



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년08월01일

(11) 등록번호 10-1884028

(24) 등록일자 2018년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/30 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2012-7016941
 (22) 출원일자(국제) 2010년11월29일
 심사청구일자 2015년11월13일
 (85) 번역문제출일자 2012년06월29일
 (65) 공개번호 10-2012-0116426
 (43) 공개일자 2012년10월22일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2010/058197
 (87) 국제공개번호 WO 2011/066503
 국제공개일자 2011년06월03일
 (30) 우선권주장
 61/265,262 2009년11월30일 미국(US)
 61/384,467 2010년09월20일 미국(US)
 (56) 선행기술조사문헌
 W02009097128 A1*
 W02005081711 A2*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 제넨테크, 인크.
 미합중국 캘리포니아 (우편번호 94080-4990) 사우
 쓰샌프란시스코 디엔에이 웨이 1
 (72) 발명자
 데니스, 마크
 미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
 에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
 플라키스, 폴
 미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
 에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
 루빈펠드, 본니
 미국 94080 캘리포니아 사우쓰 샌프란시스코 디엔
 에이 웨이 1 제넨테크, 인크. 내
 (74) 대리인
 양영준, 위혜숙

전체 청구항 수 : 총 64 항

심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 S L C 3 4 A 2 (T A T 2 1 1 = 서열 2)를 발현하는 종양의 치료 및 진단을 위한 항체

(57) 요약

본 발명은 포유동물에서 종양의 진단 및 치료에 유용한 물질의 조성물 및 종양의 진단 및 치료를 위해 이러한 물
 질의 조성물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

- (a) 서열 22의 CDR-L1 서열;
 - (b) 서열 36의 CDR-L2 서열;
 - (c) 서열 41의 CDR-L3 서열;
 - (d) 서열 43의 CDR-H1 서열;
 - (e) 서열 47의 CDR-H2 서열; 및
 - (f) 서열 62의 CDR-H3 서열
- 을 포함하는, TAT211에 결합하는 단리된 항체.

청구항 3

- (a) 서열 23의 CDR-L1 서열;
 - (b) 서열 36의 CDR-L2 서열;
 - (c) 서열 41의 CDR-L3 서열;
 - (d) 서열 43의 CDR-H1 서열;
 - (e) 서열 47의 CDR-H2 서열; 및
 - (f) 서열 62의 CDR-H3 서열
- 을 포함하는, TAT211에 결합하는 단리된 항체.

청구항 4

- (a) 서열 23의 CDR-L1 서열;
 - (b) 서열 36의 CDR-L2 서열;
 - (c) 서열 41의 CDR-L3 서열;
 - (d) 서열 43의 CDR-H1 서열;
 - (e) 서열 48의 CDR-H2 서열; 및
 - (f) 서열 65의 CDR-H3 서열
- 을 포함하는, TAT211에 결합하는 단리된 항체.

청구항 5

- (a) 서열 23의 CDR-L1 서열;
- (b) 서열 36의 CDR-L2 서열;
- (c) 서열 41의 CDR-L3 서열;
- (d) 서열 43의 CDR-H1 서열;
- (e) 서열 49의 CDR-H2 서열; 및

(f) 서열 65의 CDR-H3 서열
을 포함하는, TAT211에 결합하는 단리된 항체.

청구항 6

(a) 서열 24의 CDR-L1 서열;
(b) 서열 36의 CDR-L2 서열;
(c) 서열 41의 CDR-L3 서열;
(d) 서열 43의 CDR-H1 서열;
(e) 서열 47의 CDR-H2 서열; 및
(f) 서열 65의 CDR-H3 서열
을 포함하는, TAT211에 결합하는 단리된 항체.

청구항 7

(a) 서열 25의 CDR-L1 서열;
(b) 서열 36의 CDR-L2 서열;
(c) 서열 41의 CDR-L3 서열;
(d) 서열 43의 CDR-H1 서열;
(e) 서열 47의 CDR-H2 서열; 및
(f) 서열 65의 CDR-H3 서열
을 포함하는, TAT211에 결합하는 단리된 항체.

청구항 8

(a) 서열 22의 CDR-L1 서열;
(b) 서열 36의 CDR-L2 서열;
(c) 서열 40의 CDR-L3 서열;
(d) 서열 43의 CDR-H1 서열;
(e) 서열 47의 CDR-H2 서열; 및
(f) 서열 62의 CDR-H3 서열
을 포함하는, TAT211에 결합하는 단리된 항체.

청구항 9

삭제

청구항 10

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 66-75 중 어느 하나의 VH 수용자 인간 컨센서스 프레임워크 서열을 더 포함하는 단리된 항체.

청구항 11

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 76-79 중 어느 하나의 VL 수용자 인간 컨센서스 프레임워크 서열을 더 포함하는 단리된 항체.

청구항 12

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 66-75 중 어느 하나의 VH 수용자 인간 컨센서스 프레임워크 서열 및 서열 76-79 중 어느 하나의 VL 수용자 인간 컨센서스 프레임워크 서열을 더 포함하는 단리된 항체.

청구항 13

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 항체 단편인 항체.

청구항 14

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 키메라 또는 인간화 항체인 항체.

청구항 15

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 성장 억제제에 접합된 항체.

청구항 16

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성제에 접합된 항체.

청구항 17

제16항에 있어서, 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 뉴클레오티드분해 효소로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체.

청구항 18

제16항에 있어서, 세포독성제가 독소인 항체.

청구항 19

제18항에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 및 칼리케아미신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체.

청구항 20

제18항에 있어서, 독소가 아우리스타틴인 항체.

청구항 21

제20항에 있어서, 독소가 모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE)인 항체.

청구항 22

제20항에 있어서, 독소가 모노메틸 아우리스타틴 F (MMAF)인 항체.

청구항 23

제2항에 있어서, 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-p-아미노벤질옥시카르보닐-모노메틸 아우리스타틴 E (MC-val-cit-PAB-MMAE)에 접합된 항체.

청구항 24

제3항에 있어서, MC-val-cit-PAB-MMAE에 접합된 항체.

청구항 25

제4항에 있어서, MC-val-cit-PAB-MMAE에 접합된 항체.

청구항 26

제5항에 있어서, MC-val-cit-PAB-MMAE에 접합된 항체.

청구항 27

제6항에 있어서, MC-val-cit-PAB-MMAE에 접합된 항체.

청구항 28

제7항에 있어서, MC-val-cit-PAB-MMAE에 접합된 항체.

청구항 29

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 박테리아에서 생성된 항체.

청구항 30

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, CHO 세포에서 생성된 항체.

청구항 31

제2항 내지 제8항 및 제23항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 그것이 결합하는 세포의 사멸을 유도하는 항체.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 세포가 난소암 세포인 항체.

청구항 33

제31항에 있어서, 상기 세포가 폐암 세포인 항체.

청구항 34

제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 검출가능하게 표지된 항체.

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

서열 6의 VL 서열 및 서열 15의 VH 서열을 포함하는 단리된 항체.

청구항 38

서열 7의 VL 서열 및 서열 16의 VH 서열을 포함하는 단리된 항체.

청구항 39

서열 8의 VL 서열 및 서열 17의 VH 서열을 포함하는 단리된 항체.

청구항 40

서열 9의 VL 서열 및 서열 18의 VH 서열을 포함하는 단리된 항체.

청구항 41

서열 10의 VL 서열 및 서열 19의 VH 서열을 포함하는 단리된 항체.

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

서열 80의 중쇄 서열 및 서열 81의 경쇄 서열을 포함하는 단리된 항체.

청구항 46

제37항에 있어서, MC-val-cit-PAB-MMAE에 접합된 항체.

청구항 47

제38항에 있어서, MC-val-cit-PAB-MMAE에 접합된 항체.

청구항 48

제39항에 있어서, MC-val-cit-PAB-MMAE에 접합된 항체.

청구항 49

제40항에 있어서, MC-val-cit-PAB-MMAE에 접합된 항체.

청구항 50

제41항에 있어서, MC-val-cit-PAB-MMAE에 접합된 항체.

청구항 51

삭제

청구항 52

제45항에 있어서, MC-val-cit-PAB-MMAE에 접합된 항체.

청구항 53

제2항 내지 제8항, 제37항 내지 제41항 및 제45항 중 어느 한 항의 항체를 생성하는 세포.

청구항 54

제2항 내지 제8항, 제37항 내지 제41항 및 제45항 중 어느 한 항의 항체를 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 55

제2 항체에 의해 결합된 TAT211 항원성 에피토프에 결합하는 제1 항체가 TAT211 폴리펩티드에 대한 제2 항체의 결합을 차단하는 능력을 결정하는 것을 포함하며, 여기서 상기 제2 항체는 제2항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 항체이고, 상기 제1 항체가 상기 TAT211 폴리펩티드에 대한 상기 제2 항체의 결합을 동일한 항체 농도에서 적어도 40% 차단하는 능력은 상기 제1 항체가 상기 제2 항체에 의해 결합된 에피토프에 결합할 수 있다는 것을 나타내는 것인, 상기 제2 항체에 의해 결합된 TAT211 항원성 에피토프에 결합하는 제1 항체를 확인하는 방법.

청구항 56

TAT211 폴리펩티드를 발현하는 세포를 제2항 내지 제8항, 제23항 내지 제28항, 제37항 내지 제41항, 제45항 내지 제50항 및 제52항 중 어느 한 항에 따른 항체와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 상기 세포는 대상체로부터 수득한 것이고, 상기 TAT211 폴리펩티드에 대한 상기 항체의 결합은 상기 세포의 성장 억제를 유발하는 것인, TAT211 폴리펩티드를 발현하는 세포의 성장을 억제하는 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 TAT211 폴리펩티드가 서열 2의 아미노산 서열 또는 그의 세포외 도메인을 포함하는 것인

방법.

청구항 58

제56항에 있어서, 상기 세포가 난소암 세포인 방법.

청구항 59

제56항에 있어서, 상기 세포가 폐암 세포인 방법.

청구항 60

치료 유효량의 제2항 내지 제8항, 제23항 내지 제28항, 제37항 내지 제41항 및 제45항 중 어느 한 항에 따른 항체를 포함하는, TAT211 폴리펩티드를 발현하는 세포를 포함하는 암성 종양을 갖는 포유동물을 치료적으로 치료하기 위한 제약 조성물.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 TAT211 폴리펩티드가 서열 2의 아미노산 서열 또는 그의 세포외 도메인을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 62

제60항에 있어서, 상기 세포가 난소암 세포인 제약 조성물.

청구항 63

제60항에 있어서, 상기 세포가 폐암 세포인 제약 조성물.

청구항 64

TAT211 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 제2항 내지 제8항, 제37항 내지 제41항 및 제45항 중 어느 한 항의 항체에 노출시키는 것, 및 상기 샘플에서 상기 단백질에 대한 상기 항체의 결합을 결정하는 것을 포함하며, 여기서 상기 샘플은 대상체로부터 수득한 것이고, 상기 단백질에 대한 항체의 결합은 상기 샘플에 상기 단백질이 존재함을 나타내는 것인, TAT211 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 샘플에서 TAT211 단백질의 존재를 결정하는 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 샘플이 상기 단백질을 발현하는 것으로 의심되는 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 상기 세포가 난소암 세포인 방법.

청구항 67

제65항에 있어서, 상기 세포가 폐암 세포인 방법.

청구항 68

제65항에 있어서, 상기 항체가 검출가능하게 표지된 것인 방법.

청구항 69

포유동물로부터 수득한 조직 세포의 시험 샘플을 제2항 내지 제8항, 제37항 내지 제41항 및 제45항 중 어느 한 항의 항체와 접촉시키는 것, 및 시험 샘플에서 상기 항체와 TAT211 단백질 사이의 복합체의 형성을 검출하는 것을 포함하며, 여기서 복합체의 형성은 상기 포유동물에 종양이 존재함을 나타내는 것인, 포유동물에서 종양의 존재를 진단하는데 사용하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 상기 조직 세포의 시험 샘플이 양성 종양을 갖는 것으로 의심되는 개체로부터 수득되는 것인 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, 상기 양성 종양이 난소 또는 폐 종양인 방법.

청구항 72

제69항에 있어서, 상기 TAT211 단백질이 서열 2의 아미노산 서열 또는 그의 세포외 도메인을 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

<관련 출원>

[0002]

본 출원은 37 C.F.R. § 1.53(b)(1)하에 출원된 정식 출원이고, 35 U.S.C. § 119(e)하에 2009년 11월 30일에 출원된 미국 가출원 번호 61/265,262 및 2010년 9월 20일에 출원된 미국 가출원 번호 61/384,467 (여기서 그 전체 내용이 참고로 포함됨)을 우선권 주장한다.

[0003]

<발명의 분야>

[0004]

본 발명은 포유동물에서 종양의 진단 및 치료에 유용한 물질의 조성물 및 종양의 진단 및 치료를 위해 이러한 물질의 조성물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005]

악성 종양 (암)은 미국에서 심장 질환 다음으로 두 번째의 주요 사인이다 (문헌 [Boring et al., CA Cancer Clin. 43:7 (1993)]). 암은 증식하여 종양 덩어리를 형성하는, 정상 조직으로부터 유래되는 비정상적이거나 신 생물성인 세포의 수의 증가, 이들 신생물성 종양 세포에 의한 인접 조직의 침습, 및 전이라 불리는 과정을 통해 궁극적으로는 국소 림프절 및 원위 부위로 혈액 또는 림프계를 통해 확산되는 악성 세포의 생성을 특징으로 한다. 암성 상태에서, 세포는 정상 세포가 성장하지 않을 조건하에 증식한다. 암은 그 자체가 상이한 정도의 침습성 및 공격성을 특징으로 하는 매우 다양한 형태로 나타난다.

[0006]

암 진단 및 요법을 위한 효과적인 세포 표적을 발견하기 위한 시도에서, 연구자들은 하나 이상의 정상적인 비-암성 세포(들)에 비해 하나 이상의 특정 유형(들)의 암 세포의 표면 상에서 특이적으로 발현되는 막횡단 또는 다른 막-관련 폴리펩티드를 확인하고자 하였다. 종종, 이러한 막-회합된 폴리펩티드는 비-암성 세포의 표면 상에서 비해 암 세포의 표면 상에서 보다 풍부하게 발현된다. 이러한 종양-관련 세포 표면 항원 폴리펩티드의 확인을 통해, 항체-기재의 요법을 통해 파괴시킬 암 세포를 특이적으로 표적화하는 능력이 생성되었다. 이와 관련하여, 항체-기반 요법은 특정 암의 치료에서 매우 효과적인 것으로 입증된 것이 알려져 있다. 예를 들어, 헤르셉틴(HERCEPTIN)[®] 및 리투산(RITUXAN)[®] (둘 다 제넨테크 인크. (Genentech Inc., 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코)로부터의 것임)은 각각 유방암 및 비-호지킨 림프종을 치료하기 위해 성공적으로 사용되고 있는 항체이다. 보다 구체적으로, 헤르셉틴[®]은 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (HER2) 원종양유전자의 세포외 도메인에 선택적으로 결합하는 재조합 DNA-유래의 인간화 모노클로날 항체이다. HER2 단백질 과다발현은 원발성 유방암의 25 내지 30%에서 관찰된다. 리투산[®]은 정상 및 악성 B 림프구의 표면 상에서 발견되는 CD20 항원에 대해 지시된 유전자 조작된 키메라 뮤린/인간 모노클로날 항체이다. 이들 두 항체는 CHO 세포에서 재조합적으로 생성된다.

[0007]

포유동물 암 요법에서 상기 확인된 진보에도 불구하고, 포유동물에서 종양의 존재를 검출할 수 있고 신생물성 세포 성장을 효과적으로 억제할 수 있는 추가의 진단제 및 치료제가 각각 매우 필요하다. 따라서, 본 발명의 목적은 정상 세포 또는 다른 상이한 암 세포 상에서 비해 하나 이상의 유형(들)의 암 세포(들) 상에서 보다 풍부하게 발현되는 세포 막-관련 폴리펩티드를 확인하는 것, 및 포유동물에서 암의 치료적 치료 및 진단적 검출에 유용한 물질의 조성물을 생성하기 위해 이들 폴리펩티드 및 이들의 코딩 핵산을 사용하는 것이다.

발명의 내용

[0008] <발명의 개요>

[0009] 본 명세서에서, 출원인은 하나 이상의 유형의 정상적인 비-암 세포의 표면 상에서에 비해 하나 이상의 유형의 암 세포(들)의 표면 상에서 더 높은 정도로 발현되는 세포 폴리펩티드 (및 이들의 코딩 핵산 또는 이들의 단편)의 확인을 처음으로 기재한다. 본원에서 이들 폴리펩티드는 종양-관련 항원성 표적 폴리펩티드 ("TAT" 폴리펩티드)로 언급되고, 포유동물에서 암 치료 및 진단을 위해 효과적인 표적으로서의 역할을 할 것으로 기대된다.

[0010] 따라서, 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명은 종양 관련 항원성 표적 폴리펩티드 또는 그의 단편 ("TAT 폴리펩티드")을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 단리된 핵산 분자를 제공한다.

[0011] 특정 측면에서, 단리된 핵산 분자는 (a) 본원에 개시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 전장 TAT 폴리펩티드, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 없는 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 있거나 없는 막횡단 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인, 또는 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열의 임의의 다른 구체적으로 규정된 단편을 코딩하는 DNA 분자, 또는 (b) (a)의 DNA 분자의 상보체에 대해 적어도 약 80%의 핵산 서열 동일성, 대안적으로 적어도 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0012] 다른 측면에서, 단리된 핵산 분자는 (a) 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 cDNA의 코딩 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 없는 TAT 폴리펩티드의 코딩 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 있거나 없는 막횡단 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인의 코딩 서열, 또는 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열의 임의의 다른 구체적으로 규정된 단편의 코딩 서열을 포함하는 DNA 분자, 또는 (b) (a)의 DNA 분자의 상보체에 대해 적어도 약 80%의 핵산 서열 동일성, 대안적으로 적어도 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 핵산 서열 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0013] 본 발명의 또 다른 측면은 막횡단 도메인-결실 또는 막횡단 도메인-불활성화된 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 상기 코딩 뉴클레오티드 서열에 상보성인 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자를 제공하고, 여기서 이러한 폴리펩티드(들)의 막횡단 도메인(들)은 본원에 개시된 것이다. 따라서, 본원에 기재된 TAT 폴리펩티드의 가용성 세포외 도메인이 고려된다.

[0014] 다른 측면에서, 본 발명은 (a) 본원에 개시된 바와 같은 전장 아미노산 서열을 갖는 TAT 폴리펩티드, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 없는 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 있거나 없는 막횡단 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인, 또는 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열의 임의의 다른 구체적으로 규정된 단편을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, 또는 (b) (a)의 뉴클레오티드 서열의 상보체에 혼성화하는 단리된 핵산 분자에 관한 것이다. 이와 관련하여, 본 발명의 실시양태는 예를 들어 진단 프로브, PCR 프라이머, 안티센스 올리고뉴클레오티드 프로브로서 유용한, 예를 들어 혼성화 프로브로서 사용될 수 있거나, 또는 임의로 항-TAT 폴리펩티드 항체에 대한 결합 부위를 포함하는 폴리펩티드를 코딩할 수 있는 전장 TAT 폴리펩티드의 단편을 코딩하기 위한, 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 코딩 서열의 단편, 또는 그의 상보체에 관한 것이다. 이러한 핵산 단편은 일반적으로 적어도 약 5개 뉴클레오티드 길이, 대안적으로는 적어도 약 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 또는 1000개 뉴클레오티드 길이이고, 이러한 문맥에서 용어 "약"은 언급된 뉴클레오티드 서열 길이 \pm 언급된 길이의 10%를 의미한다. 추가로, 이러한 핵산 단편은 통상적으로 TAT 폴리펩티드의 전장 코딩 서열로부터 유래된 연속 뉴클레오티드 또는 그의 상보체로 구성된다. TAT 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 신규 단편 또는 그의 상보체는, 임의의 수많은 주지의 서열 정렬 프로그램을 사용하여 TAT 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열을 다른 공지의 뉴클레오티드 서열과 정렬하고, 어떠한 TAT 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열 단편(들) 또는 그의 상보체가 신규한지를 결정하여

통상적인 방식으로 결정될 수 있음에 주목한다. TAT 폴리펩티드-코딩 뉴클레오티드 서열의 모든 이러한 신규 단편 또는 그의 상보체가 본원에서 고려된다. 또한 이들 뉴클레오티드 분자 단편에 의해 코딩된 TAT 폴리펩티드 단편, 바람직하게는 항-TAT 항체에 대한 결합 부위를 포함하는 TAT 폴리펩티드 단편들이 고려된다.

[0015] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본원에서 상기 확인된 임의의 단리된 핵산 서열에 의해 코딩되는 단리된 TAT 폴리펩티드를 제공한다.

[0016] 특정 측면에서, 본 발명은 본원에 개시된 바와 같은 전장 아미노산 서열을 갖는 TAT 폴리펩티드, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 없는 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 있거나 없는 막횡단 TAT 폴리펩티드 단백질의 세포외 도메인, 본원에 개시된 바와 같은 임의의 핵산 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열 또는 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열의 임의의 다른 구체적으로 규정된 단편에 대해 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성, 대안적으로 적어도 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 TAT 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0017] 다른 추가의 측면에서, 본 발명은 (a) 본원에 개시된 바와 같은 전장 아미노산 서열을 갖는 TAT 폴리펩티드, (b) 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 없는 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열, (c) 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 있거나 없는 막횡단 TAT 폴리펩티드 단백질의 세포외 도메인, (d) 본원에 개시된 바와 같은 임의의 핵산 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열 또는 (e) 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열의 임의의 다른 구체적으로 규정된 단편을 코딩하는 DNA 분자의 상보체에 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 포함하는 단리된 TAT 폴리펩티드에 관한 것이다.

[0018] 특정 측면에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되며 N-말단 신호 서열 및/또는 개시 메티오닌이 없는 단리된 TAT 폴리펩티드를 제공한다. 이것의 생성 방법도 본원에 기재되어 있으며, 이러한 방법은 적절한 코딩 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 TAT 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에서 배양하는 것, 및 세포 배양물로부터 TAT 폴리펩티드를 회수하는 것을 포함한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 측면은 막횡단 도메인-결실 또는 막횡단 도메인-불활성화된 단리된 TAT 폴리펩티드를 제공한다. 이것의 생성 방법도 본원에 기재되어 있으며, 이러한 방법은 적절한 코딩 핵산 분자를 포함하는 벡터를 포함하는 숙주 세포를 TAT 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에서 배양하는 것, 및 세포 배양물로부터 TAT 폴리펩티드를 회수하는 것을 포함한다.

[0020] 본 발명의 다른 실시양태에서, 본 발명은 임의의 본원에 기재된 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 제공한다. 또한, 임의의 이러한 벡터를 포함하는 숙주 세포도 제공된다. 예를 들어, 숙주 세포는 CHO 세포, 이. 콜라이(E. coli) 세포 또는 효모 세포일 수 있다. 임의의 본원에 기재된 폴리펩티드를 생성하는 방법이 추가로 제공되며, 이러한 방법은 숙주 세포를 원하는 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 배양하는 것, 및 세포 배양물로부터 원하는 폴리펩티드를 회수하는 것을 포함한다.

[0021] 다른 실시양태에서, 본 발명은 이중성 (비-TAT) 폴리펩티드에 융합된 임의의 본원에 기재된 TAT 폴리펩티드를 포함하는 단리된 키메라 폴리펩티드를 제공한다. 이러한 키메라 분자의 예는 이중성 폴리펩티드, 예컨대 예를 들어 에피토프 태그 서열 또는 이뮤노글로불린의 Fc 영역에 융합된 임의의 본원에 기재된 TAT 폴리펩티드를 포함한다.

[0022] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 임의의 상기 또는 하기 원하는 폴리펩티드에 결합, 바람직하게는 특이적으로 결합하는 항체를 제공한다. 임의로, 항체는 모노클로날 항체, 항체 단편, 키메라 항체, 인간화 항체, 단일쇄 항체, 또는 항-TAT 폴리펩티드 항체가 그의 각각의 항원성 에피토프에 결합하는 것을 경쟁적으로 억제하는 항체이다. 본 발명의 항체는 성장 억제제 또는 세포독성제, 예컨대 독소, 예를 들어 메이탄시노이드 또는 칼리케아미신, 항생제, 방사성 동위원소, 뉴클레오티드분해 효소 등에 임의로 접합될 수 있다. 본 발명의 항체는 CHO 세포 또는 박테리아 세포에서 임의로 생성되어 바람직하게는 이것이 결합하는 세포의 성장 또는 증식을 억제하거나 상기 세포의 사멸을 유도할 수 있다. 진단 목적을 위해, 본 발명의 항체가 검출가능하게 표지되거나 고체 지지체 등에 부착될 수 있다.

[0023] 본 발명의 다른 실시양태에서, 본 발명은 임의의 본원에 기재된 항체를 코딩하는 DNA를 포함하는 벡터를 제공한다. 또한, 임의의 이러한 벡터를 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 예를 들어, 숙주 세포는 CHO 세포, 이. 콜라이 세포 또는 효모 세포일 수 있다. 임의의 본원에 기재된 항체를 생성하는 방법이 추가로 제공되며, 이러한

방법은 숙주 세포를 원하는 항체의 발현에 적합한 조건하에 배양하는 것, 및 세포 배양물로부터 원하는 항체를 회수하는 것을 포함한다.

- [0024] 다른 추가의 실시양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 TAT 폴리펩티드, 또는 본원에 기재된 바와 같은 항-TAT 항체를 담체와 함께 포함하는 조성물에 관한 것이다. 임의로, 담체는 제약상 허용되는 담체이다.
- [0025] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 용기 및 상기 용기 내에 함유된 물질의 조성물을 포함하는 제조품에 관한 것이고, 여기서 물질의 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 TAT 폴리펩티드, 또는 본원에 기재된 바와 같은 항-TAT 항체를 포함할 수 있다. 임의로, 제조품은 종양의 치료적 치료 또는 진단적 검출을 위한 물질의 조성물의 용도를 언급한, 용기에 부착된 라벨 또는 용기 내에 포함된 포장 삽입물을 더 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 실시양태는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 TAT 폴리펩티드, 또는 본원에 기재된 바와 같은 항-TAT 폴리펩티드 항체에 반응성인 상태의 치료에 유용한 의약을 제조를 위한, 상기 TAT 폴리펩티드, 상기 키메라 TAT 폴리펩티드 또는 상기 항-TAT 폴리펩티드 항체의 용도에 관한 것이다.
- [0027] 본 발명의 다른 실시양태는 본원에 개시된 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 또는 CDR-H3 서열 중 하나 이상을 포함하는 임의의 단리된 항체, 또는 임의의 이러한 항체와 동일한 에피토포에 결합하는 임의의 항체에 관한 것이다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 실시양태는 TAT 폴리펩티드를 발현하는 세포를 TAT 폴리펩티드에 결합하는 항체와 접촉시키는 것을 포함하며, 여기서 TAT 폴리펩티드에 대한 항체의 결합은 TAT 폴리펩티드를 발현하는 세포의 성장 억제를 유발하는 것인, TAT 폴리펩티드를 발현하는 세포의 성장을 억제하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 세포는 암 세포이고, TAT에 대한 항체의 결합은 TAT 폴리펩티드를 발현하는 세포의 사멸을 유발한다. 임의로, 항체는 모노클로날 항체, 항체 단편, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 단일 쇠 항체이다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 성장 억제제 또는 세포독성제, 예컨대 독소, 예를 들어 메이탄시노이드 또는 칼리케아미신, 항생제, 방사성 동위원소, 뉴클레오타이드분해 효소 등에 임의로 접합될 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 CHO 세포 또는 박테리아 세포에서 임의로 생성될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 실시양태는 TAT 폴리펩티드를 발현하는 세포를 포함하는 암성 종양을 갖는 포유동물에게 TAT 폴리펩티드와 결합하는 항체를 치료상 유효량으로 투여하여 종양을 효과적으로 치료적으로 치료하는 것을 포함하는, TAT 폴리펩티드를 발현하는 세포를 포함하는 암성 종양을 갖는 포유동물을 치료적으로 치료하는 방법에 관한 것이다. 임의로, 항체는 모노클로날 항체, 항체 단편, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 단일 쇠 항체이다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 성장 억제제 또는 세포독성제, 예컨대 독소, 예를 들어 메이탄시노이드 또는 칼리케아미신, 항생제, 방사성 동위원소, 뉴클레오타이드분해 효소 등에 임의로 접합될 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 CHO 세포 또는 박테리아 세포에서 임의로 생성될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 또 다른 실시양태는 TAT 폴리펩티드를 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 TAT 폴리펩티드에 결합하는 항체에 노출시키는 것, 및 샘플에서 TAT 폴리펩티드에 대한 항체의 결합을 결정하는 것을 포함하며, 여기서 이러한 결합의 존재는 샘플에 TAT 폴리펩티드가 존재함을 나타내는 것인, TAT 폴리펩티드를 함유하는 것으로 의심되는 샘플에서 TAT 폴리펩티드의 존재를 결정하는 방법에 관한 것이다. 임의로, 샘플은 TAT 폴리펩티드를 발현하는 것으로 의심되는 세포 (암 세포일 수 있음)를 함유할 수 있다. 방법에 사용되는 항체는 임의로 검출가능하게 표지되거나, 고체 지지체에 부착되거나, 또는 기타일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 추가의 실시양태는 (a) 포유동물에서 수득한 조직 세포의 시험 샘플 및 (b) 동일한 조직 기원 또는 유형의 공지된 정상적인 비-암성 세포의 대조군 샘플에서 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 검출하는 것을 포함하며, 여기서 대조군 샘플에 비해 시험 샘플에서 더 높은 TAT 폴리펩티드의 발현 수준은 시험 샘플을 수득한 포유동물에 종양이 존재함을 나타내는 것인, 포유동물에서 종양의 존재를 진단하는 방법에 관한 것이다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 실시양태는 (a) 포유동물로부터 수득한 조직 세포를 포함하는 시험 샘플을 TAT 폴리펩티드에 결합하는 항체와 접촉시키는 것, 및 (b) 시험 샘플에서 항체와 TAT 폴리펩티드 사이에서의 복합체의 형성을 검출하는 것을 포함하며, 여기서 복합체의 형성은 포유동물에 종양의 존재함을 나타내는 것인, 포유동물에서 종양의 존재를 진단하는 방법에 관한 것이다. 임의로, 사용되는 항체는 검출가능하게 표지되거나, 고체 지지체에

부착되거나, 또는 기타이고/거나 조직 세포의 시험 샘플은 양성 종양을 갖는 것으로 의심되는 개체로부터 수득하였다.

[0033] 본 발명의 또 다른 실시양태는 TAT 폴리펩티드의 변형된, 바람직하게는 증가된 활성과 관련된 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 유효량의 TAT 폴리펩티드의 길항제를 투여하는 것을 포함하는, 상기 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 세포 증식성 장애는 암이고 TAT 폴리펩티드의 길항제는 항-TAT 폴리펩티드 항체 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 세포 증식성 장애의 효과적인 치료 또는 예방은 TAT 폴리펩티드를 발현하는 세포의 직접적인 사멸 또는 성장 억제에 결과될 수도 있거나, 또는 TAT 폴리펩티드의 세포 성장 강화 활성을 길항한 결과될 수도 있다.

[0034] 본 발명의 또 다른 측면은 TAT 폴리펩티드를 발현하는 세포를 상기 TAT 폴리펩티드에 대한 항체의 결합에 적합한 조건하에 상기 항체와 접촉시키는 것, 및 이들 사이의 결합을 허용하는 것을 포함하는, TAT 폴리펩티드를 발현하는 세포에 항체를 결합시키는 방법에 관한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 항체가 세포에 결합하는 위치 및/또는 양을 정성적으로 및/또는 정량적으로 결정하는데 유용한 분자 또는 화합물로 표시된다.

[0035] 본 발명의 다른 실시양태는 (i) 암 또는 종양의 치료적 치료 또는 진단적 검출; 또는 (ii) 세포 증식성 장애의 치료적 치료 또는 예방에 유용한 의약의 제조에 있어서 TAT 폴리펩티드, TAT 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 또는 이러한 핵산을 포함하는 벡터 또는 숙주 세포, 또는 항-TAT 폴리펩티드 항체의 용도에 관한 것이다.

[0036] 본 발명의 또 다른 실시양태는 TAT 폴리펩티드를 TAT 폴리펩티드에 결합하는 항체와 접촉시켜 TAT 폴리펩티드의 성장-강화 활성을 길항하고, 다시 암 세포의 성장을 억제하는 것을 포함하며, 여기서 상기 암 세포의 성장은 적어도 부분적으로 TAT 폴리펩티드의 성장 강화 효과(들)에 의존하는 것인 (여기서, TAT 폴리펩티드는 암 세포 그 자체 또는 암 세포에 대한 성장 강화 효과를 갖는 폴리펩티드(들)를 생성하는 세포에 의해 발현될 수 있음), 암 세포의 성장을 억제하는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는 암 세포의 성장은 완전히 억제된다. 보다 더 바람직하게는, TAT 폴리펩티드에 대한 항체의 결합은 암 세포의 사멸을 유도한다. 임의로, 항체는 모노클로날 항체, 항체 단편, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 단일 체 항체이다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 성장 억제제 또는 세포독성제, 예컨대 독소, 예를 들어 메이탄시노이드 또는 칼리케아미신, 항생제, 방사성 동위원소, 뉴클레오타이드분해 효소 등에 임의로 접합될 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 CHO 세포 또는 박테리아 세포에서 임의로 생성될 수 있다.

[0037] 본 발명의 또 다른 실시양태는 포유동물에게 TAT 폴리펩티드에 결합하는 항체를 치료 유효량으로 투여함으로써 상기 TAT 폴리펩티드의 성장 강화 활성에 길항하여 종양을 효과적으로 치료적으로 치료하는 것을 포함하며, 여기서 상기 종양의 성장은 적어도 부분적으로 TAT 폴리펩티드의 성장 강화 효과(들)에 의존하는 것인, 포유동물에서 종양을 치료적으로 치료하는 방법에 관한 것이다. 임의로, 항체는 모노클로날 항체, 항체 단편, 키메라 항체, 인간화 항체 또는 단일 체 항체이다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 성장 억제제 또는 세포독성제, 예컨대 독소, 예를 들어 메이탄시노이드 또는 칼리케아미신, 항생제, 방사성 동위원소, 뉴클레오타이드분해 효소 등에 임의로 접합될 수 있다. 본 발명의 방법에 사용되는 항체는 CHO 세포 또는 박테리아 세포에서 임의로 생성될 수 있다.

[0038] 다른 추가의 실시양태에서, 본 발명은 본 출원 또는 앞으로의 출원에 대한 잠재적인 특허청구범위의 하기 세트에 관한 것이다:

[0039] 1. (a) 서열 2로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 DNA 분자, (b) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 DNA 분자, (c) 그의 관련된 신호 펩티드가 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포의 도메인을 코딩하는 DNA 분자, (d) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포의 도메인을 코딩하는 DNA 분자, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열, (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열의 전장 코딩 서열, 또는 (g) (a), (b), (c), (d), (e) 또는 (f)의 상보체에 대해 적어도 80% 핵산 서열 동일성을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 단리된 핵산.

[0040] 2. (a) 서열 2로 제시된 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, (b) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 아미노산 서열을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, (c) 그의 관련된 신호 펩티드가 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포의 도메인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, (d) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포의 도메인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열, (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열의 전장 코딩 영역, 또는 (g) (a), (b), (c), (d), (e) 또는 (f)의 상보체를 갖는 단리된 핵산.

- [0041] 3. (a) 서열 2로 제시된 아미노산 서열을 코딩하는 핵산, (b) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 아미노산 서열을 코딩하는 핵산, (c) 그의 관련된 신호 펩티드가 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인을 코딩하는 핵산, (d) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인을 코딩하는 핵산, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열, (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역, 또는 (g) (a), (b), (c), (d), (e) 또는 (f)의 상보체에 혼성화하는 단리된 핵산.
- [0042] 4. 제3항에 있어서, 혼성화가 엄격한 조건하에 발생하는 것인 핵산.
- [0043] 5. 제3항에 있어서, 길이가 적어도 약 5개의 뉴클레오티드인 핵산.
- [0044] 6. 제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.
- [0045] 7. 제6항에 있어서, 상기 핵산이 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 의해 인식되는 제어 서열에 작동가능하게 연결되는 것인 발현 벡터.
- [0046] 8. 제7항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0047] 9. 제8항에 있어서, CHO 세포, 이. 콜라이 세포 또는 효모 세포인 숙주 세포.
- [0048] 10. 폴리펩티드의 발현에 적합한 조건하에 제8항의 숙주 세포를 배양하는 것, 및 상기 폴리펩티드를 세포 배양액으로부터 회수하는 것을 포함하는, 폴리펩티드의 생성 방법.
- [0049] 11. (a) 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (b) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (c) 그의 관련된 신호 펩티드가 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (d) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 단리된 폴리펩티드.
- [0050] 12. (a) 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (b) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (c) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열, (d) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 갖는 단리된 폴리펩티드.
- [0051] 13. 이중성 폴리펩티드에 융합된 제11항 또는 제12항의 폴리펩티드를 포함하는 키메라 폴리펩티드.
- [0052] 14. 제13항에 있어서, 상기 이중성 폴리펩티드가 이뮤노글로불린의 에피토프 태그 서열 또는 Fc 영역인 키메라 폴리펩티드.
- [0053] 15. (a) 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (b) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (c) 그의 관련된 신호 펩티드가 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (d) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 단리된 항체.
- [0054] 16. (a) 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (b) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (c) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열, (d) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드에 결합하는 단리된 항체.
- [0055] 17. 제15항 또는 제16항에 있어서, 모노클로날 항체인 항체.
- [0056] 18. 제15항 또는 제16항에 있어서, 항체 단편인 항체.
- [0057] 19. 제15항 또는 제16항에 있어서, 키메라 또는 인간화 항체인 항체.
- [0058] 20. 제15항 또는 제16항에 있어서, 성장 억제제에 접합된 항체.
- [0059] 21. 제15항 또는 제16항에 있어서, 세포독성제에 접합된 항체.
- [0060] 22. 제21항에 있어서, 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 뉴클레오티드분해 효소로 이루어진 군으

로부터 선택되는 것인 항체.

- [0061] 23. 제21항에 있어서, 세포독성제가 독소인 항체.
- [0062] 24. 제23항에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 및 칼리케아미신으로 이루어진 군 중으로부터 선택되는 것인 항체.
- [0063] 25. 제23항에 있어서, 독소가 메이탄시노이드인 항체.
- [0064] 26. 제15항 또는 제16항에 있어서, 박테리아에서 생성된 항체.
- [0065] 27. 제15항 또는 제16항에 있어서, CHO 세포에서 생성된 항체.
- [0066] 28. 제15항 또는 제16항에 있어서, 그것이 결합하는 세포의 사멸을 유도하는 항체.
- [0067] 29. 제15항 또는 제16항에 있어서, 검출가능하게 표지된 항체.
- [0068] 30. 제15항 또는 제16항의 항체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 갖는 단리된 핵산.
- [0069] 31. 벡터로 형질전환된 숙주 세포에 의해 인식되는 제어 서열에 작동가능하게 연결된 제30항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.
- [0070] 32. 제31항의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포.
- [0071] 33. 제32항에 있어서, CHO 세포, 이. 콜라이 세포 또는 효모 세포인 숙주 세포.
- [0072] 34. 항체의 발현에 적합한 조건하에 제32항의 숙주 세포를 배양하는 것, 및 상기 항체를 세포 배양액으로부터 회수하는 것을 포함하는 항체의 생성 방법.
- [0073] 35. (a) 제11항의 폴리펩티드; (b) 제12항의 폴리펩티드; (c) 제13항의 키메라 폴리펩티드; (d) 제15항의 항체, 또는; (e) 제16항의 항체를 담체와 함께 포함하는 물질의 조성물.
- [0074] 36. 제35항에 있어서, 상기 담체가 제약상 허용되는 담체인 물질의 조성물.
- [0075] 37. (a) 용기; 및 (b) 상기 용기 내에 함유된 제35항의 물질의 조성물을 포함하는 제조품.
- [0076] 38. 제37항에 있어서, 암의 치료학적 치료 또는 진단학적 검출을 위한 상기 물질의 조성물의 용도를 언급한, 상기 용기에 부착된 라벨 또는 상기 용기 내에 포함된 포장 삽입물을 더 포함하는 제조품.
- [0077] 39. (a) 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (b) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (c) 그의 관련된 신호 펩티드가 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (d) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 단백질을 발현하는 세포를 상기 단백질에 결합하는 항체와 접촉시켜 상기 단백질에 대한 상기 항체의 결합이 상기 세포의 성장 억제를 유발하는 것을 포함하는, 상기 세포의 성장을 억제하는 방법.
- [0078] 40. 제39항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 방법.
- [0079] 41. 제39항에 있어서, 상기 항체가 항체 단편인 방법.
- [0080] 42. 제39항에 있어서, 상기 항체가 키메라 또는 인간화 항체인 방법.
- [0081] 43. 제39항에 있어서, 상기 항체가 성장 억제제에 접합되는 것인 방법.
- [0082] 44. 제39항에 있어서, 상기 항체가 세포독성제에 접합되는 것인 방법.
- [0083] 45. 제44항에 있어서, 상기 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 뉴클레오타이드분해 효소로 이루어진 군 중으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0084] 46. 제44항에 있어서, 세포독성제가 독소인 방법.
- [0085] 47. 제46항에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 및 칼리케아미신으로 이루어진 군 중으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0086] 48. 제46항에 있어서, 독소가 메이탄시노이드인 방법.

- [0087] 49. 제39항에 있어서, 상기 항체가 박테리아에서 생성되는 것인 방법.
- [0088] 50. 제39항에 있어서, 상기 항체가 CHO 세포에서 생성되는 것인 방법.
- [0089] 51. 제39항에 있어서, 상기 세포가 암 세포인 방법.
- [0090] 52. 제51항에 있어서, 상기 암 세포가 방사선 치료 또는 화학요법제에 추가로 노출되는 것인 방법.
- [0091] 53. 제51항에 있어서, 상기 암 세포가 유방암 세포, 결장직장암 세포, 폐암 세포, 난소암 세포, 중추신경계 암 세포, 간암 세포, 방광암 세포, 췌장암 세포, 자궁경부암 세포, 흑색종 세포 및 백혈병 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0092] 54. 제51항에 있어서, 상기 단백질이 동일한 조직 기원의 정상 세포에 비해 상기 암 세포에 의해 보다 풍부하게 발현되는 것인 방법.
- [0093] 55. 제39항에 있어서, 상기 세포의 사멸을 유발하는 방법.
- [0094] 56. 제39항에 있어서, 상기 단백질이 (a) 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (b) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (c) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열, (d) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 갖는 것인 방법.
- [0095] 57. (a) 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (b) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (c) 그의 관련된 신호 펩티드가 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (d) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드; 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 단백질을 발현하는 세포를 포함하는 암성 종양을 갖는 포유동물에게 상기 단백질에 결합하는 항체를 치료 유효량으로 투여하여 상기 포유동물을 효과적으로 치료하는 것을 포함하는, 상기 포유동물을 치료적으로 치료하는 방법.
- [0096] 58. 제57항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 방법.
- [0097] 59. 제57항에 있어서, 상기 항체가 항체 단편인 방법.
- [0098] 60. 제57항에 있어서, 상기 항체가 키메라 또는 인간화 항체인 방법.
- [0099] 61. 제57항에 있어서, 상기 항체가 성장 억제제에 접합되는 것인 방법.
- [0100] 62. 제57항에 있어서, 상기 항체가 세포독성제에 접합되는 것인 방법.
- [0101] 63. 제62항에 있어서, 상기 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 뉴클레오타이드분해 효소로 이루어진 군 중으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0102] 64. 제62항에 있어서, 세포독성제가 독소인 방법.
- [0103] 65. 제64항에 있어서, 독소가 메탄탄시노이드 및 칼리케아미신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0104] 66. 제64항에 있어서, 독소가 메탄탄시노이드인 방법.
- [0105] 67. 제57항에 있어서, 상기 항체가 박테리아에서 생성되는 것인 방법.
- [0106] 68. 제57항에 있어서, 상기 항체가 CHO 세포에서 생성되는 것인 방법.
- [0107] 69. 제57항에 있어서, 상기 종양이 방사선 치료 또는 화학요법제에 추가로 노출되는 것인 방법.
- [0108] 70. 제57항에 있어서, 상기 종양이 유방 종양, 결장직장 종양, 폐 종양, 난소 종양, 중추신경계 종양, 간 종양, 방광 종양, 췌장 종양 또는 자궁경부 종양인 방법.
- [0109] 71. 제57항에 있어서, 상기 단백질이 동일한 조직 기원의 정상 세포에 비해 상기 종양의 암성 세포에 의해 보다 풍부하게 발현되는 것인 방법.
- [0110] 72. 제57항에 있어서, 상기 단백질이 (a) 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (b) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (c) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드

의 세포의 도메인의 아미노산 서열, (d) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포의 도메인의 아미노산 서열, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 갖는 것인 방법.

[0111] 73. (a) 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (b) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (c) 그의 관련된 신호 펩티드가 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포의 도메인, (d) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포의 도메인, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 단백질을 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 상기 단백질에 결합하는 항체에 노출시키는 것, 및 상기 샘플에서 상기 단백질에 대한 상기 항체의 결합을 결정하는 것을 포함하며, 여기서 상기 단백질에 대한 항체의 결합은 상기 샘플에 상기 단백질이 존재함을 나타내는 것인, 상기 샘플에서 상기 단백질의 존재를 결정하는 방법.

[0112] 74. 제73항에 있어서, 상기 샘플이 상기 단백질을 발현하는 것으로 의심되는 세포를 포함하는 것인 방법.

[0113] 75. 제74항에 있어서, 상기 세포가 암 세포인 방법.

[0114] 76. 제73항에 있어서, 상기 항체가 검출가능하게 표지되는 것인 방법.

[0115] 77. 제73항에 있어서, 상기 단백질이 (a) 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (b) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (c) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포의 도메인의 아미노산 서열, (d) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포의 도메인의 아미노산 서열, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 갖는 것인 방법.

[0116] 78. 포유동물로부터 수득한 조직 세포의 시험 샘플 및 동일한 조직 기원의 공지된 정상 세포의 대조군 샘플에서 (a) 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (b) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (c) 그의 관련된 신호 펩티드가 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포의 도메인, (d) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포의 도메인, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 결정하는 것을 포함하며, 여기서 대조군 샘플에 비해 시험 샘플에서 더 높은 상기 단백질의 발현 수준은 시험 샘플을 수득한 포유동물에 종양이 존재함을 나타내는 것인, 포유동물에서 종양의 존재를 진단하는 방법.

[0117] 79. 제78항에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계가 계내 혼성화 또는 RT-PCR 분석에 올리고뉴클레오티드를 사용하는 것을 포함하는 방법.

[0118] 80. 제78항에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계가 면역조직화학 또는 웨스턴 블롯 분석에 항체를 사용하는 것을 포함하는 방법.

[0119] 81. 제78항에 있어서, 상기 단백질이 (a) 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (b) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (c) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포의 도메인의 아미노산 서열, (d) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포의 도메인의 아미노산 서열, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 갖는 것인 방법.

[0120] 82. 포유동물로부터 수득한 조직 세포의 시험 샘플을 (a) 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (b) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (c) 그의 관련된 신호 펩티드가 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포의 도메인, (d) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포의 도메인, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 단백질에 결합하는 항체와 접촉시키는 것, 및 시험 샘플에서 상기 항체와 상기 단백질 사이의 복합체의 형성을 검출하는 것을 포함하며, 여기서 복합체의 형성은 상기 포유동물에 종양이 존재함을 나타내는 것인, 포유동물에서 종양의 존재를 진단하는 방법.

[0121] 83. 제82항에 있어서, 상기 항체가 검출가능하게 표지되는 것인 방법.

[0122] 84. 제82항에 있어서, 상기 조직 세포의 시험 샘플이 암성 종양을 갖는 것으로 의심되는 개체로부터 수득되는

것인 방법.

- [0123] 85. 제82항에 있어서, 상기 단백질이 (a) 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (b) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (c) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열, (d) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 갖는 것인 방법.
- [0124] 86. (a) 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (b) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (c) 그의 관련된 신호 펩티드가 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (d) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 단백질의 증가된 발현 또는 활성화와 관련된 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 유효량의 상기 단백질의 길항제를 투여하여 상기 세포 증식성 장애를 효과적으로 치료 또는 예방하는 것을 포함하는, 상기 세포 증식성 장애를 치료 또는 예방하는 방법.
- [0125] 87. 제86항에 있어서, 상기 세포 증식성 장애가 암인 방법.
- [0126] 88. 제86항에 있어서, 상기 길항제가 항-TAT 폴리펩티드 항체 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드인 방법.
- [0127] 89. (a) 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (b) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (c) 그의 관련된 신호 펩티드가 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (d) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 단백질을 발현하는 세포를 상기 단백질에 결합하는 항체와 접촉시키는 것, 및 상기 단백질에 대한 항체의 결합이 일어나도록 허용하여 상기 항체를 상기 세포에 결합시키는 것을 포함하는, 상기 세포에 항체를 결합시키는 방법.
- [0128] 90. 제89항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 방법.
- [0129] 91. 제89항에 있어서, 상기 항체가 항체 단편인 방법.
- [0130] 92. 제89항에 있어서, 상기 항체가 키메라 또는 인간화 항체인 방법.
- [0131] 93. 제89항에 있어서, 상기 항체가 성장 억제제에 접합되는 것인 방법.
- [0132] 94. 제89항에 있어서, 상기 항체가 세포독성제에 접합되는 것인 방법.
- [0133] 95. 제94항에 있어서, 상기 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 뉴클레오티드분해 효소로 이루어진 군 중으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0134] 96. 제94항에 있어서, 세포독성제가 독소인 방법.
- [0135] 97. 제96항에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 및 칼리케아미신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0136] 98. 제96항에 있어서, 독소가 메이탄시노이드인 방법.
- [0137] 99. 제89항에 있어서, 상기 항체가 박테리아에서 생성되는 것인 방법.
- [0138] 100. 제89항에 있어서, 상기 항체가 CHO 세포에서 생성되는 것인 방법.
- [0139] 101. 제89항에 있어서, 상기 세포가 암 세포인 방법.
- [0140] 102. 제101항에 있어서, 상기 암 세포가 방사선 치료 또는 화학요법에 추가로 노출되는 것인 방법.
- [0141] 103. 제101항에 있어서, 상기 암 세포가 유방암 세포, 결장직장암 세포, 폐암 세포, 난소암 세포, 중추신경계 암 세포, 간암 세포, 방광암 세포, 췌장암 세포, 자궁경부암 세포, 흑색종 세포 및 백혈병 세포로 이루어진 군 으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0142] 104. 제103항에 있어서, 상기 단백질이 동일한 조직 기원의 정상 세포에 비해 상기 암 세포에 의해 보다 풍부하 게 발현되는 것인 방법.
- [0143] 105. 제89항에 있어서, 상기 세포의 사멸을 유발하는 방법.

- [0144] 106. 암의 치료적 치료 또는 진단적 검출을 위한 의약의 제조에 있어서 제1항 내지 제5항 및 제30항 중 어느 한 항에 따른 핵산의 용도.
- [0145] 107. 종양의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 제1항 내지 제5항 및 제30항 중 어느 한 항에 따른 핵산의 용도.
- [0146] 108. 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서 제1항 내지 제5항 및 제30항 중 어느 한 항에 따른 핵산의 용도.
- [0147] 109. 암의 치료적 치료 또는 진단적 검출을 위한 의약의 제조에 있어서 제6항, 제7항 및 제31항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터의 용도.
- [0148] 110. 종양의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 제6항, 제7항 및 제31항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터의 용도.
- [0149] 111. 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서 제6항, 제7항 및 제31항 중 어느 한 항에 따른 발현 벡터의 용도.
- [0150] 112. 암의 치료적 치료 또는 진단적 검출을 위한 의약의 제조에 있어서 제8항, 제9항, 제32항 및 제33항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포의 용도.
- [0151] 113. 종양의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 제8항, 제9항, 제32항 및 제33항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포의 용도.
- [0152] 114. 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서 제8항, 제9항, 제32항 및 제33항 중 어느 한 항에 따른 숙주 세포의 용도.
- [0153] 115. 암의 치료적 치료 또는 진단적 검출을 위한 의약의 제조에 있어서 제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드의 용도.
- [0154] 116. 종양의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드의 용도.
- [0155] 117. 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서 제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 폴리펩티드의 용도.
- [0156] 118. 암의 치료적 치료 또는 진단적 검출을 위한 의약의 제조에 있어서 제15항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 항체의 용도.
- [0157] 119. 종양의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 제15항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 항체의 용도.
- [0158] 120. 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서 제15항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 항체의 용도.
- [0159] 121. 암의 치료적 치료 또는 진단적 검출을 위한 의약의 제조에 있어서 제35항 또는 제36항에 따른 물질의 조성물의 용도.
- [0160] 122. 종양의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 제35항 또는 제36항에 따른 물질의 조성물의 용도.
- [0161] 123. 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서 제35항 또는 제36항에 따른 물질의 조성물의 용도.
- [0162] 124. 암의 치료적 치료 또는 진단적 검출을 위한 의약의 제조에 있어서 제37항 또는 제38항에 따른 제조품의 용도.
- [0163] 125. 종양의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서 제37항 또는 제38항에 따른 제조품의 용도.
- [0164] 126. 세포 증식성 장애의 치료 또는 예방을 위한 의약의 제조에 있어서 제37항 또는 제38항에 따른 제조품의 용도.
- [0165] 127. (a) 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (b) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (c) 그의 관련된 신호 펩티드가 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (d) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오티드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드에

대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 단백질을 상기 단백질에 결합하는 항체와 접촉시켜 세포의 성장을 억제하는 것을 포함하며, 여기서 상기 세포의 성장은 적어도 부분적으로 상기 단백질의 성장 강화 효과에 의존하는 것인, 상기 세포의 성장을 억제하는 방법.

- [0166] 128. 제127항에 있어서, 상기 세포가 암 세포인 방법.
- [0167] 129. 제127항에 있어서, 상기 단백질이 상기 세포에 의해 발현되는 것인 방법.
- [0168] 130. 제127항에 있어서, 상기 단백질에 대한 상기 항체의 결합이 상기 단백질의 세포 성장-강화 활성을 길항하는 것인 방법.
- [0169] 131. 제127항에 있어서, 상기 단백질에 대한 상기 항체의 결합이 상기 세포의 사멸을 유도하는 것인 방법.
- [0170] 132. 제127항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 방법.
- [0171] 133. 제127항에 있어서, 상기 항체가 항체 단편인 방법.
- [0172] 134. 제127항에 있어서, 상기 항체가 키메라 또는 인간화 항체인 방법.
- [0173] 135. 제127항에 있어서, 상기 항체가 성장 억제제에 접합되는 것인 방법.
- [0174] 136. 제127항에 있어서, 상기 항체가 세포독성제에 접합되는 것인 방법.
- [0175] 137. 제136항에 있어서, 상기 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 뉴클레오타이드분해 효소로 이루어진 군 중으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0176] 138. 제136항에 있어서, 세포독성제가 독소인 방법.
- [0177] 139. 제138항에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 및 칼리케아미신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0178] 140. 제138항에 있어서, 독소가 메이탄시노이드인 방법.
- [0179] 141. 제127항에 있어서, 상기 항체가 박테리아에서 생성되는 것인 방법.
- [0180] 142. 제127항에 있어서, 상기 항체가 CHO 세포에서 생성되는 것인 방법.
- [0181] 143. 제127항에 있어서, 상기 단백질이 (a) 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (b) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (c) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열, (d) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 갖는 것인 방법.
- [0182] 144. (a) 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (b) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드, (c) 그의 관련된 신호 펩티드가 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (d) 그의 관련된 신호 펩티드가 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 폴리펩티드, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 폴리펩티드에 대해 적어도 80% 아미노산 서열 동일성을 갖는 단백질을 상기 단백질에 결합하는 항체와 접촉시켜 종양을 효과적으로 치료하는 것을 포함하며, 여기서 상기 종양의 성장은 적어도 부분적으로 상기 단백질의 성장 강화 효과에 의존하는 것인, 포유동물에서 종양을 치료적으로 치료하는 방법.
- [0183] 145. 제144항에 있어서, 상기 단백질이 상기 종양의 세포에 의해 발현되는 것인 방법.
- [0184] 146. 제144항에 있어서, 상기 단백질에 대한 상기 항체의 결합이 상기 단백질의 세포 성장-강화 활성을 길항하는 것인 방법.
- [0185] 147. 제144항에 있어서, 상기 항체가 모노클로날 항체인 방법.
- [0186] 148. 제144항에 있어서, 상기 항체가 항체 단편인 방법.
- [0187] 149. 제144항에 있어서, 상기 항체가 키메라 또는 인간화 항체인 방법.
- [0188] 150. 제144항에 있어서, 상기 항체가 성장 억제제에 접합되는 것인 방법.

- [0189] 151. 제144항에 있어서, 상기 항체가 세포독성제에 접합되는 것인 방법.
- [0190] 152. 제151항에 있어서, 상기 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 뉴클레오타이드분해 효소로 이루어진 군 중으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0191] 153. 제151항에 있어서, 세포독성제가 독소인 방법.
- [0192] 154. 제153항에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 및 칼리케아미신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.
- [0193] 155. 제153항에 있어서, 독소가 메이탄시노이드인 방법.
- [0194] 156. 제144항에 있어서, 상기 항체가 박테리아에서 생성되는 것인 방법.
- [0195] 157. 제144항에 있어서, 상기 항체가 CHO 세포에서 생성되는 것인 방법.
- [0196] 158. 제144항에 있어서, 상기 단백질이 (a) 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (b) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 아미노산 서열, (c) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 있는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열, (d) 그의 관련된 신호 펩티드 서열이 없는, 서열 2로 제시된 폴리펩티드의 세포외 도메인의 아미노산 서열, (e) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되는 아미노산 서열, 또는 (f) 서열 1로 제시된 뉴클레오타이드 서열의 전장 코딩 영역에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 갖는 것인 방법.
- [0197] 159. 제15항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항체에 의해 결합된 동일한 에피토프에 결합하는 단리된 항체.
- [0198] 160. 제159항에 있어서, 모노클로날 항체인 항체.
- [0199] 161. 제159항에 있어서, 항체 단편인 항체.
- [0200] 162. 제159항에 있어서, 키메라 또는 인간화 항체인 항체.
- [0201] 163. 제159항에 있어서, 성장 억제제에 접합된 항체.
- [0202] 164. 제159항에 있어서, 세포독성제에 접합된 항체.
- [0203] 165. 제164항에 있어서, 세포독성제가 독소, 항생제, 방사성 동위원소 및 뉴클레오타이드분해 효소로 이루어진 군 중으로부터 선택되는 것인 항체.
- [0204] 166. 제164항에 있어서, 세포독성제가 독소인 항체.
- [0205] 167. 제166항에 있어서, 독소가 메이탄시노이드 및 칼리케아미신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 항체.
- [0206] 168. 제166항에 있어서, 독소가 메이탄시노이드인 항체.
- [0207] 169. 제159항에 있어서, 박테리아에서 생성된 항체.
- [0208] 170. 제159항에 있어서, CHO 세포에서 생성된 항체.
- [0209] 171. 제159항에 있어서, 그것이 결합하는 세포의 사멸을 유도하는 항체.
- [0210] 172. 제159항에 있어서, 검출가능하게 표지된 항체.
- [0211] 173. 제159항에 있어서, 제15항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항체의 상보성 결정 영역 중 적어도 하나를 포함하는 항체.
- [0212] 174. TAT 폴리펩티드에 결합하는 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마 세포.
- [0213] 175. 시험 항체가 제15항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항체의 결합을 차단하는 능력을 결정하는 것을 포함하며, 여기서 상기 시험 항체가 상기 제15항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항체의 TAT 폴리펩티드에 대한 결합을 동일한 항체 농도에서 적어도 40% 차단하는 능력은 상기 시험 항체가 상기 제15항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항체에 의해 결합된 에피토프에 결합할 수 있다는 것을 나타내는 것인, 제15항 내지 제29항 중 어느 한 항의 항체에 의해 결합된 에피토프에 결합하는 항체를 확인하는 방법.
- [0214] 본 발명의 추가의 실시양태는 본 명세서를 숙지한 당업자에게 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0215]

도 1은 TAT211 cDNA의 뉴클레오티드 서열 (서열 1)을 보여주고, 여기서 서열 1은 본원에서 "DNA219894"로 지정된 클론이다.

도 2는 도 1에 제시된 서열 1의 코딩 서열로부터 유래된 아미노산 서열 (서열 2)을 보여준다.

도 3a-c는 하기 경쇄 인간 하위군 I 컨센서스 서열 (huKI; 서열 3), 뮤린 10H1 항-TAT211 항체 (mu10H1-L; 서열 4), 10H1 항-TAT211 이식된 "인간화" 항체 (10H1-이식편; 서열 5), 및 다양한 다른 항-TAT211 "인간화" 항체 (서열 6-11)에 대한 가변 경쇄의 아미노산 서열의 정렬을 보여준다.

도 4a-c는 하기 중쇄 인간 하위군 III 컨센서스 서열 (hum III; 서열 12), 뮤린 10H1 항-TAT211 항체 (mu10H1-H; 서열 13), 10H1 항-TAT211 이식된 "인간화" 항체 (10H1-이식편; 서열 14), 및 다양한 다른 항-TAT211 "인간화" 항체 (서열 15-20)에 대한 가변 중쇄의 아미노산 서열의 정렬을 보여준다.

도 5는 선택된 친화도-성숙 10H1-유래의 항체의 다양한 CDR-L1 서열 (서열 21-34)을 보여준다.

도 6은 선택된 친화도-성숙 10H1-유래의 항체의 다양한 CDR-L2 서열 (서열 35-38)을 보여준다.

도 7은 선택된 친화도-성숙 10H1-유래의 항체의 다양한 CDR-L3 서열 (서열 39-41)을 보여준다.

도 8은 선택된 친화도-성숙 10H1-유래의 항체의 다양한 CDR-H1 서열 (서열 42-45)을 보여준다.

도 9는 선택된 친화도-성숙 10H1-유래의 항체의 다양한 CDR-H2 서열 (서열 46-60)을 보여준다.

도 10은 선택된 친화도-성숙 10H1-유래의 항체의 다양한 CDR-H3 서열 (서열 61-65)을 보여준다.

도 11은 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 66), 인간 VH 하위군 I 컨센서스 프레임워크 마이너스 확장된 추가변 영역 (서열 67-69), 인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 70), 인간 VH 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 확장된 추가변 영역 (서열 71-73), 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR "L-변이체" (서열 74), 및 인간 VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR "F-변이체" (서열 75)에 따르는 서열 식별자를 사용하여 본 발명을 실시하는데 사용하기 위한 예시적 수용자 인간 컨센서스 프레임워크 서열을 보여준다.

