



등록특허 10-2723905



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년10월31일

(11) 등록번호 10-2723905

(24) 등록일자 2024년10월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 16/2803 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7038453

(22) 출원일자(국제) 2018년06월04일

심사청구일자 2021년06월02일

(85) 번역문제출일자 2019년12월26일

(65) 공개번호 10-2020-0024788

(43) 공개일자 2020년03월09일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/035840

(87) 국제공개번호 WO 2018/226578

국제공개일자 2018년12월13일

(30) 우선권주장

62/515,454 2017년06월05일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2017042210 A1

WO2016203053 A2

US20110150886 A1

(73) 특허권자

어젠시스 인코포레이티드

미국, 일리노이 60062, 노쓰브룩, 워터뷰 드라이브 2375

(72) 발명자

모리슨, 카렌 제인 메이릭

미국, 캘리포니아 90404, 산타 모니카, 스튜어트 스트리트 1800

도네이트, 페르난도

미국, 캘리포니아 90404, 산타 모니카, 스튜어트 스트리트 1800

양, 팽

미국, 캘리포니아 90404, 산타 모니카, 스튜어트 스트리트 1800

(74) 대리인

청운특허법인

전체 청구항 수 : 총 18 항

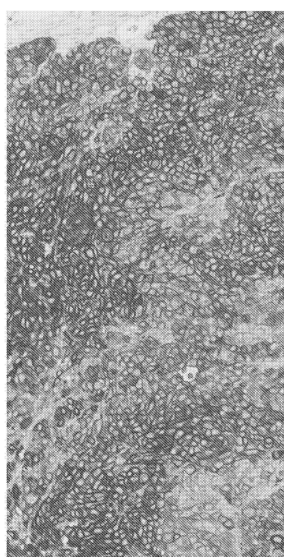
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 넥틴-4 결합 단백질 및 이의 사용 방법

(57) 요약

넥틴-4에 특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 조성물, 방법 및 용도는 여기에서 제공된다. 샘플 또는 환자에서 넥틴-4 발현을 평가하는 방법 및 항-암 치료제에 대한 암의 반응성을 평가하는 방법은 또한 여기에서 제공된다.

대표도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

인간 넥틴-4에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로서, 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은:

(a) 다음을 포함하는 경쇄 가변 영역(VL):

- (1) SEQ ID NO:7 및 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR1;
- (2) SEQ ID NO:9, 10 및 11로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR2; 및
- (3) SEQ ID NO:12 및 13으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 VL CDR3;

및

(b) 다음을 포함하는 중쇄 가변 영역(VH)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편:

- (1) SEQ ID NO:14, 15, 16 및 17로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR1;
- (2) SEQ ID NO:18, 19, 20 및 21로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR2;

및

- (3) SEQ ID NO:22, 23 및 24으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 VH CDR3.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및 VLCDR3는 Kabat 넘버링 시스템, Chothia 넘버링 시스템, IMGT 넘버링 시스템, AbM 넘버링 시스템, 대표적인(Exemplary) 넘버링 시스템, 및 Contact 넘버링 시스템으로부터 선택되는 CDR 넘버링 시스템에 따라 확인되는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

- a) VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3는 각각 SEQ ID NOS:7, 9, 및 12의 아미노산 서열을 포함하고 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3는 각각 SEQ ID NOS:14, 18, 및 22의 아미노산 서열을 포함하거나;
- b) VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3는 각각 SEQ ID NOS:7, 10, 및 12의 아미노산 서열을 포함하고, VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3는 각각 SEQ ID NOS:15, 19, 및 23의 아미노산 서열을 포함하거나;
- c) VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3는 각각 SEQ ID NOS:7, 10, 및 12의 아미노산 서열을 포함하고, VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3는 각각 SEQ ID NOS:16, 20, 및 23의 아미노산 서열을 포함하거나;
- d) VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3는 각각 SEQ ID NOS:8, 11, 및 13의 아미노산 서열을 포함하고, VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3는 각각 SEQ ID NOS:17, 21, 및 24의 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3는, 각각 SEQ ID NOS: 7, 10, 및 12의 아미노산 서열을 포함하고, 상기 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3는, 각각 SEQ ID NOS: 15, 19, 및 23의 아미노산 서열을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 5

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:3의 아미노산 서열을 포함하는 VL를 포함하거나,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 VH를 포함하거나,

또는 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은:

(a) SEQ ID NO:3의 아미노산 서열을 포함하는 VL; 및

(b) SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 VH를 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 6

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 마우스 IgG2 Fc, 또는 인간 IgG1 Fc 영역을 포함하거나,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 Fc 영역을 포함하거나,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:33의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역을 더욱 포함하거나, 또는

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은:

(a) EQ ID NO:33의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역; 및

(b) SEQ ID NO:35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 Fc 영역을 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 7

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함하거나,

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하거나, 또는

상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편은:

(a) SEQ ID NO:5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄; 및

(b) SEQ ID NO:6의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함하는, 항체 또는 이의 항원-결합 단편.

청구항 8

폴리뉴클레오티드로서:

i) 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 VH를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열;

ii) 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 VL을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열;

iii) 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 VH를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 VL을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열;

iv) 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열;

v) 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경쇄를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열; 또는

vi) 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 중쇄를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 및 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 경쇄를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는, 폴리뉴클레오티드.

청구항 9

청구항 8의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터.

청구항 10

청구항 8의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 분리된 세포.

청구항 11

청구항 9의 벡터를 포함하는 분리된 세포.

청구항 12

청구항 10의 분리된 세포를 배양하여 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 발현시키는 배양 단계를 포함하는, 인간 넥틴-4에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 제조 방법.

청구항 13

청구항 11의 분리된 세포를 배양하여 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 발현시키는 배양 단계를 포함하는, 인간 넥틴-4에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 제조 방법.

청구항 14

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는, 암이 의심되는 피험자(subject) 유래의 조직 샘플에서 넥틴-4 발현을 검출하거나, 또는 암 피험자(cancer subject)의 항-암 치료제에 대한 반응성을 평가하기 위한 키트.

청구항 15

암이 의심되는 피험자의 조직 샘플에서 넥틴-4 발현을 검출하는 방법으로서, 상기 방법은:

- (a) 상기 조직 샘플을 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 조직 샘플에 대한 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합을 검출하는 단계; 및
- (c) 단계 (b)에서 결정된 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현을 넥틴-4의 기준 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는, 넥틴-4 발현을 검출하는 방법.

청구항 16

암이 의심되는 피험자의 조직 샘플에서 넥틴-4 발현을 검출하는 방법으로서, 상기 방법은:

- (a) 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로 조직 샘플에 대한 면역조직화학 분석을 수행하는 단계; 및
- (b) 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현을 결정하는 단계를 포함하는, 넥틴-4 발현을 검출하는 방법.

청구항 17

항-암 치료제에 대한 암 피험자의 반응성을 검출하는 방법으로서, 상기 피험자의 조직 샘플에서 넥틴-4 발현에 기초한 상기 방법은:

- (a) 상기 조직 샘플을 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계;
- (b) 상기 조직 샘플에 대한 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합을 검출하는 단계;
- (c) 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준을 결정하는 단계로서, 여기서, 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준이 넥틴-4의 기준 발현 수준과 비교되는, 발현 수준을 결정하는 단계; 및
- (d) 단계 (c)에서 결정된 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준을 넥틴-4의 기준 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하고,

여기서, 기준과 비교된 넥틴-4의 증가된 발현 수준은 상기 항-암 치료제에 대한 반응성을 나타내는, 항-암 치료제에 대한 암 환자의 반응성을 검출하는 방법.

청구항 18

항-암 치료제에 대한 암 피험자의 반응성을 검출하는 방법으로서, 상기 피험자의 조직 샘플에서 넥틴-4 발현에 기초한 상기 방법은:

(a) 청구항 1 내지 3 중 어느 한 항의 항체 또는 이의 항원 결합 단편으로 조직 샘플에 대한 면역조직화학 분석을 수행하는 단계;

(b) 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준을 결정하는 단계로서, 여기서, 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준이 넥틴-4의 기준 발현 수준과 비교되는 넥틴-4의 발현 수준을 결정하는 단계; 및

(c) 단계 (b)에서 결정된 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준을 넥틴-4의 기준 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하며,

여기서, 상기 기준과 비교된 조직 샘플에서 넥틴-4의 증가된 발현 수준은 상기 항-암 치료제에 대한 반응성을 나타내는, 항-암 치료제에 대한 암 환자의 반응성을 검출하는 방법.

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 인간 넥틴-4 (human Nectin-4)에 특이적으로 결합하고, 넥틴-4의 발현 수준을 검출하는 항체를 포함하는 조성물, 방법, 및 용도는 여기에서 제공된다.
- [0002] 본 출원은 2017년 6월 5일자로 출원된, 미국 가 특허출원 제62/515,454호의 우선권을 주장하며, 이의 전체적인 내용은 여기에 참조로서 병합된다.
- [0003] 본 출원은, 2018년 5월 31일자에 생성되고, 크기가 37,280 바이트이며, 명칭이 14369-208-228_SEQ_LISTING.txt 인, 본 출원과 함께 제출된 ASCII 텍스트 형식의 서열 목록의 컴퓨터 판독 형태 (Computer Readable Form: CRF)를 참조로서 병합한다.

배경 기술

- [0004] 폴리오바이러스 수용체-관련 단백질 4 (poliovirus receptor-related protein 4: PVRL4)로도 알려진, 넥틴-4는, 세포 부착 분자 (cellular adhesion molecules)의 넥틴 계열 (Nectin family)에 속하는 약 52kDa 크기의 단일 통과 타입 I 막관통 단백질 (single pass type I transmembrane protein)이다. 넥틴은, 하나의 넥틴-4가 또 다른 넥틴-4와 상호작용하는 특이항체 상호작용 (homophilic interaction), 및 넥틴-4가 넥틴-1, 넥틴-2, 또는 넥틴-3과 같은 다른 넥틴 계열 단백질과 상호작용하는 이호성 (heterophilic) 상호작용 모두를 통해 접합 결합 (adherens junctions)에서 Ca^{2+} -비의존성 세포-세포 접착을 매개한다. (Miyoshi J et al, 2007, Am J Nephrol 27:590-604; Takai et al, 2003, Cancer Sci 94:655-667; Reymond N. et al, 2001, Journal of Biological Chemistry, 276:43205-15). 넥틴-4의 세포외 도메인 (extracellular domain)은, V, CI 및 C2로 지명된 3의 Ig-유사 서브도메인 (Ig-like subdomains)을 갖는다. 넥틴-2의 CI 도메인은 특이항체 상호작용을 담당하는 반면, 대부분의 넥틴 분자의 V 도메인은 이호성 상호작용 및 세포-세포 접착에 기여하는 것으로 밝혀져 있다. (Miyoshi J et al, 2007, Am J Nephrol 27:590-604; Takai et al, 2003, Cancer Sci 94:655-667; Reymond N. et al, 2001, Journal of Biological Chemistry, 276:43205-15).
- [0005] 넥틴은, 예를 들어, 조혈 (hematopoietic), 뉴런, 내피, 및 상피 세포들을 포함하는, 다양한 조직에서 발현된다. (Mendelsohn C et al, 1989, Cell 56:855-865; Lopez M et al., 1995, Gene (Amst.) 155:261-265; Lopez M et al., 1998, Blood 92:4602-4611; Reymond N et al., 2000, Gene (Amst.) 255:347-355; Cocchi F et al., 1998, Journal of Virology. 72:9992-10002; Takahashi K. et al., 1999, Journal of Cell Biology 145:539-549; Miyoshi J et al., 2007, Am J Nephrol 27:590-604; Takai et al., 2003, Cancer Sci 94:655-667).
- [0006] 넥틴은, 다른 넥틴 계열 단백질과의 특이항체 상호작용 또는 이호성 상호작용에 의한 세포-세포 접착을 매개하는 것 이외에, 카데린 (cadherin)과 같은 다른 세포 접착 분자, 또는 프로락틴 수용체 (prolactin receptor)와 같은 다른 세포 표면 수용체를 보강할 수 있다. 다른 세포 표면 수용체를 보강하여, 넥틴은 또한 자극성 공-수용체로서 역할을 할 수 있고, 따라서 신호전달 기능 (signaling function)을 가질 수 있다. 예를 들어, 마우스 유선 (mouse mammary gland)에서, 넥틴-4는, 프로락틴 수용체와 이의 세포외 및 막관통 도메인을 통해 상호작용하고, 야누스 키나제-2 (Janus Kinase-2: JAK2)의 키나아제 활성을 정상적으로 억제하는, 사이토카인 신호전달 억제제-1 (SOCS-1)에 결합하고 격리시키며, 이에 의해 프로락틴 유도 JAK2 활성화 및 신호전달을 향상시킨다. (Maruoka et al., 2017, Journal of Biological Chemistry, doi: 10.1074/jbc.M116.769091, jbc.M116.769091, Epub Ahead of Print; Kitayama et al., 2016, Journal of Biological Chemistry 291:5817-5831). 넥틴은 또한 카데린과 협력하여 초기 세포-세포 접착 동안 Rac1 활성을 유도 한 후 신속하게 억제할 수 있다. (Khomeika et al., 2011, PLoS ONE 6:e17841).

[0007] 다양한 생물학적 샘플에서 넥틴-4 발현을 특이적으로 검출하고, 평가하기 위해 지금까지 개발된 항-넥틴-4 항체에서 만족할만한 성과가 없었다. 따라서, 생물학적 샘플에서 넥틴-4 발현을 특이적으로 검출하고, 평가할 수 있는 항-넥틴-4 항체를 확인할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 개시는, 넥틴-4 (예를 들어, 인간 넥틴-4, SEQ ID NO:43)에 결합하는 항체와 같은 결합 단백질을 포함하는, 넥틴-4에 결합하는 단백질을 제공한다. 항체를 포함하는, 이러한 결합 단백질은, 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 단편 (fragment), 및/또는 넥틴-4 에피토프 (epitope)에 결합할 수 있다.

[0009] 본 개시는 또한, 어떤 구체 예에서, 넥틴-4를 발현하는 세포에 특이적으로 결합하는, 항체 또는 이의 단편을 포함하는, 결합 단백질을 제공한다.

[0010] 또한 이러한 항체를 인코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 및 벡터, 이러한 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터를 포함하는 세포 (예를 들어, 숙주 세포), 및 이러한 항체를 포함하는 조성물, 시약, 및 키트는 여기에서 제공된다. 또 다른 관점에서, 넥틴-4 활성화 (예를 들어, 넥틴-4 신호전달을 활성화) 또는 넥틴-4 발현 수준을 조절하는 방법, 이러한 항-넥틴-4 항체의 진단 방법 및 용도는 여기에서 제공된다.

과제의 해결 수단

[0011] 몇몇 구체 예에서, 결합 단백질 (예를 들어, 항-넥틴-4 항체)은 6의 상보성 결정 영역 (complementarity determining regions: CDRs) 또는 6개 미만의 CDRs를 포함한다. 다른 구체 예에서, 결합 단백질 (예를 들어, 항-넥틴-4 항체)은, 중쇄 가변 영역 (VH) CDR1, VH CDR2, VH CDR3, 경쇄 가변 영역 (VL) CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3로부터 선택된 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 CDRs를 포함한다. 어떤 구체 예에서, 결합 단백질 (예를 들어, 항-넥틴-4 항체)은, 여기에 기재된 바와 같은 M22-321b41.1으로 지정된 단일클론 항체, 또는 이의 인간화 변이체 (humanized variant)의 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3로부터 선택된 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 CDRs를 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 결합 단백질 (예를 들어, 항-넥틴-4 항체)은, 인간 면역글로불린 아미노산 서열 또는 이의 변이체의 VH 프레임워크 영역 1 (framework region 1: FR1), VH FR2, VH FR3, VH FR4, VL FR1, VL FR2, VL FR3, 및/또는 VL FR4를 포함하는, 스캐폴드 영역 (scaffold region) 또는 프레임워크 영역 (FR)을 더욱 포함한다.

[0012] 몇몇 구체 예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 표 1에 서술된 바와 같은 항체 M22-321b41.1의 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 포함하는 VL을 포함한다.

[0013] 다른 구체 예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 표 1에 서술된 바와 같은 항체 M22-321b41.1의 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3을 포함하는 VH를 포함한다.

[0014] 다른 구체 예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은:

[0015] (a) 표 2에 서술된 바와 같은 항체 M22-321b41.1의 VL FR1, VL FR2, VL FR3, 및 VL FR4를 포함하는 VL; 및

[0016] (b) 표 2에 서술된 바와 같은 항체 M22-321b41.1의 VH FR1, VH FR2, VH FR3, 및 VH FR4를 포함하는 VH를 포함한다.

[0017] 어떤 구체 예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3은, 각각 SEQ ID NOS: 7, 10, 및 12의 아미노산 서열을 포함하고, 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3은, 각각 SEQ ID NOS: 15, 19, 및 23의 아미노산 서열을 포함한다.

[0018] 또 다른 구체 예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:3의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 아미노산 서열은 이의 하나 이상의 보존적 변형 (conservative modifications)을 포함한다.

[0019] 어떤 구체 예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 VH를 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 아미노산 서열은 이의 하나 이상의 보존적 변형을 포함한다.

[0020] 어떤 구체 예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은: (a) SEQ ID NO:3의 아미노산 서열을 포함하는 VL; 및 (b) SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 포함하는 VH를 포함한다.

- [0021] 몇몇 구체 예에서, 항체는 인간 IgG1 Fc 영역을 포함한다. 다른 구체 예에서, 항체는 돌연변이 인간 IgG1 Fc 영역을 포함한다.
- [0022] 몇몇 구체 예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:33의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역 (constant region)을 더욱 포함한다.
- [0023] 다른 구체 예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 Fc 영역을 더욱 포함한다.
- [0024] 여전히 또 다른 구체 예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:33의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 불변 영역; 및 SEQ ID NO:35의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 Fc 영역을 더욱 포함한다.
- [0025] 몇몇 구체 예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:5의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0026] 어떤 구체 예에서, 넥틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 (residues) 31-346 중 적어도 하나에 결합한다. 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 31-150 중 적어도 하나에 결합한다. 어떤 구체 예에서, 넥틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 1-150 중 적어도 하나에 결합한다.
- [0027] 하나의 구체 예에서, 인간 넥틴-4의 에피토프는, 넥틴-4 리간드 결합 부위 (ligand binding site)와는 다르다.
- [0028] 하나의 관점에서, 인간 넥틴-4의 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 여기에 제공되며, 여기서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 넥틴-4를 발현하는 세포에 특이적으로 결합한다.
- [0029] 하나의 구체 예에서, 인간 넥틴-4의 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은: (a) 상기 조직 샘플을 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 접촉시키는 단계; (b) 상기 조직 샘플에 대한 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합을 검출하는 단계; 및 (c) 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현을 결정하는 단계를 포함하여, 암이 의심되는 피험자 유래의 조직 샘플에서 넥틴-4 발현을 평가하는데 사용되며, 여기서, 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준은, 넥틴-4의 기준 발현 수준 (reference expression level)과 비교된다.
- [0030] 어떤 구체 예에서, 항체는 단일클론 항체이다. 몇몇 구체 예에서, 항체는 인간화, 인간, 또는 키메라 항체이다. 또 다른 구체 예에서, 인간화 항체는 탈면역화 항체 또는 복합 인간 항체 (composite human antibody)이다. 어떤 구체 예에서, 항체는 인간화 항체이다. 특정 구체 예에서, 항체는 인간 넥틴-4에 특이적으로 결합하는 인간화 항체이다.
- [0031] 어떤 구체 예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, dsFv, 디아바디 (diabody), 트리아바디 (triabody), 또는 테트라바디 (tetrabody)이다. 몇몇 구체 예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체 (multispecific antibody)이다.
- [0032] 몇몇 구체 예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 작용제 (agent)에 접합된다. 하나의 구체예에서, 작용제는, 방사성 동위원소, 금속 킬레이터 (metal chelator), 효소, 형광 화합물, 생물발광 화합물 (bioluminescent compound), 또는 화학발광 화합물이다.
- [0033] 또한, 여기에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 조성물은 여기에서 제공된다. 어떤 구체 예에서, 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 더욱 포함한다.
- [0034] 여기에 제공된 항체의 VH, VL, 또는 VH 및 VL 모두를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 여기에서 제공된다.
- [0035] 본 개시는 또한, 어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 항체의 중쇄, 경쇄, 또는 중쇄 및 경쇄 모두를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0036] 어떤 구체 예에서, 폴리뉴클레오타이드는 프로모터 (promoter)에 작동 가능하게 연결된다.
- [0037] 또한, 다음을 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 모집단은 여기에서 제공된다: (a) 여기에 제공된 항체의 VH 또는 중쇄를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 폴리뉴클레오타이드, 및 (b) 여기에 제공된 항체의 VL 또는 경쇄를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 폴리뉴클레오타이드. 어떤 구체 예에서, 제1 폴리뉴클레오타이드는 제1 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, 제2 폴리뉴클레오타이드는 제2 프로모터에 작동 가능하게 연결된

다.

- [0038] 여기에 제공된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 또한 여기에서 제공된다.
- [0039] 본 개시는 또한, 어떤 구체 예에서, 다음을 포함하는 벡터의 모집단을 제공한다: (a) 여기에 제공된 항체의 VH 또는 중쇄를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 벡터, 및 (b) 여기에 제공된 항체의 VL 또는 경쇄를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 벡터.
- [0040] 본 개시는, 어떤 구체 예에서, 다음을 포함하는 벡터의 모집단을 더욱 제공한다: (a) 제1 프로모터에 작동 가능하게 연결된 여기에 제공된 항체의 VH 또는 중쇄를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제1 벡터, 및 (b) 제2 프로모터에 작동 가능하게 연결된 여기에 제공된 항체의 VL 또는 경쇄를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 제2 벡터.
- [0041] 본 개시는, 어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드의 모집단을 포함하는 세포를 제공한다.
- [0042] 본 개시는 또한, 어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 벡터 또는 벡터의 모집단을 포함하는 세포를 제공한다.
- [0043] 본 개시는, 어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 생성하는 단리된 세포 (isolated cell)를 더욱 제공한다.
- [0044] 다음을 포함하는 세포의 모집단은 여기에서 제공된다: (a) 여기에 제공된 항체의 VH 또는 중쇄를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 숙주 세포, 및 (b) 여기에 제공된 항체의 VL 또는 경쇄를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 숙주 세포.
- [0045] 다음을 포함하는 세포의 모집단은 여기에서 더욱 제공된다: (a) 제1 프로모터에 작동 가능하게 연결된 여기에 제공된 항체의 VH 또는 중쇄를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 숙주 세포, 및 (b) 제2 프로모터에 작동 가능하게 연결된 여기에 제공된 항체의 VL 또는 경쇄를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 숙주 세포.
- [0046] 여기에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 키트는 또한 여기에서 제공된다.
- [0047] 인간 넥틴-4의 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 제조하는 방법은 또한 여기에서 제공된다. 어떤 구체 예에서, 상기 방법은 여기에 제공된 세포를 배양하여 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 발현시키는, 배양 단계를 포함한다. 다른 구체 예에서, 상기 방법은 여기에 제공된 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 단계를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 인간 넥틴-4의 에피토프는, 넥틴-4 리간드 결합 부위와는 다르다.

도면의 간단한 설명

- [0048] 도 1은, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ M22-321b41.1로 넥틴-4 mRNA-양성 AG-B1 이종이식 (xenograft)의 IHC 염색 분석 (staining assay)에서 양성으로 염색된 모든 암세포 (cancerous cells)를 보여주는 실험의 결과를 나타낸다.
- 도 2는, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ M22-244b3.1.1.1로 넥틴-4 mRNA-양성 AG-B1 이종이식의 IHC 염색 분석에서 양성으로 염색된 모든 암세포를 보여주는 실험의 결과를 나타낸다.
- 도 3은, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ M22-321b41.1로 넥틴-4 mRNA-음성 AG-K24 이종이식의 IHC 염색 분석에서 염색되지 않은 모든 세포를 보여주는 실험의 결과를 나타낸다.
- 도 4는, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ M22-244b3.1.1.1로 넥틴-4 mRNA-음성 AG-K24 이종이식의 IHC 염색 분석에서 양성으로 염색된 많은 세포를 보여주는 실험의 결과를 나타낸다.
- 도 5는, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ M22-321b41.1로 넥틴-4 mRNA-음성 MDA-MB-231-MFP-XCL 이종이식의 IHC 염색 분석에서 염색되지 않은 모든 세포를 보여주는 실험의 결과를 나타낸다.
- 도 6은, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ M22-244b3.1.1.1로 넥틴-4 mRNA-음성 MDA-MB-231-MFP-XCL 이종이식의 IHC 염색 분석에서 양성으로 염색된 많은 세포를 보여주는 실험의 결과를 나타낸다.
- 도 7은, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 음성 대조군 IgG2a 항체로 넥틴-4 mRNA-양성 AG-B1 이종이식의 IHC 염색 분석에서 염색되지 않은 모든 세포를 보여주는 실험의 결과를 나타낸다.
- 도 8은, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ M22-321b41.1로 넥틴-4 mRNA-양성 AG-L16 이종이식의 IHC 염색 분석에서 양성으로 염색된

모든 암세포를 보여주는 실험의 결과를 나타낸다.

도 9는, 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ M22-321b41.1로 넥틴-4 mRNA-양성 AG-B11 이중이식의 IHC 염색 분석에서 양성으로 염색된 대부분의 암세포를 보여주는 실험의 결과를 나타낸다.

도 10은, M22-321b41.1로 요로상피 세포암종 (urothelial carcinoma)의 IHC 염색 분석에서 진한 넥틴-4 염색을 보여주는 실험의 결과를 나타낸다.

도 11은, M22-321b41.1로 유방 암종 (breast carcinoma)의 IHC 염색 분석에서 넥틴-4 염색의 불균질성 (heterogeneity)을 보여주는 실험의 결과를 나타낸다.

도 12a는, 넥틴-4를 발현하는 세포 및 이중이식에서만 넥틴-4 밴드 (넥틴-4 band)의 특이적 검출을 보여주는 웨스턴 블로팅 실험 (Western blotting experiment)의 결과를 나타낸다.

도 12b는, 도 12a에서 M22-321b41.1로 양성으로 블로팅된 Rat1 (E)-넥틴-4 세포가 높은 수준의 넥틴-4를 발현하고; 및 도 12a에서 M22-321b41.1로 음성으로 블로팅된 다른 Rat1 (E) 세포가 높은 수준의 넥틴-1, 넥틴-2 및 넥틴-3을 발현하여, M22-321b41.1이 넥틴-4에 특이적임을 보여주는 대조군 FACS 실험의 결과를 나타낸다.

도 13은, M22-321b41.1 항체가 넥틴-4의 V 단편/도메인 (아미노산 잔기 1-150)을 함유하는 단백질 밴드를 인식함을 보여주는 웨스턴 블로팅 실험의 결과를 나타낸다. 상부 패널에서, M22-321b41.1 항체는 야생형 전장 (wild type full length) (wt), V 단편/도메인 (V), V 및 C1 단편/도메인 (V/C1), C1 및 C2 단편/도메인 (C1/C2), C2 단편/도메인 (C2), 및 음성 대조군 (Neo)을 발현하는 세포 용해물 (cell lysates)에 대해 웨스턴 블롯 분석으로 시험된다. 하부 패널에서, GAPDH의 블로팅은 로딩 대조군 (loading control)으로 사용된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0049] 인간 넥틴-4를 포함하는, 넥틴-4에 결합하는 항체와 같은, 결합 단백질은 여기에서 제공된다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 항체는 인간 넥틴-4에 결합한다. 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4 항체의 넥틴-4에 대한 결합은 시험관 내에서 분석된다. 다른 구체 예에서, 넥틴-4 항체의 넥틴-4에 대한 결합은, 생체 외에서 분석된다. 어떤 구체 예에서, 분석은, 면역조직화학 (IHC) 분석, 형광 활성화 세포 분류기 (FACS) 분석, ELISA, 면역블로팅 (예를 들어, 웨스턴 블로팅, 도트 블로팅, 또는 세포-내 웨스턴 블로팅), 및 기타 면역분석법을 포함한다.
- [0050] 특정 구체 예에서, 여기에 제공된, 넥틴-4에 결합하는 항체와 같은, 결합 단백질은, 넥틴-4의 결합을 위해 서로 경쟁하는 공통 특색 (common feature)을 공유한다. 이러한 경쟁적 억제, 각각의 항체가 넥틴-4의 동일한 영역 (예를 들어, 동일한 에피토프)에 결합하고, 이에 의해 유사한 효과를 드러내는 것을 나타낼 수 있다. 어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 항-넥틴-4 항체는, 인간화 항-넥틴-4 항체, 예컨대, 항체 M22-321b41.1로부터 유래하거나 또는 이에 기초하는 항체를 포함한다. 다른 구체 예에서, 여기에 제공된 항-넥틴-4 항체는, M22-321b41.1로부터 유래하거나 또는 이에 기초하는 항체와의 결합에 대해 경쟁한다. 몇몇 구체 예에서, 항-넥틴-4 항체는, 표 1에 기재된 CDR 서열을 갖는다. 어떤 구체 예에서, 항-넥틴-4 항체는, 인간 넥틴-4의 특이적 도메인 (예를 들어, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 31-346, 1-150, 또는 31-150)에 결합한다. 게다가, 이러한 결합은, 영역 내에 특정 아미노산 잔기에 크게 기인할 수 있고, 이는 여기에 기재된 항-넥틴-4 항체에 의해 인식되는 에피토프를 포함한다. 종합하면, 여기에 기재된 결과는, 표 1에 기재된 하나 이상의 CDRs를 갖는 항체를 포함하는, M22-321b41.1로부터 유래되거나 또는 이에 기초하는 항-넥틴-4 항체에 대해 관찰된 효과가, 같거나 유사한 에피토프 특이성 (예를 들어, 같거나 유사한 CDRs)을 갖는 여기에 기재된 다른 항-넥틴-4 항체에 외삽법으로 추정될 수 있음을 보여준다.
- [0051] 본 개시의 몇몇 구체 예에서, 항-넥틴-4 항체와 같은 결합 단백질은, 표 1에 기재된 바와 같은 하나 이상의 CDRs를 포함하는 면역글로불린 가변 영역을 포함할 수 있다. 이러한 결합 단백질 (예를 들어, 항-넥틴-4 항체)에서, CDRs은, CDR(s)의 적절한 항원 결합 특성이 달성되도록, CDR(s)을 향하게 하는, 표 2에 기재된 것과 같은 하나 이상의 스캐폴드 영역 또는 프레임워크 영역 (FR)과 연결될 수 있다. 여기에 기재된 바와 같은 항-넥틴-4 항체를 포함하는, 이러한 결합 단백질은, 다양한 분석에서 넥틴-4에 결합할 수 있다.
- [0052] 1. 일반적인 기술
- [0053] 여기에 기재되거나 언급된 기술 및 절차는, 예를 들어, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3d ed.2001); Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. eds., 2003); Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic (An ed.2009); Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols

(Albitar ed. 2010); 및 Antibody Engineering Vols 1 and 2 (Kontermann and Dubel eds., 2d ed.2010)에 기재된 널리 활용되는 방법론과 같이, 기술 분야의 당업자에 의해 전통적인 방법론을 사용하여 일반적으로 잘 이해되고 및/또는 일반적으로 사용되는 기술 및 절차들을 포함한다.

[0054] 2. 용어

[0055] 별도의 언급이 없는 한, 여기서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는, 기술 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 명세서를 해석할 목적을 위해, 다음의 용어 설명은 적용되며, 가능하다면, 단수로 사용되는 용어는 복수를 포함하며, 그 반대도 마찬가지이다. 모든 특허들, 출원들, 공개된 출원들, 및 기타 공보들은 이들의 전체적인 내용이 참조로 병합된다. 서술된 용어의 임의의 설명이 여기에 참조로서 병합된 임의의 문서와 상충되는 경우, 아래에 서술된 용어의 설명이 우선한다.

