

[0055] 도 20은 매트릭겔(Matrigel) 변형된 보이든 챔버 시스템 및 4T1/대조군, 4T1/WISP-1L, 및 4T1/WISP-1H 세포주를 이용하여 침습 지수를 측정하는 시험관내 분석의 결과를 나타낸다.

[0056] 도 21A 내지 B는 유방 표피 세포 종양발생에 대한 WISP-1 발현의 효과를 나타낸다. WISP-1의 효과는 Balb/C 마우스에서 4T1/대조군 1, 4T1/대조군 2, 4T1/WISP-1L 또는 4T1/WISP-1H 세포를 주사함으로써 분석하였다. 종양 부피 (21A) 및 종양 중량 (21B)이 보고된다.

[0057] 도 22는 접종된 4T1/대조군, 4T1/WISP-1L 및 4T1/WISP-1H 세포에 의해 형성된 종양에서의 HAS2 및 CD44의 상대적 발현을 예시하는 막대 도표이다.

[0058] 도 23A 내지 F는 4T1 세포를 마우스 유방 지방 패트에서 접종하고, 마이크로 컴퓨터 단층촬영술 및 조직학에 의한 전이성 증식의 정도를 검사함으로써 평가된 생체내에서 유방-표피 세포 전이에 대한 WISP-1 효과를 예시한다. 31일 후, 4T1/WISP-1L 또는 4T1/WISP-1H 세포로 접종된 마우스 (도 23b 및 23d)는 4T1/대조군 주사된 마우스(도 23a 및 23c)에 비해 광범위한 폐 전이를 가졌다. 면역조직화학을 이용하여, 또한 4T1/WISP-1 폐 전이성 병소가 CD44의 높은 수준을 발현하였음이 관찰되었다 (도 23e). 상기 종양에서, CD44는 4T1/WISP-1 세포의 형질막에 편재되었다 (도 23f).

[0059] 도 24A는 반-정량적 RT-PCR (태크맨)에 의해 측정된 바와 같은 NRK/대조군, NRK/WISP-1₁₂₃₄, NRK/WISP-1₁₃₄, NRK/WISP-1₂₃₄, NRK/WISP-1₁₂₃ 및 NRK/WISP-1₁₂₄ 세포주에서의 WISP-1 발현을 나타내며, 결과는 NRK/WISP-

1_1234에서의 WISP-1 발현에 대한 배수로서 표현된다. 도 24B는 생체내에서 종양발생에 대한 상기 구조물의 효과를 예시하며, 결과는 종양 부피에 대한 효과에 의해 나타내어진다.

[0060] 도 25는 도 24에서 지칭된 절제된 종양의 조직학적 분석을 나타내며, NRK/WISP-1_234 종양으로부터의 신생물 세포가 NRK/WISP-1_1234 종양으로부터의 신생물 세포와 표현형적으로 유사함을 밝혀내었다. 상기 종양에서, 세포는 섬유모세포성, 분화된 및 방추형으로 보였다. NRK/WISP-1_134로부터의 신생물 세포는 표현형적으로 상이하며 덜 분화된 것으로 보였고, 빈번히 다핵화되었으며, 다양한 유사분열 특징 (화살표)의 존재에 의해 입증된 바와 같은 활발한 유사분열 속도를 가졌다.

[0061] 도 26은 도 24에서 지칭된 NRK/WISP-1_134 이종이식에서의 절제된 종양의 조직학적 분석을 나타내며, 신생물 세포가 종양에 인접한 몇몇 혈관을 침습함을 밝혀내었다.

[0062] 도 27은 빈 벡터로 형질감염된 HEK 293 세포가 변형된 보이든 챔버 시스템에서 평판배양된 대조군에 비한 배수 침습으로서의 표현을 나타낸다. 4T1 세포는, 구조물 WISP-1_1234, WISP-1_134 또는 WISP-123을 발현하는 HEK 293 세포가 하부 챔버에서 씨앗될 경우 4 배수 증가를 입증하였다.

[0063] 도 28A 내지 28B는 매트릭셀 코팅된 변형된 보이든 챔버 시스템을 이용하여 평가한 바와 같이, WISP-1 촉진된 4T1 세포 침습에 대한 가용성 WISP-1-도메인의 효과를 예시한다. 결과는 4T1/ 대조군 세포에 비해 상대적 배수 침습으로서 표현된다. WISP-1-도메인-1-His 및 WISP-1-도메인-1-Fc는 WISP-1 촉진된 4T1 침습에 대한 투여량 의존성 길항제 활성을 입증한다.

[0064] 도 29는 WISP-1 발현을 평가하는 인간 췌장 선암종의 HPAC 이종이식 모델로부터의 조직의 동일계내 혼성화 분석을 예시한다.

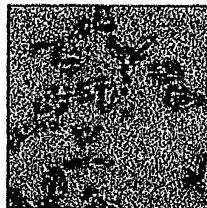
[0065] 도 30은 누드 마우스 모델에서 종양 부피에 대한 WISP-1 구조물의 효과를 예시하는 그래프를 나타낸다.

[0066] 도 31은 원발성 인간 췌장 선암종에서 WISP-1 발현을 평가하는 동일계내 혼성화 분석을 나타낸다.

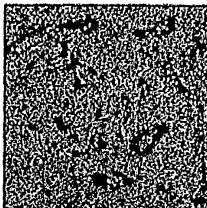
[0067] 도 32는 원발성 결장 선암종에서 WISP-1 발현을 평가하는 면역조직화학적 염색을 나타낸다.