도 12는 인간 VL 카파 하위군 I 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 76), 인간 VL 카파 하위군 II 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 77), 인간 VL 카파 하위군 III 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 78), 및 인간 VL 카파 하위군 IV 컨센서스 프레임워크 마이너스 카바트 CDR (서열 79)에 따르는 서열 식별자를 사용하여 본 발명을 실시하는데 사용하기 위한 예시적 수용자 인간 컨센서스 프레임워크 서열을 보여준다.

도 13은 항체 10H1.1.4B의 중쇄의 아미노산 서열 (서열 80)을 보여준다.

도 14는 항체 10H1.1.4B의 경쇄의 아미노산 서열 (서열 81)을 보여준다.

도 15는 하기 ADC vc-MMAE 접합된 항체, 10H1.11 (◆), 10H1.11.1 (■), 10H1.11.2B (▲), 10H1.11.4B (●), 10H1.11.6B (X), 10H1-이식편 (○), 항-인간 gD (|), 항-돼지풀 (□)로의 처리에 의한 OVCAR-3 세포 (세포 표면 상에서 TAT211 폴리펩티드를 내재적으로 발현함)의 시험관내 사멸을 보여준다.

도 16은 하기 ADC vc-MMAE 접합된 항체, 10H1.11.4B (●), 또는 항-인간 gD (|)로의 처리에 의한 293 세포 (세포 표면 상에서 TAT211 폴리펩티드를 발현하지 않음)의 시험관내 사멸을 보여준다.

도 17은 하기 ADC vc-MMAE 접합된 항체, 10H1.11.4B (●), 또는 항-인간 gD (|)로의 처리에 의한 293/TAT211 세포 (세포 표면 상에서 TAT211 폴리펩티드를 발현하도록 조작됨)의 시험관내 사멸을 보여준다.

도 18은 하기 ADC vc-MMAE 접합된 항체, 비히클 단독 (□), 10H1.11 (◆), 10H1.11.1 (■), 10H1.11.2B (▲), 10H1.11.4B (●), 10H1.11.6B (+), 및 10H1-이식편 (○)을 사용한 마우스 유방 지방 패드 실험에서 OVCAR-3 종양의 생체내 사멸을 보여준다.

도 19는 하기 ADC vc-MMAE 접합된 항체, 비히클 단독 (X), 10H1.11.4B (3 mg/kg) (■), 10H1.11.4B (1 mg/kg) (●), 또는 TAT211에 결합하지 않는 비-특이적 항-gp120 대조군 항체 (▲)를 사용한 마우스 유방 지방 패드 실험에서 OVCAR-3의 생체내 사멸을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0216] <발명의 상세한 설명>
- [0217] I. 정의
- [0218] 본원에서 사용되고 수치 지정이 바로 뒤에 위치하는 경우 용어 "TAT 폴리펩티드" 및 "TAT"는 다양한 폴리펩티드를 의미하고, 여기서 완전한 명칭 (즉, TAT/숫자)은 본원에 기재된 바와 같은 특정 폴리펩티드 서열을 나타낸다. 용어 "숫자"가 본원에 사용된 실제 수치 지정으로서 제시되는 용어 "TAT/숫자 폴리펩티드" 및 "TAT/숫자"는 천연 서열 폴리펩티드, 폴리펩티드 변이체 및 천연 서열 폴리펩티드 및 폴리펩티드 변이체의 단편 (본원에서 추가로 정의됨)을 포함한다. 본원에 기재된 TAT 폴리펩티드는 다양한 공급원, 예컨대 인간 조직 유형 또는 또 다른 공급원으로부터 단리될 수도 있고, 또는 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조될 수도 있다. 용어 "TAT 폴리펩티드"는 본원에 개시된 각각의 개별적인 TAT/숫자 폴리펩티드를 나타낸다. "TAT 폴리펩티드"를 나타내는 본원 명세서 내의 모든 개시내용은 각각의 폴리펩티드를 개별적으로 뿐만 아니라 공동으로 나타내는 것이다. 예를 들어, ~에 대한 항체의 제조, 정제, 유도체화, 형성, ~에 대한 TAT 결합 올리고펩티드의 형성, ~에 대한 TAT 결합 유기 분자의 형성, ~의 투여, ~을 함유하는 조성물, ~을 사용한 질환의 치료 등의 기재는 본 발명의 각 폴리펩티드와 개별적으로 관련이 있다. 또한, 본원에 기재된 용어 "TAT 폴리펩티드"는 TAT/숫자 폴리펩티드의 변이체를 포함한다. 한 실시양태에서, TAT211 폴리펩티드 서열은 서열 2로 제시된다.
- [0219] "천연 서열 TAT 폴리펩티드"는 자연계로부터 유래된 상응하는 TAT 폴리펩티드와 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 이러한 천연 서열 TAT 폴리펩티드는 자연계로부터 단리될 수 있거나, 또는 재조합 또는 합성 수단에 의해 생성될 수 있다. 특히, 용어 "천연 서열 TAT 폴리펩티드"는 특정 TAT 폴리펩티드의 천연 발생 말단절단된 또는 분비된 형태 (예를 들어, 세포외 도메인 서열), 폴리펩티드의 천연 발생 변이체 형태 (예를 들어, 대안적으로 스플라이싱된 형태) 및 천연 발생 대립유전자 변이체를 포함한다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 본원에 개시된 천연 서열 TAT 폴리펩티드는 첨부 도면에 제시된 전장 아미노산 서열을 포함하는 성숙 또는 전장 천연 서열 폴리펩티드이다. 출발 및 정지 코돈 (표시될 경우)은 도면에서 볼드체로 밑줄을 그어 나타낸다. 첨부 도면에서 "N 또는 X"로 표시된 핵산 잔기는 임의의 핵산 잔기이다. 그러나, 첨부 도면에 개시된 TAT 폴리펩티드는 도면에 아미노산 위치 1로서 본원에서 지정된 메티오닌 잔기로 시작하는 것으로 나타내지만, 도면에서 아미노산 위치 1의 상류 또는 하류에 위치한 다른 메티오닌 잔기를 TAT 폴리펩티드에 대한 출발 아미노산 잔기로서 사용할 수 있음을 고려할 수 있고, 또한 가능하다.
- [0220] TAT 폴리펩티드 "세포외 도메인" 또는 "ECD"는 본질적으로 막횡단 및 세포질 도메인이 없는 TAT 폴리펩티드의 형태를 의미한다. 통상적으로, TAT 폴리펩티드 ECD는 1% 미만의 이러한 막횡단 및/또는 세포질 도메인을 가질 것이고, 바람직하게는 0.5% 미만의 이러한 도메인을 가질 것이다. 본 발명의 TAT 폴리펩티드에 대해 확인된 임의의 막횡단 도메인은 소수성 도메인의 유형을 확인하기 위해 당업계에서 통상적으로 사용되는 기준에 따라 확인됨이 이해될 것이다. 막횡단 도메인의 정확한 경계는 달라질 수 있지만, 본원에서 처음에 확인된 바와 같은 도메인의 어느 한 말단에서 약 5개 이하의 아미노산이 상이할 가능성이 가장 크다. 따라서, 임의로 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인은 실시예 또는 명세서에서 확인된 막횡단 도메인/세포외 도메인 경계의 어느 한 측면에 약 5개 이하의 아미노산을 함유할 수 있고, 신호 펩티드가 있거나 없는 이러한 폴리펩티드 및 이들을 코딩하는 핵산이 본 발명에서 고려된다.
- [0221] 본원에 개시된 다양한 TAT 폴리펩티드의 "신호 펩티드"의 대략적인 위치가 본 명세서 및/또는 첨부 도면에 제시될 수 있다. 그러나, 신호 펩티드의 C-말단 경계가 달라질 수 있지만, 본원에서 처음 확인된 바와 같은 신호 펩티드 C-말단 경계의 어느 한쪽에서 약 5개 이하의 아미노산이 상이할 가능성이 가장 크며, 여기서 신호 펩티드의 C-말단 경계는 당업계에서 이러한 유형의 아미노산 서열 요소를 확인하는데 통상적으로 이용되는 기준에 따라 확인될 수 있음에 주목한다 (예를 들어, 문헌 [Nielsen et al., Prot. Eng. 10:1-6 (1997)] 및 [von Heinje et al., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)]). 추가로, 일부 경우에는 분비된 폴리펩티드로부터의 신호 서열의 절단이 전체적으로 일관되지 않아 1종 초과와 분비된 종이 생성된다는 것도 인지된다. 본원에서 확인된 바와 같은 신호 펩티드의 C-말단 경계의 어느 한쪽에서 약 5개 이하의 아미노산 이내에서 신호 펩티드가 절단된 이들 성숙 폴리펩티드 및 이들을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 본 발명에서 고려된다.
- [0222] "TAT 폴리펩티드 변이체"는 본원에 개시된 바와 같은 전장 천연 서열 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 없는 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 있거나 없는 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 서열의 임의의 다른 단편 (예컨대, 전장 TAT 폴리펩티드의 완전한 코딩 서열의 일부만을 나타내는 핵산에 의해 코딩되는 것)과 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성을 갖는, 본원에 정의된 바와 같은 TAT 폴리펩티드, 바람직하게는 활성 TAT 폴리펩티드를

의미한다. 이러한 TAT 폴리펩티드 변이체는 예를 들어 하나 이상의 아미노산 잔기가 전장 천연 아미노산 서열의 N- 또는 C-말단에서 부가되거나 결실된 TAT 폴리펩티드를 포함한다. 통상적으로, TAT 폴리펩티드 변이체는 본원에 개시된 바와 같은 전장 천연 서열 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 없는 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 있거나 없는 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 서열의 임의의 다른 구체적으로 규정된 단편에 대해 적어도 약 80%의 아미노산 서열 동일성, 대안적으로 적어도 약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다. 통상적으로, TAT 변이체 폴리펩티드는 적어도 약 10개의 아미노산 길이, 대안적으로 적어도 약 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600개 또는 그 초과개의 아미노산 길이이다. 임의로, TAT 변이체 폴리펩티드는 천연 TAT 폴리펩티드 서열에 비해 1개 이하의 보존적 아미노산 치환, 대안적으로는 천연 TAT 폴리펩티드 서열에 비해 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이하의 보존적 아미노산 치환을 가질 것이다.

[0223] 본원에서 확인된 TAT 폴리펩티드 서열에 대한 "아미노산 서열 동일성 (%)"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우에는 최대 서열 동일성 (%) 달성을 위해 갭을 도입한 후에 특정 TAT 폴리펩티드 서열 내의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열 내의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의되며, 임의의 보존적 치환을 서열 동일성의 일부로 간주하지 않는다. 아미노산 서열 동일성 (%)을 결정하기 위한 정렬은 당업계 기술 범위 내의 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈린(Megalign)(DNASTAR) 소프트웨어를 이용하여 달성할 수 있다. 당업자는 비교될 전장 서열에 대한 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 정렬 측정에 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해, 아미노산 서열 동일성 값 (%)은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 사용하여 얻었다 (여기서, ALIGN-2 프로그램에 대한 컴퓨터 원시 코드는 본원에 참고로 포함된 미국 특허 번호 7,160,985에 제공되어 있음). ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제네펜크, 인크.(Genentech, Inc.) 소유로서, 그의 원시 코드는 미국 저작권청 (20559 워싱턴 디.씨.)에 사용자 문서로 제출되어 있고, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제네펜크, 인크. (캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코)를 통해 공개적으로 이용가능하거나, 원시 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 작업 시스템, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D에서 사용되도록 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 변하지 않는다.

[0224] ALIGN-2가 아미노산 서열 비교를 위해 사용되는 상황에서, 주어진 아미노산 서열 B에, 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대한 주어진 아미노산 서열 A의 아미노산 서열 동일성 % (대안적으로, 주어진 아미노산 서열 B에, 주어진 아미노산 서열 B와, 또는 주어진 아미노산 서열 B에 대해 특정 아미노산 서열 동일성 %를 갖거나 또는 이를 포함하는 주어진 아미노산 서열 A라는 어구로 기재될 수 있음)는 다음과 같이 계산된다:

[0225] $100 \times X/Y$ 의 분율

[0226] 여기서, X는 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의한 A 및 B의 프로그램 정렬시에 상기 프로그램에 의해 동일한 매치로 스코어링된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B의 아미노산 잔기의 총수이다. 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우에는 B에 대한 A의 아미노산 서열 동일성 %가 A에 대한 B의 아미노산 서열 동일성 %와 동일하지 않을 것임을 이해할 것이다.

[0227] "TAT 변이체 폴리뉴클레오티드" 또는 "TAT 변이체 핵산 서열"은 본원에 정의된 바와 같은 TAT 폴리펩티드, 바람직하게는 활성 TAT 폴리펩티드를 코딩하고, 본원에 개시된 바와 같은 전장 천연 서열 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 없는 전장 천연 서열 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 있거나 없는 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 서열의 임의의 다른 단편 (예컨대, 전장 TAT 폴리펩티드의 완전한 코딩 서열의 일부만을 나타내는 핵산에 의해 코딩되는 것)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 약 80%의 핵산 서열 동일성을 갖는 핵산 분자를 의미한다. 통상적으로, TAT 변이체 폴리뉴클레오티드는 본원에 개시된 바와 같은 전장 천연 서열 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 펩티드가 없는 전장 천연 서열 TAT 폴리펩티드 서열, 본원에 개시된 바와 같은 신호 서열이 있거나 없는 TAT 폴리펩티드의 세포외 도메인 또는 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드 서열의 임의의 다른 단편을 코딩하는 핵산 서열과 적어도 약 80%의 핵산 서열 동일성, 대안적으로 적어도

약 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 핵산 서열 동일성을 가질 것이다. 변이체는 천연 뉴클레오타이드 서열은 포함하지 않는다.

[0228] 통상적으로, TAT 변이체 뉴클레오타이드는 적어도 약 5개 뉴클레오타이드 길이, 대안적으로는 적어도 약 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 또는 1000개 뉴클레오타이드 길이이고, 이러한 문맥에서 용어 "약"은 언급된 뉴클레오타이드 서열 길이 \pm 언급된 길이의 10%를 의미한다.

[0229] 본원에서 확인된 TAT-코딩 핵산 서열에 대한 "핵산 서열 동일성 (%)"은 서열을 정렬시키고 필요한 경우에는 최대 서열 동일성 (%) 달성을 위해 갭을 도입한 후에 관심있는 TAT 핵산 서열 내의 뉴클레오타이드와 동일한 후보 서열 내의 뉴클레오타이드의 백분율로서 정의된다. 핵산 서열 동일성 (%)을 결정하기 위한 정렬은 당업계 기술 범위 내의 다양한 방법, 예를 들어 공개적으로 이용가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈린 (DNASTAR) 소프트웨어를 이용하여 달성될 수 있다. 그러나, 본원의 목적을 위해 핵산 서열 동일성 값 (%)은 서열 비교 컴퓨터 프로그램 ALIGN-2를 이용하여 얻을 수 있는데, ALIGN-2 프로그램에 대한 완전한 원시 코드는 본원에 참고로 포함된 미국 특허 번호 7,160,985에 기재되어 있다. ALIGN-2 서열 비교 컴퓨터 프로그램은 제넨테크, 인크. 소유로서, 그의 원시 코드는 미국 저작권청 (20559 워싱턴 디.씨.)에 사용자 문서로 제출되어 있고, 미국 저작권 등록 번호 TXU510087로 등록되어 있다. ALIGN-2 프로그램은 제넨테크, 인크. (캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코)를 통해 공개적으로 이용가능하거나, 원시 코드로부터 컴파일링될 수 있다. ALIGN-2 프로그램은 UNIX 작업 시스템, 바람직하게는 디지털 UNIX V4.0D에서 사용되도록 컴파일링되어야 한다. 모든 서열 비교 파라미터는 ALIGN-2 프로그램에 의해 설정되어 있으며 변하지 않는다.

[0230] 핵산 서열 비교를 위해 ALIGN-2가 사용되는 상황에서, 주어진 핵산 서열 D에 또는 주어진 핵산 서열 D와 또는 주어진 핵산 서열 D에 대한 주어진 핵산 서열 C의 핵산 서열 동일성 (%) (대안적으로, 주어진 핵산 서열 D에 또는 주어진 핵산 서열 D와 또는 주어진 핵산 서열 D에 대해 특정 핵산 서열 동일성 (%)을 갖거나 포함하는 주어진 주어진 핵산 서열 C라는 어구로 표현될 수 있음)은 다음과 같이 계산된다:

[0231] $100 \times W/Z$ 의 분율

[0232] 여기서, W는 C와 D의 프로그램 정렬에서 서열 정렬 프로그램 ALIGN-2에 의해 동일한 매치로 스코어링되는 뉴클레오타이드의 수이고, Z는 D에 있는 뉴클레오타이드의 총 수이다. 핵산 서열 C의 길이가 핵산 서열 D의 길이와 동일하지 않은 경우에는 D에 대한 C의 핵산 서열 동일성 (%)이 C에 대한 D의 핵산 서열 동일성 (%)과 동일하지 않을 것임을 이해할 것이다.

[0233] 다른 실시양태에서, TAT 변이체 폴리뉴클레오타이드는 TAT 폴리펩티드를 코딩하고, 바람직하게는 엄격한 혼성화 및 세척 조건하에 본원에 개시된 바와 같은 전장 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 핵산 분자이다. TAT 변이체 폴리펩티드는 TAT 변이체 폴리뉴클레오타이드에 의해 코딩되는 것일 수 있다.

[0234] TAT 폴리펩티드를 코딩하는 핵산과 관련하여 사용되는 경우의 용어 "전장 코딩 영역"은 본 발명의 전장 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오타이드의 서열을 나타낸다 (첨부 도면에 종종 출발 코돈으로부터 정지 코돈에 이르기까지의 서열로 제시됨). ATCC에 기탁된 핵산과 관련하여 사용될 때, 용어 "전장 코딩 영역"은 ATCC에 기탁된 벡터 내에 삽입된 cDNA의 TAT 폴리펩티드-코딩 부분을 나타낸다 (첨부 도면에 종종 출발 코돈으로부터 정지 코돈에 이르기까지의 서열로 제시됨 (출발 및 정지 코돈은 도면에서 굵은 글씨체로 밑줄로 나타낸다)).

[0235] "단리된"이 본원에 개시된 다양한 폴리펩티드를 기재하기 위해 사용되는 경우, 이것은 천연 환경 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 폴리펩티드를 의미한다. 폴리펩티드의 천연 환경의 오염 성분은 전형적으로 상기 폴리펩티드의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 폴리펩티드는 (1) 스피닝 컵 시퀀네이터를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 15개 이상의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (2) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하여 비-환원 또는 환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 균일한 것으로 나타날 정도로 정제될 것이다.

단리된 TAT 폴리펩티드는 폴리펩티드 자연 환경의 적어도 한 성분도 존재하지 않을 것이기 때문에 제조할 세포 내의 계내 폴리펩티드를 포함한다. 그러나, 통상적으로, 단리된 폴리펩티드는 적어도 1회의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

- [0236] "단리된" TAT 폴리펩티드-코딩 핵산 또는 다른 폴리펩티드-코딩 핵산은 폴리펩티드-코딩 핵산의 천연 공급원에서 그와 통상적으로 회합되는 적어도 하나의 오염 핵산 분자로부터 확인되고 분리된 핵산 분자이다. 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는 자연계에서 발견되는 형태 또는 환경과 다른 것이다. 따라서, 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는 천연 세포에 존재하는 특정 폴리펩티드-코딩 핵산 분자와 구별된다. 그러나, 단리된 폴리펩티드-코딩 핵산 분자는, 폴리펩티드를 통상적으로 발현하는 세포 내에 함유되고 예를 들어 천연 세포에서와는 상이한 염색체 위치에 존재하는 폴리펩티드-코딩 핵산 분자를 포함한다.
- [0237] 용어 "제어 서열"은 특정 숙주 유기체 내에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 나타낸다. 원핵생물에 적합한 제어 서열은 예를 들어 프로모터, 임의로는 오퍼레이터 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서를 이용하는 것으로 공지되어 있다.
- [0238] 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계로 배치될 때 "작동가능하게 연결"된다. 예를 들어, 프리서열 또는 분비 리더의 DNA는 폴리펩티드에 대한 DNA가 상기 폴리펩티드의 분비에 수반되는 프리단백질로서 발현되는 경우에 상기 폴리펩티드에 대한 DNA에 작동가능하게 연결된 것이고; 프로모터 또는 인핸서는 코딩 서열의 전사에 영향을 미칠 경우에 상기 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이며; 또는 리보솜 결합 부위는 코딩 서열의 번역을 용이하게 하도록 배치될 경우에 상기 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 것이다. 일반적으로, "작동가능하게 연결된"은 연결된 DNA 서열들이 인접하여 위치함을 의미하며, 분비 리더의 경우에는 인접하여 위치하고 리딩 상 내에 존재하는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접하여 위치할 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서의 라이게이션을 통해 달성된다. 이러한 부위가 존재하지 않는 경우에는 합성 올리고뉴클레오타이드 어답터 또는 링커를 통상적인 관행에 따라 사용한다.
- [0239] 혼성화 반응의 "엄격성"은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있고, 일반적으로 프로브 길이, 세척 온도 및 염 농도에 따라 실험적으로 계산된다. 일반적으로, 프로브가 길수록 적절한 어닐링을 위해 더 높은 온도가 필요하고, 프로브가 짧으면 보다 낮은 온도가 필요하다. 혼성화는 일반적으로 상보성 가닥이 그의 용점 미만의 환경에 존재할 때 변성 DNA가 재어닐링되는 능력에 따라 결정된다. 프로브와 혼성화 가능 서열 사이의 원하는 상동성 정도가 클수록 사용될 수 있는 상대적 온도가 더 높다. 그 결과, 보다 높은 상대 온도는 반응 조건을 보다 엄격하게 만들고, 보다 낮은 온도는 덜 엄격하게 만드는 경향이 있다. 혼성화 반응의 엄격성에 대한 추가의 상세한 내용 및 설명에 대해서는 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995)]을 참조한다.
- [0240] 본원에서 규정되는 바와 같은 "엄격한 조건" 또는 "고엄격성 조건"은 (1) 세척을 위해 낮은 이온 강도 및 높은 온도, 예를 들어 50℃의 0.015 M 염화나트륨/0.0015 M 시트르산나트륨/0.1% 나트륨 도데실 술페이트의 사용; (2) 혼성화 동안 변성제, 예컨대 포름아미드, 예를 들어 50% (v/v) 포름아미드 + 0.1% 소 혈청 알부민/0.1% 피콜/0.1% 폴리비닐피롤리돈/50 mM 인산나트륨 완충제 (pH 6.5) + 750 mM 염화나트륨, 75 mM 시트르산나트륨 (42℃)의 사용; 또는 (3) 42℃의 0.2 x SSC (염화나트륨/시트르산나트륨)를 사용한 10분 세척, 이어서 55℃의 EDTA 함유 0.1 x SSC로 구성된 10분 동안의 고엄격성 세척과 함께, 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 덴하르트 (Denhardt) 용액, 초음파 처리된 연어 정자 DNA (50 µg/ml), 0.1% SDS, 및 10% 텍스트란 술페이트를 사용한 밤샘 혼성화에 의해 확인될 수 있다.
- [0241] "중등 엄격성 조건"은 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989]에 기재된 바와 같이 확인할 수 있고, 상기한 것보다 엄격성이 낮은 세척 용액 및 혼성화 조건 (예를 들어, 온도, 이온 강도 및 %SDS)의 사용을 포함한다. 중간 정도의 엄격한 조건의 예는 20% 포름아미드, 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM 시트르산삼나트륨), 50 mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5 x 덴하르트 용액, 10% 텍스트란 술페이트 및 20 mg/ml의 변성되고 전단된 연어 정자 DNA를 포함하는 용액 중에서 37℃에서 밤새 인큐베이션한 후, 필터를 약 37-50℃에서 1 x SSC로 세척하는 것이다. 당업자는 프로브 길이 등과 같은 인자를 조정하기 위해 필요한 온도, 이온 강도 등의 조정 방법을 알 것이다.
- [0242] 본원에 사용되는 경우 용어 "에피토프 태그가 부착된"은 "태그 폴리펩티드"에 융합된 TAT 폴리펩티드 또는 항-TAT 항체를 포함하는 키메라 폴리펩티드를 나타낸다. 태그 폴리펩티드는 항체가 생성될 수 있는 에피토프를 제공할 만큼 충분한 잔기를 갖지만 그와 융합될 폴리펩티드의 활성을 방해하지 않을 정도로 충분히 짧다. 또한,

태그 폴리펩티드는 항체가 다른 에피토프와는 실질적으로 교차반응하지 않도록 아주 특징적인 것이 바람직하다. 일반적으로, 적합한 태그 폴리펩티드는 적어도 6개의 아미노산 잔기, 통상적으로는 약 8 내지 50개의 아미노산 잔기 (바람직하게는, 약 10 내지 20개의 아미노산 잔기)를 갖는다.

[0243] 본 발명의 목적을 위해 "활성의" 또는 "활성"은 천연 또는 자연 발생 TAT의 생물학적 및/또는 면역학적 활성을 보유하는 TAT 폴리펩티드의 형태(들)를 나타내고, "생물학적" 활성은 천연 또는 자연 발생 TAT가 갖는 항원성 에피토프에 대한 항체의 생성을 유도하는 능력 이외의, 천연 또는 자연 발생 TAT에 의해 유발되는 생물학적 기능 (억제성 또는 자극성)을 나타내고, "면역학적" 활성은 천연 또는 자연 발생 TAT가 갖는 항원성 에피토프에 대한 항체의 생성을 유도하는 능력을 나타낸다.

[0244] 용어 "길항제"는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 본원에 개시된 천연 TAT 폴리펩티드의 생물학적 활성을 부분적으로 또는 완전히 차단하거나 억제하거나 중화시키는 임의의 분자를 포함한다. 유사한 방식으로, 용어 "효능제"는 가장 광범위한 의미로 사용되고, 본원에 개시된 천연 TAT 폴리펩티드의 생물학적 활성을 모방하는 임의의 분자를 포함한다. 적합한 효능제 또는 길항제 분자는 특히 효능제 또는 길항제 항체 또는 항체 단편, 천연 TAT 폴리펩티드의 단편 또는 아미노산 서열 변이체, 펩티드, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 유기 소분자 등을 포함한다. TAT 폴리펩티드의 효능제 또는 길항제를 확인하는 방법은, TAT 폴리펩티드를 후보 효능제 또는 길항제 분자와 접촉시키는 것, 및 TAT 폴리펩티드와 통상적으로 관련이 있는 하나 이상의 생물학적 활성에 있어서의 검출가능한 변화를 측정하는 것을 포함할 수 있다.

[0245] "치료하는" 또는 "치료" 또는 "완화"는 표적화된 병적 상태 또는 장애를 예방하거나 그의 진행 속도를 느리게 하는 (완화하는) 것을 목적으로 하는 치료적 치료 및 예방 또는 방지 조치를 둘 다 나타낸다. 치료가 필요한 대상체는 이미 장애를 갖는 대상체 및, 상기 장애에 걸리기 쉬운 대상체 또는 상기 장애를 예방해야 하는 대상체를 포함한다. 대상체 또는 포유동물은 본 발명의 방법에 따라, 치료량의 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자를 투여한 후, 환자가 다음 중 하나 이상의 관찰가능한 및/또는 측정가능한 감소 또는 부재를 보일 경우에 TAT 폴리펩티드-발현 암에 대해 성공적으로 "치료된다": 암 세포의 수 감소 또는 암 세포의 부재; 종양 크기의 감소; 암의 연조직 및 뼈 내로의 확산을 포함하여 말초 장기 내로 암 세포 침윤의 억제 (즉, 어느 정도 지연시키고 바람직하게는 정지시킴); 종양 전이의 억제 (즉, 어느 정도 지연시키고 바람직하게는 정지시킴); 종양 성장의 어느 정도의 억제 및/또는 특정 암과 연관된 하나 이상의 증상의 어느 정도의 경감; 이환율 및 사망률 감소, 및 삶의 질 개선. 항-TAT 항체 또는 TAT 결합 올리고펩티드가 암 세포 성장을 방지하고/하거나 존재하는 암 세포를 사멸시킬 수 있는 정도로, 이들은 세포증식 억제성 및/또는 세포독성일 수 있다. 이러한 신호 또는 증상의 감소는 또한 환자에 의해 느껴질 수 있다.

[0246] 질환의 성공적인 치료 및 개선을 평가하기 위한 상기 파라미터는 전문의에게 익숙한 통상적인 절차에 따라 쉽게 측정될 수 있다. 암 요법의 경우, 효능은 예를 들어 질환 진행까지의 시간 (TTP)을 평가하고/하거나 반응을 (RR)을 결정함으로써 측정될 수 있다. 전이는 병기분류 시험 및 갈습 수준 및 다른 효소에 대한 뼈 스캔 및 시험 (뼈로의 확산을 결정하기 위함)으로 결정할 수 있다. CT 스캔을 수행하여 골반 및 림프절 영역에 퍼져있는지를 알아볼 수도 있다. 흉부 X-선 및 공지된 방법에 의한 간 효소 수준의 측정을 이용하여 폐 및 간 각각에 전이되었는지를 확인한다. 질환을 모니터링하기 위한 다른 통상적인 방법은 경직장 초음파검사법 (TRUS) 및 경직장 침 생검법 (TRNB)을 포함한다.

[0247] "장기" 투여는 단기 방식과는 반대로 연장된 기간 동안 초기 치료 효과 (활성)를 유지하기 위해 연속 방식으로 작용제(들)를 투여하는 것을 나타낸다. "간헐적" 투여는 중단없이 연속적으로 행해지지 않지만 특성상 주기적인 치료법이다.

[0248] 암의 치료, 증상의 완화 또는 진단을 위한 "포유동물"은 인간, 가축 및 농장 동물, 및 동물원, 스포츠, 또는 애완 동물, 예컨대 개, 고양이, 소, 말, 양, 돼지, 염소, 토끼 등을 포함하여 포유동물로서 분류된 임의의 동물을 나타낸다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다.

[0249] 하나 이상의 추가의 치료제와의 "조합" 투여는 동시 (공동) 투여 및 임의의 순서의 연속 투여를 포함한다.

[0250] 본원에 사용된 "담체"는 사용되는 투여량 및 농도에서 그에 노출되는 세포 또는 포유동물에게 비독성인 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함한다. 종종, 생리학상 허용되는 담체는 수성 pH 완충 용액이다. 생리학상 허용되는 담체의 예는 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산; 저분자량 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르

기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물, 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당 알콜, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨; 염-형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 트윈(TWEEN)[®], 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 플루로닉스(PLURONICS)[®]를 포함한다.

[0251] "고체 상" 또는 "고체 지지체"는 본 발명의 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자가 점착 또는 부착될 수 있는 비-수성 매트릭스를 의미한다. 본원에 포함되는 고체 상의 예는 부분적으로 또는 전적으로 유리 (예를 들어, 공극이 제어된 유리), 폴리사카라이드 (예를 들어, 아가로스), 폴리아크릴아미드, 폴리스티렌, 폴리비닐 알콜 및 실리콘으로 형성된 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 문맥에 따라 고체 상은 검정 플레이트의 웰을 포함할 수 있으며; 다른 실시양태에서 고체상은 정제 칼럼 (예를 들어, 친화성 크로마토그래피 칼럼)이다. 상기 용어는 또한 미국 특허 번호 4,275,149에 기재된 것과 같은 별개 입자의 불연속 고체상도 포함한다.

[0252] "리포솜"은 약물 (예컨대, TAT 폴리펩티드, 그에 대한 항체 또는 TAT 결합 올리고펩티드)을 포유동물에게 전달하기 위해 유용한 다양한 종류의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 구성된 작은 소포이다. 통상적으로, 리포솜의 성분들은 생체막의 지질 배열과 유사한 이중층 형태로 배열되어 있다.

[0253] "소" 분자 또는 유기 "소" 분자는 본원에서 분자량이 약 500 달톤 미만인 것으로 정의된다.

[0254] 본원에 개시된 바와 같은 폴리펩티드, 항체, TAT 결합 올리고펩티드, TAT 결합 유기 분자 또는 그의 효능제 또는 길항제의 "유효량"은 구체적으로 언급된 목적을 수행하기에 충분한 양이다. "유효량"은 언급된 목적과 관련하여 실험적이며 통상적인 방식으로 결정할 수 있다.

[0255] 용어 "치료 유효량"은 대상체 또는 포유동물에서 질환 또는 장애의 "치료"에 효과적인 항체, 폴리펩티드, TAT 결합 올리고펩티드, TAT 결합 유기 분자 또는 다른 약물의 양을 나타낸다. 암의 경우, 치료 유효량의 약물은 암 세포의 수 감소, 종양 크기의 감소, 말초 기관으로의 암 세포 침윤의 억제 (즉, 어느 정도 지연시키고 바람직하게는 정지시킴), 종양 전이의 억제 (즉, 어느 정도 지연시키고 바람직하게는 정지시킴), 종양 성장의 어느 정도의 억제, 및/또는 암과 연관된 증상 중 하나 이상의 어느 정도의 경감을 유도할 수 있다. 본원의 "치료하는"의 정의를 참조한다. 약물은, 존재하는 암 세포의 성장을 방지하고/거나 존재하는 암 세포를 사멸시킬 수 있는 정도까지 세포증식 억제성 및/또는 세포독성일 수 있다.

[0256] 항-TAT 항체, TAT 폴리펩티드, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자의 "성장 억제량"은 세포, 특히 종양, 예를 들어, 암 세포의 성장을 시험관 내에서 또는 생체 내에서 억제할 수 있는 양이다. 신생물성 세포 성장을 억제하기 위한 항-TAT 항체, TAT 폴리펩티드, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자의 "성장 억제량"은 실험적으로 통상적인 방식으로 결정할 수 있다.

[0257] 항-TAT 항체, TAT 폴리펩티드, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자의 "세포독성량"은 세포, 특히 종양, 예를 들어, 암 세포를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 파괴할 수 있는 양이다. 신생물성 세포 성장을 억제하기 위한 항-TAT 항체, TAT 폴리펩티드, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자의 "세포독성량"은 실험적으로 통상적인 방식 결정될 수 있다.

[0258] 용어 "항체"는 가장 넓은 의미에서 사용되고, 예를 들어 단일 항-TAT 모노클로날 항체 (효능제, 길항제 및 중화 항체 포함), 다중 에피토프 특이성을 갖는 항-TAT 항체 조성물, 폴리클로날 항체, 단일 쇄 항-TAT 항체, 및 원하는 생물학적 또는 면역학적 활성을 나타내는 한 항-TAT 항체의 단편 (아래 참조)을 구체적으로 포함한다. 용어 "이뮤노글로불린" (Ig)은 본원에서 항체와 교환가능하게 사용된다.

[0259] "단리된 항체"는 천연 환경의 성분으로부터 확인 및 분리 및/또는 회수된 항체이다. 항체의 천연 환경의 오염 성분은 상기 항체의 진단 또는 치료 용도를 방해하는 물질이고, 효소, 호르몬 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체는 (1) 로우리 방법으로 측정시에 항체의 95 중량%를 초과하는 정도, 가장 바람직하게는 99 중량%를 초과하는 정도로, (2) 스피닝 컵 시퀀네이터를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하여 환원 또는 비환원 조건하에 SDS-PAGE에 의해 균질한 것으로 나타날 정도로 정제될 것이다. 단리된 항체는 재조합 세포 내의 계내 항체를 포함하는데, 이는 항체 천연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않을 것이기 때문이다. 그러나, 통상적으로, 단리된 항체는 적어도 1회의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

- [0260] 기본적인 4-쇄 항체 단위는 2개의 동일한 경쇄 (L) 및 2개의 동일한 중쇄 (H)로 이루어진 이종사량체 당단백질이다 (IgM 항체는 J 쇠라 불리는 추가의 폴리펩티드와 함께 5개의 기본적인 이종사량체 단위로 이루어져 있어서 10개의 항원 결합 부위를 함유하고, 분비된 IgA 항체는 중합되어 J 쇠와 함께 기본적인 4-쇄 단위를 2 내지 5개 포함하는 다가 어셈블리를 형성할 수 있음). IgG의 경우, 4-쇄 단위는 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 L 쇠는 1개의 공유결합 디설피드 결합에 의해 H 쇠에 연결되지만, 2개의 H 쇠는 H 쇠 이소형에 따라 하나 이상의 디설피드 결합에 의해 서로 연결된다. 또한, 각 H 쇠 및 L 쇠에는 일정한 간격을 두고 이격된 쇠내 디설피드 브릿지가 존재한다. 각각의 H 쇠는 N-말단에 가변 도메인 (VH)을 갖고, 그 뒤에 α 및 γ 쇠 각각의 경우에는 3개의 불변 도메인 (CH), μ 및 ϵ 이소형의 경우에는 4개의 CH 도메인을 갖는다. 각각의 L 쇠는 N-말단의 가변 도메인 (VL) 및 그 뒤에 다른쪽 말단의 불변 도메인 (CL)을 갖는다. VL은 VH와 정렬되고, CL은 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는 경쇄 및 중쇄 가변 도메인 사이의 인터페이스를 형성한다고 여겨진다. VH 및 VL의 쌍 형성은 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 상이한 클래스의 항체의 구조 및 특성에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994] (페이지 71 및 챕터 6)을 참조한다.
- [0261] 임의의 척추동물 종의 L 쇠는 이들의 불변 도메인의 아미노산 서열을 기초로 하여 카파 및 람다라고 불리는 명백하게 특징적인 2가지 유형 중 하나에 배정될 수 있다. 이뮤노글로불린은 중쇄의 불변 도메인 (CH)의 아미노산 서열에 따라 상이한 클래스 또는 이소형으로 배정될 수 있다. 5가지 클래스의 이뮤노글로불린 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM이 존재하고, 각각은 α , δ , ϵ , γ 및 μ 로 지칭되는 중쇄를 갖는다. γ 및 α 클래스는 CH 서열 및 기능에 있어서의 상대적으로 작은 차이점을 기초로 하여 서브클래스로 더 분류되는데, 예를 들어 인간은 서브클래스 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2를 발현한다.
- [0262] 용어 "가변"은 가변 도메인의 특정 절편의 서열이 항체마다 크게 상이하다는 사실을 나타낸다. V 도메인은 항원 결합을 매개하고, 특정 항체의 그의 특정 항원에 대한 특이성을 규정한다. 그러나, 가변성이 가변 도메인의 110개 아미노산 범위에 걸쳐 고르게 분포되어 있는 것은 아니다. 대신, V 영역은 길이가 각각 9 내지 12개 아미노산이며 가변성이 극도로 높아 "초가변 영역"이라 불리는 보다 짧은 영역에 의해 분리되어 있는, 15 내지 30개 아미노산으로 이루어진 프레임워크 영역 (FR)이라 불리는 상대적으로 불변성인 스트레치로 이루어진다. 천연 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인은 3개의 초가변 영역에 의해 연결되고 주로 β -시트 형태를 취하는 4개의 FR을 각각 포함하며, 이들 초가변 영역은 상기 β -시트 구조를 연결하고 일부 경우에는 그의 일부를 형성하는 루프를 형성한다. 각 쇠의 초가변 영역은 FR에 의해 서로 근접하게 위치하고, 다른 쇠의 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 항원에 대한 항체 결합에 직접 관여하지는 않지만, 다양한 이펙터 기능, 예컨대 항체 의존적 세포 세포독성 (ADCC)에 있어서의 항체의 참여를 나타낸다.
- [0263] 본원에 사용된 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동질적인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 나타내고, 즉, 이러한 집단을 포함하는 개개의 항체는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 단일 항원 부위에 대해 지시되며 고도로 특이적이다. 추가로, 상이한 결정자 (에피토프)에 대해 지시된 상이한 항체를 포함하는 폴리클로날 항체 제제와는 반대로, 각각의 모노클로날 항체는 항원상의 단일결정자에 대해 지시된다. 이러한 특이성 이외에도, 모노클로날 항체는 이들이 다른 항체에 의해 오염되지 않는 상태로 합성될 수 있다는 점에서 유익하다. 수식어구 "모노클로날"은 임의의 특정한 방법을 통한 항체 생성이 필요하다는 것으로 해석되어서는 안된다. 예를 들어, 본 발명에 유용한 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 처음으로 기재되었던 하이브리도마 방법으로 제조할 수 있거나, 또는 박테리아, 진핵동물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 참조)으로 제조할 수 있다. "모노클로날 항체"는 또한 예를 들어 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991)]에 기재된 기술을 이용하여 파지 항체 라이브러리로부터 단리될 수도 있다.
- [0264] 모노클로날 항체는 본원에서 중쇄 및/또는 경쇄의 일부는 특정 종에서 유래하거나 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 대응하는 서열과 동일하거나 상동성인 한편, 쇠(들)의 나머지는 다른 종으로부터 유래하거나 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체 내의 대응하는 서열과 동일하거나 상동성인 "키메라" 항체 뿐만 아니라 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한 상기 항체의 단편을 포함한다 (미국 특허 4,816,567; 문헌 [Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)] 참조). 본원에서 관

심있는 키메라 항체는 비인간 영장류 (예를 들어, 구세계 원숭이, 유인원 등)로부터 유래된 가변 도메인 항원-결합 서열 및 인간 불변 영역 서열을 포함하는 "영장류화" 항체를 포함한다.

[0265] "무손상" 항체는 항원 결합 부위 및 CL 및 적어도 중쇄 불변 도메인, CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 항체이다. 불변 도메인은 천연 서열 불변 도메인 (예를 들어, 인간 천연 서열 불변 도메인) 또는 이것의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 무손상 항체는 하나 이상의 이펙터 기능을 갖는 것이 바람직하다.

[0266] "항체 단편"은 무손상 항체의 일부, 바람직하게는 무손상 항체의 항원 결합 또는 가변 영역을 포함한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fv 단편, 디아바디, 선형 항체 (미국 특허 번호 5,641,870의 실시예 2; 문헌 [Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]] 참조), 단일쇄 항체 분자, 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함한다.

[0267] 항체를 파파인으로 소화시키면 "Fab" 단편이라고 불리는 2개의 동일한 항원-결합 단편 및 나머지 "Fc" 단편이 생성되는데, 이 명칭은 쉽게 결정화되는 능력을 반영한 것이다. Fab 단편은 H 쇠의 가변 영역 도메인 (VH) 및 1개 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)과 함께 L 쇠 전체로 이루어진다. 각 Fab 단편은 항원 결합에 대해 1가이고, 즉, 단일 항원-결합 부위를 갖는다. 항체의 펩신 처리는 2가 항원-결합 활성을 갖는 2개의 디설피드 연결된 Fab 단편에 대략적으로 상응하며 항원을 여전히 가교할 수 있는 큰 단일 F(ab')₂ 단편을 생성한다. Fab' 단편은 항체 힌지 영역으로부터의 하나 이상의 시스테인을 포함하는 CH1 도메인의 카르복시 말단에서 몇 개의 추가 잔기를 갖는다는 점에서 Fab 단편과 상이하다. Fab'-SH는 본원에서 불변 도메인의 시스테인 잔기(들)가 유리 티올 기를 보유하는 Fab'를 나타낸다. F(ab')₂ 항체 단편은 본래 가운데에 힌지 시스테인을 갖는 Fab' 단편의 쌍으로 생성된다. 항체 단편의 다른 화학적 커플링이 또한 공지되어 있다.

[0268] Fc 단편은 디설피드에 의해 함께 결합되어 있는 H 쇠 둘 다의 카르복시-말단 부분을 포함한다. 항체의 이펙터 기능은 Fc 영역의 서열에 의해 결정되는데, 이 영역은 또한 특정 유형의 세포에서 발견되는 Fc 수용체 (FcR)에 의해 인식되는 부분이기도 하다.

[0269] "Fv"는 완전한 항원-인식 및 항원 결합 부위를 함유하는 최소 항체 단편이다. 이 단편은 1개의 중쇄 가변 영역 도메인 및 1개의 경쇄 가변 영역 도메인이 단단하게 비-공유적으로 회합된 이량체로 이루어진다. 이들 2개 도메인이 폴딩되어 6개의 초가변 루프 (H 쇠 및 L 쇠로부터 각각 3개의 루프)가 형성되는데, 상기 루프는 항원 결합을 위한 아미노산 잔기를 제공하고 항체에 항원 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 단일 가변 도메인 (또는 항원에 특이적인 3개의 CDR만을 포함하는 Fv의 절반)일지라도 전체 결합 부위보다 친화도가 낮은 하지만 항원을 인식하고 결합하는 능력을 갖는다.

[0270] "단일쇄 Fv" (또한 약어로 "sFv" 또는 "scFv"라고 함)는 단일 폴리펩티드 쇠로 연결된 VH 및 VL 항체 도메인을 포함하는 항체 단편이다. 바람직하게는, sFv 폴리펩티드는 sFv가 항원 결합을 위한 원하는 구조를 형성할 수 있도록 하는, VH 및 VL 도메인 사이의 폴리펩티드 링커를 더 포함한다. sFv를 검토하기 위해서는 문헌 [Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)]; [Borrebaeck 1995, 하기 문헌]을 참조한다.

[0271] 용어 "디아바디"는 VH 도메인 및 VL 도메인 사이의 짧은 링커 (약 5 내지 10개 잔기)로 sFv 단편 (이전 단락 참조)을 구축함으로써 V 도메인의 쇠내 쌍 형성이 아닌 쇠간 쌍 형성을 달성하여 2가 단편, 즉, 2개의 항원-결합 부위를 갖는 단편을 생성하여 제조된 작은 항체 단편을 나타낸다. 이중특이적 디아바디는 2개 항체의 VH 도메인 및 VL 도메인이 상이한 폴리펩티드 쇠에 존재하는 2개의 "교차" sFv 단편의 이중이량체이다. 디아바디는 예를 들어 EP 404,097; WO 93/11161; 및 문헌 [Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0272] 비인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 "인간화" 형태는 비인간 항체로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우, 인간화 항체는 수용자의 초가변 영역의 잔기가 원하는 항체 특이성, 친화도 및 능력을 보유하는 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류와 같은 비인간 종 (공여자 항체)의 초가변 영역의 잔기로 교체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 프레임워크 영역 (FR) 잔기가 상응하는 비인간 잔기로 교체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체에서 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능이 추가로 개선되게 한다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 하나, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비인간 이뮤노글로불린의 초가변 루프에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR은 인간 이뮤노글로불린 서열의 FR이다. 임의로, 인간화 항체는 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 전

형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 것을 또한 포함할 것이다. 보다 상세한 내용은 문헌 [Jones et al., Nature 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)]을 참조한다.

[0273] "중-의존성 항체", 예를 들어 포유동물 항-인간 IgE 항체는 제1 포유동물 종으로부터의 항원에 대한 결합 친화도가 제2 포유동물 종으로부터의 항원의 상동체에 대한 결합 친화도보다 더 강력한 항체이다. 통상적으로, 중-의존성 항체는 인간 항원에 "특이적으로 결합" (즉, 결합 친화도 (Kd) 값이 약 1×10^{-7} M 이하, 바람직하게는 약 1×10^{-8} M 이하, 가장 바람직하게는 약 1×10^{-9} M 이하임)하지만, 제2의 비인간 포유동물 종으로부터의 항원의 상동체에 대한 결합 친화도는 인간 항원에 대한 결합 친화도보다 적어도 약 50배 또는 적어도 약 500배 또는 약 적어도 1000배 더 약하다. 중-의존성 항체는 상기 정의된 바와 같은 임의의 다양한 유형의 항체일 수 있으나, 바람직하게는 인간화 또는 인간 항체이다.

[0274] 용어 "카바트에서와 같은 가변 도메인 잔기 넘버링" 또는 "카바트에서와 같은 아미노산 위치 넘버링", 및 그의 변형은 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]에서의 항체의 편집의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용된 넘버링 시스템을 나타낸다. 이러한 넘버링 시스템을 사용하여, 실제적인 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축, 또는 그 내로의 삽입에 상응하여 아미노산이 더 적을 수 있거나, 또는 추가의 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은 H2의 잔기 52 다음에 단일 아미노산 삽입물 (카바트에 따라 잔기 52a), 및 중쇄 FR 잔기 82 다음에 삽입된 잔기 (예를 들어, 카바트에 따라 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 카바트 넘버링은 주어진 항체에 대해, 항체 서열을 "표준" 카바트 넘버링된 서열과 상동성 영역에서 정렬하여 결정할 수 있다.

[0275] 본원에 사용된 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"이란 당업자가 두 수치 간의 차이가 상기 값 (예를 들어, Kd 값)에 의해 측정된 생물학적 특성 맥락 내에서 생물학적 및/또는 통계적 유의성이 거의 또는 전혀 없다고 간주할 수 있을 정도로 두 수치 (일반적으로, 하나는 본 발명의 항체와 연관된 것이고, 다른 하나는 참조/비교 항체와 연관된 것임) 간의 충분한 고도의 유사성을 의미한다. 상기 2개의 값 사이의 차이는 참조/비교 항체에 대한 값의 함수로서 바람직하게는 약 50% 미만, 바람직하게는 약 40% 미만, 바람직하게는 약 30% 미만, 바람직하게는 약 20% 미만, 바람직하게는 약 10% 미만이다.

[0276] "결합 친화도"는 일반적으로, 분자 (예를 들어, 항체)의 단일 결합 부위와 그의 결합 파트너 (예를 들어, 항원) 사이의 비-공유결합적 상호작용의 전체 강도를 나타낸다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 사용된 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 내인성 결합 친화도를 의미한다. 파트너 Y에 대한 분자 X의 친화도는 일반적으로 해리 상수 (Kd)로 표시될 수 있다. 친화도는 본원에 기재된 방법을 포함하는 당업계에 공지된 통상적인 방법으로 측정할 수 있다. 저친화도 항체는 일반적으로 항원과 서서히 결합하고 쉽게 해리되는 경향이 있는 반면, 고친화도 항체는 일반적으로 항원과 보다 신속하게 결합하고 보다 오랫동안 결합된 상태를 유지하는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 당업계에 공지되어 있고, 본 발명의 목적상, 이들 중 임의의 방법이 사용될 수 있다. 특정 예시적 실시양태를 아래에 기재한다.

[0277] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 "Kd" 또는 "Kd 값"은 비표지된 항원의 연속 적정물의 존재하에 (125 I)-표지된 항원의 최소 농도로 Fab를 평형화시킨 후에 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 항원에 대한 Fab의 용액 결합 친화도를 측정하는 하기 검정에서 기재되는 바와 같이 (문헌 [Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881]), 관심있는 항체의 Fab 버전 및 그의 항원을 사용하여 수행된 방사성 표지된 항원 결합 검정 (RIA)에 의해 측정된다. 이러한 검정에 대한 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터 플레이트 (다이넥스(Dynex))를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 $5 \mu\text{g/ml}$ 의 포획성 항-Fab 항체 (카펠 랩스(Cappel Labs))로 밤새 코팅한 후, 실온 (대략 23°C)에서 2 내지 5시간 동안 PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 차단한다. 비흡착 플레이트 (눈크(Nunc) #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [125 I]-항원을 관심있는 대상 Fab의 연속 희석액과 혼합한다 (예를 들어, 문헌 [Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599]의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 관심있는 대상 Fab를 밤새 인큐베이션하였으나, 평형이 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 그 후, 혼합물을 실온에서의 인큐베이션 (예를 들어, 1시간 동안)을 위해 포획 플레이트로 보유한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 트윈-20으로 8회 세척하였다. 플레이트를 건조시킬 때, $150 \mu\text{l}$ /웰의 섬광제 (마이크로신트-20; 팩카드)를 첨가하고, 플레이트를 탐카운트 감마 계수기 (팩카드) 상에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각각의 Fab의 농도를 선택하여 경쟁 결합 검정에 사용한다. 또 다른 실시양태

에 따르면, K_d 또는 K_d 값은 약 10의 반응 단위 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25℃에서 비아코어™-2000 또는 비아코어™-3000 (비아코어, 인크., 뉴저지주 피스카타웨이)을 사용하는 표면 플라즈몬 공명 검정을 사용함으로써 측정한다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드록로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)으로 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (약 0.2 μM)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 μl /분의 유량으로 주입한다. 항원 주입 후, 반응하지 않은 기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 역학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 μl /분의 유량으로 25℃에서 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS (PBST) 중에서 주입한다. 회합 속도 (kon) 및 해리 속도 (koff)는 회합 및 해리 센서그램을 동시 피팅함으로써 단순 일-대-일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)는 koff/kon의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881]을 참조한다. 온-레이트 (on-rate)가 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 106 M⁻¹ s⁻¹을 초과하면, 온-레이트는 분광계, 예컨대 정지 유동 설치 분광분석기 (아비브 인스트루먼트 (Aviv Instruments)) 또는 적색 교반 큐벳이 구비된 8000-시리즈 SLM-아민코(Aminco) 분광광도계 (써모스펙트로닉 (ThermoSpectronic))에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에, PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25℃에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 밴드 통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하여 결정할 수 있다.

[0278]

또한, 본 발명에 따른 "온-레이트", "회합의 속도" 또는 "회합률" 또는 "kon"은 25℃에서 비아코어™-2000 또는 비아코어™-3000 (비아코어, 인크., 뉴저지주 피스카타웨이) 및 고정된 항원 CM5 칩 (약 10 반응 단위 (RU))을 사용하여 상기 기재된 동일한 표면 플라즈몬 공명 기술에 의해 측정할 수 있다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드록로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)으로 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (약 0.2 μM)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 μl /분의 유량으로 주입한다. 항원 주입 후에, 미반응기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 역학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 μl /분의 유량으로 25℃에서 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS (PBST) 중에서 주입한다. 회합 속도 (kon) 및 해리 속도 (koff)는 회합 및 해리 센서그램을 동시 피팅함으로써 단순 일-대-일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (K_d)는 koff/kon 비로 계산하였다. 예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881]을 참조한다. 그러나, 온-레이트가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 106 M⁻¹ s⁻¹을 초과하면, 온-레이트는 바람직하게는 분광계, 예컨대 정지 유동 설치 분광광도계 (아비브 인스트루먼트) 또는 교반 큐벳이 구비된 8000-시리즈 SLM-아민코 분광광도계 (써모스펙트로닉)에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에, PBS (pH 7.2) 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25℃에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 밴드 통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하여 결정할 수 있다. 본 발명에 따른 " K_d " 또는 " K_d 값"은 한 실시양태에서 표지되지 않은 항원의 적정 시리즈의 존재하에 (125I)-표지된 항원의 최소 농도로 Fab를 평형화시킨 후, 항-Fab 항체-코팅된 플레이트를 사용하여 결합된 항원을 포획함으로써 항원에 대한 Fab의 용액결합 친화도를 측정하는 하기 검정에서 기재되는 바와 같이, 항체의 Fab 버전 및 항원 분자를 사용하여 수행된 방사성 표지된 항원 결합 검정 (RIA)에 의해 측정된다 (문헌 [Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881]). 이러한 검정에 대한 조건을 확립하기 위해, 마이크로타이터 플레이트 (다이넥스)를 50 mM 탄산나트륨 (pH 9.6) 중의 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 포획성 항-Fab 항체 (카펠 랩스)로 밤새 코팅한 후, 실온 (대략 23℃)에서 2 내지 5시간 동안 PBS 중의 2% (w/v) 소 혈청 알부민으로 차단한다. 비흡착 플레이트 (넉 #269620)에서, 100 pM 또는 26 pM [125I]-항원을 관심있는 Fab의 연속 희석물과 혼합한다 (문헌 [Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599])의 항-VEGF 항체, Fab-12의 평가와 일치함). 이어서, 관심있는 Fab를 밤새 인큐베이션하였으나, 평형이 도달하는 것을 확실하게 하기 위해 더 오랜 시간 (예를 들어, 65시간) 동안 계속 인큐베이션할 수 있다. 그 후, 혼합물을 포획 플레이트로 옮겨서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 이어서, 용액을 제거하고, 플레이트를 PBS 중의 0.1% 트윈-20으로 8회 세척하였다. 플레이트를 건조시킬 때, 150 μl /웰의 섬광제 (마이크로싯-20; 팩카드)를 첨가하고, 플레이트를 탐카운트 감마 계수기 (팩카드) 상에서 10분 동안 계수한다. 최대 결합의 20% 이하를 제공하는 각 Fab의 농도를 선택하여 경쟁 결합 검정에 사용한다. 다른 실시양태에 따르면, K_d 또는 K_d 값은 약 10의 반응 단위 (RU)로 고정된 항원 CM5 칩을 사용하여 25℃에서 비아코어™-2000 또는 비아코어™-3000 (비아코어, 인크., 뉴저지주 피스카타웨이)를 사용하는 표면 플라즈몬 공명 분석을 사용함으로써 측정한다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5,

비아코어 인크.)을 공급업체의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)으로 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (약 0.2 μM)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 μl /분의 유량으로 주입한다. 항원 주입 후, 반응하지 않은 기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 역학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 μl /분의 유량으로 25°C에서 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS (PBST) 중에서 주입한다. 회합 속도 (kon) 및 해리 속도 (koff)는 회합 및 해리 센서그램을 동시 피팅함으로써 단순 일-대-일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 koff/kon의 비로 계산한다. 예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881]을 참조한다. 온-레이트 (on-rate)가 상기 표면 플라즈몬 공명 분석에 의해 106 M⁻¹ s⁻¹을 초과하면, 온-레이트는 분광계, 예컨대 정지 유동 설치 분광분석기 (아비브 인스트루먼트즈 (Aviv Instruments)) 또는 적색 교반 큐벳이 구비된 8000-시리즈 SLM-아민코(Aminco) 분광광도계 (써모스펙트로닉 (ThermoSpectronic))에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에, PBS (pH 7.2) 중 20 nM 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 밴드 통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하여 결정할 수 있다.

[0279] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 "온-레이트", "회합의 속도" 또는 "회합률" 또는 "kon"은 25°C에서 비아코어TM-2000 또는 비아코어TM-3000 (비아코어, 인크., 뉴 저지주 피스카타웨이) 및 고정된 항원 CM5 칩 (약 10 반응 단위 (RU))을 사용하여 상기 동일한 표면 플라즈몬 공명 기술에 의해 결정된다. 간략하게, 카르복시메틸화 텍스트란 바이오센서 칩 (CM5, 비아코어 인크.)을 공급업체의 지시에 따라 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드 히드로클로라이드 (EDC) 및 N-히드록시숙신이미드 (NHS)로 활성화시킨다. 항원을 10 mM 아세트산나트륨 (pH 4.8)으로 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (약 0.2 μM)로 희석한 후, 커플링된 단백질의 대략 10 반응 단위 (RU)를 달성하도록 5 μl /분의 유량으로 주입한다. 항원 주입 후에, 미반응기를 차단하기 위해 1 M 에탄올아민을 주입한다. 역학 측정을 위해, Fab의 2배 연속 희석액 (0.78 nM 내지 500 nM)을 대략 25 μl /분의 유량으로 25°C에서 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS (PBST) 중에서 주입한다. 회합 속도 (kon) 및 해리 속도 (koff)는 회합 및 해리 센서그램을 동시 피팅함으로써 단순 일-대-일 랭뮤어 결합 모델 (비아코어 평가 소프트웨어 버전 3.2)을 사용하여 계산한다. 평형 해리 상수 (Kd)는 koff/kon 비로 계산하였다. 예를 들어, 문헌 [Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881]을 참조한다. 그러나, 온-레이트가 상기 표면 플라즈몬 공명 검정에 의해 106 M⁻¹ s⁻¹을 초과하면, 온-레이트는 바람직하게는 분광계, 예컨대 정지 유동 설치 분광광도계 (아비브 인스트루먼트즈) 또는 교반 큐벳이 구비된 8000-시리즈 SLM-아민코 분광광도계 (써모스펙트로닉)에서 측정할 때 증가하는 농도의 항원의 존재 하에, PBS (pH 7.2) 중 20 nM의 항-항원 항체 (Fab 형태)의 25°C에서의 형광 방출 강도 (여기 = 295 nm; 방출 = 340 nm, 16 nm 밴드 통과)의 증가 또는 감소를 측정하는 형광 켄칭 기술을 사용하여 결정할 수 있다.

[0280] 본원에 사용된 어구 "실질적으로 저하된" 또는 "실질적으로 상이한"은 당업자가 두 수치 간의 차이가 상기 값 (예를 들어, Kd 값, HAMA 반응)에 의해 측정된 생물학적 특성 맥락 내에서 통계적 유의성이 있다고 간주할 수 있을 정도로 두 수치 (일반적으로, 하나는 본 발명의 항체와 연관된 것이고, 다른 하나는 참조/비교 항체와 연관된 것임) 간의 충분한 고도의 상이성을 의미한다. 상기 두 수치 간의 차이는 참조/비교 항체에 대한 값의 함수로서 바람직하게 약 10% 초과, 바람직하게 약 20% 초과, 바람직하게 약 30% 초과, 바람직하게 약 40% 초과, 바람직하게 약 50% 초과이다.

[0281] "항원"은 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 미리 정해진 항원이다. 표적 항원은 폴리펩티드, 탄수화물, 핵산, 지질, 합텐 또는 다른 자연 발생 또는 합성 화합물일 수 있다. 바람직하게는, 표적 항원은 폴리펩티드이다. 본원에서의 목적을 위한 "수용자 인간 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 프레임워크로부터, 또는 인간 컨센서스 프레임워크로부터 유래된 VL 또는 VH 프레임워크의 아미노산 서열을 포함하는 프레임워크이다. 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 또는 인간 컨센서스 프레임워크"로부터 유래된" 수용자 인간 프레임워크는 그의 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있거나, 또는 기존의 아미노산 서열 변화를 함유할 수 있다. 기존의 아미노산 변화가 존재하는 경우에는, 바람직하게 5개 이하, 바람직하게 4개 이하, 또는 3개 이하의 기존의 아미노산 변화가 존재한다. 기존의 아미노산 변화가 VH에 존재하는 경우, 바람직하게는 이들 변화가 위치 71H, 73H 및 78H 중의 단지 3개, 2개 또는 1개에서만 일어나는 경우, 예를 들어 이들 위치에서의 아미노산 잔기는 71A, 73T 및/또는 78A 일 수 있다. 한 실시양태에서, VL 수용자 인간 프레임워크는 VL 인간 이뮤노글로불린 프레임워크 서열 또는 인간 컨센서스 프레임워크 서열과 서열 측면에서 동일하다.

[0282] 본 발명의 항체는 제2 항체에 의해 결합된 것과 동일한 에피토프에 대한 결합에 대해 경쟁할 수 있다. 모노클

로날 항체는 각각 표준 시험관내 항체 경쟁 결합 분석에서 동일한 항체 농도에서 다른 것의 결합을 40% 이상 차단한다면 "동일한 에피토프"를 공유하는 것으로 여겨진다.