[0056] 용어 "넥틴-4", "넥틴-4 폴리펩티드", 또는 "넥틴-4 단백질"은, 별도의 언급이 없는 한, 영장류 (예를 들어, 인간 및 시노몰구스 원숭이 (cynos)), 개, 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유동물을 포함하는, 임의의 척추 동물 공급원 유래의, 임의의 천연 폴리펩티드를 포함하는, 폴리펩티드 ("폴리펩티드" 및 "단백질"은 여기에서 상호교환적으로 사용됨)를 포괄한다. 어떤 구체 예에서, 상기 용어들은, 이의 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 변이체를 포함하는, "관련된 넥틴-4 폴리펩티드"를 포함한다. 용어 "넥틴-4"는 또한 "전장", 가공되지 않은 넥틴-4 뿐만 아니라 세포에서의 처리로부터 결과하는 임의의 형태의 넥틴-4를 포괄한다. 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4는, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열을 갖는다. GenBank™ 기탁 번호 NM_030916 (mRNA), NG_028109 (게놈 DNA), 유전자 ID 81607 (유전자), NP_112178 (전구체 아미노산 서열)은, 다른 대표적인 인간 넥틴-4 핵산 또는 아미노산 서열을 제공한다. 대표적인 인간 넥틴-4 아미노산 서열은 아래에 제공된다:

[0057] MPLSLGAEMWGPEAWLLLLLLASFTGRCPAGELETSDVTVVLGQDAKLP

[0058] CFYRGDSGEQVGVAVARVDAGEGAQELALLHSHYGLHVSAPAYEGRVEQPPPPRNPL

[0059] DGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRLVLPPLSLNPGPALEEGQGLTL

[0060] AASCTAEGSPAPSVTWDEVKGTSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVS

[0061] HPGLLDQRITHTLHVSFLAEASVRGLEDQNLWHIGREGAMKCLSEGQPPPSYNWTRL

[0062] DGPLPSGVRVDGDTLGFPLTTEHSGIYVCHVSNEFSSRDSQVTVLDLPQEDSGKQVD

[0063] LVSASVVVGVIAALLFCLLVVVVLMSSRYHRRKAQMQTKYEEELTLTRENSIRRLHS

[0064] HHTDPRSQPEESVGLRAEGHPDSLKDNSSCSVMSEEPGRSYSTLTTVREIETQTELLSPG

[0065] SGRAEEEDQDEGIQAMNHFVQENGLRAKPTGNGIYINGRHLV (SEQ ID NO:1)

[0066] GenBank™ 기탁 번호 NM_030916은, 하나의 대표적인 인간 넥틴-4 핵산 서열을 제공한다:

[0067] atgccctgtccctgggagccgagatgtggggcctgaggcctggctgctgctgctactgctggcatcatttacaggc

[0068] cgggtgccccgcgggtgagctggagacctcagacgtggttaactgtggtgctgggccaggacgcaaaactgcctgcttctaccgagggga

[0069] ctccggcgagcaagtggggcaagtggcatgggctcgggtggacgcgggcgaaggcgccaggaactagcgctactgcactccaata

[0070] cgggcttcatgtgagcccggttacgagggccgcgtggagcagccgcgccccacgcaacccctggacggctcagtgtcctgcgc

[0071] aacgcagtgaggcggtgagggcgagtagcagtgccgggtcagcaccttccccgcggcagcttccaggcgggctcgggtccga

[0072] gtgtggtgcctcccctgcctcactgaatcctggtccagcactagaagaggccaggcctgacctggcagcctcctgcacagctgag

[0073] ggagccagccccagcgtgacctgggacacggaggtcaaaggcacaactccagccgttcttcaagcactcccgctctgtgcct

[0074] cacctcagagtccacttggtgcctagccgcagcatgaatgggcagccactgacttgtgtggtgtcccatcctggcctgctccaggacaaa

[0075] ggatcaccacatcctccagtgctccttcttctgtgaggcctctgtgaggggccttgaagaccaaactctgtggcacattggcagagaagga

[0076] gctatgctcaagtgcctgagtgaaggcgagccccctcctcatacaactggacacggctggatgggcctctgccagtgagggtacagtg

[0077] gatggggacactttgggctttccccactgaccactgagcacagcgcatctacgtctgccatgtcagcaatgagttctcctcaagggtattct

[0078] caggtcactgtggatgtcttgacccccaggaagactctgggaagcaggtggacctagtgtcagcctcggtggtggtgggtgtgatcg

- [0079] ccgcactcttgttctgccttctgggtgggtgggtgggtgctcatgtcccgataccatcggcgcaaggcccagcagatgaccagaaatatgag
- [0080] gaggagctgaccctgaccagggagaactccatccggaggctgcatctcccatcacacggaccccaggagccagccggaggagagtgtat
- [0081] gggctgagagccgagggccaccctgatagtctcaaggacaacagtagctgctctgtgatgagtgaagagcccagggccgcagttactc
- [0082] cacgctgaccacgggtgagggagatagaacacagactgaactgctgtctccaggctctgggcgggcccaggaggaggaagatcaggat
- [0083] gaaggcatcaaacaggccatgaaccattttgttcaggagaatgggaccctacgggccaagcccacgggcaatggcatctacatcaatggg
- [0084] cggggacacctggtctga (SEQ ID NO:36)
- [0085] GenBank™ 기탁 번호 AF472510, NM_027893, XM_203738, NM_001122680은, 대표적인 마우스 넥틴-4 핵산 및 아미노산 서열을 제공하고; GenBank™ 기탁 번호 XM_005541220 및 XM_005541223은, 대표적인 원숭이 넥틴-4 핵산 및 아미노산 서열을 제공한다.
- [0086] "관련된 넥틴-4 폴리펩티드"는, 독립 유전자 변이체 (예를 들어, SNP 변이체); 스플라이스 변이체 (splice variants); 단편; 유도체; 치환, 결실, 및 삽입 변이체; 융합 폴리펩티드; 및 넥틴-4 활성을 보유할 수 있는, 중간 상동체를 포함한다. 기술 분야의 당업자가 인지하는 바와 같이, 여기에 제공된 항-넥틴-4 항체는, 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드 단편, 넥틴-4 항원, 및/또는 넥틴-4 에피토프에 결합할 수 있다. "에피토프"는, 더 큰 넥틴-4 항원의 일부일 수 있으며, 이는 더 큰 넥틴-4 폴리펩티드 단편의 일부일 수 있으며, 이는 더 큰 넥틴-4 폴리펩티드의 일부일 수 있다. 넥틴-4는 천연 또는 변성 형태로 존재할 수 있다. 여기에 기재된 넥틴-4 폴리펩티드는, 다양한 공급원, 예컨대, 인간 조직 타입들로부터 또는 또 다른 공급원으로부터, 분리될 수 있거나, 또는 재조합 또는 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 넥틴-4 폴리펩티드에 대한 오르소로그 (Orthologs)는 또한 기술 분야의 당업계에 잘 알려져 있다.
- [0087] "넥틴-4 리간드"는, 넥틴-4에 결합하거나 또는 넥틴-4과 달리 상호작용하는 분자를 지칭한다. 넥틴-4는, 또 다른 넥틴-4 분자와 특이항체 상호작용 및 다른 넥틴 계열 단백질, 예컨대, 넥틴-1, 넥틴-2, 및 넥틴-3과 이호성 상호작용을 가질 수 있다. 넥틴-4는 또한 카데린과 같은 다른 표면 접착 분자 및 프로락틴 수용체와 같은, 다른 세포 표면 수용체와 상호작용할 수 있다. 넥틴-4는, 바이러스 입자 (viral particles) 및 바이러스성 입자에 대한 바이러스성 단백질, 예를 들어, 홍역 바이러스 및 폴리오바이러스와 더욱 상호작용할 수 있다. 따라서, 넥틴-4 리간드는, 넥틴-1, 넥틴-2, 넥틴-3, 또는 넥틴-4 또는 넥틴 계열 단백질 중 어느 하나의 단편을 포함할 수 있다. 넥틴-4 리간드는 또한, 카데린 또는 이의 단편, 또는 프로락틴 수용체 또는 이의 단편과 같은, 다른 세포 표면 수용체의 도메인 또는 전-장 분자를 포함할 수 있다. 넥틴-4 리간드는, 바이러스성 입자, 바이러스성 캡사이드 단백질, 바이러스성 표면 단백질, 및 넥틴-4에 결합할 수 있는 바이러스성 단백질 중 어느 하나의 단편을 더욱 포함할 수 있다. 여기서 기재되거나 또는 기술 분야의 당업자에게 알려진 자연 발생 리간드 외에 넥틴-4 리간드의 비-제한적 예로는, 인공적으로 발생된 리간드, 예를 들어, 넥틴-4에 결합할 수 있는 것들에 대한 펩티드의 라이브러리를 스크리닝 (screening)하여 확인된 리간드를 포함한다.
- [0088] 용어 "넥틴-4 활성", 및 "넥틴 신호전달"은, 예를 들어, 생체 내 또는 시험관 내에서 넥틴-4에 넥틴-4 리간드의 결합에 의해 유도된 생물학적 효과 또는 생물학적 반응을 의미한다. 상기 용어는 또한 넥틴-4 리간드의 기능을 모방할 수 있는 분자에 의해 유도된 유사한 효과 또는 반응을 지칭한다. 이러한 넥틴-4 리간드 모방체 (ligand mimetics)는, 넥틴-4 리간드 결합으로부터 결과하는 다른 생물학적 반응 또는 생물학적 효과를 유도한다.
- [0089] 용어 "결합 단백질"은, 넥틴-4에 결합하는 부분 (예를 들어, CDRs와 같은 하나 이상의 결합 영역) 및, 선택적으로, 결합 부분이 넥틴-4 폴리펩티드, 단편, 또는 에피토프에 대한 결합 단백질의 결합을 촉진시키는 입체구조 (conformation)를 채택하는 것이 가능하게 하는, 스캐폴드 또는 프레임워크 부분 (예를 들어, 하나 이상의 스캐폴드 또는 프레임워크 영역들)을 포함하는 단백질을 지칭한다. 이러한 결합 단백질의 예로는, 항체, 예컨대, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 재조합 항체, 단일쇄 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, IgD 항체, IgE 항체, IgM 항체, IgG1 항체, IgG2 항체, IgG3 항체, 또는 IgG4 항체, 및 이의 단편을 포함한다. 결합 단백질은, 예를 들어, 이식된 CDRs 또는 CDR 유도체를 갖는 대안적인 단백질 스캐폴드 또는 인공 스캐폴드를 포함할 수 있다. 이러한 스캐폴드는, 예를 들어, 생체적합성 중합체를 포함하는, 전체 합성 스캐폴드뿐만 아니라 결합 단백질의 3-차원 구조를 안정화시키기 위해 도입된 돌연변이를 포함하는 항체-유래 스캐폴드를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 53 (1):121-29; and Roque et al., 2004, *Biotechnol. Prog.* 20:639-54, 참조. 부가적으로, 스캐폴드로서 피브로넥틴 성분을 활용하는 항체 모방체에 기초한 스캐폴드

뿐만 아니라, 펩티드 항체 모방체 ("PAMs")는 사용될 수 있다. 본 개시의 맥락에서, 결합 단백질은 넥틴-4에 특이적으로 결합하거나 또는 선택적으로 결합하는 것을 말한다.

[0090] 용어 "항체", "면역글로불린", 또는 "Ig"는, 여기서 상호 교환적으로 사용되고, 더 넓은 의미로 사용되며, 구체적으로, 예를 들어, 아래에 기재된 바와 같은, (전장 또는 온전한 단일클론 항체 포함하는) 개별 항-넥틴-4 단일클론 항체, 폴리에피토프 또는 모노에피토프 특이성을 갖는 항-넥틴-4 항체 조성물, 다클론 (polyclonal) 또는 1가 항체들, 적어도 둘의 온전한 항체로부터 형성된, 다가항체, 단일쇄 항-넥틴-4 항체, 및 항-넥틴-4 항체의 단편을 포함한다. 항체는 인간, 인간화, 키메라 및/또는 친화도 성숙된 항체뿐만 아니라 다른 종, 예를 들어, 마우스 및 토끼, 등등 유래의 항체일 수 있다. 용어 "항체"는, 특이적 분자 항원에 결합할 수 있고, 2의 동일한 쌍의 폴리펩티드 사슬로 구성되는 폴리펩티드의 면역글로불린 부류 내에 B 세포의 폴리펩티드 생성물을 포함하는 것으로 의도되고, 여기서, 각 쌍은 하나의 중쇄 (약 50-70 kDa) 및 하나의 경쇄 (약 25 kDa)를 가지며, 각 쌍의 각 아미노-말단 부분은 약 100 내지 약 130 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함하고, 및 각 쌍의 각 카르복시-말단 부분은 불변 영역을 포함한다. 예를 들어, Antibody Engineering (Borrebæck ed., 2d ed. 1995); and Kuby, Immunology (3d ed. 1997), 참조. 특정 구체 예에서, 특이적 분자 항원은, 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 단편, 또는 넥틴-4 에피토프를 포함하는, 여기에 제공된 항체에 의해 결합될 수 있다. 항체는 또한, 합성 항체, 재조합적으로 생성된 항체, 카라멜화된 항체, 세포내 항체 (intrabodies), 항-유전자형 (항-Id) 항체, 및 단편이 유래된 항체의 결합 활성의 일부 또는 전부를 보유하는 항체 중쇄 또는 경쇄 폴리펩티드의 일부를 지칭하는, 전술한 항체 중 어느 하나의 기능성 단편 (예를 들어, 넥틴-4-결합 단편과 같은 항원-결합 단편)을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 기능성 단편 (예를 들어, 넥틴-4-결합 단편과 같은 항원-결합 단편)의 비-제한적 예로는, 단일-쇄 Fvs (scFv), Fab 단편, F(ab') 단편, F(ab)₂ 단편, F(ab')₂ 단편, 이황화-연결된 Fvs (dsFv), Fd 단편, Fv 단편, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 및 미니바디 (minibody)를 포함한다. 특히, 여기에 제공된 항체는, 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 예를 들어, 넥틴-4 항원에 결합하는 항원-결합 부위 (예를 들어, 항-넥틴-4 항체의 하나 이상의 CDRs)를 함유하는 항원-결합 도메인 또는 분자를 포함한다. 이러한 항체 단편은, 예를 들어, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1989); Mol. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers ed., 1995); Huston et al., 1993, Cell Biophysics 22:189-224; Pluckthun and Skerra, 1989, Meth. Enzymol.178:497-515; and Day, Advanced Immunochimistry (2d ed., 1990)에서 확인될 수 있다. 여기에 제공된 항체는, 면역글로불린 분자의 임의의 부류 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, 및 IgA) 또는 임의의 서브부류 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2)일 수 있다.

[0091] "항원"은 항체가 선택적으로 결합할 수 있는 미리결정된 항원이다. 표적 항원 (target antigen)은, 폴리펩티드, 탄수화물, 핵산, 지질, 합텐 (hapten), 또는 다른 자연 발생 또는 합성 화합물일 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 표적 항원은 폴리펩티드이다.

[0092] 용어 "항원-결합 단편", "항원-결합 도메인", "항원-결합 영역", 및 유사한 용어는, 항원과 상호작용하고, 결합체에 항원에 대한 이의 특이성 및 친화도를 부여하는 아미노산 잔기를 포함하는, 항체의 부분 (예를 들어, CDRs)을 지칭한다.

[0093] 용어 "결합한다" 또는 "결합하는"은, 예를 들어, 복합체 (complex)를 형성하는 것을 포함하는, 분자들 사이에 상호작용을 지칭한다. 상호작용은, 예를 들어, 수소 결합, 이온 결합, 소수성 상호작용, 및/또는 반 데르 발스 상호작용을 포함하는 비-공유 상호작용일 수 있다. 복합체는 또한 공유 또는 비-공유 결합, 상호작용, 또는 힘들에 의해 함께 유지되는 둘 이상의 분자의 결합을 포함할 수 있다. 항체 상에 단일 항원-결합 부위와 표적 분자의 단일 에피토프, 예컨대, 넥틴-4 사이에 총 비-공유 상호작용의 강도는, 그 에피토프에 대한 항체 또는 기능성 단편의 친화도이다. 1가 항원에 대한 항체의 해리 속도 (k_{off}) 대 결합 속도 (k_{on})의 비 (k_{off}/k_{on})는, 해리 상수 K_D 이며, 이는 친화도와 역비례로 관련된다. K_D 값이 낮을수록, 항체의 친화도는 높아진다. K_D 의 값은, 항체 및 항원의 다른 복합체에 대해 변하며, k_{on} 및 k_{off} 모두에 의존한다. 여기에 제공된 항체에 대한 해리 상수 K_D 는, 여기에 제공된 임의의 방법 또는 기술 분야의 당업자에게 널리 알려진 임의의 다른 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 하나의 결합 부위에서의 친화도는, 항체와 항원 사이에 상호작용의 실제 강도를 항상 반영하지 않는다. 다가 넥틴-4와 같은, 다수의 반복 항원 결정기 (repeating antigenic determinants)를 함유하는 복합 항원이, 다수의 결합 부위를 함유하는 항체와 접촉하는 경우, 한 부위에서 항체와 항원의 상호작용은, 제2 부위에서 반응의 가능성을 증가시킬 것이다. 다가 항체와 항원 사이에 이러한 다중 상호작용의 강도는 결합활성 (avidity)으로 불린다. 항체의 결합활성은, 이의개별 결합 부위의 친화도보다 이의 결합 능력의 더 나은 척도일

수 있다. 예를 들어, 높은 결합활성은, 펜타머 IgM 항체 (pentameric IgM antibodies)에서 때때로 발견되는 것과 같은, 낮은 친화도를 보상할 수 있는데, 이는 IgG보다 더 낮은 친화도이지만, 이의 다가로부터 결과하는, IgM의 높은 결합활성을 가질 수 있어, 항원에 효과적으로 결합할 수 있게 한다.

[0094] 용어 "넥틴-4에 특이적으로 결합하는 항체", "넥틴-4 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체", 및 유사한 용어는 또한, 여기서 상호교환적으로 사용되며, 넥틴-4 항원, 또는 단편, 또는 에피토프와 같은, 넥틴-4 폴리펩티드 (예를 들어, 인간 넥틴-4 폴리펩티드, 항원, 또는 에피토프와 같은 인간 넥틴-4의 ECD)에 특이적으로 결합하는 항체를 지칭한다. 넥틴-4 (예를 들어, 인간 넥틴-4의 ECD)에 특이적으로 결합하는 항체는, 세포외 도메인 또는 넥틴-4의 세포외 도메인으로부터 유래된 펩티드에 결합할 수 있다. 넥틴-4 항원 (예를 들어, 인간 넥틴-4의 ECD)에 특이적으로 결합하는 항체는, 관련 항원 (예를 들어, 시노 넥틴-4 (cyno Nectin-4))과 교차-반응성일 수 있다. 어떤 구체 예에서, 넥틴-4 항원에 특이적으로 결합하는 항체는, 넥틴-1, 넥틴-2, 및/또는 넥틴-3와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, 다른 항원과 교차-반응하지 않는다. 넥틴-4 항원에 특이적으로 결합하는 항체는, 예를 들어, 면역분석, Biacore®, 또는 기술 분야의 당업자에게 알려진 다른 기술에 의해 확인될 수 있다.

[0095] "관심의 항원 (예를 들어, 넥틴-4와 같은 표적 항원)을 결합시키는" 항체는, 항원을 발현하는 세포 또는 조직을 표적화하거나 또는 검출하는 작용제로서 항체가 유용하고, 다른 단백질들과 상당한 교차-반응을 하지 않도록, 충분한 친화도로 항원과 결합하는 항체이다. 이러한 구체 예에서, "비-표적" 단백질에 대한 항체의 결합의 정도는, 예를 들어, 형광 활성화 세포 분류기 (FACS) 분석 또는 방사성면역분석법 (RIA)에 의해 결정된 것으로, 이의 특정 표적 단백질에 대한 항체의 결합의 약 10% 미만일 것이다. 표적 분자에 대한 항체의 결합과 관련하여, 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 표적 상에 에피토프에 대한, 용어 "특이적 결합", "특이적으로 결합하는", 또는 "특이적인"은, 비-특이적 상호작용과 다른 측정 가능한 결합을 의미한다. 특이적 결합은, 예를 들어, 일반적으로 결합 활성을 갖지 않는 유사한 구조의 분자인, 대조군 분자의 결합과 비교된 분자의 결합을 결정하여, 측정될 수 있다. 예를 들어, 특이적 결합은, 표적과 유사한 대조군 분자, 예를 들어, 과량의 비-표지된 표적과의 경쟁에 의해 결정될 수 있다. 이러한 경우, 특이적 결합은, 프로브에 표지된 표적의 결합이 과잉의 표지되지 않은 표적에 의해 경쟁적으로 억제되는 경우, 나타난다. 용어 "항-넥틴-4 항체", 또는 "넥틴-4에 결합하는 항체"는, 항체가, 예를 들어, 넥틴-4를 표적화하는 진단제로서, 유용하도록 충분한 친화도로 넥틴-4에 결합할 수 있는 항체를 포함한다. 여기에 사용된 바와 같은 특정 폴리펩티드 또는 특정 폴리펩티드 표적 상에 에피토프에 대해, 용어 "특이적 결합", "특이적으로 결합하는", 또는 "특이적인"은, 분자가 특정 폴리펩티드 또는 임의의 다른 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 에피토프에 실질적인 결합 없는 특정 폴리펩티드 상에 에피토프에 결합하는 경우의 결합을 지칭한다. 넥틴-4에 특이적으로 결합하는 항-넥틴-4 항체는 여기에서 제공된다. 넥틴-1, 넥틴-2, 및/또는 넥틴-3보다 넥틴-4에 특이적으로 결합하는 항-넥틴-4 항체는 또한 여기에서 제공된다.

[0096] 항체는, 방사성면역분석법 (RIA) 및 효소 결합 면역흡착 분석 (ELISAs)과 같은, 실험 기술을 사용하여 결정된 것으로, 임의의 교차-반응성 항원보다 더 높은 친화도로 이것이 넥틴-4 항원에 결합하는 경우, 넥틴-4 항원에 특이적으로 결합한다. 통상적으로, 특이적 또는 선택적 반응은, 배경 신호 또는 잡음의 적어도 2배일 것이고, 배경의 10배를 초과할 수 있다. 예를 들어, 항체 특이성에 관한 논의에 대해 Fundamental Immunology 332-36 (Paul ed., 2d ed. 1989)을 참조. 선택적으로, 항체의 특이성은, 예를 들어, IHC 분석에서 정성적으로 결정될 수 있다. 이러한 IHC 분석에서, 항체가 넥틴-4를 발현하는 세포에 결합하는, 예를 들어, 면역조직화학적으로 염색되지만, 넥틴-4를 발현하지 않는 세포에 실질적으로 결합하지 않는, 예를 들어, 실질적으로 염색되지 않는 경우, 항체는 넥틴-4 항원에 특이적으로 결합하거나, 또는 넥틴-4 항원에 대해 특이성을 갖는다. 예로서, 항체가 면역글로불린 이소타입 (isotype) 대조군으로 보여지는 결합의 수준과 실질적으로 유사한 수준으로 세포에 결합하는, 예를 들어, 면역조직화학적으로 염색되는 경우, 항체는 IHC에서 세포에 실질적으로 결합하지 않는, 예를 들어, 실질적으로 염색되지 않는다.

[0097] 용어 "완전 인간 항체" 또는 "인간 항체"는, 여기에서 상호교환적으로 사용되며, 인간 가변 영역, 및, 예를 들어, 인간 불변 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. 특정 구체 예에서, 용어는 인간 기원의 가변 영역 및 불변 영역을 포함하는 항체를 지칭한다. 어떤 구체 예에서, "완전 인간" 항-넥틴-4 항체는 또한 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하고, 인간 생식계열 면역글로불린 핵산 서열의 자연적으로 발생하는 신체 변이체인 핵산 서열에 의해 인코딩되는 항체를 포괄할 수 있다. 특정 구체 예에서, 여기에 제공된 항-넥틴-4 항체는 완전 인간 항체이다. 용어 "완전 인간 항체"는, Kabat 등에 의해 기재된 인간 생식계열 면역글로불린 서열에 상응하는 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함한다. (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242., 참조). 완전 인간 항체를 생성하는 대표적인 방법은, 예를 들어, 여기에서의 실시예에서 제공되지만, 기술 분야의 알려진 임의의

방법은 사용될 수 있다.

[0098] 문구 "재조합 인간 항체"는, 숙주 세포로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체, 재조합, 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자이식 (transgenic) 및/또는 염색체이식 (transchromosomal)한 동물 (예를 들어, 마우스, 또는 소)로부터 단리된 항체 (예를 들어, Taylor, L. D. et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295, 참조), 또는 다른 DNA 서열에 대한 인간 면역글로불린 유전자 서열의 스플라이싱 (splicing)을 포함하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체와 같은, 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 인간 항체를 포함한다. 이러한 재조합 인간 항체는, 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역들을 가질 수 있다 (Kabat, E. A. et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 참조). 그러나, 어떤 구체 예에서, 이러한 재조합 인간 항체는, 시험관 내 돌연변이유발 (또는, 인간 Ig 서열에 대해 유전자 이식된 동물이 사용되는 경우, 생체 내 체 세포 돌연변이유발)에 적용되고, 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역들의 아미노산 서열은, 인간 생식계열 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 연관되지만, 생체내 인간 항체 생식계열 레퍼토리 (repertoire) 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0099] 항-넥틴-4 항체 (예를 들어, 넥틴-4에 결합하고, 표적 상에 동일한 에피토프 또는 결합 부위와 경쟁하는 항체 및 결합 단백질)의 맥락에서 사용된 경우, 용어 "경쟁"은, 검토 중에 있는 이의 항체 (또는 결합 단편)가 공통 항원 (common antigen) (예를 들어, 넥틴-4 또는 이의 단편)에 대한 기준 분자 (예를 들어, 기준 항체와 같은, 기준 리간드 또는 기준 항원-결합 단백질)의 특정한 결합을 방해하거나 또는 억제하는, 분석에 의해 결정된 바와 같은 경쟁을 의미한다. 수많은 타입의 경쟁적 결합 분석은, 시험 항체가 넥틴-4 (예를 들어, 인간 넥틴-4)에 결합하기 위해 기준 항체와 경쟁하는지를 결정하는데 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 분석의 예로는, 고상 직접 또는 간접 RIA, 고상 직접 또는 간접 효소 면역분석 (EIA), 샌드위치 경쟁 분석 (competition assays) (예를 들어, Stahli et al., 1983, Methods in Enzymology 9:242-53, 참조), 고상 직접 바이오틴-아비딘 EIA (예를 들어, Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137:3614-19, 참조), 고상 직접 표지 분석, 고상 직접 표지 샌드위치 분석 (예를 들어, Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988), 참조), I-125 표지를 사용한 고상 직접 표지 RIA (예를 들어, Morel et al., 1988, Mol. Immunol. 25:7-15, 참조), 및 직접 표지 RIA (Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32:77-82)을 포함한다. 통상적으로, 이러한 분석은, 고체 표면에 결합된 정제된 항원 (예를 들어, 넥틴-4, 예컨대, 인간 넥틴-4), 또는 표지되지 않은 시험 항원-결합 단백질 (예를 들어, 시험 항-넥틴 항체) 또는 표지된 기준 항원-결합 단백질 (예를 들어, 기준 항-넥틴-4 항체)을 함유하는 세포의 사용을 포함한다. 사용될 수 있는 다른 대표적인 경쟁적 결합 분석은, ELISA, FACS, (예를 들어, Humphries et al. Methods Mol Biol. 2009; 522:203-10에 기재된 바와 같은) 세포 접착 분석, 표면 플라즈몬 공명 (SPR), 또는 기술분야의 당업자에게 알려진 다른 경쟁적 결합 분석을 포함한다. 경쟁적 억제는, 시험 항원-결합 단백질의 존재하에 고체 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 결정하여 측정될 수 있다. 일반적으로, 시험 항원-결합 단백질은 과량으로 존재한다. 경쟁 분석 (경쟁 항체)에 의해 확인된 항체는, 기준 항체와 동일한 에피토프에 결합하는 항체 및/또는 항체 입체 장애가 발생하도록 기준 (reference)에 의해 결합된 에피토프에 충분히 근접한 인접 에피토프에 결합하는 항체를 포함한다. 경쟁적 결합을 결정하기 위한 방법에 관한 부가적인 세부사항은, 여기에서 기재되어 있다. 일반적으로, 경쟁 항체 단백질이 과량으로 존재하는 경우, 이것은 기준 항체의 공통 항원에 대한 특이적 결합을 적어도 30%, 예를 들어, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 또는 75% 만큼 억제할 것이다. 몇몇 사례에서, 결합은, 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 억제된다.

[0100] 여기에 사용된 바와 같은, 기타 요법들 (therapies)의 투여의 맥락에서 용어 "조합하여"는, 하나 이상의 요법의 사용을 지칭한다. 용어 "조합하여"의 사용은, 감염된 피험자에게 요법이 투여되는 순서를 제한하지는 않는다. 제1 요법은 넥틴-4-매개 질환을 앓았던, 앓고있거나, 또는 앓을 가능성 있는 피험자에 대한 제2 요법의 투여 전 (예를 들어, 1분, 45분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 또는 12주 전), 동시 또는 후 (예를 들어, 1분, 45분, 30분, 45분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간, 12시간, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 8주, 또는 12주 후)에 투여될 수 있다. 임의의 부가적인 요법은, 다른 부가적인 요법과 함께 임의의 순서로 투여될 수 있다. 어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 하나 이상의 요법 (예를 들어, 넥틴-4-매개 질환을 예방, 치료, 관리, 및/또는 개선하기 위해 현재 투여되는 여기에 제공된 항체가 아닌 요법)과 조합하여 투여될 수 있다. 여기에 제공된 항체와 조합하여 투여될 수 있는 요법의 비-제한적 예로는, 진통제, 마취제, 항생제, 또는

면역조절제 또는 미국 약전 및/또는 의사용 탁상 편람에 열거된 임의의 기타 제제를 포함한다.

[0101]

"단리된" 항체는, 세포 또는 조직 공급원 (source) 유래의 세포질 물질 (cellular material) 또는 기타 오염 단백질 및/또는 항체가 유래된 기타 오염 성분이 실질적으로 없거나, 또는 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 기타 화학물질이 실질적으로 없다. 표현 "세포질 물질이 실질적으로 없다"는, 항체가 단리되거나 또는 재조합적으로 생성되는 세포의 세포질 성분으로부터 항체가 분리된 항체의 조제용 물질 (preparations)를 포함한다. 따라서, 실질적으로 세포질 물질이 없는 항체는, 약 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 1% 미만 (건조 중량 기준)의 이중 단백질 (또한, 여기서 "오염 단백질"이라 한다)을 갖는 항체의 조제용 물질을 포함한다. 어떤 구체 예에서, 항체가 재조합적으로 생성되는 경우, 이것은 실질적으로 배양 배지가 없다, 예를 들어, 배양 배지는 단백질 조제용 물질의 부피의 약 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 1% 미만을 나타낸다. 어떤 구체 예에서, 항체가 화학적 합성에 의해 생성되는 경우, 이것은 화학적 전구체 또는 기타 화학물질이 실질적으로 없다, 예를 들어, 이것은 단백질의 합성에 포함된 화학적 전구체 또는 기타 화학물질로부터 분리된다. 따라서, 항체의 이러한 조제용 물질은, 관심의 항체 이외의 화학적 전구체 또는 화합물의 약 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 또는 1% 미만 (건조 중량 기준)을 갖는다. 오염 성분은 또한 항체의 치료적 용도를 방해하는 물질을 포함할 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니며, 효소, 호르몬, 및 기타 단백질성 또는 비단백질성 용질을 포함할 수 있다. 어떤 구체 예에서, 항체는 (1) 로리 법 (Lowry et al., 1951, J. Bio. Chem. 193:265-75)에 의해 결정된 바와 같이, 항체의 95중량% 초과, 예컨대, 96%, 97%, 98%, 또는 99%로, (2) 스피닝 컵 서열 결정장치 (spinning cup sequencer)를 사용하여 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15의 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마시 블루 (Coomassie blue) 또는 은 염색 (silver stain)을 사용하여 환원 또는 비환원 조건하에서 SDS-PAGE에 의해 동질성 (homogeneity)으로 정제될 것이다. 단리된 항체는, 항체의 자연 환경의 적어도 하나의 성분이 존재하지 않기 때문에, 재조합 세포 내의 제자리에 항체를 포함한다. 그러나, 보통 단리된 항체는, 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다. 특별한 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는 단리된다.

[0102]

4-쇄 항체 유닛은, 2의 동일한 경쇄 (L) 및 2의 동일한 중쇄 (H)로 구성된 이중사량체 당단백질 (heterotetrameric glycoprotein)이다. IgG의 경우, 4-쇄 유닛은 일반적으로 약 150,000 달톤이다. 각각의 L 사슬은, 하나의 공유 이황화 결합에 의해 H 사슬에 연결되는 반면, 2의 H 사슬은, H 사슬 이소타입에 의존하여 하나 이상의 이황화 결합에 의해 서로 연결된다. 각각의 H 및 L 사슬은 또한 규칙적으로 이격된 사슬속에 이황화 브릿지 (disulfide bridges)를 갖는다. 각각의 H 사슬은, N-말단에서, 가변 도메인 (VH)에 이어 각각의 α 및 γ 사슬에 대해 3의 불변 도메인 (CH), 및 μ 및 ϵ 이소타입에 대해 4의 CH 도메인을 갖는다. 각각의 L 사슬은, N-말단에서, 가변 도메인 (VL)에 이어 이의 다른 말단에서 불변 도메인 (CL)을 갖는다. VL은 VH와 정렬되고, CL은 중쇄의 제1 불변 도메인 (CH1)과 정렬된다. 특정 아미노산 잔기는, 경쇄와 중쇄 가변 도메인들 사이에 계면을 형성하는 것으로 믿어진다. VH 및 VL의 쌍은 함께 단일 항원-결합 부위를 형성한다. 다른 부류의 항체의 구조 및 특성에 대해서는, 예를 들어, Basic and Clinical Immunology 71 (Stites et al. eds., 8th ed. 1994)을 참조한다.

[0103]

용어 "가변 영역", "가변 도메인", "V 영역", 또는 "V 도메인"은, 일반적으로 경쇄 또는 중쇄의 아미노-말단에 위치하고, 중쇄에서 약 120 내지 130개 아미노산의 길이 및 경쇄에서 약 100 내지 110개 아미노산 길이를 갖으며, 이의 특정 항원에 대해 각각의 특정 항체의 특이성 및 결합에 사용되는 항체의 경쇄 또는 중쇄의 일부를 지칭한다. 중쇄의 가변 영역은 "VH"로 지칭될 수 있다. 경쇄의 가변 영역은 "VL"로 지칭될 수 있다. 용어 "가변"은, 가변 영역의 특정 세그먼트가 항체 중에 서열에 대해 광범위하게 다르다는 사실을 지칭한다. V 영역은, 항원 결합을 매개하고, 이의 특정 항원에 대한 특정 항체의 특이성을 한정한다. 그러나, 변이성 (variability)은, 가변 영역의 110-아미노산 범위에 걸쳐 고르게 분포되지 않는다. 대신에, V 영역은, 각각 약 9-12 아미노산 길이인 "초가변 영역들"이라 불리는 더 큰 변이성 (예를 들어, 극한 변이성)의 더 짧은 영역에 의해 분리된 약 15-30개 아미노산의 소위 프레임워크 영역들 (FRs)인 덜 가변적인 (예를 들어, 상대적으로 불변성) 구간 (stretches)으로 이루어진다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은, 각각 4의 FRs를 포함하여, 3의 초가변 영역에 의해 연결된, β 시트 형태를 주로 채택하며, 이는 루프 연결을 형성하고, 몇몇 경우에서, β 시트 구조의 일부를 형성한다. 각 사슬에서 초가변 영역들은, FRs에 의해 함께 근접하게 유지되고, 다른 사슬의 초가변 영역과 함께, 항체의 항원-결합 부위의 형성에 기여한다 (예를 들어, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th ed. 1991), 참조). 불변 영역은, 항체를 항원에 결합시키는데 직접 관여하지는 않지만, 항체 의존성 세포 독성 (ADCC) 및 보체 의존성 세포 독성 (CDC)에 항체의 참여와 같은, 다양한 이펙터 기능 (effector functions)을 나타낸다. 가변 영역은 다른 항체들 사이의 서열에 대해 광범위하게 다르다. 특별한 구체 예에서, 가변 영역은 인간 가변 영역이다.