도면

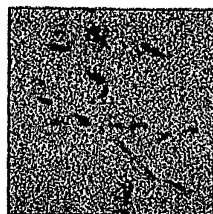
도면1A



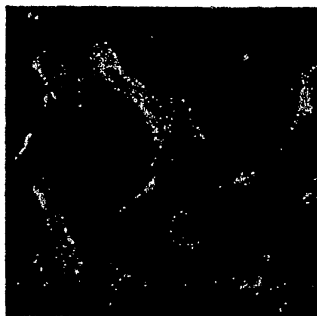
도면1B



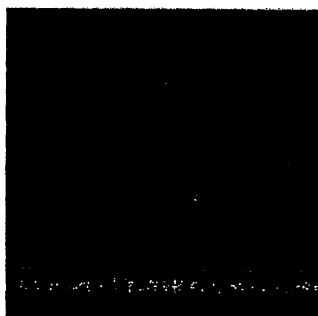
도면1C



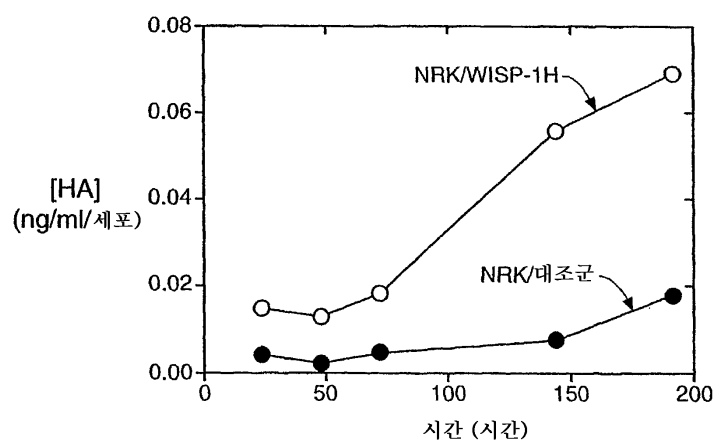
도면1D



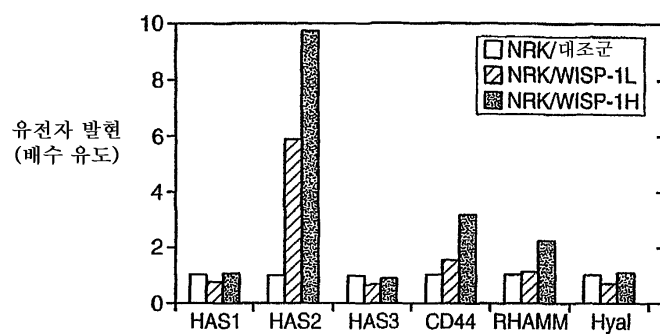
도면1E



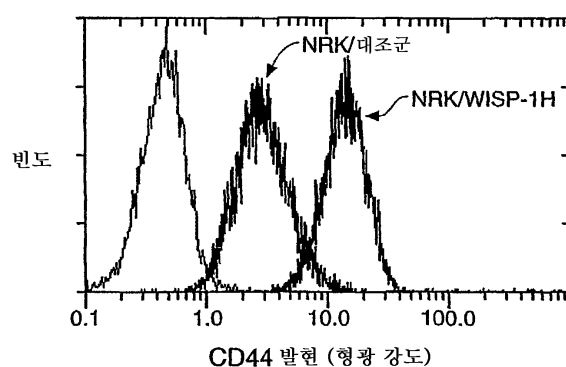
도면1F



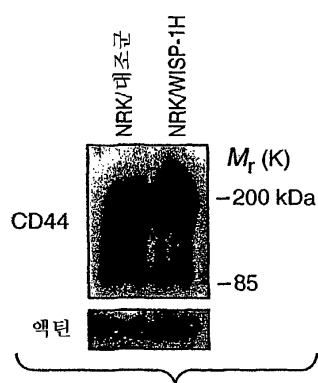
도면2A



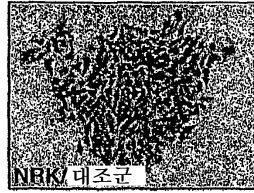
도면2B



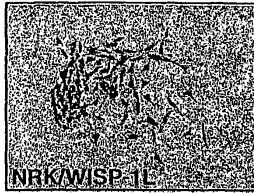
도면2C



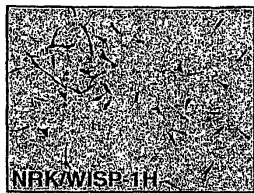
도면3A



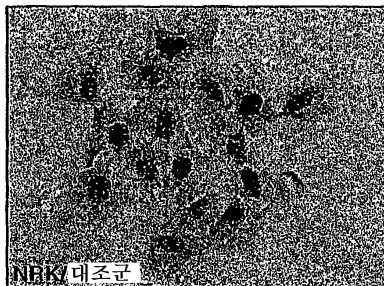
도면3B



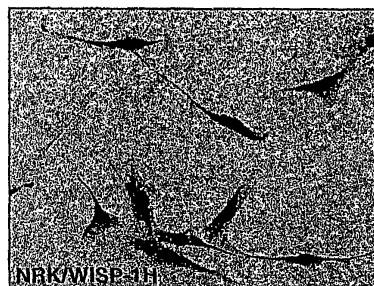
도면3C



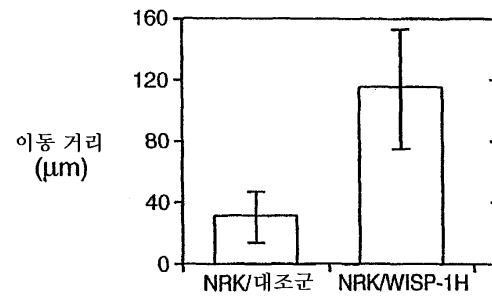
도면3D



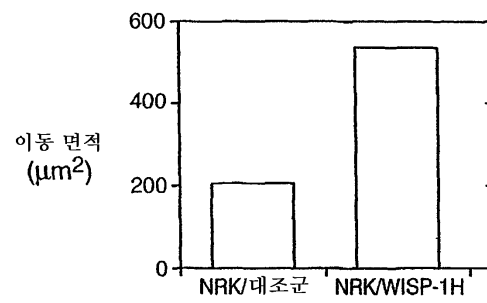
도면3E



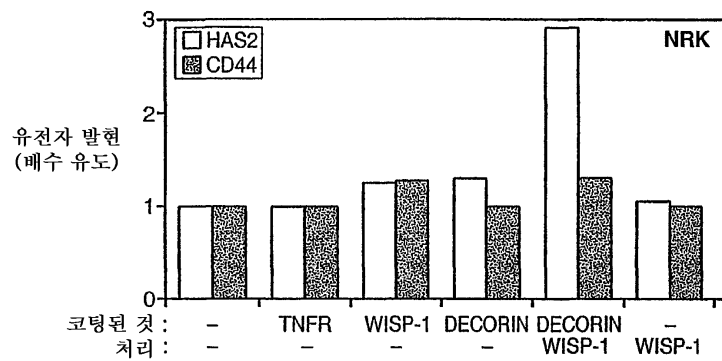
도면3F



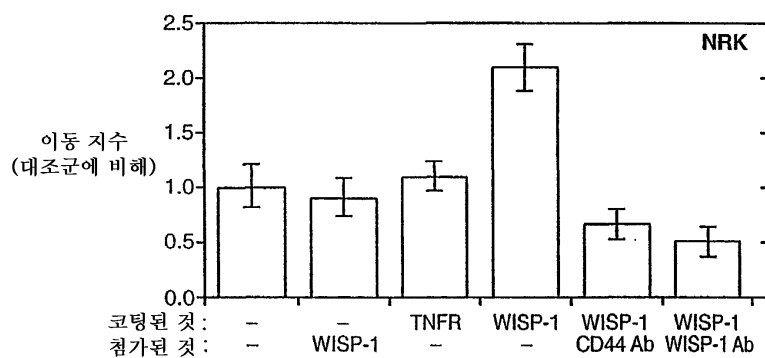
도면3G



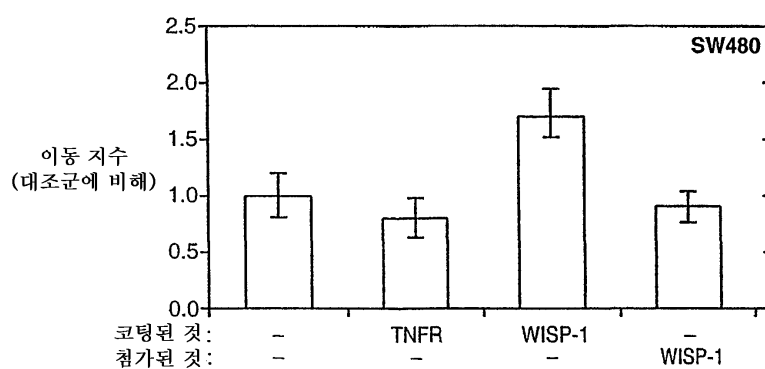
도면4A



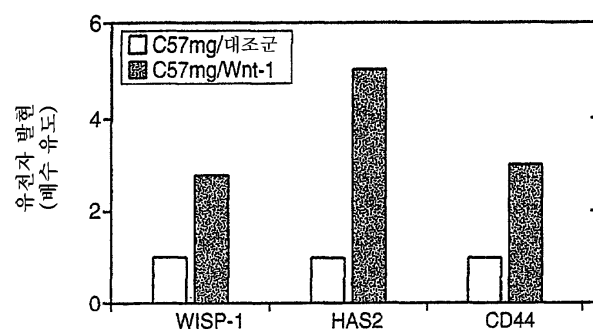
도면4B



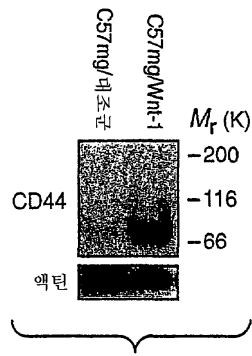
도면4C



도면5A



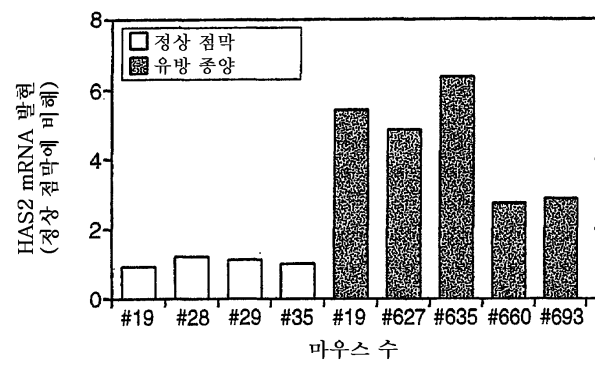
도면5B



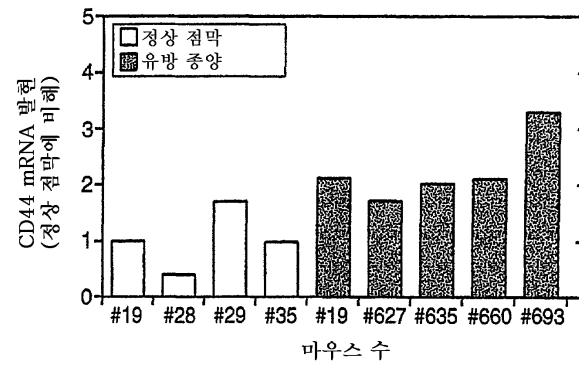
도면5C



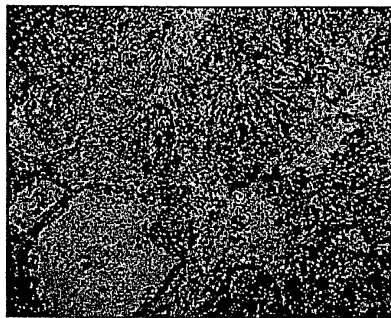
도면5D



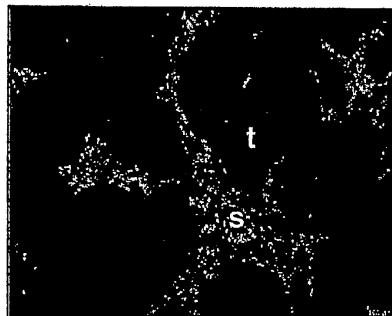
도면5E



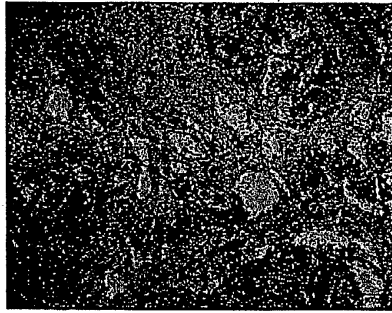
도면6A



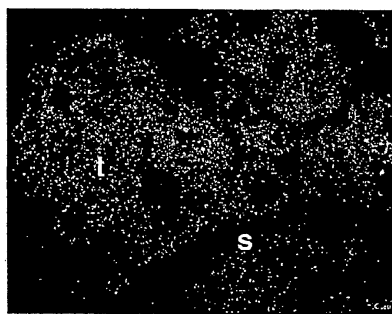
도면6B



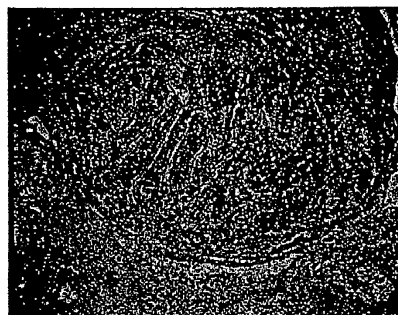
도면6C



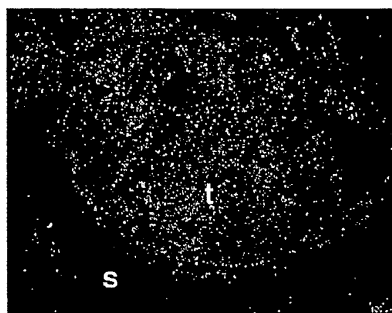
도면6D



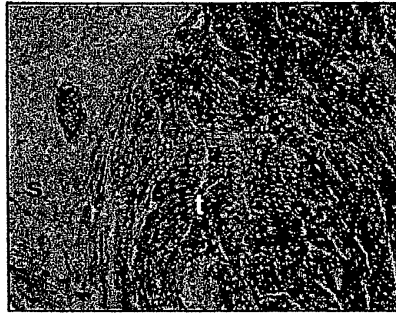
도면6E



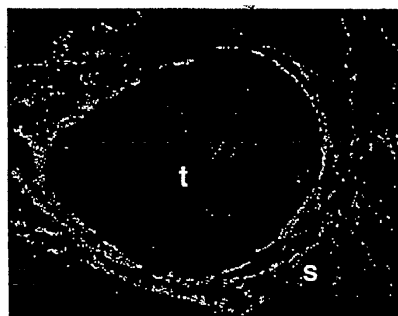
도면6F



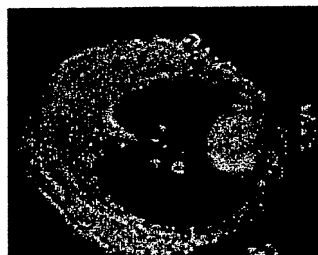
도면6G



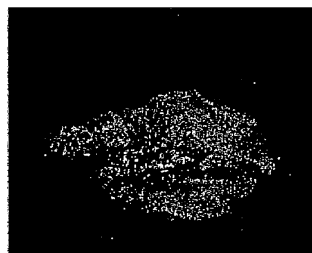
도면6H



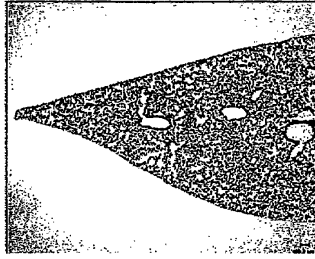
도면7A



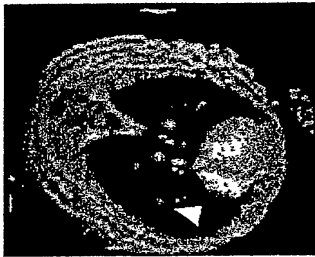
도면7B



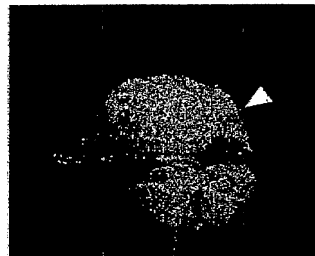
도면7C



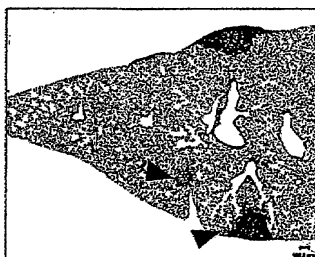
도면7D



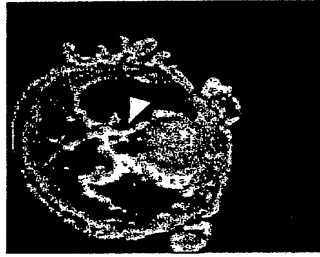
도면7E



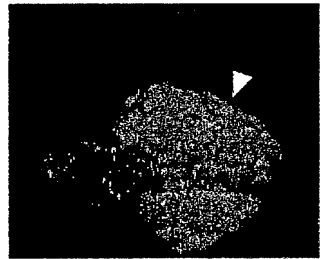
도면7F



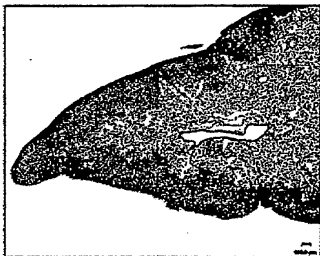
도면7G



도면7H



도면7I



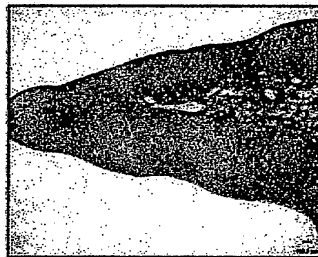
도면7J



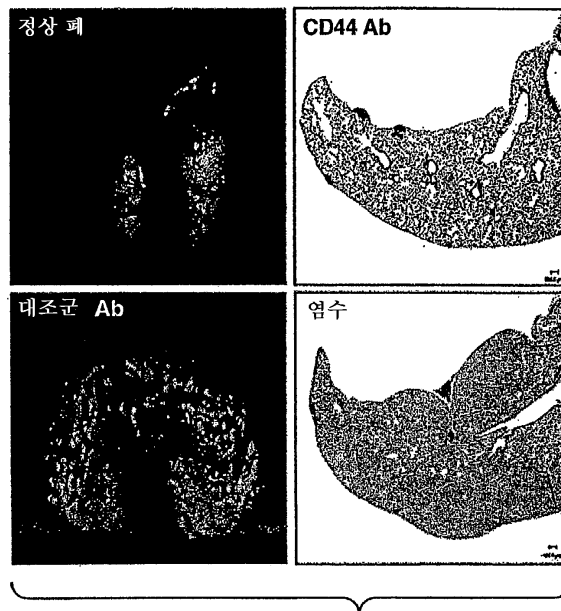
도면7K



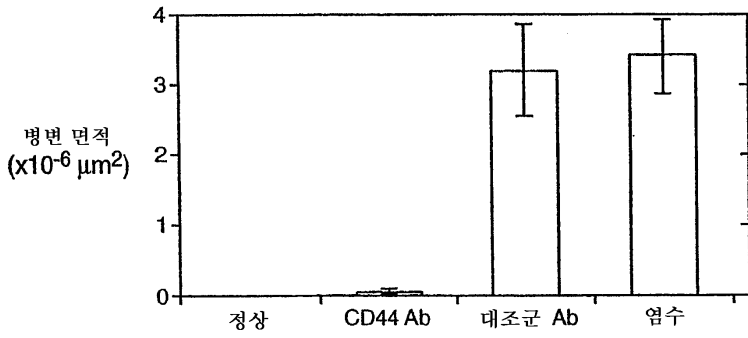
도면7L



도면8A



도면8B



도면9A

1 CCCACGCGTC CGCTGAGGCC AGCTGCCCGC AGAGTGGGTC GGATCTCTTC GGTCTCTCGG TGGAATGCCG TGCCACTGAC GTCCAGGCAT GAGGTGGTTC
GGGTGGGCGAG GCGACCCCGG TGGAAGGGGAG TCTTCACAGG CCTAGAGAGAC CCGACGAGGC AGTACGGAC ACGGTAGCTG CAGGTCCGTA TTCACCGAAG
M R W F
101 CTGACCTTGA CGCTGGCAGC AGTAGACGA GCAAGCCGCA GCAAGCTTCT GGCCACGGGC CTCTCTCCAG CCCCACGAC CATGACCTTT ACTCCAGCTC
GACGGAGCTT GCGACCGCTG TCACTGTCTG CGTCGGGGGT CGTGCCAGGA CCGGTGCCCG GAGAGAGTTC GGAGATCTG GTACCTGATA TGAAGTGAAG
5 L P W T L A A V T A A A A S T V L A T A L S P A P T T M D F T P A P
201 CACTGAGGA CACTCTCTCA CCCCCCAT TCTGCAAGTC GCGATGTGAG TGCCCGCAT CCCCACCGCG CTGCCCCCTG GAGGTCAAGC TCATCACAGA
GTGACCTCTT GTGAGAGAT GCGGGGGTTA AGACGTTCAC CGGTACACTC ACCGGGGGTA GGGGTGGGAG GACGGCGAC CCCCAGTCCG AGTAGTGTCT
39 L E D T S S R P Q F C K W P C E C P P S P P R C P L G V S L I T D
301 TGCTGTGAG TGCTGTAGA TGTGGCTCA GCACTTTGGG GACAATGCA CCGAGCTTC CATTTGTAC CCCCACCGCG GCTCTACTG TCACTACAGC
ACCGACACTC ACAGATTCT ACAGCGAGT CGTGAAGCC CTGTTGAGT GCTTCCGAG GTAGACACTG GGGGTGGGCC CCGAGATGAC ACTGATGTG
72 G C E C C K M C A Q Q L G D N C T E A A I C D P H R G L Y C D Y S
401 GGGGACCGCC CGAGTACGC AATAGAGATG TGTGACAGG TGTGCGGT GGCTGCGGTC CTGATGAGG TGCGCTACA CAAGGCGAG TCCTTCCAGC
CCCCGAGCG GCTTCATGCG TTATCTTAC ACAGTGTCC ACAGCCACA CCGACGCAAG GACCTACCC ACAGATGTT GTGCGCGTC AGAAGGTG