- [0283] "인간 컨센서스 프레임워크"는 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 프레임워크 서열의 선택시 가장 흔히 발생하는 아미노산 잔기를 나타내는 프레임워크이다. 일반적으로, 인간 이뮤노글로불린 VL 또는 VH 서열의 선택은 가변 도메인 서열의 하위군으로부터 행한다. 일반적으로, 서열의 하위군은 문헌 [Kabat et al.]에서와 같은 하위군이다. 한 실시양태에서, VL의 경우 하위군은 문헌 [Kabat et al.]에서와 같은 하위군 카파 I이다. 한 실시양태에서, VH의 경우 하위군은 문헌 [Kabat et al.]에서와 같은 하위군 III이다.
- [0284] "VH 하위군 III 컨센서스 프레임워크"는 카바트 등의 가변 중쇄 하위군 III 내의 아미노산 서열로부터 수득한 컨센서스 서열을 포함한다.
- [0285] "VL 하위군 I 컨센서스 프레임워크"는 카바트 등의 가변 경쇄 카파 하위군 I 내의 아미노산 서열로부터 수득한 컨센서스 서열을 포함한다.
- [0286] "변형되지 않은 인간 프레임워크"는 수용자 인간 프레임워크와 동일한 아미노산 서열을 갖는, 예를 들어 수용자 인간 프레임워크에서 인간 대 비인간 아미노산 치환(들)이 결여된 인간 프레임워크이다.
- [0287] 본원에서의 목적상 "변경된 초가변 영역"은 내부에 1개 이상 (예를 들어, 1 내지 약 16개) 아미노산 치환(들)을 포함하는 초가변 영역이다.
- [0288] 본원에서의 목적상 "변형되지 않은 초가변 영역"은 이것이 유래된 비인간 항체와 동일한 아미노산 서열, 즉 내부에 1개 이상의 아미노산 치환이 결여된 아미노산 서열을 갖는 초가변 영역이다.
- [0289] 용어 "초가변 영역", "HVR", "HV" 또는 "CDR"은, 본원에서 사용되는 경우, 서열이 초가변성이고/이거나 구조적으로 규정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 나타낸다. 일반적으로, 항체는 6개의 초가변 영역을 포함하는데; VH에 3개가 있고 (H1, H2, H3), VL에 3개가 있다 (L1, L2, L3). 다수의 초가변 영역 묘사가 사용되고 있고 본원에 포함된다. 카바트 상보성 결정 영역 (CDR)은 서열 가변성을 기초로 하며, 가장 흔히 사용된다 (문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)]). 대신, 코티아(Chothia)는 구조적 루프의 위치를 나타낸다 (문헌 [Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)]). "접촉" 초가변 영역은 이용 가능한 복합체 결정 구조의 분석에 기초한 것이다. 각각의 이들 초가변 영역의 잔기를 아래에 나타낸다. 달리 나타내지 않는 한, 카바트 넘버링이 사용될 것이다. 초가변 영역 위치는 일반적으로 다음과 같다: 아미노산 24-34 (HVR-L1), 아미노산 49-56 (HVR-L2), 아미노산 89-97 (HVR-L3), 아미노산 26-35A (HVR-H1), 아미노산 49-65 (HVR-H2), 및 아미노산 93-102 (HVR-H3).
- [0290] 초가변 영역은 하기 "연장된 초가변 영역"을 포함할 수 있다: VL 내의 아미노산 24-36 (L1), 및 46-56 (L2). 가변 도메인 잔기는 각각의 상기 정의에 대해 문헌 [Kabat et al., 상기 문헌]에 따라 넘버링된다.
- [0291] "프레임워크" 또는 "FR" 잔기는 본원에 정의된 바와 같은 초가변 영역 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.
- [0292] "인간 항체"는 인간에 의해 생성된 항체의 것에 상응하는 아미노산 서열을 보유하고/하거나 본원에 개시된 바와 같은 인간 항체의 제조 기술 중 임의의 것을 이용하여 제조된 것이다. 인간 항체의 이러한 정의에서 비인간 항원 결합 잔기를 포함하는 인간화 항체는 명확하게 제외된다.
- [0293] "친화도 성숙된" 항체는 변경(들)을 나타내지 않는 모 항체에 비해 항원에 대한 항체의 친화도를 개선시켜 주는, 그의 하나 이상의 CDR 내에서의 한 가지 이상의 변경을 수반한 항체이다. 바람직한 친화도 성숙 항체는 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어는 피코몰의 친화도를 가질 것이다. 친화도 성숙 항체는 당업계에서 공지된 절차에 의해 생성된다. 문헌 [Marks et al. Bio/Technology 10:779-783 (1992)]에서는 VH 및 VL 도메인 서플링에 의한 친화도 성숙을 기재하고 있다. CDR 및/또는 프레임워크 잔기의 무작위 돌연변이유발이 다음 문헌에 기재되어 있다 (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)]).
- [0294] "차단" 항체 또는 "길항제" 항체는 그가 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제하거나 감소시키는 항체이다. 바람직한 차단 항체 또는 길항제 항체는 항원의 생물학적 활성을 실질적으로 또는 완전히 억제한다.
- [0295] "TAT 결합 올리고펩티드"는 바람직하게는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드에 결합, 바람직하게는 특이

적으로 결합하는 올리고펩티드이다. TAT 결합 올리고펩티드는 공지된 올리고펩티드 합성 방법을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있거나, 또는 재조합 기술을 사용하여 제조 및 정제될 수 있다. TAT 결합 올리고펩티드는 통상적으로는 적어도 약 5개 아미노산 길이, 대안적으로는 적어도 약 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100개 또는 그 초과 아미노산 길이이고, 이러한 올리고펩티드는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드에 결합, 바람직하게는 특이적으로 결합할 수 있다. TAT 결합 올리고펩티드는 주지된 기술을 이용하여 과도한 실험없이 확인할 수 있다. 이와 관련하여, 폴리펩티드 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고펩티드에 대해 올리고펩티드 라이브러리를 스크리닝하는 기술이 당업계에 공지되어 있음에 주목한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; PCT 공보 번호 WO 84/03506 및 WO84/03564; 문헌 [Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984)]; [Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)]; [Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)]; [Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)]; [Schoofs et al., J Immunol., 140:611-616 (1988)], [Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378]; [Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832]; [Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352 624]; [Marks, J. D. et al. (1991), J Mol Biol., 222:581]; [Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363] 및 [Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668] 참조).

[0296] "TAT 결합 유기 분자"는 바람직하게는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드에 특이적으로 결합하는, 본원에 정의된 올리고펩티드 또는 항체 이외의 유기 분자이다. TAT 결합 유기 분자는 공지된 방법을 이용하여 확인되고 화학적으로 합성될 수 있다 (예를 들어, PCT 공보 번호 W000/00823 및 W000/39585 참조). TAT 결합 유기 분자는 일반적으로 약 2000 달톤 미만의 크기, 대안적으로는 약 1500, 750, 500, 250 또는 200 달톤 미만의 크기이고, 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드에 결합, 바람직하게는 특이적으로 결합할 수 있는 이러한 유기 분자는 공지의 기술을 이용하여 과도한 실험 없이 확인할 수 있다. 이와 관련하여, 폴리펩티드 표적에 결합할 수 있는 분자에 대해 유기 분자 라이브러리를 스크리닝하는 기술이 당업계에 주지되어 있는 것임에 주목한다 (예를 들어, PCT 공보 번호 W000/00823 및 W000/39585 참조).

[0297] 관심있는 항원, 예를 들어 종양-관련 폴리펩티드 항원 표적에 "결합"하는 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자는 상기 항원에 충분한 친화도로 결합하여, 상기 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자가 상기 항원을 발현하는 세포 또는 조직의 표적화에 있어서 진단제 및/또는 치료제로서 유용하고 다른 단백질과 유의하게 교차반응하지 않는 것이다. 이러한 실시양태에서, 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자와 "비-표적" 단백질과의 결합 정도는 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 분석법 또는 방사성면역침전법 (RIA)으로 측정할 때 상기 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자와 그의 특정 표적 단백질과의 결합의 약 10% 미만일 것이다. 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자와 표적 분자와의 결합과 관련하여, 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 표적에서의 에피토프에 대한 용어 "특이적 결합," "~에 특이적으로 결합하는" 또는 "~에 특이적인"은 비-특이적 상호작용과는 측정가능하게 상이한 결합을 의미한다. 특이적 결합은, 예를 들어 분자의 결합을 일반적으로 결합 활성을 보유하지 않는 유사한 구조의 분자인 대조군 분자의 결합과 비교하여 결정함으로써 측정할 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합은 표적과 유사한 대조군 분자, 예를 들어 과량의 비표지 표적과의 경쟁에 의해 측정할 수 있다. 이 경우, 프로브에 대한 표지된 표적의 결합이 과량의 비표지 표적에 의해 경쟁적으로 억제된다면 특이적 결합이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 표적에서의 에피토프에 대한 용어 "특이적 결합," "~에 특이적으로 결합하는" 또는 "~에 특이적인"은 예를 들어 표적에 대한 Kd가 적어도 약 10^{-4} M, 대안적으로 적어도 약 10^{-5} M, 대안적으로 적어도 약 10^{-6} M, 대안적으로 적어도 약 10^{-7} M, 대안적으로 적어도 약 10^{-8} M, 대안적으로 적어도 약 10^{-9} M, 대안적으로 적어도 약 10^{-10} M, 대안적으로 적어도 약 10^{-11} M, 대안적으로 적어도 약 10^{-12} M, 또는 그 초과 분자에 의해 나타낼 수 있다. 한 실시양태에서, 용어 "특이적 결합"은 분자가 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프에 대해 실질적으로 결합하지 않으면서 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드에서의 에피토프에 결합하는 결합을 의미한다.

[0298] "TAT 폴리펩티드를 발현하는 종양 세포의 성장을 억제하는" 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자 또는 "성장 억제" 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자는 적절한 TAT 폴리펩티드를 발현하거나 과발현하는 암 세

포의 측정가능한 성장 억제를 유발하는 것이다. TAT 폴리펩티드는 암 세포의 표면 상에 발현된 막형단 폴리펩티드일 수 있거나 또는 암 세포에 의해 생성되어 분비된 폴리펩티드일 수 있다. 바람직한 성장 억제 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 적절한 대조군에 비해 TAT-발현 종양 세포의 성장을 20% 초과, 바람직하게는 약 20% 내지 약 50%, 훨씬 더 바람직하게는 50% 초과 (예를 들어, 약 50% 내지 약 100%)로 억제하며, 여기서의 대조군은 전형적으로 시험될 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자로 처리되지 않은 종양 세포이다. 한 실시양태에서, 성장 억제는 세포 배양물 중에서 약 0.1 내지 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 약 0.5 nM 내지 200 nM의 항체 농도에서 측정할 수 있는데, 여기서 성장 억제는 종양 세포를 항체에 노출시키고 1일 내지 10일 후에 결정한다. 생체 내에서의 종양 세포의 성장 억제를 하기 실험 실시예 부분에 기재된 바와 같이 다양한 방식으로 결정할 수 있다. 약 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 내지 약 100 mg/kg 체중의 항-TAT 항체 투여가 항체의 1차 투여로부터 약 5일 내지 3개월 이내, 바람직하게는 약 5 내지 30일 이내에 종양 크기의 감소 또는 종양 세포 증식의 감소를 유발하는 경우, 항체는 생체내 성장 억제 효과를 갖는다.

[0299] "아포토시스를 유도하는" 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자는 아넥신 V의 결합, DNA의 단편화, 세포 수축, 소포체의 팽창, 세포 단편화 및/또는 막 소포 (아포토시스체로 불림)의 형성으로 측정되는 바와 같이 계획된 세포 사멸을 유도하는 것이다. 세포는 통상적으로 TAT 폴리펩티드를 과다발현하는 것이다. 바람직하게는, 세포는 종양 세포, 예를 들어, 전립선, 유방, 난소, 위, 자궁내막, 폐, 신장, 결장, 방광 세포이다. 다양한 방법을 이용하여 아포토시스와 연관된 세포 반응을 평가할 수 있다. 예를 들어, 포스파티딜 세린 (PS) 전위는 아넥신 결합에 의해 측정할 수 있고, DNA 단편화는 DNA 래더링을 통해 평가할 수 있으며, DNA 단편화와 함께 일어나는 핵/염색질 응집은 하이포디플로이드 세포의 임의의 증가에 의해서 확인할 수 있다. 바람직하게는, 아포토시스를 유도하는 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자는 아넥신 결합 분석에서 처리되지 않은 세포에 비해 아넥신 결합을 약 2 내지 50배, 바람직하게는 약 5 내지 50배, 가장 바람직하게는 약 10 내지 50배만큼 유도하는 것이다.

[0300] 항체 "이펙터 기능"은 항체의 Fc 영역 (천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인하는 생물학적 활성을 지칭하고, 항체 이소형에 따라 달라진다. 항체 이펙터 기능의 예는 C1q 결합 및 보체 의존성 세포독성; Fc 수용체 결합; 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC); 식세포작용; 세포 표면 수용체 (예컨대, B 세포 수용체)의 하향 조절; 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0301] "항체-의존성 세포-매개 세포독성" 또는 "ADCC"는 특정 세포독성 세포 (예를 들어, 천연 킬러 (NK) 세포, 호중구 및 대식세포)에 존재하는 Fc 수용체 (FcR)에 결합된 분비 Ig가, 이들 세포독성 이펙터 세포가 항원-보유 표적 세포에 특이적으로 결합한 후에 상기 표적 세포를 세포독성으로 사멸시킬 수 있게 하는 세포독성 형태를 나타낸다. 항체는 세포독성 세포의 "아암"이고 이러한 사멸에 반드시 필요하다. ADCC를 매개하는 주요 세포인 NK 세포는 Fc γ RIII만을 발현하는 반면, 단핵구는 Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII를 발현한다. 조혈모세포상에서의 FcR 발현은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)]의 페이지 464, 표 3에 요약되어 있다. 관심있는 분자의 ADCC 활성을 평가하기 위하여, 미국 특허 번호 5,500,362 또는 5,821,337에 기재된 바와 같은 시험관내 ADCC 검정을 수행할 수 있다. 이러한 검정에 유용한 이펙터 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 관심있는 분자의 ADCC 활성은 생체내에서, 예를 들어 문헌 [Clynes et al. (USA) 95:652-656 (1998)]에 개시된 바와 같은 동물 모델에서 평가할 수 있다.

[0302] "Fc 수용체" 또는 "FcR"은 항체의 Fc 영역에 결합하는 수용체를 기재한다. 바람직한 FcR은 천연 서열 인간 FcR이다. 추가로, 바람직한 FcR은 IgG 항체와 결합하는 수용체 (감마 수용체)이고, Fc γ RI, Fc γ RRII 및 Fc γ RIII 서브클래스의 수용체를 포함하며, 이들은 이들 수용체의 대립유전자 변이체 및 선택적으로 스플라이싱된 형태를 포함한다. Fc γ RRII 수용체는 Fc γ RIIA ("활성화 수용체") 및 Fc γ RIIB ("억제 수용체")를 포함하고, 이들은 주로 세포질 도메인에서 상이한 유사한 아미노산 서열을 갖는다. 활성화 수용체 Fc γ RIIA는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재의 활성화 모티프 (ITAM)를 함유한다. 억제 수용체 Fc γ RIIB는 그의 세포질 도메인에 면역수용체 티로신-기재의 억제 모티프 (ITIM)를 함유한다. (문헌 [M. in Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)] 검토 참조). FcR은 문헌 [Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)]; [Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)]; 및 [de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)]에서 검토되어 있다. 추후로 확인될 것을 포함하여 다른 FcR이 본원의 용어 "FcR"에 포함된다. 이 용어는 모체 IgG를 태아에게 전달하는 것을 담당하는 신생아 수용체 FcRn을 또한 포함한다 (문헌 [Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976)] 및 [Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)]).

[0303] "인간 이펙터 세포"는 하나 이상의 FcR을 발현하고 이펙터 기능을 수행하는 백혈구이다. 바람직하게는, 세포는

적어도 Fc γ RIII를 발현하고, ADCC 이펙터 기능을 수행한다. ADCC를 매개하는 인간 백혈구의 예는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 자연 킬러 (NK) 세포, 단핵구, 세포독성 T 세포 및 호중구를 포함하고, PBMC 및 NK 세포가 바람직하다. 이펙터 세포는 천연 공급원, 예를 들어 혈액으로부터 분리될 수 있다.

[0304] "보체 의존성 세포독성" 또는 "CDC"는 보체 존재 하에의 표적 세포의 용해를 나타낸다. 고전적 보체 경로의 활성화는 동족 항원에 결합된 항체 (적절한 서브클래스의 항체)에 대한 보체 시스템 제1 성분 (C1q)의 결합으로 개시된다. 보체 활성화를 평가하기 위해, 예를 들어 문헌 [Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996)]에 기재된 바와 같은 CDC 검정을 수행할 수 있다.

[0305] 용어 "암" 및 "암성"은 조절되지 않는 세포 성장을 전형적인 특징으로 하는 포유동물에서의 생리적 상태를 지칭하거나 기재한다. 암의 예는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병 또는 림프양 악성종양이 포함되지만, 이들로 한정되는 것은 아니다. 이러한 암의 보다 특정한 예에는 편평세포암 (예를 들어, 상피 편평세포암), 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암 및 폐의 편평세포 암종을 포함하는 폐암, 복막암, 간세포암, 위장관암을 포함하는 위암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 요로암, 간종양, 유방암, 결장암, 직장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암 또는 신암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 항문 암종, 음경 암종, 흑색종, 다발성 골수종 및 B-세포 림프종, 뇌암, 뿐만 아니라 두경부암, 및 관련 전이를 포함한다.

[0306] 용어 "세포 증식성 장애" 및 "증식성 장애"는 어느 정도의 비정상적인 세포 증식과 관련된 장애를 나타낸다. 한 실시양태에서, 세포 증식성 장애는 암이다.

[0307] 본원에서 사용된 "종양"은 모든 신생물성 세포 성장 및 증식 (악성 또는 양성 여부와 상관 없음), 및 모든 전암성 및 암성 세포 및 조직을 나타낸다.

[0308] "세포 사멸을 유도하는" 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자는 살아있는 세포를 사멸시키는 것이다. 세포는 TAT 폴리펩티드를 발현하는 세포이며, 바람직하게는 동일한 조직 유형의 정상 세포에 비해 TAT 폴리펩티드를 과다발현하는 세포이다. TAT 폴리펩티드는 암 세포의 표면 상에 발현된 막횡단 폴리펩티드일 수 있거나 또는 암세포에 의해 생성되어 분비된 폴리펩티드일 수 있다. 바람직하게는, 세포는 암 세포, 예를 들어, 유방, 난소, 위, 자궁내막, 침샘, 폐, 신장, 결장, 갑상선, 췌장 또는 방광 세포이다. 시험관내 세포 사멸은 보체 및 면역 이펙터 세포의 부재하에 측정되어 항체-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 또는 보체-의존성 세포독성 (CDC)에 의해 유도되는 세포 사멸이 구별될 수 있다. 따라서, 세포 사멸 검정은 열-불활성화된 혈청 (즉, 보체의 부재 하)을 사용하고 면역 이펙터 세포의 부재하에 수행될 수 있다. 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자가 세포 사멸을 유도할 수 있는지 여부를 결정하기 위해서, 프로피디움 아이오다이드 (PI), 트립판 블루 (문헌 [Moore et al. Cytotechnology 17:1-11 (1995)] 참조) 또는 7AAD의 흡수에 의해 평가되는 막의 일체성 손실을 처리되지 않은 세포와 비교하여 평가할 수 있다. 바람직한 세포 사멸-유도 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자는 BT474 세포에서의 PI 흡수 검정시에 PI 흡수를 유도하는 것이다.

[0309] "TAT-발현 세포"는 세포 표면 에 또는 분비 형태로 내인성 또는 형질감염된 TAT 폴리펩티드를 발현하는 세포이다. "TAT-발현 암"은 세포 표면 상에 존재하는 TAT 폴리펩티드를 갖거나 또는 TAT 폴리펩티드를 생성하고 분비하는 세포를 포함하는 암이다. "TAT-발현 암"은 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자가 그에 대해 결합하여 암에 대해 치료 효과를 가질 수 있도록, 그의 세포 표면 상에 충분한 수준의 TAT 폴리펩티드를 임의로 생성한다. 다른 실시양태에서, "TAT-발현 암"은 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자 길항제가 그에 대해 결합하여 암에 대해 치료 효과를 가질 수 있도록, 임의로 충분한 수준의 TAT 폴리펩티드를 생성하고 분비한다. 후자와 관련하여, 길항제는 종양 세포에 의한 분비된 TAT 폴리펩티드의 생성 및 분비를 감소, 억제 또는 방지하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. TAT 폴리펩티드를 "과다발현하는" 암은 동일한 조직 종류의 비-암성 세포에 비해 그의 세포 표면에서 유의하게 더 높은 수준의 TAT 폴리펩티드를 갖거나, 생성하고 분비하는 것이다. 이러한 과다발현은 유전자 증폭에 의해 또는 증가된 전사 또는 번역에 의해 초래될 수 있다. TAT 폴리펩티드 과다발현은 세포 표면 상에 존재하거나 또는 세포에 의해 분비된 증가된 수준의 TAT 단백질을 평가함으로써 진단 또는 예측 검정으로 결정될 수 있다 (예를 들어, TAT 폴리펩티드를 코딩하는 분리된 핵산으로부터 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있는 분리된 TAT 폴리펩티드에 대해 제조된 항-TAT 항체를 사용한 면역조직화학 검정; FACS 분석 등을 통해). 대안적으로, 또는 추가로, 예를 들어 TAT-코딩 핵산 또는 그의 상보체에 상응하는 핵산 기반 프로브를 사용하는 형광 계내 혼성화 (FISH; 1998년 10월 공개된 W098/45479 참조), 서던 블롯팅, 노던 블롯팅, 또는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 기술, 예컨대 실시간 정량적 PCR (RT-PCR)을 통해 세포 내의 TAT 폴리펩티드-코딩 핵산 또는 mRNA의 수준을 측정할 수 있다. 또한, TAT 폴리펩티드

과다발현은 예를 들어 항체 기반 검정 (또한, 예를 들어 1990년 6월 12일에 허여된 미국 특허 번호 4,933,294; 1991년 4월 18일에 공개된 W091/05264; 1995년 3월 28일에 허여된 미국 특허 번호 5,401,638; 및 문헌 [Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)] 참조)을 사용하여 생물학적 유체, 예컨대 혈청 내의 발산된 항원을 측정하여 연구할 수 있다. 상기 검정 이외에도, 당업자라면 다양한 생체내 검정을 이용할 수 있다. 예를 들어, 환자의 신체 내 세포를 검출가능한 표지, 예를 들어 방사성 동위원소로 임의로 표지된 항체에 노출시킬 수 있고, 예를 들어 방사능에 대한 외부 스캐닝에 의하거나 항체에 이전에 노출된 환자로부터 얻은 생검을 분석함으로써 환자에서 세포에 대한 항체의 결합을 평가할 수 있다.

[0310] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "이뮤노어드헤신"은 이종 단백질 ("어드헤신")의 결합 특이성을 이뮤노글로불린 불변 도메인의 이펙터 기능과 조합한 항체-유사 분자를 의미한다. 구조적으로, 이뮤노어드헤신은 항체의 항원 인식 및 결합 부위가 아닌 (즉, "이중성") 원하는 결합 특이성을 갖는 아미노산 서열 및 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열의 융합체를 포함한다. 이뮤노어드헤신 분자의 어드헤신 부분은 전형적으로 수용체 또는 리간드의 적어도 결합 부위를 포함하는 인접한 아미노산 서열이다. 이뮤노어드헤신 내의 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열은 임의의 이뮤노글로불린, 예컨대 IgG-1, IgG-2, IgG-3 또는 IgG-4 하위유형, IgA (IgA-1 및 IgA-2 포함), IgE, IgD 또는 IgM으로부터 취득될 수 있다.

[0311] 본원에서 사용된 용어 "표지"는 "표지된" 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자가 생성되도록 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자에 직접적으로 또는 간접적으로 접합된 검출가능한 화합물 또는 조성물을 나타낸다. 표지는 그 자체로 검출가능할 수도 있고 (예를 들어, 방사성동위원소 표지 또는 형광 표지), 또는 효소 표지의 경우에는 기질 화합물 또는 조성물의 검출가능한 화학적 변형을 촉매할 수도 있다.

[0312] 본원에 사용된 용어 "세포독성제"는 세포의 기능을 억제 또는 방지하고/거나 세포의 파괴를 유발하는 물질을 나타낸다. 상기 용어는 방사성 동위원소 (예를 들어, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, 및 Lu의 방사성 동위원소), 화학요법제, 효소 및 그의 단편, 예컨대 뉴클레오티드분해 효소, 항생제, 및 독소, 예컨대 소분자 독소 또는 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소, 예컨대 그의 단편 및/또는 변이체, 및 하기 개시한 다양한 항-종양 또는 항암제를 포함한다. 다른 세포독성제는 하기 기재되어 있다. 종양사멸제는 종양 세포의 파괴를 야기한다.

[0313] "화학요법제"는 암 치료에 유용한 화학적 화합물이다. 화학요법제의 예는 알킬화제, 예컨대 티오테파 및 시톡산(CYTOXAN)[®] 시클로스포스파미드; 알킬 술포네이트, 예컨대 부술허, 임프로술허 및 피포술허; 아지리딘, 예컨대 벤조도파, 카르보쿠온, 메트우레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및 메틸아멜라민, 예를 들어 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포포아미드, 트리에틸렌티오포스포아미드 및 트리메틸올로멜라민; 아세토게닌 (특히, 블라타신 및 블라타시논); 델타-9-테트라히드로칸나비놀 (드로나비놀, 마리놀(MARINOL)[®]); 베타-라파곤; 라파롤; 콜치신; 베틀린산; 캄프토테신 (예를 들어, 합성 유사체 토포테칸 (히캄틴(HYCAMTIN)[®]), CPT-11 (이리노테칸, 캄프토사르(CAMPTOSAR)[®]), 아세틸캄프토테신, 스코폴렉틴 및 9-아미노캄프토테신); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (예를 들어, 그의 아도젤레신, 카르젤레신 및 비젤레신 합성 유사체); 포도필로톡신; 포도필린산; 테니포시드; 크립토피신 (특히, 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 둘라스타틴; 듀오카르마이신 (예를 들어, 합성 유사체인 KW-2189 및 CB1-TM1); 엘레우테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰지스타틴; 질소 머스타드, 예컨대 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥시드 히드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴 및 라니무스틴; 항생제, 예컨대 에비디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아미신, 특히 칼리케아미신 감마II 및 칼리케아미신 오메가 I1 (예를 들어, 문헌 [Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)] 참조); 다이네미신, 예를 들어 다이네미신 A; 에스페라미신; 뿐만 아니라 네오키노스타틴 발색단 및 관련 발색단백질 에네디인 항생 발색단, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카르미노마이신, 카르지노필린, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 아드리아마이신(ADRIAMYCIN)[®] 독소루비신 (예를 들어, 모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 테옥시독소루비신), 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예컨대 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사물, 예컨대 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예컨대 테노프테린, 메

토티렉세이트, 프테로프테린, 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예컨대 플루다라빈, 6-메르캅토피리딘, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예컨대 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카르모푸르, 시타라빈, 디테옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록스우리딘; 안드로겐, 예컨대 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항-아드레날, 예컨대 아미노글루테티미드, 미토탄, 트리로스탄; 엽산 보충제, 예컨대 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트랙세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르니틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질산갈륨; 히드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 2-에틸히드라지드; 프로카르바진; PSK[®] 폴리사카라이드 복합체 (제이에이치 에스 내추럴 프로덕츠(JHS Natural Products), 오레곤주 유진); 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테 누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센 (특히, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈테신 (엘디신(ELDISINE)[®], 필데신(FILDESIN)[®]); 다카르바진; 만노무스틴; 미토브로니 톨; 미토탄; 피프로로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 티오테파; 탁소이드, 예를 들어 탁솔(TAXOL)[®] 파클리탁셀 (브리스톨-마이어스 스킵 온콜로지(Bristol-Myers Squibb Oncology), 뉴저지주 프린스턴), 크레모포르-무함유 아브락산(ABRAXANE)[™], 파클리탁셀의 알부민-조작 나노입자 제제 (아메리칸 파마슈티칼 파트너즈 (American Pharmaceutical Partners), 일리노이주 샤움버그) 및 탁소테레(TAXOTERE)[®] 독세탁셀 (론-프랑 로리 (Rhone-Poulenc Rorer), 프랑스 안토니); 클로란부실; 겐시타빈 (겔자르(GEMZAR)[®]); 6-티오구아닌; 메르캅토피리딘; 메토티렉세이트; 백금 유사체, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴; 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)[®]); 백금; 에 토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴 (온코빈(ONCOVIN)[®]); 옥살리플라틴; 류코보빈; 비노 렐빈 (나벨빈(NAVELBINE)[®]); 노반트론; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 이반드로네이트; 토포이 소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예컨대 레티노산; 카페시타빈 (젤로다 (XELODA)[®]); 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체; 뿐만 아니라 상기 중 2가지 이상의 조 합물, 예컨대 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니솔론의 조합 요법에 대한 약어인 CHOP, 및 5-FU 및 류코보빈과 조합된 옥살리플라틴 (엘록사틴(ELOXATIN)[™])을 사용한 치료 처방에 대한 약어인 FOLFOX를 포 함한다.

[0314]

또한, 상기 정의에는 암의 성장을 촉진할 수 있는 호르몬의 효과를 조절하거나 감소시키거나 차단하거나 억제하 는 작용을 하고, 종종 전신 또는 신체-전반 치료의 형태인 항-호르몬제도 포함된다. 이들은 그 자체가 호르몬 일 수 있다. 이것의 예는, 항에스트로겐 및 선택적인 에스트로겐 수용체 조절제 (SERM), 예를 들어 타목시펜 (예를 들어, 놀바덱스(NOLVADEX)[®] 타목시펜), 에비스타(EVISTA)[®] 탈록시펜, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY117018, 오나프리스톤 및 파레스톤(FARESTON)[®] 토레미펜; 항프로게스테론; 에스트로겐 수용체 하향-조절제 (ERD); 난소를 저해하거나 또는 그의 기능을 정지시키는 기능을 하는 작용제, 예를 들어 항 체형성 호르몬-방출 호르몬 (LHRH) 효능제, 예컨대 루프론(LUPRON)[®] 및 엘리가드(ELIGARD)[®] 류프롤리드 아세테 이트, 고세렐린 아세테이트, 부세렐린 아세테이트 및 트리프테렐린; 다른 항-안드로겐, 예컨대 플루타미드, 닐 루타미드 및 비칼루타미드; 및 부신에서 에스트로겐 생성을 조절하는 효소 아로마타제를 억제하는 아로마타제 억제제, 예컨대 예를 들어 4(5)-이미다졸, 아미노글루테티미드, 메가세(MEGASE)[®] 메게스트롤 아세테이트, 아로 마신(AROMASIN)[®] 엑세메스탄, 포르메스타니, 파드로졸, 리비소르(RIVISOR)[®] 보로졸, 페마라(FEMARA)[®] 레트로졸 및 아리미덱스(ARIMIDEX)[®] 아나스트로졸을 포함한다. 또한, 화학요법제의 이러한 정의는 비스포스포네이트, 예 컨대 클로드로네이트 (예를 들어, 보네포스(BONEFOS)[®] 또는 오스탁(OSTAC)[®]), 디드로칼(DIDROCAL)[®] 에티드로네 이트, NE-58095, 조메타(ZOMETA)[®] 졸레드론산/졸레드로네이트, 포사막스(FOSAMAX)[®] 알렌드로네이트, 아레디아 (AREDIA)[®] 파미드로네이트, 스킨리드(SKELID)[®] 탈루드로네이트 또는 악토넬(ACTONEL)[®] 리세드로네이트; 뿐만 아니라 트록사시타빈 (1,3-디옥솔란 뉴클레오시드 시토신 유사체); 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 특히 이상 세 포 증식에 연루된 신호전달 경로의 중의 유전자의 발현을 억제하는 것, 예컨대 예를 들어 PKC-알파, Raf, H-Ras 및 표피 성장 인자 수용체 (EGF-R); 백신, 예컨대 테라토프(THERATOPE)[®] 백신 및 유전자 요법 백신, 예를 들어

알로벡틴(ALLOVECTIN)[®] 백신, 류벡틴(LEUVECTIN)[®] 백신 및 백신(VAXID)[®] 백신; 루르토테칸(LURTOTECAN)[®] 토 포이소머라제 1 억제제; 아바렐릭스(ABARELIX)[®] rmRH; 라파티닙 디토실레이트 (GW572016이라고도 공지되어 있는, ErbB-2 및 EGFR 이중 티로신 키나제 소분자 억제제); 및 상기 중 임의의 것의 제약상 허용되는 염, 산 또는 유도체를 포함한다.

[0315] 본원에서 사용될 때, "성장 억제제"는 시험관내에서 또는 생체내에서 세포, 특히 TAT-발현 암 세포의 성장을 억제하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 따라서, 성장 억제제는 S기에서 TAT-발현 세포의 백분율을 유의하게 감소시키는 것일 수 있다. 성장 억제제의 예는 세포 주기 진행을 (S기 이외의 다른 단계에) 차단하는 작용제, 예컨대 G1 정지 및 M기 정지를 유도하는 작용제를 포함한다. 통상적인 M기 차단제는 빈카 (빈크리스틴 및 빈블라스틴), 탁산 및 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 에피루비신, 다우노루비신, 에토포시드 및 블레오마이신을 포함한다. G1을 정지시키는 작용제, 예를 들어 DNA 알킬화제, 예컨대 타목시펜, 프레드니손, 다카르바진, 메클로레타민, 시스플라틴, 메토틱세이트, 5-플루오로우라실 및 ara-C는 S기 정지로부터 이어진다. 추가의 정보는 문헌 [The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995)] (특히, p. 13)에서 찾아볼 수 있다. 탁산 (파클리탁셀 및 도세탁셀)은 둘 다 주목 나무에서 유래된 항암 약물이다. 유럽형 주목 나무에서 유래된 도세탁셀 (탁소테레[®], 론-프랑 로러)은 파클리탁셀 (탁솔[®], 브리스톨-마이어스 스쿼)의 반합성 유사체이다. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 튜불린 이량체로부터의 미세소관 어셈블리를 촉진하고, 탈중합을 방지함으로써 미세소관을 안정화시켜서 세포에서의 유사분열 억제를 야기한다.

[0316] "독소루비신"은 안트라시클린 항생제이다. 독소루비신의 완전한 화학명은 (8S-시스)-10-[(3-아미노-2,3,6-트리데옥시- α -L-릭소-헥사피라노실)옥시]-7,8,9,10-테트라히드로-6,8,11-트리히드록시-8-(히드록시아세틸)-1-메톡시-5,12-나프타센디온이다.

[0317] 용어 "시토카인"은 세포간 매개자로서 또 다른 세포에 대해 작용하는, 한 세포 집단에 의해 방출되는 단백질에 대한 일반 용어이다. 이러한 시토카인의 예는 림포카인, 모노카인 및 통상적인 폴리펩티드 호르몬이다. 시토카인은 성장 호르몬, 예컨대 인간 성장 호르몬, N-메티오닐 인간 성장 호르몬, 및 소 성장 호르몬; 부갑상선 호르몬; 티록신; 인슐린; 프로인슐린; 렐락신; 프로렐락신; 당단백질 호르몬, 예컨대 여포 자극 호르몬 (FSH), 갑상선 자극 호르몬 (TSH) 및 황체형성 호르몬 (LH); 간 성장 인자; 섬유모세포 성장 인자; 프로락틴; 태반 락토젠; 종양 괴사 인자- α 및 - β ; 물리-억제 물질; 마우스 고나도트로핀-관련 펩티드; 인히빈; 액티빈; 혈관 내피 성장 인자; 인테그린; 트롬보포이에틴 (TPO); 신경 성장 인자, 예컨대 NGF- β ; 혈소관-성장 인자; 형질전환 성장 인자 (TGF), 예컨대 TGF- α 및 TGF- β ; 인슐린-유사 성장 인자-I 및 -II; 에리트로포이에틴 (EPO); 골유도 인자; 인터페론, 예컨대 인터페론- α , - β 및 - γ ; 및 콜로니 자극 인자 (CSF), 예컨대 대식세포-CSF (M-CSF); 과립구-대식세포-CSF (GM-CSF); 및 과립구-CSF (G-CSF); 인터류킨 (IL), 예컨대 IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; 종양 괴사 인자, 예컨대 TNF- α 또는 TNF- β (림포톡신); 및 다른 폴리펩티드 인자, 예를 들어 LIF 및 키트 리간드 (KL)가 포함된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 시토카인은 천연 공급원 또는 재조합 세포 배양물로부터의 단백질 및 천연 서열 시토카인의 생물학적 활성 증가물을 포함한다.

[0318] 용어 "포장 삽입물"은 일반적으로 치료 제조품의 시판되는 포장물 내에 통상적으로 포함되어 있으며 이러한 치료 제조품의 사용에 관한 적응증, 사용법, 용량, 투여, 금기사항 및/또는 경고에 대한 정보를 함유하는 지침서를 지칭하기 위해 사용된다.

[0319] II. 본 발명의 조성물 및 방법

[0320] A. 항-TAT 항체

[0321] 한 실시양태에서, 본 발명은 치료제 및/또는 진단제로서 본원에서 사용할 수 있는 항-TAT 항체를 제공한다. 예시적인 항체는 폴리클로날, 모노클로날, 인간화, 이중특이적 및 이중접합체 항체를 포함한다.

[0322] 1. 폴리클로날 항체

[0323] 폴리클로날 항체는 관련 항원 및 아주반트의 다중 피하 (sc) 또는 복강내 (ip) 주사에 의해 동물에서 바람직하게 생성된다. 면역화된 종에서 면역원성인 단백질에 관련 항원 (특히, 합성 펩티드가 사용되는 경우)을 접합시키는 것이 유용할 수 있다. 예를 들어, 이관능성 작용제 또는 유도체화제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙

신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통한), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOC12 또는 $R1N=C=NR$ (여기서, R 및 R1은 상이한 알킬기임)을 사용하여, 항원을 키홀 림펫 헤모시아닌 (KLH), 혈청 알부민, 소 티로글로불린 또는 대두 트립신 억제제에 접합시킬 수 있다.

[0324] 예를 들어 단백질 또는 접합체 100 μg 또는 5 μg (각각, 토끼 또는 마우스의 경우)을 3 부피의 프로인트 완전 아주반트와 합하고, 상기 용액을 여러 부위에 피내 주사함으로써, 동물을 항원, 면역원성 접합체 또는 유도체에 대해 면역화한다. 1개월 후, 프로인트 완전 아주반트에 포함된 펩티드 또는 접합체의 최초 양의 1/5 내지 1/10을 여러 부위에 피하 주사함으로써 상기 동물을 부스팅한다. 7 내지 14일 후에는 상기 동물에서 채혈하여 혈청의 항체 역가를 검정한다. 역가가 정체기에 도달할 때까지 동물을 부스팅시킨다. 접합체는 또한 제조할 세포 배양에서 단백질 융합체로서 제조될 수 있다. 또한, 명반과 같은 응집제를 적절하게 사용하여 면역 반응을 강화시킨다.

[0325] 2. 모노클로날 항체

[0326] 모노클로날 항체는 문헌 [Kohler et al., Nature, 256:495 (1975)]에 최초로 기재된 하이브리도마 방법을 이용하여 제조할 수도 있고, 또는 제조할 DNA 방법 (미국 특허 번호 4,816,567)으로 제조할 수도 있다.

[0327] 하이브리도마 방법에서는, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대 햄스터를 상기한 바와 같이 면역화시켜서, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합할 항체를 생성하거나 생성할 수 있는 림프구를 유발한다. 대안적으로, 림프구를 시험관내에서 면역화시킬 수 있다. 면역화 후, 림프구를 단리하고, 이후에 적합한 융합제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여 골수종 세포주와 융합시켜서 하이브리도마 세포를 형성시킨다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]).

[0328] 이로써 제조된 하이브리도마 세포를 융합되지 않은 모 골수종 세포 (또한, 융합 파트너라 지칭되기도 함)의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는 것이 바람직한 적합한 배양 배지에 시딩하여 성장시킨다. 예를 들어, 모 골수종 세포에 효소 하이포크산틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)가 없는 경우, 하이브리도마를 위한 선택적인 배양 배지는 전형적으로 HGPRT-결핍 세포의 성장을 저해하는 물질인 하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘을 포함할 것이다 (HAT 배지).

[0329] 바람직한 융합 파트너 골수종 세포는 효율적으로 융합되고, 선택된 항체-생성 세포에 의한 항체의 안정한 고수준 생성을 지지하는 세포이며, 융합되지 않은 모 세포에 대해 선택하는 선택 배지에 감수성이 있다. 바람직한 골수종 세포주는 무린 골수종 세포주, 예를 들어 솔크 인스티튜트 셀 디스트리뷰션 센터(Salk Institute Cell Distribution Center, 미국 캘리포니아주 샌디에고)로부터 입수가 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양, 및 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection, 미국 버지니아주 매나서스)으로부터 입수가 가능한 SP-2 및 유도체, 예를 들어 X63-Ag8-653 세포로부터 유래된 것이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주 역시 인간 모노클로날 항체 생성과 관련하여 기재되어 있다 (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)]).

[0330] 하이브리도마 세포가 성장되는 배양 배지를 항원에 대해 지시된 모노클로날 항체의 생성에 대해 검정한다. 바람직하게는, 하이브리도마 세포에 의해 생성된 모노클로날 항체의 결합 특이성을 면역침전에 의해 또는 시험관내 결합 검정, 예를 들어 방사성면역검정 (RIA) 또는 효소 연결된 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 결정한다.

[0331] 모노클로날 항체의 결합 친화도는 예를 들어 문헌 [Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980)]에 기재된 스캐차드 분석으로 결정할 수 있다.

[0332] 원하는 특이성, 친화도 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포가 일단 확인된 후에는, 상기 클론을 한계 희석 절차로 서브클로닝하고 표준 방법으로 성장시킬 수 있다 (문헌 [Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)]). 이러한 목적에 적합한 배양 배지는, 예를 들어, D-MEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 또한, 예를 들어 하이브리도마 세포를 마우스에게 i.p. 주사함으로써 상기 하이브리도마 세포를 동물에서 복수 종양으로서 생체내 성장시킬 수 있다.

[0333] 서브클론에 의해 분비된 모노클로날 항체는 통상적인 항체 정제 절차, 예를 들어 친화성 크로마토그래피 (예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G-세파로스의 사용) 또는 이온-교환 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석 등에 의해 배양 배지, 복수액 또는 혈청으로부터 적합하게 분리된다.

- [0334] 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차 (예를 들어, 뮤린 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브 사용)를 이용하여 쉽게 단리 및 서열분석된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로 기능한다. 일단 단리되면, DNA를 발현 벡터 내로 넣을 수 있고, 이후에 이를 달리 항체 단백질을 생성하지 않는 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이 세포, 원숭이 COS 세포, 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서의 모노클로날 항체의 합성을 달성한다. 항체를 코딩하는 DNA의 박테리아에서의 재조합 발현에 대한 검토 문헌은 문헌 [Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993)] 및 [Pluckthun, Immunol. Revs. 130:151-188 (1992)]을 포함한다.
- [0335] 추가의 실시양태에서, 모노클로날 항체 또는 항체 단편을 문헌 [McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)]에 기재된 기술을 이용하여 생성된 항체 파지 라이브러리로부터 단리할 수 있다. 문헌 [Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991)] 및 [Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)]에는 파지 라이브러리를 사용하여 뮤린 및 인간 항체를 각각 단리시키는 방법이 기재되어 있다. 후속 공개 문헌에는 매우 큰 파지 라이브러리를 구축하기 위한 전략으로서 조합 감염 및 생체내 재조합 (문헌 [Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266 (1993)]) 뿐만 아니라 연쇄 서플링 (문헌 [Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)])에 의해 고 친화도 (nM 범위) 인간 항체를 생성시키는 것이 기재되어 있다. 따라서, 이러한 기술들은 모노클로날 항체의 단리를 위한 전통적인 모노클로날 항체 하이브리도마 기술에 대한 실행가능한 대안이다.
- [0336] 항체를 코딩하는 DNA는 예를 들어 상동성 뮤린 서열을 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 (CH 및 CL) 서열로 치환시키거나 (미국 특허 번호 4,816,567 및 문헌 [Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)]), 또는 이뮤노글로불린 코딩 서열에 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드 (이중 폴리펩티드)에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 융합시켜서 변형시킴으로써 키메라 또는 융합 항체 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드 서열은 항체의 불변 도메인을 교체할 수 있거나, 또는 이것이 항체의 한 항원 결합 부위의 가변 도메인을 교체하여 항원에 대한 특이성을 갖는 하나의 항원 결합 부위 및 상이한 항원에 대한 특이성을 갖는 또 다른 항원 결합 부위를 포함하는 키메라 2가 항체를 생성시킨다.
- [0337] 3. 인간 및 인간화 항체
- [0338] 본 발명의 항-TAT 항체는 추가로 인간화 항체 또는 인간 항체를 포함할 수 있다. 비인간 (예를 들어, 뮤린) 항체의 인간화 형태는 비인간 이뮤노글로불린에서 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 이뮤노글로불린, 이뮤노글로불린 쇄 또는 그의 단편 (예를 들어, Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ 또는 항체의 다른 항원-결합 하위서열)이다. 인간화 항체는 수용자의 상보성 결정 영역 (CDR)의 잔기가 원하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비인간 중 (공여자 항체), 예를 들어 마우스, 래트 또는 토끼의 CDR의 잔기로 교체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)을 포함한다. 일부 예에서, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 잔기는 상응하는 비인간 잔기로 교체된다. 또한, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열 어느 것에서도 발견되지 않는 잔기를 포함할 수도 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 컨센서스 서열의 것이다. 인간화 항체는 또한 적어도 일부의 이뮤노글로불린 불변 영역 (Fc), 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 일부의 이뮤노글로불린 불변 영역을 포함하는 것이 최적일 것이다 (문헌 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988)]; 및 [Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]).
- [0339] 비인간 항체를 인간화하는 방법은 당업계에 주지되어 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비인간 공급원으로부터 도입된 1개 이상의 아미노산 잔기를 갖는다. 이들 비인간 아미노산 잔기는 종종 "유입" 잔기라 지칭되고, 전형적으로는 "유입" 가변 도메인으로부터의 것이다. 인간화는 필수적으로, 인간 항체의 상응하는 서열을 설치류 CDR 또는 CDR 서열로 치환함으로써, 윈터(Winter) 및 동료들의 방법 (문헌 [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986)]; [Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)]; [Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)])에 따라서 수행할 수 있다. 따라서, 이러한 "인간화" 항체는 무손상 인간 가변 도메인보다 실질적으로 더 적은 서열이 비인간 종으로부터의 상응하는 서열로 치환된 키메라 항체 (미국 특허 번호 4,816,567)이다. 실제로, 전형적으로 인간화 항체는 일부 CDR 잔기 및 가능하게는 일부 FR 잔기가 설치류 항체의 유사한 부위로부터의 잔기로 치환된 인간 항체이다.
- [0340] 인간화 항체의 제조에 사용되는 인간 가변 도메인 경쇄 및 중쇄 둘 다의 선택은 항체가 인간 치료용으로 의도된

경우에 항원성 및 HAMA 반응 (인간 항-마우스 항체)을 감소시키는데 매우 중요하다. 소위 "최적-맞춤" 방법에 따라, 설치류 항체의 가변 도메인의 서열을 공지된 인간 가변 도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝한다. 설치류의 서열에 가장 근접한 인간 V 도메인 서열을 확인하고, 그 내에 있는 인간 프레임워크 영역 (FR)을 인간화 항체에 대해 허용한다 (문헌 [Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993)]; [Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)]). 또 다른 방법은 경쇄 또는 중쇄의 특정 하위군의 모든 인간 항체의 컨센서스 서열로부터 유래된 특정 프레임워크 영역을 이용한다. 동일한 프레임워크를 여러 상이한 인간화 항체에 사용할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)]; [Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)]).

[0341] 추가로, 항체가 항원에 대해 높은 친화도를 보유하고 다른 유리한 생물학적 특성을 보유하도록 인간화하는 것이 중요하다. 이를 달성하기 위해서, 바람직한 방법에 따라, 인간화 항체는 모 서열 및 인간화 서열의 3차원 모델을 이용하는 모 서열 및 다양한 개념적 인간화 생성물의 분석 방법에 의해 제조된다. 3차원 이뮤노글로불린 모델은 통상적으로 입수가 가능하고, 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 이뮤노글로불린 서열의 가능한 3차원 형태 구조를 예시하고 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하다. 이러한 디스플레이들의 정밀검사로 후보 이뮤노글로불린 서열의 기능화에 있어서 잔기들의 가능한 역할을 분석할 수 있으며, 즉, 자신의 항원에 결합하는 후보 이뮤노글로불린의 능력에 영향을 미치는 잔기를 분석할 수 있다. 이러한 방식으로, 원하는 항체 특성, 예컨대 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도가 달성되도록 수용자 및 유입 서열로부터 FR 잔기들을 선택하고 조합시킬 수 있다. 일반적으로, 항원 결합에 대한 영향에는 추가변 영역 잔기가 직접적이고 가장 실질적으로 관여한다.

[0342] 다양한 형태의 인간화 항-TAT 항체가 고려된다. 예를 들어 인간화 항체는 면역접합체를 생성하기 위해 하나 이상의 세포독성제(들)와 임의로 접합된 항체 단편, 예컨대 Fab일 수 있다. 대안적으로, 인간화 항체는 무손상 항체, 예컨대 무손상 IgG1 항체일 수 있다.

[0343] 인간화에 대한 대안으로서 인간 항체를 생성할 수 있다. 예를 들어, 면역화시, 내인성 이뮤노글로불린 생성의 부재하에 인간 항체의 전체 레퍼토리를 생성할 수 있는 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스)을 생성하는 것이 현재 가능하다. 예를 들어, 키메라 및 배선 돌연변이 마우스에서 항체 중쇄 연결 영역 (JH) 유전자를 동형접합 결실시키면 내인성 항체의 생성이 완전히 억제된다는 것이 기재되었다. 인간 배선 이뮤노글로불린 유전자 어레이를 이러한 배선 돌연변이체 마우스에게 전달하면, 항원 접종시에 인간 항체가 생성될 것이다. 예를 들어, 문헌 [Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993)]; [Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993)]; [Bruggemann et al., Year in Immuno. 7:33 (1993)]; 및 미국 특허 번호 5,545,806, 5,569,825, 5,591,669 (모두 GenPharm); 5,545,807; 및 WO 97/17852를 참조한다.

[0344] 대안적으로, 파지 디스플레이 기술 (문헌 [McCafferty et al., Nature 348:552-553 (1990)])을 이용하여 면역화되지 않은 공여자로부터의 이뮤노글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터 시험관내에서 인간 항체 및 항체 단편을 생성할 수 있다. 이러한 기술에 따라, 항체 V 도메인 유전자를 필라멘트형 박테리오파지, 예컨대 M13 또는 fd의 주요 또는 소수의 코트 단백질 유전자로 인 프레임으로 클로닝하고, 파지 입자의 표면에 기능적 항체 단편으로서 디스플레이한다. 필라멘트형 입자는 파지 게놈의 단일 가닥 DNA 카피를 함유하기 때문에, 항체의 기능적 특성에 기초한 선택에 의해 이러한 특성을 나타내는 항체를 코딩하는 유전자도 선택된다. 따라서, 파지는 B 세포의 특성의 일부를 모방한다. 파지 디스플레이는 다양한 포맷으로 수행될 수 있고, 예를 들어 문헌 [Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993)]에서 검토된다. V-유전자 절편의 여러 공급원이 파지 디스플레이에 사용될 수 있다. 문헌 [Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991)]에서는 면역화된 마우스의 비장으로부터 유래된 V 유전자의 소형 무작위 조합형 라이브러리로부터 항-옥사졸론 항체의 다양한 어레이가 단리되었다. 본질적으로 문헌 [Mark et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991)] 또는 [Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993)]에 기재된 기술에 따라, 면역화되지 않은 인간 공여자로부터의 V 유전자의 레퍼토리가 구축될 수 있고, 다양한 어레이의 항원 (자가-항원 포함)에 대한 항체를 단리할 수 있다. 또한, 미국 특허 번호 5,565,332 및 5,573,905를 참조한다.

[0345] 상기 논의된 바와 같이, 인간 항체는 또한 시험관내 활성화된 B 세포에 의해 생성될 수도 있다 (미국 특허 5,567,610 및 5,229,275 참조).

[0346] 4. 항체 단편

[0347] 특정 상황에서는, 온전한 항체가 아닌 항체 단편을 사용하는 것이 유리하다. 단편의 크기가 작을수록 제거가

신속하고, 고품 종양에 대한 접근을 개선시킬 수 있다.

[0348] 항체 단편의 생성을 위하여 다양한 기술이 개발되어 왔다. 전통적으로, 이들 단편은 무손상 항체의 단백질분해에 의한 소화를 통해 유래되었다 (예를 들어, 문헌 [Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)]; 및 [Brennan et al., Science, 229:81 (1985)] 참조). 그러나, 현재 이러한 단편들은 재조합 숙주 세포에 의해 직접적으로 생성될 수 있다. Fab, Fv 및 ScFv 항체 단편은 모두가 이. 콜라이에서 발현되어 분리될 수 있고, 이에 의해 다량의 이들 단편을 쉽게 생성할 수 있다. 항체 단편은 상기 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 대안적으로, Fab'-SH 단편은 이. 콜라이로부터 직접 회수되어 화학적으로 커플링되어 F(ab')₂ 단편을 형성할 수 있다 (문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]). 또 다른 접근법에 따라, F(ab')₂ 단편은 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 셀비지 수용체 결합 에피토프 잔기를 포함하는, 생체내 반감기가 증가된 Fab 및 F(ab')₂ 단편은 미국 특허 번호 5,869,046에 기재되어 있다. 항체 단편의 생성을 위한 다른 기술들이 당업자에게 명백할 것이다. 다른 실시양태에서, 선택된 항체는 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다. WO 93/16185; 미국 특허 번호 5,571,894; 및 미국 특허 번호 5,587,458을 참조한다. Fv 및 scFv는 불변 영역이 결여된 무손상 결합 부위를 갖는 유일한 종이며, 생체내 사용 동안 비특이적 결합을 감소시키는데 적합하다. scFv의 아미노 또는 카르복시 말단에서 이펙터 단백질의 융합체가 생성되도록 scFv 융합 단백질을 구축할 수 있다. 문헌 [Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, 상기 문헌]을 참조한다. 예를 들어, 항체 단편은 또한 예를 들어 미국 특허 5,641,870에 기재된 바와 같은 "선형 항체"일 수도 있다. 이러한 선형 항체 단편은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있다.

[0349] 5. 이중특이적 항체

[0350] 이중특이적 항체는 적어도 2종의 상이한 에피토프에 결합 특이성을 갖는 항체이다. 예시적 이중특이적 항체는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 단백질의 2개의 상이한 에피토프에 결합할 수 있다. 이러한 다른 항체는 TAT 결합 부위를 또 다른 단백질에 대한 결합 부위와 조합시킬 수 있다. 대안적으로, 항-TAT 아암은 TAT-발현 세포에 대한 세포성 방어 메커니즘에 집중하고 국제화시키기 위해, 백혈구 상의 촉발 분자, 예를 들어 T-세포 수용체 분자 (예를 들어, CD3), 또는 IgG의 Fc 수용체 (FcγR), 예를 들어 FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) 및 FcγRIII (CD16)에 결합하는 아암과 조합될 수 있다. 이중특이적 항체를 사용하여 세포독성제를, TAT를 발현하는 세포에 국제화시킬 수도 있다. 이들 항체는 TAT-결합 아암, 및 세포 독성제 (예를 들어, 사포린, 항-인터페론-α, 빈카 알칼로이드, 리신 A쇄, 메토크세이트 또는 방사성 동위원소 합텐)에 결합하는 아암을 보유한다. 이중특이적 항체는 전장 항체 또는 항체 단편 (예를 들어, F(ab')₂ 이중특이적 항체)으로 제조될 수 있다.

[0351] WO 96/16673은 이중특이적 항-ErbB2/항-FcγRIII 항체를 기재하고, 미국 특허 번호 5,837,234는 이중특이적 항-ErbB2/항-FcγRI 항체를 개시한다. 이중특이적 항-ErbB2/Fcα 항체는 WO 98/02463에 제시되어 있다. 미국 특허 번호 5,821,337는 이중특이적 항-ErbB2/항-CD3 항체를 교시한다.

[0352] 이중특이적 항체의 제조 방법이 당업계에 공지되어 있다. 전통적인 전장 이중특이적 항체의 생성 방법은 2개의 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍을 동시 발현시키는 것에 기초하는데, 상기 2개의쇄는 상이한 특이성을 갖는다 (문헌 [Millstein et al., Nature 305:537-539 (1983)]). 이뮤노글로불린 중쇄 및 경쇄의 무작위 배열로 인해, 이러한 하이브리도마 (퀴드로마)는 10가지 상이한 항체 분자의 잠재적 혼합물을 생성하고, 이중 하나만이 올바른 이중특이적 구조를 갖는다. 일반적으로 친화성 크로마토그래피 단계에 의해 이루어지는 올바른 분자의 정제는 다소 번거롭고, 생성물 수율이 낮다. 유사한 절차가 WO 93/08829, 및 문헌 [Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991)]에 개시되어 있다.

[0353] 다른 접근법에 따르면, 원하는 결합 특이성 (항체-항원 결합 부위)이 있는 항체 가변 도메인이 이뮤노글로불린 불변 도메인 서열에 융합된다. 바람직하게는, 융합은 힌지의 적어도 일부, CH2 및 CH3 영역을 포함하는 Ig 중쇄 불변 도메인을 이용한다. 경쇄 결합에 필요한 부위를 함유하는 제1 중쇄 불변 영역 (CH1)이 융합체의 적어도 하나에 존재하는 것이 바람직하다. 이뮤노글로불린 중쇄 융합체 및 원한다면 이뮤노글로불린 경쇄를 코딩하는 DNA를 별개의 발현 벡터에 삽입하고, 적합한 숙주 세포로 동시형질감염시킨다. 이는, 구축에 사용된 3종의 폴리펩티드쇄의 동일하지 않은 비율이 원하는 이중특이적 항체의 최적 수율을 제공하는 실시양태에서 3종의 폴리펩티드 단편의 상호 비율을 조정하는데 있어서 큰 유연성을 제공한다. 그러나, 동일한 비율의 적어도 2종의 폴리펩티드쇄의 발현이 고수율을 유도하거나 상기 비율이 원하는쇄 조합의 수율에 유의한 영향을 갖지 않는 경우에는 단일 발현 벡터 내에 2종 또는 3종 모두의 폴리펩티드쇄의 코딩 서열을 삽입하는 것이 가능하다.

[0354] 이러한 접근법의 바람직한 실시양태에서, 이중특이적 항체는 한쪽 아암에 제1 결합 특이성을 갖는 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄, 및 다른 쪽 아암에 하이브리드 이뮤노글로불린 중쇄-경쇄 쌍 (제2 결합 특이성을 제공

함)으로 이루어진다. 이중특이적 분자의 한쪽 절반에만 이류노글로불린 경쇄가 존재하는 것이 용이한 분리 방식을 제공하기 때문에, 이러한 비대칭 구조는 원치 않는 이류노글로불린 쇄 조합물로부터의 원하는 이중특이적 화합물의 분리를 용이하게 한다는 것이 발견되었다. 이러한 접근법이 WO 94/04690에 개시되어 있다. 이중특이적 항체를 생성하는 것에 관한 추가의 상세사항에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)]을 참조한다.

[0355] 미국 특허 번호 5,731,168에 기재된 또 다른 접근법에 따라, 한 쌍의 항체 분자들 사이의 인터페이스는 재조합 세포 배양물로부터 회수되는 이중이량체의 백분율을 최대화되도록 조작될 수 있다. 바람직한 인터페이스는 CH3 도메인의 적어도 일부를 포함한다. 이러한 방법에서, 제1 항체 분자의 인터페이스로부터의 하나 이상의 작은 아미노산 측쇄가 더 큰 측쇄 (예를 들어, 티로신 또는 트립토판)로 교체된다. 큰 아미노산 측쇄를 더 작은 아미노산 측쇄 (예를 들어, 알라닌 또는 트레오닌)로 교체함으로써 큰 측쇄(들)에 대한 동일하거나 유사한 크기의 보상 "공동"이 제2 항체 분자의 인터페이스 상에 생성된다. 이는 동종이량체와 같은 다른 바람직하지 않은 최종-생성물에 비해 이중이량체의 수율을 증가시키는 메카니즘을 제공한다.

[0356] 이중특이적 항체는 가교된 또는 "이중접합" 항체를 포함한다. 예를 들어, 이중접합체 내의 항체들 중 하나는 아비딘에 커플링되고, 다른 하나는 비오틴에 커플링될 수 있다. 이러한 항체는 예를 들어 면역계 세포의 원치 않는 세포로의 표적화 (미국 특허 번호 4,676,980) 및 HIV 감염의 치료 (WO 91/00360, WO 92/200373, 및 EP 03089)를 위해 제안된 바 있다. 임의의 편리한 가교 방법을 이용하여 이중접합체 항체를 제조할 수 있다. 적합한 가교제가 당업계에 주지되어 있고, 수많은 가교 기술과 함께 미국 특허 번호 4,676,980에 개시되어 있다.

[0357] 항체 단편으로부터 이중특이적 항체를 생성시키는 기술이 또한 문헌에 기재되어 있다. 예를 들어, 화학적 연결을 이용하여 이중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)]은 무손상 항체를 단백질 분해로 절단하여 F(ab')₂ 단편을 생성하는 절차를 기재한다. 이들 단편은 인접 디티올을 안정화시키고 분자간 디설피드 형성을 방지하기 위해 디티올 착화제인 아비산나트륨의 존재하에 환원된다. 그 후 생성된 Fab' 단편을 티오니트로벤조이트 (TNB) 유도체로 전환시킨다. 그 후 Fab'-TNB 유도체 중 하나를 메르캅토에틸아민으로의 환원에 의해 Fab'-티올로 재전환시키고 등몰량의 다른 Fab'-TNB 유도체와 혼합하여 이중특이적 항체를 형성시킨다. 생성된 이중특이적 항체는 효소의 선택적 고정을 위한 작용체로서 사용될 수 있다.