- [0104] 용어 "Kabat에서와 같은 가변 영역 잔기 넘버링 (residue numbering)" 또는 "Kabat에서와 같은 아미노산 위치 넘버링", 및 이들의 변형은, 상기 Kabat et al.에서 항체의 편집 (compilation)의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역에 대해 사용되는 넘버링 시스템 (numbering system)을 지칭한다. 이러한 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은, 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 (shortening), 또는 FR 또는 CDR 내로 삽입에 상응하는 더 적거나 부가적인 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 도메인은, 잔기 52 후에 단일 아미노산 삽입물 (Kabat에 따른 잔기 52a) 및 잔기 82 후에 3의 삽입된 잔기 (예를 들어, Kabat에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 Kabat 넘버링은, 항체의 서열의 상동성 (homology)의 영역에서 "표준" Kabat 넘버링 서열로 정렬시켜 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다. Kabat 넘버링 시스템은, 가변 도메인에서 잔기 (대략 경쇄의 잔기 1-107 및 중쇄의 잔기 1-113)를 지칭하는 경우 일반적으로 사용된다 (예를 들어, 상기 Kabat et al.). "EU 넘버링 시스템" 또는 "EU 인덱스 (EU index)"는, 일반적으로 번역글로불린 중쇄 불변 영역 (예를 들어, 상기 Kabat et al.에 보고된 EU 인덱스)에서 잔기를 지칭하는 경우 사용된다. "Kabat에서와 같은 EU 인덱스"는 인간 IgG 1 EU 항체의 잔기 넘버링을 지칭한다. 기타 넘버링 시스템은, 예를 들어, AbM, Chothia, Contact, IMGT, 및 AHon에 의해 기재되었으며, 기술분야의 당업자에게 잘 이해되어 있다.
- [0105] "온전한" 항체는, 항원-결합 부위뿐만 아니라 CL 및 적어도 중쇄 불변 영역들, CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 항체이다. 불변 영역은, 인간 불변 영역 또는 이의 아미노산 서열 변이체를 포함할 수 있다. 어떤 구체 예에서, 온전한 항체는, 하나 이상의 이펙터 기능을 갖는다.
- [0106] "항체 단편"은, 온전한 항체의 항원-결합 또는 가변 영역과 같은, 온전한 항체의 일부를 포함한다. 항체 단편의 예로는, Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편; 디아바디 및 디-디아바디 (예를 들어, Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. 90:6444-48; Lu et al., 2005, J. Biol. Chem. 280:19665-72; Hudson et al., 2003, Nat. Med. 9:129-34; WO 93/11161; 및 미국 특허 5,837,242 및 6,492,123, 참조); 단일-쇄 항체 분자 (예를 들어, 미국 특허 제4,946,778호; 제5,260,203호; 제5,482,858호; 및 제5,476,786호, 참조); 이중 가변 도메인 항체 (예를 들어, 미국 특허 제7,612,181호, 참조); 단일 가변 도메인 항체 (sdAbs) (예를 들어, Woolven et al., 1999, Immunogenetics 50:98-101; 및 Streltsov et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA. 101:12444-49, 참조); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0107] 치료용 항체의 "기능성 단편", "결합 단편", 또는 "항원-결합 단편"은, 만약 온전한 항체에 기인된 생물학적 기능의 일부 또는 전부가 아니라면, 적어도 하나를 나타내며, 상기 기능은 표적 항원 (예를 들어, 넥틴-4 결합 단편, 또는 넥틴-4에 결합하는 단편)에 적어도 결합을 포함한다.
- [0108] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "융합 단백질"은, 항체의 아미노산 서열 및 이종 폴리펩티드 (heterologous polypeptide) 또는 단백질 (예를 들어, 일반적으로 항체의 일부가 아닌 폴리펩티드 또는 단백질 (예를 들어, 비-항-넥틴-4 항원-결합 항체))의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 넥틴-4 또는 항-넥틴-4 항체와 관련하여 사용된 경우, 용어 "융합"은, 펩티드 또는 폴리펩티드, 또는 이의 단편, 변이체, 및/또는 유도체와, 이종 펩티드 또는 폴리펩티드와의 결합을 지칭한다. 어떤 구체 예에서, 융합 단백질은, 넥틴-4 또는 항-넥틴-4 항체의 생물학적 활성을 유지한다. 어떤 구체 예에서, 융합 단백질은, 넥틴-4 항체 VH 영역, VL 영역, VH CDR (1, 2, 또는 3의 VH CDRs), 및/또는 VL CDR (1, 2 또는 3의 VL CDRs)을 포함하고, 여기서, 융합 단백질은 넥틴-4 에피토프, 넥틴-4 단편, 및/또는 넥틴-4 폴리펩티드에 결합한다.
- [0109] 항체와 관련하여 사용된 경우, 용어 "중쇄"는, 약 50-70 kDa의 폴리펩티드 사슬을 지칭하며, 여기서, 아미노-말단 부분은, 약 120 내지 130 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함하고, 카르복시-말단 부분은 불변 영역을 포함한다. 불변 영역은, 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열에 기초하여, 알파 (α), 델타 (δ), 엡실론 (ϵ), 감마 (γ), 및 뮤 (μ)로 지칭되는 5의 별개의 타입, (예를 들어, 이소타입) 중 하나일 수 있다. 별개의 중쇄는 크기가 다르다: α , δ , 및 γ 는, 대략 450 아미노산을 함유하고, 반면에 μ 및 ϵ 는, 대략 550 아미노산을 함유한다. 경쇄와 조합되는 경우, 이들 별개의 타입의 중쇄는, 각각, IgG의 4개의 서브부류, 즉, IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4를 포함하여, 항체의 5개의 잘 알려진 부류 (예를 들어, 이소타입)인, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM을 발생시킨다. 중쇄는 인간 중쇄일 수 있다.
- [0110] 항체와 관련하여 사용되는 경우, 용어 "경쇄"는 약 25 kDa의 폴리펩티드 사슬을 지칭하며, 여기서, 아미노-말단 부분은 약 100 내지 약 110 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함하고, 카르복시-말단 부분은 불변 영역을 포함한다. 경쇄의 대략적인 길이는, 211 내지 217 아미노산이다. 불변 도메인의 아미노산 서열에 기초하여, 카파 (κ) 또는 람다 (λ)로 지칭되는 2의 별개의 타입이 있다. 경쇄 아미노산 서열은 기술분야의 당업계에 잘 알려져 있다. 경쇄는 인간 경쇄일 수 있다.

- [0111] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "숙주"는, 포유동물 (예를 들어, 인간)과 같은, 동물을 지칭한다.
- [0112] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "숙주 세포"는, 핵산 분자 및 이러한 세포의 후손 (progeny) 또는 잠재적 후손으로 형질감염될 수 있는 특정 피험자 세포를 지칭한다. 이러한 세포의 후손은, 숙주 세포 계통으로 핵산 분자의 통합 또는 후속 세대에서 발생할 수 있는 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 핵산 분자로 형질감염된 모 세포와 동일하지 않을 수 있다.
- [0113] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "단일클론 항체"는, 실질적으로 균질한 항체의 모집단으로부터 얻어진 항체, 예를 들어, 소량으로 존재할 수 있는 가능한 자연적으로 발생하는 돌연변이를 제외하고, 상기 모집단을 포함하는 개별 항체가 동일한 항체를 지칭하고, 각 단일클론 항체는 항원 상에 단일 에피토프를 통상적으로 인지할 것이다. 특별한 구체 예에서, 여기에 사용된 바와 같은, "단일클론 항체"는, 단일 하이브리도마 (hybridoma) 또는 기타 세포에 의해 생성된 항체이며, 여기서, 항체는, 예를 들어, ELISA 또는 기술분야에 알려진 다른 항원-결합 또는 경쟁 결합 분석에 의해 결정된 것으로, 오직 벡틴-4 에피토프에만 결합한다. 용어 "단일클론"은, 항체를 제조하기 위한 임의의 특정 방법에 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 개시에 유용한 단일클론 항체는, Kohler et al., 1975, Nature 256:495에 의해 처음 기재된 하이브리도마 방법론에 의해 제조될 수 있거나, 또는 박테리아 또는 진핵 동물 또는 식물 세포에서 재조합 DNA 방법을 사용하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 제 4,816,567호, 참조). "단일클론 항체"는 또한, 예를 들어, Clackson et al., 1991, Nature 352:624-28 및 Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581-97에 기재된 기술을 사용하여 파지 항체 라이브러리 (phage antibody libraries)로부터 단리될 수 있다. 클론 세포주 및 이에 의해 발현되는 단일클론 항체의 제조를 위한 기타 방법은 기술분야의 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. eds., 5th ed. 2002), 참조. 단일클론 항체를 생성하는 대표적인 방법은, 여기에서의 실시예에 제공된다.
- [0114] 핵산 분자, 폴리펩티드, 숙주 세포, 및 이와 유사한 것과 같은, 생물학적 물질과 관련하여 사용되는 경우, 용어 "천연"은, 자연에서 발견되고, 인간에 의해 조작, 변형, 및/또는 변화 (예를 들어, 단리, 정제, 선택)되지 않은 것을 지칭한다.
- [0115] 여기서 제공된 항체는, 원하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부가 특정 종으로부터 유래되거나 또는 특정 항체 부류 또는 서브부류에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 상동성이지만, 반면에, 사슬(들)의 나머지가 이러한 항체의 단편뿐만 아니라, 또 다른 종으로부터 유래되거나 또는 또 다른 항체 부류 또는 서브부류에 속하는 항체에서 상응하는 서열과 동일하거나 또는 상동성인, "키메라 (chimeric)" 항체를 포함할 수 있다 (미국 특허 4,816,567; 및 Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-55, 참조).
- [0116] "인간화" 형태의 비인간 (예를 들어, 쥐과 (murine)) 항체는, 인간 면역글로불린 (예를 들어, 수용자 항체)을 포함하는 키메라 항체이고, 여기서, 천연 CDR 잔기는, 원하는 특이성, 친화도, 및 역량 (capacity)을 갖는 마우스, 래트, 토끼, 또는 비인간 영장류와 같은, 비인간 종 (예를 들어, 공여자 항체)의 상응하는 CDR 유래의 잔기로 대체된다. 몇몇 사례에서, 인간 면역글로불린의 하나 이상의 FR 영역 잔기는, 상응하는 비인간 잔기로 대체된다. 더군다나, 인간화 항체는, 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 변형은 항체 성능을 더욱 개선하기 위해 수행된다. 인간화 항체 중쇄 또는 경쇄는, 실질적으로 모든 또는 적어도 하나 이상의 가변 영역을 포함할 수 있으며, 여기서, 모든 또는 실질적으로 모든 CDRs은, 비인간 면역글로불린의 것과 상응하고, FRs의 모든 또는 실질적으로 모든 인간 면역글로불린 서열의 것들에 상응한다. 어떤 구체 예에서, 인간화 항체는 면역글로불린 불변 영역 (Fc)의 적어도 일부, 통상적으로 인간 면역글로불린의 것의 적어도 일부를 포함할 것이다. 더욱 자세히, Jones et al., 1986, Nature 321:522-25; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-29; Presta, 1992, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-96; Carter et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-89; 미국 특허: 6,800,738; 6,719,971; 6,639,055; 6,407,213; 및 6,054,297호를 참조.
- [0117] "인간 항체"는, 인간에 의해 생성된 항체의 것에 상응하는 아미노산 서열을 보유하고, 및/또는 여기에 개시된 바와 같은 인간 항체를 제조하는 기술들 중 어느 하나를 사용하여 제조된다. 인간 항체의 이러한 정의는, 비-인간 항원-결합 잔기를 포함하는 인간화 항체를 구체적으로 배제한다. 인간 항체는, 파지-디스플레이 라이브러리 (Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol. 227:381; Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581) 및 효모 디스플레이 라이브러리 (Chao et al., 2006, Nature Protocols 1:755-68)를 포함하는, 기술분야에 알려진 다양한 기술을 사용하여 생산될 수 있다. 또한, 이용가능한 인간 단일클론 항체의 제법은, Cole et al.,

Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 77 (1985); Boerner et al., 1991, J. Immunol. 147 (1):86-95; 및 van Dijk and van de Winkel, 2001, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74에 기재된 방법들이다. 인간 항체는, 항원성 도전 (antigenic challenge)에 대한 반응으로 이러한 항체를 생성하도록 변형되었지만, 이의 내생 유전자좌 (endogenous loci)가 손상된 형질전환 동물, 예를 들어, 마우스에 항원을 투여하여 제조될 수 있다 (예를 들어, Jakobovits, 1995, Curr. Opin. Biotechnol. 6(5):561-66; Brüggemann and Taussing, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8(4):455-58; 및 XENOMOUSE™ technology에 관한 미국 특허 6,075,181 및 6,150,584호, 참조). 또한, 인간 B-세포 하이브리도마 기술을 통해 발생된 인간 항체에 관한, 예를 들어, Li et al., 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3557-62를 참조.

[0118] "CDR"은, 면역글로불린 (Ig 또는 항체) VH β-시트 프레임워크의 비-프레임워크 영역 내에 3의 추가변 영역들 (H1, H2 또는 H3) 중 하나, 또는 항체 VL β-시트 프레임워크의 비-프레임워크 영역 내에 3의 추가변 영역 (L1, L2 또는 L3) 중 하나를 지칭한다. 따라서, CDRs은 프레임워크 영역 서열 내에 산재된 가변 영역 서열이다. CDR 영역들은, 기술분야의 당업자에게 잘 공지되어 있고, 예를 들어, Kabat에 의해 항체 가변 (V) 도메인 내에 가장 초변이성의 영역으로 정의되어 있다 (Kabat et al., 1997, J. Biol. Chem.252:6609-16; Kabat, 1978, Adv. Prot. Chem. 32:1-75). CDR 영역 서열은 또한, 보존된 β-시트 프레임워크의 일부가 아니며, 따라서 다른 입체 형태 (conformations)를 조정할 수 있는 잔기로서 Chothia에 의해 구조적으로 정의되었다 (Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-17). 두 용어는 기술분야에 잘 알려져 있다. CDR 영역 서열은 또한 AbM, Contact, 및 IMGT에 의해 정의되었다. 표준 항체 (canonical antibody) 가변 영역 내에 CDRs의 위치는, 수많은 구조의 비교에 의해 결정된다 (Al-Lazikani et al., 1997, J. Mol. Biol. 273:927-48; Morea et al., 2000, Methods 20:267-79). 추가변 영역 내에 잔기의 수가 다른 항체에서 변하기 때문에, 표준 위치에 대한 부가적인 잔기는, 통상적으로 표준 가변 영역 넘버링 체계 (numbering scheme)에서 잔기 번호 다음에 a, b, c 등과 함께 번호가 매겨진다 (상기 Al-Lazikani et al.). 이러한 명명법은 마찬가지로 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0119] 여기에서 사용된 경우, 용어 "추가변 영역", "HVR", 또는 "HV"는, 서열이 추가변적이고 및/또는 구조적으로 한정된 루프를 형성하는 항체 가변 영역의 영역들을 지칭한다. 일반적으로, 항체는, VH에서 3개 (H1, H2, H3) 및 VL에서 3개 (L1, L2, L3)인, 6의 추가변 영역을 포함한다. 다수의 추가변 영역 서술 (delineations)은 여기에서 사용되고, 포괄된다. Kabat 상보성 결정 영역 (CDRs)은 서열 변이성에 기초하며, 가장 일반적으로 사용된다 (예를 들어, 상기 Kabat et al., 참조). Chothia는 구조적 루프의 위치를 대신 나타낸다 (예를 들어, Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-17, 참조). Kabat 넘버링 조약을 사용하여 번호를 매길 때 Chothia CDR-H1 루프의 말단은, 루프의 길이에 의존하여 H32와 H34 사이에서 변한다 (이것은 Kabat 넘버링 체계가 삽입물을 H35A 및 H35B에 배치시키기 때문인데; 만약 35A 또는 35B가 존재하지 않으면, 루프는 32에서 종료하고; 오직 35A만 존재하면, 루프는 33에서 종료하고; 35A와 35B가 모두 있으면, 루프는 34에서 종료한다). AbM 추가변 영역은, Kabat CDRs와 Chothia 구조적 루프 사이에 절충을 나타내며, Oxford Molecular의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된다 (예를 들어, Antibody Engineering Vol. 2 (Kontermann and Dübels eds., 2d ed. 2010), 참조). "접촉" 추가변 영역은, 이용 가능한 복합 결정 구조의 분석에 기초한다. 각각의 이들 추가변 영역들 또는 CDRs 유래의 잔기는 이하에 언급된다.

[0120] 최근에, 범용 넘버링 시스템인, ImmunoGeneTics (IMGT) Information System® (Lafranc et al., 2003, Dev. Comp. Immunol. 27(1):55-77)은 개발되었고, 널리 채택되고 있다. IMGT는, 면역글로불린 (IG), T-세포 수용체 (TCR), 및 인간 및 다른 척추 동물의 주요 조직적합성 복합체 (MHC)를 전문적으로 다루는 통합 정보 시스템이다. 여기서, CDRs은 아미노산 서열 및 경쇄 또는 중쇄 내에 위치 모두의 측면에서 관련된다. 면역글로불린 가변 도메인의 구조 내에서 CDRs의 "위치"가, 구조적 특색 (structural features)에 따라 가변 도메인 서열을 정렬하는 넘버링 시스템을 사용하여, 종들 사이에서 보존되고, 루프로 불리는 구조에 존재하기 때문에, CDR 및 프레임워크 잔기는 쉽게 확인된다. 이러한 정보는, 한 종 (one species)의 면역글로불린 유래의 CDR 잔기를, 통상적으로, 인간 항체 유래의 수용체 프레임워크로 이식하고 대체하는데 사용될 수 있다. 부가적인 넘버링 시스템 (AHon)은, Honegger and Plückthun, 2001, J. Mol. Biol. 309:657-70에 의해 개발되었다. 예를 들어, Kabat 넘버링을 포함하는, 넘버링 시스템과 IMGT 고유 넘버링 시스템 사이에 대응은, 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있다 (예를 들어, 상기 Kabat; 상기 Chothia 및 Lesk; 상기 Martin; 상기 Lefranc et al., 참조).

	<u>IMGT</u>	<u>Kabat</u>	<u>AbM</u>	<u>Chothia</u>	<u>Contact</u>
V _H CDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
V _H CDR2	56-65	50-65	50-58	53-55	47-58
V _H CDR3	105-117	95-102	95-102	96-101	93-101
V _L CDR1	27-38	24-34	24-34	26-32	30-36
V _L CDR2	56-65	50-56	50-56	50-52	46-55
V _L CDR3	105-117	89-97	89-97	91-96	89-96

[0121]

[0122]

초가변 영역들은, 다음과 같은 "확장된 초가변 영역들": VL에서 24-36 또는 24-34 (L1), 46-56 또는 50-56 (L2), 및 89-97 또는 89-96 (L3), 및 VH에서 26-35 또는 26-35A (H1), 50-65 또는 49-65 (H2), 및 93-102, 94-102, 또는 95-102 (H3)를 포함할 수 있다. 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "HVR" 및 "CDR"은 상호 교환적으로 사용된다.

[0123]

용어 "불변 영역" 또는 "불변 도메인"은, 항원에 대한 항체의 결합에 직접 관여하지 않지만, Fc 수용체와의 상호작용과 같은, 다양한 이펙터 기능을 나타내는, 경쇄 및 중쇄의 카르복시 말단 부분을 지칭한다. 상기 용어는, 항원 결합 부위를 함유하는, 가변 영역인, 면역글로불린의 다른 부분에 비해 더 보존된 아미노산 서열을 갖는 면역글로불린 분자의 일부분을 지칭한다. 불변 영역은, 중쇄의 CH1, CH2, 및 CH3 영역 및 경쇄의 CL 영역을 함유할 수 있다.

[0124]

용어 "프레임워크" 또는 "FR"은, CDRs에 인접한 가변 영역 잔기를 지칭한다. FR 잔기는, 예를 들어, 키메라, 인간화, 인간, 도메인 항체, 디아바디, 선형 항체, 및 이중특이성 항체에 존재한다. FR 잔기는 초가변 영역 잔기 또는 CDR 잔기 이외의 가변 도메인 잔기이다.

[0125]

"친화도 성숙된" 항체는, 이의 하나 이상의 HVRs에서 하나 이상의 변경 (예를 들어, 변화, 첨가, 및/또는 결실을 포함하는, 아미노산 서열 변이)을 갖는 항체로서, 이러한 변형(들)을 보유하지 않는 모 항체와 비교하여, 항원에 대한 항체의 친화도의 개선을 결과한다. 친화도 성숙된 항체는, 표적 항원에 대해 나노몰 (nanomolar) 또는 심지어 피코몰 (picomolar) 친화도를 가질 수 있다. 친화도 성숙된 항체는, 기술분야에 알려진 절차에 의해 생성된다. 검토를 위해, Hudson and Souriau, 2003, Nature Medicine 9:129-34; Hoogenboom, 2005, Nature Biotechnol. 23:1105-16; Quiroz and Sinclair, 2010, Revista Ingenieria Biomedica 4:39-51, 참조.

[0126]

"결합 친화도"는, 일반적으로 분자의 단일 결합 부위 (예를 들어, 항체와 같은 결합 단백질)와 이의 결합 상대자 (예를 들어, 항원) 사이에 비공유 상호작용의 총계의 강도를 지칭한다. 별도의 언급이 없는 한, 여기에서 사용된 바와 같은, "결합 친화도"는, 결합 쌍의 구성원들 (예를 들어, 항체 및 항원) 사이에 1:1 상호작용을 반영하는 고유한 결합 친화도를 지칭한다. 결합 상대자 Y에 대한 결합 분자 X의 친화도는, 일반적으로 해리 상수 (KD)로 나타낼 수 있다. 친화도는, 여기에 기재된 것을 포함하여, 기술분야에 알려진 일반적인 방법에 의해 측정될 수 있다. 저-친화도 항체는, 일반적으로 항원에 느리게 결합하고, 쉽게 분리되는 경향이 있는 반면에, 고-친화도 항체는, 일반적으로 항원에 빠르게 결합하고, 더 긴 결합을 유지하는 경향이 있다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법은 기술분야에 공지되어 있으며, 이들 중 어느 하나는 본 개시의 목적으로 사용될 수 있다. 구체적인 예시적 구체 예는 다음을 포함한다. 하나의 구체 예에서, "K_D" 또는 "K_D 값"은, 기술분야에 알려진 분석법, 예를 들어, 결합 분석법에 의해 측정될 수 있다. K_D는, 예를 들어, 관심 항체의 Fab 버전 및 이의 항원으로 수행된, RIA에서 측정될 수 있다 (Chen et al., 1999, J. Mol Biol 293:865-81). K_D 또는 K_D 값은 또한, Biacore[®], 예를 들어, Biacore[®] TM-2000 또는 Biacore[®] TM-3000을 사용하는 표면 플라즈몬 공명 분석을 사용하거나, 또는 예를 들어, Octet[®] 시스템을 사용하는 생물층 간섭법 (biolayer interferometry)에 의해 측정될 수 있다. "속도" 또는 "결합의 속도 (rate of association)" 또는 "결합 속도" 또는 "k_{on}"은 또한, 예를 들어, Biacore[®] TM-2000 또는 Biacore[®] TM-3000, 또는 Octet[®] QK384 시스템을 사용하여 전술된 동일한 표면 플라즈몬 공명 또는 생물층 간섭법 기술로 결정될 수 있다.

[0127]

문구 "실질적으로 유사한" 또는 "실질적으로 동일한"은, 두 이미지 (예를 들어, 본 개시의 항체와 관련된 하나 및 기준 항체와 연관된 다른 하나)로부터 두 개의 수치 값들 또는 신호들 (예를 들어, IHC 염색 신호) 사이에

상당히 높은 유사성의 정도를 나타내는 것으로, 기술분야의 당업자는, 두 값들 또는 두 이미지들 사이에 차이가 값들 (예를 들어, K_D 값들)에 의해 측정된 생물학적 특징의 맥락 내에서 생물학적 및/또는 통계적 유의성 (significance)이 거의 없거나 또는 없는 것으로 간주할 수 있다. 예를 들어, 두 값들 사이에 차이는, 기준 항체에 대한 값의 함수에 따라, 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 약 10% 미만, 또는 약 5% 미만일 수 있다.

[0128] 여기에 사용된 바와 같은, 문구 "실질적으로 증가된", "실질적으로 감소된", 또는 "실질적으로 다른"은, 두 개의 이미지 (예를 들어, 본 개시의 항체와 연관된 하나 및 기준 항체와 연관된 다른 하나)로부터 두 개의 수치 값들 또는 신호들 (예를 들어, IHC 염색 신호) 사이에 충분히 높은 차이의 정도를 나타내는 것으로, 기술분야의 당업자는, 두 값들 또는 두 이미지들 사이에 차이가 그 값에 의해 측정된 생물학적 특징의 맥락에서 통계적으로 유의한 것으로 간주할 수 있다. 예를 들어, 상기 두 값들 사이에 차이는, 기준 항체에 대한 값의 함수에 따라, 약 10% 초과, 약 20% 초과, 약 30% 초과, 약 40% 초과, 또는 약 50% 초과일 수 있다.

[0129] 항체 "이펙터 기능"은, 항체의 Fc 영역 (예를 들어, 천연 서열 Fc 영역 또는 아미노산 서열 변이체 Fc 영역)에 기인한 생물학적 활성을 지칭하며, 항체 이소타입에 따라 변한다. 항체 이펙터 기능의 예로는: C1q 결합; CDC; Fc 수용체 결합; ADCC; 식균작용 (phagocytosis); 및 B 세포 활성화를 포함한다.

[0130] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "유효량"은, 원하는 결과를 결과하는데 충분한 여기에 제공된 항체 또는 억제학적 조성물의 양을 지칭한다.

[0131] 여기에서 용어 "Fc 영역"은, 예를 들어, 천연 서열 Fc 영역, 재조합 Fc 영역, 및 변이체 Fc 영역을 포함하는, 면역글로불린 중쇄의 C-말단 영역을 한정하는데 사용된다. 면역글로불린 중쇄의 Fc 영역의 경계가 다양할 수 있지만, 인간 IgG 중쇄 Fc 영역은, 종종 위치 Cys226의 아미노산 잔기로부터, 또는 Pro230로부터, 이의 카르복실-말단까지 늘어나는 것으로 한정된다. Fc 영역의 C-말단 리신 (EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 447)은, 예를 들어, 항체의 생성 또는 정제 동안, 또는 항체의 중쇄를 인코딩하는 핵산을 재조합적으로 조작하여 제거될 수 있다. 따라서, 온전한 항체의 조성물은, 모든 K447 잔기가 제거된 항체 모집단, K447 잔기가 제거되지 않은 항체 모집단, 및 K447 잔기가 있거나 또는 없는 항체의 혼합물을 갖는 항체 모집단을 포함할 수 있다.

[0132] "기능적 Fc 영역"은 천연 서열 Fc 영역의 "이펙터 기능"을 보유한다. 대표적인 "이펙터 기능"은, C1q 결합; CDC; Fc 수용체 결합; ADCC; 식균작용; 등을 포함한다. 이러한 이펙터 기능은, 일반적으로 Fc 영역이 결합 영역 또는 결합 도메인 (예를 들어, 항체 가변 영역 또는 도메인)과 조합될 것을 요구하고, 개시된 바와 같은 다양한 분석법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0133] "천연 서열 Fc 영역"은, 인간에 의해 조작, 변형, 및/또는 변화 (예를 들어, 가변 영역 서열과 같은 기타 서열을 포함하거나 또는 조합하여, 단리, 정제, 선택)되지 않고, 자연에서 발견된 Fc 영역의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역들은, 천연 서열 인간 IgG1 Fc 영역 (비-A 및 A 동종형 (allotypes)); 천연 서열 인간 IgG2 Fc 영역; 천연 서열 인간 IgG3 Fc 영역; 및 천연 서열 인간 IgG4 Fc 영역뿐만 아니라 이의 자연 발생 변이체를 포함한다. 예를 들어, 천연 인간 IgG1 Fc 영역 아미노산 서열은 이하 제공된다 (SEQ ID NO:35).

[0134] "변이체 Fc 영역"은, 적어도 하나의 아미노산 변형 (예를 들어, 치환, 첨가, 또는 결실)에 의해 천연 서열 Fc 영역의 것과 다른 아미노산 서열을 포함한다. 어떤 구체 예에서, 변이체 Fc 영역은, 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 치환, 예를 들어, 천연 서열 Fc 영역 또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역에서 약 1 내지 약 10 아미노산 치환, 또는 약 1 내지 약 5 아미노산 치환을 갖는다. 여기에서 변이체 Fc 영역은, 천연 서열 Fc 영역 및/또는 모 폴리펩티드의 Fc 영역과 적어도 약 80% 상동성, 또는 적어도 약 90% 상동성, 예를 들어, 적어도 약 95% 상동성을 가질 수 있다.

[0135] 넥틴-4 또는 항-넥틴-4 항체와 관련하여 사용되는 경우, 용어 "변이체"는, 천연 또는 변형되지 않은 서열과 비교하여, 하나 이상 (예컨대, 예를 들어, 약 1 내지 약 25, 약 1 내지 약 20, 약 1 내지 약 15, 약 1 내지 약 10, 또는 약 1 내지 약 5)의 아미노산 서열 치환, 결실, 및/또는 첨가를 포함하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 지칭할 수 있다. 예를 들어, 넥틴-4 변이체는, 천연 넥틴-4의 아미노산 서열에 하나 이상 (예를 들어, 약 1 내지 약 25, 약 1 내지 약 20, 약 1 내지 약 15, 약 1 내지 약 10, 또는 약 1 내지 약 5)의 변화로부터 결과할 수 있다. 또한, 예로서, 항-넥틴-4 항체의 변이체는, 천연 또는 사전에 변형되지 않은 항-넥틴-4 항체의 아미노산 서열에 하나 이상 (예컨대, 예를 들어, 약 1 내지 약 25, 약 1 내지 약 20, 약 1 내지 약 15, 약 1 내지 약 10, 또는 약 1 내지 약 5)의 변화로부터 결과할 수 있다. 변이체는, 대립 유전자 또는 스플라이스 변이체 (splice

variants)와 같이, 자연적으로 발생하거나, 또는 인공적으로 구성될 수 있다. 폴리펩티드 변이체는, 변이체를 인코딩하는 상응하는 핵산 분자로부터 제조될 수 있다. 특정한 구체 예에서, 넥틴-4 변이체 또는 항-넥틴-4 항체 변이체는, 기준 항체와 비교하여 넥틴-4에 대한 특이적 결합을 적어도 보유한다. 어떤 구체 예에서, 변이체는, 넥틴-4 또는 항-넥틴-4 항체 VH 또는 VL 영역들 또는 서브영역, 예컨대, 하나 이상의 CDRs를 인코딩하는 핵산 분자의 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP) 변이체에 의해 인코딩된다.

[0136] 용어 "백터"는, 핵산 서열을 숙주 세포로 도입하기 위해, 예를 들어, 여기에 기재된 바와 같은 항-넥틴-4 항체를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는, 핵산 서열을 운반하거나 또는 포함하는데 사용되는 물질을 지칭한다. 사용 가능한 백터는, 예를 들어, 발현 백터, 플라스미드, 파지 백터, 바이러스성 백터, 에피솜 (episomes), 및 인공 염색체를 포함하며, 이들은 숙주 세포의 염색체에 안정적으로 통합을 위해 작동 가능한 선택 서열 또는 마커를 포함할 수 있다. 부가적으로, 백터는, 하나 이상의 선택가능한 마커 유전자 및 적절한 발현 제어 서열 (expression control sequences)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 항생제 또는 독소에 대한 내성을 제공하거나, 영양 요구성 결핍을 보완하거나, 또는 배양 배지에 없는 중요한 영양소를 공급하는, 선택가능한 마커 유전자는 포함될 수 있다. 발현 제어 서열은 기술분야에 잘 알려진, 구성적 및 유도성 프로모터, 전사 인핸서, 전사 종결자, 및 이와 유사한 것을 포함할 수 있다. 둘 이상의 핵산 분자가 동시-발현될 때 (예를 들어, 항체 중쇄 및 경쇄 또는 항체 VH 및 VL 모두), 모든 핵산 분자는, 예를 들어, 단일 발현 백터에 또는 개별의 발현 백터 내로 삽입될 수 있다. 단일 백터 발현의 경우, 인코딩 핵산은, 하나의 공통 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결되거나 또는 다른 발현 제어 서열, 예컨대, 하나의 유도성 프로모터 및 하나의 구성적 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 숙주 세포 내로 핵산 분자의 도입은, 기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, mRNA의 중합효소 연쇄 반응 (PCR) 증폭 또는 노던 블롯과 같은 핵산 분석, 유전자 생성물의 발현을 위한 면역블로팅, 또는 도입된 핵산 서열 또는 이의 상응하는 유전자 생성물의 발현을 시험하기 위한 다른 적절한 분석 방법을 포함한다. 기술분야의 당업자는, 핵산 분자가 원하는 생성물 (예를 들어, 여기에 기재된 바와 같은 항-넥틴-4 항체)을 생성하기에 충분한 양으로 발현되는 것으로 이해하며, 발현 수준이 기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 충분한 발현을 얻도록 최적화될 수 있는 것으로 더욱 이해한다.

[0137] 넥틴-4 폴리펩티드 "세포외 도메인" 또는 "ECD"는, 막관통 및 세포질 도메인이 필수적으로 없는 넥틴-4 폴리펩티드의 형태를 지칭한다. 예를 들어, 넥틴-4 폴리펩티드 ECD는, 이러한 막 관통 및/또는 세포질 도메인의 1% 미만을 가질 수 있고, 이러한 도메인의 0.5% 미만을 가질 수 있다.

[0138] 용어 "동일성 (identity)"은, 서열을 정렬하고 비교하여 결정된 것으로, 둘 이상의 폴리펩티드 분자 또는 둘 이상의 핵산 분자의 서열들 사이에 관계를 지칭한다. 기준 폴리펩티드 서열에 대한 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성"은, 서열을 정렬하고, 필요한 경우, 최대 퍼센트 서열 동일성을 달성하기 위해, 및 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않기 위한 갭 (gaps)을 도입 한 후, 기준 폴리펩티드 서열에서 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서 아미노산 잔기의 퍼센트로 정의된다. 퍼센트 아미노산 서열 동일성을 결정을 목적으로 하는 정렬은, 예를 들어, BLAST, BLAST-2, ALIGN, 또는 MEGALIGN (DNASar, Inc.) 소프트웨어와 같은, 공적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 사용하여, 기술분야의 당업자에게 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 기술분야의 당업자는, 비교될 서열의 전체 길이에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 서열 정렬을 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다.

[0139] 아미노산 잔기/위치의 "변형"은, 출발 아미노산 서열과 비교하여 1차 아미노산 서열의 변화를 지칭하며, 여기서, 변화는 상기 아미노산 잔기/위치를 포함하는 서열 변경으로부터 결과한다. 예를 들어, 통상적인 변형은, 잔기를 다른 아미노산으로 치환 (예를 들어, 보존적 또는 비-보존적 치환), 상기 잔기/위치에 인접한 하나 이상 (예를 들어, 일반적으로 5, 4, 또는 3 미만) 아미노산의 삽입, 및/또는 상기 잔기/위치의 결실을 포함한다.

[0140] "에피토프"는, 넥틴-4 폴리펩티드 단편, 넥틴-4-폴리펩티드와 같은, 항원의 표면 상에 국부적 영역과 같은, 단일 항체 분자가 결합하는 항원 분자의 표면 상에 부위로서, 항체의 하나 이상의 항원 결합 영역에 결합할 수 있고, 면역 반응을 유발할 수 있는, 포유류 (예를 들어, 인간)와 같은, 동물에서 항원성 또는 면역원성 활성을 갖는다. 면역원성 활성을 갖는 에피토프는, 동물에서 항체 반응을 유발하는 폴리펩티드의 일부이다. 항원 활성을 갖는 에피토프는, 예를 들어, 면역분석을 포함하는, 기술분야에 잘 알려진 임의의 방법에 의해 결정된 것으로, 항체가 결합하는 폴리펩티드의 일부이다. 항원성 에피토프는 필수적으로 면역원성일 필요는 없다. 에피토프는 종종 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면 그룹으로 이루어지며, 특이적 3차원 구조적 특징 및 특이적 전하 특징을 갖는다. 항체 에피토프는 선형 에피토프 또는 입체구조 에피토프일 수 있다. 선형 에피토프는 단백질에서 연속적인 아미노산의 서열에 의해 형성된다. 입체구조 에피토프는, 단백질 서열에서 불연속

적인 아미노산으로 형성되지만, 단백질의 폴딩 (folding)시 이의 3-차원 구조로 합쳐진다. 유도 에피토프 (Induced epitopes)는, 단백질의 3차원 구조가, 예컨대, 또 다른 단백질 또는 리간드의 활성화 또는 결합 후에, 변경된 형태인 경우 형성된다. 어떤 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프는, 넥틴-4 폴리펩티드의 3-차원 표면 피쳐이다. 다른 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프는 넥틴-4 폴리펩티드의 선형 피쳐이다. 일반적으로, 항원은 몇 가지 또는 많은 다른 에피토프를 가지며, 많은 다른 항체와 반응할 수 있다.