105 G D R P R Y A I G V C A Q V V G V G C V L D G V R Y N N G Q S F Q P
501 CTAAGTCAA GTACACTGC ACGTGCAATG ACCGCGGCTT GAGCTGACA CCACTGACC TCCGAGTACG CCCCCCGCT CTCTGTGCC CCGACCGCG
GATGACGTT CATGTTGACG TGCAAGTAGC TGCCGGGCGA CCGGACGCTT GTGACACGAG AGGCTCAAGC GGGGGGCGCA GAGACACAG GGGTGGCGC
139 N C K Y N C T C I D G A V G C T P L C L R V R P P R L W C P H P R
601 GCGGTGAGC ATACCTGAGC ACTGCTGTGA GCAATGGGTA TGTAGAGAGC ACCCGAAGAG GCGACGCAAG ACCGACCCG GTGACACAGG AGCTTGCAT
CGGCACTCG TATGAGCGCG TGACGAGACT CGTACCCAT ACATTCCTGC TCGGGTCTC GGTGCGCTTC TGCGTGGGG CACTGTGCTC TCGGAAGCTA
172 R V S I P G H C C E Q W V C E D D A K R P R K T A P R D T G A F D
701 GCTGAGGAGT AGTGGAGAGC ATGGACAGG AACTGCAATG CTTACACAG CCGCTGAGC CTTGTCCA CCACTGAGCG CTGAGGAGTC TTCACCTGGA
CGACACCCAC TTCACCTTCG TACCGTTC TTACGATAC GATGTGTC GGGGACCTCG GAAACGAGT GGTGACGCG GAGCCCGAG AGGTGAGCTT
205 A V G E V E A W H R N C I A Y T S P W S P C S T S C G L G V S T R I
801 TCTCCATGT TAAGCCGAG TGTGGGCTG AGCAAGAGAG CCGCTCTGC AACTGCGGC CATGCAATG GAACATCAT ACATTCATTA AGGACAGGAA
AGAGTTACA ATGCGGGGTC ACAGCCGAGC TCGTCTCTC GCGGAGAGCG TTGAAGCGCG GTACGTACA CTTGTAGGTA TGTAGTAAT TCGGTCCCTT
239 S N V N A Q C W P E Q E S R L C N L R P C D V D I H T L I K A G K

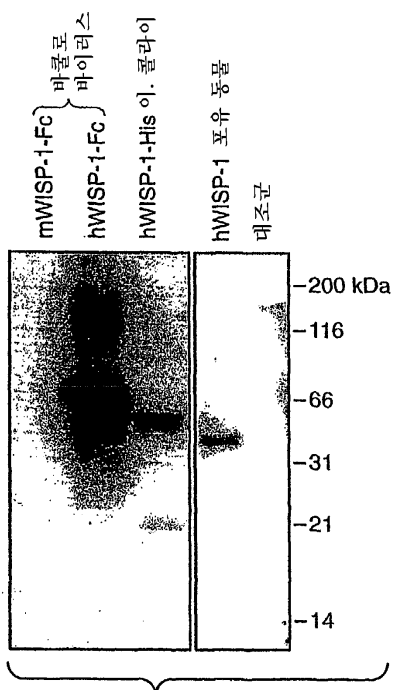
도면 9B

2001 GGGCAGGCTC TTCCTTGAAT CTTCCTCCCTT GTCTGTGCTG GGTTCATAGG AATTGGTAG GCCTCTGAG TGGCCTGTCT GGGCCCTGAG AGTGGTGCC
 CCGGTCCGAG AAGAACTTA GAAGAGGGA CAGACGAGC CCAAGTATCC TTAAACAATC CGGAGACTG ACCGACAGA CCGGGGACTC TCACCACGGG
 2101 TGAACACTC CTCTACTCTT ACAGAGCCTT GAGAGACCA GCTGCAGACC ATGCCAGACC CACTGAATG ACCAAGACAG GTTCAGGTAG GGGGTGGGT
 ACCTTGTGAG GAGATGAGA TGTCTGGGA CTCTGTGGGT CGACGTCTGG TACGCTCTGG GTGACTTTAC TGGTTCGTGC CAAGTCCATC CCGACACCA
 2201 CAACCAAGA AGTGGTGCC CTTCGTAGCA GCTTGGGTG ACCTCTAGAG CTGAGGCTG TGGACTCCA GGGGCCCCG TGTTCAGGAC ACATCTATTG
 GTTGGTTCT TCACCCACGG GAACCATCGT CGACCCAC TGAAGATCTC GACCTCCGAC ACCCTGAGT CCGGGGGG ACAGTCTG TGTAGATTAAC
 2301 CAGAGCTCA TTCACAGCC TTTCGTTCTG CTGACCAAT GGCAGTTTT CTGGTAGGA GATGAGGTT TACCAGTGT TTAGAAACAG AAATGACTT
 GTCTCTGAGT AAAGTGTGG AAAGCAAGC GACTGGTTTA CCGGTCAAAA GACCATCCTT CTACTCCA ATGGTCAACA AACTTTGTC TTATCTGAA
 2401 AATAAGGT TAAAGCTGAA GAGTTGAG CTAAAGGA AAGTTGTTG TTATGAATA TCAGGCTATT ATTTATTGTA TTAGGAAAT AATAATTTA
 TTATTTCAA ATTTGACCTT CTCCAACTTC GATTTCTCT TTCCACAAC AATTACTTAT AGTCCGATTA TAAATAACAT AATCTTTTA TATATAAAT
 2501 CTGTTAGAT TCTTTTATTT AAGGCTTTT CTGTGCCAGA CATTGCTCTC AGTCTTTGC ATGTATTAGC TCACTGAATC TTCACGACAA TGTGAGAG
 GACATCTTA AGAAATATAA TCCCGAAAA GACACGGTCT GTAAGGAGAG TCAGAAACG TACATATAG AGTGACTTAG AAGTGTGTT ACACTCTTC
 2601 TTCCCATTAAT TATTTCTGTT CTACAAAAG TGAACGGA GCTCATAGAG GTGAGAAAC TCAACAGAG TCACCAGTT GGTGACTGG AAAGTTAGA
 AAGGTATAA ATAAAGACAA GAATGTTAC ACTTGCTT CGAGTATCTC CACTCTTTG AGTGGTCTC AGTGGTCAA CCACTGACCC TTTCATCTT
 2701 TTCAGATCGA AATGAGCTG TCTTTATAC CCAATTTTC CCGCTGTTT TAGAGCTCC AAATGTGCA GAATAGGAA ACATTGCAAT AAATGGCTTG
 AAGCTAGCT TTAACTGAC AGAATATTG GGTATAAG GGGACAAAA ATCTCGAAG TTACACAGT CTATCTTT TGTAACTTA TTACCGAAC
 2801 ATTTTTPAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
 TAAAAAATTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT

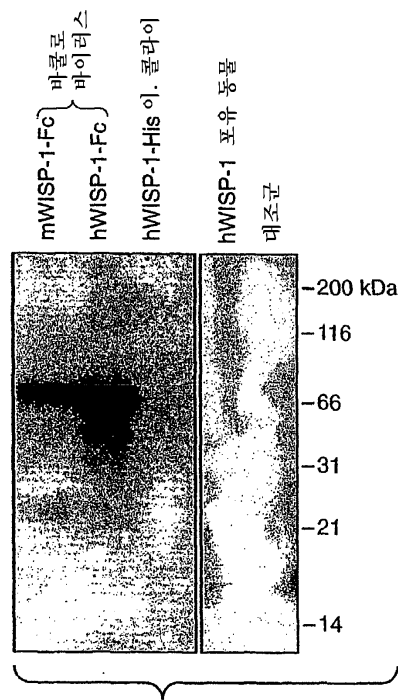
도면10

전이 가능성에 대한 WISP-1의 효과				
주사된 세포 수	접종 후 주 수	폐 전이의 발생		
		NRK/대조군	NRK/WISP-1L	NRK/WISP-1H
2.5×10^5	2	0/1	0/1	2/2 (등급 I)
	3	0/4	3/3 (등급 I)	4/4 (등급 I-II)
	4	0/4	4/4 (등급 I)	3/3 (등급 III)
0.5×10^5	2	0/2	0/2	1/2 (등급 I)
	3	0/4	2/4 (등급 I)	3/4 (등급 I)
	4	0/4	4/4 (등급 I)	3/4 (등급 I-II)