[0358] 최근의 진보는 이중특이적 항체를 형성하도록 화학적으로 커플링될 수 있는, 이. 콜라이로부터의 Fab'-SH 단편의 직접 회수를 용이하게 하였다. 문헌 [Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992)]은 완전히 인간화된 이중특이적 항체 F(ab')₂ 분자의 생성을 기재한다. 각각의 Fab' 단편을 이. 콜라이로부터 따로 분비시키고, 이중특이적 항체를 형성하도록 시험관내 유도 화학 커플링 반응을 실시하였다. 이로써 형성된 이중특이적 항체는 ErbB2 수용체를 과다발현하는 세포 및 정상 인간 T 세포에 결합할 수 있을 뿐만 아니라, 인간 유방 종양 표적에 대한 인간 세포독성 림프구의 용해 활성을 촉발할 수도 있었다. 재조합 세포 배양물로부터 직접적으로 이중특이적 항체 단편을 제조 및 분리하기 위한 다양한 기술이 또한 기재되었다. 예를 들어, 류신 지퍼를 사용하여 이중특이적 항체가 생성되었다. 문헌 [Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5):1547-1553 (1992)]. Fos 및 Jun 단백질로부터의 류신 지퍼 펩티드가 2개의 상이한 항체의 Fab' 부분에 유전자 융합에 의해 연결되었다. 항체 동종이량체가 현지 영역에서 환원되어 단량체가 형성된 후, 다시 산화되어 항체 이중이량체가 형성되었다. 이러한 방법은 항체 동종이량체의 생성에 또한 이용될 수 있다. 문헌 [Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)]에 기재된 "디아바디" 기술은 이중특이적 항체 단편의 제조를 위한 대안적인 메카니즘을 제공한다. 상기 단편은 동일 쇄의 2개 도메인 사이에서 쌍 형성을 허용하기에는 지나치게 짧은 링커에 의해 VL에 연결된 VH를 포함한다. 따라서, 한 단편의 VH 및 VL 도메인이 또 다른 단편의 상보적인 VL 및 VH 도메인과 쌍을 이루도록 강요됨으로써, 2개의 항원 결합 부위가 형성된다. 단일 쇄 Fv (sFv) 이량체를 사용하여 이중특이적 항체 단편을 제조하기 위한 또 다른 전략이 또한 보고되었다. 문헌 [Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)]을 참조한다.

[0359] 2가를 초과하는 항체가 고려된다. 예를 들어, 삼중특이적 항체를 제조할 수 있다. 문헌 [Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991)].

[0360] 6. 이중접합체 항체

[0361] 이중접합체 항체도 또한 본 발명의 범주에 속한다. 이중접합체 항체는 2개의 공유 결합에 의해 연결된 항체로 구성된다. 이러한 항체는 예를 들어 면역계 세포의 원치 않는 세포로의 표적화 (미국 특허 번호 4,676,980) 및 HIV 감염의 치료 (WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089)를 위해 제안된 바 있다. 항체는 가교체를 사용하는 것을 포함하는, 합성 단백질 화학에 공지된 방법을 이용하여 시험관내 제조될 수 있는 것으로 고려된다. 예를

들어, 디설피드 교환 반응을 이용하거나 티오에테르 결합을 형성하여 면역독소를 구축할 수 있다. 이러한 목적에 적합한 시약의 예는 이미노티올레이트 및 메틸-4-메르캅토부티르이미데이트 및, 예를 들어 미국 특허 번호 4,676,980에 개시된 것을 포함한다.

[0362] 7. 다가 항체

[0363] 다가 항체는 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 2가 항체보다 신속하게 내재화 (및/또는 이화)될 수 있다. 본 발명의 항체는 3개 이상의 항원 결합 부위를 갖는 (예를 들어, 4가 항체) 다가 항체 (IgM 클래스 이외의 것)일 수 있고, 이는 항체의 폴리펩티드쇄를 코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 쉽게 생성될 수 있다. 다가 항체는 이량체화 도메인 및 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 바람직한 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 힌지 영역을 포함한다 (또는 이것으로 이루어진다). 이러한 시나리오에서, 항체는 Fc 영역, 및 Fc 영역의 아미노 말단에 3개 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 본원에서의 바람직한 다가 항체는 3 내지 약 8개, 그러나 바람직하게는 4개의 항원 결합 부위를 포함한다 (또는 이것으로 이루어진다). 다가 항체는 적어도 1개의 폴리펩티드쇄 (바람직하게는 2개의 폴리펩티드쇄)를 포함하고, 여기서의 상기 폴리펩티드쇄(들)는 2개 이상의 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어 폴리펩티드쇄(들)는 VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc (여기서, VD1은 제1 가변 도메인이고, VD2는 제2 가변 도메인이고, Fc는 Fc 영역의 1개의 폴리펩티드쇄이고, X1 및 X2는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n은 0 또는 1임)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩티드쇄(들)는 VH-CH1-가요성 링커-VH-CH1-Fc 영역쇄; 또는 VH-CH1-VH-CH1-Fc 영역쇄를 포함할 수 있다. 본원에서의 다가 항체는 바람직하게는 적어도 2개 (바람직하게는 4개)의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 더 포함한다. 본원에서의 다가 항체는 예를 들어 약 2 내지 약 8개의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 본원에서 고려되는 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드는 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 임의로 CL 도메인을 더 포함한다.

[0364] 8. 이펙터 기능 조작

[0365] 본 발명의 항체를 예를 들어 항체의 항원-의존성 세포-매개 세포독성 (ADCC) 및/또는 보체-의존성 세포독성 (CDC)이 증진되도록 이펙터 기능에 관하여 변형시키는 것이 바람직할 수 있다. 이것은 항체의 Fc 영역에 하나 이상의 아미노산 치환을 도입함으로써 달성될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 시스테인 잔기(들)를 Fc 영역 내에 도입하여, 이 영역 내에서의 쇠간 디설피드 결합 형성을 허용할 수 있다. 이로써 생성된 동종이량체 항체는 개선된 내재화 능력 및/또는 증가된 보체-매개 세포 사멸 및 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 가질 수 있다. 문헌 [Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992)] 및 [Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)]을 참조한다. 항종양 활성이 증진된 동종이량체 항체는 문헌 [Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993)]에 기재된 바와 같이 이중이관능성 가교제를 사용하여 제조할 수 있다. 대안적으로, 이중 Fc 영역을 갖는 항체를 조작할 수 있고, 이에 의해 보체 용해 및 ADCC 능력이 증진될 수 있다. 문헌 [Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)]을 참조한다. 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어 미국 특허 5,739,277에 기재된 바와 같이 샬비지 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히, 항체 단편)에 혼입시킬 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "샬비지 수용체 결합 에피토프"는 IgG 분자 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4)의 생체내 혈청 반감기 증가를 담당하는 IgG 분자의 Fc 영역의 에피토프를 나타낸다.

[0366] 9. 면역접합체

[0367] 본 발명은 또한 세포독성제, 예컨대 화학요법제, 성장 억제제, 독소 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물 기원의 효소 활성 독소 또는 그의 단편) 또는 방사성 동위원소 (즉, 방사성접합체)에 접합된 항체를 포함하는 면역접합체에 관한 것이다.

[0368] 이러한 면역접합체의 생성에 유용한 화학요법제는 상기 기재되어 있다. 사용될 수 있는 효소 활성 독소 및 그 의 단편은 디프테리아 A 쇠, 디프테리아 독소의 비-결합 활성 단편, 외독소 A 쇠 (슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*)로부터 유래됨), 리신 A 쇠, 아브린 A 쇠, 모데신 A 쇠, 알파-사르신, 알레우리테스 포르디이(*Aleurites fordii*) 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나(*Phytolaca americana*) 단백질 (PAPI, PAPII 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아(*Momordica charantia*) 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스(*sapaonaria officinalis*) 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트릭토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 방사성접합된 항체의 생성을 위한 다양한 방사성핵종이 이용가능하다. 예는 ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y, 및 ¹⁸⁶Re를 포함한다. 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질-커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티올) 프로피오네이트 (SPDP), 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디피미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드

(예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨리엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조된다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14 표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 대한 방사성뉴클레오타이드의 접합을 위한 예시적인 킬레이트화제이다. W094/11026을 참조한다.

[0369] 또한, 항체 및 1개 이상의 소분자 독소, 예컨대 칼리케아미신, 메이탄시노이드, 트리코텐 및 CC1065, 및 독소 활성을 갖는 이들 독소의 유도체의 접합체도 본원에서 고려된다.

[0370] 메이탄신 및 메이탄시노이드

[0371] 한 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 항-TAT 항체 (전장 또는 단편)는 1개 이상의 메이탄시노이드 분자에 접합된다.

[0372] 메이탄시노이드는 튜블린 중합을 억제함으로써 작용하는 유사분열 억제제이다. 메이탄신은 동아프리카 관목 메이테누스 세라타(Maytenus serrata)로부터 처음 단리되었다 (미국 특허 번호 3,896,111). 이어서, 특정 미생물이 또한 메이탄시노이드, 예컨대 메이탄시놀 및 C-3 메이탄시놀 에스테르를 생성하는 것으로 발견되었다 (미국 특허 번호 4,151,042). 합성 메이탄시놀 및 그의 유도체 및 유사체는 예를 들어 미국 특허 번호 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 및 4,371,533 (이들 개시내용은 명백하게 본원에 참고로 포함됨)에 개시되어 있다.

[0373] 메이탄시노이드-항체 접합체

[0374] 메이탄신 및 메이탄시노이드의 치료 지수를 개선시키기 위한 시도로써, 이들을 종양 세포 항원과 특이적으로 결합하는 항체에 접합시켰다. 메이탄시노이드를 함유하는 면역접합체 및 그의 치료 용도는 예를 들어 미국 특허 번호 5,208,020, 5,416,064 및 유럽 특허 EP 0 425 235 B1에 개시되어 있으며, 이들의 개시 내용은 명백하게 본원에 참고로 포함된다. 문헌 [Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)]에는 인간 결장직장암에 대해 작용하는 모노클로날 항체 C242에 연결된 DM1로 명명된 메이탄시노이드를 포함하는 면역접합체가 기재되어 있다. 상기 접합체는 배양된 결장암 세포에 대해 고도로 세포독성인 것으로 밝혀졌고, 생체내 종양 성장 검정에서 항종양 활성을 나타냈다. 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]에서는 메이탄시노이드가 인간 결장암 세포주 상의 항원에 결합하는 뮤린 항체 A7에 또는 HER-2/neu 종양유전자에 결합하는 다른 뮤린 모노클로날 항체 TA.1에 디술피드 링커를 통해 접합된 면역접합체를 설명하고 있다. TA.1-메이탄시노이드 접합체의 세포독성은 세포 당 3 x 10⁵개 HER-2 표면 항원을 발현하는 인간 유방암 세포주 SK-BR-3에 대해 시험관내 시험되었다. 상기 약물 접합체는 메이탄시노이드 무함유 약물과 유사한 정도의 세포독성을 나타내었고, 이것은 항체 분자 당 메이탄시노이드 분자의 수를 증가시킴으로써 증가될 수 있었다. A7-메이탄시노이드 접합체는 마우스에서 낮은 전신 세포독성을 나타냈다.

[0375] 항-TAT 폴리펩티드 항체-메이탄시노이드 접합체 (면역접합체)

[0376] 항-TAT 항체-메이탄시노이드 접합체는 항체 또는 메이탄시노이드 분자의 생물학적 활성을 유의하게 감소시키지 않으면서 항-TAT 항체를 메이탄시노이드 분자에 화학적으로 연결시켜 제조된다. 항체 분자 당 평균 3-4개로 접합된 메이탄시노이드 분자는 항체의 기능 또는 용해도에 부정적인 영향 없이 표적 세포의 세포독성을 증진시키는 효능을 나타냈지만, 1개의 독소/항체 분자일지라도 네이키드 항체의 사용에 비해 세포독성을 증진시킬 것이라 예상된다. 메이탄시노이드는 당업계에 공지되어 있으며, 공지의 기술에 의해 합성될 수도 있고 천연 공급원으로부터 단리될 수도 있다. 적합한 메이탄시노이드는 예를 들어 미국 특허 번호 5,208,020 및 본원에서 상기 언급된 다른 특허 및 비특허 간행물에 개시되어 있다. 바람직한 메이탄시노이드는 메이탄시놀, 및 메이탄시놀 분자의 방향족 고리 또는 다른 위치에서 변형된 메이탄시놀 유사체, 예컨대 다양한 메이탄시놀 에스테르이다.

[0377] 예를 들어 개시내용이 명백하게 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 번호 5,208,020 또는 EP 특허 0425235B1, 문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)] 및 2004년 10월 8일에 출원된 미국 특허 출원 번호 10/960,602에 개시된 것을 포함하여, 항체-메이탄시노이드 접합체의 제조를 위한 다수의 연결 기가 당업계에 공지되어 있다. 링커 성분 SMCC를 포함하는 항체-메이탄시노이드 접합체는 2004년 10월 8일에 출원된 미국 특허 출원 번호 10/960,602에 개시된 바와 같이 제조될 수 있다. 연결 기는 상기 언급된 특허에 개시된 바와 같이 디술피드 기, 티오에테르 기, 산 불안정성 기, 광분해성 기, 캡티다제 불안정성 기 또는 에스테라제 불안정성

기를 포함하고, 디술피드 및 티오에테르 기가 바람직하다. 추가의 연결기는 본원에 기재되고 예시되어 있다.

- [0378] 항체 및 메이탄시노이드의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노타올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디프이미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일) 헥산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨루엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조될 수 있다. 디술피드 연결을 제공하기 위해 특히 바람직한 커플링제는 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP) (문헌 [Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978]]), 및 N-숙신이미딜-4-(2-피리딜디티오)펜타노에이트 (SPP)를 포함한다.
- [0379] 링커는 연결 유형에 따라 다양한 위치에서 메이탄시노이드 분자에 부착될 수 있다. 예를 들어, 에스테르 연결부는 통상적인 커플링 기술을 이용하여 히드록실기와 반응으로 형성될 수 있다. 반응은 히드록실기를 갖는 C-3 위치, 히드록시메틸로 변형된 C-14 위치, 히드록실기로 변형된 C-15 위치, 및 히드록실기를 갖는 C-20 위치에서 일어날 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 연결은 메이탄시놀 또는 메이탄시놀 유사체의 C-3 위치에서 형성된다.
- [0380] 아우리스타틴 및 도라스타틴
- [0381] 일부 실시양태에서, 면역접합체는 도라스타틴 또는 도로스타틴 펩티드 유사체 및 유도체, 즉 아우리스타틴에 접합된 본 발명의 항체를 포함한다 (미국 특허 번호 5,635,483; 5,780,588). 도라스타틴 및 아우리스타틴은 미세관 역학, GTP 가수분해, 및 핵 및 세포 분열을 방해하며 (문헌 [Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584]), 항암 (US 5,663,149) 및 항진균 활성 (문헌 [Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965])을 갖는 것으로 밝혀졌다. 도라스타틴 또는 아우리스타틴 약물 모이어티는 펩티드 약물 모이어티의 N (아미노) 말단 또는 C (카르복실) 말단을 통해 항체에 부착될 수 있다 (WO 02/088172).
- [0382] 예시적인 아우리스타틴 실시양태는 문헌 [Senter et al., Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623] (2004년 3월 28일 발행) (이것의 개시내용은 그 전문이 명백하게 참고로 포함됨)에 개시된 N-말단 연결된 모노메틸아우리스타틴 약물 잔기 DE 및 DF (즉, MMAE 및 MMAF)를 포함한다.
- [0383] 전형적으로, 펩티드-기재의 약물 모이어티는 2개 이상의 아미노산 및/또는 펩티드 단편 사이의 펩티드 결합 형성으로 제조될 수 있다. 이러한 펩티드 결합은 예를 들어 펩티드 화학 분야에 주지된 액체 상 합성 방법 (문헌 [E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press] 참조)에 따라 제조될 수 있다. 아우리스타틴/도라스타틴 약물 모이어티는 US 5,635,483; US 5,780,588; 문헌 [Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465]; [Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277]; [Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725]; [Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863] 및 [Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784]의 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0384] 칼리케아미신
- [0385] 관심있는 또 다른 면역접합체는 하나 이상의 칼리케아미신 분자와 접합된 항-TAT 항체를 포함한다. 칼리케아미신 패밀리의 항생제는 피코몰 미만의 농도에서 이중 가닥 DNA 절단부를 생성할 수 있다. 칼리케아미신 패밀리의 접합체의 제조에 대해서는, 미국 특허 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (모두 아메리칸 시아나미드 캄파니(American Cyanamid Company))를 참조한다. 사용할 수 있는 칼리케아미신의 구조적 유사체는 γ 1I, α 2I, α 3I, N-아세틸- γ 1I, PSAG 및 Θ 1I를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다 (문헌 [Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993)], [Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998)] 및 상기 언급된 아메리칸 시아나미드의 미국 특허). 항체가 접합될 수 있는 또 다른 항-종양 약물은 항폴레이트인 QFA이다. 칼리케아미신 및 QFA는 둘 다 세포내 작용 부위를 갖고, 원형질막을 쉽게 통과하지 않는다. 따라서, 항체-매개 내재화를 통한 이들 작용제의 세포 흡수는 이들의 세포독성 효과를 크게 증진시킨다.
- [0386] 다른 세포독성제

- [0387] 본 발명의 항-TAT 항체에 접합될 수 있는 다른 항종양제로는 BCNU, 스트렙토조신, 빈크리스틴 및 5-플루오로우라실, 미국 특허 5,053,394, 5,770,710에 기재된, 집합적으로 LL-E33288 복합체로 공지된 작용제의 패밀리 뿐만 아니라 에스페라미신 (미국 특허 5,877,296)을 들 수 있다.
- [0388] 사용할 수 있는 효소 활성 독소 및 그의 단편은 디프테리아 A쇄, 디프테리아 독소의 비결합 활성 단편, 외독소 A쇄 (슈도모나스 아에루기노사로부터 유래됨), 리신 A쇄, 아브린 A쇄, 모데신 A쇄, 알파-사르신, 알레우리테스 포르티디 단백질, 디안틴 단백질, 피토라카 아메리카나 단백질 (PAPI, PAPII, 및 PAP-S), 모모르디카 카란티아 억제제, 쿠르신, 크로틴, 사파오나리아 오피시날리스 억제제, 겔로닌, 미토겔린, 레스트락토신, 페노마이신, 에노마이신 및 트리코테센을 포함한다. 예를 들어, 1993년 10월 28일에 공개된 WO 93/21232를 참조한다.
- [0389] 본 발명은 항체와 핵산분해 활성을 갖는 화합물 (예를 들어, 리보뉴클레아제 또는 DNA 엔도뉴클레아제, 예컨대 데옥시리보뉴클레아제; DNase) 사이에 형성된 면역접합체를 추가로 고려한다.
- [0390] 종양의 선택적 파괴를 위해서, 항체는 고도의 방사성 원자를 포함할 수 있다. 다양한 방사성동위원소가 방사성 접합된 항체의 생성을 위해 이용가능하다. 그 예는 At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32, Pb212, 및 Lu의 방사성 동위원소를 포함한다. 방사성접합체는 진단용으로 사용되는 경우에 섬광조영 연구를 위한 방사성 원자, 예를 들어 tc99m 또는 I123을 포함하거나, 핵자기 공명 (NMR) 영상화 (자기 공명 영상화, mri로도 공지됨)용 스핀 표지, 예컨대 다시 아이오딘-123, 아이오딘-131, 인듐-111, 플루오린-19, 탄소-13, 질소-15, 산소-17, 가돌리늄, 망가니즈 또는 철을 포함할 수 있다.
- [0391] 방사성- 또는 다른 표지를 공지의 방식으로 접합체에 혼입시킬 수 있다. 예를 들어, 펩티드는 생합성될 수도 있고, 또는 예를 들어 수소 대신에 플루오린-19를 포함하는 적합한 아미노산 전구체를 사용한 화학적 아미노산 합성에 의해 합성될 수도 있다. tc99m 또는 I123, Re186, Re188 및 In111과 같은 표지가 펩티드 내의 시스테인 잔기를 통해 부착될 수 있다. 이트륨-90은 리신 잔기를 통해 부착될 수 있다. 아이오도젠 (IODOGEN) 방법 (문헌 [Fraker et al. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57])을 사용하여 아이오딘-123을 혼입시킬 수 있다. 문헌 ["Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)]에는 다른 방법이 상세히 기재되어 있다.
- [0392] 항체 및 세포독성제의 접합체는 다양한 이관능성 단백질 커플링제, 예컨대 N-숙신이미딜-3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트 (SPDP), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸) 시클로헥산-1-카르복실레이트, 이미노티올란 (IT), 이미도에스테르의 이관능성 유도체 (예컨대 디메틸 아디피미데이트 HCL), 활성 에스테르 (예컨대 디숙신이미딜 수베레이트), 알데히드 (예컨대 글루타르알데히드), 비스-아지도 화합물 (예컨대 비스(p-아지도벤조일) 핵산디아민), 비스-디아조늄 유도체 (예컨대 비스-(p-디아조늄벤조일)-에틸렌디아민), 디이소시아네이트 (예컨대 톨리엔 2,6-디이소시아네이트) 및 비스-활성 플루오린 화합물 (예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠)을 사용하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 리신 면역독소는 문헌 [Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)]에 기재된 바와 같이 제조할 수 있다. 탄소-14 표지된 1-이소티오시아네이트벤질-3-메틸디에틸렌 트리아민펜타아세트산 (MX-DTPA)은 항체에 대한 방사성뉴클레오타이드의 접합을 위한 예시적인 킬레이트화제이다. WO94/11026을 참조한다. 링커는 세포 내에서 세포독성 약물의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있다. 예를 들어, 산불안정성 링커, 펩티다제-감수성 링커, 광분해성 링커, 디메틸 링커 또는 디술피드-함유 링커 (문헌 [Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)]; 미국 특허 번호 5,208,020)가 사용될 수 있다.
- [0393] 본 발명의 화합물은 시판하는 (예를 들어, 피어스 바이오테크놀로지, 인크. (Pierce Biotechnology, Inc.) (미국 일리노이주 록포드)로부터의) 가교제 시약: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, 술포-EMCS, 술포-GMBS, 술포-KMUS, 술포-MBS, 술포-SIAB, 술포-SMCC, 및 술포-SMPB, 및 SVSB (숙신이미딜-(4-비닐술포)벤조에이트)을 사용하여 제조된 ADC를 명백하게 고려하지만, 이에 제한되지 않는다. 문헌 [2003-2004 Applications Handbook and Catalog]의 467-498 페이지를 참조한다.
- [0394] 대안적으로, 항-TAT 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. DNA의 길이는 서로 인접하거나 접합체의 원하는 특성을 파괴하지 않는 링커 펩티드를 코딩하는 영역에 의해 분리된, 접합체의 2개 부분을 코딩하는 각각의 영역을 포함할 수 있다.
- [0395] 또 다른 실시양태에서, 항체를 종양 예비표적화에 활용하기 위해 "수용체" (상기, 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있고, 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 다음, 제거제를 사용하여 결합되지 않은 접합체를 순환계로부터 제거하고, 이어서 세포독성제 (예를 들어, 방사성 뉴클레오타이드)에 접합된 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여한다.

[0396] 10. 이뮤노리포솜

[0397] 본원에 개시된 항-TAT 항체는 또한 이뮤노리포솜으로서 제제화될 수 있다. "리포솜"은 약물을 포유동물에게 전달하는 데에 유용한, 다양한 유형의 지질, 인지질 및/또는 계면활성제로 구성된 작은 소포이다. 통상적으로, 리포솜의 성분들은 생체막의 지질 배열과 유사한 이중층 형태로 배열되어 있다. 항체를 함유하는 리포솜은 문헌 [Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985)]; [Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030 (1980)]; 미국 특허 번호 4,485,045 및 4,544,545; 및 W097/38731 (1997년 10월 23일 공개)에 기재된 것과 같은 당업계에 공지된 방법에 의해 제조된다. 순환 시간이 증진된 리포솜은 미국 특허 번호 5,013,556에 개시되어 있다.

[0398] 특히 유용한 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도체화 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 포함하는 지질 조성물을 사용한 역상 증발 방법으로 생성될 수 있다. 규정된 기공 크기의 필터를 통해 리포솜을 압출하여 원하는 직경의 리포솜을 생성한다. 본 발명의 항체의 Fab' 단편을 디숄피드 쇠간 반응을 통하여 문헌 [Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)]에 기재된 바와 같이 리포솜에 접합시킬 수 있다. 임의로, 화학요법제를 리포솜 내에 함유시킨다. 문헌 [Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989)]을 참조한다.

[0399] B. TAT 결합 올리고펩티드

[0400] 본 발명의 TAT 결합 올리고펩티드는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드에 결합, 바람직하게는 특이적으로 결합하는 올리고펩티드이다. TAT 결합 올리고펩티드는 공지된 올리고펩티드 합성 방법을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있거나, 또는 재조합 기술을 사용하여 제조 및 정제될 수 있다. TAT 결합 올리고펩티드는 통상적으로 적어도 약 5개 아미노산 길이, 대안적으로는 적어도 약 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100개 또는 그 초과 아미노산 길이이고, 이러한 올리고펩티드는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드에 결합, 바람직하게는 특이적으로 결합할 수 있다. 결합 올리고펩티드는 주지된 기술을 이용하여 과도한 실험없이 확인할 수 있다. 이와 관련하여, 폴리펩티드 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고펩티드에 대해 올리고펩티드 라이브러리를 스크리닝하는 기술이 당업계에 공지되어 있음에 주목한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; PCT 공보 번호 WO 84/03506 및 W084/03564; 문헌 [Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984)]; [Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)]; [Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)]; [Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)]; [Schoofs et al., J. Immunol., 140:611-616 (1988)], [Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378]; [Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832]; [Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352:624]; [Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581]; [Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363] 및 [Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668] 참조).

[0401] 이와 관련하여, 박테리오파지 (파지) 디스플레이는 공지된 기술이며, 큰 규모의 올리고펩티드 라이브러리를 스크리닝하여 폴리펩티드 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 라이브러리의 구성원(들)을 확인할 수 있는 기술이다. 파지 디스플레이는 변이체 폴리펩티드가 박테리오파지 입자의 표면 상의 코트 단백질에 대한 융합 단백질로서 디스플레이되는 기술이다 (문헌 [Scott, J.K. and Smith, G. P. (1990) Science 249: 386]). 파지 디스플레이의 유용성은, 선택적으로 무작위 단백질 변이체 (또는 무작위 클로닝된 cDNA)의 대규모 라이브러리가 표적 분자에 고친화도로 결합하는 서열에 대하여 빠르고 효율적으로 분류될 수 있다는 사실에 있다. 파지 상에서 펩티드 (문헌 [Cwirla, S.E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378]) 또는 단백질 (문헌 [Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832], [Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352:624], [Marks, J.D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581], [Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8363]) 라이브러리의 디스플레이가 수백만가지의 폴리펩티드 또는 올리고펩티드를 특이적 결합 특성을 갖는 것에 대해 스크리닝하는데 사용된 바 있다 (문헌 [Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668]). 무작위 돌연변이체의 파지 라이브러리 분류는 다수의 변이체를 구축하여 증식시키는 전략, 표적 수용체를 사용하여 친화도 정제하는 절차, 및 결합 증가의 결과를 평가하는 수단을 필요로 한다. 미국 특허 번호

5,223,409, 5,403,484, 5,571,689 및 5,663,143.

- [0402] 대부분의 파지 디스플레이 방법에서 필라멘트형 파지가 사용되어 왔지만, 람다형 파지 디스플레이 시스템 (WO 95/34683; U.S. 5,627,024), T4 파지 디스플레이 시스템 (문헌 [Ren et al., Gene, 215:439 (1998)]; [Zhu et al., Cancer Research, 58(15):3209-3214 (1998)]; [Jiang et al., Infection & Immunity, 65(11) 4770-4777 (1997)]; [Ren et al., Gene, 195(2):303-311 (1997)]; [Ren, Protein Sci., 5:1833 (1996)]; [Efimov et al., Virus Genes, 10:173 (1995)]) 및 T7 파지 디스플레이 시스템 (문헌 [Smith and Scott, Methods in Enzymology, 217 228-257 (1993)]; U.S. 5,766,905)가 또한 공지되어 있다.
- [0403] 현재까지 기본적인 파지 디스플레이 개념에 대한 다수의 다른 개선 및 변형이 개발되어 왔다. 이러한 개선은 선택된 표적 분자와의 결합에 대해 펩티드 라이브러리를 스크리닝하고 이러한 단백질을 원하는 특성에 대해 스크리닝하는 능력을 이용하여 기능성 단백질을 디스플레이하는 디스플레이 시스템의 능력을 증진시킨다. 파지 디스플레이 반응에 대한 조합 반응 장치가 개발되었으며 (WO 98/14277), 파지 디스플레이 라이브러리를 이용하여 2개 분자간의 상호작용 (WO 98/20169, WO 98/20159) 및 억제된 나선형 펩티드의 특성 (WO 98/20036)을 분석 및 제어하였다. WO 97/35196은 파지 디스플레이 라이브러리를, 리간드가 표적 분자에 결합하는 제1 용액 및 친화도 리간드가 표적 분자에 결합하지 않는 제2 용액과 접촉시켜서 친화도 리간드를 단리함으로써 결합 리간드를 선택적으로 단리하는 방법을 기재한다. WO 97/46251은 친화도 정제된 항체를 사용하여 무작위 파지 디스플레이 라이브러리를 바이오패닝한 후에 결합 파지를 단리하고, 이후에 마이크로플레이트 웰을 사용하는 마이크로패닝 방법으로 고친화도 결합 파지를 단리하는 것을 기재한다. 친화성 태그로서의 스태필로코쿠스 아우레우스 (*Staphylococcus aureus*) 단백질 A의 용도가 또한 보고되었다 (문헌 [Li et al. (1998) Mol Biotech., 9:187]). WO 97/47314는 파지 디스플레이 라이브러리일 수 있는 조합 라이브러리를 사용하여 효소 특이성을 구별하는 기질 제외 라이브러리의 사용을 기재한다. 파지 디스플레이를 이용할 때 세제 중에 사용하기에 적합한 효소를 선택하는 방법은 WO 97/09446에 기재되어 있다. 특이적 결합 단백질을 선택하는 추가의 방법은 미국 특허 번호 5,498,538, 5,432,018 및 WO 98/15833에 기재되어 있다.
- [0404] 펩티드 라이브러리를 생성시키고 이러한 라이브러리를 스크리닝하는 방법이 미국 특허 번호 5,723,286, 5,432,018, 5,580,717, 5,427,908, 5,498,530, 5,770,434, 5,734,018, 5,698,426, 5,763,192, 및 5,723,323에 또한 개시되어 있다.
- [0405] C. TAT 결합 유기 분자
- [0406] TAT 결합 유기 분자는 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드에 결합, 바람직하게는 특이적으로 결합하는, 본원에 정의된 바와 같은 올리고펩티드 또는 항체 이외의 유기 분자이다. TAT 결합 유기 분자는 공지된 방법을 이용하여 확인되고 화학적으로 합성될 수 있다 (예를 들어, PCT 공보 번호 W000/00823 및 W000/39585 참조). TAT 결합 유기 분자는 일반적으로 약 2000 달톤 미만의 크기, 대안적으로는 약 1500, 750, 500, 250 또는 200 달톤 미만의 크기이고, 본원에 기재된 바와 같은 TAT 폴리펩티드에 결합, 바람직하게는 특이적으로 결합할 수 있는 이러한 유기 분자는 공지된 기술을 이용하여 과도한 실험 없이 확인될 수 있다. 이와 관련하여, 폴리펩티드 표적에 결합할 수 있는 분자에 대해 유기 분자 라이브러리를 스크리닝하는 기술이 당업계에 주지되어 있음에 주목한다 (예를 들어, PCT 공보 번호 W000/00823 및 W000/39585 참조). TAT 결합 유기 분자는 예를 들어 알데히드, 케톤, 옥심, 히드라존, 세미카르바존, 카르바지드, 1급 아민, 2급 아민, 3급 아민, N-치환된 히드라진, 히드라지드, 알콜, 에테르, 티올, 티오에테르, 디설파이드, 카르복실산, 에스테르, 아마이드, 우레아, 카르바메이트, 카르보네이트, 케탈, 티오케탈, 아세탈, 티오아세탈, 아릴 할라이드, 아릴 술포네이트, 알킬 할라이드, 알킬 술포네이트, 방향족 화합물, 헤테로시클릭 화합물, 아닐린, 알켄, 알킨, 디올, 아미노 알콜, 옥사졸리딘, 옥사졸린, 티아졸리딘, 티아졸린, 엔아민, 술폰아마이드, 에폭사이드, 아지리딘, 이소시아네이트, 술폰일 클로라이드, 디아조 화합물, 산 클로라이드 등일 수 있다.
- [0407] D. 원하는 특성을 갖는 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 및 TAT 결합 유기 분자에 대한 스크리닝
- [0408] TAT 폴리펩티드에 결합하는 항체, 올리고펩티드 및 유기 분자를 생성하기 위한 기술은 상기 기재된 바 있다. 원한다면, 특정한 생물학적 특성을 갖는 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자를 추가로 선택할 수 있다.
- [0409] 본 발명의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자의 성장 억제 효과는 당업계에 공지된 방법에 의해, 예를 들어 TAT 폴리펩티드를 내인성 발현하거나 TAT 유전자로의 형질감염 후에 발현하는 세포를 사용하여 평가할 수 있다. 예를 들어, 적절한 종양 세포주 및 TAT-형질감염된 세포를 다양한 농도의 본 발명의 항-TAT 모노클로날 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자로 수 일 (예를 들어, 2-7일) 동안 처리하고 크리스탈 바이올렛

또는 MTT로 염색하거나 다른 몇몇 비색측정 검정으로 분석할 수 있다. 증식을 측정하는 또 다른 방법은 본 발명의 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자의 존재 또는 부재하에 처리된 세포에 의한 3H-티미딘 흡수를 비교하는 것이다. 처리 후에 세포를 수확하고, DNA에 혼입된 방사성의 양을 섬광 계수기에서 정량한다. 적절한 양성 대조군은 선택된 세포주를 이것의 성장을 억제하는 것으로 공지된 성장 억제 항체로 처리하는 것을 포함한다. 종양 세포의 생체내 성장 억제는 당업계에 공지된 다양한 방법으로 결정할 수 있다. 바람직하게는, 종양 세포는 TAT 폴리펩티드를 과다발현하는 것이다. 바람직하게는, 항-TAT 항체, TAT 올리고펩티드 또는 TAT 유기 분자는 한 실시양태에서는 항체 농도 약 0.5 내지 30 $\mu\text{g/ml}$ 에서 처리되지 않은 종양 세포에 비해 TAT-발현 종양 세포의 세포 증식을 시험관내 또는 생체내에서 약 25 내지 100%, 더 바람직하게는 약 30 내지 100%, 훨씬 더 바람직하게는 약 50 내지 100% 또는 70 내지 100% 억제할 것이다. 성장 억제는 세포 배양물 중 항체 농도 약 0.5 내지 30 $\mu\text{g/ml}$ 또는 약 0.5 nM 내지 200 nM에서 측정될 수 있고, 여기서 성장 억제는 종양 세포를 항체에 노출시킨지 1 내지 10일 후에 결정된다. 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 약 100 mg/kg 체중의 항-TAT 항체 투여가 상기 항체의 1차 투여로부터 약 5일 내지 3개월 이내, 바람직하게는 약 5 내지 30일 이내에 종양 크기의 감소 또는 종양 세포 증식의 감소를 유발하는 경우, 항체는 생체내 성장 억제 효과를 갖는다.

[0410] 세포 사멸을 유도하는 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자를 선택하기 위해서, 예를 들어, 프로피디움 아이오다이드 (PI), 트립판 블루 또는 7AAD 흡수에 의해 나타나는 바와 같이, 막의 일체성의 손실을 대조군과 비교하여 평가할 수 있다. PI 흡수 검정은 보체 및 면역 이펙터 세포의 부재하에 수행될 수 있다. TAT 폴리펩티드-발현 종양 세포를 배지 단독 또는 적절한 항-TAT 항체 (예를 들어, 약 10 $\mu\text{g/ml}$), TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자를 함유하는 배지와 함께 인큐베이션한다. 세포를 3일의 기간 동안 인큐베이션한다. 각각의 처리 후에, 세포를 세척하고, 세포 덩어리를 제거하기 위해 35 mm의 스트레이너 마개가 있는 12 x 75 튜브 (1 ml/튜브, 처리군 당 3개 튜브) 내로 분취한다. 이어서, 튜브에 PI (10 $\mu\text{g/ml}$)를 넣는다. 샘플을 팩스칸(FACSCAN)[®] 유동 세포계측기 및 팩스콘버트(FACSCONVERT)[®] 셀퀘스트(CellQuest) 소프트웨어 (벡톤 디킨슨(Becton Dickinson))를 사용하여 분석할 수 있다. PI 흡수에 의해 결정된 바와 같이 통계적으로 유의적 수준의 세포 사멸을 유도하는 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자를 세포 사멸 유도 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 또는 TAT 결합 유기 분자로서 선택할 수 있다.

[0411] 관심있는 항체가 결합하는 TAT 폴리펩티드 상에서의 에피토프에 결합하는 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자를 스크리닝하기 위해, 문헌 [Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)]에 기재된 것과 같은 통상적인 교차-차단 검정을 수행할 수 있다. 상기 검정은 시험 항체, 올리고펩티드 또는 다른 유기 분자가 공지의 항-TAT 항체와 동일한 부위 또는 에피토프에 결합하는 지 여부를 결정하는데 이용될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 에피토프 맵핑을 당업계에 공지된 방법으로 수행할 수 있다. 예를 들어, 접촉 잔기를 확인하기 위해서 항체 서열을 예컨대 알려진 스캐닝을 통해 돌연변이 유발시킬 수 있다. 돌연변이체 항체를 적합한 폴딩을 확인하기 위해서 우선 폴리클로날 항체와의 결합에 대해 시험한다. 다른 방법에서, TAT 폴리펩티드의 상이한 영역에 상응하는 펩티드를 시험 항체들 또는 시험 항체 및 에피토프 특성이 규명되고 공지된 항체와의 경쟁 검정에 사용할 수 있다.

[0412] E. 항체 의존성 효소 매개 전구약물 요법 (ADEPT)

[0413] 본 발명의 항체는 또한 전구약물 (예를 들어, 펩티딜 화학요법제, W081/01145 참조)을 활성 항암 약물로 전환시키는 전구약물-활성화 효소에 항체를 접합함으로써 ADEPT에서 사용할 수 있다. 예를 들어 WO 88/07378 및 미국 특허 번호 4,975,278을 참조한다.

[0414] ADEPT에 유용한 면역접합체의 효소 성분은 전구약물을 그의 보다 활성인 세포독성 형태로 전환시키는 방식으로 전구약물에 대해 작용할 수 있는 임의의 효소를 포함한다.

[0415] 본 발명의 방법에 유용한 효소는 포스페이트-함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 알칼리성 포스파타제; 술페이트-함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 아틸솔파타제; 비독성 5-플루오로시토신을 항암 약물인 5-플루오로우라실로 전환시키는데 유용한 시토신 데아미나제; 펩티드-함유 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 프로테아제, 예를 들어 세라티아 프로테아제, 테르몰리신, 서브틸리신, 카르복시펩티다제 및 카텡신 (예를 들어, 카텡신 B 및 L); D-아미노산 치환기를 함유하는 전구약물을 전환시키는데 유용한 D-알라닐카르복시펩티다제; 글리코실화된 전구약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 탄수화물-절단 효소, 예를 들어 β -갈락토시다제 및 뉴라미니다제; β -락탐으로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 β -락타마제; 및 아민 질소에서 각각 페녹시아세틸기 또는 페닐아세틸기로 유도체화된 약물을 유리 약물로 전환시키는데 유용한 페닐실린 아마미다제, 예컨대 페닐실린 V 아마미다제 또는 페닐실린 G 아마미다제를 포함하나 이에 제한

되지 않는다. 대안적으로, 본 발명의 전구약물을 유리 활성 약물로 전환시키기 위해 효소적 활성을 갖는 항체 (당업계에서 "아브자임 (abzyme)"으로도 알려짐)를 사용할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Massey, Nature 328:457-458 (1987)] 참조). 항체-아브자임 접합체는 종양 세포 집단에 아브자임을 전달하기 위해 본원에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0416] 본 발명의 효소는 당업계 주지의 기술에 의해, 예컨대 상기 논의된 이중이관능성 가교 시약을 사용하여 항-TAT 항체에 공유 결합될 수 있다. 대안적으로, 적어도 본 발명의 효소의 기능적 활성 부분에 연결된 본 발명의 항체의 항원 결합 영역을 적어도 포함하는 융합 단백질은 당업계에 주지된 재조합 DNA 기술을 이용하여 제작할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984)] 참조).

[0417] F. 전장 TAT 폴리펩티드

[0418] 본 발명은 또한 본 명세서에서 TAT 폴리펩티드라 지칭되는 폴리펩티드를 코딩하는, 새로 확인되고 단리된 뉴클레오티드 서열을 제공한다. 특히, 다양한 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 cDNA (부분 및 전장)가 아래의 실시예에 추가로 상세히 개시되는 바와 같이 확인되고 단리되었다.

[0419] 아래 실시예에 개시된 바와 같이, 다양한 cDNA 클론이 ATCC에 기탁되었다. 이들 클론의 실제 뉴클레오티드 서열은 당업계에서 통상적인 방법을 사용하여 기탁된 클론을 서열 결정함으로써 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 예측된 아미노산 서열은 통상적인 기술을 사용하여 뉴클레오티드 서열로부터 결정될 수 있다. 본원에 기재된 TAT 폴리펩티드 및 코딩 핵산에 대해, 몇몇 경우에, 본 출원인들은 그 당시에 이용가능한 서열 정보를 사용하여 가장 우수하게 확인가능한 리딩 프레임인 것으로 생각되는 것을 확인하였다.

[0420] G. 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드 변이체

[0421] 본원에 기재된 항-TAT 항체 및 전장 천연 서열 TAT 폴리펩티드 이외에, 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드 변이체를 제조할 수 있음이 고려된다. 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드 변이체는 코딩 DNA에 적절한 뉴클레오티드 변화를 도입하고/하거나 원하는 항체 또는 폴리펩티드를 합성하여 제조될 수 있다. 당업자는 아미노산 변화가 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 번역후 프로세스를 변경시킬 수 있고, 예컨대 글리코실화 부위의 수 또는 위치를 변화시키거나 막 앵커링 특성을 변경시킬 수 있음을 이해할 것이다.

[0422] 본원에 기재된 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드에서의 변이는 예를 들어 미국 특허 번호 5,364,934에 열거된 보존적 및 비-보존적 돌연변이를 위한 임의의 기술 및 지침을 이용하여 달성될 수 있다. 변이는 천연 서열 항체 또는 폴리펩티드와 비교할 때 아미노산 서열에서의 변화를 야기하는, 항체 또는 폴리펩티드를 코딩하는 1개 이상의 코돈의 치환, 결실 또는 삽입일 수 있다. 임의로, 변이는 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 1개 이상의 도메인에서 적어도 1개의 아미노산을 임의의 다른 아미노산으로 치환하여 달성된다. 어떤 아미노산 잔기가 원하는 활성에 유해한 영향을 미치지 않으면서 삽입, 치환 또는 결실될 수 있는지를 결정할 때의 지침은, 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 서열을 공지의 상동성 단백질 분자의 서열과 비교하고 상동성이 높은 영역에서 이루어지는 아미노산 서열 변화의 수를 최소화함으로써 찾을 수 있다. 아미노산 치환은 하나의 아미노산을 구조적 및/또는 화학적 특성이 유사한 또 다른 아미노산으로 교체한 결과일 수 있고, 예를 들어 류신을 세린으로 교체한, 즉, 보존적 아미노산 교체의 결과일 수 있다. 삽입 또는 결실은 임의로 약 1 내지 5개의 아미노산 범위에 걸쳐 이루어질 수 있다. 허용되는 변이는 서열에서 체계적으로 아미노산의 삽입, 결실 또는 치환을 생성하고, 이로 인한 변이체를 전장 또는 성숙 천연 서열이 나타내는 활성에 대해 시험하여 결정될 수 있다.

[0423] 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드 단편이 본원에서 제공된다. 이러한 단편은 예를 들어 전장 천연 항체 또는 단백질과 비교하는 경우에 N-말단 또는 C-말단에서 말단절단된 것일 수도 있고, 또는 내부 잔기가 결여된 것일 수도 있다. 특정 단편은 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 원하는 생물학적 활성에 필수적이지 않은 아미노산 잔기가 결여되어 있다.

[0424] 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 단편은 임의의 수많은 통상적인 기술로 제조될 수 있다. 원하는 펩티드 단편을 화학적으로 합성할 수 있다. 대안적인 접근법은 효소에 의한 소화에 의해, 예를 들어 특정 아미노산 잔기로 규정되는 부위에서 단백질을 절단하는 것으로 공지된 효소로 단백질을 처리하거나 적합한 제한 효소로 DNA를 소화시켜서 항체 또는 폴리펩티드 단편을 생성하고, 원하는 단편을 단리하는 것을 포함한다. 또 다른 적합한 기술은 원하는 항체 또는 폴리펩티드 단편을 코딩하는 DNA 단편을 단리하고 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)에 의해 증폭시키는 것을 포함한다. DNA 단편의 원하는 말단을 규정하는 올리고뉴클레오티드를 PCR에서의 5' 및 3' 프라이머에서 사용한다. 바람직하게는, 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 단편은 적어도 하나의 생물학적 및/또는 면역학적 활성을 본원에 개시된 천연 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드와 공유한다.

[0425] 특정한 실시양태에서, 관심있는 대상의 보존적 치환은 바람직한 치환이라는 표제로 표 6에 나타내었다. 이러한 치환이 생물학적 활성을 변화시키는 경우에는 표 1에 예시적인 치환이라 명명되거나 아미노산 클래스에 대해 아래에서 추가로 기재된 바와 같은 보다 실질적인 변화를 도입하고 생성물을 스크리닝한다.

표 1

본래 잔기	예시적인 치환	바람직한 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Leu	노르류신
Leu (L)	노르류신 ; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe;	Leu
	Ala; 노르류신	

[0426]

[0427] 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 기능 또는 면역학적 동일성에 있어서의 실질적인 변형은 (a) 예를 들어 시트 또는 나선 형태로서, 치환 영역 내의 폴리펩티드 백본의 구조, (b) 표적 부위에서의 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 부피를 유지하는 것에 대한 효과가 유의하게 상이한 치환을 선택함으로써 달성된다. 자연 발생 잔기는 공통적인 측쇄 특성을 기초로 하기 군으로 분류될 수 있다:

[0428] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0429] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr; Asn; Gln

[0430] (3) 산성: Asp, Glu;

[0431] (4) 염기성: His, Lys, Arg;

- [0432] (5) 쇠 배향을 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro; 및
- [0433] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [0434] 비보존적 치환은 이들 클래스 중의 하나의 구성원을 또 다른 클래스로 교환하는 것을 포함할 것이다. 이러한 치환된 잔기를 또한 보존적 치환 부위에, 또는 보다 바람직하게는 나머지 (비-보존된) 부위에 도입할 수 있다.
- [0435] 변이는 당업계 공지 방법, 예컨대 올리고뉴클레오타이드-매개 (부위-지정) 돌연변이유발, 알라닌 스캐닝 및 PCR 돌연변이유발을 이용하여 이루어질 수 있다. 부위 지정 돌연변이유발 (문헌 [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (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 공지의 기술을 클로닝된 DNA에 대해 수행하여 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 변이체 DNA를 생성할 수 있다.
- [0436] 인접한 서열을 따라 하나 이상의 아미노산을 확인하기 위해 스캐닝 아미노산 분석을 이용할 수도 있다. 바람직한 스캐닝 아미노산은 비교적 작은 중성 아미노산이다. 이러한 아미노산은 알라닌, 글리신, 세린 및 시스테인을 포함한다. 베타-탄소 너머의 측쇄를 제거하고, 변이체의 주쇄 형태를 덜 변형시킬 것 같기 때문에, 이러한 군 중에서 알라닌이 전형적으로 바람직한 스캐닝 아미노산이다 (문헌 [Cunningham and Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]). 알라닌은 또한 가장 흔한 아미노산이기 때문에 전형적으로 바람직하다. 또한, 알라닌은 종종 매립된 위치 및 노출된 위치 모두에서 발견된다 (문헌 [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); [Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]). 알라닌 치환이 적당량의 변이체를 생성하지 않을 경우에는 이소테릭 아미노산을 사용할 수 있다.
- [0437] 또한, 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 적절한 형태 유지에 관여하지 않는 임의의 시스테인 잔기가 일반적으로 세린으로 치환되어 분자의 산화 안정성을 개선시키고 이상 가교를 방지할 수 있다. 반대로, 시스테인 결합 (들)을 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드에 부가하여 그의 안정성을 개선시킬 수 있다 (특히, 항체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우).
- [0438] 특히 바람직한 유형의 치환 변이체는 모 항체 (예를 들어, 인간화 또는 인간 항체)의 하나 이상의 추가변 영역 잔기를 치환하는 것을 수반하였다. 일반적으로, 추가적인 개발용으로 선택된 생성된 변이체(들)는 이들이 생성되는 모 항체에 비해 생물학적 특성이 개선될 것이다. 이러한 치환 변이체를 생성하는 편리한 방법은 파지 디스플레이를 사용한 친화도 성숙이다. 간략하게, 몇몇 추가변 영역 부위 (예를 들어, 6 내지 7개 부위)가 각각의 부위에서 모든 가능한 아미노 치환이 생성되도록 돌연변이된다. 이로써 생성된 항체 변이체를 필라멘트형 파지 입자로부터 각 입자 내에 패키징된 M13의 유전자 III 생성물에 대한 융합체로서 1가 방식으로 디스플레이시킨다. 이어서, 파지-디스플레이된 변이체를 본원에 개시된 바와 같이 그의 생물학적 활성 (예를 들어, 결합 친화도)에 대해 스크리닝한다. 변형을 위한 후보 추가변 영역 부위를 확인하기 위해, 알라닌 스캐닝 돌연변이유발을 수행하여 항원 결합에 유의하게 기여하는 추가변 영역 잔기를 확인할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 항체와 인간 TAT 폴리펩티드 사이의 접촉 지점을 확인하기 위해서는 항원-항체 복합체의 결정 구조를 분석하는 것이 유익할 수 있다. 이러한 접촉 잔기 및 인접 잔기는 본원에서 상술된 기술에 따른 치환을 위한 후보이다. 일단 이러한 변이체가 생성되면, 변이체들의 패널을 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝하고, 하나 이상의 관련 검정에서 탁월한 특성을 갖는 항체를 추가적인 개발을 위해 선택할 수 있다.
- [0439] 항-TAT 항체의 아미노산 서열 변이체를 코딩하는 핵산 분자는 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 제조된다. 이러한 방법은 천연 공급원으로부터의 단리 (자연 발생 아미노산 서열 변이체의 경우), 또는 항-TAT 항체의 앞서 제조된 변이체 또는 비-변이체 버전의 올리고뉴클레오타이드-매개 (또는 부위-지정) 돌연변이유발, PCR 돌연변이유발 및 카세트 돌연변이유발에 의한 제조를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0440] H. 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드의 변형
- [0441] 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 공유 변형이 본 발명의 범위 내에 포함된다. 공유 변형 중 한 유형은 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 표적화된 아미노산 잔기를, 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제와 반응시키는 것을 포함한다. 이관능성 작용제를 사용한 유도체화는 예를 들어 항-TAT 항체를 정제하기 위한 방법에서 사용하기 위한 수불용성 지지체 매트릭스 또는 표면에 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 가교시키기 위해, 및 그 반대를 위해 유용하다. 통상적으로 사용되는 가교결합제는 예를 들어 1,1-비스(디아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타르알데히드, N-히드록시숙신이미드 에스테르, 예를 들어 4-아지도살리실산을 갖는 에스테르, 동종이관능성 이미도에스테르, 예를 들어 디숙신이

미틸 에스테르, 예컨대 3,3'-디티오비스(숙신아미딜프로피오네이트), 이관능성 말레이미드, 예컨대 비스-N-말레이미도-1,8-옥탄 및 메틸-3-[(p-아지도페닐)디티오]프로피오아미데이트와 같은 작용제를 포함한다.

[0442] 다른 변형은 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기의 각각 상응하는 글루타미 및 아스파르틸 잔기로의 탈아미드화, 프롤린 및 리신의 히드록실화, 세릴 또는 트레오닐 잔기의 히드록실 기의 인산화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 α -아미노 기의 메틸화 (문헌 [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)]), N-말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C-말단 카르복실 기의 아미드화를 포함한다.

[0443] 본 발명의 범위 내에 포함되는 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 또 다른 유형의 공유 변형은 항체 또는 폴리펩티드의 천연 글리코실화 패턴의 변경을 포함한다. "천연 글리코실화 패턴의 변경"은 본원의 목적에서 천연 서열 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드에서 발견된 하나 이상의 탄수화물 모이어티의 삭제 (근원적인 글리코실화 부위의 제거에 의해 또는 화학적 및/또는 효소적 수단에 의한 글리코실화의 결실에 의해), 및/또는 천연 서열 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드에 존재하지 않는 하나 이상의 글리코실화 부위의 부가를 의미하는 것으로 의도된다. 또한, 상기 어구는 존재하는 다양한 탄수화물 모이어티의 성질 및 비율의 변화를 수반하는, 천연 단백질의 글리코실화의 정성적 변화를 포함한다.

[0444] 항체 및 다른 폴리펩티드의 글리코실화는 전형적으로 N-연결되거나 O-연결된다. N-연결은 탄수화물 모이어티가 아스파라긴 잔기의 측쇄에 부착된 것을 나타낸다. 트리펩티드 서열 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌 (식 중 X는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산임)은 탄수화물 모이어티를 아스파라긴 측쇄에 효소에 의해 부착시키기 위한 인식 서열이다. 따라서, 이러한 트리펩티드 서열 중 하나가 폴리펩티드에 존재함으로써 잠재적인 글리코실화 부위가 생성된다. O-연결 글리코실화는 당 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스 또는 크실로스 중의 하나가 히드록시아미노산, 가장 통상적으로는 세린 또는 트레오닌에 부착되는 것을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신 또한 사용될 수 있다.

[0445] 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드에 글리코실화 부위를 추가하는 것은 이것이 하나 이상의 상기 기재된 트리펩티드 서열을 함유하도록 아미노산 서열을 변경시킴으로써 편리하게 달성된다 (N-연결된 글리코실화 부위의 경우). 또한 변경은 원래의 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 서열에 대한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 부가 또는 치환에 의해 달성될 수 있다 (O-연결된 글리코실화 부위의 경우). 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 아미노산 서열은 DNA 수준에서의 변화를 통해, 특히 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 원하는 아미노산으로 번역될 코돈이 생성되도록 미리 선택된 염기에서 돌연변이시킴으로써 임의적으로 변경될 수 있다.

[0446] 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 상의 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 또 다른 수단은 폴리펩티드에 글리코시드를 화학적으로 또는 효소에 의해 커플링시키는 것이다. 상기 방법은 예를 들어 1987년 9월 11일에 공개된 WO 87/05330 및 문헌 [Aplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981)]에 기재되어 있다.

[0447] 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 상에 존재하는 탄수화물 모이어티의 제거는 화학적으로 또는 효소에 의해, 또는 글리코실화의 표적으로 기능하는 아미노산 잔기를 코딩하는 코돈의 돌연변이에 의한 치환에 의해 달성할 수 있다. 화학적 탈글리코실화 기술은 당업계에서 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Hakimuddin, et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987)] 및 [Edge et al., *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981)]에 기재되어 있다. 폴리펩티드 상의 탄수화물 모이어티의 효소에 의한 절단은 문헌 [Thotakura et al., *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987)]에 기재된 바와 같이 다양한 엔도- 및 엑소-글리코시다제의 사용에 의해 달성할 수 있다.

[0448] 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 또 다른 유형의 공유 변형은 항체 또는 폴리펩티드를 다양한 비단백질성 중합체 중 하나, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌에 미국 특허 번호 4,640,835, 4,496,689, 4,301,144, 4,670,417, 4,791,192 또는 4,179,337에 열거된 방식으로 연결시키는 것을 포함한다. 항체 또는 폴리펩티드는 또한 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합으로 제조된 마이크로캡슐 (예를 들어, 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐) 내에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐) 내에 또는 매크로에멀전 내에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980)]에 개시되어 있다.

[0449] 본 발명의 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드는 또한 다른 이중 폴리펩티드 또는 아미노산 서열에 융합된 항-TAT

항체 또는 TAT 폴리펩티드를 포함하는 키메라 분자를 형성하는 방식으로 변형될 수 있다.

[0450] 한 실시양태에서, 이러한 키메라 분자는 항-태그 항체가 그에 대해 선택적으로 결합할 수 있는 에피토프를 제공하는 태그 폴리펩티드와 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 융합체를 포함한다. 에피토프 태그는 일반적으로 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 아미노- 또는 카르복실-말단에 위치한다. 이러한 에피토프 태그가 부착된 형태의 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 존재를 태그 폴리펩티드에 대한 항체를 사용하여 검출할 수 있다. 또한, 에피토프 태그를 제공함으로써 항-태그 항체 또는 에피토프 태그에 결합하는 또 다른 유형의 친화도 매트릭스를 사용한 친화도 정제에 의해 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 쉽게 정제할 수 있다. 다양한 태그 폴리펩티드 및 이들 각각의 항체는 당업계에 공지되어 있다. 그 예는 폴리-히스티딘 (폴리-his) 또는 폴리-히스티딘-글리신 (폴리-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 포진 바이러스 당단백질 D (gD) 태그 및 그의 항체 (문헌 [Paborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)])를 포함한다. 다른 태그 폴리펩티드에는 Flag-펩티드 (문헌 [Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]); KT3 에피토프 펩티드 (문헌 [Martin et al., Science, 255:192-194 (1992)]); α-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)])가 포함된다.

[0451] 대안적인 실시양태에서, 키메라 분자는 이뮤노글로불린 또는 이뮤노글로불린의 특정 영역과 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 융합체를 포함할 수 있다. 2가 형태의 키메라 분자 (본원에서는 "이뮤노어드헤신"이라고 지칭하기도 함)의 경우, 이러한 융합체는 IgG 분자의 Fc 영역에 대한 것일 수 있다. Ig 융합체는 바람직하게는 Ig 분자 내의 적어도 하나의 가변 영역 대신에 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 가용성 형태 (막횡단 도메인이 결실되거나 불활성화된 형태)의 치환을 포함한다. 특히 바람직한 실시양태에서, 이뮤노글로불린 융합체는 힌지, CH2 및 CH3, 또는 IgG1 분자의 힌지, CH1, CH2 및 CH3 영역을 포함한다. 이뮤노글로불린 융합체의 생성에 대해서는 또한 미국 특허 번호 5,428,130 (1995년 6월 27일에 허여됨)를 참조한다.

[0452] I. 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드의 제조

[0453] 하기 기재는 주로 항-TAT 항체- 및 TAT 폴리펩티드-코딩 핵산을 함유하는 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 세포를 배양하여 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 생성하는 것에 관한 것이다. 물론, 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 제조하기 위해 당업계에 공지되어 있는 대안적 방법을 사용할 수 있음이 고려된다. 예를 들어, 적절한 아미노산 서열, 또는 그의 일부를 고체-상 기술을 사용하여 직접적인 펩티드 합성에 의해 생성할 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 기술 또는 자동화에 의해 수행될 수 있다. 자동화 합성은 예를 들어 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 펩티드 합성기 (캘리포니아주 포스터 시티 소재)를 제조업체의 지침에 따라 사용하여 달성될 수 있다. 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 다양한 부분들은 별개로 화학적으로 합성되고, 원하는 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 생성하기 위해 화학적 또는 효소적 방법을 사용하여 조합될 수 있다.

[0454] 1. 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 단리

[0455] 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 DNA는 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 mRNA를 보유하고 이를 검출가능한 수준으로 발현하는 것으로 여겨지는 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 따라서, 인간 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 DNA는 인간 조직으로부터 제조된 cDNA 라이브러리로부터 편리하게 얻을 수 있다. 항-TAT 항체- 또는 TAT 폴리펩티드-코딩 유전자는 또한 게놈 라이브러리로부터 또는 공지의 합성 절차 (예를 들어, 자동화 핵산 합성)에 의해 얻을 수 있다.

[0456] 라이브러리는 관심있는 유전자 또는 그에 의해 코딩되는 단백질을 확인하도록 설계된 프로브 (예를 들어, 적어도 약 20 내지 80개 염기의 올리고뉴클레오타이드)를 사용하여 스크리닝할 수 있다. 선택된 프로브를 사용한 cDNA 또는 게놈 라이브러리의 스크리닝은 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. 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 유전자를 단리하는 대안적인 수단은 PCR 방법을 사용하는 것이다 (문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]; [Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)]).