[0141] 2의 항체가 3-차원 공간에서 동일하거나, 중첩되거나, 또는 인접한 에피토프를 인식하는 경우, 항체는 기준 항체의 "에피토프", 기준 항체와 "필수적으로 동일한 에피토프" 또는 "동일한 에피토프"에 결합한다. 3-차원 공간에서 2의 항체가 동일하거나, 중첩되거나, 또는 인접한 에피토프에 결합하는지 여부를 결정하기 위해 가장 널리 사용되고 빠른 방법은, 예를 들어, 표지된 항원 또는 표지된 항체를 사용하는, 다수의 다른 포맷으로 구성될 수 있는, 경쟁 분석이다. 몇몇 분석에서, 항원은 96-웰 플레이트에 고정되거나, 또는 세포 표면에서 발현되고, 표지된 항체의 결합을 차단하는 표지되지 않은 항체의 능력은, 방사성, 형광, 또는 효소 표지를 사용하여 측정된다.

[0142] "에피토프 맵핑 (Epitope mapping)"은 표적 항원 상에 항체의 결합 부위 또는 에피토프를 확인하는 과정이다. "에피토프 비닝 (Epitope binning)"은, 이들이 인식하는 에피토프에 기초하여 항체를 그룹화하는 과정이다. 좀 더 구체적으로, 에피토프 비닝은, 에피토프 인식 특성에 기초하여 항체를 클러스터링하는 단계 및 뚜렷한 결합 특이성을 갖는 항체를 확인하는 단계를 위한 계산 과정 (computational processes)과 조합된 경쟁 분석을 사용하여, 다른 항체의 에피토프 인식 특성을 구별하기 위한 방법 및 시스템을 포함한다.

[0143] 여기서 사용된 "담체들"은, 사용된 투여량 및 농도에서 이에 노출된 세포 또는 포유동물에 무독성인 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제를 포함한다. 종종, 생리학적으로 허용가능한 담체는 수성의 pH 완충 용액이다. 생리학적으로 허용가능한 담체의 예로는, 인산염, 구연산염, 및 기타 유기산과 같은, 완충제; 아스코르브산을 포함하는, 항산화제; 저분자량 (예를 들어, 약 10 미만의 아미노산 잔기) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은, 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌, 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스, 또는 덱스트린을 포함하는, 당당류, 이당류, 및 기타 탄수화물; EDTA와 같은, 킬레이트제 (chelating agents); 만니톨 또는 솔비톨과 같은, 당알코올; 나트륨과 같은, 염-형성 반대이온; 및/또는 TWEEN™, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 및 PLURONICS™과 같은, 비이온성 계면활성제를 포함한다. 용어 "담체"는 또한 희석제, 보조제 (예를 들어, Freund의 보조제 (완전 또는 불완전)), 부형제, 또는 비히클 (vehicle)을 지칭할 수 있다. 약제학적 담체를 포함하는, 이러한 담체는, 석유, 동물, 채소, 또는 합성 기원의 물 및 오일, 예컨대, 땅콩 오일, 대두유, 미네랄 오일, 참기름, 및 이와 유사한 것의 물 및 오일을 포함하는, 멸균 액체 (sterile liquids)일 수 있다. 물은 조성물 (예를 들어, 약제학적 조성물)이 정맥내에 투여될 때 대표적인 담체이다. 식염수 용액 및 수성의 텍스트로스 및 글리세롤 용액은 또한, 특히, 주사 가능한 용액을 위한 액체 담체로서 사용될 수 있다. 적절한 부형제 (예를 들어, 약제학적 부형제)는, 전분, 글루코오스, 락토오스, 슈크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크 (chalk), 실리카겔, 스테아르산 나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올, 및 이와 유사한 것을 포함한다. 필요한 경우, 조성물은 또한 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 조성물은, 용액, 현탁액, 에멀전, 정제, 환제, 캡슐제, 분말, 서방성 제형 (sustained-release formulations), 및 이와 유사한 것의 형태를 취할 수 있다. 제형을 포함하는, 경구 조성물은, 약제학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산 마그네슘, 소듐 사카린, 셀룰로스, 탄산 마그네슘, 등과 같은 표준 담체를 포함할 수 있다. 적절한 약제학적 담체의 예로는, Remington and Gennaro, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed. 1990)에 기재되어 있다. 약제학적 화합물을 포함하는, 조성물은, 예를 들어, 단리되거나 또는 정제된 형태로, 항-넥틴-4 항체를, 적절한 양의 담체와 함께 함유할 수 있다.

[0144] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "약제학적으로 허용가능한"은, 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나, 미국 약전, 유럽 약전, 또는 동물에, 좀 더 구체적으로는 인간에 사용하기 위해 일반적으로 인정되는 기타 약전에 열거된 것을 의미한다.

[0145] 여기서 사용된 "다클론 항체"는, 많은 에피토프를 갖는 단백질에 대한 면역원성 반응에서 발생된 항체 모 집단을 지칭하며, 따라서, 단백질 내에 동일하거나 또는 다른 에피토프로 향하는 다양한 다른 항체를 포함한다. 다클론 항체를 생성하는 방법은, 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al. eds., 5th ed. 2002), 참조).

[0146] "단리된 핵산"은, 천연 서열을 자연스럽게 수반하는, 리보솜 및 폴리머라제와 같은 단백질 또는 복합체뿐만 아

나라 다른 게놈 DNA 서열로부터 분리되는, 핵산, 예를 들어, RNA, DNA 또는 혼합 핵산이다. "단리된" 핵산 분자는, 핵산 분자의 천연 공급원에 존재하는 다른 핵산 분자로부터 분리된 것이다. 게다가, cDNA 분자와 같은, "단리된" 핵산 분자는, 재조합 기술에 의해 생성될 때, 배양 배지 또는 다른 세포질 물질이 실질적으로 없거나, 또는 화학적으로 합성될 때, 화학 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다. 특별한 구체 예에서, 여기에 기재된 바와 같은 항체를 인코딩하는 하나 이상의 핵산 분자는 단리되거나 또는 정제된다. 상기 용어는 자연 발생 환경으로부터 제거된 핵산 서열을 포함하며, 재조합 또는 클로닝된 DNA 단리물 (isolates) 및 이중 시스템에 의해 생물학적으로 합성된 유사체 (analogues) 또는 화학적으로 합성된 유사체를 포함한다. 실질적으로 순수한 분자는, 단리된 형태의 분자를 포함할 수 있다.

[0147] 여기서 상호 교환적으로 사용되는 바와 같은, "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은, 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭하며, DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는, 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 이들의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 폴리머라제에 의해 또는 합성 반응에 의해 중합체로 통합될 수 있는 임의의 기질 (substrate)일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는, 메틸화된 뉴클레오티드 및 이들의 유사체와 같은, 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 여기에 사용된 바와 같은, "올리고뉴클레오티드"는, 반드시 아니지만, 일반적으로, 길이가 약 200 미만의 뉴클레오티드인, 짧은, 일반적으로 단일-가닥, 합성 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "폴리뉴클레오티드"는 상호 배타적이지 않다. 폴리뉴클레오티드에 대한 위의 설명은, 올리고뉴클레오티드에 동일하고 완전하게 적용 가능하다. 본 개시의 항-벡틴-4 항체를 생성하는 세포는, 모 하이브리도마 세포뿐만 아니라, 항체를 인코딩하는 핵산이 도입된 박테리아 및 진핵 숙주 세포를 포함할 수 있다. 적절한 숙주 세포는 이하 개시된다.

[0148] 별도의 언급이 없는 한, 여기에 개시된 임의의 단일-가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌-측 말단은 5' 말단이고; 이중-가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌-측 방향은 5' 방향으로 지칭된다. 초기 RNA 전사체의 5' 내지 3' 첨가의 방향은, 전사 방향으로 지칭되고; RNA 전사체의 5' 내지 5' 말단인 RNA 전사체와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥 상에 서열 영역들은, "업스트림 서열"로 지칭되며; RNA 전사체의 3' 내지 3' 말단인 RNA 전사체와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥 상에 서열 영역들은 "다운스트림 서열"로 지칭된다.

[0149] 용어 "재조합 항체"는, 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성, 또는 단리된 항체를 지칭한다. 재조합 항체는, 숙주 세포 내로 형질감염된 재조합 발현 벡터, 재조합, 조합 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 인간 면역글로불린 유전자에 대해 유전자 변형 및/또는 트랜스염색체 (transchromosomal)인 동물 (예를 들어, 마우스 또는 소)로부터 단리된 항체 (예를 들어, Taylor et al., 1992, Nucl. Acids Res. 20:6287-95, 참조), 또는 면역글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열에 스플라이싱시키는 단계를 포함하는 임의의 수단에 의해 제조, 발현, 생성, 또는 단리된 항체를 사용하여 발현된 항체일 수 있다. 이러한 재조합 항체는, 인간 생식계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 것을 포함하여, 가변 및 불변 영역들을 가질 수 있다 (상기 Kabat et al., 참조). 그러나, 어떤 구체 예에서, 이러한 재조합 항체는, 시험관 내 돌연변이유발 (또는, 인간 Ig 서열에 대해 유전자 이식된 동물이, 생체 내 체세포 돌연변이유발에 사용되는 경우)에 적용될 수 있고, 따라서, 재조합 항체의 VH 및 VL 영역들의 아미노산 서열은, 인간 생식계열 VH 및 VL 서열로부터 유래되고, 이와 관련되어 있지만, 생체 내에서 인간 항체 생식계열 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0150] 용어 "피험자" 및 "환자"는, 상호 교환적으로 사용될 수 있다. 여기에 사용된 바와 같은, 어떤 구체 예에서, 피험자는, 비-영장류 (예를 들어, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트, 등) 또는 영장류 (예를 들어, 원숭이 및 인간)와 같은, 포유동물이다. 특별한 구체 예에서, 피험자는 인간이다. 하나의 구체 예에서, 피험자는, 여기서 제공된 질병 또는 장애로 진단된, 포유동물, 예를 들어, 인간이다. 또 다른 구체 예에서, 피험자는, 여기서 제공된 질병 또는 장애가 발생할 위험이 있는 포유동물, 예를 들어, 인간이다.

[0151] "실질적으로 모두"는, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98% 이상, 적어도 약 99% 이상 또는 약 100%를 지칭한다.

[0152] 용어 "검출가능한 프로브"는, 검출가능한 신호를 제공하는 조성물을 지칭한다. 상기 용어는, 임의의 형광단, 발색단, 방사성 표지, 효소, 항체 또는 항체 단편, 및 이와 유사한 것이, 이의 활성을 통해 검출가능한 신호를 제공하는 것을, 제한없이, 포함한다.

[0153] 용어 "검출가능한 작용제"는, 샘플 또는 피험자에서, 여기에 기재된 바와 같은 항-벡틴-4 항체와 같은, 원하는 분자의 실제 또는 존재를 규명하는데 사용될 수 있는 물질을 지칭한다. 검출가능한 작용제는, 시각화될 수 있는 물질 또는 (예를 들어, 정량화에 의해) 달리 측정 및/또는 결정될 수 있는 물질일 수 있다.

- [0154] 용어 "진단제"는 피험자에게 투여되어 질환, 장애, 또는 질병의 진단을 돕는 물질을 지칭한다. 이러한 물질은 질환 유발 과정의 병소 부위를 밝히고, 정확하게 지적하며, 및/또는 한정하는데 사용될 수 있다. 어떤 구체 예에서, 진단제는, 물질에 접합되거나 또는 단독으로, 피험자에 투여되거나 또는 피험자 유래의 샘플과 접촉되는 경우, 넥틴-4-매개 질환의 진단을 돕는, 여기에 기재된 바와 같은 항-넥틴-4 항체 또는 이의 단편을 포함한다.
- [0155] 핵산 분자와 관련하여 사용되는 경우, 용어 "인코딩 핵산 (encoding nucleic acid)" 또는 이의 문법적 균등물은, 이의 천연 상태의 핵산 분자 또는 mRNA를 생성하기 위해 전사될 수 있는 기술분야의 당업자에게 잘 알려진 방법에 의해 조작되는 경우, 핵산 분자로 지칭되고, 이는 그 다음 폴리펩티드 및/또는 이의 단편으로 번역된다. 안티센스 가닥 (antisense strand)은, 이러한 핵산 분자의 상보체 (complement)이며, 이로부터 인코딩 서열은 추론될 수 있다.
- [0156] 용어 "부형제"는, 희석제, 비히클, 보존제, 결합제, 또는 안정화제로서 보통 사용되는 불활성 물질을 지칭하며, 단백질 (예를 들어, 혈청 알부민, 등), 아미노산 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산, 리신, 아르기닌, 글리신, 히스티딘, 등), 지방산 및 인지질 (예를 들어, 알킬 설페이트, 카프릴레이트 (caprylate), 등), 계면활성제 (예를 들어, SDS, 폴리솔베이트, 비이온성 계면활성제, 등), 당류 (예를 들어, 자당, 말토스, 트레할로스, 등), 및 폴리올 (예를 들어, 만니톨, 솔비톨, 등)을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, Remington and Gennaro, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed. 1990)을 참조하고, 이의 전체적인 내용은 참조로서 여기에 병합된다.
- [0157] 펩티드 또는 폴리펩티드의 맥락에서, 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "단편"은, 전장 미만의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 이러한 단편은, 예를 들어, 아미노 말단에서의 절단, 카르복시 말단에서의 절단, 및/또는 아미노산 서열로부터의 잔기(들)의 내부 결실로부터 발생할 수 있다. 단편은, 예를 들어, 선택적인 RNA 스플라이싱 또는 생체 내 단백질 분해효소 활성으로부터 결과할 수 있다. 어떤 구체 예에서, 넥틴-4 단편, 또는 항-넥틴-4 항체 단편은, 넥틴-4 폴리펩티드 또는 항-넥틴-4 항체의 아미노산 서열의 적어도 5의 인접 아미노산 잔기 (contiguous amino acid residues), 적어도 10의 인접 아미노산 잔기, 적어도 15의 인접 아미노산 잔기, 적어도 20의 인접 아미노산 잔기, 적어도 25의 인접 아미노산 잔기, 적어도 30의 인접 아미노산 잔기, 적어도 40의 인접 아미노산 잔기, 적어도 50의 인접 아미노산 잔기, 적어도 60의 인접 아미노산 잔기, 적어도 70의 인접 아미노산 잔기, 적어도 80의 인접 아미노산 잔기, 적어도 90의 인접 아미노산 잔기, 적어도 100의 인접 아미노산 잔기, 적어도 125의 인접 아미노산 잔기, 적어도 150의 인접 아미노산 잔기, 적어도 175의 인접 아미노산 잔기, 적어도 200의 인접 아미노산 잔기, 적어도 225개, 적어도 250개, 적어도 275개, 적어도 300개, 적어도 325개, 적어도 350개, 적어도 375개, 적어도 400개, 적어도 425개, 적어도 450개, 적어도 475개, 적어도 500개, 적어도 525개 또는 적어도 550의 인접 아미노산 잔기의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 포함한다. 특별한 구체 예에서, 넥틴-4 폴리펩티드 또는 항-넥틴-4 항체의 단편은, 폴리펩티드 또는 항체의 적어도 1, 적어도 2, 적어도 3 이상의 기능을 보유한다.
- [0158] 용어 "약" 및 "대략"은, 주어진 값 또는 범위의 20% 이내, 15% 이내, 10% 이내, 9% 이내, 8% 이내, 7% 이내, 6% 이내, 5% 이내, 4% 이내, 3% 이내, 2% 이내, 1% 이내 또는 그 이하를 의미한다.
- [0159] "투여하다" 또는 "투여"는, 체외에 존재하는 물질 (예를 들어, 여기에 기재된 바와 같은 항-넥틴-4 항체)을, 예컨대, 점막, 피부 내 (intradermal), 정맥 내, 근육 내 전달, 및/또는 여기에 기재되거나 기술분야에 알려진 임의의 다른 물리적 전달 방법에 의해, 환자에게 주사 또는 별도의 물리적 전달의 행위를 지칭한다.
- [0160] 폴리펩티드의 맥락에서, 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "유사체"는, 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드의 단편, 또는 항-넥틴-4 항체와 유사하거나 또는 동일한 기능을 보유하지만, 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드의 단편, 또는 항-넥틴-4 항체의 유사하거나 또는 동일한 아미노산 서열을 필수적으로 포함하지 않거나, 또는 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드의 단편, 또는 항-넥틴-4 항체의 유사하거나 또는 동일한 구조를 보유하는, 폴리펩티드를 지칭한다. 유사한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드는, 다음 중 적어도 하나를 만족시키는 폴리펩티드를 지칭한다: (a) 여기에 기재된 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드, 또는 항-넥틴-4 항체의 아미노산 서열과 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 적어도 5 아미노산 잔기, 적어도 10 아미노산 잔기, 적어도 15 아미노산 잔기, 적어도 20 아미노산 잔기, 적어도 25 아미노산 잔기, 적어도 30 아미노산 잔기, 적어도 40 아미노산 잔기, 적어도 50 아미노산 잔기, 적어도 60 amino residues, 적어도 70 아미노산 잔기, 적어도 80 아미노산 잔기, 적어도 90 아미노산 잔기, 적어도 100 아미노산 잔기, 적어도 125 아미노산 잔기, 또는 적어도 150 아미노산 잔기

(see, e.g., Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2001); 및 Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)); (b) 여기에 기재된 벡틴-4 폴리펩티드, 벡틴-4 폴리펩티드의 단편, 또는 항-벡틴-4 항체 (또는 이의 VH 또는 VL 영역)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 적어도 5 아미노산 잔기, 적어도 10 아미노산 잔기, 적어도 15 아미노산 잔기, 적어도 20 아미노산 잔기, 적어도 25 아미노산 잔기, 적어도 30 아미노산 잔기, 적어도 40 아미노산 잔기, 적어도 50 아미노산 잔기, 적어도 60 아미노산 잔기, 적어도 70 아미노산 잔기, 적어도 80 아미노산 잔기, 적어도 90 아미노산 잔기, 적어도 100 아미노산 잔기, 적어도 125 아미노산 잔기, 또는 적어도 150 아미노산 잔기를 엄격한 조건하에서 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 폴리펩티드 (예를 들어, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2001); 및 Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982), 참조); 또는 (c) 여기에 기재된 벡틴-4 폴리펩티드, 벡틴-4 폴리펩티드의 단편, 또는 항-벡틴-4 항체 (또는 이의 VH 또는 VL 영역)를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열과 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 폴리펩티드. 여기에 기재된 벡틴-4 폴리펩티드, 벡틴-4 폴리펩티드의 단편, 또는 항-벡틴-4 항체와 유사한 구조를 갖는 폴리펩티드는, 여기에 기재된 벡틴-4 폴리펩티드, 벡틴-4 폴리펩티드의 단편, 또는 항-벡틴-4 항체의 유사 2차, 3차, 또는 4차 구조를 갖는 폴리펩티드를 지칭한다. 폴리펩티드의 구조는, X-선 결정학, 핵 자기 공명, 및 결정학적 전자 현미경을 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 기술분야의 당업자에게 알려진 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0161] 폴리펩티드의 맥락에서, 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "유도체"는, 벡틴-4 폴리펩티드, 벡틴-4 폴리펩티드의 단편, 또는 아미노산 잔기 치환, 결실, 또는 첨가의 도입에 의해 변경된 벡틴-4 폴리펩티드에 결합하는 항체의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "유도체"는 또한, 벡틴-4 폴리펩티드, 벡틴-4 폴리펩티드의 단편, 또는 예를 들어, 폴리펩티드에 대한 임의의 타입의 분자의 공유 부착에 의해, 화학적으로 변형된 벡틴-4 폴리펩티드에 결합한 항체를 지칭한다. 예를 들어, 벡틴-4 폴리펩티드, 벡틴-4 폴리펩티드의 단편, 또는 항-벡틴-4 항체는, 예를 들어, 글리코실화, 아세틸화, 페길화, 인산화, 아마이드화, 알려진 보호/차단기들 (protecting/blocking groups)에 의한 유도체화, 단백질분해 절단, 화학적 절단, 제형, 튜니카마이신 (tunicamycin)의 대사 합성, 세포 리간드 또는 기타 단백질과 연결, 등에 의해, 화학적으로 변형될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 유도체는, 부착된 분자의 타입 또는 위치에서, 자연 발생하거나 또는 출발 펩티드 또는 폴리펩티드와 다른 방식으로 변형된다. 유도체는, 펩티드 또는 폴리펩티드에 자연적으로 존재하는 하나 이상의 화학기 (chemical groups)의 결실을 더욱 포함한다. 더욱이, 벡틴-4 폴리펩티드, 벡틴-4 폴리펩티드의 단편, 또는 항-벡틴-4 항체의 유도체는, 하나 이상의 비-고전적 아미노산 (non-classical amino acids)을 함유할 수 있다. 폴리펩티드 유도체는, 여기에 기재된 벡틴-4 폴리펩티드, 벡틴-4 폴리펩티드의 단편, 또는 항-벡틴-4 항체와 유사하거나 또는 동일한 기능을 보유한다.

[0162] 용어 "조성물"은, 선택적으로, 명시된 양으로 명시된 성분 (예를 들어, 여기에 제공된 항체)을 함유하는 생성물을 포괄하는 것으로 의도된다.

[0163] 사용된 바와 같은, 용어, "예방하다", "예방하는" 및 "예방"은, 여기서 제공된 요법 또는 요법의 조합 (예를 들어, 여기서 제공된 항체와 같은, 예방제 또는 치료제의 조합)의 투여로부터 결과하는, 벡틴-4-매개 질환 및/또는 이와 연관된 증상의 발달, 재발, 발병, 또는 확산을 완전히 또는 부분 억제하는 것을 지칭한다.

[0164] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "예방제 (prophylactic agent)"는, 피험자에서 벡틴-4-매개 질환 및/또는 이와 연관된 증상의 발달, 재발, 발병, 또는 확산을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 작용제를 지칭한다. 어떤 구체 예에서, 용어 "예방제"는 여기에 제공된 항체를 지칭한다. 어떤 다른 구체 예에서, 용어 "예방제"는, 여기에 제공된 항체 이외의 작용제를 지칭한다. 몇몇 구체 예에서, 예방제는, 벡틴-4-매개 질환 및/또는 이와 연관된 증상을 예방하는데 유용한 것으로 알려지거나, 사용되었거나, 현재 사용되거나, 또는 벡틴-4-매개 질환 및/또는 이와 연관된 증상의 발병, 발달, 진행, 및/또는 중증도를 지연시키는 작용제이다. 특별한 구체 예에서, 예방제는, 전적으로 인간 항-벡틴-4 항체, 예컨대, 전적으로 인간 항-벡틴-4 단일클론 항체이다.

[0165] 어떤 구체 예에서, "예방적으로 효과적인 혈청 역가 (serum titer)"는, 피험자에서 벡틴-4-매개 질환 및/또는 이와 관련된 증상의 발달, 재발, 발병, 또는 확산을 완전히 또는 부분적으로 억제하는, 인간과 같은, 피험자에서의 혈청 역가이다.

[0166] "벡틴-4-매개 질환" 및 "벡틴-4-매개 장애"는, 여기에서 상호 교환적으로 사용되며, 벡틴-4에 의해 완전히 또는 부분적으로 야기되거나, 벡틴-4의 결과, 또는 벡틴-4와 관련되는, 임의의 질병을 지칭한다. 어떤 구체 예에서,

넥틴-4는, 세포의 표면에서 비정상적으로 (예를 들어, 고도로) 발현된다. 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4는, 특정 세포 타입에서 비정상적으로 상향조절될 (upregulated) 수 있다. 다른 구체 예에서, 정상, 이상, 또는 과도한 세포 신호전달은, 넥틴-4 리간드에 넥틴-4의 결합에 의해 유발된다. 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4-매개 질환은, 넥틴-4가 피험자, 예를 들어, 인간에서 바이오마커로서 사용될 수 있는 질환이다. 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4-매개 질환은, 넥틴-4 발현이 피험자, 예를 들어, 인간에서 질환 진행 또는 예후를 반영할 수 있는 질환이다. 어떤 구체 예에서, 넥틴-4 리간드는, 예를 들어, 세포의 표면에서 발현되는 넥틴-4 수용체이다.

[0167] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "혈청 역가"는, 적어도 10, 적어도 20, 적어도 30 또는 적어도 40 피험자의 모집단에서 약 100, 1000 또는 그 이상까지의 평균 혈청 역가를 지칭한다.

[0168] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "부작용"은, 요법 (예를 들어, 예방제 또는 치료제)의 원하지 않는 역효과를 포함한다. 원하지 않는 효과는, 반드시 부정적인 것은 아니다. 요법 (예를 들어, 예방제 또는 치료제) 유래의 역효과는, 유해하거나 또는 불편하거나 또는 위험할 수 있다. 부작용의 예로는, 설사, 기침, 위장염, 천명, 메스꺼움, 구토, 거식증, 복부 경련, 열, 통증, 체중 감량, 탈수, 원형탈모증, 호흡곤란, 불면증, 현기증, 점막염, 신경 및 근육 효과, 피로, 구강 건조 및 식욕 부진, 투여 부위의 발진 또는 부기, 열, 오한 및 피로와 같은 독감 유사 증상, 소화관 문제 및 알레르기 반응을 포함한다. 환자들에 의해 경험되는 부가적인 원하지 않는 효과는, 기술 분야에 매우 많이 알려져 있다. 많은 것들은, Physician's Desk Reference (60th ed., 2006)에 개시되어 있다.

[0169] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "치료제"는, 넥틴-4-매개 질환 및/또는 이에 연관된 증상의 치료, 관리 또는 개선에 사용될 수 있는 임의의 작용제를 지칭한다. 어떤 구체 예에서, 용어 "치료제"는 여기에 제공된 항체를 지칭한다. 어떤 다른 구체 예에서, 용어 "치료제"는, 여기에 제공된 항체 이외의 작용제를 지칭한다. 몇몇 구체 예에서, 치료제는, 넥틴-4-매개 질환 또는 이와 관련된 하나 이상의 증상의 치료, 관리 또는 개선에 유용한 것으로 알려져 있거나, 사용되었거나 또는 현재 사용되는 작용제이다.

[0170] 요법의 조합 (예를 들어, 예방제 또는 치료제의 사용)은, 임의의 둘 이상의 단일 요법의 부가 효과보다 더 효과적이다. 예를 들어, 예방제 및/또는 치료제의 조합의 상승 효과는, 단일 작용제 단독보다 더 효과적이고, 및/또는 넥틴-4-매개 질환이 있는 피험자에게 하나 이상의 작용제의 더 낮은 투여량의 사용 및/또는 상기 작용제의 더 적은 투여 빈도를 가능하게 한다. 더 낮은 투여량의 예방 또는 치료 요법들을 활용하는 능력 및/또는 상기 요법을 투여하는 능력은, 넥틴-4-매개 질환의 예방, 관리, 치료 또는 개선에서 상기 요법의 효능을 감소시키지 않고 피험자에 대한 상기 요법의 투여와 관련된 독성을 덜 빈번하게 감소시킨다. 부가적으로, 상승 효과는, 넥틴-4-매개 질환의 예방, 또는 관리, 치료 또는 개선에서 요법의 개선된 효능을 결과할 수 있다. 마지막으로, 요법의 조합 (예를 들어, 예방제 또는 치료제)의 상승 효과는, 임의의 단일 요법의 사용과 관련된 역효과 또는 원치 않는 부작용을 피하거나 감소시킬 수 있다.

[0171] 어떤 구체 예에서, "치료적으로 유효한 혈청 역가"는, 인간과 같은, 피험자에서 넥틴-4-매개 질환과 관련된 중증도, 지속기간 및/또는 증상을 감소시키는, 상기 피험자에서의 혈청 역가이다.

[0172] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "요법"은, 넥틴-4-매개 질환의 예방, 관리, 치료 및/또는 개선에 사용될 수 있는 임의의 프로토콜, 방법 및/또는 작용제를 지칭한다. 어떤 구체 예에서, 용어 "요법들" 및 "요법"은, 의료진과 같은 기술분야의 당업자에게 알려진 넥틴-4-매개 질환의 예방, 관리, 치료 및/또는 개선에 유용한 생물학적 요법, 지지 요법 (supportive therapy), 및/또는 기타 요법을 지칭한다.

[0173] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은, (하나 이상의 예방제 또는 치료제, 예컨대, 여기에 제공된 항체의 투여를 포함하지만, 이에 제한되지 않는) 하나 이상의 요법의 투여로부터 결과하는 넥틴-4-매개 질환의 진행, 중증도, 및/또는 지속기간의 감소 또는 개선을 지칭한다.

[0174] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "관리하다", "관리하는", 및 "관리"는, 넥틴-4와 관련된 질병의 치료를 결과하지 않는, 피험자가 요법 (예를 들어, 예방제 또는 치료제)으로부터 유도되는 유리한 효과를 지칭한다. 어떤 구체 예에서, 질병 또는 장애의 진행 또는 악화를 방지하기 위해, 피험자는, 여기에 기재된 질병 또는 장애, 이의 하나 이상의 증상을 "관리"하기 위해 하나 이상의 요법 (예를 들어, 여기에 기재된 항체와 같은, 예방제 또는 치료제)을 투여받는다.

[0175] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "예방하다", "예방하는", 및 "예방"은, 여기에 제공된 요법 또는 요법의 조합 (예를 들어, 본 발명의 항체와 같은, 예방제 또는 치료제의 조합)의 투여로부터 결과하는, 넥틴-4-매개 질환 및/또는 이와 연관된 증상의 발달, 재발, 발병 또는 확산의 전체 또는 부분 억제 지칭한다.

- [0176] 여기서 사용된 바와 같은, "투여하는" 또는 "투여"는, 예컨대, 점막, 국소, 피부 내, 비경구, 정맥 내, 피하, 근육 내 전달 및/또는 기술분야에 알려지거나 또는 여기에 기재된 임의의 다른 물리적 전달 방법과 같이, 피험자 또는 환자 (예를 들어, 인간)에게 물질 (예를 들어, 여기에 제공된 항-넥틴-4 항체 또는 이의 항원-결합 단편)을 주사하거나 또는 달리 물리적으로 전달하는 행위를 지칭한다.
- [0177] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은, 주어진 질병, 장애 또는 질환 및/또는 이와 연관된 증상의 중증도 및/또는 지속기간을 감소 및/또는 개선시키기에 충분한 요법 (예를 들어, 여기서 제공된 항체 또는 약제학적 조성물)의 양을 지칭한다. 이들 용어는 또한 주어진 질환의 진전 또는 진행의 감소, 둔화 또는 개선, 주어진 질환의 재발, 발달 또는 발병의 감소, 둔화, 또는 개선, 및/또는 또 다른 요법 (예를 들어, 여기서 제공된 항-넥틴-4 항체 외 요법)의 예방 또는 치료 효과 들)을 개선 또는 향상시키기 위한 필수적인 양을 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 여기서 사용된 바와 같은 "유효량"은 또한 명시된 결과를 달성하기 위해 여기에 기재된 항체의 양을 지칭한다.
- [0178] 넥틴-4 항원에 면역특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 액체 제형의 맥락에서 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "안정성" 및 "안정한"은, 주어진 제각, 제조, 수송 및 저장 조건하에서 열 및 화학적 언폴딩 (unfolding), 응집, 분해 또는 단편화에 대한 제형에서 항체의 저항성을 지칭한다. 여기에 제공된 "안정한" 제형은, 주어진 제각, 제조, 수송 및 저장 조건하에서 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 99.5% 이상의 생물학적 활성을 보유한다. 항체의 안정성은, 기준 항체와 비교하여, 감소된 모세관 겔 전기영동 (rCGE), 나트륨 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 (SDS-PAGE) 및 HPSEC을 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 기술분야의 당업자에게 알려진 방법에 의한 응집, 분해 또는 단편화 정도에 의해 평가될 수 있다. 넥틴-4 항원에 면역특이적으로 결합하는 항체를 포함하는 제형의 전체 안정성은, 예를 들어, 넥틴-4의 특이적 에피토프를 사용하는 ELISA 및 방사선면역분석을 포함하는, 다양한 면역학적 분석에 의해 평가될 수 있다. 몇몇 대표적인 제형에서, 항-넥틴-4 항체는, 2개월, 4개월, 6개월, 8개월, 10개월, 1년, 18개월, 2년, 3년 이상 동안 안정할 수 있다.
- [0179] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "실질적으로 계면활성제가 없는"은, 넥틴-4 항원에 면역특이적으로 결합하는 항체의 제형이, 0.0005% 미만, 0.0003% 미만, 또는 0.0001% 미만의 계면활성제를 함유하는 것을 지칭한다.
- [0180] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "염이 실질적으로 없는"은, 넥틴-4 항원에 면역특이적으로 결합하는 항체의 제형이 0.0005% 미만, 0.0003% 미만, 또는 0.0001% 미만의 무기염을 함유하는 것을 지칭한다.
- [0181] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "무기염"은, 금속 또는 금속처럼 작용하는 기 (group)에 의해 산 수소 (hydrogen atom) 또는 산의 일부 또는 전부로부터 결과하는 탄소를 함유하지 않는 임의의 화합물을 지칭하며, 약제학적 조성물 및 생물학적 물질의 제제에서 탄력성 조정 화합물 (tonicity adjusting compound)로서 종종 사용된다. 가장 일반적인 무기염은, NaCl, KCl, NaH₂PO₄, 등이다.
- [0182] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "계면활성제"는, 양친매성 구조를 갖는 유기 물질을 지칭한다; 즉, 이들은 대립하는 용해성 경향의 군들, 통상적으로, 유-용성 탄화수소 사슬 및 수-용성 이온성 군으로 구성된다. 계면활성제는, 표면-활성 모이어티 (moiety)의 전하에 의존하여 음이온성, 양이온성, 및 비이온성 계면활성제로 분류될 수 있다. 계면활성제는, 종종 다양한 약제학적 조성물 및 생물학적 물질의 제제를 위한 습윤제, 유화제, 가용화제, 및 분산제로서 사용된다.
- [0183] 8. 조성물 및 이의 제조 방법
- [0184] 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드 단편, 또는 넥틴-4 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항체는 여기에서 제공된다. 또한, 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드 단편, 또는 넥틴-4 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항체를 인코딩하는 단리된 핵산은 제공된다. 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드 단편, 또는 넥틴-4 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항체를 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터 및 숙주 세포는 더욱 제공된다. 또한, 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드 단편, 또는 넥틴-4 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항체를 제조하는 방법은 제공된다.
- [0185] 어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 인간 및/또는 시노 넥틴-4에 결합한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 항체는, 인간 넥틴-4에 결합한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 항체는 시노 넥틴-4에 결합한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 항체는, 인간 넥틴-4 및 시노 넥틴-4 모두에 결합한다. 다른 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 설치류 넥틴-4에 결합하지 않는다.
- [0186] 몇몇 구체 예에서, 항-넥틴-4 항체는, 넥틴-4의 세포외 도메인 (ECD)에 결합한다. 어떤 구체 예에서, 항-넥틴-4

항체는, 넥틴-4 리간드 결합 부위와는 다른, 넥틴-4의 ECD에서 에피토프에 결합한다.