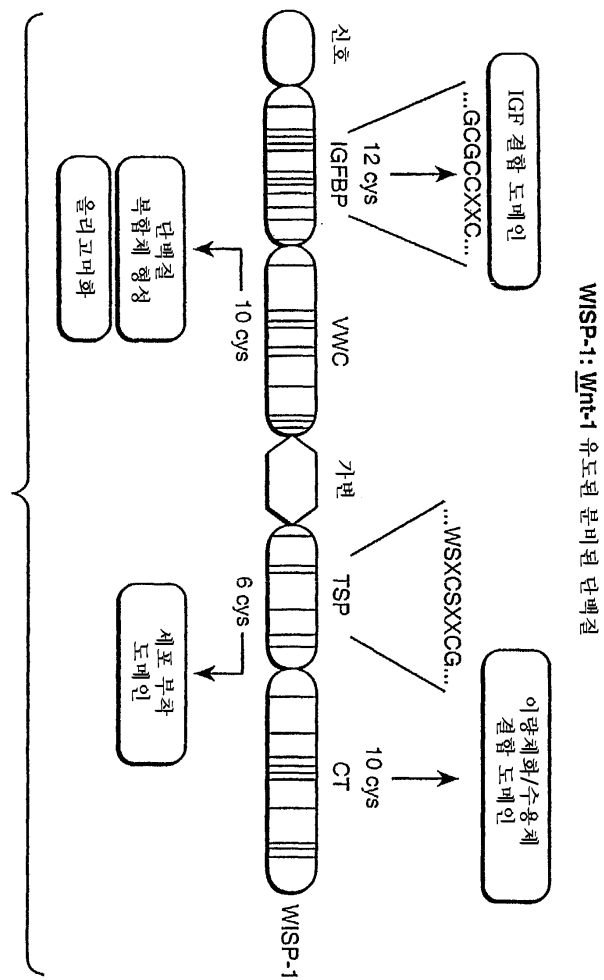
도면11A



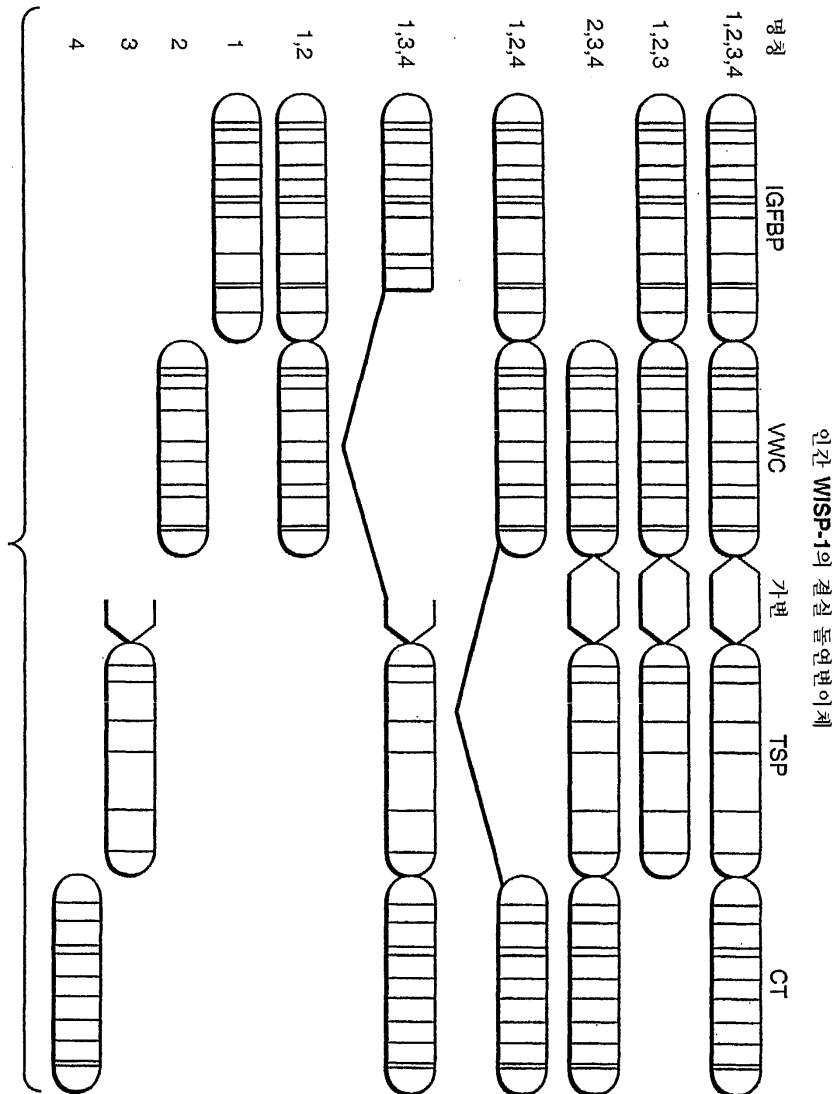
도면11B



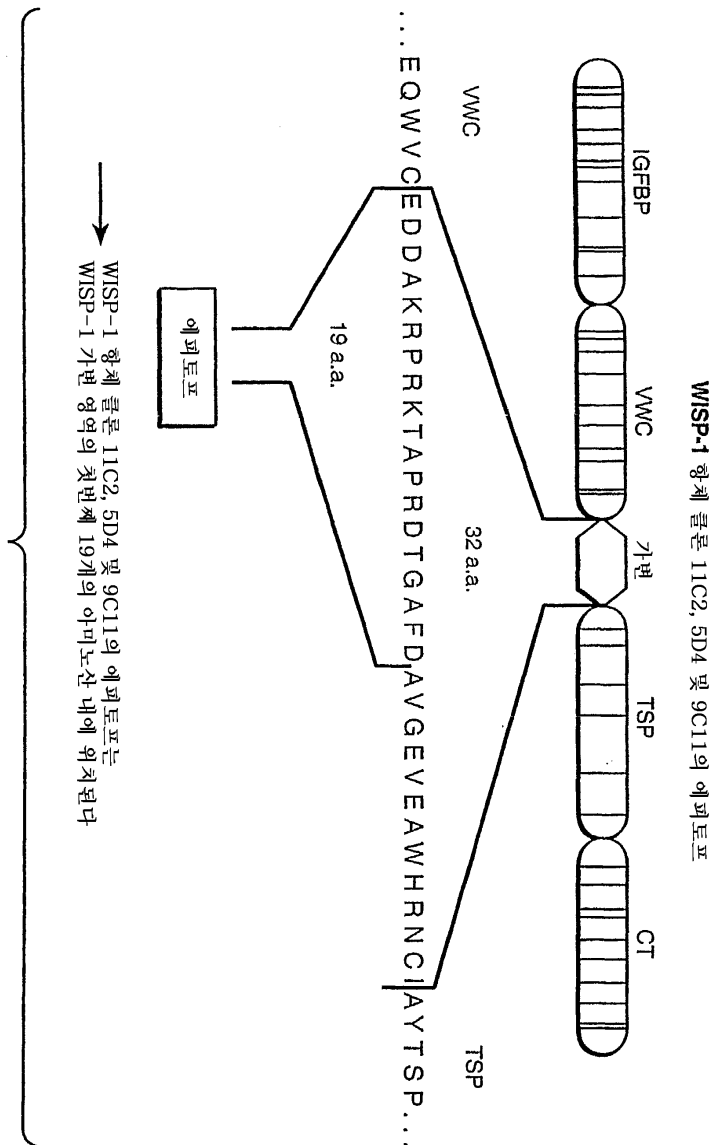
도면12A



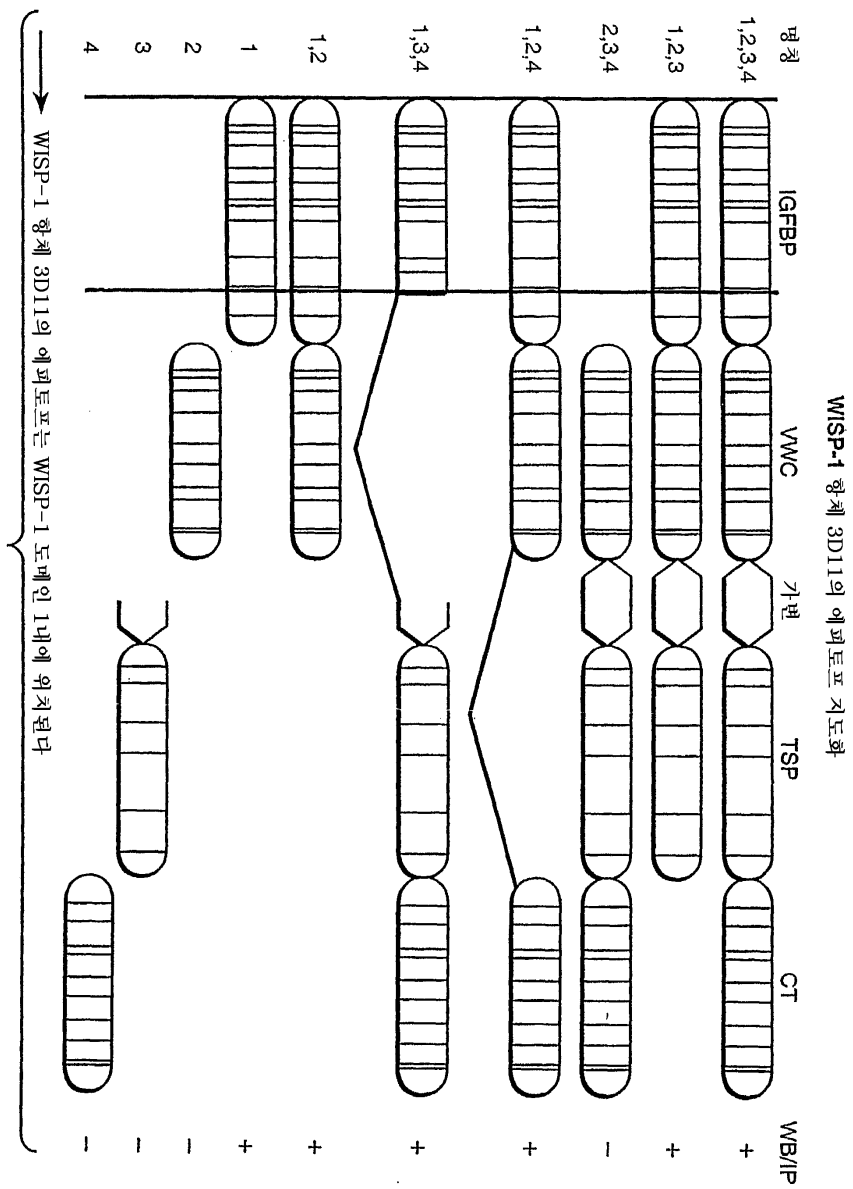
도면12B



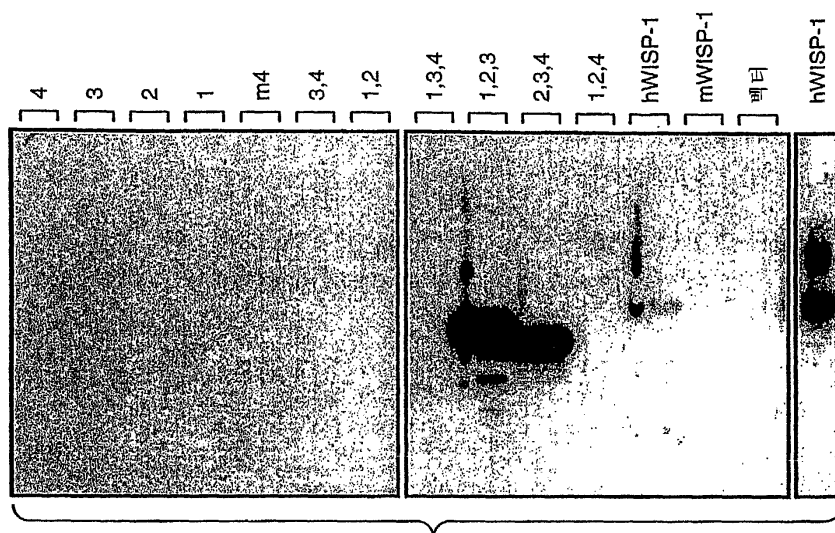
도면12C



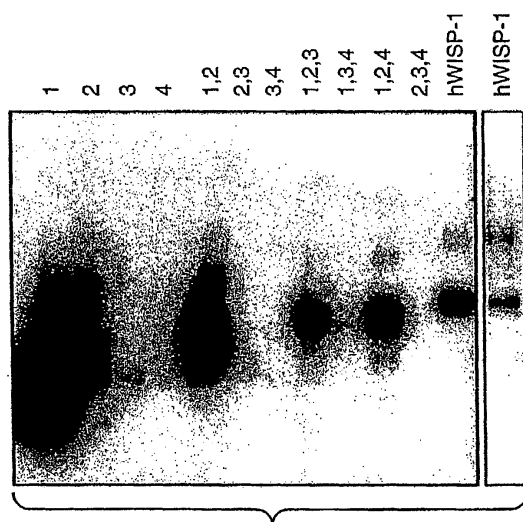
도면12D



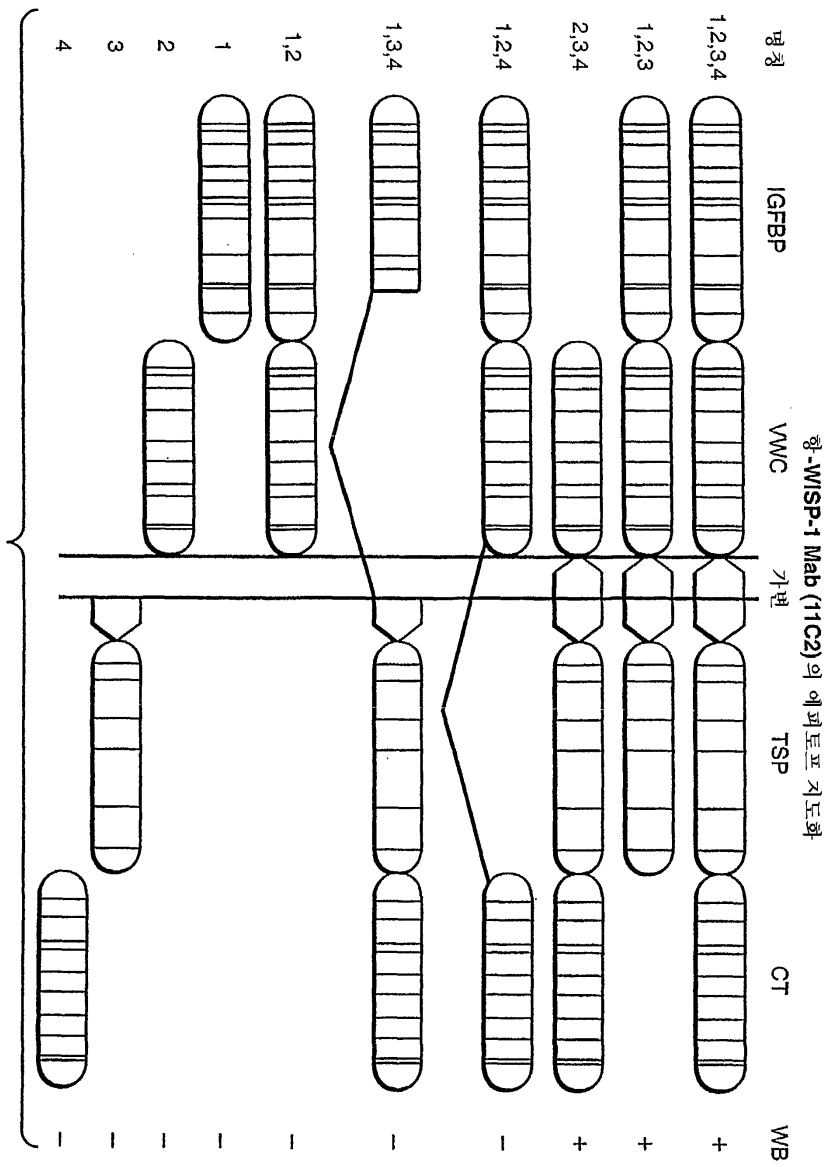
도면12E



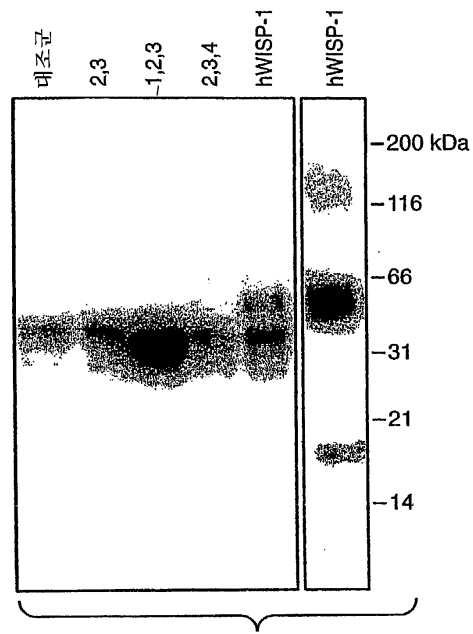
도면12F



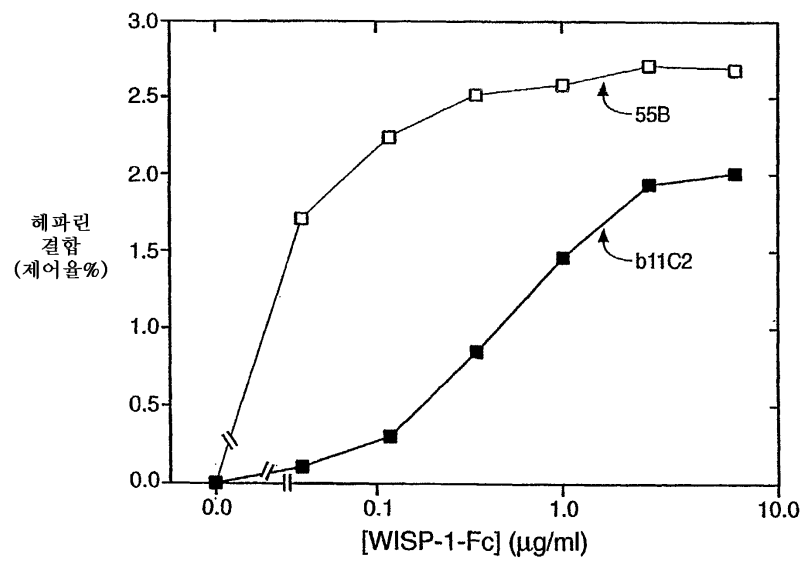