- [0457] cDNA 라이브러리를 스크리닝하는 기술은 당업계에 공지되어 있다. 프로브로서 선택된 올리고뉴클레오타이드 서열은 가양성이 최소화되도록 충분한 길이이고 충분히 분명해야 한다. 올리고뉴클레오타이드는 바람직하게는 스크리닝될 라이브러리 내의 DNA에 대한 혼성화시에 검출될 수 있도록 표지된다. 표지 방법은 당업계에 공지되어 있고, 32P-표지된 ATP와 같은 방사성표지, 비오틴화 또는 효소 표지의 사용을 포함한다. 중간 정도의 엄격도 및 고엄격도를 포함하는 혼성화 조건은 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]에서 제공된다.
- [0458] 이러한 라이브러리 스크리닝 방법에서 확인된 서열은 공공 데이터베이스, 예를 들어 진뱅크(GenBank) 또는 다른 사실 서열 데이터베이스에 기탁되고 이로부터 이용가능한 다른 공지의 서열과 비교 및 정렬될 수 있다. 분자의 규정된 영역 내의 서열 동일성 또는 전장 서열에 걸친 서열 동일성 (아미노산 또는 뉴클레오타이드 수준)은 당업계에 공지되고 본원에 기재된 바와 같은 방법을 이용하여 결정될 수 있다.
- [0459] 단백질 코딩 서열을 갖는 핵산은 본원에서 최초로 개시된 의심 아미노산 서열을 사용하고, 필요한 경우에는 cDNA로 역전사될 수 없는 mRNA의 전구체 및 프로세싱 중간체를 검출하기 위해 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재된 바와 같은 통상적인 프라이머 연장 절차를 이용함으로써, 선택된 cDNA 또는 게놈 라이브러리를 스크리닝하여 얻을 수 있다.
- [0460] 2. 숙주 세포의 선택 및 형질전환
- [0461] 숙주 세포를 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 생성을 위해 본원에 기재된 발현 또는 클로닝 벡터로 형질감염 또는 형질전환시키고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 원하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지 내에서 배양한다. 배양 조건, 예컨대 배지, 온도, pH 등은 당업자가 과도한 실험 없이 선택할 수 있다. 일반적으로, 세포 배양물의 생산성을 최대화하기 위한 원리, 프로토콜 및 실제 기술은 문헌 [Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991)] 및 [Sambrook et al., 상기 문헌]에서 찾을 수 있다.
- [0462] 진핵 세포 형질감염 및 원핵 세포 형질전환의 방법, 예를 들어 CaCl₂, CaPO₄, 리포솜-매개 및 전기천공은 당업자에게 공지되어 있다. 사용된 숙주 세포에 따라, 형질전환은 이러한 세포에 적절한 표준 기술을 이용하여 수행된다. 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 염화칼슘을 사용한 칼슘 처리, 또는 전기천공은 일반적으로 원핵생물에 대해 사용된다. 문헌 [Shaw et al., Gene, 23:315 (1983)] 및 WO 89/05859 (1989년 6월 29일에 공개)에 기재된 바와 같이, 아그로박테리움 투메파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)를 사용한 감염은 특정 식물 세포의 형질전환에 사용된다. 이러한 세포벽이 없는 포유동물 세포의 경우에는, 문헌 [Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978)]의 인산칼슘 침전 방법을 이용할 수 있다. 포유동물 세포 숙주 시스템 형질감염의 일반적인 측면은 미국 특허 번호 4,399,216에 기재되어 있다. 효모로의 형질전환은 전형적으로 문헌 [Van Solingen et al., J. Bact., 130:946 (1977)] 및 [Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979)]의 방법에 따라 수행된다. 그러나, DNA를 세포에 도입하기 위한 다른 방법, 예를 들어 핵 미세주입, 전기천공, 무손상 세포와 박테리아 원형질체의 융합, 또는 다가양이온, 예를 들어 폴리브렌, 폴리 오르니틴에 의한 방법이 이용될 수도 있다. 포유동물 세포를 형질전환하는 다양한 기술에 대해서는 문헌 [Keown et al., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990)] 및 [Mansour et al., Nature, 336:348-352 (1988)]을 참조한다.
- [0463] 본원에서 벡터 내 DNA의 클로닝 또는 발현에 적합한 숙주 세포는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵생물의 세포를 포함한다. 적합한 원핵생물은 유박테리아, 예컨대 그람-음성 또는 그람-양성 유기체, 예를 들어 엔테로박테리아세아에 (*Enterobacteriaceae*), 예컨대 이. 콜라이를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 다양한 이. 콜라이 균주, 예컨대 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)는 공개적으로 입수가능하다. 다른 적합한 원핵 숙주 세포는 엔테로박테리아세아에, 예컨대 에스케리키아(*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*) 뿐만 아니라 바실루스, 예컨대 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 및 비. 리케니포르미스(*B. licheniformis*) (예를 들어, 1989년 4월 12일에 공개된 DD 266,710에 개시된 비. 리케니포르미스 41P), 슈도모나스(*Pseudomonas*), 예를 들어 피. 아에루기노사(*P. aeruginosa*) 및 스트렙토미세스(*Streptomyces*)를 포함한다. 이러한 예들은 제한적이기보다는 예시적이다. 균주 W3110은 재조합 DNA 생성물 발효를 위한 통상적인 숙주 균주이기 때문에 특히 바람직한 숙주 또는 모 숙주 중 하나이다. 바람직하게는, 숙주 세포는 최소량의 단백질분해 효소를 분비한다. 예를 들어 균주 W3110은 숙주에 내인성인 단백질을 코딩하는

유전자에 유전자 돌연변이가 발생하도록 변형될 수 있고, 이러한 숙주의 예는 완전한 유전자형 tonA를 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 1A2, 완전한 유전자형 tonA ptr3을 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 9E4, 완전한 유전자형 tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kanr을 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 27C7 (ATCC 55,244), 완전한 유전자형 tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kanr을 갖는 이. 콜라이 W3110 균주 37D6, 비-카나마이신 내성 degP 결실 돌연변이를 갖는 균주 37D6인 이. 콜라이 W3110 균주 40B4, 및 미국 특허 번호 4,946,783 (1990년 8월 7일 허여)에 개시된 돌연변이체 주변세포질 프로테아제를 갖는 이. 콜라이 균주를 포함한다. 대안적으로, 시험관내 클로닝 방법, 예를 들어 PCR 또는 다른 핵산 폴리머라제 반응이 적합하다.

[0464] 전장 항체, 항체 단편 및 항체 융합 단백질은 특히 글리코실화 및 Fc 이펙터 기능이 필요하지 않는 경우, 예컨대 치료 항체가 세포독성제 (예를 들어, 독소)에 접합되고 면역접합체 자체가 종양 세포 파괴에 효과를 나타내는 경우에 박테리아에서 생성될 수 있다. 전장 항체는 순환 반감기가 더 길다. 이. 콜라이에서의 생성은 보다 신속하고 보다 비용 효율적이다. 항체 단편 및 폴리펩티드를 박테리아에서 발현시키는 경우에는, 예를 들어 발현 및 분비를 최적화하기 위한 번역 개시 영역 (TIR) 및 신호 서열이 기재된 U.S. 5,648,237 (Carter et al.), U.S. 5,789,199 (Joly et al.) 및 U.S. 5,840,523 (Simmons et al.) (이들 특허는 본원에 참고로 포함됨)을 참조한다. 발현 후에, 항체를 가용성 분획 중의 이. 콜라이 세포 페이스트로부터 단리하고, 예를 들어 이소형에 따라 단백질 A 또는 G 칼럼을 통해 정제할 수 있다. 최종 정제는 예를 들어 CHO 세포 내에서 발현된 항체를 정제하는 방법과 유사하게 수행될 수 있다.

[0465] 원핵생물 이외에, 진핵 미생물, 예컨대 필라멘트형 진균 또는 효모가 항-TAT 항체- 또는 TAT 폴리펩티드-코딩 벡터의 적합한 클로닝 또는 발현 숙주이다. 사카로미세스 세레비시아에 (*Saccharomyces cerevisiae*)는 통상적으로 사용되는 보다 낮은 진핵 숙주 미생물이다. 다른 미생물에는 스킴조사카로미세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*) (문헌 [Beach and Nurse, Nature, 290:140 [1989]], 1985년 5월 2일에 공개된 EP 139,383), 클루이베로미세스 (*Kluyveromyces*) 숙주 (미국 특허 번호 4,943,529; 문헌 [Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)]), 예컨대 예를 들어, 케이. 락티스 (*K. lactis*) (MW98-8C, CBS683, CBS4574; 문헌 [Louvencourt et al., J. Bacteriol., 154(2):737-742 [1983]]), 케이. 프라길리스 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424), 케이. 불가리쿠스 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045), 케이. 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. 써모톨레란스 (*K. thermotolerans*) 및 케이. 마르시아누스 (*K. marxianus*); 야로위아 (*Yarrowia*) (EP 402,226); 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070; 문헌 [Sreekrishna et al., J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]]); 칸디다 (*Candida*); 트리코더마 레시아 (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234); 뉴로스포라 크라사 (*Neurospora crassa*) (문헌 [Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]]); 슈와니오미세스 (*Schwanniomyces*), 예컨대 슈와니오미세스 옥시덴탈리스 (*Schwanniomyces occidentalis*) (1990년 10월 31일에 공개된 EP 394,538) 및 필라멘트형 진균, 예컨대 뉴로스포라 (*Neurospora*), 페니실륨 (*Penicillium*), 톨리포클라디움 (*Tolypocladium*) (1991년 1월 10일에 공개된 WO 91/00357) 및 아스페르길루스 (*Aspergillus*) 숙주, 예컨대 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. 니거 (*A. niger*) (문헌 [Kelly and Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]])가 포함된다. 메틸영양요구성 효모가 본원에서 적합하고, 한세눌라(*Hansenula*), 칸디다, 클로에케라 (*Kloeckera*), 피키아, 사카로미세스, 톨로롭시스(*Torulopsis*) 및 로도토룰라(*Rhodotorula*)로 이루어진 속으로부터 선택된, 메탄올에서 성장할 수 있는 효모를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 이러한 클래스의 효모의 예시적인 특정 종의 목록은 문헌 [C. Anthony, The Biochemistry of Methylophils, 269 (1982)]에서 찾을 수 있다.

[0466] 글리코실화된 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 발현에 적합한 숙주 세포는 다세포 유기체로부터 유래된다. 무척추동물 세포의 예는 곤충 세포, 예컨대 드로소필라(*Drosophila*) S2 및 스포도프테라(*Spodoptera*) Sf9 뿐만 아니라, 식물 세포, 예컨대 면화, 옥수수, 감자, 대두, 페튜니아, 토마토 및 담배의 세포 배양물을 포함한다. 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*) (모충), 아에데스 아에집티(*Aedes aegypti*) (모기), 아에데스 알보픽투스(*Aedes albopictus*) (모기), 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*) (과일파리), 및 봄빅스 모리(*Bombyx mori*)와 같은 숙주로부터의 수많은 바칼로바이러스 균주 및 변이체, 및 상응하는 증식 허용성 곤충 숙주 세포가 확인되어 있다. 다양한 형질감염용 바이러스 균주, 예를 들어, 아우토그라파 칼리포르니카(*Autographa californica*) NPV의 L-1 변이체 및 봄빅스 모리 NPV의 Bm-5 균주가 공개적으로 이용가능하고, 이러한 바이러스들은, 특히 스포도프테라 프루기페르다 세포의 형질감염을 위해, 본 발명에 따라 본원에서 바이

러스로 사용될 수 있다.

- [0467] 그러나, 척추동물 세포가 가장 흥미롭고, 배양물 (조직 배양물)에서의 척추동물 세포의 증식은 통상적인 절차가 되어 있다. 유용한 포유동물 숙주 세포주의 예는 SV40에 의해 형질전환된 원숭이 신장 CV1 세포주 (COS-7, ATCC CRL 1651); 인간 배아 신장 세포주 (293 또는 현탁 배양하에 성장하도록 서브클로닝된 293 세포, 문헌 [Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)]); 새끼 햄스터 신장 세포 (BHK, ATCC CCL 10); 차이니스 햄스터 난소 세포/-DHFR (CHO, 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)]); 마우스 세르톨리 세포 (TM4, 문헌 [Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)]); 원숭이 신장 세포 (CV1 ATCC CCL 70); 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 인간 자궁경부 암종 세포 (HELA, ATCC CCL 2); 개 신장 세포 (MDCK, ATCC CCL 34); 버팔로 래트 간 세포 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 인간 폐 세포 (W138, ATCC CCL 75); 인간 간 세포 (Hep G2, HB 8065); 마우스 유방 종양 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI 세포 (문헌 [Mather et al., Annals N. Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)]); MRC 5 세포; FS4 세포; 및 인간 간종양 세포주 (Hep G2)이다.
- [0468] 숙주 세포를 상기 기재된 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 생성을 위한 발현 또는 클로닝 벡터로 형질전환시킨 다음, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 원하는 서열을 코딩하는 유전자를 증폭시키기 위해 적절하게 변형시킨 통상적인 영양 배지에서 배양시킨다.
- [0469] 3. 복제가능한 벡터의 선택 및 사용
- [0470] 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 (예를 들어, cDNA 또는 게놈 DNA)은 클로닝 (DNA의 증폭) 또는 발현을 위해 복제가능한 벡터 내로 삽입될 수 있다. 다양한 벡터가 공개적으로 이용가능하다. 벡터는, 예를 들어 플라스미드, 코스미드, 바이러스 입자 또는 파지의 형태일 수 있다. 적절한 핵산 서열을 다양한 절차를 통해 벡터에 삽입할 수 있다. 일반적으로, 당업계 공지 기술을 이용하여, DNA를 적절한 제한 엔도뉴클레아제 부위(들)에 삽입한다. 벡터 성분은 일반적으로 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 마커 유전자, 인핸서 요소, 프로모터 및 전사 종결 서열 중 하나 이상을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이들 성분 중 하나 이상을 함유하는 적합한 벡터의 구축은 당업자에게 공지된 표준 라이게이션 기술을 이용한다.
- [0471] TAT는 직접적으로, 뿐만 아니라 신호 서열, 또는 성숙 단백질 또는 폴리펩티드의 N-말단에 특이적 절단 부위를 갖는 다른 폴리펩티드일 수 있는 이중성 폴리펩티드와의 융합 폴리펩티드로서 재조합 방식으로 생성할 수 있다. 일반적으로, 신호 서열은 벡터의 성분일 수 있거나, 또는 벡터 내로 삽입되는 항-TAT 항체- 또는 TAT 폴리펩티드-코딩 DNA의 일부일 수 있다. 신호 서열은 예를 들어 알칼리성 포스파타제, 페니실리나제, lpp, 또는 열-안정성 장독소 II 리더의 군으로부터 선택된 원핵생물 신호 서열일 수 있다. 효모 분비를 위해, 신호 서열은 예를 들어 효모 인버타제 리더, 알파 인자 리더 (사카로미세스 및 미국 특허 번호 5,010,182에 기재된 클루이베로미세스 α 인자 리더 포함) 또는 산 포스파타제 리더, 씨. 알비칸스(C. albicans) 글루코아밀라제 리더 (1990년 4월 4일에 공개된 EP 362,179) 또는 WO 90/13646 (1990년 11월 15일에 공개)에 기재된 신호일 수 있다. 포유동물 세포 발현시에, 포유동물 신호 서열, 예컨대 동일 또는 관련 종의 분비된 폴리펩티드로부터의 신호 서열 뿐만 아니라 바이러스 분비 리더가 단백질의 분비를 지지하는데 사용될 수 있다.
- [0472] 발현 벡터 및 클로닝 벡터는 둘 다 벡터가 하나 이상의 선택된 숙주 세포 내에서 복제될 수 있게 하는 핵산 서열을 함유한다. 이러한 서열은 다양한 박테리아, 효모 및 바이러스에 대해 주지되어 있다. 플라스미드 pBR322로부터의 복제 기점은 대부분의 그람-음성 박테리아에 적합하고, 2 μ 플라스미드 기점은 효모에 적합하며, 다양한 바이러스 기점 (SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, VSV 또는 BPV)은 포유동물 세포에서의 클로닝 벡터에 유용하다.
- [0473] 발현 및 클로닝 벡터는 전형적으로 선택가능한 마커라고도 불리는 선택 유전자를 함유할 것이다. 전형적인 선택 유전자는 (a) 항생제 또는 다른 독소, 예를 들어 암피실린, 네오마이신, 메토폭세이트 또는 테트라시클린에 대한 내성을 부여하거나, (b) 영양요구성 결핍을 보완하거나, 또는 (c) 복합 배지로부터 얻을 수 없는 중요 영양분을 공급하는 단백질을 코딩하고, 예를 들어 바실루스의 경우에는 D-알라닌 라세마제를 코딩하는 유전자이다.
- [0474] 포유동물 세포에 대한 적합한 선택 마커의 예는 항-TAT 항체- 또는 TAT 폴리펩티드-코딩 핵산을 받아들이는데 적극적인 세포의 확인을 가능하게 하는 것, 예컨대 DHFR 또는 티미딘 키나제이다. 야생형 DHFR을 사용할 때 적절한 숙주 세포는 문헌 [Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)]에 기재된 바와 같이 제조하여 증식시킨, DHFR 활성이 결여된 CHO 세포주이다. 효모에서 사용하기 적합한 선택 유전자는 효모 플라스미

드 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 트립토판 내에서 성장하는 능력이 결여된 효모의 돌연변이체 균주, 예를 들어 ATCC 번호 44076 또는 PEP4-1에 대한 선택 마커를 제공한다 (문헌 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)]).

[0475] 발현 및 클로닝 벡터는 통상적으로 mRNA 합성을 지시하도록 항-TAT 항체- 또는 TAT 폴리펩티드-코딩 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식되는 프로모터는 공지되어 있다. 원핵생물 숙주와 사용하기에 적절한 프로모터로는 β -락타마제 및 락토스 프로모터 시스템 (문헌 [Chang et al., Nature, 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 하이브리드 프로모터, 예컨대 tac 프로모터 (문헌 [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)])가 포함된다. 박테리아 시스템에 사용하기 위한 프로모터는 또한 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 DNA에 작동가능하게 연결된 샤인-달가노 (S.D.) 서열도 함유할 것이다.

[0476] 효모 숙주와 함께 사용하기에 적합한 프로모터 서열의 예는 3-포스포글리세레이트 키나제 (문헌 [Hitzeman et al. J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] 또는 다른 당분해 효소 (문헌 [Hess et al. J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968)], [Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)]), 예컨대 에놀라제, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데히드로게나제, 헥소키나제, 피루베이트 데카르복실라제, 포스포프룩토키나제, 글루코스-6-포스페이트 이소머라제, 3-포스포글리세레이트 뮤타제, 피루베이트 키나제, 트리오스포스페이트 이소머라제, 포스포글루코스 이소머라제 및 글루코키나제에 대한 프로모터를 포함한다.

[0477] 성장 조건에 의해 제어되는 전사의 추가의 이점을 갖는 유도성 프로모터인 다른 효모 프로모터는 알콜 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.

[0478] 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터의 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 전사는 예를 들어 바이러스, 예컨대 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스 (1989년 7월 5일에 공개된 UK 2,211,504), 아데노바이러스 (예컨대, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)의 게놈에서 얻은 프로모터, 이중 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터, 및 열 충격 프로모터 (단, 이러한 프로모터가 숙주 세포 시스템과 상용가능한 경우)에 의해 제어된다.

[0479] 보다 고등한 진핵생물에 의한 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 DNA의 전사는 인핸서 서열을 벡터 내로 삽입함으로써 증가시킬 수 있다. 인핸서는 해당 DNA의 전사가 증가되도록 프로모터에 작용하는, 통상적으로 약 10 내지 300 bp인 DNA의 시스-작용 요소이다. 다수의 인핸서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, α -태아단백질 및 인슐린)로부터 공지되어 있다. 그러나, 전형적으로는 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용할 것이다. 이것의 예는 복제 기점 하류 쪽 (bp 100-270)의 SV40 인핸서, 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점 하류 쪽의 폴리오마 인핸서 및 아데노바이러스 인핸서를 포함한다. 인핸서는 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드 코딩 서열의 위치 5' 또는 3'에서 벡터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 바람직하게는 프로모터로부터 5'의 부위에 위치한다.

[0480] 진핵 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간, 또는 다른 다세포 유기체로부터의 유핵 세포)에 사용되는 발현 벡터 역시 전사의 종결 및 mRNA의 안정화에 필요한 서열을 함유할 것이다. 이러한 서열은 진핵 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역으로부터 흔히 이용가능하다. 이들 영역은 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA의 비번역 부분 내의 폴리아데닐화 단편으로서 전사된 뉴클레오타이드 절편을 함유한다.

[0481] 제조할 척추동물 세포 배양물에서 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 합성에 이용하기에 적합한 또 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.

[0482] 4. 숙주 세포의 배양

[0483] 본 발명의 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드를 생성하는데 사용되는 숙주 세포는 다양한 배지 중에서 배양될 수 있다. 시판 배지, 예컨대 햄 F10 (시그마(Sigma)), 최소 필수 배지 (MEM) (시그마), RPMI-1640 (시그마) 및

둘베코 변형 이글 배지 (DMEM) (시그마)가 숙주 세포의 배양에 적합하다. 또한, [Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)], [Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)], 미국 특허 번호 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 또는 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 또는 미국 특허 Re. 30,985에 기재된 배지들 중 임의의 배지를 숙주 세포용 배양 배지로 사용할 수 있다. 임의의 이들 배지에는 필요에 따라 호르몬 및/또는 다른 성장 인자 (예컨대 인슐린, 트랜스페린 또는 표피 성장 인자), 염 (예컨대 염화나트륨, 칼슘, 마그네슘 및 포스페이트), 완충제 (예컨대 HEPES), 뉴클레오티드 (예컨대 아데노신 및 티미딘), 항생제 (예컨대 겐타마이신(GENTAMYCIN)TM 약물), 미량 원소 (통상적으로 마이크로몰 범위의 최종 농도로 존재하는 무기 화합물로서 정의됨) 및 글루코스 또는 등가의 에너지원이 보충될 수 있다. 임의의 다른 필요한 보충물이 당업자에게 공지된 적합한 농도로 또한 포함될 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현에 선택된 숙주 세포와 함께 기존에 사용된 것들이고, 당업자에게 명백할 것이다.

[0484] 5. 유전자 증폭/발현의 검출

[0485] 유전자 증폭 및/또는 발현은 예를 들어 본원에 제공된 서열을 기초로 하여, mRNA의 전사를 정량하는 통상적인 서던 블롯팅, 노던 블롯팅 (문헌 [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)]), 도트 블롯팅 (DNA 분석), 또는 적절하게 표지된 프로브를 사용한 계내 혼성화에 의해 샘플 내에서 직접 측정할 수 있다. 대안적으로, DNA 듀플렉스, RNA 듀플렉스, 및 DNA-RNA 하이브리드 듀플렉스 또는 DNA-단백질 듀플렉스를 포함한 특정 듀플렉스를 인식할 수 있는 항체를 사용할 수 있다. 다시, 항체를 표지할 수 있고, 듀플렉스가 표면에 결합하는 검정을 수행하여, 표면 상에 듀플렉스가 형성되었을 때 듀플렉스에 결합된 항체의 존재가 검출될 수 있도록 할 수 있다.

[0486] 대안적으로 유전자 발현은 유전자 생성물의 발현을 직접적으로 정량하기 위해, 면역학적 방법, 예컨대 세포 또는 조직 절편의 면역조직화학 염색 및 세포 배양물 또는 체액의 검정에 의해 측정될 수 있다. 면역조직화학 염색 및/또는 샘플 유체의 검정에 유용한 항체는 모노클로날이거나 폴리클로날일 수 있고, 임의의 포유동물에서 제조될 수 있다. 편리하게는, 항체는 천연 서열 TAT 폴리펩티드에 대항하여, 또는 본원에 제공된 DNA 서열에 기반한 합성 펩티드에 대항하여, 또는 TAT DNA에 융합되고 특이적 항체 에피토프를 코딩하는 외인성 서열에 대항하여 제조할 수 있다.

[0487] 6. 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드의 정제

[0488] 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 형태를 배양 배지로부터 또는 숙주 세포 용해물로부터 회수할 수 있다. 막 결합형인 경우에는, 적합한 세제 용액 (예를 들어, 트리톤(Triton)-X 100)을 사용하거나 효소에 의한 절단에 의해 이것을 막으로부터 방출시킬 수 있다. 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 발현에 사용되는 세포는 다양한 물리적 또는 화학적 수단, 예컨대 동결-해동 주기, 초음파처리, 기계적 파괴 또는 세포 용해제에 의해 파괴할 수 있다.

[0489] 제조합 세포 단백질 또는 폴리펩티드로부터 항-TAT 항체 및 TAT 폴리펩티드를 정제하는 것이 바람직할 수 있다. 하기 절차는 적합한 정제 절차의 예시이다: 이온-교환 칼럼 상에서의 분획화; 에탄올 침전; 역상 HPLC; 실리카 또는 양이온-교환 수지, 예컨대 DEAE 상에서의 크로마토그래피; 크로마토포커싱; SDS-PAGE; 황산암모늄 침전; 예를 들어 세파렉스 G-75를 사용하는 겔 여과; 오염물, 예컨대 IgG를 제거하기 위한 단백질 A 세파로스 칼럼; 및 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드의 에피토프-태그가 부착된 형태에 결합하기 위한 금속 킬레이팅 칼럼. 다양한 단백질 정제 방법을 이용할 수 있고, 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990)]; [Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982)]에 기재되어 있다. 선택되는 정제 단계(들)는 예를 들어 이용된 생성 공정의 특징, 및 생성된 특정 항-TAT 항체 또는 TAT 폴리펩티드에 따라 달라질 것이다.

[0490] 제조합 기술을 사용하는 경우, 항체는 세포 내에서 생성되거나, 주변세포질 공간 내에서 생성되거나, 또는 배지 내로 직접 분비될 수 있다. 항체가 세포 내에서 생성되는 경우, 제1 단계로서 입자형 잔해인 숙주 세포 또는 용해된 단편을 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 제거하였다. 문헌 [Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)]에는 이. 콜라이의 주변세포질 공간에 분비되는 항체를 분리하는 절차가 기재되어 있다. 간략하게, 세포 페이스트를 아세트산나트륨 (pH 3.5), EDTA 및 페닐메틸설포닐플루오라이드 (PMSF)의 존재하에 약 30분에 걸쳐 해동시킨다. 세포 잔해는 원심분리로 제거할 수 있다. 항체가 배지 내로 분비되는 경우, 일반적으로 이러한 발현 시스템으로부터의 상청액을 시판되는 단백질 농축 필터, 예를 들어, 아미콘(Amicon) 또는 밀리포어 펠리콘(Millipore Pellicon) 한외여과 장치를 사용하여 먼저 농축한다. 단백질분해를 억제하기 위해 프로테아제 억제제 예컨대 PMSF가 임의의 상기 단계에서 포함될 수 있고, 우발적인 오염물의 성장을 방지하기 위

해 항생제가 포함될 수 있다.

[0491] 세포로부터 제조된 항체 조성물은, 예를 들어 히드록시아파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 및 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제할 수 있는데, 친화성 크로마토그래피가 바람직한 정제 기술이다. 친화성 리간드로서의 단백질 A의 적합성은 항체에 존재하는 임의의 이뮤노글로불린 Fc 도메인의 중 및 이소형에 좌우된다. 단백질 A를 사용하여 인간 $\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 4$ 중쇄를 기초로 하는 항체를 정제할 수 있다 (문헌 [Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)]). 단백질 G는 모든 마우스 이소형 및 인간 $\gamma 3$ 에 대해 권장된다 (문헌 [Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)]). 친화성 리간드가 부착되는 매트릭스는 거의 대부분 아가로스로이지만, 다른 매트릭스도 이용가능하다. 기계적으로 안정한 매트릭스, 예컨대 제어형 다공성 유리 또는 폴리(스티렌디비닐)벤젠은 아가로스로 달성할 수 있는 것보다 유량을 더 빠르게 하고 처리 시간을 더 짧게 한다. 항체가 CH3 도메인을 포함하는 경우, 베이커본드(Bakerbond) ABXTM 수지 (제이. 티. 베이커(J. T. Baker), 뉴저지주 필립스버그)가 정제에 유용하다. 회수할 항체에 따라, 단백질 정제를 위한 다른 기술, 예컨대 이온-교환 칼럼에서의 분획화, 에탄올 침전, 역상 HPLC, 실리카에서의 크로마토그래피, 헤파린 세파로스(SEPHAROSE)TM 크로마토그래피, 음이온 또는 양이온 교환 수지 (예를 들어, 폴리아스파르트산 칼럼) 상에서의 크로마토그래피, 크로마토포커싱, SDS-PAGE 및 황산암모늄 침전이 또한 이용될 수도 있다.

[0492] 임의의 예비 정제 단계(들) 후에, 관심있는 대상 항체 및 오염물을 포함하는 혼합물에 대해 pH 약 2.5-4.5의 용리 완충제를 사용하는, 바람직하게는 낮은 염 농도 (예를 들어, 약 0-0.25 M 염)에서 수행되는 낮은 pH 소수성 상호작용 크로마토그래피를 실시할 수 있다.

[0493] J. 제약 제제

[0494] 본 발명에 따라 사용되는 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드, TAT 결합 유기 분자 및/또는 TAT 폴리펩티드의 치료 제제는 원하는 순도를 갖는 항체, 폴리펩티드, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 임의의 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제 (문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)])와 혼합하여 동결건조된 제제 또는 수용액의 형태로 저장을 위해 제조된다. 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이고, 완충제, 예를 들어 아세트이트, 트리스, 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예를 들어, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 핵사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예를 들어 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레솔); 저분자량 (약 10개 미만 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글리신, 글루타민, 아스파라진, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 등장화제, 예컨대 트레할로스 및 염화나트륨; 당, 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 계면활성제, 예컨대 폴리소르베이트; 염-형성 반대이온, 예를 들어 나트륨; 금속 착체 (예를 들어, Zn-단백질 착체); 및/또는 비-이온성 계면활성제, 예를 들어 트윈[®], 플루로닉스[®] 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 항체는 바람직하게는 항체를 5 내지 200 mg/ml, 바람직하게는 10 내지 100 mg/ml의 농도로 포함한다.

[0495] 본원의 제제는 또한 치료할 특정 적응증에 필요한 경우에는 1종 초과와 활성 화합물, 바람직하게는 서로 유해한 영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 화합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드, 또는 TAT 결합 유기 분자에 이외에, 하나의 제제 내에, 추가의 항체, 예를 들어, TAT 폴리펩티드 상의 상이한 에피토프에 결합하는 제2 항-TAT 항체, 또는 특정 암의 성장에 영향을 미치는 성장 인자와 같은 일부 다른 표적에 대한 항체를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 상기 조성물은 화학요법제, 세포독성제, 시토킴, 성장 억제제, 항-호르몬제 및/또는 심장보호제를 더 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

[0496] 활성 성분은 또한 예를 들어 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 각각 히드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐에, 콜로이드성 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로캡슐, 마이크로에멀전, 나노입자 및 나노캡슐)에, 또는 매크로에멀전에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 개시되어 있다.

- [0497] 지속 방출형 제제를 제조할 수 있다. 지속 방출형 제제의 적합한 예는 항체를 함유하는 소수성 고체 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하고, 상기 매트릭스는 성형품, 예를 들어 필름 또는 마이크로캡슐 형태이다. 지속 방출형 매트릭스의 예는 폴리에스테르, 히드로겔 (예를 들어, 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알콜)), 폴리락티드 (미국 특허 번호 3,773,919), L-글루탐산 및 γ 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 예컨대 루프론 데포(LUPRON DEPOT)[®] (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤리드 아세테이트로 이루어진 주사가능한 마이크로스피어), 및 폴리-D-(-)-3-히드록시부티르산을 포함한다.
- [0498] 생체내 투여에 사용될 제제는 멸균되어야 한다. 이는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 쉽게 달성된다.
- [0499] K. 항-TAT 항체, TAT 결합 올리고펩티드 및 TAT 결합 유기 분자를 사용한 진단 및 치료
- [0500] 암에서 TAT 발현을 결정하기 위해, 다양한 진단 검정이 이용가능하다. 한 실시양태에서, TAT 폴리펩티드 과다 발현은 면역조직화학 (IHC)에 의해 분석할 수 있다. 종양 생검으로부터의 파라핀 포매 조직 절편을 IHC 검정에 적용하고 하기TAT 단백질 염색 강도 기준을 부여할 수 있다.
- [0501] 스코어 0 - 염색이 관찰되지 않거나, 10% 미만의 종양 세포에서 막 염색이 관찰됨.
- [0502] 스코어 1+ - 희미한/거의 지각할 수 없는 막 염색이 10% 초과 종양 세포에서 검출됨. 세포는 단지 그의 막의 일부에서만 염색된다.
- [0503] 스코어 2+ - 약한 내지 중간 정도의 완전한 막 염색이 10% 초과 종양 세포에서 관찰됨.
- [0504] 스코어 3+ - 중간 정도 내지 강력한 정도의 완전한 막 염색이 10% 초과 종양 세포에서 관찰됨.
- [0505] TAT 폴리펩티드 발현에 대해 0 또는 1+ 스코어를 갖는 종양은 TAT를 과다발현하지 않는 것으로 특성화될 수 있는 반면, 2+ 또는 3+ 스코어를 갖는 종양은 TAT를 과다발현하는 것으로 특성화될 수 있다.
- [0506] 대안적으로 또는 추가로, FISH 검정, 예컨대 인폼(INFORM)[®] (벤탐나(Ventana) (아리조나주)에 의해 시판됨) 또는 패스비전(PATHVISION)[®] (비시스(Vysis), 일리노이주)을 포르말린-고정되고 파라핀-포매된 종양 조직 상에서 수행하여, 종양에서 TAT 과다발현 (존재하는 경우)의 정도를 결정할 수 있다.
- [0507] TAT 과다발현 또는 증폭은 예를 들어 검출할 분자에 결합하고 검출가능한 표지 (예를 들어, 방사성 동위원소 또는 형광 표지)로 태그가 부착된 분자 (예를 들어, 항체, 올리고펩티드 또는 유기 소분자)를 투여하고 표지의 국재화를 위해 환자를 외부에서 스캐닝함으로써 생체내 검출 검정을 사용하여 평가할 수 있다.
- [0508] 상기 기재된 바와 같이, 본 발명의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 및 유기 분자는 다양한 비-치료 용도를 갖는다. 본 발명의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 및 유기 분자는 TAT 폴리펩티드-발현 암의 진단 및 병기분류에 유용할 수 있다 (예를 들어, 방사선촬영에서). 항체, 올리고펩티드 및 유기 분자는 또한 세포로부터 TAT 폴리펩티드의 정제 또는 면역침전을 위해, 시험관 내에서, 예를 들어, ELISA 또는 웨스턴 블롯에서 TAT 폴리펩티드의 검출 및 정량을 위해, 다른 세포의 정제에서 하나의 단계로서 혼합된 세포의 집단으로부터 TAT-발현 세포를 사멸 및 제거하기 위해 유용하다.
- [0509] 현재, 암의 단계에 따라, 암 치료는 하기 요법 중 하나 또는 조합을 수반하였다: 암성 조직의 제거 수술, 방사선요법 및 화학요법. 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자 요법은 화학요법의 독성 및 부작용을 잘 견디지 못하는 노인 환자에서, 및 방사선요법의 유용성이 제한적인 전이성 질환에서 특히 바람직할 수 있다. 본 발명의 종양 표적화 항-TAT 항체, 올리고펩티드 및 유기 분자는 질환의 초기 진단시에 또는 재발 동안 TAT-발현 암을 완화시키는데 유용하다. 치료 용도를 위해, 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 단독으로 사용될 수도 있고, 또는 예를 들어 호르몬, 항혈관신생제 또는 방사성표지된 화합물과 조합되어 사용될 수도 있고, 또는 수술, 저온요법 및/또는 방사선요법과 조합되어 사용될 수도 있다. 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자 치료제는 다른 형태의 통상적인 요법과 함께, 그와 연속적으로 또는 통상적인 요법 이전 또는 이후에 투여될 수 있다. 화학요법 약물, 예를 들어 탁소테레[®] (도세탁셀), 탁솔[®] (파클리탁셀), 에스트라무스틴 및 미톡산트론은 특히 저위험군 환자에서 암을 치료하는데 사용된다. 암을 치료 또는 완화하기 위한 본 발명의 방법에서, 암 환자에게 하나 이상의 상기 화학요법제를 사용한 치료와 병행하여 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 투여할 수 있다. 특히, 파클리탁셀 및 변형된 유도체를 사용한 조합 요법 (예를 들어, EP0600517 참조)이 고려된다. 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 치료 유효량의 화학요법제와 함께

투여될 것이다. 또 다른 실시양태에서, 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 화학요법제, 예를 들어 파클리탁셀의 활성 및 효능을 증진시키기 위해 화학요법제와 함께 투여된다. 문헌 [Physicians' Desk Reference (PDR)]은 다양한 암의 치료에 사용되었던 이들 작용제의 용량을 개시한다. 이들 언급된 화학요법 약물의 치료 효과적인 투약법 및 투여량은 치료할 특정 암, 질환의 정도 및 당업계 전문가가 잘 알고 있는 다른 인자에 따라 달라질 것이고, 전문가가 결정할 수 있다.

[0510] 한 특정 실시양태에서, 세포독성제에 접합된 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 포함하는 접합체가 환자에게 투여된다. 바람직하게는, TAT 단백질에 결합된 면역접합체는 세포에 의해 내재화되어, 이것이 결합하는 암 세포를 사멸시키는데 있어서 면역접합체의 치료 효능을 증가시킨다. 바람직한 실시양태에서, 세포독성제는 암 세포에서 핵산을 표적으로 하거나 방해한다. 이러한 세포독성제의 예는 상기 기재되어 있고, 메이탄시노이드, 칼리케아미신, 리보뉴클레아제 및 DNA 엔도뉴클레아제를 포함한다.

[0511] 항-TAT 항체, 올리고펩티드, 유기 분자 또는 이들의 독소 접합체는 인간 환자에게 공지의 방법에 따라, 예컨대 볼루스로서 예를 들어 정맥내 투여되거나, 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입에 의해, 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활액낭내, 경막내, 경구, 국소 또는 흡입 경로에 의해 투여된다. 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자의 정맥내 또는 피하 투여가 바람직하다.

[0512] 다른 치료법이 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자의 투여와 조합될 수 있다. 조합 투여는 별개의 제제 또는 단일 제약 제제를 사용하는 동시 투여, 및 임의의 순서로의 연속 투여를 포함하고, 여기서 바람직하게는 둘 다의 (또는 모든) 활성제가 이들의 생물학적 활성을 동시에 발휘하는 일정 기간이 존재한다. 바람직하게는 이러한 조합 요법은 상승작용적 치료 효과를 나타낸다.

[0513] 항-TAT 항체(들), 올리고펩티드 또는 유기 분자의 투여를 특정 암과 관련이 있는 또 다른 종양 항원에 대해 지시된 항체의 투여와 조합하는 것이 또한 바람직할 수 있다.

[0514] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 치료적 치료 방법은 항-TAT 항체 (또는 항체들), 올리고펩티드 또는 유기 분자 및 하나 이상의 화학요법제 또는 성장 억제제의 조합 투여 (상기한 화학요법제들의 각테일의 동시 투여를 포함함)를 포함한다. 화학요법제는 에스트라무스틴 포스페이트, 프레드니무스틴, 시스플라틴, 5-플루오로우라실, 멜팔란, 시클로포스파미드, 히드록시우레아 및 히드록시우레아탁산 (예컨대, 파클리탁셀 및 도세탁셀) 및/또는 안트라시클린 항생제를 포함한다. 이러한 화학요법제에 대한 제조 및 투여 스케줄은 제조업체의 지침에 따라 또는 숙련된 진료의가 경험적으로 결정하는 바에 따라 이용될 수 있다. 또한, 상기 화학요법제의 제조 및 투약 계획은 문헌 [Chemotherapy Service Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)]에 기재되어 있다.

[0515] 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 항-호르몬 화합물; 예를 들어 항-에스트로겐 화합물, 예를 들어 타목시펜; 항-프로게스테론, 예컨대 오나프리스톤 (EP 616 812 참조); 또는 항-안드로겐, 예를 들어 플루타미드와 이러한 분자에 대해 공지된 용량으로 조합될 수 있다. 치료할 암이 안드로겐에 비-의존성인 암인 경우에, 환자는 항-안드로겐 요법을 미리 받았을 수 있고, 암이 안드로겐에 비-의존성으로 된 후에 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자 (및 임의로는 본원에 기재된 바와 같은 다른 작용제)를 환자에게 투여할 수 있다.

[0516] 때로는, 또한 심장보호제 (요법과 관련이 있는 심근 기능이상을 예방 또는 감소시키기 위해서임) 또는 하나 이상의 시토카인을 환자에게 동시 투여하는 것이 유익할 수 있다. 상기 치료 요법에 추가하여, 환자에게 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자 요법 이전에, 그와 동시에 또는 그 이후에 암 세포의 수술 제거 및/또는 방사선요법을 실시할 수 있다. 상기 동시 투여되는 임의의 작용제에 대한 적합한 투여량은 현재 사용되고 있는 양이고, 작용제와 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자의 조합 작용 (상승작용)으로 인해 낮춰질 수 있다.

[0517] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 투여량 및 투여 방식은 공지된 기준에 따라 전문가가 선택할 것이다. 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자의 적절한 투여량은 상기 규정한 바와 같은 치료할 질환의 종류, 질환의 중증도 및 과정, 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자가 예방 목적으로 투여되는지 치료 목적으로 투여되는지 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자에 대한 반응, 및 담당의의 판단에 따라 결정될 것이다. 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 환자에게 적합하게는 1회 또는 일련의 치료에 걸쳐 투여된다. 바람직하게는, 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 정맥내 주입 또는 피하 주사에 의해 투여된다. 질환의 유형 및 중증도에 따라, 예를 들어 1회 이상의 별개 투여에 의해서든 연속 주입에 의해서든 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 약 50 mg/kg 체중 (예를 들어, 약 0.1-15 mg/kg /용량)의 항체가 환자에게 투여하기 위한 초기 후보 투여량일 수 있다. 투약 처방은 항-TAT 항체를 약 4 mg/kg 의 초기 로딩 용량으로 투여한 후에 약 2 mg/kg 의 항-TAT 항체를 매

주 유지 용량으로 투여하는 것을 포함한다. 그러나, 또 다른 투여량 처방이 유용할 수 있다. 전형적인 1일 투여량은 상기 언급된 인자에 따라 약 1 $\mu\text{g/kg}$ 내지 100 mg/kg 또는 그 초과 범위일 수 있다. 수일 이상에 걸친 반복 투여의 경우, 상태에 따라 원하는 질환 증상이 억제될 때까지 치료를 지속한다. 이러한 요법의 진행은 통상적인 방법 및 검정을 이용하고 전문의 또는 다른 당업자에게 공지되어 있는 기준에 기초하여 쉽게 모니터링될 수 있다.

[0518] 항체 단백질을 환자에 투여하는 것 이외에도, 본 출원은 유전자 요법에 의한 항체의 투여를 고려한다. 항체를 코딩하는 핵산의 이러한 투여는 표현 "치료 유효량의 항체의 투여"에 포함된다. 세포내 항체를 생성하기 위한 유전자 요법의 사용에 관해서는 예를 들어, 1996년 3월 14일에 공개된 W096/07321을 참조한다.

[0519] 핵산 (임의로 벡터에 함유된 것)을 생체내 및 생체외에서 환자의 세포에 도입하기 위한 2가지 주요 접근법이 존재한다. 생체내 전달의 경우, 핵산은 통상적으로 항체가 필요한 부위에서 환자에게 직접 주사된다. 생체외 치료의 경우, 환자의 세포를 떼어내고, 핵산을 이들 단리된 세포에 도입하고, 변형된 세포를 직접 또는 예를 들어 환자에게 이식되는 다공성 막 내에 캡슐화시켜 환자에게 투여한다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,892,538 및 5,283,187 참조). 핵산을 살아있는 세포에 도입하는 다양한 기술이 이용가능하다. 이러한 기술은 핵산이 배양된 세포로 시험관내 전달되는지 또는 의도된 숙주의 세포로 생체내 전달되는지에 따라 달라진다. 핵산을 포유동물 세포로 시험관내 전달하는데 적합한 기술은 리포솜, 전기전공, 미세주사, 세포 융합, DEAE-텍스트란, 인산 칼슘 침전 방법 등의 이용을 포함한다. 유전자의 생체외 전달에 통상적으로 사용되는 벡터는 레트로바이러스 벡터이다.

[0520] 현재 바람직한 생체내 핵산 전달 기술은 바이러스 벡터 (예컨대 아데노바이러스, 제I형 단순 포진 바이러스 또는 아데노-관련 바이러스) 및 지질-기반 시스템 (유전자의 지질 매개 전달에 유용한 지질은 예를 들어 DOTMA, DOPE 및 DC-Chol임)을 사용한 형질감염을 포함한다. 현재 공지된 유전자 표지 및 유전자 요법 프로토콜에 관한 검토는 문헌 [Anderson et al., Science 256:808-813 (1992)]을 참조한다. 또한 WO 93/25673 및 여기에 인용된 참고문헌을 참조한다.

[0521] 본 발명의 항-TAT 항체는 본원에서의 "항체"의 정의에 포함되는 여러가지 형태일 수 있다. 따라서, 상기 항체는 전장 또는 무손상 항체, 항체 단편, 천연 서열 항체 또는 아미노산 변이체, 인간화, 키메라 또는 융합 항체, 면역접합체, 및 이들의 기능적 단편을 포함한다. 융합 항체에서, 항체 서열은 이중 폴리펩티드 서열에 융합된다. 항체는 원하는 이펙터 기능이 제공되도록 Fc 영역에서 변형될 수 있다. 본원의 섹션에서 더 상세하게 논의된 바와 같이, 세포 표면에 결합된 네이키드 항체는 적절한 Fc 영역을 사용하여 예를 들어 항체-의존성 세포성 세포독성 (ADCC)을 통해 또는 보체-의존성 세포독성에서 보체를 동원함으로써, 또는 일부 다른 메커니즘에 의해 세포독성을 유도할 수 있다. 대안적으로, 부작용 또는 치료 합병증을 최소화하도록 이펙터 기능을 제거하거나 감소시키는 것이 바람직한 경우에는 특정 다른 Fc 영역을 사용할 수 있다.

[0522] 한 실시양태에서, 항체는 본 발명의 항체와 동일한 에피토프에의 결합에 대해 경쟁하거나 이러한 에피토프에 실질적으로 결합한다. 본 발명의 항-TAT 항체의 생물학적 특성, 특히 예를 들어 생체내 종양 표적화 및 임의의 세포 증식 억제 또는 세포독성 특성을 갖는 항체가 또한 고려된다.

[0523] 상기 항체의 생성 방법은 본원에 상세하게 기재되어 있다.

[0524] 본 발명의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 및 유기 분자는 포유동물에서 TAT-발현 암을 치료하거나 상기 암의 하나 이상의 증상을 완화시키는데 유용하다. 이러한 암은 전립선암, 요로암, 폐암, 유방암, 결장암 및 난소암, 보다 특히 전립선 선암종, 신장 세포 암종, 결장직장 선암종, 폐 선암종, 폐 편평 세포 암종 및 흉막 중피종을 포함한다. 암은 상기한 임의의 암의 전이성 암을 포함한다. 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 포유동물에서 TAT 폴리펩티드를 발현하는 암 세포의 적어도 일부에 결합할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 세포상의 TAT 폴리펩티드에 결합시에 시험관내 또는 생체내에서 TAT-발현 종양 세포를 파괴 또는 사멸시키거나 또는 이러한 종양 세포의 성장을 억제하는데 효과적이다. 이러한 항체는 네이키드 항-TAT 항체 (임의의 작용제에 접합되지 않은 것)를 포함한다. 세포독성 또는 세포 성장 억제 특성을 갖는 네이키드 항체에는 종양 세포 파괴에서 이것을 훨씬 더 강력하게 하는 세포독성제를 더 포함시킬 수 있다. 세포독성 특성은 예를 들어 항-TAT 항체를 세포독성제와 접합시켜서 본원에 기재된 바와 같은 면역접합체를 형성함으로써 상기 항체에 부여될 수 있다. 세포독성제 또는 성장 억제제는 바람직하게는 소분자이다. 독소, 예컨대 칼리케아미신 또는 메이탄시노이드 및 그의 유사체 또는 유도체가 바람직할 수 있다.

[0525] 본 발명은 본 발명의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자, 및 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 암

치료 목적을 위해, 조성물은 이러한 치료를 필요로 하는 환자에게 투여될 수 있고, 여기서 조성물은 면역접합체 또는 네이키드 항체로서 존재하는 하나 이상의 항-TAT 항체를 포함할 수 있다. 추가의 실시양태에서, 상기 조성물은 이들 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 다른 치료제, 예를 들어 세포독성제 또는 성장 억제제, 예컨대 화학요법제와 조합하여 포함할 수 있다. 본 발명은 또한 본 발명의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자, 및 담체를 포함하는 제제를 제공한다. 한 실시양태에서, 제제는 제약상 허용되는 담체를 포함하는 치료 제제이다.

[0526] 본 발명의 또 다른 측면은 항-TAT 항체를 코딩하는 단리된 핵산이다. 천연 서열 항체, 뿐만 아니라 항체의 변이체, 변형체 및 인간화 버전을 코딩하는 채인 H 및 L쇄 둘 다, 및 특히 초가변 영역 잔기를 코딩하는 핵산이 포함된다.

[0527] 본 발명은 또한 치료 유효량의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 TAT 폴리펩티드-발현 암을 치료하거나 상기 암의 하나 이상의 증상을 완화시키는데 유용한 방법을 제공한다. 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자의 치료 조성물은 전문의의 지시에 따라 단기 (급성) 또는 장기 또는 간헐적으로 투여될 수 있다. 또한, TAT 폴리펩티드-발현 세포의 성장을 억제하고, 상기 세포를 사멸시키는 방법도 제공된다.

[0528] 본 발명은 또한 적어도 하나의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 포함하는 키트 및 제조품을 제공한다. 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 함유하는 키트는 예를 들어 TAT 세포 사멸 검정, 세포로부터 TAT 폴리펩티드의 정제 또는 면역침전에 사용된다. 예를 들어, TAT의 단리 및 정제를 위해, 키트는 비드 (예를 들어, 세파로스 비드)에 커플링된 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 함유할 수 있다. 시험관내에서, 예를 들어 ELISA 또는 웨스턴 블롯팅에서 TAT를 검출하고 정량하기 위해서 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 함유하는 키트가 제공될 수 있다. 검출에 유용한 이러한 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자는 표지, 예컨대 형광 또는 방사성표지와 함께 제공될 수 있다.

[0529] L. 제조품 및 키트

[0530] 본 발명의 또 다른 실시양태는 항-TAT 발현 암의 치료에 유용한 물질을 함유하는 제조품이다. 제조품은 용기, 및 용기상에 있거나 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 적절한 용기는, 예를 들어 병, 바이알, 시린지 등을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로부터 형성될 수 있다. 용기는 암 상태의 치료에 효과적인 조성물을 보유하고, 멸균 입구를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 정맥내 용액 백 또는 피하 주사 바늘로 뚫을 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있음). 조성물의 적어도 하나의 활성체는 본 발명의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자이다. 라벨 또는 포장 삽입물은 상기 조성물이 암의 치료에 사용됨을 나타낸다. 라벨 또는 포장 삽입물은 암 환자에게 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자 조성물을 투여하는 것에 대한 지침서를 더 포함할 것이다. 추가로, 제조품은 제약상 허용되는 완충제, 예컨대 정균 주사용수 (BWFI), 포스페이트 완충 염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2 용기를 더 포함할 수 있다. 제조품은 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘 및 시린지를 포함하여, 상업용 및 사용자 관점에서 바람직한 다른 물질을 더 포함할 수 있다.

[0531] 다양한 목적, 예를 들어 TAT-발현 세포 사멸 검정, 세포로부터 TAT 폴리펩티드의 정제 또는 면역침전에 유용한 키트도 제공된다. TAT 폴리펩티드의 단리 및 정제를 위해, 상기 키트는 비드 (예를 들어, 세파로스 비드)에 커플링된 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 함유할 수 있다. 시험관내에서, 예를 들어 ELISA 또는 웨스턴 블롯팅에서 TAT 폴리펩티드를 검출하고 정량하기 위해서 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 함유하는 키트가 제공될 수 있다. 제조품과 마찬가지로, 키트는 용기, 및 용기 상의 또는 용기와 결합된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 용기는 본 발명의 적어도 하나의 항-TAT 항체, 올리고펩티드 또는 유기 분자를 포함하는 조성물을 보유한다. 예를 들어 희석제 및 완충제, 대조군 항체를 함유하는 추가의 용기가 포함될 수 있다. 라벨 또는 포장 삽입물은 조성물의 기재된 뿐만 아니라 의도된 시험관내 또는 진단 용도에 대한 지침을 제공할 수 있다.

[0532] M. TAT 폴리펩티드 및 TAT-폴리펩티드 코딩 핵산의 용도

[0533] TAT 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 (또는 그의 상보체)은 혼성화 프로브로서, 염색체 및 유전자 맵핑에 있어서 및 안티센스 RNA 및 DNA 프로브의 생성에 있어서의 용도를 포함하여 분자 생물학 분야에서 다양한 용도를 갖는다. TAT 코딩 핵산은 또한 본원에 기재된 재조합 기술에 의한 TAT 폴리펩티드의 제조에 유용할 것이고, 여기서 이들 TAT 폴리펩티드는 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 항-TAT 항체의 제조에 유용할 수

있다.

[0534] 전장 천연 서열 TAT 유전자 또는 그의 일부는 전장 TAT cDNA를 단리하거나, 또는 본원에 개시된 천연 TAT 서열에 원하는 서열 동일성을 갖는 또 다른 cDNA (예를 들어, TAT의 천연 발생 변이체 또는 다른 종으로부터의 TAT를 코딩하는 cDNA)를 단리하는데 있어서 cDNA 라이브러리에 대한 혼성화 프로브로서 사용될 수 있다. 임의로, 프로브는 약 20 내지 약 50개 염기의 길이일 것이다. 혼성화 프로브는 과도한 실험 없이 결정될 수 있는, 전장 천연 뉴클레오타이드 서열의 적어도 부분적으로 신규한 영역 또는 천연 서열 TAT의 프로모터, 인핸서 요소 및 인트론을 포함하는 게놈 서열로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 스크리닝 방법은 공지의 DNA 서열을 사용하여 TAT 유전자의 코딩 영역을 단리함으로써 약 40개 염기의 선택된 프로브를 합성하는 것을 포함할 것이다. 혼성화 프로브는 32P 또는 35S와 같은 방사선뉴클레오타이드, 또는 아비딘/비오틴 커플링 시스템을 통해 프로브에 커플링된 알칼리성 포스파타제와 같은 효소 표지를 비롯한 다양한 표지로 표지될 수 있다. 본 발명의 TAT 유전자의 서열에 상보적인 서열을 갖는 표지된 프로브를 사용하여 인간 cDNA, 게놈 DNA 또는 mRNA의 라이브러리를 스크리닝함으로써 이러한 라이브러리 중에서 프로브가 혼성화되는 구성원을 결정할 수 있다. 혼성화 기술은 하기 실시예에 더 상세하게 기재되어 있다. 본원에 개시된 방법을 이용하여, 본 출원에 개시된 임의의 EST 서열을 프로브로서 유사하게 사용할 수 있다.

[0535] TAT-코딩 핵산의 다른 유용한 단편은 표적 TAT mRNA (센스) 또는 TAT DNA (안티센스) 서열에 결합할 수 있는 단일-가닥 핵산 서열 (RNA 또는 DNA)을 포함하는 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 본 발명에 따라, 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오타이드는 TAT DNA의 코딩 영역의 단편을 포함한다. 이러한 단편은 일반적으로 적어도 약 14개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 약 14 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 주어진 단백질 코딩하는 cDNA 서열을 기초로 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오타이드를 유도하는 능력, 예를 들어, 문헌 [Stein and Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988)] 및 [van der Krol et al. (BioTechniques 6:958, 1988)]에 기재되어 있다.

[0536] 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오타이드와 표적 핵산 서열의 결합은 듀플렉스의 형성을 야기하고, 이것은 듀플렉스의 분해 증진, 전사 또는 번역의 조기 종결을 비롯한 여러가지 수단 중 하나 또는 다른 수단에 의해 표적 서열의 전사 또는 번역을 차단한다. 이러한 방법은 본 발명에 포함된다. 따라서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 포유동물에서 암을 유도하는데 있어서 소정의 역할을 수행할 수 있는 TAT 단백질의 발현을 차단하는데 사용될 수 있다. 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된 당-포스포디에스테르 백본 (또는 다른 당 연결부, 예컨대 WO 91/06629에 기재된 것)를 갖는 올리고뉴클레오타이드를 더 포함하며, 여기서 이러한 당 연결부는 내인성 뉴클레아제에 내성이 있다. 내성이 있는 당 연결부를 갖는 이러한 올리고뉴클레오타이드는 생체내 안정하지만 (즉, 효소 분해에 대해 내성을 가질 수 있음), 표적 뉴클레오타이드 서열에 결합할 수 있는 서열 특이성을 보유한다.

[0537] 안티센스 결합에 바람직한 유전자내 부위는 유전자의 오픈 리딩 프레임 (ORF)의 번역 개시/출발 코돈 (5'-AUG/5'-ATG) 또는 종결/정지 코돈 (5'-UAA, 5'-UAG 및 5'-UGA/5'-TAA, 5'-TAG 및 5'-TGA)이 혼입된 영역을 포함한다. 이러한 영역은 번역 개시 또는 종결 코돈으로부터 어느 한쪽 방향 (즉, 5' 또는 3')으로의 약 25 내지 약 50개의 인접한 뉴클레오타이드를 포함하는 mRNA 또는 유전자의 일부를 나타낸다. 안티센스 결합에 바람직한 다른 영역은 다음을 포함한다: 인트론; 엑손; 인트론-엑손 접합부; 번역 개시 코돈과 번역 종결 코돈 사이의 영역인 오픈 리딩 프레임 (ORF) 또는 "코딩 영역"; 5'-5' 트리포스페이트 연결부를 통해 mRNA의 가장 5'쪽의 잔기에 연결된 N7-메틸화 구아노신 잔기를 포함하고, 5' 캡 구조 자체 뿐만 아니라 상기 캡에 인접한 최초 50개의 뉴클레오타이드를 포함하는 mRNA의 5' 캡; 번역 개시 코돈으로부터 5' 방향이고, 따라서 mRNA의 5' 캡 부위와 번역 개시 코돈 사이의 뉴클레오타이드 또는 유전자 상의 상응하는 뉴클레오타이드를 포함하는 mRNA의 일부인 5' 비번역 영역 (5'UTR); 및 번역 종결 코돈으로부터 3' 방향이고, 따라서 mRNA의 번역 종결 코돈과 3' 말단 사이의 뉴클레오타이드 또는 유전자 상의 상응하는 뉴클레오타이드를 포함하는 mRNA의 일부인 3' 비번역 영역 (3'UTR).

[0538] TAT 단백질의 발현 억제에 유용한 바람직한 안티센스 화합물의 구체적인 예는 변형된 백본 또는 비-천연 뉴클레오시드간 연결부를 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 변형된 백본을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 백본 내에 인 원자를 보유하는 것들 및 백본 내에 인 원자를 갖지 않는 것들을 포함한다. 본 명세서의 목적상, 및 당업계에서 종종 언급되는 바와 같이, 뉴클레오시드간 백본에 인 원자를 갖지 않는 변형된 올리고뉴클레오타이드 역시 올리고뉴클레오시드인 것으로 간주될 수 있다. 바람직한 변형된 올리고뉴클레오타이드 백본은 예를 들어 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 예를 들어 3'-알킬렌 포스포네이트, 5'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트, 포스피네이트, 포스포르아미데이트, 예를 들어 3'-아미노 포스포르아미데이트 및 아미노알

킬포스포르아미데이트, 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 통상적인 3'-5' 연결부를 갖는 셀레노포스페이트 및 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결 유사체, 및 1개 이상의 뉴클레오타이드간 연결부가 3'-3', 5'-5' 또는 2'-2' 연결부인, 역극성을 갖는 것을 포함한다. 역극성을 갖는 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 가장 3'쪽의 뉴클레오타이드간 연결부에서의 단일 3'-3' 연결부, 즉, 염기가 소실될 수 있는 (핵염기가 소실되거나 그 대신에 히드록실기를 가짐) 단일의 역전된 뉴클레오타이드 잔기를 포함한다. 다양한 염, 혼합 염 및 유리 산 형태 역시 포함된다. 인-함유 연결부의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 미국 특허 번호 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 및 5,625,050 (각각 본원에 참고로 포함됨)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0539] 인 원자를 내부에 포함하지 않는 바람직한 변형된 올리고뉴클레오타이드 백본은 단쇄 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오타이드간 연결부, 혼합 헤테로원자 및 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오타이드간 연결부, 또는 1개 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로시클릭 뉴클레오타이드간 연결부에 의해 형성된 백본을 갖는다. 이들은 모르폴리노 연결부 (뉴클레오타이드의 당 부분으로부터 부분적으로 형성됨)를 갖는 것들; 실록산 백본; 술피드, 술폭시드 및 술폰 백본; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 리보아세틸 백본; 알켄 함유 백본; 술폰아미드 백본; 메틸렌아미노 및 메틸렌히드라지노 백본; 술폰네이트 및 술폰아미드 백본; 아미드 백본; 및 혼합된 N, O, S 및 CH₂ 성분 일부를 갖는 다른 백본을 포함한다. 이러한 올리고뉴클레오타이드의 제조가 교시된 대표적인 미국 특허는 미국 특허 번호 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269 및 5,677,439 (각각 본원에 참고로 포함됨)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0540] 다른 바람직한 안티센스 올리고뉴클레오타이드에서, 뉴클레오타이드 단위의 당 및 뉴클레오타이드간 연결부 둘 다, 즉 백본은 새로운 기로 교체된다. 염기 단위는 적절한 핵산 표적 화합물과의 혼성화를 위해 유지된다. 우수한 혼성화 특성을 갖는 것으로 나타난 올리고뉴클레오타이드 모방체인 이러한 올리고머 화합물은 펩티드 핵산 (PNA)이라 지칭된다. PNA 화합물에서, 올리고뉴클레오타이드의 당-백본은 특정 아미노에틸글리신 백본에서 아미드 함유 백본으로 교체된다. 핵염기는 보유하고, 백본 아미드 부분의 아자 질소 원자에 직접 또는 간접적으로 결합된다. PNA 화합물 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허로는 미국 특허 번호 5,539,082; 5,714,331; 및 5,719,262 (이들 각각이 본원에서 참고로 포함됨)를 포함하나 이에 제한되지 않는다. PNA 화합물의 추가적인 교시를 문헌 [Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500]에서 확인할 수 있다.

[0541] 바람직한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 백본 및/또는 헤테로원자 백본, 특히 -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- [메틸렌 (메틸이미노) 또는 MMI 백본으로 공지됨], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- 및 -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- [여기서, 천연 포스포디에스테르 백본은 -O-P-O-CH₂-로 표시됨] (상기 언급된 미국 특허 번호 5,489,677에 기재됨), 및 상기 언급된 미국 특허 번호 5,602,240의 아미드 백본을 혼입시킨다. 또한, 상기 언급된 미국 특허 번호 5,034,506의 모르폴리노 백본 구조를 갖는 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 바람직하다.

[0542] 변형된 올리고뉴클레오타이드는 또한 1개 이상의 치환된 당 모이어티를 함유할 수 있다. 바람직한 올리고뉴클레오타이드는 2' 위치에서 다음 중 하나를 포함한다: OH; F; O-알킬, S-알킬 또는 N-알킬; O-알케닐, S-알케닐 또는 N-알케닐; O-알키닐, S-알키닐 또는 N-알키닐; 또는 O-알킬-O-알킬 (여기서, 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환되거나 치환되지 않은 C1 내지 C10 알킬 또는 C2 내지 C10 알케닐 및 알키닐일 수 있음). O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, 및 O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂ (여기서, n 및 m은 1 내지 약 10임)이 특히 바람직하다. 다른 바람직한 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 2' 위치에서 다음 중 하나를 포함한다: C1 내지 C10 저급 알킬, 치환된 저급 알킬, 알케닐, 알키닐, 알크아릴, 아르알킬, O-알크아릴 또는 O-아르알킬, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂, CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, 헤테로시클로알킬, 헤테로시클로알크아릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, RNA 절단 기, 리포터기, 인터칼레이터, 올리고뉴클레오타이드의 약력학적 특성을 개선시키는 기, 또는 올리고뉴클레오타이드의 약동학적 특성을 개선시키는 기, 및 유사한 특성을 갖는 다른 치환기. 바람직한 변형은 2'-메톡시에톡시 (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, 2'-O-(2-메톡시에틸) 또는 2'-MOE로 공지됨) (문헌 [Martin et al., Helv. Chim. Acta., 1995, 78, 486-504]), 즉 알콕시알콕

시 기를 포함한다. 추가의 바람직한 변형은 2'-디메틸아미노옥시에톡시, 즉, 하기 실시예에 기재된 바와 같은 2'-DMAOE라고도 공지된 $O(CH_2)_{20}N(CH_3)_2$ 기, 및 2'-디메틸아미노에톡시에톡시 (당업계에서 2'-O-디메틸아미노에톡시에틸 또는 2'-DMAEOE라고도 공지됨), 즉, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)를 포함한다.