- [0187] 여기에 제공된 항-넥틴-4 항체가 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 것을 경쟁적으로 차단하는 항체는 또한 제공된다.
- [0188] 여기에 제공된 항-넥틴-4 항체와 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하기 위해 경쟁하는 항체는 또한 제공된다.
- [0189] 몇몇 구체 예에서, 항-넥틴-4 항체는, 넥틴-4 리간드가 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 것을 차단하지 않는다.
- [0190] 몇몇 구체 예에서, 항-넥틴-4 항체는, 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하기 위해 넥틴-4 리간드와 경쟁하지 않는다.
- [0191] 어떤 구체 예에서, 넥틴-4 리간드의 넥틴-4에 대한 결합은, 항체에 의해 억제되지 않는다.
- [0192] 여기에 제공된 항-넥틴-4 항체는 또한, 예를 들어, 진단제, 검출가능한 작용제 및/또는 작용제에 접합 또는 재조합적으로 융합될 수 있다. 항-넥틴-4 항체를 포함하는 조성물은 더욱 제공된다.
- [0193] 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드 단편, 넥틴-4 펩티드, 또는 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항-넥틴-4 항체의 면역글로불린 중쇄, 경쇄, VH 영역, VL 영역, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3을 인코딩하는 단리된 핵산 분자는 또한 여기에서 제공된다.
- [0194] 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드 단편, 넥틴-4 펩티드, 또는 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항-넥틴-4 항체를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는 벡터 및 숙주 세포는 더욱 제공된다. 또한, 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드 단편, 넥틴-4 펩티드, 또는 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체를 제조하는 방법은 제공된다.
- [0195] 하나의 구체 예에서, 본 개시는, 여기에서 진단제로서 사용될 수 있는 항-넥틴-4 항체를 제공한다. 대표적인 항체는, 다클론, 단일클론, 인간화, 인간, 및 이중접합체 항체뿐만 아니라, 개선된 친화도 또는 기타 특성을 갖는 이의 변이체를 포함한다.
- [0196] 9. 항-넥틴-4 항체
- [0197] 여기에 제공된 항체는, 합성 항체, 단일클론 항체, 재조합적으로 생성된 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 이중특이적 항체, 체내, 단일-쇄 Fvs (scFv), 낙타화 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 이황화-연결된 Fvs (sdFv), 항-유전자형 (항-Id) 항체, 및 상기 중 어느 하나의 에피토프-결합 단편을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0198] 특히, 여기에 제공된 항체는, 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 즉, 넥틴-4 항원에 면역특이적으로 결합하는 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 포함한다. 여기에 제공된 면역글로불린 분자는, 면역글로불린 분자의 임의의 타입 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 서브부류일 수 있다. 특별한 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, IgG1 항체와 같은, IgG 항체이다.
- [0199] 항체의 변이체 및 유도체는, 에피토프에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체 단편을 포함한다. 대표적인 단편은, Fab 단편 (항원-결합 도메인을 함유하고, 이황화 결합에 의해 가교된 중쇄의 일부 및 경쇄를 포함하는 항체 단편); Fab' (힌지 영역을 통한 Fab 및 중쇄의 부가적인 부분을 포함하는 단일 항-결합 도메인을 함유하는 항체 단편); F(ab')₂ (중쇄의 힌지 영역에서 쇠간 이황화 결합에 의해 연결된 2의 Fab' 분자; Fab' 분자는 같거나 다른 에피토프를 향할 수 있음); sFv로도 알려진, 가변 영역 (10-25 아미노산의 사슬에 의해 함께 연결된 항체의 단일 경쇄 및 중쇄의 가변, 항원-결합 결정 영역)을 포함하는 단일-쇄 Fab 사슬; 이황화 결합된 Fv, 또는 dsFv (이황화 결합에 의해 함께 연결된 항체의 단일 경쇄 및 중쇄의 가변, 항원-결합 결정 영역); 낙타화 VH (VH 계면의 몇몇 아미노산이 자연적으로 발생하는 낙타 항체의 중쇄에서 발견되는 항체의 단일 중쇄의 가변, 항원-결합 결정 영역); 디아바디 (제1 sFv의 VH 도메인이 제2 sFv의 VL 도메인과 조립되고, 제1 sFv의 VL 도메인이 제2 sFv의 VH 도메인과 조립될 때 형성된 이량체화된 sFv (dimerized sFv); 디아바디의 2의 항원-결합 영역들은 같거나 다른 에피토프를 향할 수 있음); 및 트리아바디 (디아바디와 유사한 방식으로 형성되지만, 3의 항원-결합 도메인이 단일 복합체에서 생성되는 트리머화된 sFv; 3의 항원 결합 도메인은 같거나 다른 에피토프를 향할 수 있음)를 포함한다. 항체의 유도체는 또한 항체 조합 부위의 하나 이상의 CDR 서열을 포함한다. CDR 서열은, 둘 이상의 CDR 서열이 존재할 때 스캐폴드 상에서 함께 연결될 수 있다. 어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 단일-쇄 Fv ("scFv")를 포함한다. scFv는, 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 항체 단편이며, 여기서, 이들 도메인은 단일 폴리펩티드 사슬에 존재한다. 일반적으로, scFv 폴리펩티드는, scFv가 항원 결합을 위해 원하는 구조를 형성하는 것을 가능하게 하는, VF 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩티드 링커를 더욱 포함한

다. scFvs의 검토를 위해, Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol.113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp.269-315 (1994) 참조한다.

[0200] 여기에 제공된 항체는, 조류 및 포유동물 (예를 들어, 인간, 쥐, 당나귀, 양, 토끼, 염소, 기니피그, 낙타, 말, 또는 닭)을 포함하는 임의의 동물 기원일 수 있다. 어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 인간 또는 인간화된 단일클론 항체이다. 여기서 사용된 바와 같은, "인간" 항체는, 인간 면역글로불린의 아미노산 서열을 갖는 항체를 포함하고, 인간 면역글로불린 라이브러리 또는 인간 유전자 유래의 항체를 발현하는 마우스로부터 단리된 항체를 포함한다.

[0201] 어떤 구체 예에서, 항체는, 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드 단편, 또는 넥틴-4 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 완전 인간 항체와 같은, 완전 인간 항체이다. 이러한 완전 인간 항체는, 원하지 않거나 필요하지 않은 부작용, 예컨대, 피험자에게 투여한 경우, 비-완전한 인간 항체 (예를 들어, 다른 종으로부터 유래된 항-넥틴-4 항체)에 향하는 면역 반응의 발달을 최소화하는데 완전한 마우스 (또는 다른 완전 또는 부분 비-인간 종 항체), 인간화 항체, 또는 키메라 항체보다 유리할 것이다.

[0202] 하나의 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 2의 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 갖는 이중특이적 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있으며, 이들 각각은 넥틴-4 상에 다른 에피토프에 향하게 된다.

[0203] 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 넥틴-4 폴리펩티드의 주어진 에피토프에 대해 단일특이적이며, 다른 에피토프에 면역특이적으로 결합하지 않는다.

[0204] 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드 단편, 넥틴-4 펩티드, 또는 넥틴-4 에피토프를 포함하는, 넥틴-4에 결합하는 항체는 여기에서 제공된다. 하나의 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 인간 넥틴-4에 결합한다. 또 다른 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 시노 넥틴-4에 결합한다. 또 다른 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 인간 넥틴-4 및 시노 넥틴-4에 결합한다. 몇몇 구체 예에서, 항-넥틴-4 항체는, 넥틴-4 리간드가 넥틴-4 폴리펩티드에 결합하는 것을 차단하지 않는다. 다른 구체 예에서, 항-넥틴-4 항체는, 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드 단편, 넥틴-4 펩티드, 또는 넥틴-4 에피토프를 포함하는, 넥틴-4에 결합하는 (예를 들어, 인간 불변 영역을 포함하는) 인간화 항체이다.

[0205] 하나의 구체 예에서, 여기에 제공된 항체를 포함하는 조성물의 항체 및 항체를 사용하는 방법은 M22-321b41.1 항체를 포함한다. 또한, M22-321b41.1 항체를 생성하는 하이브리도마는 여기에서 제공된다. 몇몇 구체 예에서, M22-321b41.1 항체는 M22-321b41.1 하이브리도마 세포주로부터 생성된다. 몇몇 구체 예에서, M22-321b41.1 항체는 쥐파 IgG2a/카파 이소타입을 갖는다.

[0206] M22-321b41.1은, 마우스 기원의 하이브리도마 세포주이다. M22-321b41.1 하이브리도마 세포주는 2017년 6월 13일에 기탁되었다 (ATCC 기탁 번호 PTA-124245).

[0207] 어떤 구체 예에서, 항-넥틴-4 항체는, 표 1에 나타난 아미노산 서열과 같은, 여기에 기재된 쥐파 단일클론 항체의 VH 영역, VL 영역, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3를 포함한다. 따라서, 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편은, 항-넥틴-4 항체 M22-321b41.1 유래의 1개, 2개, 및/또는 3의 중쇄 CDRs 및/또는 1개, 2개 및/또는 3의 경쇄 CDRs를 포함한다.

표 1

[0208] 항체 M22-321b41.1 CDR 서열

	대표적인	Kabat	Chothia	Contact
VL CDR 서열	VL CDR1 RSSKSLHNSGITYLY (SEQ ID NO:7)	RSSKSLHNSGITYLY (SEQ ID NO:7)	RSSKSLHNSGITYLY (SEQ ID NO:7)	ITYLYWY (SEQ ID NO:8)
	VL CDR2 LLIYHMSNLAS (SEQ ID NO:9)	HMSNLAS (SEQ ID NO:10)	HMSNLAS (SEQ ID NO:10)	LLIYHMSNLA (SEQ ID NO:11)
	VL CDR3 AQNLELPFT (SEQ ID NO:12)	AQNLELPFT (SEQ ID NO:12)	AQNLELPFT (SEQ ID NO:12)	AQNLELPF (SEQ ID NO:13)

VH CDR 서열	VH CDR1	GYTFTTYWMQ (SEQ ID NO:14)	TYWMQ (SEQ ID NO:15)	GYTFTTY (SEQ ID NO:16)	TTYWMQ (SEQ ID NO:17)
	VH CDR2	WIGSIYPGDGDTRYTQKFKG (SEQ ID NO:18)	SIYPGDGDTRYTQKFKG (SEQ ID NO:19)	YPGDGD (SEQ ID NO:20)	WIGSIYPGDGDTR (SEQ ID NO:21)
	VH CDR3	AREYYGLDY (SEQ ID NO:22)	EYYGLDY (SEQ ID NO:23)	EYYGLDY (SEQ ID NO:23)	AREYYGLD (SEQ ID NO:24)
VL 서열: DIVMTQAASNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYHMSNLASGVPDRFTSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGYYCAQNLELPF TFGGGTKLETKRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSG (SEQ ID NO:3)					
VH 서열: QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYFTTYWMQWVKQRPQGQLEWIGSIYPGDGDTRYTQKFKGKATLTADKSSSTAYIQLSTLASEDSAVYYCAREYY GLDYWGQGTTLTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITG (SEQ ID NO:4)					

[0209] 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 6의 CDRs, 예를 들어, 표 1에서 확인된 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3을 포함하거나 또는 이루어진다. 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 6개 미만의 CDRs를 포함할 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 항체는, 표 1에서 확인된 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3로 이루어진 군으로부터 선택된 1, 2, 3, 4 또는 5의 CDRs를 포함하거나 또는 이루어진다. 몇몇 구체 예에서, 항체는, 단일클론 항체 M22-321b41.1의 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3으로 이루어진 군으로부터 선택된 1, 2, 3, 4 또는 5의 CDRs를 포함하거나 또는 이루어진다.

[0210] 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 표 1에 열거된 하나 이상의 (예를 들어, 1, 2 또는 3의) VH CDRs를 포함한다. 다른 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 표 1에 열거된 하나 이상의 (예를 들어, 1, 2 또는 3의) VL CDRs를 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 표 1에 열거된 하나 이상의 (예를 들어, 1, 2 또는 3의) VH CDRs 및 표 1에 열거된 하나 이상의 VL CDRs를 포함한다. 따라서, 몇몇 구체 예에서, 항체는, Kabat VH CDR1 (SEQ ID NO:15), Chothia VH CDR1 (SEQ ID NO:16), Contact VH CDR1 (SEQ ID NO:17), 및 대표적인 VH CDR1 (SEQ ID NO:14)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1을 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 항체는, Kabat VH CDR2 (SEQ ID NO:19), Chothia VH CDR2 (SEQ ID NO:20), Contact VH CDR2 (SEQ ID NO:21), 및 대표적인 VH CDR2 (SEQ ID NO:18)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2를 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 항체는, Kabat VH CDR3 (SEQ ID NO:23), Chothia VH CDR3 (SEQ ID NO:23), Contact VH CDR3 (SEQ ID NO:24), 및 대표적인 VH CDR3 (SEQ ID NO:22)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 항체는, 표 1에 나타난 바와 같은 VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 독립적으로 선택된 VH CDR1 및/또는 VH CDR2 및/또는 VH CDR3을 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 항체는, Kabat VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Chothia VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Contact VL CDR1 (SEQ ID NO:8), 및 대표적인 VL CDR1 (SEQ ID NO:7)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 항체는, Kabat VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Chothia VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Contact VL CDR2 (SEQ ID NO:11), 및 대표적인 VL CDR2 (SEQ ID NO:9)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2를 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 항체는, Kabat VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Chothia VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Contact VL CDR3 (SEQ ID NO:13), 및 대표적인 VL CDR3 (SEQ ID NO:12)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 항체는 표 1에 나타난 바와 같은 VL CDR1, VL CDR2, VL CDR3 아미노산 서열 중 어느 하나로부터 독립적으로 선택된 VL CDR1 및/또는 VL CDR2, 및/또는 VL CDR3을 포함한다.

[0211] 어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는: (1) Kabat VH CDR1 (SEQ ID NO:15), Chothia VH CDR1 (SEQ ID NO:16), Contact VH CDR1 (SEQ ID NO:17), 및 대표적인 VH CDR1 (SEQ ID NO:14)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; (2) Kabat VH CDR2 (SEQ ID NO:19), Chothia VH CDR2 (SEQ ID NO:20), Contact VH CDR2 (SEQ ID NO:21), 및 대표적인 VH CDR2 (SEQ ID NO:18)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 및 (3) Kabat VH CDR3 (SEQ ID NO:23), Chothia VH CDR3 (SEQ ID NO:23), Contact VH CDR3 (SEQ ID NO:24), 및 대표적인 VH CDR3 (SEQ ID NO:22)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3를 포함하는 VH 영역; 및 (1) Kabat VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Chothia VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Contact VL CDR1 (SEQ ID NO:8), 및 대표적인 VL CDR1 (SEQ ID NO:7)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; (2) Kabat VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Chothia VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Contact VL CDR2 (SEQ ID NO:11), 및 대표적인 VL CDR2 (SEQ ID NO:9)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL

CDR2; 및 (3) Kabat VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Chothia VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Contact VL CDR3 (SEQ ID NO:13), 및 대표적인 VL CDR3 (SEQ ID NO:12)으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3를 포함하는 VL 영역을 포함한다.

[0212] 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는: (1) VH CDR1 (SEQ ID NO:15), Chothia VH CDR1 (SEQ ID NO:16), Contact VH CDR1 (SEQ ID NO:17), 및 대표적인 VH CDR1 (SEQ ID NO:14)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; (2) Kabat VH CDR2 (SEQ ID NO:19), Chothia VH CDR2 (SEQ ID NO:20), Contact VH CDR2 (SEQ ID NO:21), 및 대표적인 VH CDR2 (SEQ ID NO:18)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 및 (3) Kabat VH CDR3 (SEQ ID NO:23), Chothia VH CDR3 (SEQ ID NO:23), Contact VH CDR3 (SEQ ID NO:24), 및 대표적인 VH CDR3 (SEQ ID NO:22)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3를 포함하는 VH 영역을 포함한다.

[0213] 다른 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는: (1) Kabat VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Chothia VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Contact VL CDR1 (SEQ ID NO:8), 및 대표적인 VL CDR1 (SEQ ID NO:7)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; (2) Kabat VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Chothia VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Contact VL CDR2 (SEQ ID NO:11), 및 대표적인 VL CDR2 (SEQ ID NO:9)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 및 (3) Kabat VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Chothia VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Contact VL CDR3 (SEQ ID NO:13), 및 대표적인 VL CDR3 (SEQ ID NO:12)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3를 포함하는 VL 영역을 포함한다.

[0214] 또한, 표 1에 열거된 하나 이상의 (예를 들어, 1, 2 또는 3의) VH CDRs 및 하나 이상의 (예를 들어, 1, 2 또는 3의) VL CDRs를 포함하는 항체는 여기에서 제공된다. 특히, Kabat VH CDR1 (SEQ ID NO:15), Chothia VH CDR1 (SEQ ID NO:16), Contact VH CDR1 (SEQ ID NO:17), 및 대표적인 VH CDR1 (SEQ ID NO:14)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 및 Kabat VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Chothia VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Contact VL CDR1 (SEQ ID NO:8), 및 대표적인 VL CDR1 (SEQ ID NO:7)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1을 포함하는 항체는 여기에서 제공된다. 하나의 구체 예에서, 항체는, Kabat VH CDR1 (SEQ ID NO:15), Chothia VH CDR1 (SEQ ID NO:16), Contact VH CDR1 (SEQ ID NO:17), 및 대표적인 VH CDR1 (SEQ ID NO:14)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 및 Kabat VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Chothia VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Contact VL CDR2 (SEQ ID NO:11), 및 대표적인 VL CDR2 (SEQ ID NO:9)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2를 포함한다. 다른 구체 예에서, 항체는, Kabat VH CDR1 (SEQ ID NO:15), Chothia VH CDR1 (SEQ ID NO:16), Contact VH CDR1 (SEQ ID NO:17), 및 대표적인 VH CDR1 (SEQ ID NO:14)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; 및 Kabat VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Chothia VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Contact VL CDR3 (SEQ ID NO:13), 및 대표적인 VL CDR3 (SEQ ID NO:12)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 항체는, Kabat VH CDR2 (SEQ ID NO:19), Chothia VH CDR2 (SEQ ID NO:20), Contact VH CDR2 (SEQ ID NO:21), 및 대표적인 VH CDR2 (SEQ ID NO:18)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 및 Kabat VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Chothia VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Contact VL CDR1 (SEQ ID NO:8), 및 대표적인 VL CDR1 (SEQ ID NO:7)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1을 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 항체는, Kabat VH CDR2 (SEQ ID NO:19), Chothia VH CDR2 (SEQ ID NO:20), Contact VH CDR2 (SEQ ID NO:21), 및 대표적인 VH CDR2 (SEQ ID NO:18)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 및 Kabat VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Chothia VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Contact VL CDR2 (SEQ ID NO:11), 및 대표적인 VL CDR2 (SEQ ID NO:9)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 항체는, Kabat VH CDR2 (SEQ ID NO:19), Chothia VH CDR2 (SEQ ID NO:20), Contact VH CDR2 (SEQ ID NO:21), 및 대표적인 VH CDR2 (SEQ ID NO:18)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 및 Kabat VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Chothia VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Contact VL CDR3 (SEQ ID NO:13), 및 대표적인 VL CDR3 (SEQ ID NO:12)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 항체는, Kabat VH CDR3 (SEQ ID NO:23), Chothia VH CDR3 (SEQ ID NO:23), Contact VH CDR3 (SEQ ID NO:24), 및 대표적인 VH CDR3 (SEQ ID NO:22)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3; 및 Kabat VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Chothia VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Contact VL CDR1 (SEQ ID NO:8), 및 대표적인 VL CDR1 (SEQ ID NO:7)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1을 포함한다. 다른 구체 예에서, 항체는, Kabat VH CDR3 (SEQ ID NO:23), Chothia VH CDR3 (SEQ ID NO:23), Contact VH CDR3 (SEQ ID NO:24), 및 대표적인 VH CDR3 (SEQ ID NO:22)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3; 및 Kabat VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Chothia VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Contact VL CDR2 (SEQ ID

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

적인 VH CDR2 (SEQ ID NO:18)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; Kabat VH CDR3 (SEQ ID NO:23), Chothia VH CDR3 (SEQ ID NO:23), Contact VH CDR3 (SEQ ID NO:24), 및 대표적인 VH CDR3 (SEQ ID NO:22)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3; Kabat VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Chothia VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Contact VL CDR1 (SEQ ID NO:8), 및 대표적인 VL CDR1 (SEQ ID NO:7)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; Kabat VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Chothia VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Contact VL CDR2 (SEQ ID NO:11), 및 대표적인 VL CDR2 (SEQ ID NO:9)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 및 Kabat VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Chothia VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Contact VL CDR3 (SEQ ID NO:13), 및 대표적인 VL CDR3 (SEQ ID NO:12)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 항체는, Kabat VH CDR1 (SEQ ID NO:15), Chothia VH CDR1 (SEQ ID NO:16), Contact VH CDR1 (SEQ ID NO:17), 및 대표적인 VH CDR1 (SEQ ID NO:14)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; Kabat VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Chothia VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Contact VL CDR1 (SEQ ID NO:8), 및 대표적인 VL CDR1 (SEQ ID NO:7)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; Kabat VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Chothia VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Contact VL CDR2 (SEQ ID NO:11), 및 대표적인 VL CDR2 (SEQ ID NO:9)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 및 Kabat VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Chothia VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Contact VL CDR3 (SEQ ID NO:13), 및 대표적인 VL CDR3 (SEQ ID NO:12)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 항체는, Kabat VH CDR2 (SEQ ID NO:19), Chothia VH CDR2 (SEQ ID NO:20), Contact VH CDR2 (SEQ ID NO:21), 및 대표적인 VH CDR2 (SEQ ID NO:18)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; Kabat VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Chothia VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Contact VL CDR1 (SEQ ID NO:8), 및 대표적인 VL CDR1 (SEQ ID NO:7)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; Kabat VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Chothia VL CDR2 (SEQ ID NO:10), Contact VL CDR2 (SEQ ID NO:11), 및 대표적인 VL CDR2 (SEQ ID NO:9)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 및 Kabat VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Chothia VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Contact VL CDR3 (SEQ ID NO:13), 및 대표적인 VL CDR3 (SEQ ID NO:12)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함한다. 다른 구체 예에서, 항체는, Kabat VH CDR3 (SEQ ID NO:23), Chothia VH CDR3 (SEQ ID NO:23), Contact VH CDR3 (SEQ ID NO:24), 및 대표적인 VH CDR3 (SEQ ID NO:22)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3; Kabat VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Chothia VL CDR1 (SEQ ID NO:7), Contact VL CDR1 (SEQ ID NO:8), 및 대표적인 VL CDR1 (SEQ ID NO:7)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; 및 Kabat VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Chothia VL CDR3 (SEQ ID NO:12), Contact VL CDR3 (SEQ ID NO:13), 및 대표적인 VL CDR3 (SEQ ID NO:12)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 항체는 표 1에 열거된 VH CDRs 및 VL CDRs의 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0215] 여기에 기재된 프레임워크 영역은, CDR 넘버링 시스템의 경계 (boundaries)에 기초하여 결정된다. 다시 말해서, CDRs이, 예를 들어, Kabat, IMGT, 또는 Chothia에 의해 결정되는 경우, 그 다음 프레임워크 영역은, N-말단으로부터 C-말단으로의 형식으로 가변 영역에서 CDRs를 둘러싼 아미노산 잔기이다: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. 예를 들어, FR1은, 예를 들어, Kabat 넘버링 시스템, IMGT 넘버링 시스템, 또는 Chothia 넘버링 시스템에 의해 정의된 것으로 CDR1 아미노산 잔기에 대한 아미노산 잔기 N-말단으로 정의되고, FR2는, 예를 들어, Kabat 넘버링 시스템, IMGT 넘버링 시스템, 또는 Chothia 넘버링 시스템에 의해 정의된 것으로 CDR1과 CDR2 사이에 아미노산 잔기로 정의되며, FR3는, 예를 들어, Kabat 넘버링 시스템, IMGT 넘버링 시스템, 또는 Chothia 넘버링 시스템에 의해 정의된 것으로 CDR2와 CDR3 사이에 아미노산 잔기로 정의되고, 및 FR4는, 예를 들어, Kabat 넘버링 시스템, IMGT 넘버링 시스템, 또는 Chothia 넘버링 시스템에 의해 정의된 것으로 CDR3 아미노산 잔기에 대한 아미노산 잔기 C-말단으로 정의된다.

[0216] 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편은, 표 2에 나타난 바와 같이, 항체 M22-321b41.1 유래의 1, 2, 3 및/또는 4의 중쇄 FRs 및/또는 1, 2, 3 및/또는 4의 경쇄 FRs를 더욱 포함한다.

표 2

[0217]

M22-321b41.1 VL 및 VH FR 아미노산 서열

항체	FR1	FR2	FR3	FR4
VL	DIVMTQAAFSNPVTLGTSAS ISC (SEQ ID NO:25)	WYLQKPGQSPQLLIY (SEQ ID NO:26)	GVPDRFTSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG VYYC (SEQ ID NO:27)	FGGGTKLETKR (SEQ ID NO:28)
VH	QVQLQQSGAELARPGASVKL SCKASGYTFT (SEQ ID NO:29)	WVKQRPGQGLEWIG (SEQ ID NO:30)	KATLTADKSSSTAYIQLSTLASEDSAVY YCAR (SEQ ID NO:31)	WGQGTTLTVSS (SEQ ID NO:32)

[0218]

어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편은, 표 2에 나타난 바와 같이, 항체 M22-321b41.1의 1, 2, 3 및/또는 4 유래의 중쇄 FRs를 더욱 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 항체 중쇄 FR(들)은 항체 M22-321b41.1로부터 유래한다.

[0219]

몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 단리된 항체 또는 이의 기능성 단편은, 표 2에 나타난 바와 같이, 항체 M22-321b41.1 유래의 1, 2, 3 및/또는 4의 경쇄 FRs를 더욱 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 항체 경쇄 FR(들)은, 항체 M22-321b41.1로부터 유래한다.

[0220]

어떤 구체 예에서, 여기에 기재된 항체의 이의 단편은: (1) SEQ ID NO:29의 아미노산을 갖는 VH FR1; (2) SEQ ID NO:30의 아미노산 서열을 갖는 VH FR2; (3) SEQ ID NO:31의 아미노산 서열을 갖는 VH FR3; 및/또는 (4) SEQ ID NO:32의 아미노산 서열을 갖는 VH FR4를 포함하는 VH 영역을 포함한다. 특별한 구체 예에서, 항체는, 4개의 전-슬된 VH FR1, VH FR2, VH FR3, 및 VH FR4 모두를 포함하는 VH 영역을 포함한다.

[0221]

따라서, 하나의 구체 예에서, 인간화 항체는, SEQ ID NO:29의 아미노산 서열을 갖는 VH FR1을 포함하는 VH 영역을 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 인간화 항체는, SEQ ID NO:30의 아미노산 서열을 갖는 VH FR2를 포함하는 VH 영역을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 인간화 항체는, SEQ ID NO:31의 아미노산 서열을 갖는 VH FR3을 포함하는 VH 영역을 포함한다. 다른 구체 예에서, 인간화 항체는, SEQ ID NO:32의 아미노산 서열을 갖는 VH FR4를 포함하는 VH 영역을 포함한다.

[0222]

몇몇 구체 예에서, VL 영역은: (1) SEQ ID NO:25의 아미노산 서열을 갖는 VL FR1; (2) SEQ ID NO:26의 아미노산 서열을 갖는 VL FR2; (3) SEQ ID NO:27의 아미노산 서열을 갖는 VL FR3; 및/또는 (4) SEQ ID NO:28의 아미노산 서열을 갖는 VL FR4를 포함한다.

[0223]

따라서, 몇몇 구체 예에서, 인간화 항체는, SEQ ID NO:25의 아미노산 서열을 갖는 VL FR1을 포함하는 VL 영역을 포함한다. 어떤 구체 예에서, 인간화 항체는, SEQ ID NO:26의 아미노산 서열을 갖는 VL FR2를 포함하는 VL 영역을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 인간화 항체는, SEQ ID NO:27의 아미노산 서열을 갖는 VL FR3을 포함하는 VL 영역을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 인간화 항체는, SEQ ID NO:28의 아미노산 서열을 갖는 VL FR4를 포함하는 VL 영역을 포함한다.

[0224]

몇몇 구체 예에서, 항체의 이의 단편은, VH 영역 및 VL 영역을 포함하고, 여기서, VH 영역은: (1) SEQ ID NO:29의 아미노산 서열을 갖는 VH FR1; (2) SEQ ID NO:30의 아미노산 서열을 갖는 VH FR2; (3) SEQ ID NO:31의 아미노산 서열을 갖는 VH FR3; 및/또는 (4) SEQ ID NO:32의 아미노산 서열을 갖는 VH FR4를 포함하고; 및 여기서, VL 영역은: (1) SEQ ID NO:25의 아미노산 서열을 갖는 VL FR1; (2) SEQ ID NO:26의 아미노산 서열을 갖는 VL FR2; (3) SEQ ID NO:27의 아미노산 서열을 갖는 VL FR3; 및/또는 (4) SEQ ID NO:28의 아미노산 서열을 갖는 VL FR4를 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 항체는, 4개의 전-슬된 VH FR1, VH FR2, VH FR3 및 VH FR4 모두를 포함하는 VH 영역을 포함한다. 다른 구체 예에서, 항체는 4개의 전-슬된 VL FR1, VL FR2, VL FR3 및 VL FR4 모두를 포함하는 VL 영역을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 항체는 4개의 전-슬된 VH FR1, VH FR2, VH FR3, 및 VH FR4 모두를 포함하는 VH 영역, 및 4개의 전-슬된 VL FR1, VL FR2, VL FR3, 및 VL FR4 모두를 포함하는 VL을 포함한다.

[0225]

또한, 표 2에 열거된 하나 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3 또는 4) VH FRs 및 하나 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3 또는 4) VL FRs를 포함하는 항체는 여기에서 제공된다. 특히, VH FR1 (SEQ ID NO:29), 및 VL FR1 (SEQ ID NO:25)을 포함하는 항체는 여기에서 제공된다. 하나의 구체 예에서, 항체는 VH FR1 (SEQ ID NO:29), 및 VL FR2 (SEQ ID NO:26)를 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 항체는 VH FR1 (SEQ ID NO:29), 및 VL FR3 (SEQ ID NO:27)을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 항체는 VH FR1 (SEQ ID NO:29), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 다른

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

[illegible]

(SEQ ID NO:25), VL FR3 (SEQ ID NO:27), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 다른 구체 예에서, 항체는 VH FR2 (SEQ ID NO:30), VH FR3 (SEQ ID NO:31), VH FR4 (SEQ ID NO:32), VL FR2 (SEQ ID NO:26), VL FR3 (SEQ ID NO:27), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 항체는 VH FR1 (SEQ ID NO:29), VH FR2 (SEQ ID NO:30), VL FR1 (SEQ ID NO:25), VL FR2 (SEQ ID NO:26), VL FR3 (SEQ ID NO:27), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 항체는 VH FR1 (SEQ ID NO:29), VH FR3 (SEQ ID NO:31), VL FR1 (SEQ ID NO:25), VL FR2 (SEQ ID NO:26), VL FR3 (SEQ ID NO:27), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 항체는 VH FR1 (SEQ ID NO:29), VH FR4 (SEQ ID NO:32), VL FR1 (SEQ ID NO:25), VL FR2 (SEQ ID NO:26), VL FR3 (SEQ ID NO:27), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 항체는 VH FR2 (SEQ ID NO:30), VH FR3 (SEQ ID NO:31), VL FR1 (SEQ ID NO:25), VL FR2 (SEQ ID NO:26), VL FR3 (SEQ ID NO:27), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 항체는 VH FR2 (SEQ ID NO:30), VH FR4 (SEQ ID NO:32), VL FR1 (SEQ ID NO:25), VL FR2 (SEQ ID NO:26), VL FR3 (SEQ ID NO:27), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 다른 구체 예에서, 항체는 VH FR3 (SEQ ID NO:31), VH FR4 (SEQ ID NO:32), VL FR1 (SEQ ID NO:25), VL FR2 (SEQ ID NO:26), VL FR3 (SEQ ID NO:27), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 항체는 VH FR1 (SEQ ID NO:29), VH FR2 (SEQ ID NO:30), VH FR3 (SEQ ID NO:31), VH FR4 (SEQ ID NO:32), VL FR1 (SEQ ID NO:25), VL FR2 (SEQ ID NO:26), 및 VL FR3 (SEQ ID NO:27)를 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 항체는 VH FR1 (SEQ ID NO:29), VH FR2 (SEQ ID NO:30), VH FR3 (SEQ ID NO:31), VH FR4 (SEQ ID NO:32), VL FR1 (SEQ ID NO:25), VL FR2 (SEQ ID NO:26), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 항체는 VH FR1 (SEQ ID NO:29), VH FR2 (SEQ ID NO:30), VH FR3 (SEQ ID NO:31), VH FR4 (SEQ ID NO:32), VL FR1 (SEQ ID NO:25), VL FR2 (SEQ ID NO:26), VL FR3 (SEQ ID NO:27), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 항체는 VH FR1 (SEQ ID NO:29), VH FR2 (SEQ ID NO:30), VH FR3 (SEQ ID NO:31), VH FR4 (SEQ ID NO:32), VL FR2 (SEQ ID NO:26), VL FR3 (SEQ ID NO:27), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 항체는 VH FR1 (SEQ ID NO:29), VH FR2 (SEQ ID NO:30), VH FR3 (SEQ ID NO:31), VL FR1 (SEQ ID NO:25), VL FR2 (SEQ ID NO:26), VL FR3 (SEQ ID NO:27), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 항체는 VH FR1 (SEQ ID NO:29), VH FR2 (SEQ ID NO:30), VH FR4 (SEQ ID NO:32), VL FR1 (SEQ ID NO:25), VL FR2 (SEQ ID NO:26), VL FR3 (SEQ ID NO:27), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 다른 구체 예에서, 항체는 VH FR1 (SEQ ID NO:29), VH FR3 (SEQ ID NO:31), VH FR4 (SEQ ID NO:32), VL FR1 (SEQ ID NO:25), VL FR2 (SEQ ID NO:26), VL FR3 (SEQ ID NO:27), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 항체는 VH FR2 (SEQ ID NO:30), VH FR3 (SEQ ID NO:31), VH FR4 (SEQ ID NO:32), VL FR1 (SEQ ID NO:25), VL FR2 (SEQ ID NO:26), VL FR3 (SEQ ID NO:27), 및 VL FR4 (SEQ ID NO:28)를 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 항체는 표 2에 열거된 VH FRs (SEQ ID NOS:29-32), 및 VL FRs (SEQ ID NOS:25-28)의 임의의 조합을 포함한다.