도면12G



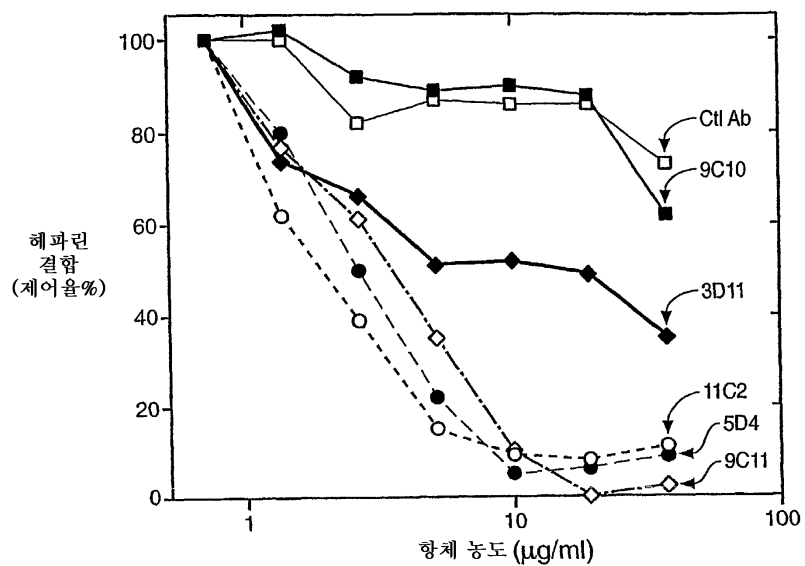
도면13



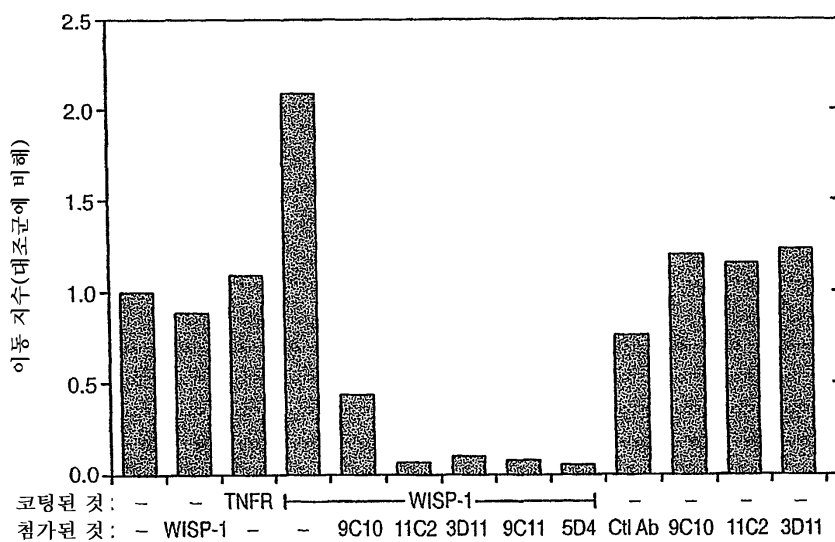
도면14



도면15



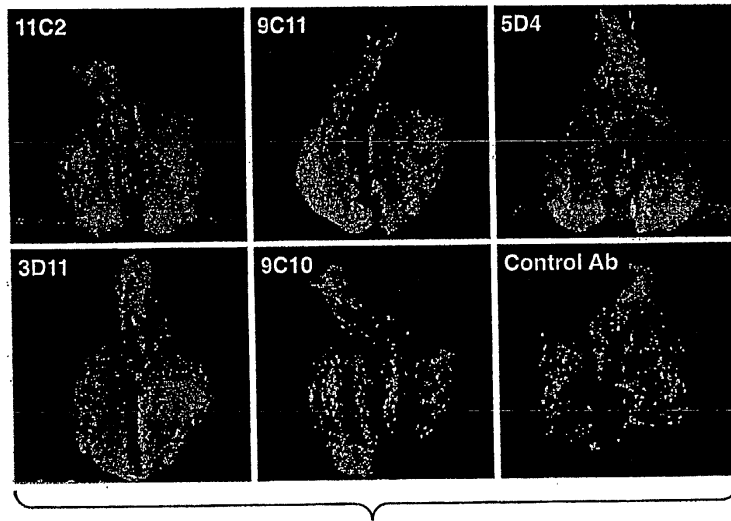
도면16A



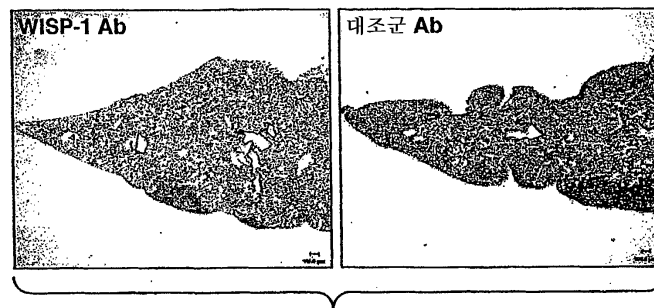
도면16B

WISP-1항체 특성화								
클론	이소형	Epitope		IP	WB	차단 활성		
		구조	교차 경쟁자			헤파린 결합	세포 이동	폐 전이
3D11	2b	도메인 1	A	-	+	+/-	+	+
9C10	2b	도메인 1	B	+	-	-	+	+
11C2	2b	가변 영역	C	+	+	+	+	+
5D4	2a	가변 영역	C	+	+	+	+	+
9C11	2a	가변 영역	C	+	+	+	+	+