[0543] 추가의 바람직한 변형은 2'-히드록실기가 당 고리의 3' 또는 4' 탄소 원자에 연결되어 비시클릭 당 모이어티를 형성한 잠금 핵산 (LNA)을 포함한다. 상기 연결부는 바람직하게는 2' 산소 원자 및 4' 탄소 원자를 가교시키는 메틸렌 (-CH₂-)_n 기 (여기서, n은 1 또는 2임)이다. LNA 및 그의 제법은 WO 98/39352 및 WO 99/14226에 기재되어 있다.

[0544] 다른 바람직한 변형은 2'-메톡시 (2'-O-CH₃), 2'-아미노프로폭시 (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-알릴 (2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-알릴 (2'-O-CH₂-CH=CH₂) 및 2'-플루오로 (2'-F)를 포함한다. 2'-변형은 아라비노 (상부) 위치 또는 리보 (하부) 위치에 있을 수 있다. 바람직한 2'-아라비노 변형은 2'-F이다. 또한, 유사한 변형이 올리고뉴클레오타이드 상의 다른 위치에서, 특히 3' 말단 뉴클레오타이드 상의 당 또는 2'-5' 연결된 올리고뉴클레오타이드에서의 3' 위치에서, 및 5' 말단 뉴클레오타이드의 5' 위치에서도 이루어질 수 있다. 또한, 올리고뉴클레오타이드는 펜토피라노실 당 대신에 당 모방체, 예컨대 시클로부틸 모이어티를 가질 수 있다. 이러한 변형된 당 구조의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 미국 특허 번호 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; 및 5,700,920 (각각 그 전문이 본원에 참고로 포함됨)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0545] 올리고뉴클레오타이드는 핵염기 (당업계에서 간단히 "염기"로 종종 지칭됨) 변형 또는 치환을 또한 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 "변형되지 않은" 또는 "천연" 핵염기는 퓨린 염기인 아데닌 (A) 및 구아닌 (G), 및 피리미딘 염기인 티미딘 (T), 시토신 (C) 및 우라실 (U)을 포함한다. 변형된 핵염기는 다른 합성 및 천연 핵염기, 예컨대 5-메틸시토신 (5-me-C), 5-히드록시메틸 시토신, 크산틴, 하이포크산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐 (-C≡C-CH₃ 또는 -CH₂-C≡CH) 우라실 및 시토신 및 피리미딘 염기의 다른 알킬닐 유도체, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-히드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노-아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-테아자구아닌 및 7-테아자아데닌 및 3-테아자구아닌 및 3-테아자아데닌을 포함한다. 추가적인 변형된 핵염기는 트리스클릭 피리미딘, 예컨대 폐녹사진 시티딘 (1H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조사진-2(3H)-온), 폐노티아진 시티딘 (1H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조티아진-2(3H)-온), G-클램프, 예컨대 치환된 폐녹사진 시티딘 (예를 들어, 9-(2-아미노에톡시)-H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조사진-2(3H)-온), 카르바졸 시티딘 (2H-피리미도[4,5-b]인돌-2-온), 피리도인돌 시티딘 (H-피리도[3',2':4,5]피롤로[2,3-d]피리미딘-2-온)을 포함한다. 변형된 핵염기는 또한 퓨린 또는 피리미딘 염기가 다른 헤테로시클로 교체된 것들, 예를 들어 7-테아자-아데닌, 7-테아자구아노신, 2-아미노피리딘 및 2-피리돈을 포함할 수도 있다. 추가적인 핵염기는 미국 특허 번호 3,687,808에 개시된 것들, 문헌 [The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990]에 개시된 것들, 및 문헌 [Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613]에 개시된 것들을 포함한다. 이들 핵염기 중 일부는 본 발명의 올리고머 화합물의 결합 친화도를 증가시키는데 특히 유용하다. 이들은 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린, 예를 들어 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함한다. 5-메틸시토신 치환은 0.6-1.2°C만큼 핵산 듀플렉스 안정성을 증가시키는 것으로 밝혀졌고 (문헌 [Sanghvi et al., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278), 보다 더 특히 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 조합될 때 바람직한 염기 치환이다. 변형된 핵염기의 제조가 교시된 대표적인 미국 특허는 미국 특허 번호 3,687,808, 뿐만 아니라 미국 특허 번호 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096; 5,681,941 및 5,750,692 (각각 본원에 참고로 포함됨)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0546] 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 변형은 상기 올리고뉴클레오타이드에 이것의 활성, 세포 분포 또는 세포 흡수를 증진시키는 하나 이상의 모이어티 또는 접합체를 화학적으로 연결시키는 것이다. 본 발명의 화합물은 관능기, 예컨대 1급 또는 2급 히드록실 기에 공유 결합된 접합체 기를 포함할 수 있다. 본 발명의 접합체 기는

인터칼레이터, 리포터 분자, 폴리아민, 폴리아미드, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에테르, 올리고머의 약동학적 특성을 증진시키는 기, 및 올리고머의 약력학적 특성을 증진시키는 기를 포함한다. 전형적인 접합체 기는 콜레스테롤, 지질, 양이온 지질, 인지질, 양이온성 인지질, 비오틴, 페나진, 플레이트, 페난트리딘, 안트라퀴논, 아크리딘, 플루오로세인, 로다민, 쿠마린 및 염료를 포함한다. 본 발명의 내용에서, 약동학적 특성을 증진시키는 기는 올리고머 흡수를 개선시키고/시키거나, 분해에 대한 올리고머 내성을 증진시키고/시키거나, RNA와의 서열-특이적 혼성화를 강화시키는 기를 포함한다. 본 발명의 내용에서, 약력학적 특성을 증진시키는 기는 올리고머 흡수, 분포, 대사 또는 배출을 개선시키는 기를 포함한다. 접합체 모이어티는 지질 모이어티, 예컨대 콜레스테롤 잔기 (문헌 [Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556]), 콜산 (문헌 [Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060]), 티오에테르, 예를 들어 핵실-S-트리틸티올 (문헌 [Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309], [Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770]), 티오펜 (문헌 [Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538]), 지방족 설퐜, 예를 들어 도데칸디올 또는 운데실 잔기 (문헌 [Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118], [Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330], [Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54]), 인지질, 예를 들어 디-핵사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸-암모늄 1,2-디-O-핵사데실-rac-글리세로-3-H-포스포네이트 (문헌 [Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654], [Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783]), 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 설퐜 (문헌 [Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973]) 또는 아다만탄 아세트산 (문헌 [Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654]), 팔미틸 모이어티 (문헌 [Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237] 또는 옥타데실아민 또는 핵실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤 모이어티를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또한, 본 발명의 올리고뉴클레오티드는 활성 약물 물질, 예를 들어 아스피린, 와르파린, 페닐부타존, 이부프로펜, 수프로펜, 펜부펜, 케토프로펜, (S)-(+)-프라노프로펜, 카르프로펜, 단실사르코신, 2,3,5-트리아이오도벤조산, 플루페남산, 폴린산, 벤조티아디아자이드, 클로로티아자이드, 디아제핀, 인도메티신, 바르비투레이트, 세팔로스포린, 술과 약물, 항당뇨병제, 항균제 또는 항생제에 접합될 수도 있다. 올리고뉴클레오티드-약물 접합체 및 그의 제조가 미국 특허 출원 번호 09/334,130 (1999년 6월 15일에 출원) 및 미국 특허 출원 번호 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 및 5,688,941 (각각 본원에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0547] 주어진 화합물의 모든 위치가 균일하게 변형될 필요는 없고, 사실상 1개 초과와 1개 이하의 변형이 단일 화합물 또는 심지어 올리고뉴클레오티드 내의 단일 뉴클레오티드에 도입될 수 있다. 본 발명은 또한 키메라 화합물인 안티센스 화합물도 포함한다. "키메라" 안티센스 화합물 또는 "키메라"는, 본 발명의 문맥에서, 각각 적어도 하나의 단량체 단위 (즉 올리고뉴클레오티드 화합물의 경우에는 뉴클레오티드)로 이루어진 2개 이상의 화학적으로 상이한 영역을 함유하는 안티센스 화합물, 특히 올리고뉴클레오티드이다. 전형적으로, 이들 올리고뉴클레오티드는, 뉴클레아제 분해에 대한 증가된 내성, 증가된 세포 흡수 및/또는 표적 핵산에 대한 증가된 결합 친화도가 올리고뉴클레오티드에게 부여되도록 올리고뉴클레오티드가 변형된 적어도 하나의 영역을 함유한다. 올리고뉴클레오티드의 추가의 영역은 RNA:DNA 또는 RNA:RNA 하이브리드를 절단할 수 있는 효소에 대한 기질로서 작용할 수 있다. 예를 들어, RNase H는 RNA:DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 절단하는 세포성 엔도뉴클레아제이다. 따라서, RNase H의 활성화로 인해 RNA 표적이 절단되어 유전자 발현의 올리고뉴클레오티드 억제제의 효율이 크게 증진된다. 결과적으로, 키메라 올리고뉴클레오티드가 사용되는 경우, 동일한 표적 영역에 혼성화되는 포스포로티오에이트 데옥시올리고뉴클레오티드와 비교할 때 더 짧은 올리고뉴클레오티드를 사용하여 유사한 결과가 종종 달성될 수 있다. 본 발명의 키메라 안티센스 화합물은 상기한 바와 같은 2개 이상의 올리고뉴클레오티드, 변형된 올리고뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드 및/또는 올리고뉴클레오티드 모방체의 복합 구조물로서 형성될 수 있다. 바람직한 키메라 안티센스 올리고뉴클레오티드에는 3' 말단에 뉴클레아제 내성을 부여하는 적어도 하나의 2' 변형된 당 (바람직하게는 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) 및 RNase H 활성을 부여하는 적어도 4개의 인접한 2'-H 당이 혼입되어 있다. 이러한 화합물은 당연계에서 하이브리드 또는 겹머라고도 지칭된다. 바람직한 겹머는 적어도 4개의 인접한 2'-H 당을 갖는 적어도 하나의 영역에 의해 분리된 3'-말단 및 5' 말단에서 2' 변형된 당 (바

람직하게는 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃)의 영역을 갖고, 바람직하게는 포스포로티오에이트 백본 연결부가 혼입되어 있다. 이러한 하이브리드 구조물의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 미국 특허 번호 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; 및 5,700,922 (각각 그 전문이 본원에 참고로 포함됨)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0548] 본 발명에 따라 사용되는 안티센스 화합물은 공지의 고체 상 합성 기술을 통해 편리하고 통상적으로 제조될 수 있다. 예를 들어 어플라이드 바이오시스템즈 (캘리포니아주 포스터 시티)를 포함하는 여러 판매처에서 이러한 합성을 위한 장치를 시판한다. 당업계에 공지된 이러한 합성을 위한 임의의 다른 수단을 추가로 또는 대안적으로 사용할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 포스포로티오에이트 및 알킬화된 유도체를 제조하는 유사한 기술을 이용하는 것이 공지되어 있다. 본 발명의 화합물은 또한 섭취, 분포 및/또는 흡수를 보조하기 위해 다른 분자, 분자 구조물 또는 화합물들의 혼합물, 예를 들어 리포솜, 수용체 표적화 분자, 경구, 직장, 국소 또는 다른 제제와 혼합되거나 이에 포획되거나 이와 접합되거나 또는 다른 방식으로 조합될 수도 있다. 이러한 섭취, 분포 및/또는 흡수 보조 제제의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 미국 특허 번호 5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,521,291; 5,543,158; 5,547,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; 5,512,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575; 및 5,595,756 (각각 본원에 참고로 포함됨)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0549] 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 다른 예는 유기 모이어티, 예를 들어, WO 90/10048에 기재된 모이어티, 및 표적 핵산 서열에 대한 올리고뉴클레오타이드의 친화도를 증가시키는 다른 모이어티, 예를 들어, 폴리-(L-리신)과 공유결합적으로 연결된 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 추가로, 엘립티신과 같은 인터칼레이팅제, 및 알킬화제 또는 금속 착제를 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 부착시켜서 표적 뉴클레오타이드 서열에 대한 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오타이드의 결합 특이성을 변형시킬 수 있다.

[0550] 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어 CaPO₄-매개 DNA 형질감염, 전기천공을 포함하는 임의의 유전자 전달 방법을 이용하거나 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스와 같은 유전자 전달 벡터를 사용함으로써 표적 핵산 서열을 함유하는 세포에 도입될 수 있다. 바람직한 절차에서, 안티센스 또는 센스 올리고뉴클레오타이드를 적합한 레트로바이러스 벡터에 삽입한다. 표적 핵산 서열을 함유하는 세포를 생체내 또는 생체외에서 재조합 레트로바이러스 벡터와 접촉시킨다. 적합한 레트로바이러스 벡터는 뮌헨 레트로바이러스 M-MuLV, N2 (M-MuLV로부터 유래된 레트로바이러스), 또는 DCT5A, DCT5B 및 DCT5C라고 지칭되는 이중 카피 벡터 (WO 90/13641 참조)로부터 유래된 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0551] 또한, WO 91/04753에 기재된 바와 같이, 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 리간드 결합 분자와의 접합체 형성을 통해서 표적 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 세포에 도입할 수도 있다. 적합한 리간드 결합 분자는 세포 표면 수용체, 성장 인자, 다른 시토카인, 또는 세포 표면 수용체에 결합하는 다른 리간드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 리간드 결합 분자의 접합은, 이것이 그의 상응하는 분자 또는 수용체에 결합하는 능력을 실질적으로 방해하지 않거나, 또는 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또는 그의 접합 버전의 세포로의 진입을 실질적으로 차단하지 않는다.

[0552] 대안적으로, WO 90/10448에 기재된 바와 같이, 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체의 형성을 통해 표적 핵산 서열을 함유하는 세포에 도입할 수 있다. 이러한 센스 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드-지질 복합체는 바람직하게는 세포내에서 내인성 리파제에 의해 해리된다.

[0553] 안티센스 또는 센스 RNA 또는 DNA 분자는 일반적으로 적어도 약 5개 뉴클레오타이드 길이, 대안적으로는 적어도 약 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 또는 1000개 뉴클레오타이드 길이이고, 이러한 문맥에서 용어 "약"은 언급된 뉴클레오타이드 서열 길이 ± 언급된 길이의 10%를 의미한다.

[0554] 또한, 프로브를 PCR 기술에 사용하여 밀접하게 관련된 TAT 폴리펩티드 코딩 서열의 확인을 위한 서열 풀을 생성할 수도 있다.

- [0555] TAT를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 또한 TAT를 코딩하는 유전자의 맵핑 및 유전적 장애가 있는 개체의 유전자 분석을 위한 혼성화 프로브를 구축하는데 사용될 수 있다. 본원에서 제공되는 뉴클레오타이드 서열은 계내 혼성화, 공지된 염색체 마커에 대한 연관성 분석, 및 라이브러리를 사용한 혼성화 스크리닝과 같은 공지의 기술을 이용하여 염색체 및 염색체의 특정 영역에 맵핑될 수 있다.
- [0556] TAT에 대한 코딩 서열이 또 다른 단백질에 결합하는 단백질을 코딩하는 경우 (예를 들어, TAT이 수용체인 경우), TAT은 결합 상호작용에 관여하는 다른 단백질 또는 분자를 확인하기 위한 검정에 사용될 수 있다. 이러한 방법에 의해, 수용체/리간드 결합 상호작용의 억제제를 확인할 수 있다. 또한, 이러한 결합 상호작용에 관여하는 단백질을 사용하여 결합 상호작용의 펩티드 또는 소분자 억제제 또는 효능제를 스크리닝할 수도 있다. 또한, 수용체 TAT를 사용하여 상관관계가 있는 리간드(들)를 단리할 수도 있다. 스크리닝 검정은 천연 TAT 또는 TAT에 대한 수용체의 생물학적 활성을 모방하는 리드 화합물을 발견하도록 설계될 수 있다. 이러한 스크리닝 검정은 화학적 라이브러리의 고처리량 스크리닝이 가능한 검정을 포함할 것이며, 이에 따라 이들이 소분자 약물 후보를 확인하는데 특히 적합하게 된다. 고려되는 소분자는 합성 유기 또는 무기 화합물을 포함한다. 검정은 당업계에 널리 특성화되어 있는 다양한 포맷, 예를 들어 단백질-단백질 결합 검정, 생화학적 스크리닝 검정, 면역검정 및 세포-기계 검정으로 수행될 수 있다.
- [0557] 또한, TAT 또는 그의 변형된 형태를 코딩하는 핵산을 사용하여 치료학적으로 유용한 시약의 개발 및 스크리닝에 유용한 트랜스제닉 동물 또는 "녹아웃" 동물을 생성할 수 있다. 트랜스제닉 동물 (예를 들어, 마우스 또는 래트)은 트랜스진을 함유하는 세포를 갖는 동물이고, 트랜스진은 태아기, 예를 들어 배아 단계에서 동물 또는 동물의 조상에 도입된다. 트랜스진은 세포의 게놈에 통합되는 DNA이며, 이 세포로부터 트랜스제닉 동물이 발생한다. 한 실시양태에서, TAT를 코딩하는 cDNA를 확립된 기술에 따라 사용하여 TAT를 코딩하는 게놈 DNA를 클로닝할 수 있고, 게놈 서열을 사용하여 TAT를 코딩하는 DNA를 발현하는 세포를 함유하는 트랜스제닉 동물을 생성할 수 있다. 트랜스제닉 동물, 특히 마우스 또는 래트와 같은 동물을 생성하는 방법은 당업계에서 통상적인 것이 되었으며, 예를 들어 미국 특허 번호 4,736,866 및 4,870,009에 기재되어 있다. 전형적으로, 특정 세포가 조직 특이적 인핸서를 사용한 TAT 트랜스진 혼입의 표적이 된다. 배아 단계에서 동물의 배선에 도입된 TAT를 코딩하는 트랜스진의 카피를 포함하는 트랜스제닉 동물을 이용하여, TAT를 코딩하는 DNA의 증가된 발현의 효과를 시험할 수 있다. 이러한 동물은, 예를 들어 폴리펩티드의 과다발현과 관련이 있는 병적 상태로부터의 보호를 제공할 것으로 여겨지는 시약에 대한 시험 동물로서 사용될 수 있다. 본 발명의 이러한 측면에 따라, 동물에게 상기 시약을 처리하고, 트랜스진을 보유하는 처리되지 않은 동물에 비해 병적 상태의 발생이 감소되는 것은 상기 병적 상태에 대한 잠재적인 치료적 개입을 나타낸다.
- [0558] 대안적으로, TAT의 비인간 상동체는 TAT를 코딩하는 내인성 유전자와 동물의 배아 줄기세포 내로 도입된 TAT를 코딩하는 변형된 게놈 DNA 사이의 상동성 재조합의 결과로서 TAT를 코딩하는 결합 또는 변형된 유전자를 갖는 TAT "녹아웃" 동물을 구축하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, TAT를 코딩하는 cDNA는 확립된 기술에 따라 TAT를 코딩하는 게놈 DNA를 클로닝하는데 사용될 수 있다. TAT를 코딩하는 게놈 DNA의 일부를 결실시키거나 이것을 또 다른 유전자, 예컨대 통합을 모니터링하는데 사용될 수 있는 선택가능한 마커를 코딩하는 유전자로 교체할 수 있다. 전형적으로, 수 킬로베이스의 변경되지 않은 플랭킹 DNA (5' 및 3' 말단 둘 다에서)가 벡터에 포함된다 (예를 들어, 상동성 재조합 벡터에 대한 기재는 문헌 [Thomas and Capecchi, Cell, 51:503 (1987)] 참조). 상기 벡터는 배아줄기세포주 내로 (예를 들어, 전기천공에 의해) 도입되고, 도입된 DNA가 내인성 DNA와 상동성 재조합된 세포를 선택한다 (예를 들어, 문헌 [Li et al., Cell, 69:915 (1992)] 참조). 이어서, 선택된 세포를 동물 (예를 들어, 마우스 또는 래트)의 배반포에 주사하여 응집 키메라를 형성한다 (예를 들어, 문헌 [Bradley, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152] 참조). 이어서, 키메라 배아는 적합한 가임신 암컷 대리모 동물에 착상되고, 태아는 분만하여 "녹아웃" 동물을 생성할 수 있다. 생식 세포에 상동성 재조합된 DNA를 보유하는 자손을 표준 기술로 확인할 수 있고, 이것을 이용하여 모든 세포가 상동성 재조합된 DNA를 보유하는 동물을 번식시킬 수 있다. 녹아웃 동물은 예를 들어 특정 병적 상태에 대해 방어하는 능력 및 TAT 폴리펩티드의 부재에 의한 병적 상태 발생에 대해 특성화될 수 있다.
- [0559] TAT 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 또한 유전자 요법에도 사용될 수 있다. 유전자 요법 용도에서, 유전자는 예를 들어 결합 유전자를 교체하는, 치료적으로 효과적인 유전자 생성물의 생체내 합성을 달성하기 위하여 세포에 도입된다. "유전자 요법"은 단일 치료에 의해 지속적인 효과가 달성되는 통상적인 유전자 요법, 및 치료적으로 효과적인 DNA 또는 mRNA의 1회 또는 반복 투여가 수반되는 유전자 치료제의 투여 둘 다를 포함한다. 안티센스 RNA 및 DNA를 생체내 특정 유전자의 발현 차단을 위한 치료제로서 사용할 수 있다. 짧은 안티센스 올리고뉴클

레오티드는 세포 막에 의한 제한된 흡수로 인해 세포내 농도가 낮음에도 불구하고 세포에 도입될 수 있고 여기서 억제제로 작용한다는 것이 이미 확인된 바 있다. (문헌 [Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986]]). 예를 들어, 음으로 대전된 포스포디에스테르 기를 대전되지 않는 기로 치환함으로써 올리고뉴클레오티드를 변형시켜서 그의 흡수를 증진시킬 수 있다.

[0560] 핵산을 살아있는 세포에 도입하는 다양한 기술이 이용가능하다. 이러한 기술은 핵산이 배양된 세포로 시험관내 전달되는지 또는 의도된 숙주의 세포로 생체내 전달되는지에 따라 달라진다. 핵산을 포유동물 세포로 시험관내 전달하는데 적합한 기술은 리포솜, 전기천공, 미세주사, 세포 융합, DEAE-텍스트란, 인산칼슘 침전 방법 등의 이용을 포함한다. 현재 바람직한 생체내 유전자 전달 기술은 바이러스 (전형적으로는 레트로바이러스) 벡터를 사용한 형질감염 및 바이러스 외피 단백질-리포솜 매개 형질감염을 포함한다 (문헌 [Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993]]). 일부 상황에서는, 표적 세포를 표적화하는 작용제, 예컨대 세포 표면 막 단백질 또는 표적 세포에 특이적인 항체, 표적 세포 상의 수용체에 대한 리간드 등을 핵산 공급원에 제공하는 것이 바람직하다. 리포솜이 사용되는 경우, 표적화하고/하거나 흡수를 용이하게 하기 위해서 세포내이입과 관련이 있는 세포 표면 막 단백질에 결합하는 단백질, 예를 들어 특정 세포 유형에 대해 작용하는 캡시드 단백질 또는 그의 단편, 세포주기 동안 내재화되는 단백질에 대한 항체, 및 세포내 국소화를 표적화하고 세포내 반감기를 증진시키는 단백질을 사용할 수 있다. 수용체-매개 세포내이입 기술은 예를 들어 문헌 [Wu et al., J. Biol. Chem. 262, 4429-4432 (1987)] 및 [Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3410-3414 (1990)]에 기재되어 있다. 유전자 마킹 및 유전자 요법 프로토콜에 관한 검토를 위해 문헌 [Anderson et al., Science 256, 808-813 (1992)]을 참조한다.

[0561] 본원에 기재된 TAT 폴리펩티드 또는 그의 단편을 코딩하는 핵산 분자는 염색체의 확인에 유용하다. 이와 관련하여, 계속해서 새로운 염색체 마커를 확인할 필요가 있는데, 이는 실제 서열 데이터에 기초하는 사용가능한 염색체 마킹 시약이 현재로서는 비교적 적기 때문이다. 본 발명의 TAT 핵산 분자는 각각 염색체 마커로 사용될 수 있다.

[0562] 본 발명의 TAT 폴리펩티드 및 핵산 분자는 조직 타이핑에 진단용으로 사용할 수도 있으며, 여기서 본 발명의 TAT 폴리펩티드는 다른 조직에 비해 한 조직에서, 바람직하게는 동일한 조직 유형의 정상 조직에 비해 환부 조직에서 차별적으로 발현될 수 있다. TAT 핵산 분자는 PCR, 노던 분석, 서던 분석 및 웨스턴 분석용 프로브를 생성하는데 사용될 것이다.

[0563] 본 발명은 TAT 폴리펩티드를 모방하는 물질 (효능제) 또는 TAT 폴리펩티드의 효과를 저해하는 물질 (길항제)을 확인하기 위해 화합물을 스크리닝하는 방법을 포함한다. 길항제 약물 후보에 대한 스크리닝 검정은 본원에서 확인된 유전자에 의해 코딩되는 TAT 폴리펩티드에 결합하거나 그와 복합체를 형성하거나, 또는 다르게는 예를 들어 세포로부터 TAT 폴리펩티드의 발현을 억제하는 것을 포함하는, 코딩된 폴리펩티드와 다른 세포성 단백질의 상호작용을 방해하는 화합물을 확인하도록 설계된다. 이러한 스크리닝 검정은 화학적 라이브러리의 고처리량 스크리닝이 가능한 검정을 포함하여, 소분자 약물 후보를 확인하는데 특히 적합하다.

[0564] 검정은 당업계에 널리 특성화되어 있는 다양한 포맷, 예를 들어 단백질-단백질 결합 검정, 생화학적 스크리닝 검정, 면역검정 및 세포-기재 검정으로 수행될 수 있다.

[0565] 길항제에 대한 모든 검정은, 약물 후보를 본원에서 확인된 핵산에 의해 코딩되는 TAT 폴리펩티드와, 이들 2가지 성분의 상호작용을 허용하는 조건하에 이에 충분한 시간 동안 접촉시키는 것을 필요로 한다는 점에서 공통적이다.

[0566] 결합 검정에서, 상호작용은 결합이고, 형성된 복합체는 반응 혼합물에서 단리 또는 검출될 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에서 확인된 유전자에 의해 코딩되는 TAT 폴리펩티드 또는 약물 후보는 공유 또는 비-공유 결합에 의한 부착에 의해 고체 상, 예를 들어 마이크로타이터 플레이트 상에 고정된다. 비-공유 결합에 의한 부착은 고체 표면을 TAT 폴리펩티드의 용액으로 코팅하고 건조시킴으로써 일반적으로 달성된다. 대안적으로, 고정된 TAT 폴리펩티드에 특이적인 고정된 항체, 예를 들어, 모노클로날 항체를 사용하여 이를 고체 표면에 앵커링시킬 수 있다. 검출가능한 표지로 표지될 수 있는 고정되지 않은 성분을 고정된 성분, 예를 들어, 앵커링된 성분을 함유하는 코팅된 표면에 첨가함으로써 검정이 수행된다. 반응이 완료되면, 반응하지 않은 성분을, 예를 들어, 세정에 의해, 제거하고, 고체 표면 상에 앵커링된 복합체를 검출한다. 원래의 고정되지 않은 성분이 검출가능한 표지를 보유하는 경우, 표면 상에 고정된 표지의 검출은 복합체가 형성되었음을 나타낸다. 원래의 고정되지 않은 성분이 표지를 보유하지 않는 경우, 예를 들어, 고정된 복합체에 특이적으로 결합하는 표지된 항체를 사용함으로써, 복합체 형성을 검출할 수 있다.

- [0567] 후보 화합물이 본원에서 확인된 유전자에 의해 코딩되는 특정 TAT 폴리펩티드와 상호작용하지만 그에 결합하지 않는 경우에, 폴리펩티드와 그의 상호작용은 단백질-단백질 상호작용을 검출하기 위한 주지되어 있는 방법에 의해 검정할 수 있다. 이러한 검정은 전통적인 접근법, 예컨대 가교, 공동-면역침전, 및 구배 또는 크로마토그래피 칼럼을 통한 공동-정제를 포함한다. 또한, 문헌 [Chevray and Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5789-5793 (1991)]에 개시된 바와 같이 필즈(Fields) 및 동료들에 의해 기재된 (문헌 [Fields and Song, Nature (London), 340:245-246 (1989)]; [Chien et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)]), 효모-기반 유전자 시스템을 사용함으로써 단백질-단백질 상호작용을 모니터링할 수 있다. 다수의 전사 활성화제, 예컨대 효모 GAL4는 2개의 물리적으로 구분되는 모듈 메인으로 구성되고, 이중 하나는 DNA-결합 도메인으로 작용하고, 다른 하나는 전사-활성화 도메인으로 기능한다. 상기 간행물들에 기재된 효모 발현 시스템 (일반적으로, "2-하이브리드 시스템"으로 지칭됨)은 이러한 성질의 이점을 취하고, 2개의 하이브리드 단백질을 사용하는데, 이 중 하나에서는 표적 단백질이 GAL4의 DNA-결합 도메인에 융합되고, 다른 하나에서는 후보 활성화 단백질이 활성화 도메인에 융합된다. GAL4-활성화된 프로모터의 제어 하에서의 GAL1-lacZ 리포터 유전자의 발현은 단백질-단백질 상호작용을 통한 GAL4 활성의 재구성에 좌우된다. 상호작용하는 폴리펩티드들을 함유하는 콜로니가 β -갈락토시다제에 대한 발색 기질로 검출된다. 2-하이브리드 기술을 사용하여 2개의 특정 단백질들 간의 단백질-단백질 상호작용을 확인하기 위한 완성형 키트 (매치마커(MATCHMAKER)TM)가 클론테크(Clontech)에서 시판된다. 또한, 이러한 시스템을 확장시켜, 특정 단백질 상호작용에 연관되는 단백질 도메인을 맵핑할 수 있을 뿐만 아니라, 이러한 상호작용에 결정적인 아미노산 잔기를 정확하게 알아낼 수 있다.
- [0568] 본원에서 확인된 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 유전자와 다른 세포내 또는 세포외 성분의 상호작용을 방해하는 화합물은 다음과 같이 시험될 수 있다: 통상적으로, 유전자 생성물 및 세포내 또는 세포외 성분을 함유하는 반응 혼합물을 상기 2가지 생성물의 상호작용 및 결합을 허용하는 조건하에 이를 허용하는 시간 동안 제조한다. 결합을 억제하는 후보 화합물의 능력을 시험하기 위해, 시험 화합물의 부재 및 존재하에 상기 반응을 실시한다. 또한, 양성 대조군으로 기능하도록 위약을 제3 반응 혼합물에 첨가할 수 있다. 시험 화합물 및 혼합물 중에 존재하는 세포내 또는 세포외 성분 사이의 결합 (복합체 형성)을 본원에서 상기 기재된 바와 같이 모니터링한다. 대조군 반응물(들)에서는 복합체가 형성되고 시험 화합물을 함유하는 반응 혼합물에서는 형성되지 않는 것은, 시험 화합물이 시험 화합물과 그의 반응 파트너의 상호작용을 방해함을 나타낸다.
- [0569] 길항제에 대해 검정하기 위해, TAT 폴리펩티드를 특정 활성화에 대해 스크리닝할 화합물과 함께 세포에 첨가할 수 있고, TAT 폴리펩티드의 존재하에 관심있는 활성을 억제하는 화합물의 능력은 상기 화합물이 TAT 폴리펩티드에 대한 길항제임을 나타낸다. 대안적으로, 길항제는 경쟁적 억제 검정에 적절한 조건하에 TAT 폴리펩티드 및 잠재적인 길항제를 막-결합 TAT 폴리펩티드 수용체 또는 재조합 수용체와 조합함으로써 검출할 수 있다. 수용체에 결합된 TAT 폴리펩티드 분자의 수를 이용하여 잠재적인 길항제의 효과를 결정할 수 있도록, TAT 폴리펩티드를 예컨대 방사성에 의해 표지할 수 있다. 수용체를 코딩하는 유전자는 당업자에게 공지된 수많은 방법, 예를 들어 리간드 패닝 및 FACS 분류에 의해 확인할 수 있다. 문헌 [Coligan et al., Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991)]. 바람직하게는, 폴리아데닐화된 RNA를 TAT 폴리펩티드에 반응성인 세포로부터 제조하고 이 RNA로부터 생성된 cDNA 라이브러리를 풀로 나누고 이것을 사용하여 COS 세포 또는 TAT 폴리펩티드에 반응성이 아닌 다른 세포를 형질감염시키는 발현 클로닝이 이용된다. 유리 슬라이드에서 성장시킨 형질감염된 세포를 표지된 TAT 폴리펩티드에 노출시킨다. TAT 폴리펩티드는 아이오딘화, 또는 부위-특이적 단백질 키나제에 대한 인식 부위의 도입을 포함하는 다양한 수단으로 표지될 수 있다. 고정 및 인큐베이션 후에, 상기 슬라이드로 자기방사기록 분석을 실시한다. 양성 풀을 확인하여 하위 풀을 제조하고, 상호작용성 하위 풀의 수확 및 재-스크리닝 과정을 이용하여 다시 형질감염시켜서, 최종적으로는 추정되는 수용체를 코딩하는 단일 클론을 생성시킨다.
- [0570] 대안적인 수용체 확인 방법으로서, 표지된 TAT 폴리펩티드는 수용체 분자를 발현하는 세포막 또는 추출물 제제와 광친화도-연결될 수 있다. PAGE를 통해 가교된 물질을 분해하고 X-선 필름에 노출시킨다. 수용체를 함유하는 표지된 복합체를 절단하고 펩티드 단편으로 분해하여 단백질 미세서열분석을 수행할 수 있다. 미세서열분석으로부터 얻은 아미노산 서열을 사용하여 축퇴성 올리고뉴클레오타이드 프로브 한 세트를 설계함으로써 cDNA 라이브러리를 스크리닝하여 의심된 수용체를 코딩하는 유전자를 확인할 것이다.
- [0571] 길항제에 대한 다른 검정에서, 수용체를 발현하는 포유동물 세포 또는 막 제제를 후보 화합물의 존재하에 표지된 TAT 폴리펩티드와 함께 인큐베이션할 것이다. 그 후에, 상기 상호작용을 증대시키거나 차단하는 화합물의 능력을 측정할 수 있다.

- [0572] 잠재적인 길항제의 더 구체적인 예는 이뮤노글로불린과 TAT 폴리펩티드의 융합체에 결합하는 올리고뉴클레오티드, 및 특히 폴리클로날 및 모노클로날 항체 및 항체 단편, 단일쇄 항체, 항-이디오타입 항체, 및 이러한 항체 또는 단편의 키메라 또는 인간화 버전, 뿐만 아니라 인간 항체 및 항체 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는 항체를 포함한다. 대안적으로, 잠재적인 길항제는 밀접하게 관련된 단백질, 예를 들어 수용체를 인식하지만 영향을 미치지 않아 TAT 폴리펩티드의 작용을 경쟁적으로 억제하는 돌연변이된 형태의 TAT 폴리펩티드일 수 있다.
- [0573] 또 다른 잠재적인 TAT 폴리펩티드 길항제는 안티센스 기술로 제조된 안티센스 RNA 또는 DNA 구축물이고, 여기서, 예를 들어 상기 안티센스 RNA 또는 DNA 분자는 표적 mRNA에 혼성화하여 단백질 번역을 저해함으로써 mRNA의 번역을 직접 차단하는 작용을 한다. 안티센스 기술을 이용하여 삼중-나선 형성 또는 안티센스 DNA 또는 RNA를 통해 유전자 발현을 제어할 수 있는데, 이러한 방법은 둘 다 폴리뉴클레오티드의 DNA 또는 RNA에 대한 결합을 기초로 한다. 예를 들어, 본원에서 성숙 TAT 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열의 5' 코딩 부분은 약 10 내지 40 염기쌍 길이의 안티센스 RNA 올리고뉴클레오티드를 설계하는데 사용될 수 있다. DNA 올리고뉴클레오티드는 전사에 관여하는 유전자의 영역에 대해 상보적이도록 설계됨으로써 (삼중-나선 - 문헌 [Lee et al., Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979)]; [Cooney et al., Science, 241: 456 (1988)]; [Dervan et al., Science, 251:1360 (1991)] 참조), TAT 폴리펩티드의 전사 및 생성을 방지한다. 안티센스 RNA 올리고뉴클레오티드는 생체 내에서 mRNA와 혼성화하여, mRNA 분자가 TAT 폴리펩티드로 번역되는 것을 차단한다 (안티센스 - 문헌 [Okano, Neurochem., 56:560 (1991)]; [Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)]). 또한, 안티센스 RNA 또는 DNA가 생체내에서 발현되어 TAT 폴리펩티드의 생성을 억제할 수 있도록 상기 기재된 올리고뉴클레오티드를 세포에 전달할 수도 있다. 안티센스 DNA를 사용하는 경우, 번역-개시 부위로부터 유래된 올리고데옥시리보뉴클레오티드, 예를 들어 표적 유전자 뉴클레오티드 서열의 약 -10 위치 내지 +10 위치 사이가 바람직하다.
- [0574] 잠재적인 길항제는 TAT 폴리펩티드의 활성 부위, 수용체 결합 부위 또는 성장 인자 또는 다른 관련 결합 부위에 결합하여 TAT 폴리펩티드의 정상적인 생물학적 활성을 차단하는 소분자를 포함한다. 소분자의 예는 작은 펩티드 또는 펩티드-유사 분자, 바람직하게는 가용성 펩티드, 및 합성 비-펩티딜 유기 또는 무기 화합물을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0575] 리보자임은 RNA의 특이적 절단을 촉매할 수 있는 효소 활성의 RNA 분자이다. 리보자임은 상보적 표적 RNA에 대한 서열-특이적 혼성화에 이은 엔도뉴클레아제 절단에 의해 작용한다. 잠재적인 RNA 표적 내의 특이적 리보자임 절단 부위는 공지된 기술로 확인될 수 있다. 추가의 상세한 내용은, 예를 들어 문헌 [Rossi, Current Biology 4:469-471 (1994)] 및 PCT 공보 번호 WO 97/33551 (1997년 9월 18일에 공개)을 참조한다.
- [0576] 전사 억제에 사용되는 삼중-나선 형성에 있어서의 핵산 분자는 단일-가닥이어야 하며, 데옥시뉴클레오티드로 구성되어야 한다. 이러한 올리고뉴클레오티드의 염기 조성은 이것이 혹스틴 염기-쌍 형성 규칙을 통해 삼중-나선 형성을 촉진하도록 설계되는데, 여기서 일반적으로 듀플렉스 중 한쪽 가닥에 상당한 크기의 퓨린 또는 피리미딘 스트레치가 필요하다. 추가의 상세한 내용은, 예를 들어 상기 PCT 공보 번호 WO 97/33551을 참고한다.
- [0577] 이러한 소분자들은 임의의 하나 이상의 상기 논의된 스크리닝 검정 및/또는 당업자에게 주지된 임의의 다른 스크리닝 기술에 의해 확인될 수 있다.
- [0578] 본원에서, 단리된 TAT 폴리펩티드-코딩 핵산은, 당업계에 주지되고 본원에 기재된 바와 같은 기술을 이용하여 TAT 폴리펩티드가 재조합 방식으로 생성되도록 사용될 수 있다. 다시, 생성된 TAT 폴리펩티드를 당업계에 주지되고 본원에 기재된 바와 같은 기술을 이용하여 항-TAT 항체를 생성하는데 사용할 수 있다.
- [0579] 본원에서 확인된 TAT 폴리펩티드, 뿐만 아니라 본원에서 상기 개시된 스크리닝 검정에 의해 확인된 다른 분자에 특이적으로 결합하는 항체는 암을 포함하는 다양한 장애의 치료를 위해서 제약 조성물의 형태로 투여될 수 있다.
- [0580] TAT 폴리펩티드가 세포내 생성되고 온전한 항체가 억제체로서 사용되는 경우에는 내재화 항체가 바람직하다. 그러나, 항체 또는 항체 단편을 세포 내로 전달하기 위해 리포펙션 또는 리포솜을 사용할 수도 있다. 항체 단편이 사용되는 경우, 표적 단백질의 결합 도메인에 특이적으로 결합하는 최소 크기의 억제 단편이 바람직하다. 예를 들어, 항체의 가변 영역 서열을 기초로 하여, 표적 단백질 서열에 결합하는 능력이 유지되는 펩티드 분자를 고안할 수 있다. 이러한 펩티드는 화학적으로 합성하고/하거나 재조합 DNA 기술에 의해 생성할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)]을 참조한다.
- [0581] 본원의 제제는 또한 치료할 특정 적응증에 필요한, 바람직하게는 서로 악영향을 미치지 않는 상보적인 활성을

갖는, 하나를 초과하는 활성 화합물을 함유할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 조성물은 그의 기능을 증진시키는 작용제, 예를 들어 세포독성제, 시토키인, 화학요법제 또는 성장-억제제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.

[0582] 하기 실시예는 단지 예시 목적으로만 제공되며, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[0583] 본 명세서에서 인용된 모든 특허 및 문헌은 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0584] 실시예

[0585] 달리 나타내지 않는 한, 본 실시예에서 언급되는 시판 시약은 제조업체의 지침에 따라 사용하였다. 하기 실시예 및 명세서 전반에 걸쳐 ATCC 기탁 번호로 확인된 세포의 공급원은 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (미국 버지니아주 매나사스)이다.

[0586] 실시예 1: 진익스프레스(GeneExpress)[®]를 사용한 조직 발현 프로파일링

[0587] 그의 발현이 다른 인간 종양(들) 및/또는 정상 인간 조직에 비해 관심있는 특정 인간 종양 조직(들)에서 유의하고 검출가능하게 상향조절되는 폴리펩티드 (및 이들의 코딩 핵산)를 확인하기 위해, 유전자 발현 정보를 함유하는 독점적인 데이터베이스 (진익스프레스[®], 진 로직 인크.(Gene Logic Inc.), 매릴랜드주 게이터스버그)를 분석하였다. 특히, 진익스프레스[®] 데이터베이스의 분석은 진익스프레스[®] 데이터베이스와 사용하기 위한 진 로직 인크. (매릴랜드주 게이터스버그)를 통해 이용가능한 소프트웨어 또는 진익스프레스[®] 데이터베이스와 사용하기 위해 제넨테크, 인크.에서 쓰여지고 개발된 독점적인 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 분석에서 포지티브 히트의 등급은 예를 들어 정상적인 본질적 조직 및/또는 정상적인 증식 조직에서의 조직 특이성, 종양 특이성 및 발현 수준을 포함하는 여러 기준에 기초한다. 이 mRNA 발현 분석을 사용하여, TAT211 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA가 각각 상응하는 정상 인간 폐, 난소 및 갑상선 조직에 비해 인간 폐, 난소 및 갑상선 종양에서 유의하고, 재현가능하며 검출가능하게 과다발현된다는 것을 결정하였다.

[0588] 실시예 2: 계내 혼성화

[0589] 계내 혼성화는 세포 또는 조직 제제 내에서 핵산 서열의 검출 및 국제화를 위한 강력한 다목적 기술이다. 이는 예를 들어, 유전자 발현의 부위를 확인하고, 전사의 조직 분포를 분석하고, 바이러스 감염을 확인하고 국제화하고, 특이적 mRNA 합성에서 변화를 추적하고 염색체 맵핑을 돕기 위해 유용할 수 있다.

[0590] 계내 혼성화는 PCR-생성된 ³²P-표지된 리보프로브를 사용하여 문헌 [Lu and Gillett, Cell Vision 1:169-176 (1994)]에 의한 프로토콜의 최적화된 버전에 따라 수행하였다. 간략하게, 포르말린-고정되고 파라핀-포매된 인간 조직을 절편화하고, 탈파라핀화하고, 프로테이나제 K (20 g/ml)에서 15분 동안 37°C에서 단백질을 제거하고, 문헌 [Lu and Gillett, 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 계내 혼성화를 위해 추가로 처리하였다. ³²P-UTP--표지된 안티센스 리보프로브를 PCR 생성물로부터 생성하고, 55°C에서 밤새 혼성화시켰다. 슬라이드를 Kodak NTB2 핵 트랙 에멀전에 담그고, 4주 동안 노출시켰다.

[0591] ³²P-리보프로브 합성

[0592] 6.0 μ l (125 mCi)의 ³²P-UTP (아머샴(Amersham) BF 1002, SA<2000 Ci/mmol)를 고속 진공 건조시켰다. 건조된 ³²P-UTP를 함유하는 각각의 튜브에, 하기 성분을 첨가하였다: 2.0 μ l 5x 전사 완충제, 1.0 μ l DTT (100 mM), 2.0 μ l NTP 믹스 (2.5 mM 10 μ ; 각각의 10 mM GTP, CTP & ATP + 10 μ l H₂O), 1.0 μ l UTP (50 μ M), 1.0 μ l Rnasin, 1.0 μ l DNA 주형 (1 μ g), 1.0 μ l H₂O, 1.0 μ l RNA 폴리머라제 (일반적으로, PCR 생성물 T3 = AS, T7 = S).

[0593] 튜브를 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 1.0 μ l RQ1 DNase를 첨가한 후, 37°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 90 μ l TE (10 mM 트리스 pH 7.6/1 mM EDTA pH 8.0)를 첨가하고, 혼합물을 DE81 종이 상에 피펫팅하였다. 남아있는 용액을 마이크로콘(Microcon)-50 한외여과 장치에 로딩하고, 프로그램 10 (6분)을 이용하여 회전시켰다. 여과 장치를 제2 튜브 상에서 뒤집고, 프로그램 2 (3분)를 이용하여 회전시켰다. 최종 회수 회전 후에, 100 μ l TE를 첨가하였다. 1 μ l의 최종 생성물을 DE81 종이 상에 피펫팅하고, 6 ml의 바이오플루오르 (Biofluor) II에서 계수하였다.

- [0594] 프로브를 TBE/우레아 겔 상에서 러닝시켰다. 1-3 μl 의 프로브 또는 5 μl 의 RNA Mrk III을 3 μl 의 로딩 완충제에 첨가하였다. 95°C 가열 블록 상에서 3분 동안 가열한 후, 프로브를 즉시 얼음 상에 놓았다. 겔의 웰을 플러싱하고, 샘플을 로딩하고, 180-250 볼트에서 45분 동안 러닝시켰다. 겔을 사란 (saran) 랩으로 싸고, -70°C 동결기에서 1시간 내지 밤새 증감지가 있는 XAR 필름에 노출시켰다.
- [0595] ^{32}P -혼성화
- [0596] A. 동결된 절편의 예비처리
- [0597] 슬라이드를 동결기로부터 제거하여, 알루미늄 트레이 상에 놓고, 실온에서 5분 동안 해동시켰다. 트레이를 55°C 인큐베이터 내에 5분 동안 넣어 응축을 감소시켰다. 슬라이드를 흡 후드에서 얼음 상에서 4% 파라포름알데히드로 10분 동안 고정시키고, 0.5 x SSC에서 5분 동안 실온에서 (25 ml 20 x SSC + 975 ml SQ H₂O) 세척하였다. 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 프로테이나제 K에서 10분 동안 37°C에서 단백질 제거 후에 (250 ml 예온시킨 RNase가 없는 RNase 완충제 중 10 mg/ml 원액 12.5 μl), 절편을 0.5 x SSC에서 10분 동안 실온에서 세척하였다. 절편을 70%, 95%, 100% 에탄올에서 각각 2분 탈수시켰다.
- [0598] B. 파라핀-포매된 절편의 예비처리
- [0599] 슬라이드를 탈파라핀화하고, SQ H₂O에 넣고, 실온에서 2 x SSC에서 2회, 각각 5분 동안 세정하였다. 절편을 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 프로테이나제 K (250 ml RNase가 없는 RNase 완충제 중 10 mg/ml의 500 μl ; 37°C, 15분) - 인간 배아, 또는 8 x 프로테이나제 K (250 ml RNase 완충제 중 100 μl , 37°C, 30분) - 포르말린 조직에서 단백질을 제거하였다. 0.5 x SSC에서 후속적인 세정 및 탈수를 상기 기재된 바와 같이 수행하였다.
- [0600] C. 예비혼성화
- [0601] 슬라이드를 Box 완충제 (4 x SSC, 50% 포름아미드) - 포화 여과지가 라이닝된 플라스틱 상자에 펼쳐놓았다.
- [0602] D. 혼성화
- [0603] 슬라이드 당 1.0 x 10⁶ cpm 프로브 및 1.0 μl tRNA (50 mg/ml 원액)를 95°C에서 3분 동안 가열하였다. 슬라이드를 얼음 상에서 냉각시키고, 슬라이드 당 48 μl 혼성화 완충제를 첨가하였다. 볼텍싱 후에, 50 μl ^{32}P 믹스를 슬라이드 상의 50 μl 예비혼성화액에 첨가하였다. 슬라이드를 55°C에서 밤새 인큐베이션하였다.
- [0604] E. 세척
- [0605] 세척은 2xSSC, EDTA로 실온에서 2 x 10분으로 이루어졌고 (400 ml 20 x SSC + 16 ml 0.25M EDTA, Vf=4L), 이어서 37°C에서 30분 동안 RNaseA 처리하였다 (250 ml RNase 완충제 중 10 mg/ml의 500 μl = 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). 슬라이드를 2 x 10분 동안 2 x SSC, EDTA로 실온에서 세척하였다. 엄격한 세척 조건은 다음과 같았다: 55°C에서 2시간, 0.1 x SSC, EDTA (20 ml 20 x SSC + 16 ml EDTA, Vf=4L).
- [0606] F. 올리고뉴클레오티드
- [0607] 계내 분석을 본원에 개시된 다양한 DNA 서열에 대해 수행하였다. 이들 분석을 위해 사용된 올리고뉴클레오티드는 첨부 도면에 제시된 바와 같은 핵산 (또는 그의 상보체)에 대해 상보성이도록 얻었다.
- [0608] G. 결과
- [0609] 정상 인간 조직에서 TAT211의 발현과 관련하여, 시험된 유방 상피, 담낭 점막, 폐 및 신장 세관 샘플의 하위세트에서 약한 발현부터 중간 정도의 발현이 관찰되었다. 정상 인간 난소 기질 및 자궁 자궁근을 둘 다 포함하는 시험된 모든 다른 정상 인간 조직은 TAT211 발현에 대해 음성이었다. 대조적으로, 강한 TAT211 발현이 시험된 27개의 인간 비-소세포 폐 암종 중 16개 (59%)에서 관찰되었다. 추가로, 강한 TAT211 발현이 또한 시험된 9개의 인간 자궁내막 암종 중 8개 (89%)에서 관찰되었다. 최종적으로, 강한 TAT211 발현이 시험된 14개의 난소 암종 중 12개에서 관찰되었다.
- [0610] 실시예 3: TAT211 폴리펩티드에 결합하는 항체의 제조
- [0611] 본 실시예는 TAT211에 특이적으로 결합할 수 있는 모노클로날 항체의 제조를 설명한다.
- [0612] 모노클로날 항체를 생성하는 기술은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌 [Goding, 상기 문헌]에 기재되어 있다. 사용할 수 있는 면역원은 정제된 TAT, TAT를 함유하는 융합 단백질, 및 세포 표면 상에 재조합 TAT를

발현하는 세포를 포함한다. 당업자는 과도한 실험 없이 면역원을 선택할 수 있다.

- [0613] 마우스, 예를 들어 Balb/c를 완전 프로인트 아주반트 중에서 에멀전화시킨 TAT 면역원을 1-100 μg 의 양으로 사용하여 피하 또는 복강내 주사하여 면역화시킨다. 대안적으로, 면역원을 MPL-TDM 아주반트 (리비 이뮤노케미칼 리서치(Ribi Immunochemical Research), 몬타나주 해밀톤) 중에서 에멀전화시켜 동물의 뒷발바닥에 주사하였다. 이어서, 면역화된 마우스를 10일 내지 12일 후에 선택된 아주반트 중에 에멀전화시킨 추가의 면역원으로 부스팅 하였다. 이어서, 마우스를 수주 동안 추가의 면역화 주사로 부스팅할 수도 있었다. 안와 후방 채혈법으로 마우스로부터 혈청 샘플을 주기적으로 채취하여 ELISA 검정에서 시험하여 항-TAT 항체를 검출할 수 있었다.
- [0614] 적합한 항체 역가가 검출된 후, 항체에 대해 "양성"인 동물에게 TAT의 최종 정맥내 주사를 주사할 수 있었다. 3일 내지 4일 후에 마우스를 희생시키고, 비장 세포를 수확하였다. 이어서, 비장 세포를 (35% 폴리에틸렌 글리콜을 사용하여) 선택된 뮤린 골수종 세포주, 예컨대 P3X63AgU.1 (ATCC로부터 입수가가능함, 번호 CRL 1597)에 융합시켰다. 이러한 융합은 하이브리도마 세포를 생성시켰고, 이것을 이후에 HAT (하이포크산틴, 아미노프테린 및 티미딘) 배지를 함유하는 96웰 조직 배양 플레이트에 플레이팅하여 융합되지 않은 세포, 골수종 하이브리드 및 비장 세포 하이브리드의 증식을 억제할 수 있었다.
- [0615] 하이브리도마 세포는 TAT에 대한 반응성에 대해 ELISA에서 스크리닝될 것이다. TAT에 대한 원하는 모노클로날 항체를 분리하는 "양성" 하이브리도마 세포의 결정은 당업계의 기술 내의 것이다.
- [0616] 양성 하이브리도마 세포를 동계 Balb/c 마우스에게 복강내 주사하여 항-TAT 모노클로날 항체를 함유하는 복수를 생성할 수 있었다. 대안적으로, 하이브리도마 세포를 조직 배양 플라스크 또는 롤러병에서 성장시킬 수도 있었다. 복수 중에서 생성된 모노클로날 항체의 정제는 황산암모늄 침전 후에 겔 배제 크로마토그래피를 사용하여 수행할 수 있었다. 대안적으로, 항체가 단백질 A 또는 단백질 G에 결합하는 것을 기초로 하는 친화도 크로마토그래피를 이용할 수도 있었다.
- [0617] 상기 기재된 기술을 사용하여, 다양한 개별적이고 특징적인 하이브리도마 세포주를 생성하였고, 이들은 각각 천연 TAT211 폴리펩티드에 결합하는 모노클로날 항체를 생성하였다. 이들 하이브리도마 세포주에 의해 생성된 모노클로날 항체는 주지되어 있고 통상적으로 사용되는 기술, 예컨대 웨스턴 블롯, ELISA 분석, TAT211 폴리펩티드를 발현하는 세포의 FACS 분류 분석 및/또는 면역조직화학 분석을 사용하여 TAT211 폴리펩티드에 결합하는 것으로 밝혀졌다. 하나의 특정한 뮤린 하이브리도마 세포주 (본원에서 10H1로 설계된 뮤린 모노클로날 항체 (또한, mu10H1로 지칭됨)를 발현함)를 추가의 연구를 위해 선택하였다. VL, VH 및/또는 CDR 도메인을 포함하는 10H1 모노클로날 항체와 관련된 아미노산 서열, 및 그의 다양한 다른 버전을 도 3-12에 제시하였다.
- [0618] 실시예 4: 경쟁적 결합 분석 및 에피토프 맵핑
- [0619] 기재된 모노클로날 항체에 의해 결합된 TAT211 에피토프를 표준 경쟁 결합 분석에 의해 결정할 수 있다 (문헌 [Fendly et al., Cancer Research 50:1550-1558 (1990)]). 교차-차단 연구는 형광을 정량하기 위한 판텍스 (PANDEX)TM 스크린 기계를 사용하여 TAT211을 발현하도록 조작된 무손상 PC3 세포 상의 직접적인 형광에 의해 항체 상에서 수행하였다. 각각의 모노클로날 항체를 확립된 절차를 사용하여 플루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC)와 접합시켰다 (문헌 [Wofsy et al., Selected Methods in Cellular Immunology, p. 287], [Mishel and Schiigi (eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980)]). TAT211-발현 PC3 세포의 합류 단층을 트립신화하고, 1회 세척하고, 0.5% 소 혈청 알부민 (BSA) 및 0.1% NaN_3 을 함유하는 냉각 PBS 중에서 1.75×10^6 개 세포/ml로 재현탁시켰다. 최종 농도의 1% 라텍스 입자 (IDC, 오리곤주 포틀랜드)를 첨가하여 판텍스TM 플레이트 막의 클로킹을 감소시켰다. 현탁액 중 세포, 20 μl , 및 20 μl 의 정제된 모노클로날 항체 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 내지 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 판텍스TM 플레이트 웰에 첨가하고, 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. FITC-표지된 모노클로날 항체의 소정의 희석액 20 μl 를 각각의 웰에 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션하고, 세척하고, 형광을 판텍스TM 스크린 기계에 의해 정량하였다. 모노클로날 항체는 각각 부적절한 모노클로날 항체 대조군에 비해 및 동일한 항체 농도에서 다른 것의 결합을 40% 이상 차단한다면 에피토프를 공유하는 것을 여겨진다. 이 검정을 사용하여, 당업자는 본원에 기재된 것과 동일한 에피토프에 결합하는 다른 모노클로날 항체를 확인할 수 있었다.
- [0620] 결실 분석을 수행하여 항원성 에피토프의 서열 2로 제시된 폴리펩티드 서열에서 대략적인 위치를 확인할 수 있다. 한 실험에서, 항-TAT211 모노클로날 항체는 도 2에 제시된 TAT211 폴리펩티드 서열의 아미노산 320-361 사

이에 위치한 항원성 에피토프에 결합하는 것으로 입증되었다. 임의의 이러한 구체적으로 확인된 항원성 에피토프 부위를 포함하는 폴리펩티드, 이러한 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 분자, 및 이러한 폴리펩티드에 결합하는 항체가 모두 본 발명에 포함된다.

[0621] 실시예 5: 면역조직화학 분석

[0622] TAT211에 대한 항체를 상기 기재된 바와 같이 제조하고, 면역조직화학 분석을 다음과 같은 기능적 항-TAT211 모노클로날 항체를 사용하여 수행하였다. 조직 절편을 우선 5분 동안 아세톤/에탄올 (동결 또는 파라핀-포매됨)에서 고정시켰다. 이어서, 절편을 PBS에서 세척한 후에 10분 동안 아비딘 및 비오틴 (벡터 키트)으로 차단한 다음 각각을 PBS에서 세척하였다. 이어서, 절편을 10% 혈청으로 20분 동안 차단한 후에 블롯팅하여 잉여량을 제거하였다. 이어서, 1차 항체를 절편에 1시간 동안 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 첨가한 후에 절편을 PBS에서 세척하였다. 이어서, 비오틴화 2차 항체 (항-1차 항체)를 30분 동안 절편에 첨가한 후에 절편을 PBS로 세척하였다. 이어서, 절편을 벡터 ABC 키트의 시약에 30분 동안 노출시킨 후에 절편을 PBS에서 세척하였다. 이어서, 절편을 디아미노벤지딘 (피어스)에 5분 동안 노출시킨 후에 PBS에서 세척하였다. 이어서, 절편을 메이어스 헤마톡실린으로 대비염색하고, 커버슬립으로 덮고, 시각화하였다. 면역조직화학 분석은 또한 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989] 및 [Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997)]에 기재된 바와 같이 수행할 수 있다.

[0623] 이러한 분석으로부터의 결과는 사용된 항-TAT211 모노클로날 항체가 임의의 하기 정상 인간 조직: 뇌, 심장, 간, 전립선, 피부, 비장, 대동맥, 고환, 갑상선, 소장 및 대장, 위 및 난소 기질에 검출가능하게 결합하지 않는다는 것을 입증하였고, 오직 약한 결합이 정상적인 폐의 폐포 세포, 유방 상피, 신장 세관 및 편도의 하위세트에서 관찰되었다.

[0624] 대조적으로, TAT211의 중간 정도 내지 강한 발현이 11개의 독립적인 난소 투명 세포 선암종 샘플 중 9개, 20개의 독립적인 난소 엔도메트리오이드 선암종 샘플 중 19개, 10개의 독립적인 난소 점소양 선암종 샘플 중 4개, 및 25개의 독립적인 난소 혈청 선암종 샘플 중 23개에서 관찰되었다. 모두에서, TAT211의 검출가능한 발현이 시험된 66개의 모든 독립적인 난소 선암종 샘플 중 총 58개 (88%)에서 관찰되었다.

[0625] 또한, TAT211의 중간 정도 내지 강한 발현이 31개 독립적인 폐 선암종 샘플 중 24개에서 관찰되었다. 모두에서, TAT211의 검출가능한 발현이 시험된 31개의 모든 독립적인 폐 선암종 샘플 중 총 27개 (87%)에서 관찰되었다.

[0626] TAT211의 중간 정도 내지 강한 발현이 또한 23개의 독립적인 갑상선 유두상 암종 샘플 중 19개에서 관찰되었다. 모두에서, TAT211의 검출가능한 발현이 시험된 23개의 모든 독립적인 갑상선 유두상 암종 샘플 중 총 21개 (91%)에서 관찰되었다.

[0627] 항-TAT211 모노클로날 항체 10H1 (도 3-12에 제시된 관련 아미노산 서열)을 사용하여, 다양한 원발성 및 매칭된 국부 전이성 암종 조직 샘플에 대해 면역조직화학 분석을 이용하여 TAT211의 발현이 전이성 상태에서 (원발성 상태에 비해) 유지되지는 여부를 결정하였다. 조직 분석의 결과는 원발성 및 매칭된 국부 전이성 샘플에서의 TAT211 발현이 높은 정도로 일치한다는 것을 입증하였다. 특히, 시험된 10개의 난소 선암종 샘플 중, 9개가 원발성 종양 및 매칭된 국부 전이 둘 다에서 동일한 중간 정도 내지 높은 수준의 TAT211 발현을 나타내었다. 시험된 14개의 폐 선암종 샘플 중, 12개가 원발성 종양 및 매칭된 국부 전이 둘 다에서 동일한 중간 정도 내지 높은 수준의 TAT211 발현을 나타내었다. 최종적으로, 시험된 3개의 편평 세포 폐 암종 샘플 중, 2개가 원발성 종양 및 매칭된 국부 전이 둘 다에서 동일한 중간 정도 내지 높은 수준의 TAT211 발현을 나타내었다.

[0628] 실시예 6: 류린 모노클로날 항체의 인간화

[0629] 본 실시예는 TAT211에 대해 지시된 류린 항체 10H1을 인간화하는 방법의 응용성을 입증한다.