[0226] 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는 VH 영역 또는 VH 도메인을 포함한다. 다른 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는 VL 영역 또는 VL 도메인을 포함한다. 어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, (i) VH 도메인 또는 VH 영역; 및/또는 (ii) VL 도메인 또는 VL 영역의 조합을 갖는다. 또 다른 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, (i) VH 도메인 또는 VH 영역; 및/또는 (ii) 표 1에 서술된 SEQ ID NOS:3 및 4로 이루어진 군으로부터 선택된 VL 도메인 또는 VL 영역의 조합을 갖는다.

[0227] 어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는: (1) SEQ ID NO:15의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR1; (2) SEQ ID NO:19의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR2; 및 (3) SEQ ID NO:23의 아미노산 서열을 갖는 VH CDR3을 포함하는 VH 영역; 및 표 1에 서술된 SEQ ID NO:3으로 이루어진 군으로부터 선택된 VL 영역을 포함한다.

[0228] 다른 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는 표 1에 서술된 SEQ ID NO:4로 이루어진 군으로부터 선택된 VH 영역; 및 (1) SEQ ID NO:7의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR1; (2) SEQ ID NO:10의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR2; 및 (3) SEQ ID NO:12의 아미노산 서열을 갖는 VL CDR3를 포함하는 VL 영역을 포함한다.

[0229] 넥틴-4 폴리펩티드, 넥틴-4 폴리펩티드 단편, 넥틴-4 펩티드, 또는 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항-넥틴-4 항체의 면역글로불린 중쇄, 경쇄, VH 영역, VL 영역, VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, 및/또는 VL CDR3를 인코딩하는 단리된 핵산 분자는 또한 여기에서 제공된다. 항체 M22-321b41.1의 VL 영역, 경쇄, VH 영역, 및 중쇄에 대한 대표적인 핵산 서열은 표 3-4에 나타난다.

표 3

[0230]

VL 핵산 서열

항체	뉴클레오티드 서열
M22-321b41.1 VL 영역에 대한 DNA 서열	GATATTGTGATGACGCAGGCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAACATCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTC TCCTACATAGTAATGGCATCATTATTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGTCTCTGATTATCATATGTC CAACCTTGCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCACTAGCAGTGGGTCAGGAAGTATTTCACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCT GAGGATGTGGGTGTTTATTACTGCGCTCAAAATCTAGAACTTCGGTTCACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAACAAAACGGG CTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGA (SEQ ID NO:37)
M22-321b41.1 경쇄에 대한 DNA 서열	GATATTGTGATGACGCAGGCTGCATTCTCCAATCCAGTCACTCTTGGAACATCAGCTTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTC TCCTACATAGTAATGGCATCATTATTGTATTGGTATCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGTCTCTGATTATCATATGTC CAACCTTGCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCACTAGCAGTGGGTCAGGAAGTATTTCACACTGAGAATCAGCAGAGTGGAGGCT GAGGATGTGGGTGTTTATTACTGCGCTCAAAATCTAGAACTTCGGTTCACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAACAAAACGGG CTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAA CAACTTCTACCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAACAGTTGGAGTGTAT CAGGACAGCAAAGACAGACCTACAGCATGAGCAGCACCTCAGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCT GTGAGGCCACTCACAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGACCTTCAACAGGAATGAGTGT (SEQ ID NO:39)

표 4

[0231]

VH 핵산 서열

항체	뉴클레오티드 서열
M22-321b41.1 VH 영역에 대한 DNA 서열	CAGGTTCACTCCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGCAAGACCTGGGGCTTCAGTGAAATTGCTCTGCAAGGCTTCTGGCTATACCT TACTACCTACTGGATGCAGTGGGTAACAGAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGGTCTATTATCTCTGGAGATGGTGA TACTAGGTACACTCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGATAAATCTCCAGCACAGCCTACATTCAACTCAGCACC TTGGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGAATACTACGGTCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAGAG TCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCCTGTGTGTGGAGATACAACACTGGC (SEQ ID NO:38)
M22-321b41.1 중쇄에 대한 DNA 서열	CAGGTTCACTCCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGCAAGACCTGGGGCTTCAGTGAAATTGCTCTGCAAGGCTTCTGGCTATACCT TACTACCTACTGGATGCAGTGGGTAACAGAGGCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGGTCTATTATCTCTGGAGATGGTGA TACTAGGTACACTCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGCAGATAAATCTCCAGCACAGCCTACATTCAACTCAGCACC TTGGCATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGAGAATACTACGGTCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAGAG TCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCCCTGTGTGTGGAGATACAACACTGGCTCCTCGGTGACTTAGG ATGCTGTGTCAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGACCTGGAACCTTGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTCCCA GCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACCTCAGCAGCTCAGTGACTGTAACCTCGAGCACCTGGCCAGCCAGTCCATCACCTGCA ATGTGGCCCAACCCGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAATTTGAGCCCAAGGGGCCCAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAA ATGCCCAGCACCTAACCTCTTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCCTGAGC CCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTAC ACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATTACAACAGTACTCTCCGGTGGTCACTGCCCTCCCATCCAGCACCAGGACTG GATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAGACCTCCAGCGCCATCGAGAGAACCTCTCAAAAGCCAAAGGG TCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGCTTGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACCTCTGACCTGCATGGTCA CAGACTTCATGCCTGAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACTGAACAGTCTCT GGACTCTGATGGTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTCA GTGGTCCACGAGGGTCTGCACAATCACACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACTCCGGGTAAA (SEQ ID NO:40)

[0232]

몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 항체 M22-321b41.1의 VH 및 VL 아미노산 서열을 갖는다. 몇몇 구체 예에서, 항체는 SEQ ID NO:4의 VH 아미노산 서열, 및 SEQ ID NO:3의 VL 아미노산 서열을 포함한다.

[0233]

어떤 구체 예에서, 벡틴-4 폴리펩티드 (예를 들어, 벡틴-4의 ECD, 예를 들어, 인간 벡틴-4의 ECD)에 특이적으로 결합하는, 여기에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서, 경쇄는 다음의 아미노산 서열을 갖는 불변 영역을 포함한다:

[0234]

GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEQRNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKSTSPIVKTFNRNEC (SEQ ID NO:33).

[0235]

어떤 구체 예에서, 벡틴-4 폴리펩티드 (예를 들어, 벡틴-4의 ECD, 예를 들어, 인간 벡틴-4의 ECD)에 특이적으로 결합하는, 여기에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서 중쇄는 다음의 아미노산 서열을 갖는 불변 영역을 포함한다:

[0236]

SSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQISITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPS VFIFPPKIKDVLMLISLPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKG SVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVDTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSGYSFYMSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSR TPGK (SEQ ID NO:34).

[0237]

다른 구체 예에서, 벡틴-4 폴리펩티드 (예를 들어, 벡틴-4의 ECD, 예를 들어, 인간 벡틴-4의 ECD)에 특이적으로

결합하는, 여기에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서, 중쇄는 다음의 아미노산 서열을 갖는 인간 IgG1 Fc 영역을 포함한다:

[0238] PRGPTIKPCPPCKPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSP I VTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWM S G K E F K C K V N N K D L P A P I E R T I S K P K G S V R A P Q V Y V L P P P E E M T K K Q V T L T C M V T D F M P E D I Y V E W T N N G K T E L N Y K N T E P V L D S D G S Y F M Y S K L R V E K K N W V E R N S Y S C S V V H E G L H N H H T T K S F S R T P G K (SEQ ID NO:35).

[0239] 몇몇 구체 예에서, 벡틴-4 폴리펩티드 (예를 들어, 벡틴-4의 ECD, 예를 들어, 인간 벡틴-4의 ECD)에 특이적으로 결합하는, 여기에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서, 중쇄는 SEQ ID NO:35의 아미노산 서열을 갖는 인간 IgG1 Fc 영역을 포함하지 않는다.

[0240] 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 폴리펩티드 (예를 들어, 벡틴-4의 ECD, 예를 들어, 인간 벡틴-4의 ECD)에 특이적으로 결합하는, 여기에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서, 경쇄는 SEQ ID NO:33의 아미노산 서열을 갖는 불변 영역을 포함하며; 중쇄는 SEQ ID NO:35의 아미노산 서열을 갖는 Fc 영역을 포함한다.

[0241] 어떤 구체 예에서, 벡틴-4 폴리펩티드 (예를 들어, 벡틴-4의 ECD, 예를 들어, 인간 벡틴-4의 ECD)에 특이적으로 결합하는, 여기에 기재된 항체는 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서, 경쇄는 다음과 같은 아미노산 서열을 포함한다:

[0242] DIVMTQA AFSNPVTLGTSASISCRSSKSL LHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYHMSNLASGV PDRFTSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYCAQNLELPFTFGGGTKLETKRADAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLN NFYPKDINVKWKIDG SERQNGVLN SWTDQDSKDYSSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHK TSTSPIVKT FNRNEC (SEQ ID NO:5).

[0243] 몇몇 구체 예에서, 벡틴-4 폴리펩티드 (예를 들어, 벡틴-4의 ECD, 예를 들어, 인간 벡틴-4의 ECD)에 특이적으로 결합하는, 여기에 기재된 항체는 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서, 중쇄는 다음과 같은 아미노산 서열을 포함한다:

[0244] QVQLQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTTYWMQVWKQRPQG LEWIGSIYPGDG DTRYTQKFKGKATLTADKSSSTAYIQLSTLASEDSAVYYCAREYYGLDYWGQG TLT VSSAKTTAPSVYPLAPVCGDTT GSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPA SSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSP I VTCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALP IQHQDWM S G K E F K C K V N N K D L P A P I E R T I S K P K G S V R A P Q V Y V L P P P E E M T K K Q V T L T C M V T D F M P E D I Y V E W T N N G K T E L N Y K N T E P V L D S D G S Y F M Y S K L R V E K K N W V E R N S Y S C S V V H E G L H N H H T T K S F S R T P G K (SEQ ID NO:6).

[0245] 하나의 특정 구체 예에서, 벡틴-4 폴리펩티드 (예를 들어, 벡틴-4의 ECD, 예를 들어, 인간 벡틴-4의 ECD)에 특이적으로 결합하는, 여기에 기재된 항체는, 경쇄 및 중쇄를 포함하고, 여기서, (i) 경쇄는 SEQ ID NO:5의 아미노산 서열을 포함하고; 및 (ii) 중쇄는 SEQ ID NO:6의 아미노산 서열을 포함한다.

[0246] 또 다른 관점에서, 벡틴-4에 결합하기 위해 대표화된 항체 또는 기능성 단편 중 하나와 경쟁하는 항체는 제공된다. 이러한 항체는 또한 여기에 대표화된 항체 중 하나와 동일한 에피토프, 또는 중첩 에피토프 (overlapping epitope)에 결합할 수 있다. 대표화된 항체와 동일한 에피토프와 경쟁하거나 또는 이에 결합하는 항체 및 단편은, 유사한 기능적 특성을 나타낼 것으로 예상된다. 대표화된 항원-결합 단백질 및 단편은, 표 1에서의 것들을 포함하는, 여기에 제공된 CDRs, 및 VH 및 VL 영역들을 갖는 것들을 포함한다. 따라서, 구체적인 예로서, 제공되는 항체는, 다음을 포함하는 항체와 경쟁하는 것들을 포함한다: (a) 표 1에 열거된 항체에 대해 열거된 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6의 CDRs; (b) 표 1에 열거된 항체에 대해 열거된 VH 및 VL 영역들로부터 선택된 VH 및 VL; 또는 (c) 표 1에 열거된 항체에 대해 구체화된 바와 같은 VH 및 VL을 포함하는 2개의 경쇄 및 2개의 중쇄. 몇몇 구체 예에서, 항체는, 항체 M22-321b41.1이다.

[0247] 어떤 구체 예에서, 여기에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 항체 M22-321b41.1에 대해 특정 퍼센트 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0248] 두 서열들 (예를 들어, 아미노산 서열 또는 핵산 서열) 사이에 퍼센트 동일성의 결정은, 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 두 서열의 비교에 활용되는 수학적 알고리즘의 바람직한, 비-제한적인 예로는, Karlin and Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:58735877에서와 같이 수정된, Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264 2268의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은, Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램에 통합된다. BLAST 뉴클레오타이드 검색은, 여기에 기재된 핵산 분자에 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 얻기 위해, 예를 들어, 스코어=100, 단어길이=12에 대해 설

정된 NBLAST 뉴클레오타이드 프로그램 파라미터 (NBLAST nucleotide program parameters)로 수행될 수 있다. BLAST 단백질 검색은, 여기에 기재된 단백질 분자와 상동성인 아미노산 서열을 얻기 위해, 예를 들어, 스코어 50, 단어길이=3으로 설정된 XBLAST 프로그램 파라미터로 수행될 수 있다. 비교 목적을 위한 갭 정렬 (gapped alignments)을 얻기 위해, Gapped BLAST는 Altschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25:33893402에 기재된 바와 같이 활용될 수 있다. 선택적으로, PSI BLAST는, 분자들 (Id.) 사이의 먼 관계를 검출하는 반복 검색을 수행하는데 사용될 수 있다. BLAST, Gapped BLAST 및 PSI Blast 프로그램을 활용하는 경우, 각각의 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터 (default parameters)는 사용될 수 있다 (예를 들어, National Center for Biotechnology Information (NCBI) on the worldwide web, ncbi.nlm.nih.gov, 참조). 서열의 비교를 위해 활용되는 수학적 알고리즘의 또 다른 바람직한, 비제한적인 예로는, Myers and Miller, 1988, CABIOS 4:1117의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 GCG 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 일부인, ALIGN 프로그램 (버전 2.0)에 통합된다. 아미노산 서열을 비교하기 위해 ALIGN 프로그램을 활용하는 경우, PAM120 중량 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티 (penalty), 및 4의 갭 페널티는 사용될 수 있다.

[0249] 두 서열 사이에 퍼센트 동일성은, 갭을 허용하거나 또는 갭의 허용 없이, 전술된 것과 유사한 기술을 사용하여 결정될 수 있다. 퍼센트 동일성을 계산할 때, 통상적으로 정확한 일치만 계산된다.

[0250] 어떤 구체 예에서, 여기에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:3의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하고, 여기서, 항체는 넥틴-4에 면역특이적으로 결합한다. 어떤 구체 예에서, 여기에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:3의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 VL 도메인을 포함하고, 여기서, 항체는 넥틴-4에 면역특이적으로 결합하며, 및 여기서, 항체는 항체 M22-321b41.1의 CDRs (예를 들어, VL CDRs 1-3)과 동일한 CDRs (예를 들어, VL CDRs 1-3)을 포함한다.

[0251] 어떤 구체 예에서, 여기에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:3의 프레임워크 영역의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 VL 프레임워크 영역을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, 여기서, 항체는 넥틴-4에 면역특이적으로 결합한다. 특정 구체 예에서, 항체는 항체 M22-321b41.1의 VL CDRs과 동일한 VL CDRs를 포함한다.

[0252] 어떤 구체 예에서, 여기에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:4의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 VH 도메인을 포함하고, 여기서, 항체는 넥틴-4에 면역특이적으로 결합한다. 어떤 구체 예에서, 여기에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:4의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 VH 도메인을 포함하고, 여기서, 항체는 넥틴-4에 면역특이적으로 결합하며, 및 여기서, 항체는 항체 M22-321b41.1의 CDRs (예를 들어, VH CDRs 1-3)과 동일한 CDRs (예를 들어, VH CDRs 1-3)을 포함한다.

[0253] 어떤 구체 예에서, 여기에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:4의 프레임워크 영역의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 VH 프레임워크 영역을 포함하는 VH 도메인을 포함하고, 여기서, 항체는 넥틴-4에 면역특이적으로 결합한다. 특별한 구체 예에서, 이러한 항체는 항체 M22-321b41.1의 CDRs (예를 들어, VH CDRs 1-3)과 동일한 CDRs (예를 들어, VH CDRs 1-3)을 포함한다.

[0254] 어떤 구체 예에서, 여기에 기재된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 각각 (i) SEQ ID NO:3의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 VL 도메인, 및 (ii) SEQ ID NOS: 4의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98% 서열 동일성을 갖는 VH 도메인을 포함하고, 여기서, 항체는 넥틴-4에 면역특이적으로 결합한다. 특별한 구체 예에서, 이러한 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 항체 M22-321b41.1의 CDRs (예를 들어, VL CDRs 1-3 및/또는 VH CDRs 1-3)과 동일한 CDRs (예를 들어, VL CDRs 1-3 및/또는 VH CDRs 1-3)을 포함한다.

[0255] 또 다른 관점에서, 여기에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 인간 넥틴-4의, 에피토프를 포함하는, 영역에 결합한다. 예를 들어, 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 인간 넥틴-4의 아미노산 잔기 31-346 (SEQ ID NO:2)을 포함하는 인간 넥틴-4의 영역 (SEQ ID NO:1), 인간 넥틴-4의 아미노산 잔기 1-150 (SEQ ID NO:45)을 포함하는 인간 넥틴-4의 영역 (SEQ ID NO:1), 또는 인간 넥틴-4의 아미노산 잔기 31-150 (SEQ ID NO:46)을 포함하는 인간 넥틴-4의 영역 (SEQ ID NO:1)에 결합한다. 또 다른 관점에서, 여기에 제공된 항체는,

인간 넥틴-4의 특이적 에피토프에 결합한다. 인간 넥틴-4 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 잔기 31-346의 아미노산 서열은 다음과 같다:

[0256] AGELETSDVVTVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGVAVARVDAGEGAQELALLHSKYGLHVSAPAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLVPLPLSNPGPALEEGQGLTLAASCTAEGSPAPSVTWDEVKGTTSSRSFKHSRSAAVTSEFHLVPSRSMNGQPLTCVVSHPGLLQDQRITHILHVSFLAEASVRGLEQNLWHIGREGAMLKCLSEGQPPPSYNWTRLDGPLPSGVRVDGDTLGFPLTTEHSGIYVCHVSNEFSRDSQVTVLDLPQEDSGKQVDLV (SEQ ID NO:2). 인간 넥틴-4 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 잔기 1-150의 아미노산 서열은 다음과 같다:

[0257] MPLSLGAEMWGPEAWLLLLLLASFTGRCPAGELETSDVVTVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGVAVARVDAGEGAQELALLHSKYGLHVSAPAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLVPL (SEQ ID NO:45). 인간 넥틴-4 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 잔기 31-150의 아미노산 서열은 다음과 같다:

[0258] AGELETSDVVTVLGQDAKLPCFYRGDSGEQVGVAVARVDAGEGAQELALLHSKYGLHVSAPAYEGRVEQPPPPRNPLDGSVLLRNAVQADEGEYECRVSTFPAGSFQARLRLRVLVPL (SEQ ID NO:46).

[0259] 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는 (예를 들어, 넥틴-4 폴리펩티드의 다중체 형태 (multimeric form)에서) 넥틴-4 폴리펩티드의 3-차원 표면 특색인 넥틴-4 에피토프에 결합한다. 에피토프에 기여하는 넥틴-4 폴리펩티드의 영역은, 폴리펩티드의 인접 아미노산일 수 있거나 또는 에피토프는 폴리펩티드의 2개 이상의 비-인접 영역으로부터 합쳐질 수 있다. 넥틴-4 에피토프는, (a) 넥틴-4의 다중체 형태 ("다중체 넥틴-4 에피토프"), (b) 넥틴-4의 단량체 형태 ("단량체 넥틴-4 에피토프"), (c) 넥틴-4의 다중체 및 단량체 형태 모두, (d) 넥틴-4의 단량체 형태가 아닌 다중체 형태, 또는 (e) 넥틴-4의 다중체 형태가 아닌 단량체 형태에서 존재할 수 있다. 예를 들어, 몇몇 구체 예에서, 에피토프는, 다중체 (본연의) 형태로 결합하기 위해 오직 존재하거나 또는 이용 가능하나, 항-넥틴-4 항체에 의해 단량체 (변성된) 형태에서 결합하기 위해 존재하거나 또는 이용 가능하지 않다. 다른 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프는, (예를 들어, 넥틴-4 폴리펩티드의 다중체 형태 또는 단량체 형태에서) 넥틴-4 폴리펩티드의 선형 특색이다. 여기에 제공된 항체는, (a) 넥틴-4의 단량체 형태의 에피토프, (b) 넥틴-4의 다중체 형태의 에피토프, (c) 넥틴-4의 다중체 형태가 아닌 단량체 형태의 에피토프, (d) 넥틴-4의 단량체 형태가 아닌 다중체의 에피토프, 또는 (e) 넥틴-4의 단량체 형태 및 다중체 형태 모두에 면역특이적으로 결합할 수 있다.

[0260] 또한, 여기에 기재된 항체 M22-321b41.1, 예를 들어, 여기에 기재된 항체 M22-321b41.1과 넥틴-4 (인간 넥틴-4의 ECD)와 결합하기 위해 (예를 들어, 투여량 의존적 방식 (dose dependent manner)에서) 경쟁하거나, 또는 넥틴-4 (예를 들어, 넥틴-4의 ECD 상에 위치한 에피토프)에 결합함으로써 여기에 기재된 항체 M22-321b41.1을 (예를 들어, 투여량 의존적 방식에서) 경쟁적으로 억제하는 항체와, 넥틴-4의 동일하거나 또는 중첩 에피토프 (예를 들어, 인간 넥틴-4의 ECD에 위치한 에피토프)에 결합되는 항체는 제공된다.

[0261] 특별한 관점에서, 또한, 항체 M22-321b41.1과 넥틴-4의 동일하거나 또는 중첩 에피토프 (예를 들어, 인간 넥틴-4의 ECD에 위치한 에피토프)에 결합되는 항체는 제공된다.

[0262] 넥틴-4의 동일하거나 또는 중첩되는 에피토프 (예를 들어, 인간 넥틴-4의 ECD에 위치한 에피토프)에 결합하는 항체는, 여기에 제시된 실시예에서 활용된 것과 같은 일상적인 기술을 사용하여 확인될 수 있다. 예를 들어, 면역분석은 하나의 항체가 표적 항원에 대한 또 다른 항체의 결합을 차단하는 능력, 즉, 경쟁적 결합 분석을 입증하는데 사용된다. 경쟁 결합 분석은 또한 두 항체가 에피토프에 대한 유사한 결합 특이성을 갖는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있다. 시험하에 면역글로불린이 공통 항원, 예컨대, 넥틴-4에 대한 기준 항체의 특이적 결합을 억제하는 분석에서 경쟁적 결합은 결정될 수 있다. 다수의 타입의 경쟁적 결합 분석은, 예를 들어: 고상 직접 또는 간접 방사성면역분석법 (RIA), 고상 직접 또는 간접 효소 면역분석법 (EIA), 샌드위치 경쟁 분석법 (Stahli et al., (1983) *Methods in Enzymology* 9:242, 참조); 고상 직접 비오틴-아비딘 EIA (Kirkland et al., (1986) *J. Immunol.* 137:3614, 참조); 고상 직접 표지 분석, 고상 직접 표지 샌드위치 분석 (Harlow and Lane, (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, 참조); I-125 표지를 사용한 고상 직접 표지 RIA (Morel et al., (1988) *Mol. Immunol.* 25(1):7, 참조); 고상 직접 비오틴-아비딘 EIA (Cheung et al., (1990) *Virology* 176:546); 및 직접 표지 RIA (Moldenhauer et al., (1990) *Scand J. Immunol.* 32:77)에 알려져 있다. 통상적으로, 이러한 분석은, 표지되지 않은 시험 면역글로불린 및 표지된 기준 면역글로불린 중 어느 하나를 함유하는 고상 표면 또는 세포에 결합된 정제된 항원 (예를 들어, 넥틴-4, 예컨대, 인간 넥틴-4의 ECD)의 사용을 포함한다. 경쟁적 억제는, 시험 면역글로불린의 존재하에 고상 표면 또는 세포에 결합된 표지의 양을 결정하여 측정될 수 있다. 보통, 시험 면역글로불린은 과량으로 존재한다. 보통, 경

쟁 항체가 과량으로 존재하는 경우, 이것은 공통 항원에 대한 기준 항체의 특이적 결합을 적어도 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70% 70-75% 이상 억제할 것이다. 경쟁 결합 분석은, 표지된 항원 또는 표지된 항체를 사용하여 다수의 다른 형식으로 구성될 수 있다. 이 분석의 일반적인 버전에서, 항원은 96-웰 플레이트 상에 고정된다. 표지된 항체의 항원에 대한 결합을 차단하는 표지되지 않은 항체의 능력은, 그 다음 방사성 또는 효소 표지를 사용하여 측정된다. 추가의 세부 사항은, 예를 들어, Wagener et al., J. Immunol., 1983, 130:2308-2315; Wagener et al., J. Immunol. Methods, 1984, 68:269-274; Kuroki et al., Cancer Res., 1990, 50:4872-4879; Kuroki et al., Immunol. Invest., 1992, 21:523-538; Kuroki et al., Hybridoma, 1992, 11:391-407, and Using Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane editors (Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, N.Y., 1999), pp.386-389을 참조한다.

- [0263] 어떤 관점에서, 경쟁 결합 분석법은, 항체의 결합이 또 다른 항체에 의해, 예를 들어, 투여량 의존적 방식에서, 경쟁적으로 억제되는지 여부를 결정하는데 사용될 수 있으며, 이에 의해 항체가 본질적으로 동일한 에피토프 또는 중첩 에피토프, 예를 들어, 입체적으로 중첩하는 에피토프에 결합했다는 신호를 보낸다. 이러한 경쟁 결합 분석은, 예를 들어, 표지된 항원 또는 표지된 항체를 사용하여, 모든 수의 다양한 형식으로 구성될 수 있는, 경쟁 ELISA 분석을 포함할 수 있다. 특정 구체 예에서, 항체는, 여기에 기재된 항체 M22-321b41.1, 또는 이의 키메라 또는 Fab 항체, 또는 항체 M22-321b41.1의 VH CDRs 및 VL CDRs를 포함하는 항체와의 경쟁 결합 분석에서 시험될 수 있다.
- [0264] 특별한 관점에서, 기술분야의 당업자에게 알려지거나 또는 여기에 기재된 분석법 (예를 들어, ELISA 경쟁 분석법)을 사용하여 결정된 것으로, 넥틴-4-폴리펩티드 (예를 들어, 넥틴-4의 ECD, 예를 들어, 인간 넥틴-4의 ECD)에 특이적으로 결합하기 위해 여기에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 항체의 결합을 (예를 들어, 투여량 의존적 방식에서) 경쟁적 차단하는 항체는 여기서 제공된다. 특별한 관점에서, 기술분야의 당업자에게 알려지거나 또는 여기에 기재된 분석 (예를 들어, ELISA 경쟁 분석법)을 사용하여 결정된 것으로, 여기에 기재된 아미노산 서열 (예를 들어, 항체 M22-321b41.1의 VL 및/또는 VH 아미노산 서열)을 포함하는 항체와, 넥틴-4-폴리펩티드 (예를 들어, 넥틴-4의 ECD, 예를 들어, 인간 넥틴-4의 ECD)에 특이적으로 결합하기 위해 (예를 들어, 투여량 의존적 방식에서) 경쟁하는 항체는 여기서 제공된다.
- [0265] 특정 관점에서, 항체 M22-321b41.1과, 넥틴-4 폴리펩티드 (예를 들어, 넥틴-4의 ECD, 예를 들어, 인간 넥틴-4의 ECD)에 특이적으로 결합하기 위해 (예를 들어, 투여량 의존적 방식에서) 경쟁하는 항체는 여기서 제공된다.
- [0266] 특별한 관점에서, SEQ ID NO:3의 아미노산 서열을 갖는 VL 사슬 영역, 및 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 갖는 VH 사슬 영역을 포함하는 항체와, 넥틴-4-폴리펩티드 (예를 들어, 넥틴-4의 ECD, 예를 들어, 인간 넥틴-4의 ECD)에 특이적으로 결합하기 위해 (예를 들어, 투여량 의존적 방식에서) 경쟁하는 항체는 여기서 제공된다.
- [0267] 특별한 관점에서, (i) 임의의 항체 M22-321b41.1과, 넥틴-4-폴리펩티드의 에피토프 (예를 들어, 인간 넥틴-4의 ECD의 에피토프)에 특이적으로 결합하기 위해 (예를 들어, 투여량 의존적 방식에서) 경쟁하고, 및 (ii) IHC 분석에서 넥틴-4에 특이적으로 결합할 수 있는 항체는 여기서 또한 제공된다.
- [0268] 특정 구체 예에서, 여기에 기재된 항체는, 넥틴-4에 특이적으로 결합하고, 및 넥틴-4-폴리펩티드 (예를 들어, 넥틴-4의 ECD, 예를 들어, 인간 넥틴-4의 ECD)에 특이적으로 결합하기 위해, SEQ ID NOS: 3의 아미노산 서열을 갖는 VL 사슬 영역 및 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 갖는 VH 사슬 영역을 포함하는, 항체에 의해 (예를 들어, 투여량 의존적 방식에서) 경쟁적으로 차단되는 항체이다.
- [0269] 특별한 관점에서, (i) 넥틴-4 폴리펩티드의 에피토프 (예를 들어, 인간 넥틴-4의 ECD의 에피토프)에 특이적으로 결합하기 위해 항체 M22-321b41.1을 (예를 들어, 투여량 의존적 방식에서) 경쟁적으로 차단하고, 및 (ii) IHC 분석에서 넥틴-4에 특이적으로 결합할 수 있는 항체는 여기서 또한 제공된다.
- [0270] 특별한 관점에서, 넥틴-4폴리펩티드 (예를 들어, 넥틴-4의 ECD, 예를 들어, 인간 넥틴-4의 ECD)에 대한 특이적 결합을 위해 여기에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 항체 M22-321b41.1과 동일한 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은 여기서 제공된다. 기술분야의 당업자에게 알려져 있거나 또는 여기에 기재된 분석법 (예를 들어, ELISA 분석법)은, 2개의 항체가 동일한 에피토프에 결합하는지를 결정하는데 사용될 수 있다.
- [0271] 특별한 구체 예에서, 여기에 기재된 항체, 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:3의 아미노산 서열을 갖는 VL 사슬 영역 및 SEQ ID NO:4의 아미노산 서열을 갖는 VH 사슬 영역을 포함하고, 넥틴-4에 특이적으로 결합하는 항체 M22-321b41.1의 것과 동일한 에피토프에 면역특이적으로 결합한다.

[0272] 특별한 관점에서, (i) 항체 M22-321b41.1의 것과 동일한 벡틴-4 폴리펩티드의 에피토프 (예를 들어, 인간 벡틴-4의 ECD의 에피토프)에 면역특이적으로 결합하고; 및 (ii) IHC 분석에서 벡틴-4에 특이적으로 결합할 수 있는 항체는 여기서 또한 제공된다.

[0273] 어떤 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 31-346 중 적어도 하나에 결합한다. 몇몇 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 31-75 중 적어도 하나에 결합한다. 다른 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 75-125 중 적어도 하나에 결합한다. 몇몇 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 100-150 중 적어도 하나에 결합한다. 다른 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 125-175 중 적어도 하나에 결합한다. 몇몇 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 150-200 중 적어도 하나에 결합한다. 다른 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 175-225 중 적어도 하나에 결합한다. 몇몇 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 200-250 중 적어도 하나에 결합한다. 다른 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 225-275 중 적어도 하나에 결합한다. 몇몇 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 250-300 중 적어도 하나에 결합한다. 다른 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 275-325 중 적어도 하나에 결합한다. 몇몇 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 300-346 중 적어도 하나에 결합한다.

[illegible]

NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 100-110 중 적어도 하나에 결합한다. 몇몇 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 105-115 중 적어도 하나에 결합한다. 다른 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 110-120 중 적어도 하나에 결합한다. 몇몇 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 115-125 중 적어도 하나에 결합한다. 다른 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 120-130 중 적어도 하나에 결합한다. 몇몇 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 125-135 중 적어도 하나에 결합한다. 다른 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 130-140 중 적어도 하나에 결합한다. 몇몇 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 135-145 중 적어도 하나에 결합한다. 다른 구체 예에서, 벡틴-4에 결합되는 경우, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, SEQ ID NO:1의 아미노산 서열 내에 잔기 140-150 중 적어도 하나에 결합한다.