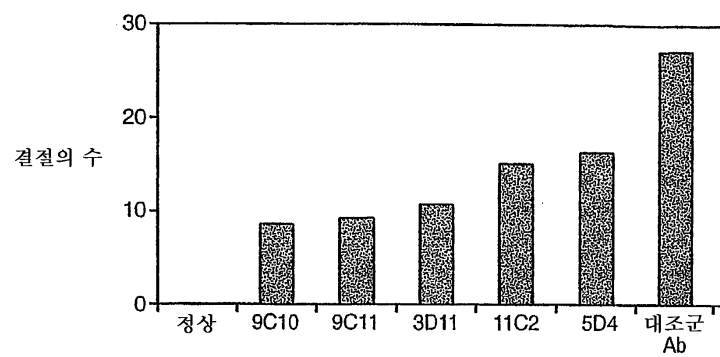
도면17A



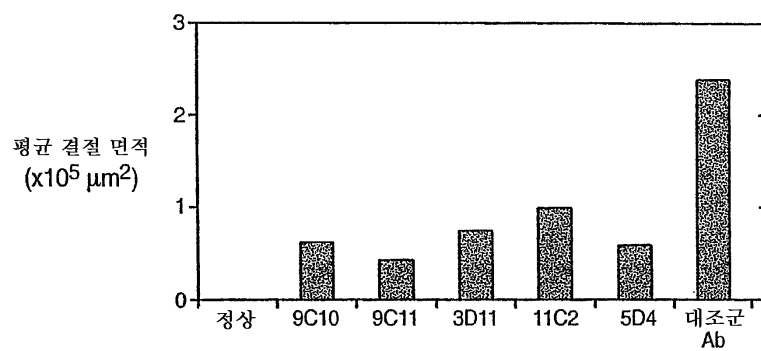
도면17B



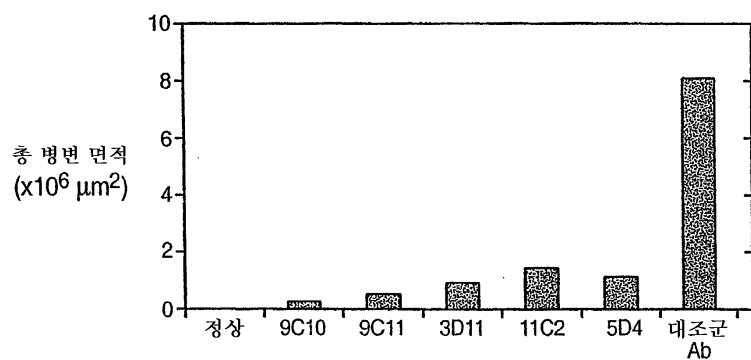
도면17C



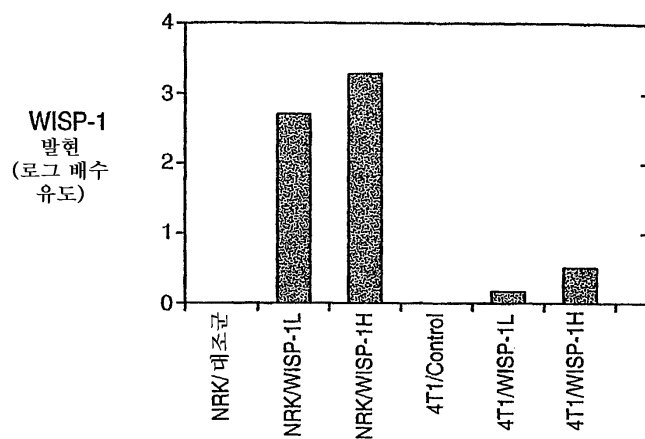
도면17D



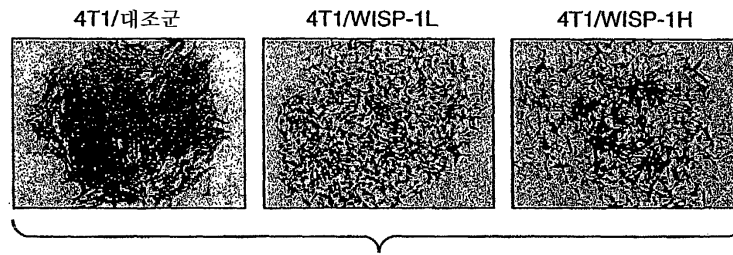
도면17E



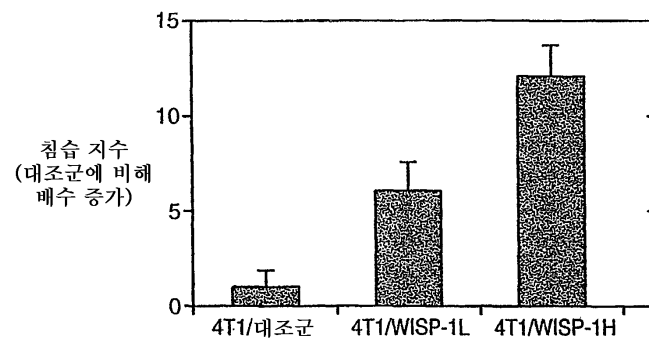
도면18



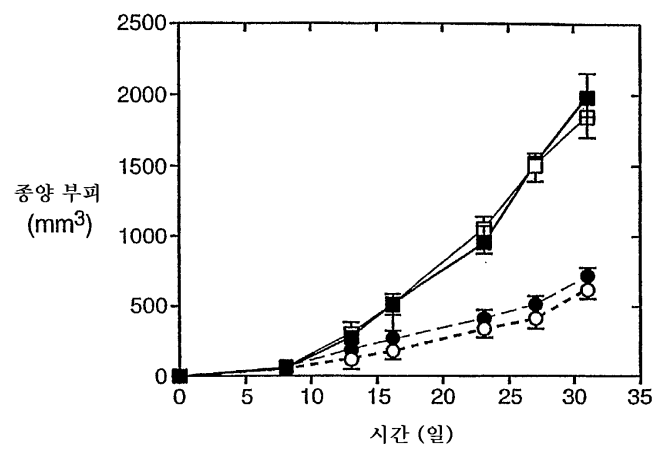
도면19



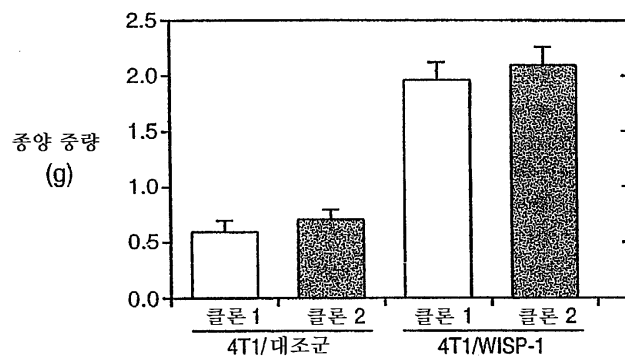
도면20



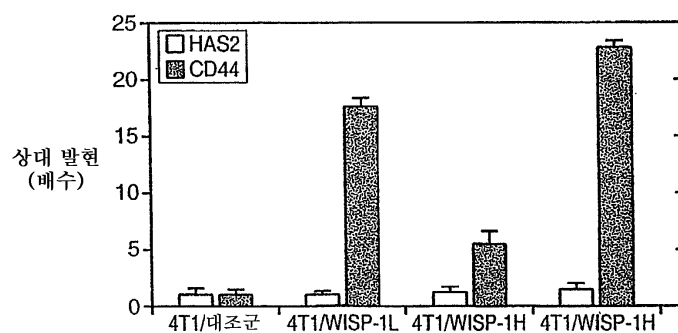
도면21A



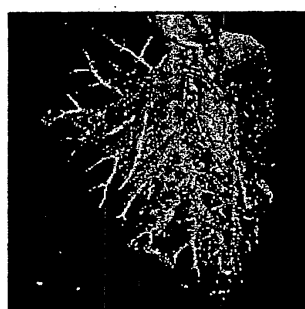
도면21B



도면22



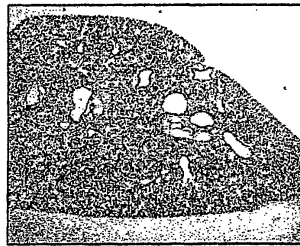
도면23A



도면23B



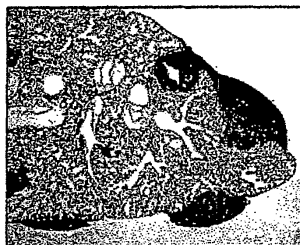
도면23C



도면23D



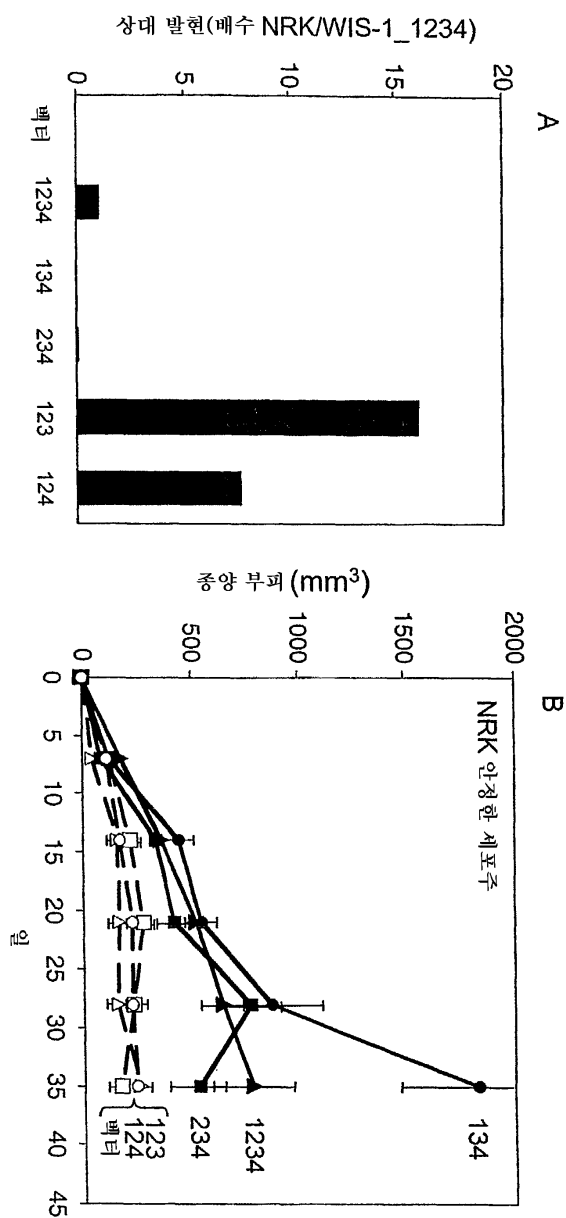
도면23E



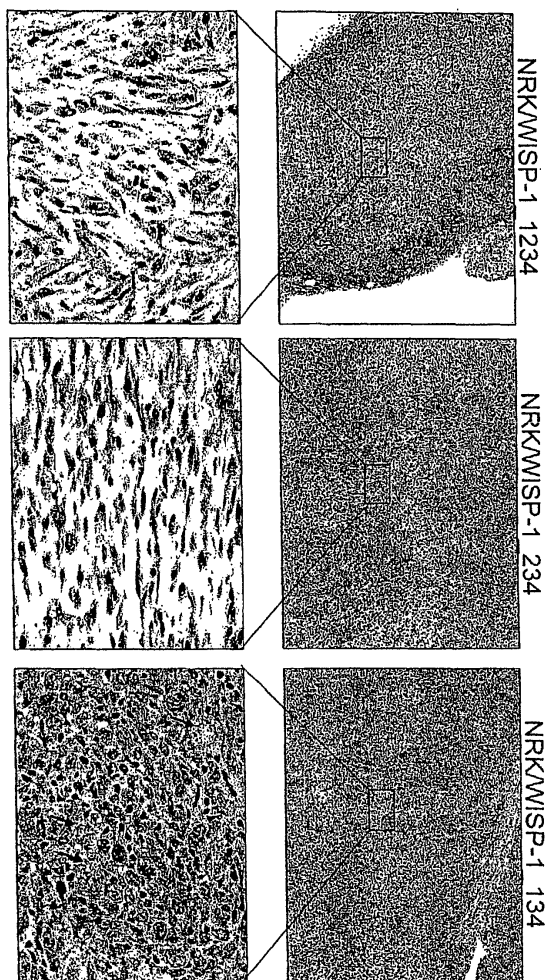
도면23F



도면24



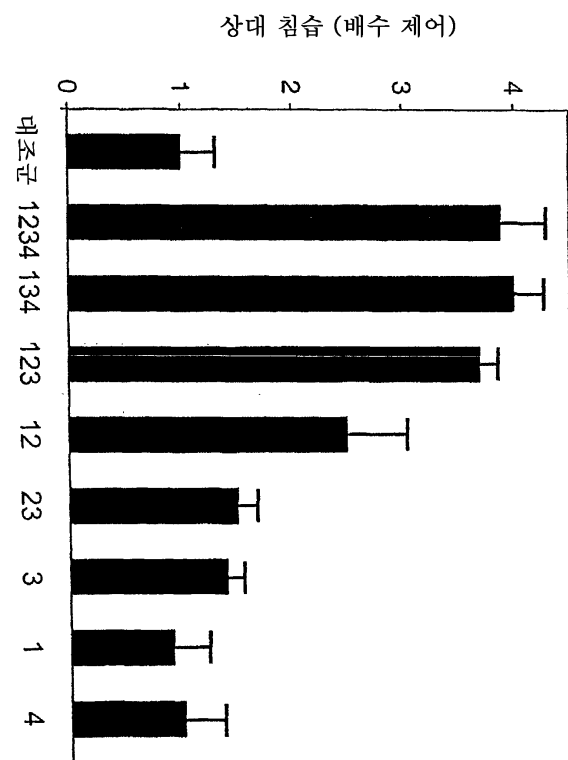
도면25



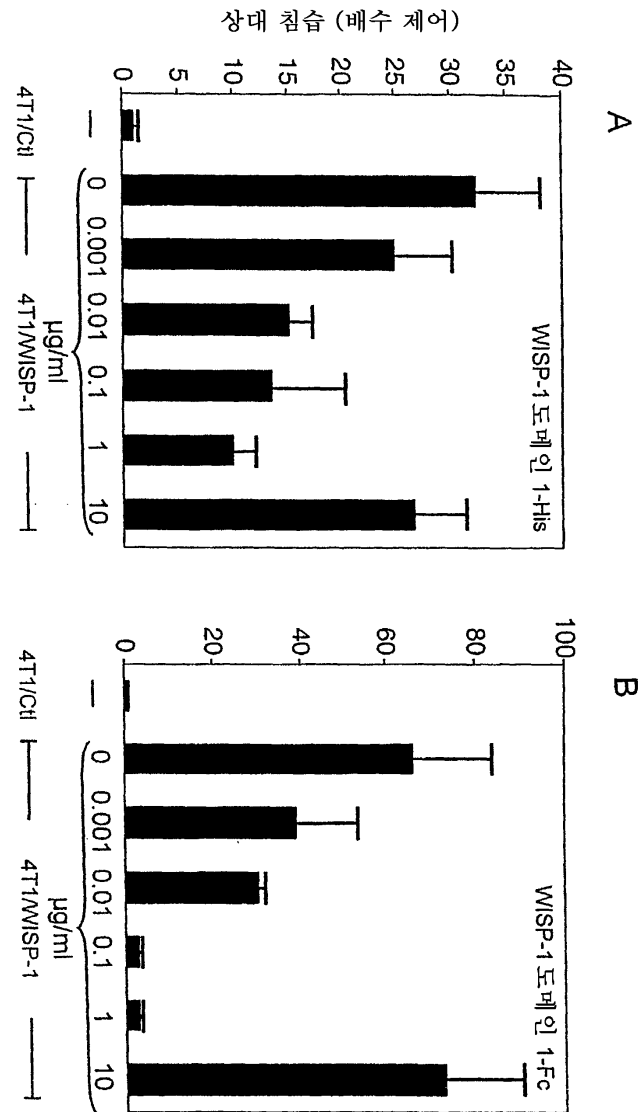
도면26



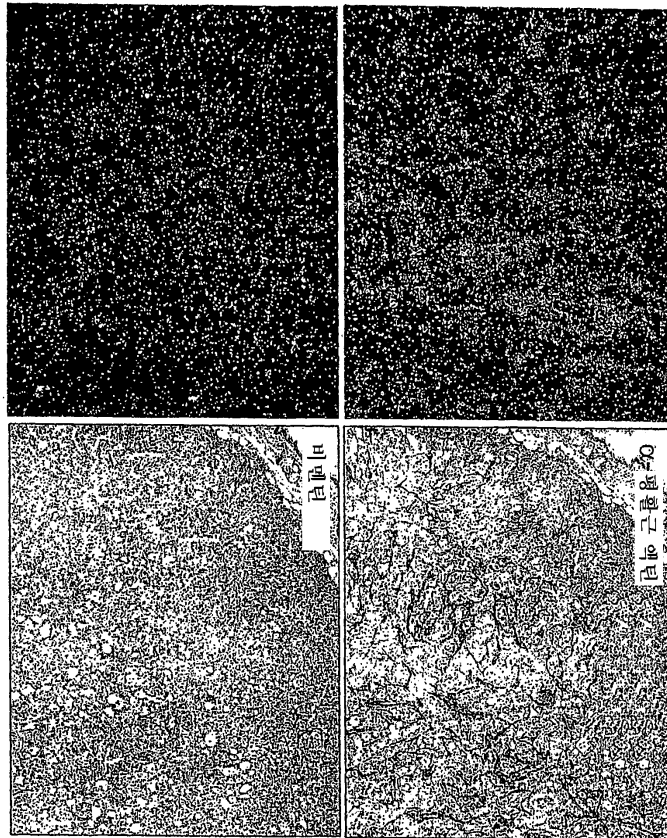
도면27



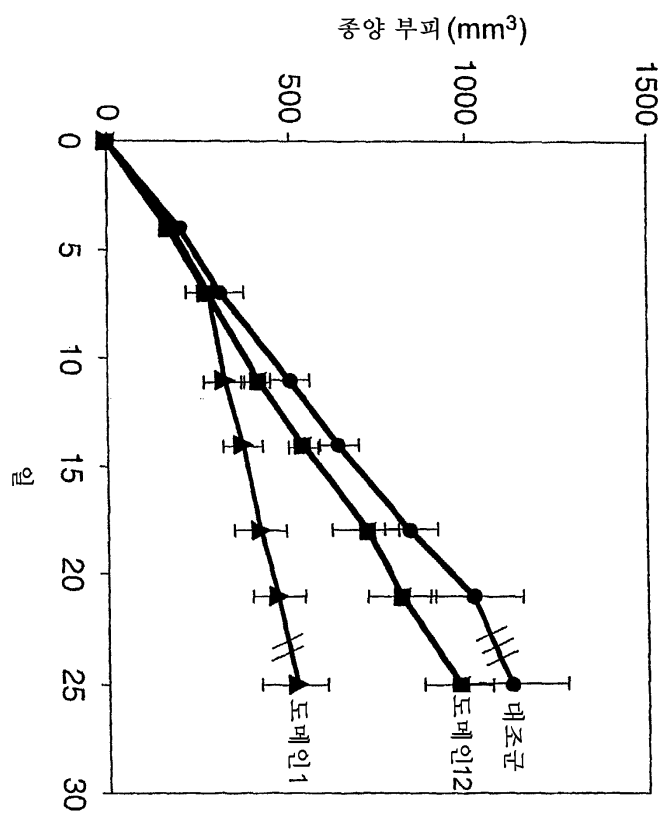
도면28



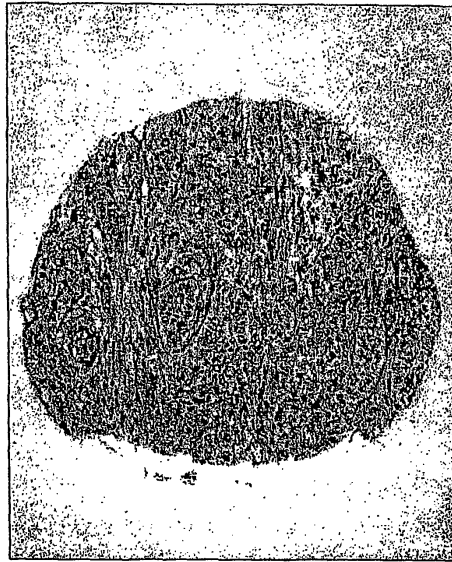
도면29



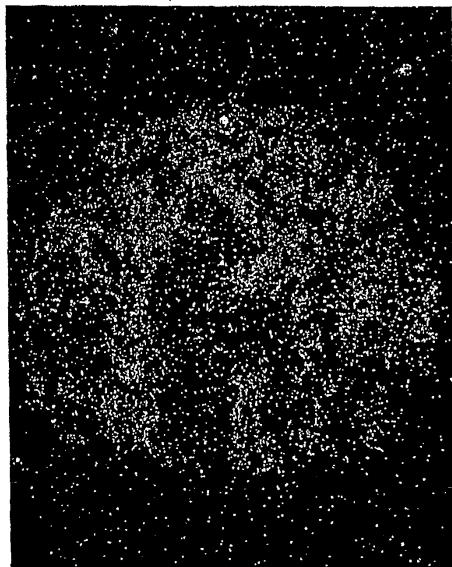
도면30



도면31

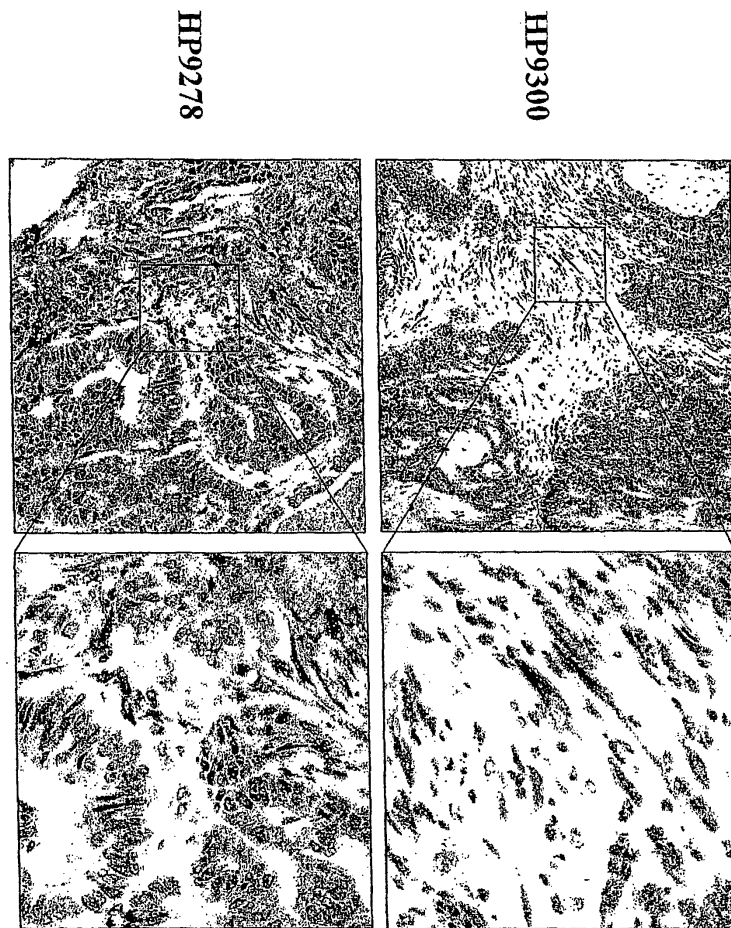


H&E 염색



WISP-1 동일계내 혼성화

도면32



서열목록

<110> DESNOYERS, LUC
FILVAROFF, ELLEN

<120> Methods and Compositions for Modulating and Detecting
WISP Activitiy

<130> P1918R1P1

<140> US 11/105,876

<150> US 10/519,621

<151> 2004-12-28

<150> US 60/392,652

<151> 2002-06-29

<150> US 60/408,739

<151> 2002-09-06

<160> 22

<210> 1

<211> 367

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met	Arg	Trp	Phe	Leu	Pro	Trp	Thr	Leu	Ala	Ala	Val	Thr	Ala	Ala
1				5					10					15

Ala	Ala	Ser	Thr	Val	Leu	Ala	Thr	Ala	Leu	Ser	Pro	Ala	Pro	Thr
				20					25					30

Thr	Met	Asp	Phe	Thr	Pro	Ala	Pro	Leu	Glu	Asp	Thr	Ser	Ser	Arg
				35					40					45

Pro	Gln	Phe	Cys	Lys	Trp	Pro	Cys	Glu	Cys	Pro	Pro	Ser	Pro	Pro
				50					55					60

Arg	Cys	Pro	Leu	Gly	Val	Ser	Leu	Ile	Thr	Asp	Gly	Cys	Glu	Cys
				65					70					75

Cys	Lys	Met	Cys	Ala	Gln	Gln	Leu	Gly	Asp	Asn	Cys	Thr	Glu	Ala
				80					85					90

Ala	Ile	Cys	Asp	Pro	His	Arg	Gly	Leu	Tyr	Cys	Asp	Tyr	Ser	Gly
				95					100					105

Asp	Arg	Pro	Arg	Tyr	Ala	Ile	Gly	Val	Cys	Ala	Gln	Val	Val	Gly
				110					115					120

Val	Gly	Cys	Val	Leu	Asp	Gly	Val	Arg	Tyr	Asn	Asn	Gly	Gln	Ser
				125					130					135

Phe	Gln	Pro	Asn	Cys	Lys	Tyr	Asn	Cys	Thr	Cys	Ile	Asp	Gly	Ala
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

140	145	150
Val Gly Cys Thr Pro Leu Cys Leu Arg	Val Arg Pro Pro Arg Leu	
155	160	165
Trp Cys Pro His Pro Arg Arg Val Ser	Ile Pro Gly His Cys Cys	
170	175	180
Glu Gln Trp Val Cys Glu Asp Asp Ala	Lys Arg Pro Arg Lys Thr	
185	190	195
Ala Pro Arg Asp Thr Gly Ala Phe Asp	Ala Val Gly Glu Val Glu	
200	205	210
Ala Trp His Arg Asn Cys Ile Ala Tyr	Thr Ser Pro Trp Ser Pro	
215	220	225
Cys Ser Thr Ser Cys Gly Leu Gly Val	Ser Thr Arg Ile Ser Asn	
230	235	240
Val Asn Ala Gln Cys Trp Pro Glu Gln	Glu Ser Arg Leu Cys Asn	
245	250	255
Leu Arg Pro Cys Asp Val Asp Ile His	Thr Leu Ile Lys Ala Gly	
260	265	270
Lys Lys Cys Leu Ala Val Tyr Gln Pro	Glu Ala Ser Met Asn Phe	
275	280	285
Thr Leu Ala Gly Cys Ile Ser Thr Arg	Ser Tyr Gln Pro Lys Tyr	
290	295	300
Cys Gly Val Cys Met Asp Asn Arg Cys	Cys Ile Pro Tyr Lys Ser	
305	310	315
Lys Thr Ile Asp Val Ser Phe Gln Cys	Pro Asp Gly Leu Gly Phe	
320	325	330
Ser Arg Gln Val Leu Trp Ile Asn Ala	Cys Phe Cys Asn Leu Ser	
335	340	345

Cys Arg Asn Pro Asn Asp Ile Phe Ala Asp Leu Glu Ser Tyr Pro
350 355 360

Asp Phe Ser Glu Ile Ala Asn
365

<210> 2

<211> 2830

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

cccacgcgtc cgctgggcc agtcccccg agagggtgtc ggatcctctg 50

ggctgctcgg tcgatgcctg tgccactgac gtccaggcat gaggtggttc 100

ctgccctgga cgctggcagc agtgacagca gcagccgcca gcaccgtcct 150

ggccacggcc ctctctccag cccctacgac catggacttt actccagctc 200

cactggagga cacctctca cgcgcccaat tctgcaagt gccatgtgag 250

tgcccgccat cccaccccg ctgcccgctg ggggtcagcc tcatcacaga 300