[0630] TAT211의 세포의 도메인을 이. 콜라이 (비글리코실화)에서 발현시키고, 이뮤노어드헤신 (Fc 융합체)을 CHO (글리코실화) 세포에서 발현시키고, 종래의 수단에 의해 정제하였다. 항체 10H1을 발현하는 류린 하이브리도마는 마우스를 이. 콜라이로부터 유래된 재조합 TAT211 세포의 도메인으로 면역화시켜 수득하였고, ELISA에 의해 TAT211 코팅된 플레이트에 결합하는 그의 능력에 의해 확인하였다.

[0631] 류린 10H1 가변 도메인의 클로닝

[0632] 전체 RNA는 표준 방법을 이용하여 10H1을 생성하는 하이브리도마 세포로부터 추출하였다. 중쇄 및 경쇄에 대한

축퇴성 프라이머를 사용한 RT-PCR을 이용하여 가변 경쇄 (VL) 및 가변 중쇄 (VH) 도메인을 증폭시켰다. 정방향 프라이머는 VL 및 VH 영역의 N-말단 아미노산 서열에 특이적이었다. 중쇄 사이에서 고도로 보존된 불변 경쇄 (CL) 및 불변 중쇄 도메인 1 (CH1) 내의 영역으로 어닐링하기 위해 LC 및 HC 역방향 프라이머를 각각 설계하였다. 삽입체의 폴리뉴클레오티드 서열은 통상적인 서열분석 방법을 이용하여 결정하였다. mu10H1 VL (서열 4) 및 VH (서열 13) 아미노산 서열을 각각 도 3 및 4에 제시하였다.

[0633] 수용자 인간 컨센서스 프레임워크 상으로의 직접적인 추가변 영역 이식편

[0634] 상기 작업에 사용되는 파지미드는 1가의 Fab-g3 디스플레이 벡터로, 단일 phoA 프로모터 제어하의 2개의 오픈 리딩 프레임으로 이루어진다. 제1 오픈 리딩 프레임은 수용자 경쇄의 VL 및 CH1 도메인에 융합된 stII 신호 서열로 이루어지고, 제2 오픈 리딩 프레임은 수용자 중쇄의 VH 및 CH1 도메인에 융합된 stII 신호 서열, 및 이어서 존재하는 마이너 파지 코트 단백질 P3으로 이루어진다.

[0635] 뮤린 10H1 (mu10H1)로부터의 VL 및 VH 도메인을 인간 VL 카파 I (huKI) 및 인간 VH 하위군 III (huIII) 컨센서스 서열과 정렬하였다. CDR 이식편을 제조하기 위해, mu10H1로부터의 추가변 영역을 huKI 및 huIII 컨센서스 수용자 프레임워크로 이식시켜 직접적인 CDR-이식편인 "10H1-이식편"을 생성하였다 (도 3 및 4). VL 도메인에서, 하기 영역들을 인간 컨센서스 수용자: 위치 24-34 (L1), 50-56 (L2) 및 89-97 (L3)로 이식하였다. VH 도메인에서, 위치 26-35 (H1), 49-65 (H2) 및 93-102 (H3)를 이식시켰다. 맥칼럼(MacCallum) 등 (문헌 [J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)])은 항체 및 항원 복합체 결정 구조를 분석하였고, 중쇄의 위치 49 및 93이 접촉 영역의 일부임을 발견하였고, 따라서 항체를 인간화할 때 CDR-H2 및 CDR-H3의 정의 내에 이들 위치를 포함시키는 것이 합당한 것으로 보인다.

[0636] 각각의 추가변 영역에 대해 개별적인 올리고뉴클레오티드를 사용하여 LC 및 HC 발현 벡터의 쿨켈(Kunkel) 돌연변이유발에 의해 IgG로서 "10H1-이식편"을 생성하였다. 친화도 및 안정성을 증가시키기 위한 아미노산 변화를 또한 쿨켈 돌연변이유발을 이용하여 수행하였다. 올바른 클론을 DNA 서열분석에 의해 확인하였다.

[0637] 추가변 영역의 무작위화

[0638] 서열 다양성은 뮤린 추가변 영역 서열을 향한 바이어스를 유지하는 소프트 무작위화 전략을 이용하여 10H1-이식편의 각각의 추가변 영역으로 개별적으로 도입하였다. 이는 문헌 [Gallop et al., J. Med. Chem. 37:1233-1251 (1994)]에 최초로 기재된 포이즌드 올리고뉴클레오티드 합성 전략을 이용하여 수행하였다. 돌연변이될 추가변 영역 내의 주어진 위치에서, 야생형 아미노산을 코딩하는 코돈을 뉴클레오티드의 70-10-10-10 혼합물로 포이즈닝시켜 각각의 위치에서 평균 50% 돌연변이 비율을 나타내었다.

[0639] 소프트 무작위화 올리고뉴클레오티드를 뮤린 추가변 영역 서열 뒤에서 패턴화하고, 직접적인 추가변 영역 이식편에 의해 규정된 동일한 영역을 포함시켰다. VH 도메인의 H2의 시작 부분에서의 아미노산 위치 (위치 49)를 코돈 RGC를 사용함으로써 A, G, S 또는 T에 대한 서열 다양성으로 제한하였다.

[0640] 야생형 CDR 이식된 서열을 다시 선택하는 것을 피하기 위해, 정지 코돈 (TAA)을 쿨켈 돌연변이유발에 의해 10H1-이식편의 각각의 CDR의 중앙에 도입하여 6개의 상이한 주형을 생성하였으며, 이들은 각각 상이한 CDR에 도입된 정지 코돈을 갖는다. 무작위 올리고뉴클레오티드를 사용하여 다양성을 도입하였을 뿐만 아니라 상응하는 주형의 정지 코돈을 복구하였다.

[0641] 파지 라이브러리의 생성

[0642] 상기 개략한 바와 같이 각각의 추가변 영역에 다양성을 도입하기 위해 설계된 무작위 올리고뉴클레오티드 풀을 660 ng의 올리고뉴클레오티드, 50 mM 트리스 pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 20 mM DTT, 및 5 U 폴리뉴클레오티드 키나제를 함유하는 20 μ l 반응물 중에서 1시간 동안 37°C에서 개별적으로 인산화시켰다.

[0643] 단일 CDR에 다양성을 도입하도록 지시된 각각의 인산화된 올리고뉴클레오티드 풀을 상응하는 정지 코돈을 함유하는 20 μ g의 쿨켈 주형과 합하였다. 반응을 50 mM 트리스 pH 7.5, 10 mM MgCl₂에서 500 μ l의 최종 부피로 수행하여 올리고뉴클레오티드 대 주형의 비가 3이 되도록 하였다. 혼합물을 90°C에서 4분 동안, 50°C에서 5분 동안 어닐링시킨 후에 얼음 상에서 냉각시켰다. 이어서, 어닐링된 주형 (250 μ l)을 이에 1 μ l 100 mM ATP, 10 μ l 25 mM dNTP (각각 25 mM의 dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP), 15 μ l 100 mM DTT, 25 μ l 10X TM 완충제 (0.5 M 트리스 pH 7.5, 0.1 M MgCl₂), 2400 U T4 리가제, 및 30 U T7 폴리머라제를 3시간 동안 실온에서 첨가하여 충전시켰다. 이어서, 충전된 생성물을 세정하고, SS320 세포로 전기천공시키고, 문헌 [Sidhu et al., Methods in Enzymology 328:333-363 (2000)]에 기재된 바와 같이 M13/K07 헬퍼 파지의 존재하에 증식시켰다. 라이브러리

크기는 1 - 2 x 10⁹개 독립적인 클론 범위였다. 초기 라이브러리로부터의 무작위 클론을 서열분석하여 라이브러리 품질을 평가하였다.

[0644] 파지 선택

[0645] 파지 선택을 위해, CHO 유래의 TAT211 세포의 도메인 (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 PBS에서 맥시소르프(MaxiSorp) 마이크로타이터 플레이트 (넉크(Nunc)) 상에 4°C에서 밤새 고정시켰다. 플레이트를 적어도 1시간 동안 카세인 블로커 (Casein Blocker) (피어스)를 사용하여 차단시켰다. 파지를 배양 상등액으로부터 수확하고, 0.5% BSA 및 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS (PBSBT)에 현탁시켰다. 파지 선택 후에, 마이크로타이터 웰을 0.05% 트윈 20을 함유하는 PBS (PBST)로 광범위하게 세척하고, 결합된 파지는 웰을 100 mM HCl과 30분 동안 인큐베이션함으로써 용리하였다. 파지를 1 M 트리스, pH 8로 중화시키고, XL1-블루 세포 및 M13/K07 헬퍼 파지를 사용하여 증폭시키고, 37°C에서 2YT, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 카르베나실린에서 밤새 성장시켰다. 표적 함유 웰로부터 용리된 파지의 역가를 비-표적 함유 웰로부터 회수한 파지의 역가와 비교하여 풍부화를 평가하였다.

[0646] Fab 및 IgG 생성

[0647] 친화도 측정을 위한 Fab 단백질을 발현시키기 위해, 정지 코돈을 중쇄와 파지 디스플레이 벡터 내의 g3 사이에 도입하였다. 클론을 이. 콜라이 34B8 세포로 형질전환시키고, 완전 C.R.A.P. 배지에서 30°C에서 성장시켰다 (문헌 [Presta et al. Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)]). 세포를 원심분리에 의해 수확하고, PBS, 100 μM PMSF, 100 μM 벤즈아미딘, 2.5 mM EDTA에 현탁시키고, 고압유화기를 이용하여 파쇄하여 개방시켰다. 단백질 G 친화성 크로마토그래피를 이용하여 Fab를 정제하였다.

[0648] 스크리닝 목적을 위해, IgG 변이체를 처음에 293 세포에서 생성하였다. VL 및 VH를 코딩하는 벡터 (25 μg)를 퓨진(FuGene) 시스템을 이용하여 293 세포 내로 형질감염시켰다. 500 μl 의 퓨진을 FBS를 함유하지 않은 4.5 ml의 DMEM 배지와 혼합하고, 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다. 각각의 채 (25 μg)를 이 혼합물에 첨가하고, 실온에서 20분 동안 인큐베이션한 다음, 5% CO₂ 중에서 37°C에서 밤새 형질감염을 위해 5개의 T-150 플라스크로 옮겼다. 다음날, 형질감염 혼합물을 함유하는 배지를 제거하고, 0.1 ml/l 미량 원소 (A0934) 및 10 mg/l 인슐린 (A0940)을 함유하는 PS04 배지 23 ml로 교체하였다. 세포를 추가로 5일 동안 인큐베이션한 후, 배지를 1000 rpm에서 5분 동안 수확하고, 0.22 μm 저 단백질 결합 필터를 이용하여 멸균 여과하였다. 샘플은 125 ml의 배지 당 2.5 ml 0.1% PMSF를 첨가한 후 4°C에서 저장할 수 있다. IgG는 단백질 G 친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

[0649] 친화도 결정

[0650] 친화도 결정을 스캐차드 분석, 비아코어™-2000 또는 A100을 이용하는 표면 플라즈몬 공명에 의해 수행하였다.

[0651] 비아코어 2000

[0652] TAT211 세포의 도메인 (글리코실화됨)을 고정시켰으며 (대략 100-400 RU, CM5 센서 칩 상의 10 mM 아세트산나트륨 pH 4.8 중), 10H1 항체 변이체는 분석물로서 역할을 하였다 (30 μl /분의 유량으로 주사, PBST 중 4 내지 1000 nM의 2-배 일련의 희석액 사용). 각각의 샘플을 4-분 회합 및 10-분 해리로 분석하였다. 각각의 주사 후에, 칩을 10 mM 글리신 pH 1.7을 사용하여 재생시켰다.

[0653] 결과 및 논의

[0654] 인간화에 사용된 인간 수용자 프레임워크는 컨센서스 인간 카파 I VL 도메인 및 컨센서스 인간 하위군 III VH 도메인에 기초한다. mu10H1의 VL 및 VH 도메인을 인간 카파 I 및 하위군 III 도메인과 정렬시키고; 각각의 상보성 결정 구역 (CDR)을 확인하고, 인간 수용자 프레임워크 내로 이식하여 IgG로서 발현될 수 있는 CDR 이식편 (10H1-이식편)을 생성하였다 (도 3 및 4). Fab로서 10H1-이식편의 친화도는 표면 플라즈몬 공명을 이용하여 평가하였고, CHO 유래의 TAT211 세포의 도메인에 대해 74 nM의 친화도를 갖는 것으로 밝혀졌으며, 이는 CDR 이식편이 mu10H1 하이브리도마 항체에 비해 약 2-배의 친화도가 손실되었다는 것을 나타낸다. 스캐차드 분석에 의해, mu10H1 IgG의 친화도는 각각 P828, OVCAR4, P701sc20 및 Igrov1 세포 (모두 TAT211을 발현함)에 대한 결합에 대해 36, 37, 59 및 61 nM인 것으로 결정되었다.

[0655] 다양성을 10H1-이식편의 각각의 CDR에 개별적으로 도입시키고, CHO 유래의 TAT211 세포의 도메인에 대해 패닝시킨 Fab 디스플레이 파지 라이브러리를 생성하였다. 모든 6개의 라이브러리에서 제2 라운드 후에 풍부화가 관찰되었다. 라운드 6 후에, 각각의 라이브러리로부터 DNA 서열 분석을 위한 클론을 피킹하고, 각각의 6개의 CDR에

서 표적화된 서열 변화를 밝혀냈다 (도 3 및 4). 라이브러리로부터 확인된 이들 서열 변화는 개선된 결합을 갖는 변이체로 이어지는 변화를 나타낼 수 있거나, 또는 간단하게 TAT211 세포의 도메인 결합에 영향을 미치지 않는 위치에서의 아미노산 변화를 나타낼 수 있다.

[0656] 몇몇 선택된 클론을 Fab로 발현시키고, 비아코어에 의해 TAT211 세포의 도메인에 대한 결합에 대해 특성화하였다. 모든 클론이 세포의 표면 상에서 TAT211에 결합하고, 대부분의 클론이 10H1-이식편에 대해 크게 개선된 친화도로 결합하였다.

[0657] 10H1-이식편의 CDR-L1에서의 잠재적 탈아미드화 및 이소-아스파르트산 형성 부위의 평가

[0658] 잠재적인 제조상의 문제점을 방지하기 위해, 10H1-이식편의 CDR-L1에서의 잠재적인 이소-아스파르트산 형성 부위 Asn28-Gly29를 다른 항체에서 이들 위치에서 발현되는 잔기의 샘플을 취하여 제거하였다. 10H1-이식편의 CDR-L1에서 Asn28을 Ser28로 교체하는 것 (10H1.v11.1)은 적합한 대안인 것으로 밝혀졌고, 잠재적인 탈아미드화 및 이소-아스파르트산 형성을 제거하는 역할을 하였다. 또한, VH에서 V93A의 복귀 돌연변이는 결합에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌고 (10H1.11.2b, 도 4), 이 위치에서 알라닌이 보다 통상적으로 발견되므로 이후의 인간화 변이체에 도입하였다.

[0659] 10H1.11의 친화도 성숙

[0660] TAT211 세포의 도메인에 대한 친화도 성숙 10H1.11 결합을 위한 추가의 파지 라이브러리를 생성하였다. 다양성은 10H1.11.2B에서 이전의 라이브러리에서 빈번하게 변화되는 위치에 표적화되었고, 경쇄에서 위치 27, 27c, 27e, 29, 93 및 94 및 중쇄에서 54, 55 및 61을 포함하였다. 이들 라이브러리로부터 확인된 서열을 도 3-12에 제시하였다.

[0661] 선택된 서열로부터, 비아코어 및 스캐차드 분석에 의한 평가를 위해 몇몇을 IgG로 다시 포맷하였다. 10H1.11.4B는 10H1.11.2B에서 관찰된 소분류 변화로부터 생성되었고, 스캐차드 분석에 의해 최고 친화도를 가졌다. 서열 9의 VL 아미노산 서열 (서열 81의 경쇄 아미노산 서열) 및 서열 18의 VH 아미노산 서열 (서열 80의 중쇄 아미노산 서열)을 갖는 항체 10H1.11.4B는 무린 10H1보다 더 높은 친화도를 갖는 세포의 표면 상에서 TAT211에 결합하는 것으로 밝혀졌으며, 이에 따라 추가의 개발을 위한 리드 후보로 선택되었다.

[0662] 실시예 7: TAT211에 결합하는 독소-접합된 항체의 제조

[0663] 암의 치료에서 종양 세포를 사멸 또는 억제하기 위해 세포독성제 또는 세포증식 억제제, 즉 약물의 국소 전달을 위한 항체-약물 접합체 (ADC), 즉 면역접합체를 사용하는 것 (문헌 [Payne (2003) Cancer Cell 3:207-212]; [Syrgos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614]; [Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172]; US 4,975,278)은 종양에 대한 약물 모이어티의 표적화된 전달, 및 거기에서 세포내 축적을 허용하며, 여기서 이들 접합되지 않은 약물 제제의 전신 투여는 제거되도록 발견된 종양 세포 뿐만 아니라 정상 세포에 대해 허용되지 않는 수준의 독성을 일으킬 수 있다 (문헌 [Baldwin et al., (1986) Lancet (Mar. 15, 1986) pp. 603-05]; [Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506]). 이에 의해 최소 독성을 나타내는 최대 효능을 찾았다. ADC를 설계하고 정밀화하기 위한 노력은 모노클로날 항체 (mAb)의 선택성 뿐만 아니라 약물-연결 및 약물-방출 특성에 집중되었다. 폴리클로날 항체 및 모노클로날 항체는 둘 다 이러한 전략에서 유용한 것으로 보고되었다 (문헌 [Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87]). 이들 방법에 사용된 약물은 다우노마이신, 독소루비신, 메토트렉세이트 및 빈데신을 포함한다 (문헌 [Rowland et al., (1986) 상기 문헌]). 항체-독소 접합체에 사용된 독소는 박테리아 독소, 예컨대 디프테리아 독소, 식물 독소, 예컨대 리신, 소분자 독소, 예컨대 겔다나마이신 (문헌 [Mandler et al. (2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581]; [Mandler et al. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028]; [Mandler et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791]), 메이탄시노이드 (EP 1391213; 문헌 [Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623]), 및 칼리케아미신 (문헌 [Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928]; [Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342])을 포함한다.

[0664] 본 발명의 항체 약물 접합체 (ADC)에서, 항체 (Ab)는 링커 (L)를 통해 항체 당 하나 이상의 약물 모이어티 (D), 예를 들어 약 1 내지 약 20개의 약물 모이어티에 접합된다. 화학식 $Ab-(L-D)_n$ 를 갖는 ADC는 다음을 포함하는, 당업자에게 공지된 유기 화학 반응, 조건 및 시약을 사용하여 여러 경로에 의해 제조할 수 있다: (1) 항체의 친핵성 기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통해 Ab-L을 형성시킨 후, 이를 약물 모이어티 D와 반응시켜

는 것; 및 (2) 약물 모이어티의 친핵성 기를 2가 링커 시약과 반응시켜, 공유 결합을 통해 D-L을 형성시킨 다음, 이를 항체의 친핵성 기와 반응시키는 것. ADC를 제조하는 추가의 방법은 본원에 기재되어 있다.

[0665] 링커는 하나 이상의 링커 성분으로 구성될 수 있다. 예시적인 링커 성분은 6-말레이미도카프로일 ("MC"), 말레이미도프로파노일 ("MP"), 발린-시트룰린 ("val-cit"), 알라닌-페닐알라닌 ("ala-phe"), p-아미노벤질옥시카르보닐 ("PAB"), N-숙신이미딜 4-(2-피리디리티오)펜타노에이트 ("SPP"), N-숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1 카르복실레이트 ("SMCC") 및 N-숙신이미딜 (4-아이오도-아세틸)아미노벤조에이트 ("SIAB")를 포함한다. 추가의 링커 성분이 당업계에 공지되어 있고, 일부는 본원에서 기재된다.

[0666] 일부 실시양태에서, 링커는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 예시적인 아미노산 링커 성분은 디펩티드, 트리펩티드, 테트라펩티드 또는 펜타펩티드를 포함한다. 예시적인 디펩티드는 발린-시트룰린 (vc 또는 val-cit), 알라닌-페닐알라닌 (af 또는 ala-phe)을 포함한다. 예시적인 트리펩티드는 글리신-발린-시트룰린 (gly-val-cit) 및 글리신-글리신-글리신 (gly-gly-gly)을 포함한다. 아미노산 링커 성분을 포함하는 아미노산 잔기는 자연적으로 발생하는 것들 뿐만 아니라 소수의 아미노산 및 비-자연 발생 아미노산 유사체, 예컨대 시트룰린을 포함한다. 아미노산 링커 성분은 특정 효소, 예를 들어 종양-관련 프로테아제, 카텝신 B, C 및 D, 또는 플라스민 프로테아제에 의한 효소에 의한 절단에 대한 이들의 선택성 측면에서 설계되고 최적화될 수 있다.

[0667] 항체 상의 친핵성 기는 (i) N-말단 아민 기, (ii) 측쇄 아민 기, 예를 들어 리신, (iii) 측쇄 티올 기, 예를 들어 시스테인, 및 (iv) 항체가 글리코실화되는 당 히드록실 기 또는 아미노 기를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 아민, 티올, 히드록실, 히드라지드, 옥심, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트 및 아릴히드라지드 기는 친핵성이고, 링커 모이어티 및 다음을 포함하는 링커 시약 상의 친전자성 기와 반응하여 공유 결합을 형성할 수 있다: (i) 활성 에스테르, 예컨대 NHS 에스테르, HOBt 에스테르, 할로포르메이트 및 산 할라이드, (ii) 알킬 및 벤질 할라이드, 예컨대 할로아세타미드, (iii) 알데히드, 케톤, 카르복실 및 말레이미드 기. 특정 항체는 환원가능한 쇠간 디설피드, 즉 시스테인 브릿지를 갖는다. 환원제, 예컨대 DTT (디티오트레이톨)로의 처리를 통해 항체를 링커 시약과의 접합에 반응성이 되도록 할 수 있다. 따라서, 각각의 시스테인 브릿지는 이론상 2개의 반응성 티올 친핵체를 형성할 것이다. 아민을 티올로 전환시키는, 리신과 2-이미노티올란 (트라우트 (Traut) 시약)의 반응을 통해 추가의 친핵성 기를 항체 내로 도입할 수 있다. 반응성 티올기는 1, 2, 3, 4개 또는 그 초과인 시스테인 잔기를 도입함으로써 (예를 들어, 하나 이상의 비-천연 시스테인 아미노산 잔기를 포함하는 돌연변이체 항체를 제조함으로써) 항체 (또는 그의 단편)에 도입될 수 있다.

[0668] 본 발명의 항체 약물 접합체는 또한 링커 시약 또는 약물 상의 친핵성 치환기와 반응할 수 있는 친전자성 모이어티를 도입하는 항체의 변형에 의해 생성될 수도 있다. 글리코실화된 항체의 당을, 예를 들어 피아이오테이트 산화 시약으로 산화시켜서 링커 시약 또는 약물 모이어티의 아민 기와 반응할 수 있는 알데히드 또는 케톤 기를 형성할 수 있다. 생성되는 이민 쉬프 염기성 기는 안정한 연결부를 형성할 수도 있거나, 또는 예를 들어 보로히드라이드 시약에 의해 환원되어 안정한 아민 연결부를 형성할 수도 있다. 한 실시양태에서, 글리코실화된 항체의 탄수화물 부분을 갈락토스 옥시다제 또는 나트륨 메타-피아이오테이트와 반응시키면, 약물상의 적절한 기와 반응할 수 있는 카르보닐 (알데히드 및 케톤) 기가 단백질 내에 생성될 수 있다 (헤르만슨(Hermanson), 바이오컨쥬게이트 테크닉스(Bioconjugate Techniques)). 또 다른 실시양태에서, N-말단 세린 또는 트레오닌 잔기를 함유하는 단백질을 나트륨 메타-피아이오테이트와 반응시키면, 첫번째 아미노산 대신에 알데히드가 생성될 수 있다 (문헌 [Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146]; US 5362852). 이러한 알데히드는 약물 모이어티 또는 링커 친핵체와 반응할 수 있다.

[0669] 대안적으로, 항체 및 세포독성제를 포함하는 융합 단백질은 예를 들어 재조합 기술 또는 펩티드 합성에 의해 제조될 수 있다. DNA의 길이는 서로 인접하거나 접합체의 원하는 특성을 파괴하지 않는 링커 펩티드를 코딩하는 영역에 의해 분리된, 접합체의 2개 부분을 코딩하는 각각의 영역을 포함할 수 있다.

[0670] 또 다른 실시양태에서, 항체를 종양 예비표적화에 활용하기 위해 "수용체" (상기, 스트렙타비딘)에 접합시킬 수 있고, 여기서 항체-수용체 접합체를 환자에게 투여한 다음, 제거제를 사용하여 결합되지 않은 접합체를 순환계로부터 제거하고, 이어서 세포독성제 (예를 들어, 방사성 뉴클레오타이드)에 접합된 "리간드" (예를 들어, 아비딘)를 투여한다.

[0671] 독소를 정제된 항체에 연결하여 항체-약물 접합체를 생성하는 구체적인 기술은 공지되어 있고 당업계에서 통상적으로 이용된다. 예를 들어, 정제된 모노클로날 항체의 독소 DM1에 대한 접합은 하기하는 바와 같이 하여 달성될 수 있었다. 정제된 항체를 N-숙신이미딜-4-(2-피리디리티오)펜타노에이트로 유도체화시켜 디티오피리디를 도입한다. NaCl (50 mM) 및 EDTA (1 mM)를 함유하는 50 mM 인산칼륨 완충제 (pH 6.5) 44.7 ml 중의 항체

(376.0 mg, 8 mg/mL)를 SPP (에탄올 2.3 mL 중 5.3 몰 당량)로 처리하였다. 주위 온도에서 아르곤하에 90분 동안 인큐베이션한 후, 상기 반응 혼합물을 35 mM 시트르산나트륨, 154 mM NaCl, 및 2 mM EDTA로 평형화시킨 세파텍스 G25 칼럼을 통해 겔 여과하였다. 이어서, 항체 함유 분획을 모아서 검정하였다. 항체-SPP-Py (방출가능한 2-티오피리딘 기를 가짐, 337.0 mg)를 상기 35 mM 시트르산나트륨 완충제 (pH 6.5)를 사용하여 최종 농도 2.5 mg/mL로 희석하였다. 이어서, 3.0 mM 디메틸아세트아미드 (DMA, 최종 반응 혼합물 중 3% v/v) 중 DM1 (1.7 당량, 16.1 mol)을 항체 용액에 첨가하였다. 반응이 주위 온도에서 아르곤하에 20시간 동안 진행되게 하였다. 반응물을 35 mM 시트르산나트륨, 154 mM NaCl (pH 6.5)로 평형화시킨 세파크릴 S300 겔 여과 칼럼 (5.0 cm x 90.0 cm, 1.77 L)에 로딩하였다. 유량은 5.0 mL/분이었고, 65개 분획 (각각 20.0 mL)을 수집하였다. 분획을 모아서 검정하였고, 252 nm 및 280 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 항체 분자 당 연결된 DM1 약물 분자의 수 (p')를 결정하였다.

[0672] 설명의 목적을 위해, 정제된 모노클로날 항체의 독소 DM1에 대한 접합은 또한 하기와 같이 하여 달성될 수도 있었다. 정제된 항체를 숙신이미딜 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트 (SMCC, 피어스 바이오테크놀로지, 인크.)로 유도체화하여 SMCC 링커를 도입하였다. 항체를 50 mM 인산칼륨/50 mM 염화나트륨/2 mM EDTA (pH 6.5) 중에 20 mg/mL에서 7.5 몰 당량의 SMCC (DMSO 중 20 mM, 6.7 mg/mL)로 처리하였다. 주위 온도에서 아르곤하에 2시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 50 mM 인산칼륨/50 mM 염화나트륨/2 mM EDTA (pH 6.5)로 평형화시킨 세파텍스 G25 칼럼을 통해 여과하였다. 항체 함유 분획을 모아서 검정하였다. 이어서, 항체-SMCC를 50 mM 인산칼륨/50 mM 염화나트륨/2 mM EDTA (pH 6.5)를 사용하여 최종 농도 10 mg/mL로 희석하고, 디메틸아세트아미드 중 10 mM DM1 용액 (1.7 당량, 항체 당 5개의 SMCC를 갖는다고 의심됨, 7.37 mg/mL)과 반응시켰다. 반응물을 주위 온도에서 아르곤하에 16.5시간 동안 교반하였다. 이어서, 접합 반응 혼합물을 pH 6.5의 1 x PBS로 세파텍스 G25 겔 여과 칼럼 (1.5 x 4.9 cm)을 통해 여과하였다. 이어서, DM1/항체 비율 (p)을 252 nm 및 280 nm에서의 흡광도에 의해 측정하였다.

[0673] 추가로, 선택된 항체 상의 유리 시스템인을 비스-말레이미도 시약 BM(PEO)4 (피어스 케미칼(Pierce Chemical))로 변형시켜, 항체의 표면 상에 반응하지 않은 말레이미도기가 남게 할 수 있었다. 이것은 BM(PEO)4를 50% 에탄올/물 혼합물 중에 10 mM의 농도로 용해하고, 10배 몰 과량을 포스페이트 완충 염수 중 항체를 함유하는 용액에 대략 1.6 mg/mL (10 μ M)의 농도로 첨가하고, 이것이 1시간 동안 반응하도록 하여 달성될 수 있었다. 잉여량의 BM(PEO)4를 150 mM NaCl 완충제를 함유하는 30 mM 시트레이트 (pH 6) 중에서의 겔 여과로 제거하였다. 대략 10배 몰 과량의 DM1을 디메틸 아세트아미드 (DMA) 중에 용해하고, 항체-BMPEO 중간체에 첨가하였다. 또한, 디메틸 포름아미드 (DMF)를 사용하여 약물 잔기 시약을 용해시킬 수도 있었다. 반응 혼합물을 밤새 반응시킨 후에 PBS로의 겔 여과 또는 투석을 실시하여 반응하지 않은 약물을 제거하였다. PBS 중 S200 칼럼 상에서의 겔 여과를 이용하여 고분자량 응집체를 제거하고, 정제된 항체-BMPEO-DM1 접합체를 제공하였다.

[0674] 세포독성 약물은 전형적으로 종종 항체의 다수의 리신 잔기를 통해 항체에 접합되어 왔다. 관심있는 항체에 존재하거나 관심있는 항체에 존재하도록 조작된 티올기를 통해 접합이 달성되기도 했다. 예를 들어, 시스템인 잔기는 유전자 조작 기술에 의해 단백질 내로 도입되어, 리간드에 공유결합에 의한 부착을 형성하였다 (문헌 [Better et al. (1994) J. Biol. Chem. 13: 9644-9650]; [Bernhard et al. (1994) Bioconjugate Chem. 5: 126-132]; [Greenwood et al. (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255]; [Tu et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4862-4867]; [Kanno et al. (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214]; [Chmura et al. (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484]; 미국 특허 번호 6,248,564). 일단 유리 시스템인 잔기가 관심있는 항체에 존재하면, 독소를 그 부위에 연결시킬 수 있었다. 예로서, DMSO 중에 용해된 약물 링커 시약, 말레이미도카프로일-모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE), 즉, MC-MMAE, 말레이미도카프로일-모노메틸 아우리스타틴 F (MMAF), 즉, MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE 또는 MC-val-cit-PAB-MMAF를 공지의 농도로 아세트니트릴 및 물 중에 희석하고, 포스페이트 완충 염수 (PBS) 중의 냉각된 시스템인-유도체화 항체에 첨가하였다. 약 1시간 후, 과량의 말레이미드를 첨가하여 반응을 켜치시키고, 임의의 반응하지 않은 항체 티올기를 캡핑하였다. 반응 혼합물을 원심분리 한외여과에 의해 농축하여 독소 접합된 항체를 정제하고 PBS 중 G25 수지를 통해 용리시켜 탈염하고, 멸균 조건하에서 0.2 μ m 필터를 통해 여과하고 동결시켜 저장하였다.

[0675] 추가로, 본 발명의 항-TAT211 항체를 하기 기술을 이용하여 아우리스타틴 및 돌로스타틴 독소 (예컨대 MMAE 및 MMAF)에 접합시킬 수 있었다. pH 8.0의 500 mM 붕산나트륨 및 500 mM 염화나트륨에 용해된 항체를 과량의 100 mM 디티오프레이톨 (DTT)로 처리하였다. 37°C에서 약 30분 동안 인큐베이션한 후, 완충제를 세파텍스 G25 수지 상에서의 용리에 의해 교환하고, 1 mM DTPA가 존재하는 PBS로 용리하였다. 용액의 280 nm에서의 흡광도로부터 환원된 항체 농도를 결정하고, DTNB (알드리치(Aldrich), 위스콘신주 밀워키)와 반응시켜 412 nm에서의 흡광도

를 측정하여 티올 농도를 결정함으로써 티올/Ab 값을 확인하였다. PBS 중에 용해된 환원된 항체를 얼음에서 냉각시켰다.

[0676] DMSO 중에 용해된 약물 링커 시약, (1) 말레이미도카프로일-모노메틸 아우리스타틴 E (MMAE), 즉, MC-MMAE, (2) MC-MMAF, (3) MC-val-cit-PAB-MMAE 또는 (4) MC-val-cit-PAB-MMAF를 공지의 농도로 아세트니트릴 및 물 중에 희석하고, PBS 중의 냉각된 환원된 항체에 첨가하였다. 약 1시간 후, 과량의 말레이미드를 첨가하여 반응을 켜치시키고, 임의의 반응하지 않은 항체 티올 기를 캡핑하였다. 반응 혼합물을 원심분리 한외여과에 의해 농축하여 집합된 항체를 정제하고 PBS 중 G25 수지를 통해 용리시켜 탈염하고, 멸균 조건하에서 0.2 μ m 필터를 통해 여과하고 동결시켜 저장하였다.

[0677] 실시예 8: 시험관내 종양 세포 사멸 검정

[0678] 관심있는 TAT211 폴리펩티드를 발현하는 포유동물 세포는 표준 발현 벡터 및 클로닝 기술을 이용하여 얻을 수 있었다. 대안적으로, 관심있는 TAT211 폴리펩티드를 발현하는 다수의 종양 세포주는 예를 들어 ATCC를 통해 공개적으로 입수가 가능하고, 표준 ELISA 또는 FACS 분석을 이용하여 통상적으로 확인할 수 있었다. 이어서, 항-TAT211 폴리펩티드 모노클로날 항체 (및 그의 독소 집합된 유도체)를 TAT211 폴리펩티드 발현 세포를 시험관 내에서 사멸시키는 항체의 능력을 결정하기 위한 검정에서 사용할 수 있었다.

[0679] 예를 들어, 관심있는 TAT211 폴리펩티드를 발현하는 세포를 상기 기재된 바와 같이 수득하고, 96 웰 접시에 플레이트팅하였다. 하나의 분석에서, 항체/독소 집합체 (또는 네이키드 항체)를 세포 인큐베이션 전체에 4일 동안 포함시켰다. 제2 독립적인 분석에서, 세포를 1시간 동안 항체/독소 집합체 (또는 네이키드 항체)와 함께 인큐베이션한 후, 세척하고 항체/독소 집합체의 부재하에 4일 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 셀타이터-글로 (CellTiter-Glo) 발광 세포 생존을 검정 (프로메가 (Cat# G7571))를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 처리되지 않은 세포가 음성 대조군 역할을 하였다.

[0680] 처음 실험에서 및 구체적으로 본 발명과 관련하여, 인간화 항-TAT211 10H1 항체 및 TAT211에 대한 결합에 대해 비-특이적인 대조군 항체 (항-인간 gD 또는 항-폐지풀)의 다양한 농도의 ADC MC-vc-PAB-MMAE 독소 집합체를 TAT211 폴리펩티드-발현 세포주 OVCAR-3를 사멸시키기 위해 결합하는 능력에 대해 시험하였다. 보다 구체적으로, OVCAR-3 세포를 96 웰 플레이트에서 웰 당 3000개 세포로 시딩하고, 이후에 다양한 농도의 항체로 처리하였다. 세포 사멸을 셀 타이터-글로 시약을 사용하여 제7일에 정량하였다. 이러한 분석에 사용된 항체는 (i) 항-TAT211 항체 10H1-이식편 (서열 5에 제시된 VL 아미노산 서열 및 서열 14에 제시된 VH 아미노산 서열을 가짐), (ii) 비-특이적 항-인간 gD 항체, (iii) 비-특이적 항-폐지풀 항체, (iv) 인간화 항-TAT211 항체 10H1.11 (서열 6에 제시된 VL 아미노산 서열 및 서열 15에 제시된 VH 아미노산 서열을 가짐), (v) 인간화 항-TAT211 항체 10H1.11.2B (서열 8에 제시된 VL 아미노산 서열 및 서열 17에 제시된 VH 아미노산 서열을 가짐), (vi) 인간화 항-TAT211 항체 10H1.11.4B (서열 9에 제시된 VL 아미노산 서열 및 서열 18에 제시된 VH 아미노산 서열을 가짐), (vii) 인간화 항-TAT211 항체 10H1.11.6B (서열 11에 제시된 VL 아미노산 서열 및 서열 20에 제시된 VH 아미노산 서열을 가짐), 및 (viii) 인간화 항-TAT211 항체 10H1.11.1 (서열 7에 제시된 VL 아미노산 서열 및 서열 16에 제시된 VH 아미노산 서열을 가짐)이다. 이러한 실험으로부터의 결과를 도 15에 제시하였고, 이는 각각의 독소 집합된 항-TAT211 항체가 OVCAR-3 세포 (즉, 세포 표면 상에서 TAT211 폴리펩티드를 발현하는 세포)에서 유의한 수준의 세포 사멸을 유발하는 반면, 임의의 비-특이적 항체에서는 어떠한 유의한 세포 사멸도 관찰되지 않았다는 것을 입증하였다. 이러한 데이터는 시험된 항-TAT211 항체가 TAT211 폴리펩티드를 발현하는 세포의 표면 상에서 TAT211 폴리펩티드에 결합할 수 있고, 시험관내에서 이러한 세포의 사멸을 유발할 수 있다는 것을 입증하였다.

[0681] 제2 실험에서, 다양한 농도의 (i) MC-vc-PAB-MMAE 집합된 10H1.11.4B, 또는 (ii) 대조군 항-인간 gD 항체를 이들이 293 세포 (TAT211 폴리펩티드를 내재적으로 발현하지 않음) 또는 이들의 세포 표면 상에서 TAT211 폴리펩티드를 발현하도록 재조합적으로 조작된 293 세포 (293/TAT211 세포)를 사멸하는 능력에 대해 시험관내에서 시험하였다. 보다 특히, 293 또는 293/TAT211 세포를 96 웰 플레이트에서 웰 당 2000개 세포로 시딩하고, 이후에 다양한 농도의 항체로 처리하였다. 세포 사멸을 셀 타이터-글로 시약을 사용하여 제7일에 정량하였다. 293 세포를 사용하여 수득한 결과를 도 16에 제시하였고, 여기서 데이터는 비-특이적 대조군 항-인간 gD 항체 뿐만 아니라 항-TAT211 10H1.11.4B 항체가 293 세포 (TAT211 폴리펩티드를 발현하지 않음)의 유의한 사멸을 생성할 수 없다는 것을 입증한다. 그러나, 대조적으로, 세포 표면 상에서 TAT211 폴리펩티드를 발현하지 않는 293/TAT211 세포를 사용하여 수득한 결과 (도 17)는 독소 집합된 항-TAT211 10H1.11.4B 항체가 시험관내에서 유의한 세포 사멸을 유발한다는 것을 입증하였다.

- [0682] 이러한 데이터는 이들 검정에서 사용된 다양한 항-TAT211 항체가 세포 표면 상에서 TAT211 폴리펩티드에 결합할 수 있고, 항체가 결합하는 세포의 사멸을 유도할 수 있다는 것을 입증하였다.
- [0683] 실시예 9: 생체내 종양 사멸 분석
- [0684] 생체내에서 종양 사멸을 위한 다양한 항-TAT211 항체의 효능을 시험하기 위해, OVCAR-3 유방 지방 패드 생체내 모델을 사용하였다. 특히, OVCAR-3 유방 지방 패드 이식 모델 번호 4382-061404를 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (버지니아주 매나사스)로부터 수득한 TAT211-발현 OVCAR-3 난소 선암종 세포주를 사용하여 개발하였다. OVCAR-3 세포를 베이지 돌연변이를 갖는 암컷 C.B-17 중증의 조합된 면역결핍 마우스 (C.B-17 SCID.베이지)에 복강내 주사하였다. 공여자 종양을 복강내 종양을 보유하는 마우스로부터 절제하고, 잘게 자르고, 암컷 C.B-17 SCID. 베이지 수용자 마우스의 오른쪽 가슴 유방 지방 패드에 외과적으로 이식하였다. 유방 지방 패드 종양을 연속적으로 계대배양하여 이식 세포주를 유지하고, 효능 연구를 위한 종양-보유 마우스를 제공하였다 (일반적으로, 이식 14 내지 18일 후에 준비). 이식 세포주를 유지하기 위해 사용된 C.B-17 SCID.베이지 마우스는 6 내지 8주령 이고, 찰스 리버 래보러토리즈, 인크.(Charles River Laboratories, Inc.) (캘리포니아주 샌 디에고)로부터 수득하였다. 이어서, 다양한 농도 (3 mg/kg 포함)의 다양한 항체를 사용하여 생체내에서 평균 종양 부피에 대한 이들의 효과를 결정하였다.
- [0685] 이러한 다양한 생체내 분석의 결과를 도 18 및 19에 제시하였다. 이들 결과는 시험된 다양한 항-TAT211 항체가 생체내에서 종양 세포의 표면 상에서 TAT211 폴리펩티드에 결합할 수 있고, 이러한 TAT211-발현 종양 세포의 사멸을 유도할 수 있다는 것을 입증한다. 따라서, 이들 실험의 결과는 시험된 다양한 항-TAT211 항체가 생체내에서 TAT211-발현 종양의 치료적 치료에 효과적이라는 것을 보여준다.
- [0686] 실시예 10: 항-TAT211 항체의 세포 내재화
- [0687] 본원에 기재된 항-TAT211 항체가 세포 표면 상의 TAT211 폴리펩티드에 대한 항체의 결합시에 TAT211-발현 세포로 내재화되는지 결정하기 위해, 세포를 8-웰 챔버 슬라이드 (날제 넉크 인터내셔널(Nalge Nunc Intl.)) (OVCAR3의 경우 100,000개 세포/웰 및 Igrov1 또는 293의 경우 30,000개 세포/웰)에 시딩하고, 37°C/5% CO₂에서 24-48시간 동안 인큐베이션하였다. 항-TAT211 항체를 성장 배지 중 2-5 µg/ml에서 프로테아제 억제제 (50 µg/ml 류펩틴 및 5 µg/ml 펩스타틴)와 함께 밤새 또는 2시간 동안 첨가하였다. 이들 프로테아제 억제제는 1차 항체의 분해를 방지하여, 리소솜에서의 항체의 검출을 허용한다. 라이브 표지화를 위해, 세포를 항체와 실온에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 모든 세포를 세척하고, 3% 포름알데히드에 10분 동안 고정시키고, 0.05% 사포닌으로 5 내지 10분 동안 투과시키고, 비-특이적 항체 결합 부위를 PBS+1%BSA에 의해 20분 동안 실온에서 차단하였다. 이어서, 세포를 알렉사-488 (몰레큘라 프로브스(Molecular Probes))로 표지된 2차 항체와 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 세척한 후에 챔버 삽입물을 제거하여 세포가 있는 유리 슬라이드를 노출시켰다. 슬라이드를 핵을 표지하는 DAPI와 벡타실드(VectaShield)를 적용하여 마운팅하고 (벡터 래보러토리즈 (Vector Laboratories)), 이어서 유리 커버슬립 아래 놓고, 투명 네일 폴리쉬로 밀봉하였다.
- [0688] 이러한 분석으로부터의 결과는 본원에 기재된 다양한 항-TAT211 항체가 살아있는 세포의 표면 상에서 TAT211 폴리펩티드에 결합하고, 세포로 빠르게 내재화되고, 항체를 세포에 첨가한 후 20시간 미만 이내에 세포의 리소솜에 위치한다는 것을 입증하였다. 이에 따라, 본원에 기재된 항-TAT211 항체는 TAT211 폴리펩티드를 발현하는 종양을 위한 독소-접합된 종양 치료에 우수한 후보이다.
- [0689] 실시예 11: 혼성화 프로브로서 TAT의 용도
- [0690] 하기 방법은 혼성화 프로브로서, 즉 포유동물에서 종양의 존재의 진단을 위한 TAT를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 용도를 설명한다.
- [0691] 본원에 개시된 바와 같은 전장 또는 성숙 TAT의 코딩 서열을 포함하는 DNA는 또한 인간 조직 cDNA 라이브러리 또는 인간 조직 게놈 라이브러리에서 상동성 DNA (예를 들어, TAT의 자연 발생 변이체를 코딩하는 것)를 스크리닝하기 위한 프로브로서 사용될 수 있다.
- [0692] 하기 고염격성 조건하에서 라이브러리 DNA를 함유하는 필터를 혼성화하고 세척하였다. 필터에 대한 방사성표지된 TAT-유래의 프로브의 혼성화는 50% 포름아미드, 5x SSC, 0.1% SDS, 0.1% 피로인산나트륨, 50 mM 인산나트륨 (pH 6.8), 2x 덴하르트 용액, 및 10% 텍스트란 술페이트의 용액에서 42°C에서 20시간 동안 수행하였다. 필터의 세척은 0.1x SSC 및 0.1% SDS의 수용액에서 42°C에서 수행한다.
- [0693] 이어서, 전장 천연 서열 TAT를 코딩하는 DNA와 원하는 서열 동일성을 갖는 DNA를 당업계에 공지된 표준 기술을

사용하여 확인할 수 있었다.

- [0694] 실시예 12: 이. 콜라이에서의 TAT의 발현
- [0695] 본 실시예는 이. 콜라이에서의 재조합 발현에 의해 글리코실화되지 않은 형태의 TAT를 제조하는 것을 설명한다.
- [0696] 우선, TAT를 코딩하는 DNA 서열을 선택된 PCR 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. 프라이머는 선택된 발현 벡터 상의 제한 효소 부위에 상응하는 제한 효소 부위를 함유해야 한다. 다양한 발현 벡터를 사용할 수 있다. 적합한 벡터의 예는 암피실린 및 테트라시클린 내성을 위한 유전자를 함유하는 pBR322 (이. 콜라이에서 유래됨; 문헌 [Bolivar et al., Gene, 2:95 (1977)] 참조)이다. 벡터를 제한 효소로 소화시키고 탈인산화시켰다. 이어서, PCR 증폭된 서열을 벡터에 라이게이션시켰다. 바람직하게는, 벡터는 항생제 내성 유전자, trp 프로모터, 폴리his 리더 (처음 6개의 STII 코돈, 폴리his 서열 및 엔테로키나제 절단 부위를 포함함), TAT 코딩 영역, 램다 전사 종결자 및 argU 유전자를 코딩하는 서열을 포함할 것이다.
- [0697] 이어서, 라이게이션 혼합물을 사용하여, 선택된 이. 콜라이 균주를 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재된 방법을 이용하여 형질전환시켰다. LB 플레이트 상에서 성장하는 능력에 의해 형질전환체를 확인한 후, 항생제 내성 콜로니를 선택하였다. 제한 분석 및 DNA 서열분석에 의해 플라스미드 DNA를 분리 및 확인할 수 있었다.
- [0698] 선택된 클론을 항생제가 보충된 LB 브로스와 같은 액체 배양 배지 중에서 밤새 성장시킬 수 있었다. 이후에, 밤샘 배양물을 사용하여, 더 큰 규모의 배양물에 접종할 수 있었다. 이어서, 세포를 원하는 광학 밀도까지 성장시켰고, 이 동안에 발현 프로모터가 작동되었다.
- [0699] 추가로 수시간 동안 세포를 배양한 후, 원심분리에 의해 세포를 수확할 수 있었다. 원심분리에 의해 수득된 세포 펠릿을 당업계에 공지된 다양한 작용제를 사용하여 가용화할 수 있었고, 이어서 가용화된 TAT 단백질을 단백질의 단단한 결합을 허용하는 조건하에서 금속 킬레이팅 칼럼을 사용하여 정제할 수 있었다.
- [0700] 하기 절차를 이용하여 TAT를 이. 콜라이에서 폴리-His 태그가 부착된 형태로 발현시킬 수 있었다. 먼저, TAT를 코딩하는 DNA를 선택된 PCR 프라이머를 사용하여 증폭시켰다. 프라이머는 선택된 발현 벡터 상의 제한 효소 부위에 상응하는 제한 효소 부위, 및 효율적이고 신뢰할 수 있는 번역 개시, 금속 킬레이트 칼럼 상에서의 신속한 정제, 및 엔테로키나제에 의한 단백질분해 제거를 제공하는 다른 유용한 서열들을 함유한다. 이어서, PCR 증폭된, 폴리-His 태그가 부착된 서열을 발현 벡터에 라이게이션시키고, 이것을 사용하여 균주 52를 기초로 하는 이. 콜라이 숙주를 형질전환시켰다 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)). 먼저, 형질전환체를 50 mg/ml의 카르베니실린을 함유하는 LB에서 O.D.600이 3-5에 도달할 때까지 30℃에서 진탕하며 성장시켰다. 이어서, 배양물을 CRAP 배지 (물 500 ml 중 (NH₄)₂SO₄ 3.57 g, 시트르산나트륨 · 2H₂O 0.71 g, KCl 1.07 g, 디프코(Difco) 효모 추출물 5.36 g, 셰필드(Sheffield) 히카제 SF 5.36 g 뿐만 아니라 110 mM MPOS (pH 7.3), 0.55% (w/v) 글루코스 및 7 mM MgSO₄를 혼합하여 제조한 것) 중에 50-100배 희석하고, 대략 20-30시간 동안 30℃에서 진탕하며 성장시켰다. 샘플을 제거하여 SDS-PAGE 분석에 의해 발현을 입증하고, 벌크 배양물을 원심분리하여 세포를 펠릿화하였다. 정제 및 리폴딩시킬 때까지 세포 펠릿을 동결시켰다.
- [0701] 발효물 0.5 내지 1 L로부터의 이. 콜라이 페이스트 (펠릿 6-10 g)를 7 M 구아니딘, 20 mM 트리스 (pH 8) 완충제 중에 10 부피 (w/v)로 재현탁시켰다. 고체 아황산나트륨 및 나트륨 테트라티오네이트를 각각 0.1 M 및 0.02 M의 최종 농도가 되도록 첨가하고, 용액을 4℃에서 밤새 교반하였다. 이 단계에서, 모든 시스테인 잔기가 아황산염화에 의해 차단된 변성 단백질이 생성되었다. 용액을 베크만 초원심분리기에서 40,000 rpm으로 30분 동안 원심분리하였다. 상청액을 3-5 부피의 금속 킬레이트 칼럼 완충제 (6 M 구아니딘, 20 mM 트리스 (pH 7.4))로 희석하고, 0.22 μm 필터를 통해 여과하여 정제하였다. 정제된 추출물을 금속 킬레이트 칼럼 완충제로 평형화시킨 5 ml 쿼아젠 Ni-NTA 금속 킬레이트 칼럼에 로딩하였다. 50 mM 이미다졸 (칼바이오켄, 우트롤(Utrol) 등급)을 함유하는 추가의 완충제 (pH 7.4)로 칼럼을 세척하였다. 250 mM 이미다졸을 함유하는 완충제로 단백질을 용리하였다. 원하는 단백질을 함유하는 분획을 모으고, 4℃에서 저장하였다. 아미노산 서열을 기초로 하여 계산된 흡광 계수를 사용하여 280 nm에서의 흡광도에 의해 단백질 농도를 의심하였다.
- [0702] 샘플을 새로 제조된 리폴딩 완충제 (20 mM 트리스 (pH 8.6), 0.3 M NaCl, 2.5 M 우레아, 5 mM 시스테인, 20 mM 글리신 및 1 mM EDTA로 이루어짐)으로 천천히 희석하여 단백질을 리폴딩시켰다. 최종 단백질 농도가 50 내지 100 μg/ml가 되도록 리폴딩 부피를 선택하였다. 리폴딩 용액을 4℃에서 12 내지 36시간 동안 부드럽게 교반하였다. TFA를 0.4%의 최종 농도 (대략 pH 3)로 첨가하여 리폴딩 반응을 켜치시켰다. 추가의 단백질 정제 이전에, 용액을 0.22 μm 필터를 통해 여과하고, 아세트오트릴을 2-10%의 최종 농도로 첨가하였다. 리폴딩된 단백

질로 0.1% TFA의 이동상 완충제를 사용한 포로스(Poros) R1/H 역상 칼럼 상에서의 크로마토그래피를 실시하였고, 여기서 10 내지 80%의 아세트니트릴 구배로 용리하였다. A280 흡광도를 갖는 분획의 분취액을 SDS 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분석하고, 균질한 리폴딩된 단백질을 함유하는 분획을 모았다. 일반적으로, 대부분의 단백질의 적절하게 다시 폴딩된 종은 가장 낮은 농도의 아세트니트릴에서 용리되는데, 이는 이러한 종들이 소수성 내부가 상기 역상 수지와와의 상호작용으로부터 차폐되면서 가장 조밀하기 때문이다. 응집된 종은 일반적으로 더 높은 아세트니트릴 농도에서 용리된다. 잘못 폴딩된 단백질 형태를 원하는 형태로부터 분해하는 것 이외에, 역상 단계는 또한 샘플로부터 내독소를 제거하였다.

[0703] 원하는 폴딩된 TAT 폴리펩티드를 함유하는 분획을 모으고, 용액에 질소를 부드럽게 흐르게 하여 아세트니트릴을 제거하였다. 투석에 의해 또는 제제 완충제로 평형화되고 멸균 여과된 G25 수퍼파인(Superfine) (파마시아(Pharmacia)) 수지를 사용한 겔 여과에 의해, 단백질을 0.14 M 염화나트륨 및 4% 만니톨을 갖는 20 mM Hepes (pH 6.8)로 제제화하였다.

[0704] 본원에 개시된 특정 TAT 폴리펩티드는 상기 기술(들)을 이용하여 성공적으로 발현 및 정제하였다.

[0705] 실시예 13: 포유동물 세포에서의 TAT의 발현

[0706] 본 실시예는 포유동물 세포에서 재조합 발현에 의해 잠재적으로 글리코실화된 형태의 TAT를 제조하는 것을 설명한다.

[0707] 벡터 pRK5 (1989년 3월 15일에 공개된 EP 307,247 참조)를 발현 벡터로 사용하였다. 임의로, TAT DNA를 문헌 [Sambrook et al., 상기 문헌]에 기재된 것과 같은 라이게이션 방법을 이용하여 TAT DNA의 삽입을 허용하도록 선택된 제한 효소를 사용하여 pRK5에 라이게이션시켰다. 생성된 벡터는 pRK5-TAT로 불린다.

[0708] 한 실시양태에서, 선택된 숙주 세포는 293 세포일 수 있다. 인간 293 세포 (ATCC CCL 1573)를 조직 배양 플레이트에서 태아 송아지 혈청이 보충되고 임의로는 영양소 성분 및/또는 항생제가 보충된 DMEM과 같은 배지 중에서 전면성장시까지 성장시켰다. pRK5-TAT DNA 약 10 μ g을 VA RNA 유전자를 코딩하는 DNA (문헌 [Thimmappaya et al., Cell, 31: 543 (1982)]) 약 1 μ g과 혼합하고, 500 μ l의 1 mM 트리스-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.227 M CaCl₂에 용해시켰다. 이러한 혼합물에 500 μ l의 50 mM HEPES (pH 7.35), 280 mM NaCl, 1.5 mM NaPO₄를 적가하고, 25°C에서 10분 동안 침전물을 형성시켰다. 침전물을 현탁시키고, 293 세포에 첨가하여, 37°C에서 약 4시간 동안 침강시켰다. 배양 배지를 흡출하고, PBS 중 20% 글리세롤 2 ml를 30초 동안 첨가하였다. 이어서, 293 세포를 혈청 무함유 배지로 세척하고, 새로운 배지를 첨가하고, 세포를 약 5 일 동안 인큐베이션하였다.

[0709] 형질감염 후 대략 24시간이 지난 후에 상기 배양 배지를 제거하고, 배양 배지 (단독) 또는 200 μ Ci/ml 35S-시스테인 및 200 μ Ci/ml 35S-메티오닌을 함유하는 배양 배지로 교체하였다. 12시간 동안 인큐베이션한 후, 조건화 배지를 수집하여 회전 필터 상에서 농축시키고 15% SDS 겔에 로딩하였다. 처리된 겔을 건조시키고 선택된 기간 동안 필름에 노출시켜서 TAT 폴리펩티드의 존재를 밝혀낼 수 있었다. 형질감염된 세포를 함유하는 배양물을 추가로 인큐베이션할 수 있었고 (혈청 무함유 배지 중에서), 상기 배지를 선택된 생물검정으로 시험하였다.

[0710] 대안적인 기술로, 문헌 [Somparyrac et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 12:7575 (1981)]에 기재된 텍스트란 솔페이트 방법을 이용하여 TAT를 293 세포 내에 일시적으로 도입할 수 있었다. 293 세포를 스피너 플라스크에서 최대 밀도로 성장시키고, 700 μ g의 pRK5-TAT DNA를 첨가하였다. 세포를 원심분리에 의해 스피너 플라스크로부터 우선 농축하고 PBS로 세척하였다. DNA-텍스트란 침전물을 4시간 동안 세포 펠렛 상에서 인큐베이션하였다. 세포를 20% 글리세롤로 90초 동안 처리하고, 조직 배양 배지로 세척하고, 조직 배양 배지, 5 μ g/ml 소 인슐린 및 0.1 μ g/ml 소 트랜스페린을 함유하는 스피너 플라스크에 다시 도입하였다. 약 4일 후, 조건화 배지를 원심분리하고 여과하여 세포 및 잔해를 제거하였다. 이어서, 임의의 선택된 방법, 예컨대 투석 및/또는 칼럼 크로마토그래피에 의해, 발현된 TAT를 함유하는 샘플을 농축하고 정제할 수 있었다.

[0711] 또 다른 실시양태에서, TAT를 CHO 세포에서 발현시킬 수 있었다. pRK5-TAT를 공지의 시약, 예컨대 CaPO₄ 또는 DEAE-텍스트란을 사용하여 CHO 세포로 형질감염시킬 수 있었다. 상기 기재된 바와 같이, 세포 배양물을 인큐베이션하고, 배지를 배양 배지 (단독) 또는 35S-메티오닌과 같은 방사성표지를 함유하는 배지로 교체할 수 있었다. TAT 폴리펩티드의 존재를 결정한 후에, 배양 배지를 혈청 비함유 배지로 교체할 수 있었다. 바람직하게는, 배양물을 약 6일 동안 인큐베이션한 후에 조건화 배지를 수확하였다. 이어서, 발현된 TAT를 함유하는 배지를 임의의 선택된 방법에 의해 농축시키고 정제할 수 있었다.

[0712] 에피토프-태그가 부착된 TAT가 또한 숙주 CHO 세포에서 발현될 수 있었다. TAT를 pRK5 벡터로 서브클로닝할 수 있었다. 서브클론 삽입물로 PCR을 수행하여 바큘로바이러스 발현 벡터에 선택된 에피토프 태그, 예컨대 폴리-

his 태그와 프레임에 맞추어 융합시킬 수 있었다. 이어서, 폴리-his 태그가 부착된 TAT 삽입물을 안정한 클론의 선택을 위한 선택 마커, 예컨대 DHFR을 함유하는 SV40 구동 벡터에 서브클로닝할 수 있었다. 최종적으로, CHO 세포를 (상기 기재된 바와 같이) SV40 구동 벡터로 형질감염시킬 수 있었다. 상기 기재된 바와 같이 표지하여 발현을 입증할 수 있었다. 이어서, 발현된 폴리-His 태그가 부착된 TAT를 함유하는 배양 배지를 임의의 선택된 방법, 예컨대 Ni²⁺-킬레이트 친화성 크로마토그래피에 의해 농축하고 정제할 수 있었다.

[0713] TAT는 또한 일시적인 발현 절차에 의해 CHO 및/또는 COS 세포 내에서, 또는 다른 안정한 발현 절차에 의해 CHO 세포 내에서 발현될 수 있었다.

[0714] 하기 절차를 이용하여 CHO 세포에서의 안정한 발현을 수행하였다. 단백질은 IgG 구축물 (이뮤노어드헤신)로 발현되었고, 여기서 각각의 단백질의 가용성 형태 (예를 들어, 세포외 도메인)에 대한 코딩 서열은 힌지, CH2 및 CH2 도메인을 함유하는 IgG1 불변 영역 서열에 융합되었고/거나 폴리-His 태그가 부착된 형태였다.

[0715] PCR 증폭 후, 문헌 [Ausubel et al., Current Protocols of Molecular Biology, Unit 3.16, John Wiley and Sons (1997)]에 기재된 바와 같은 표준 기술을 이용하여 각각의 DNA를 CHO 발현 벡터에 서브클로닝하였다. CHO 발현 벡터는 cDNA의 편리한 서틀링을 허용하도록 관심있는 DNA의 5' 및 3'에서와 상용가능한 제한 부위를 갖도록 구축되었다. CHO 세포에서의 발현에 사용된 벡터는 문헌 [Lucas et al., Nucl. Acids Res. 24:9 (1774-1779 (1996))]에 기재된 바와 같고, SV40 초기 프로모터/인핸서를 사용하여 관심있는 cDNA 및 디히드로폴레이트 리덕타제 (DHFR)의 발현을 구동시켰다. DHFR 발현은 형질감염 후 안정적으로 유지되는 플라스미드의 선택을 허용한다.

[0716] 원하는 플라스미드 DNA 12 μ g을 시판되는 형질감염 시약 슈퍼펙트(SUPERFECT)[®] (퀴아젠), 도스퍼(DOSPER)[®] 또는 퓨진(FUGENE)[®] (베링거 만하임(Boehringer Mannheim))을 사용하여 대략 1000만개의 CHO 세포에 도입하였다. 문헌 [Lucas et al., 상기 문헌]에 기재된 바와 같이 세포를 성장시켰다. 대략 3 x 10⁷개의 세포를 하기에 기재된 바와 같은 추가의 성장 및 생성을 위해 앰플에서 동결시켰다.