- [0275] 전-술된 아미노산 벡틴-4 결합 부위 중 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 이상의 임의의 조합은 또한 고려된다.
- [0276] 어떤 구체 예에서, 항체는, 벡틴-4 리간드 결합 부위와 구별되는 인간 벡틴-4의 ECD의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 어떤 구체 예에서, 벡틴-4 리간드의 벡틴-4에 대한 결합은, 항체에 의해 억제되지 않는다.
- [0277] 하나의 관점에서, 벡틴-4에 특이적으로 결합하는 항체는 여기서 제공된다. 어떤 구체 예에서, 인간 벡틴-4의 ECD에 특이적으로 결합하는 항체는 여기서 제공된다.
- [0278] 어떤 구체 예에서, 벡틴-4에 특이적으로 결합하는 항체는, 인간 벡틴-4의 ECD, 또는 이의 인간 벡틴-4의 ECD의 에피토프에 결합한다. 어떤 구체 예에서, 항체는, 벡틴-4 리간드 결합 부위와 구별되는 인간 벡틴-4의 ECD의 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0279] 벡틴-4 활성은, 기술분야에 알려지거나 또는 기재된 것과 같은, 벡틴-4의 임의의 활성과 관련될 수 있다. 벡틴-4 활성의 비-제한적인 예로는: 벡틴-4 수용체 이량체화, 다른 수용체와의 벡틴-4 수용체 이종이량체화, 벡틴-4 수용체 인산화, 벡틴-4 수용체의 다운스트림에서 신호전달, 세포 증식 (예를 들어, 암 세포 증식)의 벡틴-4 리간드-유도된 향상과 같은 세포 증식, 또는 세포 생존 (예를 들어, 암 세포), 벡틴-4 리간드 유도된 항-아포토시스 (anti-apoptosis)를 포함한다. 벡틴-4 활성 또는 벡틴-4 기능은, 여기서 상호교환적으로 사용된다. 어떤 관점에서, 벡틴-4 활성은, 벡틴-4 수용체에 대해 벡틴-4 리간드 결합에 의해 유도된다. 어떤 구체 예에서, 벡틴-4 수용체의 높은 발현 (또는 과발현)으로 인해, 벡틴-4 리간드 결합 벡틴-4 수용체의 부재하에서, 벡틴-4 활성 또는 신호전달에서 증가는 발생할 수 있다. 세포에서 벡틴-4의 높거나 또는 과발현은, 정상적인 벡틴-4 발현 또는 벡틴-4 활성을 갖는 것으로 알려진 세포 또는 샘플의 모집단에서 벡틴-4의 평균 발현 수준보다, 또는 정상적인 벡틴-4 발현 또는 벡틴-4 활성을 갖는 것으로 알려진 기준 세포의 발현 수준보다, 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 또는 500% 많은 발현 수준을 지칭한다. 벡틴-4의 발현 수준은, 여기에 기재되거나 또는 기술분야의 당업자에게 알려진 방법들 (예를 들어, 웨스턴 블로팅, ELISA, 또는 IHC)에 의해 평가될 수 있다.
- [0280] 10. 다클론 항체
- [0281] 본 개시의 항체는, 다클론 항체를 포함할 수 있다. 다클론 항체의 제조 방법은 기술분야의 당업자에게 알려져 있다. 다클론 항체는, 예를 들어, 면역화제 및, 원한다면, 보조제의 1회 이상의 주사에 의해 포유동물에서 발생할 수 있다. 통상적으로, 면역화제 및/또는 보조제는, 다수의 피하 또는 복강내 주사에 의해 포유동물에 주사될 것이다. 면역화제는, 벡틴-4 폴리펩티드 또는 이의 융합 단백질을 포함할 수 있다. 면역화되는 포유동물에서 면역원성인 것으로 알려진 단백질에 면역화제를 접합시키거나 또는 단백질 및 하나 이상의 보조제로 포유동물을 면역화시키는 것은 유용할 수 있다. 이러한 면역원성 단백질의 예로는, 키홀 림펫 헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin), 혈청 알부민, 소 티로글로불린, 및 대두 트립신 억제제를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 사용될 수 있는 보조제의 예로는, Ribl, CpG, 폴리 IC, Freund의 완전 보조제, 및 MPL-TDM 보조제 (모노포스포릴 Lipid A, 합성 트레할로스 디코리노마이콜레이트)를 포함한다. 면역화 프로토콜은, 과도한 실험없이 기술분야의 당업자에 의해 선택될 수 있다. 포유동물은 그 다음 채혈되고, 혈청은 벡틴-4 항체 역가에 대해 분석된다. 원하는 경우, 항체 역가가 증가하거나 또는 안정될 때까지, 포유동물은 부스팅될 (boosted) 수 있다. 부가적으로 또는 선택적으로, 림프구는, 하기 기재된 바와 같이 하이브리도마로부터 단일클론 항체의 융합 및 제조를 위해 면역화된 동물로부터 얻어질 수 있다.

- [0282] 11. 단일클론 항체
- [0283] 본 개시의 항체는, 선택적으로 단일클론 항체일 수 있다. 단일클론 항체는, Kohler et al., 1975, Nature 256:495-97에 의해 처음 기재된 하이브리도마 방법을 사용하여 제조될 수 있거나, 또는 재조합 DNA 방법 (예를 들어, 미국 특허 제4,816,567호, 참조)에 의해 제조될 수 있다.
- [0284] 하이브리도마 방법에서, 마우스 또는 다른 적절한 숙주 동물, 예컨대, 햄스터는, 면역화에 사용된 단백질에 특이적으로 결합하는 항체를 생성하거나 생성할 수 있는, 림프구를 유도하기 위해 전술한 바와 같이 면역화된다. 선택적으로, 림프구는 시험관내에서 면역화될 수 있다. 면역 후에, 림프구는 단리되고, 그 다음, 폴리에틸렌 글리콜과 같은, 적절한 융합제 (fusing agent)를 사용하여 골수종 세포주와 융합되어, 하이브리도마 세포를 형성한다 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice 59-103 (1986)).
- [0285] 이렇게 제조된 하이브리도마 세포는, 어떤 구체 예에서, 융합되지 않은, 모 골수종 세포 (또한 "융합 파트너"라 한다)의 성장 또는 생존을 억제하는 하나 이상의 물질을 함유하는, 적절한 배양 배지에 접종되고 성장된다. 예를 들어, 모 골수종 세포가 효소 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (HGPRT 또는 HPRT)를 필요로 하는 경우, 하이브리도마용 선택적 배양 배지는, HGPRT-결핍 세포의 성장을 방지하는, 하이포크산틴, 아미노테린, 및 티미딘 (HAT 배지)을 통상적으로 포함할 것이다.
- [0286] 대표적인 융합 파트너 골수종 세포는, 효율적으로 융합하고, 선택된 항체-생성 세포에 의해 항체의 안정적인 고-수준의 생성을 지원하며, 융합되지 않은 모 세포를 도태시키는 선택 배지에 민감한 것들이다. 대표적인 골수종 세포주는, SP-2 및 유도체와 같은, 쥐 골수종 세포주, 예를 들어, American Type Culture Collection (Manassas, VA)에서 이용 가능한 X63-Ag8-653 세포, 및 Salk Institute Cell Distribution Center (San Diego, CA)에서 이용 가능한 MOPC-21 및 MPC-11 마우스 종양으로부터 유래된 것들이다. 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주는, 또한 인간 단일클론 항체의 생성을 위해 기재되어 있다 (Kozbor, 1984, Immunol. 133: 3001-05; 및 Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63 (1987)).
- [0287] 하이브리도마 세포가 성장하는 배양 배지는, 항원에 대해 향하는 단일클론 항체의 생성을 위해 분석된다. 하이브리도마 세포에 의해 생성된 단일클론 항체의 결합 특이성은, 면역침전 또는 시험관내 결합 분석, 예컨대, RIA 또는 ELISA에 의해 결정된다. 단일클론 항체의 결합 친화도는, 예를 들어, Munson et al., 1980, Anal. Biochem. 107:220-39에 기재된 스캐차드 분석 (Scatchard analysis)에 의해 결정될 수 있다.
- [0288] 원하는 특이성, 친화도, 및/또는 활성의 항체를 생성하는 하이브리도마 세포가 확인되면, 클론은 제한 희석 절차 (limiting dilution procedures)에 의해 서브클로닝되고, 표준 방법 (상기, Goding)에 의해 성장될 수 있다. 이러한 목적에 적절한 배양 배지는, 예를 들어, DMEM 또는 RPMI-1640 배지를 포함한다. 부가적으로, 하이브리도마 세포는, 예를 들어, 마우스에 세포의 복강내 주사에 의해, 동물에서 복수 종양 (ascites tumors)으로서 생체 내에서 성장될 수 있다.
- [0289] 서브클론에 의해 분리된 단일클론 항체는, 예를 들어, 친화성 크로마토그래피 (예를 들어, 단백질 A 또는 단백질 G-세파로스를 사용함) 또는 이온-교환 크로마토그래피, 하이드록시라파타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 등과 같은, 전통적인 항체 정제 절차에 의해, 배양 배지, 복수 유체 (ascites fluid), 또는 혈청으로부터 적절히 분리된다.
- [0290] 단일클론 항체를 인코딩하는 DNA는, 전통적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 쥐와 항체의 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용하여) 쉽게 단리 및 서열분석된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 공급원으로서 역할을 할 수 있다. 일단 단리되면, DNA는 발현 벡터로 배치될 수 있고, 이어서, E. coli 세포, 시미안 COS 세포, Chinese Hamster Ovary (CHO) 세포, 또는 항체 단백질을 별도로 생성하지 않는 골수종 세포와 같은 숙주 세포로 형질감염되어, 재조합 숙주 세포에서 단일클론 항체의 합성을 얻을 수 있다. 항체를 인코딩하는 DNA의 박테리아에서 재조합 발현에 대한 검토 논문은, Skerra et al., 1993, Curr. Opinion in Immunol. 5:256-62 and Plückthun, 1992, Immunol. Revs. 130:151-88을 포함한다.
- [0291] 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체는, 엄격한 조건하에서 (예를 들어, 약 45℃의 6X 염화나트륨/시트르산 나트륨 (SSC)에서 필터-결합 DNA (filter-bound DNA)에 대해 혼성화한 후 약 50-65℃의 0.2X SSC/0.1% SDS에서 한번 이상 세척), 매우 엄격한 조건하에서 (예를 들어, 약 45℃의 6X SSC에서 필터-결합 핵산에 대해 혼성화한 후, 약 68℃의 0.1X SSC/0.2% SDS에서 한번 이상 세척), 또는 기술분야의 당업자에게 알려진

다른 엄격한 혼성화 조건하에서, 여기에 기재된 VH 및/또는 VL 도메인 중 어느 하나를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 상보체에 대해 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 VH 도메인의 아미노산 서열 및/또는 VL 도메인의 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, Current Protocols in Molecular Biology Vol. I, 6.3.1-6.3.6 및 2.10.3 (Ausubel et al. eds., 1989), 참조.

[0292] 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프와 결합하는 항체는, 엄격한 조건하에서 (예를 들어, 약 45°C의 6X SSC에서 필터-결합 DNA에 대해 혼성화 후, 약 50-65°C의 0.2X SSC/0.1% SDS에서 한번 이상 세척), 매우 엄격한 조건하에서 (예를 들어, 약 45°C의 6X SSC에서 필터-결합 핵산에 대해 혼성화 후, 약 68°C의 0.1X SSC/0.2% SDS에서 한번 이상 세척), 또는 기술분야의 당업자에게 알려진 다른 엄격한 혼성화 조건하에서 (예를 들어, 상기 Ausubel et al., 참조), 표 1에 나타낸 VH CDRs 및/또는 VL CDRs 중 어느 하나를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 상보체에 대해 혼성화하는 뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 VH CDR의 아미노산 서열 또는 VL CDR의 아미노산 서열을 포함한다.

[0293] 또 다른 구체 예에서, 단일클론 항체 또는 항체 단편은, 예를 들어, Antibody Phage Display: Methods and Protocols (O'Brien and Aitken eds., 2002)에 기재된 기술을 사용하여 발생된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 파지 디스플레이 방법에서, 기능적 항체 도메인은, 이들을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 수반하는 파지 입자 (phage particles)의 표면 상에 표시된다. 여기에 기재된 항체를 만드는데 사용될 수 있는 파지 디스플레이 방법의 예로는, Brinkman et al., 1995, J. Immunol. Methods 182:41-50; Ames et al., 1995, J. Immunol. Methods 184:177-186; Kettleborough et al., 1994, Eur. J. Immunol. 24:952-958; Persic et al., 1997, Gene 187:9-18; Burton et al., 1994, Advances in Immunology 57:191-280; PCT 출원 번호 PCT/GB91/01134; 국제 공개 번호 WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/11236, WO 95/15982, WO 95/20401, 및 WO97/13844; 및 미국 특허 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727, 5,733,743 및 5,969,108에 개시된 것들을 포함한다.

[0294] 원칙적으로, 합성 항체 클론은, 파지 코트 단백질 (phage coat protein)에 융합된 항체 가변 영역 (Fv)의 다양한 단편을 나타내는 파지를 함유하는 파지 라이브러리를 스크리닝하여 선택된다. 이러한 파지 라이브러리는, 원하는 항원에 대해 스크리닝된다. 원하는 항원에 결합할 수 있는 Fv 단편을 발현하는 클론은, 항원에 흡착되고, 따라서, 라이브러리의 비-결합 클론으로부터 분리된다. 결합 클론은 그 다음 항원으로부터 용출되고, 추가적인 사이클의 항원 흡착/용출에 의해 더욱 농축될 수 있다.

[0295] 가변 도메인은, 예를 들어, Winter et al., 1994, Ann. Rev. Immunol. 12:433-55에 기재된 바와 같이, VH 및 VL이 짧고, 유연한 펩티드를 통해 공유적으로 연결된 단-쇄 Fv (scFv) 단편으로서, 또는 불변 도메인에 각각 융합되고, 비-공유적으로 상호작용하는, Fab 단편으로서, 파지 상에 기능적으로 표시될 수 있다.

[0296] VH 및 VL 유전자의 레퍼토리는, PCR에 의해 개별적으로 클로닝될 수 있고, 파지 라이브러리에서 무작위로 재조합될 수 있으며, 그 다음 상기 Winter et al.에 기재된 바와 같이 항원-결합 클론을 찾을 수 있다. 면역화된 공급원 (immunized sources) 유래의 라이브러리는, 하이브리도마를 구축할 요건 없이 면역원에 고-친화도 항체를 제공한다. 선택적으로, 천연 레퍼토리는, Griffiths et al., 1993, EMBO J 12:725-34에 의해 기재된 바와 같이 임의의 면역화없이 광범위한 비-자가 및 또한 자가 항원에 인간 항체의 단일 공급원을 제공하기 위해 클로닝될 수 있다. 마지막으로, 천연 라이브러리는 또한, 예를 들어, Hoogenboom and Winter, 1992, J. Mol. Biol. 227:381-88에 기재된 바와 같이, 줄기 세포 유래의 재배열되지 않은 V-유전자 세그먼트 (gene segments)를 클로닝하고, 매우 가변적인 CDR3 영역들을 인코딩하고, 시험관에서 재배열을 달성하기 위해 랜덤 서열 (random sequence)을 함유하는 PCR 프라이머를 사용하여 합성적으로 만들어질 수 있다.

[0297] 라이브러리의 스크리닝은, 기술분야에 알려진 다양한 기술에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 넥틴-4 (예를 들어, 넥틴-4 폴리펩티드, 단편, 또는 에피토프)는, 흡착판의 웰을 코팅하는데 사용될 수 있고, 흡착판에 부착된 숙주 세포에서 발현되거나 또는 세포 분류에 사용될 수 있으며, 스트렙타비딘-코팅된 비드로 포획을 위해 비오틴에 접합될 수 있거나, 또는 디스플레이 라이브러리의 패닝 (panning)을 위한 임의의 다른 방법에 사용될 수 있다. 느린 해리 동역학 (예를 들어, 우수한 결합 친화도)을 갖는 항체의 선택은, Bass et al., 1990, Proteins 8:309-14 및 WO 92/09690에 기재된 바와 같이, 긴 세척 및 일가 파지 디스플레이의 사용에 의해, 및 Marks et al., 1992, Biotechnol. 10:779-83에 기재된 바와 같은, 낮은 코팅 밀도의 항원의 사용에 의해, 촉진될 수 있다.

[0298] 항-넥틴-4 항체는, 관심의 파지 클론을 선택하기에 적절한 항원 스크리닝 절차를 설계한 다음, 상기 Kabat et

al.에 기재된, 관심 및 적절한 불변 영역 (예를 들어, Fc) 서열의 파지 클론으로부터, VH 및/또는 VL 서열 (예를 들어, Fv 서열), 또는 VH 및 VL 서열 유래의 다양한 CDR 서열을 사용하여 전장 항-넥틴-4 항체 클론의 구축에 의해 얻어질 수 있다.

[0299] 여기에 기재된 항체는 또한, 예를 들어, 키메라 항체를 포함할 수 있다. 키메라 항체는, 항체의 다른 부분이 다른 면역글로불린 분자로부터 유래된 분자이다. 예를 들어, 키메라 항체는, 인간 항체의 불변 영역에 융합된 마우스 또는 래트 단일클론 항체의 가변 영역을 함유할 수 있다. 키메라 항체를 생성하는 방법은, 기술분야에 알려져 있다. 예를 들어, Morrison, 1985, Science 229:1202; Oi et al., 1986, BioTechniques 4:214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods 125:191-202; 및 미국 특허 5,807,715, 4,816,567, 4,816,397, 및 6,331,415, 참조.

[0300] 여기에 기재된 것과 같은 기술을 사용하여 생성된 항체 또는 항원-결합 단편은, 표준의, 잘 알려진 기술을 사용하여 분리될 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 항원-결합 단편은, 예를 들어, 단백질 A-세파로스, 하이드록시라파 타이트 크로마토그래피, 겔 전기영동, 투석, 또는 친화성 크로마토그래피와 같은, 전통적인 면역글로불린 정제 절차에 의해, 예를 들어, 배양 배지, 복수 유체, 혈청, 세포 용해물, 합성 반응 물질 또는 이와 유사한 것으로부터 적절히 분리될 수 있다. 여기서 사용된 "단리된" 또는 "정제된" 항체는, 항체가 유래된 세포 또는 조직 공급원 유래의 세포질 물질 또는 기타 단백질이 실질적으로 없거나, 또는 화학적으로 합성된 경우 화학적 잔구체 또는 기타 화학물질이 실질적으로 없다.

[0301] 12. 항체 단편

[0302] 본 개시는 넥틴-4에 결합하는 항체 및 항체 단편을 제공한다. 어떤 상황에서, 전체 항체 외에, 항체 단편을 사용하는 것은 장점이 있다. 더 작은 크기의 단편은, 신속한 제거를 가능하게 하며, 세포, 조직, 또는 기관에 대한 개선된 접근성으로 이어질 수 있다. 어떤 항체 단편의 검토를 위해, Hudson et al., 2003, Nature Med. 9:129-34을 참조한다.

[0303] 항체 단편의 생성을 위한 다양한 기술은 개발되었다. 전통적으로, 이들 단편은, 온전한 항체의 단백질 가수분해 소화 (proteolytic digestion)를 통해 유래된다 (예를 들어, Morimoto et al., 1992, J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-17; 및 Brennan et al., 1985, Science 229:81-83, 참조). 그러나, 이들 단편은, 지금 재조합 숙주 세포에 의해 직접 생성될 수 있다. Fab, Fv 및 scFv 항체 단편은, E. coli 또는 효모 세포에서 모두 발현되고, 분비될 수 있고, 따라서 이들 단편의 용이한 대량 생산을 가능하게 한다. 항체 단편은, 위에서 논의된 항체 파지 라이브러리로부터 단리될 수 있다. 선택적으로, Fab'-SH 단편은, E. coli로부터 직접 회수될 수 있고, 화학적으로 연결될 수 있어 F(ab')₂ 단편을 형성한다 (Carter et al., 1992, Bio/Technology 10:163-67). 또 다른 접근법에 따르면, F(ab')₂ 단편은, 재조합 숙주 세포 배양물로부터 직접 단리될 수 있다. 인양 수용체 결합 에피토프 잔기 (salvage receptor binding epitope residues)를 포함하는 증가된 생체 내 반감기를 갖는 Fab 및 F(ab')₂ 단편은, 예를 들어, 미국 특허 제5,869,046호에 기재되어 있다. 항체 단편의 생성을 위한 기타 기술은 당업자에게 명백할 것이다. 어떤 구체 예에서, 항체는, 단일쇄 Fv 단편 (scFv)이다 (예를 들어, WO 93/16185; 미국 특허 5,571,894 및 5,587,458, 참조). Fv 및 scFv는, 불변 영역이 없는 온전한 결합 부위를 가지며; 따라서, 이들은 생체 내 사용 동안 감소된 비특이적 결합에 적합할 수 있다. scFv 융합 단백질은, scFv의 아미노 또는 카르복시 말단에서 이펙터 단백질의 융합을 산출하도록 구축될 수 있다 (예를 들어, 상기 Borrebaeck ed., 참조). 항체 단편은 또한, 예를 들어, 상기 인용된 문헌에 기재된 바와 같은, "선형 항체"일 수 있다.

[0304] 더 작은 항체-유도된 결합 구조는, 단일 가변 도메인 항체 (sdAbs)이라고도 하는 개별적인 가변 도메인 (V 도메인)이다. 특정 타입의 유기체인, 낙타류 및 연골 어류는, 이들의 면역계의 일부로서 Fc 등가 도메인 구조 상에 장착된 고 친화도 단일 V-유사 도메인 (V-like domains)을 보유한다. (Woolven et al., 1999, Immunogenetics 50:98-101; 및 Streltsov et al., 2004, Proc Natl Acad Sci USA. 101:12444-49). V-유사 도메인 (낙타에서 VhH, 및 상어에서 V-NAR이라 불림)은, 표적 항원의 공동 (cavities)의 침투를 가능하게 하는, 긴 표면 루프 (surface loops)를 통상적으로 나타낸다. 이들은 또한, 소수성 표면 패치 (hydrophobic surface patches)를 마스킹하여 단리된 VH 도메인을 안정화시킨다.

[0305] 이들 VhH 및 V-NAR 도메인들은, sdAbs를 조작하는데 사용된다. 인간 V 도메인 변이체는, 파지 라이브러리 및 안정한, 높은 결합 VL- 및 VH-유래 도메인을 결과하는, 기타 접근법으로부터의 선택을 사용하여 설계된다.

[0306] 여기에 제공된 항체는, 면역글로불린 분자 및 면역글로불린 분자의 면역학적 활성 부분, 예를 들어, 넥틴-4 에

피토프에 결합하는 항원 결합 부위를 함유하는 분자를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 여기에 제공된 면역글로불린 분자는, 면역글로불린 분자의 임의의 부류 (예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD 및 IgA) 또는 임의의 서브부류 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)일 수 있다.

[0307] 항체의 변이체 및 유도체는, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 능력을 보유하는 항체 기능성 단편을 포함한다. 대표적인 기능성 단편은, Fab 단편 (예를 들어, 항원-결합 도메인을 함유하고, 이황화 결합에 의해 가교된 중쇄의 일부 및 경쇄를 포함하는 항체 단편); Fab' (예를 들어, 힌지 영역을 통한 중쇄의 부가적인 부분 및 Fab를 포함하는 단일 항원-결합 도메인을 함유하는 항체 단편); F(ab')₂ (예를 들어, 중쇄의 힌지 영역에서 쇠간 이황화 결합에 의해 연결된 2개의 Fab' 분자들; 상기 Fab' 분자는 같거나 다른 에피토프를 향할 수 있음); scFv로도 알려진, 가변 영역을 포함하는 단일 쇠 (예를 들어, 10-25개 아미노산의 사슬에 의해 함께 연결된 항체의 단일 경쇄 및 중쇄의 가변, 항원-결합 결정 영역); 이황화-연결된 Fv, 또는 dsFv (예를 들어, 이황화 결합에 의해 함께 연결된 항체의 단일 경쇄 및 중쇄의 가변, 항원-결합 결정 영역); 낙타화 VH (예를 들어, 항체의 단일 중쇄의 가변, 항원-결합 결정 영역, 여기서, VH 계면에서 몇몇 아미노산은 자연적으로 발생하는 낙타 항체의 중쇄에서 발견되는 것들임)를 포함한다.

[0308] 13. 인간화 항체

[0309] 여기에 기재된 항체는, 예를 들어, 인간화 항체, 예를 들어, 탈면역화 또는 복합 인간 항체를 포함할 수 있다.

[0310] 인간화 항체는, 인간 불변 영역 서열을 포함할 수 있다. 어떤 구체 예에서, 인간화 항체는, IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE를 포함하는, 임의의 부류의 면역글로불린, 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하는, 임의의 이소 타입으로부터 선택될 수 있다. 어떤 구체 예에서, 인간화 항체는 카파 또는 람다 경쇄 불변 서열을 포함할 수 있다.

[0311] 인간화 항체는, CDR-이식 (유럽 특허 EP 239,400; 국제 공개 번호 WO 91/09967; 및 미국 특허 5,225,539, 5,530,101, 및 5,585,089호), 베니어링 (veneering) 또는 재포장 (resurfacing) (유럽 특허 EP 592,106 및 EP 519,596; Padlan, 1991, Molecular Immunology 28(4/5):489-498; Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7(6):805-814; 및 Roguska et al., 1994, PNAS 91:969-973), 체인 셔플링 (chain shuffling) (미국 특허 5,565,332), 및 예를 들어, 미국 특허 6,407,213, 미국 특허 5,766,886, WO 9317105, Tan et al., J. Immunol. 169:111925 (2002), Caldas et al., Protein Eng. 13(5):353-60 (2000), Morea et al., Methods 20(3):26779 (2000), Baca et al., J. Biol. Chem. 272(16):10678-84 (1997), Roguska et al., Protein Eng. 9(10):895904 (1996), Couto et al., Cancer Res. 55(23 Supp):5973s-5977s (1995), Couto et al., Cancer Res. 55(8):1717-22 (1995), Sandhu JS, Gene 150(2):409-10 (1994), 및 Pedersen et al., J. Mol. Biol. 235(3):959-73 (1994)에 개시된 기술을 포함하지만, 이에 제한하지 않는, 기술분야에서 알려진 다양한 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 미국 공개 특허 US 2005/0042664 A1 (Feb. 24, 2005)을 또한 참조하고, 이의 전체적인 내용은 여기에 참조로서 병합된다.

[0312] 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 인간 넥틴-4를 포함하는, 넥틴-4에 결합하는 인간화 항체일 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 인간화 항체는, 표 1에 나타난 바와 같은 하나 이상의 CDRs를 포함할 수 있다. 비-인간 항체를 인간화하기 위한 다양한 방법은 기술분야에 알려져 있다. 예를 들어, 인간화 항체는, 비-인간인 공급원으로부터 도입된 하나 이상의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 이들 비-인간 아미노산 잔기는, 종종 "외래 (import)" 잔기로 지칭되며, 이는 통상적으로 "외래" 가변 도메인으로부터 취해진다. 인간화는, 인간 항체의 상응하는 서열에 대해 추가된 영역 서열을 치환하여, 예를 들어, Jones et al., 1986, Nature 321:522-25; Riechmann et al., 1988, Nature 332:323-27; 및 Verhoeyen et al., 1988, Science 239:1534-36의 방법에 따라 수행될 수 있다.

[0313] 몇몇 경우에서, 인간화 항체는, CDR 이식에 의해 구축되며, 여기서, 모 비-인간 항체 (예를 들어, 설치류)의 6 개의 CDRs의 아미노산 서열은 인간 항체 프레임워크 상으로 이식된다. 예를 들어, Padlan et al.은, CDRs에서 잔기 중 약 1/3만이 실제로 항원과 접촉하는 것을 알아내고, 이를 "특이성 결정 잔기" 또는 SDRs라고 명명했다 (Padlan et al., 1995, FASEB J. 9:133-39). SDR 이식의 기술에서, 오직 SDR 잔기들은 인간 항체 프레임워크 상으로 이식된다 (예를 들어, Kashmiri et al., 2005, Methods 36:25-34, 참조).

[0314] 인간화 항체를 만드는데 사용되는, 경쇄 및 중쇄 모두의, 인간 가변 도메인의 선택은, 항원성 (antigenicity)을 감소시키는데 중요할 수 있다. 예를 들어, 소위 "최-적합" 방법에 따르면, 비-인간 (예를 들어, 설치류) 항체의 가변 도메인의 서열은, 알려진 인간 가변-도메인 서열의 전체 라이브러리에 대해 스크리닝된다. 설치류의 서열에 가장 가까운 인간 서열은, 인간화 항체에 대한 인간 프레임워크로서 선택될 수 있다 (Sims et al., 1993, J.

Immunol. 151:2296-308; 및 Chothia et al., 1987, J. Mol. Biol. 196:901-17). 또 다른 방법은, 경쇄 또는 중쇄의 특정 서브그룹의 모든 인간 항체의 공통 서열로부터 유래된 특정 프레임워크를 사용한다. 동일한 프레임워크는, 여러 다른 인간화 항체에 대해 사용될 수 있다 (Carter et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285-89; Presta et al., 1993, J. Immunol. 151:2623-32). 어떤 경우에서, 프레임워크는, 가장 풍부한 인간 서브부류인, V_L6 서브그룹 I (V_L6I), 및 V_H 서브그룹 III (V_HIII)의 공통 서열로부터 유래된다. 또 다른 방법에서, 인간 생식계열 유전자는, 프레임워크 영역들의 공급원으로서 사용된다.

[0315] 초인간화 (superhumanization)라 불리는, CDRs의 비교에 기초한 선택적 패러다임에서, FR 상동성은 무의미하다. 이 방법은, 비-인간 서열과 기능성 인간 생식계열 유전자 레퍼토리의 비교로 이루어진다. 귀과 서열과 동일하거나 밀접하게 관련된 표준 구조 (canonical structures)를 인코딩하는 유전자는 그 다음 선택된다. 다음으로, 비-인간 항체와 표준 구조를 공유하는 유전자 내에서, CDRs 내에서 가장 높은 상동성을 갖는 것들은 FR 공여체로서 선택된다. 마지막으로, 비-인간 CDRs는 이들 FRs 상으로 이식된다 (예를 들어, Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-25, 참조).

[0316] 항체는 항원에 대한 이들의 친화도 및 기타 유리한 생물학적 특성을 유지하면서 인간화되는 것이 일반적으로 더욱 바람직하다. 이러한 목적을 달성하기 위해, 하나의 방법에 따르면, 인간화 항체는, 모 서열 및 인간화 서열의 3-차원 모델을 사용하여 다양한 개념적 인간화 생성물 및 모서열의 분석의 과정에 의해 제조된다. 3-차원 면역글로불린 모델은, 일반적으로 이용 가능하고, 기술분야의 당업자에게 친숙하다. 선택된 후보 면역글로불린 서열의 가능한 3-차원 입체 구조를 예시하고, 디스플레이하는 컴퓨터 프로그램은 이용 가능하다. 이들은, 예를 들어, WAM (Whitelegg and Rees, 2000, Protein Eng. 13:819-24), Modeller (Sali and Blundell, 1993, J. Mol. Biol. 234:779-815), 및 Swiss PDB Viewer (Guex and Peitsch, 1997, Electrophoresis 18:2714-23)을 포함한다. 이들 디스플레이의 검사는, 후보 면역글로불린 서열의 기능에서 잔기의 가능한 역할의 분석, 예를 들어, 후보 면역글로불린이 이의 항원에 결합하는 능력에 영향을 미치는 잔기의 분석을 가능하게 한다. 이러한 방식으로, FR 잔기는, 표적 항원(들)에 대한 증가된 친화도와 같은, 원하는 항체 특성이 달성되도록, 수용자 (recipient) 및 외래 서열로부터 선택되고 조합될 수 있다. 일반적으로, 추가변 영역 잔기는, 항원 결합에 영향을 미치는데 있어서 직접적이고 가장 실질적으로 관여된다.

[0317] 항체 인간화를 위한 또 다른 방법은, Human String Content (HSC)로 지칭되는 항체 인간성 (antibody humanness)의 측정기준에 기초한다. 이 방법은, 마우스 서열을 인간 생식계열 유전자의 레퍼토리와 비교하고, 그 차이는 HSC로 채점된다. 표적 서열은 그 다음 다수의 다양한 인간화된 변이체를 발생하기 위해 전체적 동일성 측정 (global identity measure)을 사용하는 대신 이의 HSC를 최대화하여 인간화된다 (Lazar et al., 2007, Mol. Immunol. 44:1986-98).

[0318] 전술된 방법에 부가하여, 실험적 방법은, 인간화 항체를 발생 및 선택하는데 사용될 수 있다. 이들 방법은, 인간화 변이체의 큰 라이브러리의 발생, 및 농축 기술 또는 고속 대량 스크리닝 기술을 사용하는 최적 클론의 선택에 기초한 방법을 포함한다. 항체 변이체는, 박테리아 콜로니 스크리닝뿐만 아니라 파지, 리보솜, 및 효모 디스플레이 라이브러리로부터 단리될 수 있다 (예를 들어, Hoogenboom, 2005, Nat. Biotechnol. 23:1105-16; Dufner et al., 2006, Trends Biotechnol. 24:523-29; Feldhaus et al., 2003, Nat. Biotechnol. 21:163-70; 및 Schlapschky et al., 2004, Protein Eng. Des. Sel. 17:847-60, 참조).

[0319] FR 라이브러리 접근법에서, 잔기 변이체의 수집은, FR에서 특정 위치에 도입된 후, 이식된 CDR을 가장 잘 지지하는 FR을 선택하기 위해 라이브러리를 스크리닝한다. 치환될 잔기는, Baca et al. (1997, J. Biol. Chem. 272:10678-84)에 의해 확인된 표적 잔기의 더 제한된 세트로부터, 또는 CDR 구조에 잠재적으로 기여하는 것으로 확인된 "버니어 (Vernier)" 잔기의 일부 또는 전부 (예를 들어, Foote and Winter, 1992, J. Mol. Biol. 224:487-99, 참조)를 포함할 수 있다.

[0320] FR 셔플링 (FR shuffling)에서, 전체 FRs은, 선택된 잔기 변이체의 조합 라이브러리를 생성하는 대신에 비-인간 CDR과 조합된다 (예를 들어, Dall'Acqua et al., 2005, Methods 36:43-60, 참조). 라이브러리는, 먼저 VL을 인간화 한 후 VH가 수반되는, 2-단계 공정에서 결합하기 위해 스크리닝될 수 있다. 선택적으로, 1-단계 FR 셔플링 공정은 사용될 수 있다. 이러한 공정은, 그 결과로 생긴 항체가 향상된 발현, 증가된 친화도, 및 열 안정성을 포함하는 개선된 생화학적 및 물리화학적 특성을 나타냄에 따라, 2-단계 스크리닝보다 더 효율적인 것으로 나타났다 (예를 들어, Damschroder et al., 2007, Mol Immunol. 44:3049-60, 참조).

[0321] "휴머니어링 (humaneering)" 방법은, 필수 최소 특이성 결정인자 (MSDs)의 실험적 확인에 기초하고, 인간 FRs의 라이브러리 내로 비-인간 단편의 순차적인 대체 및 결합의 평가에 기초한다. 이것은, 비-인간 VH 및 VL 사슬의

CDR3 영역들로 시작하고, VH 및 VL 모두의 CDR1 및 CDR2를 포함하는, 인간 FRs 내로 비-인간 항체의 다른 영역들을 점진적으로 대체한다. 이 방법론은 통상적으로 별개의 인간 V-세그먼트 CDRs를 갖는 다수의 서브부류 유래의 항체의 에피토프 보유 및 확인을 결과한다. 휴먼니어링은, 인간 생식계열 유전자 항체와 91-96% 상동성인 항체의 분리를 가능하게 한다 (예를 들어, Alfenito, Cambridge Healthtech Institute's Third Annual PEGS, The Protein Engineering Summit, 2007, 참조).