tggctgtgag tgctgtaaga tgtgcgtca gcagcttggg gacaactgca 350

cggaggctgc catctgtgac cccacccggg gcctctactg tgactacagc 400

ggggaccgcc cgaggtacgc aataggagtg tgtgcacagg tggtcggtgt 450

gggctgcgtc ctggatgggg tgcgtacaa caacggccag tccttcagc 500

ctaactgcaa gtacaactgc acgtgcatg acggcgcggt gggctgcaca 550

ccactgtgcc tccagtgcg ccccccgct ctctggtgcc cccacccgag 600

gcgcgtgagc atacctggcc actgctgtga gcagtgggtg tgtgaggacg 650

acgccaagag gccacgcaag accgcacccc gtgacacagg agccttcgat 700

gctgtgggtg aggtggaggc atggcacagg aactgcatag cctacacaag 750

ccccctggagc ccttctcca ccagctgcgg cctgggggtc tccactcgga 800

tctccaatgt taacgccag tgctggcctg agcaagagag cgcctctgc 850

aacttgcggc catgcgatgt ggacatccat acactatta aggcaggga 900

gaagtgtctg gctgtgtacc agccagaggc atccatgaac ttcacacttg 950

cgggctgcat cagcacacgc tcctatcaac ccaagtactg tggagtittg 1000

atggacaata ggtgtgcat ccctacaag tctaagacta tcgacgtgc 1050

cttccagtgt cctgatgggc ttggcttctc ccgccaggtc ctatggatta 1100

atgcctgctt ctgtaacctg agctgtagga atcccaatga catctttgct 1150

gacttggaa cctaccctga ctctcagaa attgccaact aggcaggcac 1200

aaatcttggg tcttggggac taaccaatg cctgtgaagc agtcagccct 1250

tatggccaat aacttttcac caatgagcct tagttaccct gatctggacc 1300

cttggcctcc atttctgtct ctaaccattc aaatgacgcc tgatggtgct 1350

gctcaggccc atgctatgag ttttctcctt gatatttc agcatctact 1400

ctaaagaaaa atgcctgtct ctactgttc tggactacac ccaagcctga 1450

tccagccttt ccaagtcact agaagtcctg ctggatcttg cctaaatccc 1500

aagaaatgga atcaggtaga cttttaatat cactaatttc ttcttttagat 1550

gccaaaccac aagactcttt ggttcattc agatgaatag atggaatttg 1600

gaacaataga ataatctatt atttgagcc tgccaagagg tactgtaatg 1650

ggtaattctg acgtcagcgc accaaaacta tctgattcc aaatatgtat 1700

gcacctcaag gtcacaaac atttgccaag tgagtgaat agttgcttaa 1750

ttttgatttt taatggaaag ttgtatccat taacctgggc attgttgagg 1800

ttaagtttct cttcacccct acactgtgaa gggtagacat taggtttgtc 1850

ccagtcagaa ataaaatttg ataaacattc ctgttgatgg gaaaagcccc 1900

cagttaatac tccagagaca gggaaaggtc agccatttc agaaggacca 1950

attgactctc acactgaatc agctgctgac tggcagggtt ttgggcagtt 2000

ggccaggctc ttccttgaat cttctccctt gtcctgcttg ggttcatagg 2050

aattggttaag gcctctggac tggcctgtct ggccctgag agtggtgccc 2100

tggaacactc ctctactctt acagagcctt gagagacca gctgcagacc 2150

atgccagacc cactgaaatg accaagacag gttcaggtag ggggtgtgggt 2200

caaaccaaga agtgggtgcc cttggtagca gcctggggtg acctctagag 2250

ctggaggctg tgggactcca ggggcccccg tgttcaggac acatctattg 2300

cagagactca ttccacagcc ttctgttctg ctgaccaaag gccagtttt 2350

ctggtaggaa gatggagggt taccagttgt ttagaaacag aaatagactt 2400

aataaagggt taaagctgaa gaggttgaag ctaaaaggaa aaggttggtg 2450

ttaatgaata tcaggctatt atttattgta ttaggaaaat ataatattha 2500

ctgttagaat tcttttattt agggcctttt ctgtgccaga cattgctctc 2550

agtgccttgc atgtattagc tcaactgaatc ttcacgacaa tgttgagaag 2600

ttccattat tatttctgtt cttacaaatg tgaacggaa gctcatagag 2650

gtgagaaaaac tcaaccagag tcacccagtt ggtgactggg aaagttagga 2700

ttcagatcga aattggactg tctttataac ccatattttc cccctgtttt 2750

tagagcttcc aaatgtgtca gaataggaaa acattgcaat aaatggcttg 2800

attttttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2830

<210> 3

<211> 440

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gaattcacca tgaggtggtt cctgccctgg acgctggcag cagtgcacgc 50

agcagccgcc agcacctcc tggccacggc cctctctcca gcccctacga 100

ccatggactt tactccagct ccaactggagg acacctctc acgcccccaa 150

ttctgcaagt ggccatgtga gtgcccacca tccccacccc gctgcccgt 200

gggggtcagc ctcatcacag atggctgtga gtgctgtaag atgtgcgctc 250

agcagcttgg ggacaactgc acggaggctg ccatctgtga cccccaccgg 300

ggcctctact gtgactacag cggggaccgc ccgaggtacg caataggagt 350

gtgtgcacag gcggccgcac accacatca ccatcaccat cactaagtga 400

ggccgcatag ataactgatc cagtgtgctg gaattaattc 440

<210> 4

<211> 340

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gaattcacca tgaggtggtt cctgccctgg acgctggcag cagtgcacgc 50