[0717] 플라스미드 DNA를 함유하는 앰플을 수조에 넣어 해동시키고, 볼텍싱시켜 혼합하였다. 내용물을 배지 10 ml를 함유하는 원심분리 튜브에 피펫팅하고, 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 상청액을 흡출하고, 세포를 10 ml의 선택 배지 (0.2 μ m 정용여과된 5% 소 태아 혈청을 갖는 0.2 μ m 여과된 PS20)에 재현탁시켰다. 이어서, 상기 세포를 선택 배지 90 ml를 함유하는 100 ml 스피너에 분취하였다. 1-2일 후, 세포를 선택 성장 배지 150 ml가 충전된 250 ml 스피너로 옮기고, 37°C에서 인큐베이션하였다. 2-3 일이 더 지난 후, 250 ml, 500 ml 및 2000 ml 스피너에 3 x 10⁵개 세포/ml로 시딩하였다. 원심분리 및 생성 배지 중의 재현탁에 의해 세포 배지를 새로운 배지로 교환하였다. 임의의 적합한 CHO 배지를 사용할 수 있지만, 실제로는 1992년 6월 16일에 허여된 미국 특허 번호 5,122,469에 기재된 생성 배지를 사용할 수 있다. 3L 생성 스피너에 1.2 x 10⁶개 세포/ml로 시딩하였다. 제0일에는 세포 수 및 pH를 측정하였다. 제1일에, 스피너를 샘플을 취하고, 여과된 공기를 살포하기 시작하였다. 제2일에, 스피너로부터 샘플을 취하고, 온도를 33°C로 올리고, 500 g/L 글루코스 30 ml 및 10% 소포제 (예를 들어, 35% 폴리디메틸실록산 에멀전, 다우 코닝(Dow Corning) 365 의학 등급 에멀전) 0.6 ml를 취하였다. 생성 전반에 걸쳐, 필요에 따라 pH를 조정하여 pH가 약 7.2로 유지되도록 하였다. 10일 후, 또는 생존율이 70% 아래로 떨어졌을 때, 세포 배양물을 원심분리 및 0.22 μ m 필터를 통한 여과에 의해 수확하였다. 여액을 4°C에서 저장하거나, 또는 즉시 정제용 칼럼 상에 로딩하였다.

[0718] 폴리-His 태그가 부착된 구축물의 경우, Ni-NTA 칼럼 (퀴아젠)을 사용하여 단백질을 정제하였다. 정제 전에, 이미다졸을 5 mM 농도로 조건화 배지에 첨가하였다. 0.3 M NaCl 및 5 mM 이미다졸을 함유하는 20 mM Hepes (pH 7.4) 완충제로 평형화된 6 ml Ni-NTA 칼럼 상에 4°C에서 4-5 ml/분의 유량으로 조건화 배지를 펌핑하였다. 로딩 후, 상기 칼럼을 추가의 평형화 완충제로 세척하고, 0.25 M 이미다졸을 함유하는 평형화 완충제로 단백질을 용리하였다. 이어서, 고도로 정제된 단백질을 25 ml의 G25 수퍼파인 (파마시아) 칼럼으로 10 mM Hepes, 0.14 M NaCl 및 4% 만니톨을 함유하는 저장 완충제 (pH 6.8) 내로 탈염시키고, -80°C에서 저장하였다.

[0719] 이뮤노어드헤신 (Fc 함유) 구축물을 하기와 같이 조건화 배지로부터 정제하였다. 조건화 배지를 20 mM 인산나트륨 완충제 (pH 6.8)로 평형화시킨 5 ml 단백질 A 칼럼 (파마시아)에 펌핑하였다. 로딩 후, 상기 칼럼을 평형화 완충제로 철저하게 세척한 후에 100 mM 시트르산 (pH 3.5)으로 용리하였다. 1 ml 분획을 1 M 트리스 완충제 (pH 9) 275 μ l를 함유하는 튜브에 수집함으로써, 용리된 단백질을 즉시 중화시켰다. 이후에, 고도로 정제된 단백질을 폴리-His 태그가 부착된 단백질에 대해 상기 기재된 바와 같은 저장 완충제에 탈염시켰다. SDS 폴리 아크릴 아미드 겔 및 에드만(Edman) 분해법에 의한 N-말단 아미노산 서열분석에 의해 균질성을 평가하였다.

- [0720] 본원에 개시된 특정 TAT 폴리펩티드는 상기 기술(들)을 이용하여 성공적으로 발현 및 정제하였다.
- [0721] 실시예 14: 효모에서의 TAT의 발현
- [0722] 하기 방법은 효모에서 TAT의 재조합 발현을 기재한다.
- [0723] 우선, ADH2/GAPDH 프로모터로부터 TAT가 세포내 생성 또는 분비되도록 효모 발현 벡터를 구축하였다. TAT 및 프로모터를 코딩하는 DNA를 TAT의 세포내 발현을 지시하도록 선택된 플라스미드 내의 적합한 제한 효소 부위 내로 삽입한다. 분비를 위해, TAT를 코딩하는 DNA를 TAT의 발현을 위해서 ADH2/GAPDH 프로모터, 천연 TAT 신호 펩티드 또는 다른 포유동물 신호 펩티드, 또는 예를 들어 효모 알파-인자 또는 인버타제 분비 신호/리더 서열 및 링커 서열 (필요한 경우)을 코딩하는 DNA와 함께 선택된 플라스미드로 클로닝할 수 있었다.
- [0724] 이어서, 효모 세포, 예컨대 효모 균주 AB110을 상기 기재된 발현 플라스미드로 형질전환시키고, 선택된 발효 배지 중에서 배양할 수 있었다. 10% 트리클로로아세트산으로 침전시키고 SDS-PAGE로 분리한 후에 겔을 쿠마시 블루 염료로 염색함으로써, 형질전환된 효모 상등액을 분석할 수 있었다.
- [0725] 이후에, 원심분리에 의해 발효 배지로부터 효모 세포를 제거한 후에 선택된 카트리지 필터를 사용하여 배지를 농축시킴으로써 재조합 TAT를 단리하고 정제할 수 있었다. TAT를 함유하는 농축물은 선택된 칼럼 크로마토그래피 수지를 이용하여 추가로 정제될 수 있다.
- [0726] 본원에 개시된 특정 TAT 폴리펩티드는 상기 기술(들)을 이용하여 성공적으로 발현 및 정제하였다.
- [0727] 실시예 15: 바큇로바이러스-감염된 곤충 세포에서의 TAT의 발현
- [0728] 하기 방법은 바큇로바이러스-감염된 곤충 세포에서 TAT의 재조합 발현을 기재한다.
- [0729] TAT를 코딩하는 서열을 바큇로바이러스 발현 벡터 내에 함유된 에피토프 태그의 상류에 융합시켰다. 이러한 에피토프 태그는 폴리-his 태그 및 이뮤노글로불린 태그 (IgG의 Fc 영역과 유사)를 포함하였다. 시판되는 플라스미드, 예컨대 pVL1393 (노바젠(Novagen))으로부터 유래된 플라스미드를 포함하여 다양한 플라스미드를 사용할 수 있었다. 간략하게, TAT를 코딩하는 서열 또는 TAT의 코딩 서열의 원하는 부분, 예컨대 막형단 단백질의 세포외 도메인을 코딩하는 서열 또는 단백질이 세포외 단백질이라면 성숙 단백질을 코딩하는 서열을 5' 및 3' 영역에 상보적인 프라이머를 사용하여 PCR에 의해 증폭시켰다. 5' 프라이머는 플랭킹 (선택된) 제한 효소 부위를 혼입시킬 수 있었다. 이어서, 생성물을 선택된 제한 효소로 소화시키고, 발현 벡터 내로 서브클로닝하였다.
- [0730] 리포펙틴 (GIBCO-BRL로부터 시판됨)을 사용하여 상기 플라스미드 및 바큇로골드(BACULOGOLD)TM 바이러스 DNA (파밍겐(Pharmingen))를 스포도프테라 프루기페르다 ("Sf9") 세포 (ATCC CRL 1711) 내로 공동-형질감염시킴으로써 재조합 바큇로바이러스가 생성되었다. 28℃에서 4-5일 동안 인큐베이션한 후, 방출된 바이러스를 수확하여 추후의 증폭에 사용하였다. 문헌 [O'Reilley et al., Baculovirus expression vectors: A laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994)]에 기재된 바와 같이 바이러스 감염 및 단백질 발현을 수행하였다.
- [0731] 이어서, 발현된 폴리-his 태그가 부착된 TAT를 예를 들어, 다음과 같이 Ni²⁺-킬레이트 친화성 크로마토그래피에 의해 정제할 수 있었다. 추출물을 문헌 [Rupert et al., Nature, 362:175-179 (1993)]에 기재된 바와 같이 재조합 바이러스-감염 Sf9 세포로부터 제조하였다. 간략하게, Sf9 세포를 세척하고, 초음파처리 완충제 (25 ml Hepes (pH 7.9); 12.5 mM MgCl₂; 0.1 mM EDTA; 10% 글리세롤; 0.1% NP-40; 0.4 M KCl)에 재현탁시키고, 얼음 위에서 20초 동안 2회 초음파처리하였다. 초음파처리물을 원심분리에 의해 정제하고, 상등액을 로딩 완충제 (50 mM 포스페이트, 300 mM NaCl, 10% 글리세롤, pH 7.8)으로 50배 희석하고 0.45 μm 필터를 통해 여과하였다. 총 부피가 5 ml인 Ni²⁺-NTA 아가로스 칼럼 (키아젠에서 시판됨)을 제조하여 물 25 ml로 세척하고, 로딩 완충제 25 ml로 평형화시켰다. 여과된 세포 추출물을 분 당 0.5 ml로 칼럼에 로딩하였다. 칼럼을 로딩 완충제로 A280 기준선까지 세척하고, 이 시점에서 분획 수집을 시작하였다. 다음에, 2차 세척 완충제 (50 mM 포스페이트; 300 mM NaCl, 10% 글리세롤, pH 6.0)으로 칼럼을 세척하여 비-특이적으로 결합된 단백질을 용리하였다. A280이 다시 기준선에 도달한 후, 칼럼을 2차 세척 완충제에서 0 내지 500 mM 이미다졸로 구배로 전개시켰다. 분획 1 ml을 수집하고, SDS-PAGE 및 은 염색 또는 알칼리성 포스포타제에 접합된 Ni²⁺-NTA (키아젠)로의 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 용리된 His10-태그가 부착된 TAT를 함유하는 분획을 모으고 로딩 완충제에 대해 투석하였다.
- [0732] 대안적으로, IgG 태그가 부착된 (또는 Fc 태그가 부착된) TAT의 정제는 공지된 크로마토그래피 기술 (예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G 칼럼 크로마토그래피 포함)을 이용하여 수행할 수도 있었다.

- [0733] 본원에 개시된 특정 TAT 폴리펩티드는 상기 기술(들)을 이용하여 성공적으로 발현 및 정제하였다.
- [0734] 실시예 16: 특이적 항체를 사용한, TAT 폴리펩티드의 정제
- [0735] 천연 또는 재조합 TAT 폴리펩티드를 단백질 정제 분야의 다양한 표준 기술에 의해 정제할 수 있었다. 예를 들어, 프로-TAT 폴리펩티드, 성숙 TAT 폴리펩티드 또는 프리-TAT 폴리펩티드는 관심있는 TAT 폴리펩티드에 특이적인 항체를 사용한 면역친화성 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 일반적으로, 면역친화성 칼럼은 항-TAT 폴리펩티드 항체를 활성화된 크로마토그래피 수지에 공유 결합에 의해 커플링시켜 구축하였다.
- [0736] 황산암모늄을 사용한 침전 또는 고정된 단백질 A (파마시아 엘케이비 바이오테크놀로지(Pharmacia LKB Biotechnology), 뉴저지주 피스카타웨이) 상에서의 정제에 의해 면역 혈청으로부터 폴리클로날 이뮤노글로불린을 제조하였다. 마찬가지로, 모노클로날 항체를 황산암모늄 침전 또는 고정된 단백질 A 상에서의 크로마토그래피에 의해 마우스 복수액으로부터 제조하였다. 부분적으로 정제된 이뮤노글로불린을 크로마토그래피 수지, 예컨대 CnBr-활성화된 세파로스™ (파마시아 엘케이비 바이오테크놀로지)에 공유 결합에 의해 부착시켰다. 항체를 수지에 커플링시키고, 수지를 차단하고, 유도체 수지를 제조자의 지침에 따라 세척하였다.
- [0737] 이러한 면역친화성 칼럼을 이용하여 가용성 형태의 TAT 폴리펩티드를 함유하는 세포로부터 분획을 제조하여 TAT 폴리펩티드를 정제하였다. 이러한 제제는 온전한 세포 또는 차등 원심분리에 의해 수득된 세포 이하의 분획을 세제의 첨가 또는 당업계에 주지된 다른 방법에 의해 가용화하여 유도하였다. 대안적으로, 신호 서열을 함유하는 가용성 TAT 폴리펩티드를 세포가 성장하는 배지 내에 유용한 양으로 분비시킬 수도 있었다.
- [0738] 가용성 TAT 폴리펩티드-함유 제제를 면역친화성 칼럼 상에서 통과시키고, 칼럼을 TAT 폴리펩티드의 우선적인 흡수를 허용하는 조건 (예를 들어, 세제 존재하에 높은 이온 강도의 완충제)하에 세척하였다. 이어서, 칼럼을 항체/TAT 폴리펩티드 결합을 파괴하는 조건 (예를 들어, 낮은 pH 완충제, 예컨대 대략 pH 2-3, 또는 고농도의 카오토로프(chaotrope), 예컨대 우레아 또는 티오시아네이트 이온)하에 용리하고, TAT 폴리펩티드를 수집하였다.
- [0739] 전술된 명세서는 당업자가 본 발명을 실시할 수 있도록 하는데 충분하다고 고려된다. 본 발명은 기탁된 구축물에 의해 범위가 제한되지 않는데, 이는 기탁된 실시양태가 본 발명의 특정 측면의 단일 예시에 불과하고, 기능적으로 등가인 임의의 구축물이 본 발명의 범위 내에 속하기 때문이다. 본원에서 물질의 기탁은 본원에 함유된 기록된 명세서가 그의 최선의 방식을 포함하는 본 발명의 임의의 측면을 실시할 수 있도록 하는데 부적당하다고 인정하는 것이 아니고, 또한 그가 나타내는 특정 예시로 특허청구범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 실제로, 본원에 제시되고 기재된 것 이외의 본 발명의 다양한 변형은 전술된 기재로부터 당업자에게 명백해질 것이고, 첨부된 특허청구범위 내에 속할 것이다.

도면

도면1

CAGCCCAGCACCTGCGGAGGGAGCGCTGACC**ATG**GGCTCCCTGGCCTGAATTGGGAGATGCCAGCCCAACCC
CGATAAGTACCTCGAAGGGGCCGAGGTGAGCAGCCCACTGCCCTGATAAAAGCAAAGAGACCAACAAAAC
AGATAACACTGAGGCACCTGTAACCAAGATTGAACCTCTGCCGTCCTACTCCACGGCTACACTGATAGATGA
GCCCCACTGAGGTGGATGACCCCTGGAACCTACCCACTCTTCAGGACTCGGGGATCAAGTGGTCAGAGAGAGA
CACCAAAGGGAAGATTCTCTGTTCTTCCAAGGGATTGGGAGATTGATTTTACTTCTCGGATTCTCTACTT
TTTCGTGTGCTCCCTGGATATTCTTAGTAGCGCTTCCAGCTGGTTGGAGGAAAAATGGCAGGACAGTTCTT
CAGCAACAGCTCTATTATGTCCAACCCCTTGTGGGGCTGGTGATCGGGGTGCTGGTGACCGTCTTGGTGCA
GAGCTCCAGCACCTCAACGTCCATCGTTGTGAGCATGGTGCTCTTTCATTGCTCACTGTTCTGGGCTGCCAT
CCCCATTATCATGGGGGCCAACATTGGAACGTCAATCACCAACACTATTGTTGCGCTCATGCAAGTGGGAGA
TCGGAGTGAGTTCAGAAGAGCTTTTGCAAGGAGCCACTGTCCATGACTTCTTCAACTGGCTGTCCGTGTTGGT
GCTCTTGCCCGTGAGGTGGCCACCCATTACCTCGAGATCATAACCCAGCTTATAGTGGAGAGCTTCCACTT
CAAGAAATGGAGAAGATGCCCCAGATCTTCTGAAAGTCATCACTAAGCCCTTCACAAAGCTCATTGTCCAGCT
GGATAAAAAAGTTATCAGCCAAATTGCAATGAACGATGAAAAAGCGAAAAACAAGAGTCTTGTCAAGATTG
GTGCAAAACTTTTACCAACAAGACCAGATTAAACGTCACTGTTCCCTCGACTGCTAACTGCACCTCCCTTC
CCTCTGTTGGACGGATGGCATCCAAACTGGACCATGAAGAAATGTGACCTACAAGGAGAACATCGCCAAATG
CCAGCATATCTTTGTGAATTTCCACCTCCCGGATCTTGCTGTGGGCACCATCTTGCTCATACTCTCCCTGCT
GGTCTCTGTGGTTGCCTGATCATGATTGTCAAGATCCTGGGCTCTGTGCTCAAGGGGCAGGTGCGCACTGT
CATCAAGAAGACCATCAACACTGATTTCCCTTTCCCTTTGCATGGTTGACTGGCTACCTGGCCATCCCTCGT
CGGGGCAGGCATGACCTTTCATCGTACAGAGCAGCTCTGTGTTACGTCGGCCTTGACCCCTTGATTGGAAT
CGGCGTGATAACCATTGAGAGGGCTTATCCACTCACGCTGGGCTCCAACATCGGCACCAACCACCGCCAT
CCTGGCCGCTTAGCCAGCCCTGGCAATGCATTGAGGAGTTCACTCCAGATCGCCCTGTGCCACTTTTCTT
CAACATCTCCGGCATCTTGCTGTGGTACCCGATCCCGTTCACTCGCCTGCCATCCGCATGGCCAAGGGCT
GGGCAACATCTTGCCAAGTATCGCTGGTTGCGCGTCTTCTACCTGATCATCTTCTTCTTCTGATCCCGCT
GACGGTGTGTTGGCCTCTCGCTGGCCGGCTGGCGGGTGCTGGTGGTGTCGGGGTTCCCGTCGTCTCATCAT
CATCCTGGTACTGTGCCCTCCGACTCTGCAGTCTCGCTGCCACGCGTCTGCCGAAGAACTCCAGAACTG
GAACTTCTGCGCTGTGGATGCGCTCGCTGAAGCCCTGGGATGCCGTGCTCTCAAGTTCACCGGCTGCTT
CCAGATGCGCTGTGCTGTGCTGCCGCTGTGCTGCCGCGCTGCTGCTTGTGTGGCTGCCCCAAGTG
CTGCCGCTGCAGCAAGTGTGCGAGGACTTGAGGAGGCGCAGGAGGGGCAGGATGTCCCTGTCAAGGCTCC
TGAGACCTTTGATAACATAACCATTAGCAGAGAGGCTCAGGGTGAGGTCCCTGCCTCGGACTCAAAGACCGA
ATGCACGGCCTT**G****TAG**GGGACGCCCCAGATTGTGAGGGATGGGGGATGGTCCTTGAGTTTTCATGCTCTC
CTCCCTCCCACTTCTGCACCCCTTTCACCACCTCGAGGAGATTGCTCCCATTAGCGAATGAAATTGATGCA
GTCTTACCTAACTCGATTCCCTTTGGCTTGGTGGGTAGGCCTGCAGGGCACTTTTATTCACCCATGGCCT
CCATGACTTTTTCAAAAA

도면2

MAPWPELGDAQPNPDKYLEGAAGQQPTAPDKSKETNKTNDTEAPVTKIELLPSYSTATLIDEPTFVDDPWNLP
TLQDSGIKWSERDTKGKILCFFQIGRLILLGLFYFFVCSLDILSSAFQLVGGKMAGQFFSNSSIMSNPLLGLVIG
VLVTVLVQSSSTSTSIVVSVMVSSLLTVRAAIPIMGANIGTSITNTIVALMQVGDSEFRRAFAGATVHDFFNW
LSVLVLLPVEVATHYLEIITQLIVESFHFKNGEDAPDLLKVITKPFTKLIVQLDKKVISQIAMNDEKAKNKS
LVKIWCKTFTNKTQINVTVPSTANCTSPSLCWTGDIQNWMTMKNVTYKENIAKCQHIFVNFHLPDLAVGT
ILLILSLLVLCGCLIMIVKILGSLVKGOVATVIKKTINTDFFPPFAWLTGYLAILVGAGMTFIVQSSSVFTS
ALTPLIGIGVITIERAYPLTLGSGNIGTTTTAILAALASPGNALRSSQLALCHFFFNISGILLWYPIPFTR
LPIRMAKGLGNISAKYRWFVAVFYLIIFFFLIPLTVFGLSLAGWRVLVGVGVVVFIIILVLCLRL
LQSRCPRVLPKKLQNNWNFLPLWMRSLKPWDVAVVSKFTGCFQMRCCCCRVCCRACLLCGCPKCCRC
SKCCEDLEEAQEGQDVPVKAPETFDNITISREAGGEVPASDSKTECTAL

막형단 도메인

아미노산 96-116, 136-156, 178-198, 219-239, 356-376, 372-392, 406-426,
445-465, 488-508, 523-543, 547-567, 563-583, 592-612

N- 글리코실화 부위

아미노산 36-39, 136-139, 295-298, 308-311, 313-316, 321-324, 335-338,
340-343, 495-498, 520-523, 667-670

N- 미리스토일화 부위

아미노산 23-28, 79-84, 126-131, 131-136, 146-151, 150-155, 187-192, 191-
196, 393-398, 423-428, 460-465, 464-469, 519-524, 546-551, 634-639

4Fe-4S 페레독신, 철- 황 결합 영역 시그너처

아미노산 635-645

인슐린 패밀리 시그너처

아미노산 621-635

Na+/Pi-공동수송자

아미노산 118-549

카바트 #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
hukI	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
mulOH1-L	D	I	L	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	C
10H1-이식편	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.2B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.4B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.5B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C
10H1.11.6B	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C

카바트 #	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
hukI	R	A	S	Q							S	I	S	N	Y	L	A	W	Y	Q	Q	K	P
mulOH1-L	R	S	S	E	T	L	V	H	S		N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	L	Q	K	L
10H1-이식편	R	S	S	E	T	L	V	H	S		N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11	R	S	S	E	T	L	V	H	S		N	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.1	R	S	S	E	T	L	V	H	S		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.2B	R	S	S	E	T	L	V	H	S		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.4B	R	S	S	E	T	L	V	H	S		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.5B	R	S	S	E	T	L	V	H	W		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P
10H1.11.6B	R	S	S	G	T	L	R	H	W		S	G	N	T	Y	L	E	W	Y	Q	Q	K	P

카바트 #	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
hukI	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S
mulOH1-L	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S
10H1-이식편	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11.1	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11.2B	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11.4B	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11.5B	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S
10H1.11.6B	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	R	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S

카바트 #	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86
hukI	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
mulOH1-L	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	R	L	E	A	E	D	L	G	V	Y
10H1-이식편	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11.1	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11.2B	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11.4B	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11.5B	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y
10H1.11.6B	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y

도면3c

카바트 #	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
huki	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
mulOH1-L	Y	C	F	Q	G	S	H	N	P	L	T	F	G	A	G	T	K	V	E	I	K	R
10H1-이식편	Y	C	F	Q	G	S	H	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
10H1.11	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
10H1.11.1	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
10H1.11.2B	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
10H1.11.4B	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
10H1.11.5B	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R
10H1.11.6B	Y	C	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R

카바트 #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
hum III	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
mulOH1-H	E	V	M	L	V	E	S	G	G	G	L	V	R	P	G	G	S	L	K	V	S	C	A	A	S
10H1-이식편	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11.1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11.2B	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11.4B	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11.5B	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S
10H1.11.6B	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S

카바트 #	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
hum III	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V
mulOH1-H	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	R	T	P	D	K	R	L	E	W	V	A	T
10H1-이식편	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11.1	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11.2B	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11.4B	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11.5B	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T
10H1.11.6B	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	A	T

도면4a

카바트 #	51	52	A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
hum III	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
mul10H1-H	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A
10H1-이식편	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11.1	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11.2B	I	G	R	V	S	F	H	T	Y	Y	P	V	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11.4B	I	G	R	V	A	F	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11.5B	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S
10H1.11.6B	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	Y	P	D	S	M	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S

카바트 #	75	76	77	78	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
hum III	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	
mul10H1-H	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	S	D	D	T	A	I	Y	Y	C	V	R	H	R
10H1-이식편	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	V	R	H	R
10H1.11	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	V	R	H	R
10H1.11.1	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	V	R	H	R
10H1.11.2B	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	R
10H1.11.4B	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	R
10H1.11.5B	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	R
10H1.11.6B	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	H	R

도면4b

도면4c

카바트 #	97	98	99	100	A	B	...	K	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113
hum III								F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
mulOH1-H	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	L	T	V	S	A
10H1-이차편	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
10H1.11	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
10H1.11.1	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
10H1.11.2B	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
10H1.11.4B	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
10H1.11.5B	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
10H1.11.6B	G	F	D	V	G	H		F	D	F	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

도면5

카바트#		24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	
		R	A	S	Q							S	I	S	N	Y	L	A	(서열21)
		R	S	S	E	T	L	V	H	S		N	G	N	T	Y	L	E	(서열22)
		R	S	S	E	T	L	V	H	S		S	G	N	T	Y	L	E	(서열23)
		R	S	S	E	T	L	V	H	W		S	G	N	T	Y	L	E	(서열24)
		R	S	S	G	T	L	R	H	W		S	G	N	T	Y	L	E	(서열25)
		R	S	S	G	T	L	L	H	N		N	G	N	T	Y	L	E	(서열26)
		R	S	S	E	T	L	V	H	R		S	G	N	T	Y	L	E	(서열27)
		R	S	S	E	T	L	V	H	T		S	G	N	T	Y	L	E	(서열28)
		R	S	S	E	T	L	V	H	G		S	G	N	T	Y	L	E	(서열29)
		R	S	S	E	T	L	V	H	A		S	G	N	T	Y	L	E	(서열30)
		R	S	S	E	T	L	V	H	N		S	G	N	T	Y	L	E	(서열31)
		R	S	S	E	T	L	V	H	K		S	G	N	T	Y	L	E	(서열32)
		R	S	S	E	T	L	V	H	A		S	G	N	T	Y	L	E	(서열33)
		R	S	S	R	T	L	E	H	W		S	G	N	T	Y	L	E	(서열34)

도면6

카바트#	50	51	52	53	54	55	56	
	A	A	S	S	L	E	S	(서열35)
	R	V	S	N	R	F	S	(서열36)
	R	V	S	Q	R	F	T	(서열37)
	R	V	S	N	R	F	R	(서열38)

도면7

카바트#	89	90	91	92	93	94	95	96	97	
	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	(서열39)
	F	Q	G	S	H	N	P	L	T	(서열40)
	F	Q	G	S	F	N	P	L	T	(서열41)

도면8

카바트#	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	(서열42)
	G	F	S	F	S	D	F	A	M	S	(서열43)
	S	S	S	F	S	D	F	A	L	S	(서열44)
	G	F	N	F	R	G	F	A	M	S	(서열45)

도면9

카바트 #	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	
	S	V	I	S	G	D	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	(서열46)
	A	T	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	P	D	S	M	K	G	(서열47)
	A	T	I	G	R	V	S	F	H	T	Y	P	V	S	M	K	G	(서열48)
	A	T	I	G	R	V	A	F	H	T	Y	P	D	S	M	K	G	(서열49)
	S	T	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	P	V	G	M	T	G	(서열50)
	A	T	I	G	R	V	W	Y	H	R	Y	P	D	S	M	V	R	(서열51)
	G	T	I	G	W	M	V	S	H	T	Y	P	Q	R	L	N	G	(서열52)
	A	T	I	G	R	V	T	S	R	T	Y	P	D	S	M	K	G	(서열53)
	A	T	I	G	R	V	Y	R	H	T	Y	P	T	S	M	K	G	(서열54)
	A	T	I	G	R	V	P	L	H	T	Y	P	R	S	M	K	G	(서열55)
	A	T	I	G	R	V	P	L	H	T	Y	P	G	S	M	K	G	(서열56)
	A	T	I	G	R	V	P	L	H	T	Y	P	A	S	M	K	G	(서열57)
	A	T	I	G	R	V	E	Q	H	T	Y	P	Q	S	M	K	G	(서열58)
	A	T	I	G	R	V	A	S	H	T	Y	P	G	S	M	K	G	(서열59)
	A	T	I	G	R	V	A	L	H	T	Y	P	Q	S	M	K	G	(서열60)

도면10

카바트 #	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	K	101	102	
	A	R	G								F	D	Y	(서열 61)
	V	R	H	R	G	F	D	V	G	H	F	D	F	(서열 62)
	A	R	H	R	G	F	D	V	G	H	F	V	F	(서열 63)
	A	R	H	R	G	W	V	V	G	H	F	D	L	(서열 64)
	A	R	H	R	G	F	D	V	G	H	F	D	F	(서열 65)

도면11

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T [-H1-] W V R Q A P G Q G L E W M G [-H2-] R V T I T A D
T S T S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R [-H3-] W G Q G T L V T V S S (시열66)
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S [-H1-] W V R Q A P G Q G L E W M [-H2-] R V T I T A D T S T S T A
Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R [-H3-] W G Q G T L V T V S S (시열67)
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S [-H1-] W V R Q A P G Q G L E W M [-H2-] R V T I T A D T S T S T A
Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A [-H3-] W G Q G T L V T V S S (시열68)
Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S [-H1-] W V R Q A P G Q G L E W M [-H2-] R V T I T A D T S T S T A
Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C [-H3-] W G Q G T L V T V S S (시열69)
Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S [-H1-] W I R Q P P G K G L E W I [-H2-] R V T I S V D T S K N Q F
T S K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R [-H3-] W G Q G T L V T V S S (시열70)
Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S [-H1-] W I R Q P P G K G L E W I [-H2-] R V T I S V D T S K N Q F
S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A R [-H3-] W G Q G T L V T V S S (시열71)
Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S [-H1-] W I R Q P P G K G L E W I [-H2-] R V T I S V D T S K N Q F
S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A [-H3-] W G Q G T L V T V S S (시열72)
Q V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L T C T V S [-H1-] W I R Q P P G K G L E W I [-H2-] R V T I S V D T S K N Q F
S L K L S S V T A A D T A V Y Y C [-H3-] W G Q G T L V T V S S (시열73)
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S [-H1-] W V R Q A P G K G L E W V [-H2-] R F T I S R D N S K N T L
Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C [-H3-] W G Q G T L V T V S S (시열74)
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S [-H1-] W V R Q A P G K G L E W V [-H2-] R F T I S R D N S K N T F
Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C [-H3-] W G Q G T L V T V S S (시열75)

도면12

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C [-L1-] W Y Q Q K P G K A P K L L I [-L2-] G V P S R F S G S G S G T D
F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K R (시예76)
D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C [-L1-] W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y [-L2-] G V P D R F S G S G S G T
D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K (시예77)
E I V L T Q S P G T I S L S P G E R A T L S C [-L1-] W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y [-L2-] G I P D R F S G S G S G T
D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K (시예78)
D I V M T Q S P D S L A V S L G E R A T I N C [-L1-] W Y Q Q K P G Q P P K L L I Y [-L2-] G V P D R F S G S G S G T
D F T L T I S S L Q A E D V A V Y Y C [-L3-] F G Q G T K V E I K (시예79)

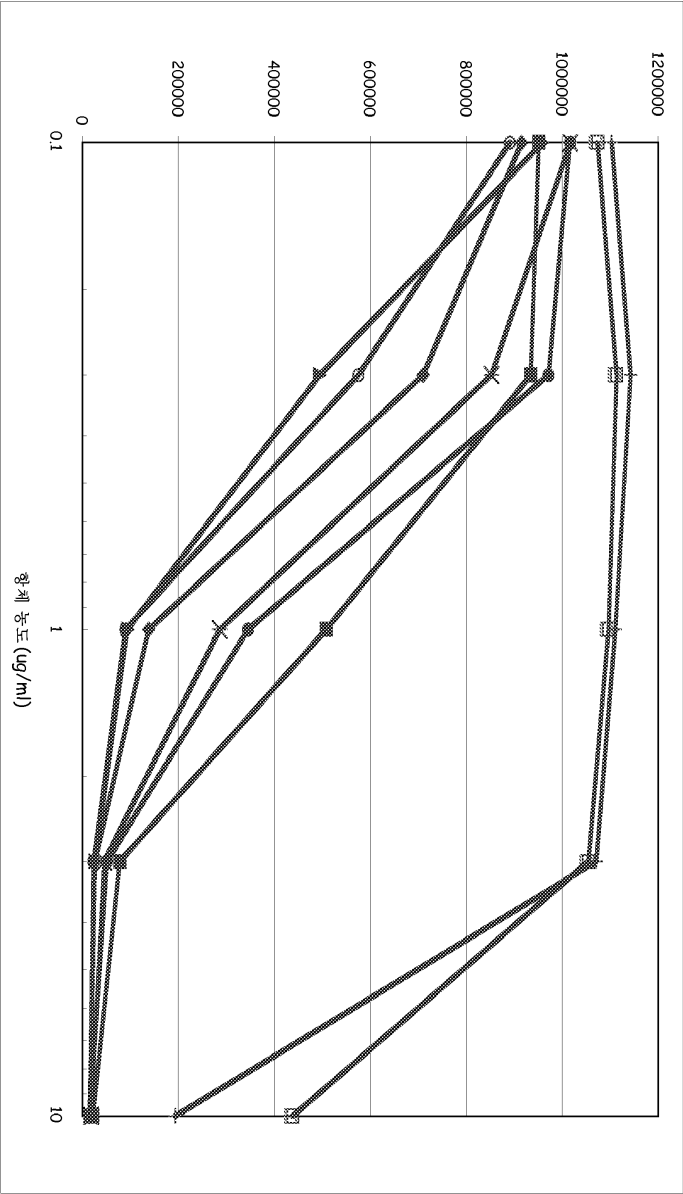
도면13

EVQLVESGGGI VOPGSLRISCA SGFSFSDPMSWVRQAPGKGLEWVATIGRVAHHTYY PDSMKGRFTISRDN SKNTLYIQMNSLRAPDTAVYICARHGRFDVGHFDFWGQTLV
TVSSASTKPSVPEPLA PSSKTSISGGTALGCLVXDYFPEPYTVSMNSGALTSGVHTFPALOSGLSISVYTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKVEPKSCDRTHTCPPC
PAPELGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEPTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGEVHNATKPREQYNSTYRVYSLTFLHODWLNKKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPRE
FQYITLPPSRREMTKNQVSLTCLVKGFTPSDIAVMESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLISKLTVDKSRMQGNVFSCSVMHREALNHTYQKSLSPG (서열 80)

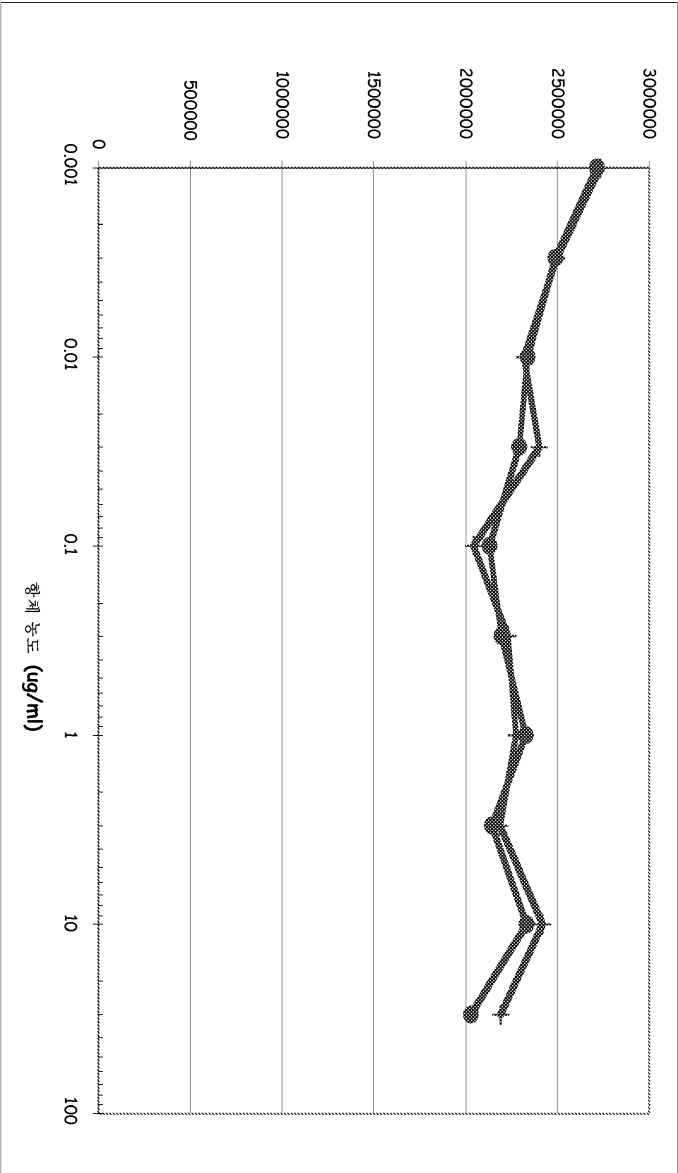
도면14

DIQMTOSPSSLSASVGDRTYITICRSSELIHSGNTYLEMYOKPGKAPLLIYRVSNRFGVPSRFSGSGGDPDTLLTSSLOPEDFATYICFOGSFNNPLTFGQGTKEIKRTVA
APSVFIFFPPSPDFOIKSGTASVVCILNNFYPREAKVQMKVDNALQSGNSQSEVTEDSKDSTYSSSTLLTSKADYEKHKYACFVTHQGLSPVTKSFNRGEC (49 81)

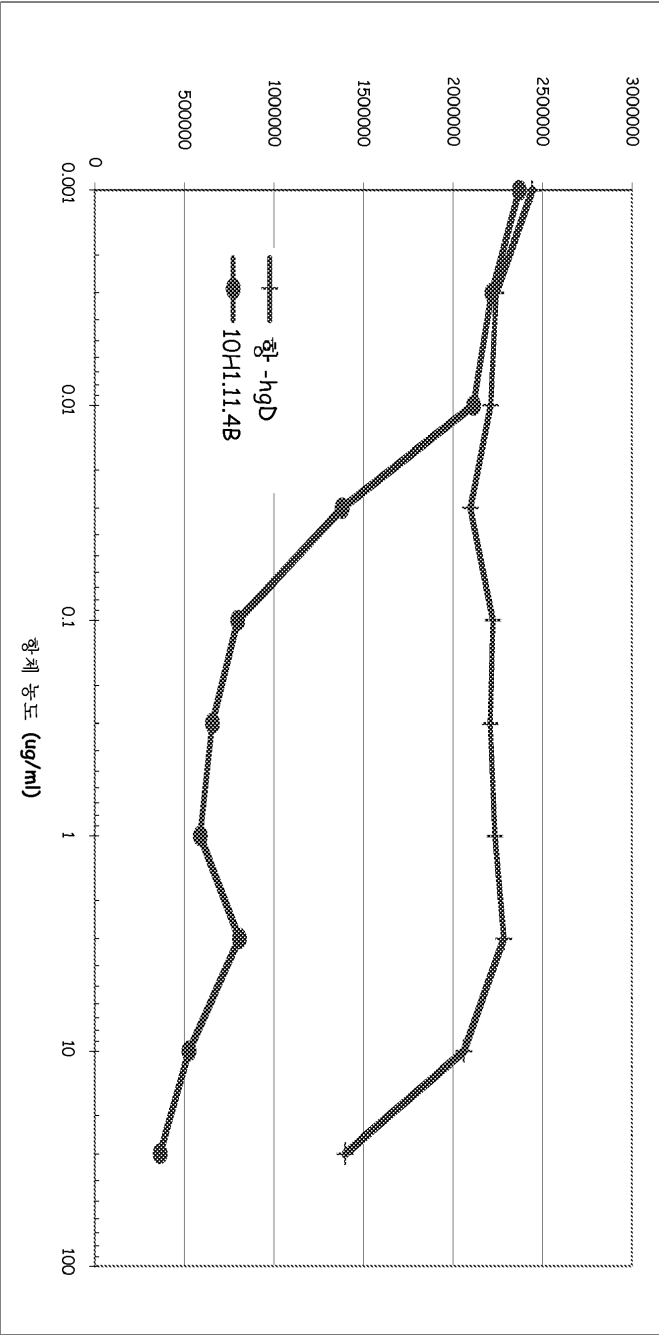
도면15



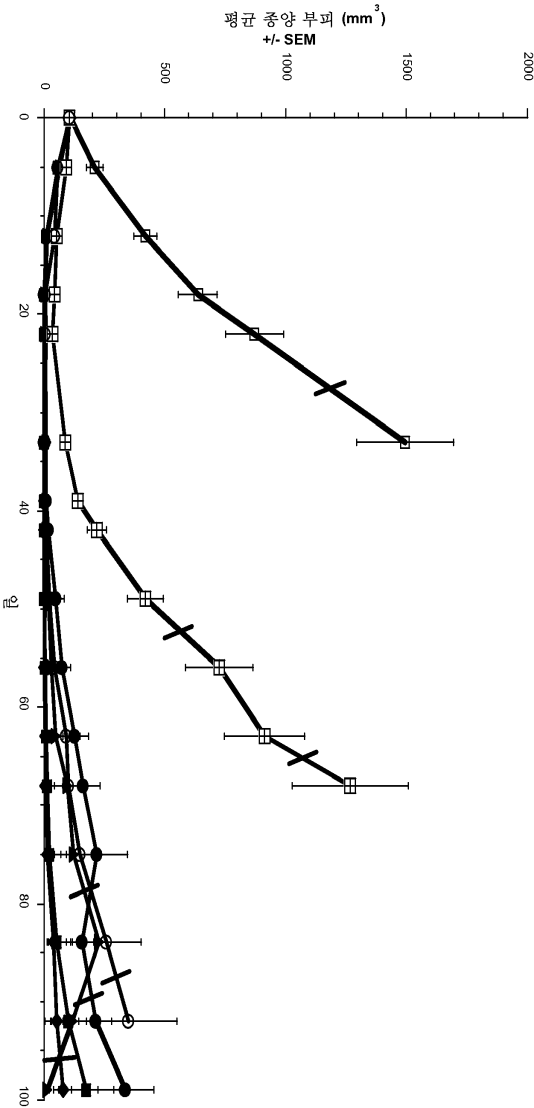
도면16



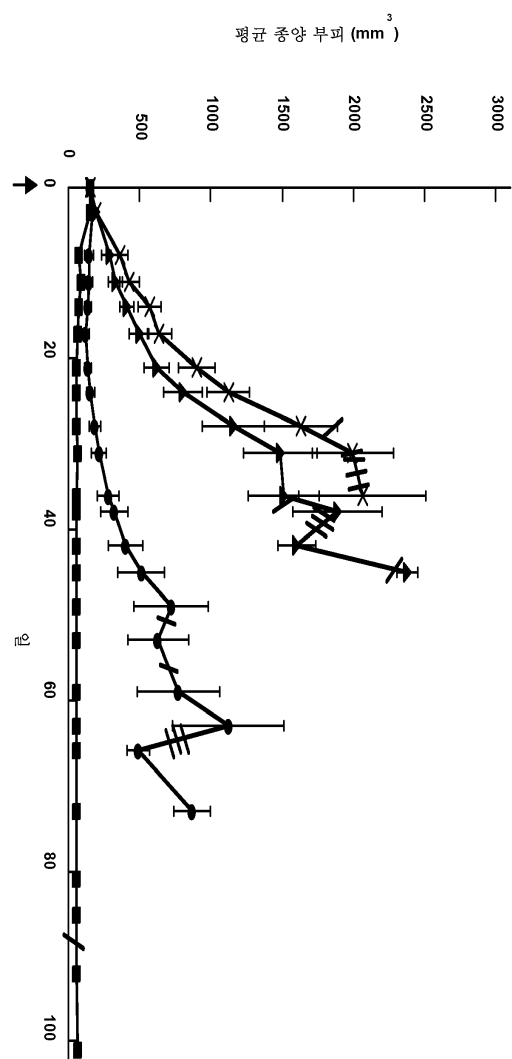
도면17



도면18



도면19



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> GENENTECH, INC. et al.
- <120> ANTIBODIES FOR TREATING AND DIAGNOSING TUMORS EXPRESSING SLC34A2 (TAT211 = SEQID 2)
- <130> P5041R1W0
- <140> PCT/US2010/058197
- <141> 2010-11-29
- <150> US 61/384,467
- <151> 2010-09-20
- <150> US 61/265,262
- <151> 2009-11-30
- <160> 81
- <210> 1

<211> 2366

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

cagcccagca cctgcggagg gagcgtgac catggctccc tggcctgaat 50
tgggagatgc ccagcccaac cccgataagt acctcgaagg ggccgcaggt 100

cagcagccca ctgccctga taaaagcaaa gagaccaaca aaacagataa 150
cactgaggca cctgtaacca agattgaact tctgccgtcc tactccacgg 200
ctacactgat agatgagccc actgaggtgg atgaccctg gaacctaccc 250
actcttcagg actcggggat caagtgttca gagagagaca ccaaaggga 300
gattctctgt ttcttccaag ggattgggag attgatttta cttctcggat 350
ttctctactt ttctgtgtgc tccctggata ttcttagtag cgccttcag 400
ctggttggag gaaaaatggc aggacagttc ttcagcaaca gctctattat 450
gtccaacctt ttgttggggc tggatgatcg ggtgctggtg accgtcttgg 500
tgcagagctc cagcacctca acgtccatcg ttgtcagcat ggtgtcctct 550

tcattgtcga ctgttcgggc tgccatcccc attatcatgg gggccaacat 600
tggaacgtca atcaccaaca ctattgttgc gctcatgcag gtgggagatc 650
ggagtgagtt cagaagagct ttgcaggag ccactgtcca tgacttcttc 700
aactggctgt ccgtgttggg gctcttggcc gtggagggtg ccaccatta 750
cctcgagatc ataaccagc ttatagtga gagcttcac ttcaagaatg 800
gagaagatgc ccagatctt ctgaaagtca tactaagcc cttcacaag 850
ctcattgtcc agctggataa aaaagttatc agccaaattg caatgaacga 900
tgaaaaagcg aaaaacaaga gtcttgtcaa gatttgggtg aaaactttta 950
ccaacaagac ccagattaac gtcactgttc cctcgactgc taactgcacc 1000

tccccttccc tctgttggac ggatggcatc caaaactgga ccatgaagaa 1050
tgtgacctac aaggagaaca tcgccaaatg ccagcatatc ttttgaatt 1100
tccacctccc ggatcttgcg gtgggcacca tcttgcctat actctccctg 1150
ctggtcctct gtggttgctt gatcatgatt gtcaagatcc tgggctctgt 1200
gctcaagggg caggctgcca ctgtcatcaa gaagaccatc aacactgatt 1250
tcccctttcc ctttgcattg ttgactggct acctggccat cctcgtcggg 1300
gcaggcatga cttcatcgt acagagcagc tctgtgttca cgtcggcctt 1350
gacccccctg attggaatcg gcgtgataac cattgagagg gcttatccac 1400

```

tcacgtggg ctccaacatc ggcaccacca ccaccgcat cctggccgcc 1450

ttagccagcc ctggcaatgc attgaggagt tcactccaga tcgccctgtg 1500

ccactttttc ttcaacatct ccggcatctt gctgtggtac ccgataccgt 1550

tcactcgcct gcccatccgc atggccaagg ggctgggcaa catctctgcc 1600

aagtatcgct ggttcgccgt cttctacctg atcatcttct tcttctgat 1650

cccgtgacg gtgtttggcc tctcgtggc cggtggcgg gtgctggtg 1700

gtgtcgggggt tcccgctgc ttcacatca tcctggtact gtgcctccga 1750

ctctgcagt ctgcgtgccc acgcgtctg ccgaagaaac tccagaactg 1800

gaacttctg ccgctgtgga tgcgtcgt gaagccctgg gatgccgtcg 1850

tctccaagtt caccggctgc ttccagatgc gctgctgctg ctgctgccgc 1900

gtgtgctgcc gcgcgtgctg cttgctgtgt ggctgcccc aagtctgccg 1950

ctgcagcaag tgctgcgagg acttggagga ggcgcaggag gggcaggatg 2000

tccctgtcaa ggctcctgag accttgata acataacat tagcagagag 2050

gctcaggtg aggtccctgc ctccgactca aagaccgaat gcacggcctt 2100

gtaggggacg cccagattg tcagggatgg ggggatggc cttgagttt 2150

gcattctctc ctccctccca cttctgcacc ctttcaccac ctgaggaga 2200

tttctcccc attagcaat gaaattgatg cagtcctacc taactcgatt 2250

ccctttggct tggtaggtg gcctgcaggg cacttttatt ccaacccatg 2300

gcctccatga ctttttcaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa 2350

aaaaaaaaa aaaaaa 2366

<210> 2

<211> 690

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Pro Trp Pro Glu Leu Gly Asp Ala Gln Pro Asn Pro Asp

1 5 10 15

Lys Tyr Leu Glu Gly Ala Ala Gly Gln Gln Pro Thr Ala Pro Asp

20 25 30

Lys Ser Lys Glu Thr Asn Lys Thr Asp Asn Thr Glu Ala Pro Val

35 40 45

Thr Lys Ile Glu Leu Leu Pro Ser Tyr Ser Thr Ala Thr Leu Ile

50 55 60

Asp Glu Pro Thr Glu Val Asp Asp Pro Trp Asn Leu Pro Thr Leu

65 70 75

Gln Asp Ser Gly Ile Lys Trp Ser Glu Arg Asp Thr Lys Gly Lys

80 85 90

Ile Leu Cys Phe Phe Gln Gly Ile Gly Arg Leu Ile Leu Leu Leu

95 100 105

Gly Phe Leu Tyr Phe Phe Val Cys Ser Leu Asp Ile Leu Ser Ser

110 115 120

Ala Phe Gln Leu Val Gly Gly Lys Met Ala Gly Gln Phe Phe Ser

125 130 135

Asn Ser Ser Ile Met Ser Asn Pro Leu Leu Gly Leu Val Ile Gly

140 145 150

Val Leu Val Thr Val Leu Val Gln Ser Ser Ser Thr Ser Thr Ser

155 160 165

Ile Val Val Ser Met Val Ser Ser Ser Leu Leu Thr Val Arg Ala

170 175 180

Ala Ile Pro Ile Ile Met Gly Ala Asn Ile Gly Thr Ser Ile Thr

185 190 195

Asn Thr Ile Val Ala Leu Met Gln Val Gly Asp Arg Ser Glu Phe

200 205 210

Arg Arg Ala Phe Ala Gly Ala Thr Val His Asp Phe Phe Asn Trp

215 220 225

Leu Ser Val Leu Val Leu Leu Pro Val Glu Val Ala Thr His Tyr

230 235 240

Leu Glu Ile Ile Thr Gln Leu Ile Val Glu Ser Phe His Phe Lys

245 250 255

Asn Gly Glu Asp Ala Pro Asp Leu Leu Lys Val Ile Thr Lys Pro

260 265 270

Phe Thr Lys Leu Ile Val Gln Leu Asp Lys Lys Val Ile Ser Gln

275	280	285
Ile Ala Met Asn Asp Glu Lys Ala Lys Asn Lys Ser Leu Val Lys		
290	295	300
Ile Trp Cys Lys Thr Phe Thr Asn Lys Thr Gln Ile Asn Val Thr		
305	310	315
Val Pro Ser Thr Ala Asn Cys Thr Ser Pro Ser Leu Cys Trp Thr		
320	325	330
Asp Gly Ile Gln Asn Trp Thr Met Lys Asn Val Thr Tyr Lys Glu		
335	340	345
Asn Ile Ala Lys Cys Gln His Ile Phe Val Asn Phe His Leu Pro		
350	355	360
Asp Leu Ala Val Gly Thr Ile Leu Leu Ile Leu Ser Leu Leu Val		
365	370	375
Leu Cys Gly Cys Leu Ile Met Ile Val Lys Ile Leu Gly Ser Val		
380	385	390
Leu Lys Gly Gln Val Ala Thr Val Ile Lys Lys Thr Ile Asn Thr		
395	400	405
Asp Phe Pro Phe Pro Phe Ala Trp Leu Thr Gly Tyr Leu Ala Ile		
410	415	420
Leu Val Gly Ala Gly Met Thr Phe Ile Val Gln Ser Ser Ser Val		
425	430	435
Phe Thr Ser Ala Leu Thr Pro Leu Ile Gly Ile Gly Val Ile Thr		
440	445	450
Ile Glu Arg Ala Tyr Pro Leu Thr Leu Gly Ser Asn Ile Gly Thr		
455	460	465
Thr Thr Thr Ala Ile Leu Ala Ala Leu Ala Ser Pro Gly Asn Ala		
470	475	480
Leu Arg Ser Ser Leu Gln Ile Ala Leu Cys His Phe Phe Phe Asn		
485	490	495
Ile Ser Gly Ile Leu Leu Trp Tyr Pro Ile Pro Phe Thr Arg Leu		
500	505	510
Pro Ile Arg Met Ala Lys Gly Leu Gly Asn Ile Ser Ala Lys Tyr		

515	520	525
Arg Trp Phe Ala Val Phe Tyr Leu Ile Ile Phe Phe Phe Leu Ile		
530	535	540
Pro Leu Thr Val Phe Gly Leu Ser Leu Ala Gly Trp Arg Val Leu		
545	550	555
Val Gly Val Gly Val Pro Val Val Phe Ile Ile Ile Leu Val Leu		
560	565	570
Cys Leu Arg Leu Leu Gln Ser Arg Cys Pro Arg Val Leu Pro Lys		
575	580	585
Lys Leu Gln Asn Trp Asn Phe Leu Pro Leu Trp Met Arg Ser Leu		
590	595	600
Lys Pro Trp Asp Ala Val Val Ser Lys Phe Thr Gly Cys Phe Gln		
605	610	615
Met Arg Cys Cys Cys Cys Cys Arg Val Cys Cys Arg Ala Cys Cys		
620	625	630
Leu Leu Cys Gly Cys Pro Lys Cys Cys Arg Cys Ser Lys Cys Cys		
635	640	645
Glu Asp Leu Glu Glu Ala Gln Glu Gly Gln Asp Val Pro Val Lys		
650	655	660
Ala Pro Glu Thr Phe Asp Asn Ile Thr Ile Ser Arg Glu Ala Gln		
665	670	675
Gly Glu Val Pro Ala Ser Asp Ser Lys Thr Glu Cys Thr Ala Leu		
680	685	690
<210> 3		
<211> 91		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 3		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val		
1	5	10
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu		

20 25 30

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

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val
 20 25 30
 His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Leu
 35 40 45
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Leu Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala
 95 100 105
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 110

<210> 5

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
  1           5           10           15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val
           20           25           30
His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
           35           40           45
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
           50           55           60
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
           65           70           75
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
           80           85           90
Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln
           95          100          105
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
           110

```

<210> 6

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

```

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

```

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln
 95 100 105
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 110

<210> 7

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

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

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val
 20 25 30

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

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

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln
 95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 110

<210> 8

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val

20 25 30

His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

35 40 45

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp

65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr

80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln

95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

110

<210> 9

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

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

1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val

20 25 30

His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

35 40 45

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe

50 55 60
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln

95 100 105
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

110

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
 1 5 10 15
 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val
 20 25 30
 His Trp Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

35 40 45
 Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gln
 95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

110

<210> 11

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5						10				15
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Arg
				20						25				30
His	Trp	Ser	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro
				35						40				45
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Val	Ser	Asn	Arg	Phe
				50						55				60
Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
				65						70				75
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr
				80						85				90
Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Phe	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln
				95						100				105
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg							

110

<210> 12

<211> 113

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

<210

> 13

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

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

<210> 14

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5						10				15
Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Ser
				20						25				30
Asp	Phe	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
				35						40				45
Glu	Trp	Val	Ala	Thr	Ile	Gly	Arg	Val	Ala	Ser	His	Thr	Tyr	Tyr
				50						55				60
Pro	Asp	Ser	Met	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
				65						70				75
Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
				80						85				90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His	Arg	Gly	Phe	Asp	Val	Gly
				95						100				105
His	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
				110						115				120

<210> 15

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

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

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

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

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

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

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

<210> 18

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

Pro	Asp	Ser	Met	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser
				65						70				75

Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp
			80						85					90
Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	His	Arg	Gly	Phe	Asp	Val	Gly
			95						100					105
His	Phe	Asp	Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
			110						115					120

<210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

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

<210> 20

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Arg
 65 70 75
 Gly Phe Asp Val Gly His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 80 85 90
 Val Thr Val Ser Ser
 95

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr Leu Ala
 5 10

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10 15
 Glu

<210> 23

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Ser Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10 15
 Glu

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Trp Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10 15
 Glu

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Arg Ser Ser Gly Thr Leu Arg His Trp Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10 15
 Glu

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Arg Ser Ser Gly Thr Leu Leu His Asn Asn Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10 15
 Glu

<210> 27

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Leu

1 5 10 15

Glu

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Thr Ser Gly Asn Thr Tyr Leu

1 5 10 15

Glu

<210> 29

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Leu

1 5 10 15

Glu

<210> 30

<211> 16

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Ala Ser Gly Asn Thr Tyr Leu

1 5 10 15

Glu

<210> 31

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Asn Ser Gly Asn Thr Tyr Leu

1 5 10 15

Glu

<210> 32

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Arg Ser Ser Glu Thr Leu Val His Lys Ser Gly Asn Thr Tyr Leu

1 5 10 15

Glu

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

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

1 5 10 15

Glu

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Arg Ser Ser Gln Thr Leu Gln His Trp Ser Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10 15
 Glu

<210> 35

<211> 7

<212>

> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser
 5

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser
 5

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Arg Val Ser Gln Arg Phe Thr
 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Arg Val Ser Asn Arg Phe Arg
 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr

5

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Phe Gln Gly Ser His Asn Pro Leu Thr

5

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Phe Gln Gly Ser Phe Asn Pro Leu Thr

5

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser

5

10

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Gly Phe Ser Phe Ser Asp Phe Ala Met Ser

5

10

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Ser Ser Ser Phe Ser Asp Phe Ala Leu Ser

5 10

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Gly Phe Asn Phe Arg Gly Phe Ala Met Ser

5 10

<210> 46

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 46

Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 47

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Ser His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser

1 5 10 15

Met Lys Gly

<210> 48

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

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

1 5 10 15

Met Lys Gly

<210> 49

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Phe His Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser

1 5 10 15

Met Lys Gly

<210> 50

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Ser Thr Ile Gly Arg Val Ala Ser His Thr Tyr Tyr Pro Val Gly

1 5 10 15

Met Thr Gly

<210> 51

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

1 5 10 15

Met Val Arg

<210> 52

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Gly Thr Ile Gly Trp Met Val Ser His Thr Tyr Tyr Pro Gln Arg

1 5 10 15

Leu Asn Gly

<210> 53

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Ala Thr Ile Gly Arg Val Thr Ser Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser

1 5 10 15

Met Lys Gly

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Ala Thr Ile Gly Arg Val Tyr Arg His Thr Tyr Tyr Pro Thr Ser

1 5 10 15

Met Lys Gly

<210> 55

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Ala Thr Ile Gly Arg Val Pro Leu His Thr Tyr Tyr Pro Arg Ser

1 5 10 15

Met Lys Gly

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Ala Thr Ile Gly Arg Val Pro Leu His Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser

1 5 10 15

Met Lys Gly

<210> 57

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 57

Ala Thr Ile Gly Arg Val Pro Leu His Thr Tyr Tyr Pro Ala Ser

1 5 10 15

Met Lys Gly

<210> 58

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 58

Ala Thr Ile Gly Arg Val Glu Gln His Thr Tyr Tyr Pro Gln Ser

1 5 10 15

Met Lys Gly

<210> 59

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Ser His Thr Tyr Tyr Pro Gly Ser

1 5 10 15

Met Lys Gly

<210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Leu His Thr Tyr Tyr Pro Gln Ser

1 5 10 15

Met Lys Gly

<210> 61

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Ala Arg Gly Phe Asp Tyr

5

<210> 62

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Val Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly His Phe Asp Phe

5 10

<210> 63

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly His Phe Val Phe

5 10

<210> 64

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Ala Arg His Arg Gly Trp Val Val Gly His Phe Asp Leu

5 10

<210> 65

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly His Phe Asp Phe

5 10

<210> 66

<211> 87

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 66

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly Arg

35 40 45

Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu

50 55 60

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

	65	70	75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	80	85	
<210> 67			
<211> 81			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 67			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly			
1 5 10 15			
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala			
20 25 30			
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp			
35 40 45			
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser			
50 55 60			
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr			
65 70 75			
Leu Val Thr Val Ser Ser			
80			
<210> 68			
<211> 80			
<212> PRT			
<213> Homo sapiens			
<400> 68			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly			
1 5 10 15			
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala			
20 25 30			
Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp			
35 40 45			
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser			
50 55 60			

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 69

<211> 79

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 69

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

50 55 60
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 70

<211> 87

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg
35 40 45

Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
50 55 60
Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75
Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 71

<211> 81

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

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

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75
Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 72

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp

35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala

50 55 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu

65 70 75

Val Thr Val Ser Ser

80

<210> 73

<211> 79

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

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

1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro

20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp

35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala

50 55 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 74

<211> 79

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly

1 5 10 15

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

<210> 75

<211> 79

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

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

<210> 76

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

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

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

Val Glu Ile Lys Arg

80

<210> 77

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

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

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

Lys Val Glu Ile Lys

80

<210> 78

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

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

<210> 79

<211> 80

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

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

<210> 80

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly			
1	5	10	15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser			
	20	25	30
Asp Phe Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
	35	40	45
Glu Trp Val Ala Thr Ile Gly Arg Val Ala Phe His Thr Tyr Tyr			
	50	55	60
Pro Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser			
	65	70	75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp			
	80	85	90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg His Arg Gly Phe Asp Val Gly			
	95	100	105
His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	110	115	120
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser			
	125	130	135
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys			
	140	145	150
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala			
	155	160	165
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser			
	170	175	180
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser			
	185	190	195
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			
	200	205	210

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys			
	215	220	225
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met			
	245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser			
	260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val			
	275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn			
	290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			
	305	310	315
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
	320	325	330
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
	335	340	345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu			
	350	355	360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe			
	365	370	375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro			
	380	385	390
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly			
	395	400	405
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp			
	410	415	420
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			
	425	430	435
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
	440	445	

<210> 81

<211> 219

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 81

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val
1				5				10					15	
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ser	Ser	Glu	Thr	Leu	Val
				20				25					30	
His	Ser	Ser	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Glu	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro
				35				40					45	
Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Val	Ser	Asn	Arg	Phe
				50				55					60	
Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp
				65				70					75	
Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr
				80				85					90	
Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	Phe	Asn	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln
				95				100					105	
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val
				110				115					120	
Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala
				125				130					135	
Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys
				140				145					150	
Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
				155				160					165	
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
				170				175					180	
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
				185				190					195	

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 200 205 210
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 215