agcagccgcc agcacctcc tggccactgc agtggtcggt gtgggctgcg 100

tcctggatgg ggtgcgtac aacaacggcc agtccttcca gcctaactgc 150

aagtacaact gcacgtgcat cgacggcgcg gtgggctgca caccactgtg 200

cctccgagtg cgcccccg gtctctggcg cccccaccg cggcgcgta 250

gcatactgg ccactgctgt gagcagtggg tatgtgcggc cgacacacc 300

catcaccatc accatcacta agtgaggccg catagataac 340

<210> 5
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 gaattcacca tgaggtggtt cctgccctgg acgtggcag cagtgcacg 50

agcagccgcc agcacctcc tggccactgc agcatggcac aggaactgca 100

tagcctacac aagcccctgg agcccttgc ccaccagtgc cggcctgggg 150

gtctccactc ggatctccaa tgttaacgcc cagtgtggc ctgagcaaga 200

gagccgcctc tgcaacttgc ggccatcga tgtggacatc cataactca 250

ttaaggcggc cgacacacc catcaccatc accatcacta agtgaggccg 300

catagataac tgatccagt t 321

<210> 6
 <211> 442
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 gaattcacca tgaggtggtt cctgccctgg acgtggcag cagtgcacg 50

agcagccgcc agcacctcc tggccactgc aggaagaag tgtctggctg 100

tgtaccagcc agaggcaccc atgaacttca cacttgcggg ctgcatcagc 150
 acacgtcctt atcaacccaa gtactgtgga gtttgcattg acaataggtg 200
 ctgcatcccc tacaagtcta agactatcga cgtgtccttc cagtgtcctg 250
 atgggcttgg ctctccccgc caggctctat ggattaatgc ctgcttctgt 300
 aacctgagct gtaggaatcc caatgacatc tttgtgact tggaatccta 350
 ccctgacttc tcagaaattg ccaacgcggc cgcacaccac catcaccatc 400
 accatcacta agtgaggccg catagataac tgatccagtg tg 442

<210> 7

<211> 619

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gaattcacca tgagggtggt cctgccctgg acgctggcag cagtgcacgc 50
 agcagccgcc agcacgtcc tggccacggc cctctctcca gcccctacga 100
 ccatggactt tactccagct cactggagg acacctctc acgcccccaa 150
 ttctgcaagt ggccatgtga gtgcccgcca tccccacccc gctgcccgct 200
 gggggtcagc ctcatcacag atggctgtga gtgctgtaag atgtgcgctc 250
 agcagcttgg ggacaactgc acggaggctg ccatctgtga cccccaccg 300
 ggcctctact gtgactacag cggggaccgc ccgaggtagc caataggagt 350
 gtgtgcacag gtggctcggg tgggctgcgt cctggatggg gtgcgctaca 400
 acaacggcca gtccttcag cctaactgca agtacaactg cacgtgcac 450
 gacggcgccg tgggctgcac accactgtgc ctccgagtgc gccccccg 500

tctctgggtgc cccacccgc gccgcgtgag catacctggc cactgctgtg 550

agcagtgggt atgtgcggcc gcacaccacc atcacatca ccatcactaa 600

gtgaggccgc atagataac 619

<210> 8

<211> 885

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gaattcacca tgagtggtt cctgccctgg acgtggcag cagtgcacgc 50

agcagccgc agcacgtcc tggccacggc cctctctcca gcccctacga 100

ccatggactt tactccagct cactggagg acacctctc agcccccaa 150

ttctgcaagt ggccatgtga gtcccgcga tccccaccc gctgcccgt 200

gggggtcagc ctcatcacag atggctgtga gtgctgtaag atgtgcgtc 250

agcagcttgg ggacaactgc acggaggctg ccatctgtga cccccaccg 300

ggcctctact gtgactacag cggggaccgc ccgaggtacg caataggagt 350

gtgtgcacag gtggtcggtg tgggctgcgt cctggatggg gtgcgtaca 400

acaacggcca gtccttcag cctaactga agtacaactg cacgtgcac 450

gacggcgagg tgggtgcac accactgtgc ctccaggtgc gcccccgcg 500

tctctgggtgc cccacccgc gccgcgtgag catacctggc cactgctgtg 550

agcagtgggt atgtgaggac gacccaaga ggccacgaa gaccgcacc 600

cgtgacacag gagccttcga tgctgtgggt gaggtggagg catggcacag 650

gaactgcata gcctacacaa gccctggag cccttgcctc accagctgcg 700

gcctgggggt ctccactcgg atctccaatg ttaacgccca gtgctggcct 750

gagcaagaga gccgcctctg caacttgcgg ccatgcgatg tggacatcca 800

tacactcatt aaggcgcccg cacaccacca tcaccatcac catcactaag 850

tgaggccgca tagataactg atccagtgtg ctgga 885

<210> 9

<211> 1014

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

gaattcacca tgaggtggtt cctgccctgg acgtggcag cagtgcacgc 50

agcagccgcc agcacgtcc tggccacggc cctctctcca gcccctacga 100

ccatggactt tactccagct cactggagg acacctctc acgccccaa 150

ttctgcaagt ggccatgtga gtgcccga tccccaccc gctgcccgt 200

gggggtcagc ctcatcacag atggctgtga gtgctgtaag atgtgcgctc 250

agcagcttgg ggacaactgc acggaggctg ccatctgtga cccccaccg 300

ggcctctact gtgactacag cggggaccgc ccgaggtacg caataggagt 350

gtgtgcacag gtggtcggtg tgggctgcgt cctggatggg gtgcgtaca 400

acaacggcca gtccttccag cctaactgca agtacaactg cacgtgcac 450

gacggcgcg tgggtgcac accactgtgc ctccgagtgc gcccccgcg 500

tctctgggtc cccacccgc ggcgctgag catactggc cactgctgtg 550

agcagtgggt atgtctgcag gcagggaaga agtgtctggc tgtgtaccag 600

ccagaggcat ccatgaactt cacacttgcg ggctgcatca gcacacgctc 650

ctatcaaccc aagtactgtg gagtttgcac ggacaatagg tgctgcatcc 700

cctacaagtc taagactatc gacgtgtcct tccagtgtcc tgatgggctt 750

ggctttctccc gccaggtcct atggattaat gcctgtttct gtaacctgag 800

ctgtaggaat cccaatgaca tctttgtga cttggaatcc taccctgact 850

tctcagaaat tgccaacgcg gccgcacacc accatcacca tcaccatcac 900

taagtgaggc cgcatagata actgatccag tgtgtctggaa ttaattcgct 950

gtctgcgagg gccagctgtt ggggtgagta ctcctctca aaagcgggca 1000

tgactttctgc gcta 1014

<210> 10

<211> 904

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

gaattcacca tgaggtgggt cctgccttgg acgttggcag cagtgcacgc 50

agcagccgcc agcaccgtcc tggccaaggc cctctctcca gccctacga 100

ccatggactt tactccagct ccaactggagg acactctctc acgcccccaa 150

ttctgcaagt ggccatgtga gtgcccacca tccccacccc gctgcccgt 200

gggggtcagc ctcatcacag atggctgtga gtgtgtgaag atgtgcgtc 250

agcagcttgg ggacaactgc acggaggctg ccatctgtga cccccaccg 300

ggcctctact gtgactacag cggggaccgc ccgaggtacg caataggagt 350

gtgtgcgcat gctgtgggtg aggtggaggc atggcacagg aactgcatag 400

cctacacaag cccctggagc ccttgtcca ccagctgcgg cctgggggtc 450

tccactcgga tctccaatgt taacgcccag tgctggcctg agcaagagag 500

ccgcctctgc aacttgccgc catgcgatgt ggacatccat acactcatta 550

aggcaggga gaagtgtctg gctgtgtacc agccagaggc atccatgaac 600

ttcacacttg cgggctgcat cagcacacgc tectatcaac ccaagtactg 650

tggagtttgc atggacaata ggtgctgcat ccctacaag tctaagacta 700

tcgacgtgtc cttccagtgt cctgatgggc ttggcttctc ccgccaggtc 750

ctatggatta atgcctgctt ctgtaacctg agctgtagga atcccaatga 800

catctttgct gacttggaa cctaccctga cttctcagaa attgccaacg 850

cggccgcaca ccaccatcac catcaccatc actaagtgag gccgcataga 900

taac 904

<210> 11
 <211> 922
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 gaattcacca tgaggtgggt cctgccctgg acgctggcag cagtgcacgc 50

agcagccgcc agcaccgtcc tggccactgc agtggtcggt gtgggctgcg 100

tcctggatgg ggtgcgctac aacaacggcc agtccttcca gcctaactgc 150

aagtacaact gcacgtgcat cgacggcgcg gtgggctgca caccactgtg 200

cctccgagtg cgccccccgc gtctctggtg cccccaccg cggcgctgta 250

gcataacctg ccaactgctgt gagcagtggg tatgtgagga cgacgccaag 300

aggccacgca agaccgcacc ccgtgacaca ggagccttcg atgctgtggg 350

tgaggtggag gcatggcaca ggaactgcat agcctacaca agcccctgga 400
 gcccttgctc caccagctgc ggctggggg tctccactcg gatctccaat 450
 gttaacgccc agtgtcggcc tgagcaagag agccgcctct gcaacttgcg 500
 gccatgcgat gtggacatcc atacactcat taaggcaggg aagaagtgtc 550
 tggtgtgta ccagccagag gcatccatga acttcacact tgcgggctgc 600
 atcagcacac gctcctatca acccaagtac tgtggagttt gcatggacaa 650
 taggtgctgc atcccctaca agtctaagac tatcgacgtg tccttccagt 700
 gtctgatgg gcttggcttc tccgcccagg tcctatggat taatgcctgc 750
 ttctgtaacc tgagctgtag gaatccaat gacatctttg ctgacttgga 800
 atcctaccct gacttctcag aaattgccaa cgcggccgca caccaccatc 850
 accatcacca tcactaagtg aggccgcata gataactgat ccagtgtgct 900
 ggaattaatt cgctgtctgc ga 922

<210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 12
 ggctgccatc tgtgacca 19

<210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 13
 cataggacct gccgggagaa a 21

<210> 14
 <211> 19

<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 14
gccgtggcag tcctgaggg 19

<210> 15
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 15
cagcaccggg cattgacgtt a 21

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 16
tggagaaaaa tggccgctac a 21

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 17
tggggtgctc ttctcgatgg 20

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 18
ggacaaatcg gccacgtaca t 21

<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 19

cttgctccat cgggtctgc 19

<210> 20

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Glu	Gln	Trp	Val	Cys	Glu	Asp	Asp	Ala	Lys	Arg	Pro	Arg	Lys	Thr
1				5					10					15

Ala	Pro	Arg	Asp	Thr	Gly	Ala	Phe	Asp	Ala	Val	Gly	Glu	Val	Glu
				20					25					30

Ala	Trp	His	Arg	Asn	Cys	Ile	Ala	Tyr	Thr	Ser	Pro
				35					40		

<210> 21

<211> 625

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

gaattcacca tgaggtgggt cctgccctgg acgtggcag cagtgcacgc 50

agcagccgcc agcacctcc tggccactgc agtggtcggt gtgggctgcg 100

tcttgatgg ggtgcgtac aacaacggcc agtccttcca gcctaactgc 150

aagtacaact gcacgtgcat cgacggcgcg gtgggctgca caccactgtg 200

cctccgagtgcg cccccccgc gtctctggtg cccccaccg cggcgcgtga 250

gcatacctgg ccactgctgt gagcagtggg tatgtgagga cgacccaag 300

aggccacgca agaccgcacc ccgtgacaca ggagccttcg atgctgtggg 350

tgaggtggag gcatggcaca ggaactgcat agcctacaca agcccctgga 400

gcccttgctc caccagctgc ggctggggg tctccactcg gatctcaat 450

gttaacgccc agtgctggcc tgagcaagag agccgcctct gcaacttgcg 500

gccatgcgat gtggacatcc atacactcat taaggcggcc gcacaccacc 550

atcaccatca ccatcactaa gtgaggccgc atagataact gatccagtgt 600

gctggaatta attcgtgtc tgcga 625

<210> 22

<211> 1131

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 22

cctcggttct atcgattgaa ttccacatg aggtggttcc tgccctggac 50

gctggcagca gtgacagcag cagccgccag caccgtcctg gccacggccc 100

tctctccagc ccttacgacc atggacttta ctccagctcc actggaggac 150

acctctcac gcccacaatt ctgcaagtgg ccatgtgagt gcccgccatc 200

cccacccgcg tgcccgttgg gggtcagcct catcacagat ggctgtgagt 250

gctgtaagat gtgcgtcag cagcttgggg acaactgcac ggaggtgcc 300

atctgtgacc cccaccgggg cctctactgt gactacagcg gggaccgccc 350

gaggtacgca ataggagtgt gtgcacaggt ggtcgggtg ggggtcaccg 400

acaaaactca cacatgccca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga 450

ccgtcagttc tcctcttccc cccaaaacc aaggacacc tcatgatctc 500

ccggaccct gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc 550

ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 600

aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag 650

cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt 700
 gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 750
 aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc 800
 ccgggaagag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag 850
 gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 900
 gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt 950
 cticctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga 1000
 acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1050
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tgagtgcgac ggccctagag 1100
 tcgacctgca gaagcttggc cgccatggcc c 1131