[0322] "인간 공학 (human engineering)" 방법은, 원래의 비-인간 항체의 바람직한 결합 특성을 여전히 유지하면서, 인간에서 감소된 면역원성을 갖는 변형된 항체를 생성하기 위해, 항체의 아미노산 서열에 특이적 변화를 만들어서, 비-인간 항체 또는 항체 단편, 예컨대, 마우스 또는 키메라 항체 또는 항체 단편을 변경시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 상기 기술은 비-인간 (예를 들어, 마우스) 항체의 아미노산 잔기를 "저 위험", "중간 위험", 또는 "고 위험" 잔기로 분류하는 단계를 포함한다. 상기 분류는, 치환이 그 결과로 생긴 항체의 폴딩에 영향을 미칠 위험에 대해 특정 치환을 만드는 것의 예측된 이점 (예를 들어, 인간에서 면역원성)을 평가하는 전체적 위험/보상 계산을 사용하여 수행된다. 비-인간 (예를 들어, 마우스) 항체 서열의 정해진 위치 (예를 들어, 저 위험 또는 중간 위험)에서 치환될 특정 인간 아미노산 잔기는, 특이적 또는 공통 인간 항체 서열의 상응하는 영역으로 비-인간 항체의 가변 영역으로부터 아미노산 서열을 정렬하여 선택될 수 있다. 비-인간 서열에서 저 또는 중간 위험 위치들에서 아미노산 잔기는, 정렬에 따라 인간 항체 서열에서 상응하는 잔기에 대해 치환될 수 있다. 인간 조작된 단백질을 만드는 기술은, Studnicka et al., 1994, Protein Engineering 7:805-14; 미국 특허 5,766,886; 5,770,196; 5,821,123; 및 5,869,619; 및 PCT 공개 WO 93/11794호에 더욱 상세히 기재되어 있다.

[0323] 복합 인간 항체는, 예를 들어, Composite Human Antibody™ technology (Antitope Ltd., Cambridge, United Kingdom)을 사용하여 발생될 수 있다. 복합 인간 항체를 발생시키기 위해, 가변 영역 서열은, T 세포 에피토프를 피하는 방식으로 다수의 인간 항체 가변 영역 서열의 단편으로부터 설계되고, 이에 의해 그 결과로 생긴 항체의 면역원성을 최소화시킨다. 이러한 항체는, 인간 불변 영역 서열, 예를 들어, 인간 경쇄 및/또는 중쇄 불변 영역들을 포함할 수 있다.

[0324] 탈면역화된 항체는, T-세포 에피토프가 제거된 항체이다. 탈면역화된 항체를 제조하는 방법들은 기재되어 있다. 예를 들어, Jones et al., Methods Mol Biol. 2009;525:405-23, xiv, and De Groot et al., Cell. Immunol. 244:148-153 (2006)을 참조한다. 탈면역화된 항체는, T-세포 에피토프-결합 가변 영역들 및 인간 불변 영역들을 포함한다. 간략하게, 항체의 VH 및 VL은 클로닝되고, T-세포 에피토프는 T 세포증식 분석에서 항체의 VH 및 VL로부터 유래된 증점 펩티드를 시험하여 나중에 확인된다. T 세포 에피토프는, 인간 MHC 부류 II에 대한 펩티드 결합을 확인하기 위해 인실리코 (in silico) 방법을 통해 확인된다. 인간 MHC 부류 II에 대한 결합을 저지하기 위해 돌연변이는 VH 및 VL에 도입된다. 돌연변이된 VH 및 VL는 그 다음 탈면역화된 항체를 발생시키기 위해 활용된다.

[0325] 14. 인간 항체

[0326] 특별한 구체 예에서, 항체는 완전 인간 항-인간 항체이다. 완전 인간 항체는, 기술분야에 알려진 임의의 방법에 의해 생성될 수 있다. 인간 항-넵탄-4 항체는, 인간-유래 파지 디스플레이 라이브러리로부터 선택된 Fv 클론 가변 도메인 서열(들)을 알려진 인간 불변 도메인 서열(들)과 조합하여 구축될 수 있다. 선택적으로, 본 개시의 인간 단일클론 항-넵탄-4 항체는, 하이브리도마 방법에 의해 만들어질 수 있다. 인간 단일클론 항체의 생성을 위한 인간 골수종 및 마우스-인간 이종골수종 세포주들은, 예를 들어, Kozbor, 1984, J. Immunol. 133:3001-05; Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63 (1987); 및 Boerner et al., 1991, J. Immunol. 147:86-95에 기재되어 있다.

[0327] 면역화 시, 내인성 면역글로불린 생성의 부재하에서 인간 항체의 완전한 레퍼토리를 생성할 수 있는, 유전자변형 동물 (예를 들어, 마우스)을 생성하는 것은 또한 가능하다. 인간 항체 레퍼토리를 발현하는 유전자변형 마우스는, 광범위한 잠재적 약물 표적에 대해 고-친화도 인간 서열 단일클론 항체를 발생시키는데 사용된다 (예를 들어, Jakobovits, A., 1995, Curr. Opin. Biotechnol. 6(5):561-66; Brüggenmann and Taussing, 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8(4):455-58; 미국 특허 6,075,181 및 6,150,584; 및 Lonberg et al., 2005, Nature Biotechnol. 23:1117-25, 참조).

[0328] 선택적으로, 인간 항체는, 표적 항원을 향하는 항체를 생성하는 인간 B 림프구의 불멸화 (immortalization)를 통해 제조될 수 있다 (예를 들어, 이러한 B 림프구는 개체로부터 회복될 수 있거나 또는 시험관에서 면역화될

수 있다) (예를 들어, Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (1985); Boerner et al., 1991, J. Immunol. 147(1):86-95; 및 미국 특허 5,750,373, 참조).

[0329] 유전자 서플링은 또한 비-인간, 예를 들어, 설치류, 항체 유래의 인간 항체들을 유도하는데 사용될 수 있으며, 여기서, 인간 항체는 출발 비-인간 항체와 유사한 친화도 및 특이성을 갖는다. "에피토프 임프린팅 (epitope imprinting)" 또는 "가이드 선택 (guided selection)"으로도 불리는, 이 방법에 따르면, 여기에 기재된 파지 디스플레이 기술에 의해 얻어진 비-인간 항체 단편의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역은, 인간 V 도메인 유전자의 레퍼토리로 대체되어, 비-인간 사슬/인간 사슬 scFv 또는 Fab 키메라의 모집단을 생성한다. 항원으로 선택은, 비-인간 사슬/인간 사슬 키메라 scFv 또는 Fab의 단리를 결과하고, 여기서, 인간 사슬은 일차 파지 디스플레이 클론에서 상응하는 비-인간 사슬의 제거시 파괴된 항원 결합 부위 (예를 들어, 인간 사슬 파트너의 선택을 가이드하는 (임프린트하는) 에피토프)를 회복시킨다. 공정이 나머지 비-인간 사슬을 대체하기 위해 반복되는 경우, 인간 항체는 얻어진다 (예를 들어, PCT WO 93/06213; 및 Osbourn et al., 2005, Methods 36:61-68, 참조). CDR 이식에 의한 비-인간 항체의 전통적인 인간화와는 달리, 이 기술은, 비-인간 기원의 FR 또는 CDR 잔기가 없는, 완전한 인간 항체를 제공한다. 세포 표면 항원을 향하는 마우스 항체를 인간화하기 위한 가이드 선택의 예로는, 난소암 세포 상에 존재하는 엽산-결합 단백질 (예를 들어, Figini et al., 1998, Cancer Res. 58:991-96, 참조) 및 간세포 암종에서 매우 높게 발현되는, CD147 (예를 들어, Bao et al., 2005, Cancer Biol. Ther. 4:1374-80, 참조)을 포함한다.

[0330] 가이드 선택 접근법의 잠재적 단점은, 하나의 항체 사슬을 서플링하면서 다른 하나를 일정하게 유지하면 에피토프 드리프트 (epitope drift)를 결과할 수 있다는 점이다. 비-인간 항체에 의해 인식되는 에피토프를 유지하기 위해, CDR 보유는 적용될 수 있다 (예를 들어, Klimka et al., 2000, Br. J. Cancer. 83:252-60; 및 Beiboer et al., 2000, J. Mol. Biol. 296:833-49, 참조). 이 방법에서, 비-인간 VH CDR3은, 이 CDR이 항원-결합 부위의 중심에 있을 수 있고, 항원 인식을 위한 항체의 가장 중요한 영역일 수 있음에 따라, 일반적으로 유지된다. 그러나, 몇몇 사례에서, 비-인간 항체의 VH CDR2, VL CDR2, 및 VL CDR1뿐만 아니라, VH CDR3 및 VL CDR3은 유지될 수 있다.

[0331] 15. 다가 항체

[0332] 다가 항체는, 항체가 결합하는 항원을 발현하는 세포에 의해 2가 항체보다 더 빨리 내재화 (internalized) (및/또는 이화 (catabolized))될 수 있다. 본 개시의 항체는, 항체의 폴리펩티드 사슬을 인코딩하는 핵산의 재조합 발현에 의해 쉽게 생성될 수 있는, 3 이상의 항원 결합 부위를 갖는 (IgM 부류 이외) 다가 항체 (예를 들어, 4가 항체)일 수 있다. 다가 항체는, 이량체화 도메인 및 3 이상의 항원 결합 부위를 포함할 수 있다. 어떤 구체 예에서, 이량체화 도메인은 Fc 영역 또는 힌지 영역을 포함하거나 (또는 이루어진다). 이 시나리오에서, 항체는, Fc 영역 및 Fc 영역에 대한 아미노-말단의 3 이상의 항원 결합 부위를 포함할 것이다. 어떤 구체 예에서, 다가 항체는, 3 내지 약 8의 항원 결합 부위를 포함하거나 (또는 이루어진다). 하나의 이러한 구체 예에서, 다가 항체는, 4의 항원 결합 부위를 포함하거나 (또는 이루어진다). 다가 항체는, 적어도 하나의 폴리펩티드 사슬 (예를 들어, 2개의 폴리펩티드 사슬)를 포함하며, 여기서, 폴리펩티드 사슬(들)은 2 이상의 가변 도메인을 포함한다. 예를 들어, 폴리펩티드 사슬(들)은, VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc를 포함할 수 있으며, 여기서, VD1은 제1 가변 도메인이고, VD2는 제2 가변 도메인이며, Fc는 Fc 영역의 하나의 폴리펩티드 사슬이고, X1 및 X2는 아미노산 또는 폴리펩티드를 나타내고, n은 0 또는 1이다. 예를 들어, 폴리펩티드 사슬(들)은: VH-CH1-유연한 링커-VH-CH1-Fc 영역 사슬; 또는 VH-CH1-VH-CH1-Fc 영역 사슬을 포함할 수 있다. 여기에서의 다가 항체는, 적어도 2 (예를 들어, 4)의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 더욱 포함할 수 있다. 여기에서의 다가 항체는, 예를 들어, 약 2 내지 약 8의 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 여기서 고려되는 경쇄 가변 도메인 폴리펩티드는, 경쇄 가변 도메인을 포함하고, 선택적으로, CL 도메인을 더욱 포함한다.

[0333] 16. Fc 엔지니어링 (Fc Engineering)

[0334] Fc 엔지니어링에 의해 여기에 제공된 항-넥틴-4 항체를 변형시키는 것은 바람직할 수 있다. 어떤 구체 예에서, 항체의 Fc 영역에 대한 변형은, 항체의 이펙터 기능의 감소 또는 제거를 결과한다. 어떤 구체 예에서, 이펙터 기능은, ADCC, ADCP, 및/또는 CDC이다. 몇몇 구체 예에서, 이펙터 기능은, ADCC이다. 다른 구체 예에서, 이펙터 기능은, ADCP이다. 다른 구체 예에서, 이펙터 기능은 CDC이다. 하나의 구체 예에서, 이펙터 기능은 ADCC 및 ADCP이다. 하나의 구체 예에서, 이펙터 기능은 ADCC 및 CDC이다. 하나의 구체 예에서, 이펙터 기능은 ADCP 및 CDC이다. 하나의 구체 예에서, 이펙터 기능은 ADCC, ADCP 및 CDC이다. 이는 항체의 Fc 영역에서 하나 이상의 아미노산 치환을 도입하여 달성될 수 있다.

- [0335] 항체의 혈청 반감기를 증가시키기 위해, 예를 들어, 미국 특허 제5,739,277호에 기재된 바와 같이, 인양 수용체 결합 에피토프를 항체 (특히 항체 단편)에 혼입시킬 수 있다. 용어 "인양 수용체 결합 에피토프"는, IgG 분자의 생체 내 혈청 반감기를 증가시키는 역할을 하는 IgG 분자 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4)의 Fc 영역의 에피토프를 지칭한다.
- [0336] 17. 선택적인 결합제
- [0337] 본 개시는, 여기에 개시된 항-넥틴-4 항체와 동일한 에피토프에 특이적으로 결합하는 비-면역글로불린 결합제를 포괄한다. 몇몇 구체 예에서, 비-면역글로불린 결합제는, 경쟁적 결합 분석에서 본 개시의 항-넥틴-4 항체를 대체하거나 또는 항-넥틴-4 항체에 의해 대체되는 작용제로 확인된다. 이들 선택적인 결합제는, 예를 들어, 기술 분야에 알려진 조작된 단백질 스캐폴드 (engineered protein scaffolds) 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 이러한 스캐폴드는, 표 1에 나타낸 바와 같은 하나 이상의 CDRs를 포함할 수 있다. 이러한 스캐폴드는, 예를 들어, 리간드 결합 부위를 형성하는 4개의 추가변 루프를 지지하는 단단한 베타-배럴 (beta-barrel)을 특징으로 하는 단백질 구조인, 리포칼린 스캐폴드 (lipocalin scaffold)에 기초한, 안티칼린 (anticalins)을 포함한다. 새로운 결합 특이성은, 기능적 디스플레이 및 가이드된 선택과 조합하여, 루프 영역에서 표적화된 랜덤 돌연변이유발에 의해 조작될 수 있다 (예를 들어, Skerra, 2008, FEBS J. 275:2677-83, 참조). 다른 적절한 스캐폴드는, 예를 들어, 인간 피브로넥틴 III의 10번째 세포외 도메인에 기초한, 아드넥틴 (adnectins), 또는 모노바디 (예를 들어, Koide and Koide, 2007, Methods Mol. Biol. 352:95-109, 참조); 포도상구균 단백질 A의 Z 도메인에 기초한, 항체-모방단백질 (affibody) (예를 들어, Nygren et al., 2008, FEBS J. 275:2668-76, 참조); 안키린 반복 단백질에 기초한, DARPins (예를 들어, Stumpp et al., 2008, Drug. Discov. Today 13:695-701, 참조); 인간 Fyn 단백질 키나제의 SH3 도메인을 기초한, 피노머 (fynomer) (예를 들어, Grabulovski et al., 2007, J. Biol. Chem. 282:3196-204, 참조); 솔포로부스 엑시돌아리우스 (*Sulfolobus acidolarius*) 유래의 Sac7d에 기초한, 아피틴 (예를 들어, Krehenbrink et al., 2008, J. Mol. Biol. 383:1058-68], 참조); 인간 y-B-크리스탈린에 기초한, 아필린 (예를 들어, Ebersbach et al., 2007, J. Mol. Biol. 372:172-85, 참조); 막 수용체 단백질의 A 도메인에 기초한, 아미머 (예를 들어, Silverman et al., 2005, Biotechnol. 23:1556-61, 참조); 시스템인-풍부 노틴 펩티드 (예를 들어, Kolmar, 2008, FEBS J. 275:2684-90, 참조); 및 유전자 조작된 쿠니츠-형 억제제 (예를 들어, Nixon and Wood, 2006, Curr. Opin. Drug. Discov. Dev. 9:261-68, 참조)를 포함할 수 있다. 검토를 위해, 예를 들어, Gebauer and Skerra, 2009, Curr. Opin. Chem. Biol. 13:245-55을 참조한다.
- [0338] 18. 넥틴-4 특이적 항체에 대한 스크리닝
- [0339] 항체를 발생시키는 기술은 위에 기재되어 있다. 항체는, 원하는 바와 같은, 특정 생물학적 특징, 예컨대, 넥틴-4에 대한 이들의 결합 특이성을 위해 더욱 스크리닝되거나 또는 선택될 수 있다. 표적 항원에 특이적인 항체를 스크리닝하는 것은 2개의 관점을 포함한다. 먼저, 항체를 스크리닝하여 넥틴-4를 함유하지 않는 샘플에 결합하지 않거나 또는 결합이 낮은 것을 확인한다. 스크리닝의 이러한 관점은, 넥틴-4를 특이적으로 인식하고 결합하지만, 넥틴-4 이외의 분자를 실질적으로 인식하거나 또는 결합하지 않는 항체를 확인한다. 둘째, 넥틴-4를 포함하는 샘플에 강력하게 또는 높은 친화도로 결합하는 것을 확인하기 위해 항체를 스크리닝한다. 스크리닝의 이러한 관점은, 넥틴-4에 대해 높은 친화도를 가지며, 이하 기재된 바와 같은 다양한 분석에서 강한 검출 신호를 제공할 수 있는 항체를 확인한다. 두 관점에서 항체의 스크리닝은, 이하 더욱 기재된 면역분석을 사용하여 달성될 수 있다.
- [0340] 어떤 구체 예에서, 마이크로타이터 플레이트 (microtiter plates)가 넥틴-4 단백질 또는 이의 단편으로 코팅된, ELISA를 사용하여 항체는 초기에 스크리닝된다. 고정화된 넥틴-4에 결합하지 않거나 또는 약하게 결합하는 항체의 클론은 제거된다. 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4에 결합하는 항체는, 예를 들어, 넥틴-1, 넥틴-2, 또는 넥틴-3으로 코팅된 마이크로타이터 플레이트를 사용하여, 다른 넥틴 동형단백질 (isoform)에, 면역분석, 예를 들어, ELISA-기반 분석 또는 웨스턴 블로팅 분석에서 반응성을 위해 더욱 스크리닝될 수 있다. 넥틴의 또 다른 동형단백질에 반응성인 항체의 클론은 제거되고, 오직 넥틴-4에 반응성인 항체의 클론은 추가 스크리닝을 위해 선택될 수 있다.
- [0341] 항-넥틴-4 항체는, 낮은 수준의 넥틴-4를 발현하거나 또는 발현하지 않는 음성 대조군에 대한 이의 결합에 대해 더욱 스크리닝될 수 있다. 이러한 스크린의 경우, 항체의 다양한 클론과 음성 대조군 사이에 결합은, 면역분석, 예를 들어, IHC 분석, ELISA 분석, 또는 면역블로팅 분석에서 결정될 수 있다. 임의의 음성 대조군에 반응성인 항체의 클론은 제거된다. 다른 음성 대조군 (예를 들어, 넥틴-4 발현에 대해 음성인 다른 조직 또는 세포주)은, 다른 세트의 분자를 함유할 수 있고, 따라서, 다중 음성 대조군들은, 후보 항-넥틴-4 항체가 다양한 세트의 비-

넥틴-4 분자에 대해 선택되는 것을 보장하기 위해 사용될 수 있다.

- [0342] 항-넥틴-4 항체는, 넥틴-4를 발현하는 것으로 알려진 양성 대조군에 대한 결합을 위해 더욱 스크리닝될 수 있다. 이러한 스크리닝을 위해, 항체의 다양한 클론과 양성 대조군 사이에 결합은, 면역분석, 예를 들어, IHC 분석, ELISA 분석, 또는 면역블로팅 분석에서 결정될 수 있다. 양성 대조군에 강한 결합을 갖는 항체의 클론은 선택된다. 양성 대조군에 강하게 결합하고, 음성 대조군에 약하게 결합하는 항-넥틴-4 항체는, 넥틴-4에 특이적인 항체로서 선택될 수 있다. 양성 및 음성 대조군에 결합된 항-넥틴-4 항체의 양 사이에 차이는, 넥틴-4에 대한 상기 항-넥틴-4 항체의 특이적 결합이다. 특이적 결합은, 특이적 항-넥틴-4 항체를 선택하기 위한 기준 중 하나로서 사용될 수 있다. 특이적 항체는, 이하 상세히 기재된 면역분석에서 높은 특이적 결합을 제공한다.
- [0343] 몇몇 구체 예에서, 항-넥틴-4 항체의 특이성은, 다른 수단에 의해 결정된 이들 기준에서 알려진 넥틴-4 발현 수준으로 음성 및 양성 기준에 대한 항-넥틴-4 항체 결합을 상호관련시키거나 또는 비교하여 결정될 수 있다. 기준 넥틴-4 발현은, 이하 기재된 바와 같이, 양성 넥틴-4 대조군 또는 음성 넥틴-4 대조군일 수 있다. 특이적 항-넥틴-4 항체의 샘플 또는 기준에 대한 결합은, 샘플 또는 기준에서의 넥틴-4 발현과 상호관련되거나 비례적일 수 있다. 즉, 특이적 항-넥틴-4 항체는, 높은 수준의 넥틴-4를 발현하는 샘플 또는 기준에 강하게 결합하고, 중간 수준을 발현하는 것에 적당히 결합하며, 저수준을 발현하는 것에 약하게 결합하고, 넥틴-4를 발현하지 않는 것에는 최소로 결합한다 (예를 들어, 이소타입 대조군 항체가 결합하는 동일한 수준으로 대략적으로 결합한다). 음성 또는 양성 대조군에서 알려진 넥틴-4 발현은, 이하 상세하게 기재된 qPCR 분석에 의해 독립적으로 결정될 수 있다. 알려진 넥틴-4 발현은 또한 넥틴-4 특이적인 것으로 이전에 결정된 항-넥틴-4 항체로 이하 기재된 임의의 면역분석을 사용하여 독립적으로 결정될 수 있다. 음성 및 양성 대조군에서 넥틴-4 발현을 확인하기 위한 적절한 면역분석은, 제한 없는 예로서, 이하 상세히 기재된 바와 같은, IHC 분석, 면역블로팅 분석, FACS 분석, 또는 ELISA를 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4 mRNA 수준은, 이하 기재된 바와 같은, 분석의 배경 소음 또는 생물학적으로 무의미한 낮은 수준의 잔류 넥틴-4로 인해, 음성 대조군에서 0이 아닐 수 있다. 예를 들어, 음성 넥틴-4 대조군은, 예를 들어, qPCR 분석에서 넥틴-4 mRNA 수준이 비특이적 프라이머의 세트로부터 검출된 mRNA 수준과 실질적으로 유사한 경우, 또는 넥틴-4 mRNA 수준이 양성 넥틴-4 대조군에서 넥틴-4 mRNA 수준을 고려하여 생물학적으로 무의미한 경우, 넥틴-4에 대해 음성인 것으로 정확히 간주될 수 있다. 유사하게, 음성 대조군에서 또 다른 넥틴-4 특이적 항체를 사용하여 면역분석에 의해 검출된 넥틴-4는, 분석의 배경 소음 또는 생물학적으로 무의미한 낮은 수준의 잔류 넥틴-4로 인해, 0이 아닐 수 있다. 배경 소음은, 항-넥틴-4 항체 외의 분석 시약과 샘플 사이에 비-특이적 상호작용에 의해 야기될 수 있다. 음성 넥틴-4 대조군은, 예를 들어, 넥틴-4 특이적 항체에 의해 검출된 음성 대조군에서 넥틴-4 수준이 동일한 분석에서 이소타입 대조군 항체로부터의 검출 수준과 실질적으로 유사한 경우, 넥틴-4에 대해 음성인 것으로 정확히 간주될 수 있다. 몇몇 분석에서, 배경 소음은, 양성 대조군에서 검출된 신호의 실질적인 퍼센트를 설명할 수 있다.
- [0344] 부가적으로, 양성 및 음성 대조군은, 양성 및/또는 음성 조직, (예를 들어, 세포주 포함하는) 세포, 및 병리학 적 샘플을 포함하여, 기술분야의 당업자에 의해 문헌에서 확인되고 공개되어 있다. 이러한 문헌은, (예를 들어, 넥틴-4, 발현, 양성, 음성, 및/또는 분포와 같은 검색 용어를 사용하여) Pubmed와 같은 데이터베이스를 검색하고, 검색 적중 (search hits)을 분석하여 쉽게 찾을 수 있다.
- [0345] 따라서, 넥틴-4 발현이 없는 음성 대조군 세포에 결합된 넥틴-4 특이적 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 상대적인 양은, 넥틴-4를 발현하는 양성 대조군에 결합된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 양의 약 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.03%, 0.01%, 0.001% 또는 그 이하일 수 있다.
- [0346] 여기서 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 몇몇 구체 예에서, 대조군 세포에서 음성 또는 양성 넥틴-4 발현은, qPCR 분석, 제2 항체를 이용한 IHC 분석, 제2 항체를 이용한 면역블로팅 분석, 제2 항체를 이용한 FACS 분석, 또는 제2 항체를 이용한 ELISA에 의해 독립적으로 결정된다.
- [0347] 여기에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 몇몇 구체 예에서, 세포에 결합된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 양은, IHC 분석, 면역블로팅 분석, FACS 분석, 또는 ELISA에 의해 결정된다.
- [0348] 19. 항체 변이체
- [0349] 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4에 결합하거나 또는 여기에 기재된 항체의 아미노산 서열 변형(들)은 고려된다. 예를 들어, 특이성, 열안정성, 발현 수준, 이펙터 기능, 글리코실화, 감소된면역원성, 또는 용해도를 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 개선하는 것은 바람직할 수 있다.

따라서, 여기에 기재된 항-넥틴-4 항체에 부가하여, 항-넥틴-4 항체 변이체가 제조될 수 있는 것도 고려된다. 예를 들어, 항-넥틴-4 항체 변이체는, 인코딩 DNA에 적절한 뉴클레오티드 변화를 도입하여, 및/또는 원하는 항체 또는 폴리펩티드의 합성에 의해, 제조될 수 있다. 기술분야의 당업자는, 아미노산 변화가 글리코실화 부위의 수 또는 위치의 변화 또는 막 앵커링 특징 (membrane anchoring characteristics)의 변경과 같은, 항-넥틴-4 항체의 번역-후 과정을 변경할 수 있음을 인식한다.

[0350] 몇몇 구체 예에서, 제1 잔기에서의 글루타민은, 또한 제공된 서열 내에 제1 글루타민을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 여기에 제공된 항체 중 어느 하나에서 피로글루타메이트로 치환될 수 있다. 이러한 치환은, 생리학적 조건에서 또는 시험관 내 또는 생체 외에서 pH 약 7의 완충액에서 자연적으로 발생한다. 이러한 치환은, 제1 글루타민을 갖는 폴리펩티드를 포함하는 항체를, 피로글루타메이트를 형성하기 위한 제1 글루타민 글루타미닐의 고리화가, 예를 들어, 아세테이트 및 트리플루오로아세테이트와 같은 약산의 용액에서, 선호되는 조건에 적용시켜 수행될 수 있다.

[0351] 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 예를 들어, 항체에 임의의 타입의 분자의 공유 부착에 의해, 화학적으로 변형된다. 항체 유도체는, 예를 들어, 글리코실화, 아세틸화, 페길화, 인산화, 아마이드 화, 알려진 보호/차단기에 의한 유도체화, 단백질 분해 절단, 세포질 리간드 또는 기타 단백질에 연결, 등에 의해 화학적으로 변형된 항체를 포함할 수 있다. 수많은 화학적 변형 중 어느 하나는, 특이적 화학적 절단, 아세틸화, 제형화, 튜니카마이신의 대사 합성, 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 알려진 기술에 의해 수행될 수 있다. 부가적으로, 항체는, 하나 이상의 비-고전적 아미노산을 함유할 수 있다.

[0352] 변형은, 천연 서열 항체 또는 폴리펩티드와 비교하여 아미노산 서열에서 변화를 결과하는 항체 또는 폴리펩티드를 인코딩하는 하나 이상의 코돈의 치환, 결실, 또는 삽입일 수 있다. 아미노산 치환은, 하나의 아미노산을 유사한 구조적 및/또는 화학적 특성을 갖는 또 다른 아미노산을 대체, 예컨대, 류신을 세린으로의 대체, 예를 들어, 보존적 아미노산 대체의 결과일 수 있다. 기술분야의 당업자에게 알려진 표준 기술은, 예를 들어, 아미노산-치환을 결과하는 부위-지향적 돌연변이유발 및 PCR-매개 돌연변이유발을 포함하여, 여기에 제공된 분자를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 돌연변이를 도입하는데 사용될 수 있다. 삽입 또는 결실은, 선택적으로 약 1 내지 5의 아미노산의 범위 내에 일 수 있다. 어떤 구체 예에서, 치환, 결실, 또는 삽입은, 원래의 분자에 대하여 25 미만의 아미노산 치환, 20 미만의 아미노산 치환, 15 미만의 아미노산 치환, 10 미만의 아미노산 치환, 5 미만의 아미노산 치환, 4 미만 아미노산 치환, 3 미만의 아미노산 치환, 또는 2 미만의 아미노산 치환을 포함한다. 특별한 구체 예에서, 치환은, 하나 이상의 예측된 비-필수 아미노산 잔기에서 만들어진 보존적 아미노산 치환이다. 허용된 변이는, 서열에 아미노산의 삽입, 결실, 또는 치환을 체계적으로 만들고, 전-장 또는 성숙 천연 서열 (mature native sequence)에 의해 나타나는 활성에 대한 그 결과로 생긴 변이체를 시험하여 결정될 수 있다.

[0353] 아미노산 서열 삽입은, 단일 또는 다수의 아미노산 잔기의 서열내 삽입뿐만 아니라, 하나의 잔기로부터 수백 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드까지의 길이 범위의 아미노- 및/또는 카르복실-말단 융합을 포함한다. 말단 삽입의 예로는, N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 항체를 포함한다. 항체 분자의 다른 삽입 변이체는, 항체의 혈청 반감기를 증가시키는 폴리펩티드 또는 (예를 들어, 항체-지향된 효소 프로드러그 요법 (prodrug therapy)에 대해) 효소에 대한 항체의 N- 또는 C-말단에 융합을 포함한다.

[0354] "보존적 아미노산 치환"은, 아미노산 잔기가 유사한 전하를 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 유사한 전하를 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 계열 (Families)은 기술분야에 정의되어 있다. 이들 계열은, 염기성 측쇄 (예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄 (예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄 (예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄 (예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄 (예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 선택적으로, 돌연변이는, 예컨대, 포화 돌연변이유발에 의해, 코딩 서열의 전부 또는 일부를 따라 무작위로 도입될 수 있고, 그 결과로 생긴 돌연변이는, 생물학적 활성을 위해 스크리닝되어 활성을 보유하는 돌연변이를 확인할 수 있다. 돌연변이유발 후에, 인코딩된 단백질은 발현될 수 있고, 단백질의 활성은 결정될 수 있다.

[0355] 항체의 생물학적 특성의 실질적인 변형은, (a) 치환의 구역에서 폴리펩티드 백본의 구조, 예를 들어, 시트 또는 나선형 형태, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성, 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는데 있어 이들의 효과가 크게 다른 치환을 선택하여 달성된다. 선택적으로, (예를 들어, 유사한 특성 및/또는 측쇄를 갖는 아미노산기 내에서) 보존적 치환은, 특성을 유지하거나 또는 크게 변화시키지 않기 위하여, 만들어질 수 있다. 아미노

산은, 이들의 측쇄의 특성에서 유사성에 따라 그룹화될 수 있다 (예를 들어, Lehninger, Biochemistry 73-75 (2d ed. 1975), 참조): (1) 비-극성: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M); (2) 비전하 극성: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q); (3) 산성: Asp (D), Glu (E); 및 (4) 염기성: Lys (K), Arg (R), His (H).

[0356] 선택적으로, 자연적으로 발생하는 잔기는, 공통 측-쇄 특성에 기초한 그룹: (1) 소수성: 노르류신 (Norleucine), Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) 산성: Asp, Glu; (4) 염기성: His, Lys, Arg; (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro; 및 (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe으로 나누어질 수 있다.

[0357] 비-보존적 치환은, 이들 부류 중 하나의 멤버를 또 다른 부류로 교환하는 것을 수반한다. 이러한 치환된 잔기는 또한 보존적 치환 부위로, 또는 잔여 (비-보존적) 부위로 도입될 수 있다. 따라서, 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 여기에 기재된 쥐과 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 여기에 기재된 쥐과 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 35% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 여기에 기재된 쥐과 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 40% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 여기에 기재된 쥐과 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 45% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 여기에 기재된 쥐과 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 50% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 여기에 기재된 쥐과 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 55% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 여기에 기재된 쥐과 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 여기에 기재된 쥐과 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 65% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 여기에 기재된 쥐과 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 70% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 여기에 기재된 쥐과 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 여기에 기재된 쥐과 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 여기에 기재된 쥐과 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 여기에 기재된 쥐과 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 여기에 기재된 쥐과 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 여기에 기재된 쥐과 단일클론 항체의 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0358] 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1-2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1-2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 35% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1-2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 40% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1-2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 45% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1-2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 50% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1-2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 55% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1-2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 60% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1-2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 65% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1-2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 70%

동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1-2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 75% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1-2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1-2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1-2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1-2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1-2에 나타난 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0359] 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1에 나타난 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 표 1에 나타난 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1에 나타난 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 표 1에 나타난 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 35% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1에 나타난 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 표 1에 나타난 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 40% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1에 나타난 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 표 1에 나타난 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 45% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1에 나타난 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 표 1에 나타난 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 50% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1에 나타난 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 표 1에 나타난 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 55% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1에 나타난 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 표 1에 나타난 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 60% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1에 나타난 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 표 1에 나타난 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 65% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1에 나타난 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 표 1에 나타난 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 70% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1에 나타난 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 표 1에 나타난 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 75% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1에 나타난 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 표 1에 나타난 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 80% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1에 나타난 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 표 1에 나타난 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1에 나타난 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 표 1에 나타난 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1에 나타난 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 표 1에 나타난 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 벡틴-4 에피토프에 결합하는 항체 또는 이의 단편은, 표 1에 나타난 VH CDR 아미노산 서열 및/또는 표 1에 나타난 VL CDR 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 VH CDR 및/또는 VL CDR 아미노산 서열을 포함한다.

[0360] 변형은, 올리고뉴클레오타이드-매개 (부위-지향적) 돌연변이유발, 알라닌 스캐닝, 및 PCR 돌연변이유발과 같은, 기술분야에 알려진 방법을 사용하여 만들어질 수 있다. 부위-지향적 돌연변이유발 (예를 들어, Carter, 1986, Biochem J. 237:1-7; 및 Zoller et al., 1982, Nucl. Acids Res. 10:6487-500, 참조), 카세트 (cassette) 돌연변이유발 (예를 들어, Wells et al., 1985, Gene 34:315-23, 참조), 또는 기타 알려진 기술은, 클로닝된 DNA 상에서 수행되어 항-벡틴-4 항체 변이체 DNA를 생성할 수 있다.

[0361] 항-벡틴-4 항체의 적절한 형태를 유지하는데 관여하지 않는 임의의 시스템 잔기는 또한, 예를 들어, 알라닌 또는 세린과 같은, 또 다른 아미노산으로 치환되어, 분자의 산화 안정성 (oxidative stability)을 개선시키고, 비정상적인 가교를 방지할 수 있다. 반대로, 시스템 결합(들)은, 항-벡틴-4 항체에 첨가되어 (예를 들어, 항

체가 Fv 단편과 같은 항체 단편인 경우) 이의 안정성을 개선시킬 수 있다.

[0362] 몇몇 구체 예에서, 본 개시의 항-넥틴-4 항체 분자는, "탈-면역화된" 항체이다. "탈-면역화된" 항-넥틴-4 항체는, 인간화 또는 키메라 항-넥틴-4 항체로부터 유래된 항체이며, 이는 각각의 원래의 비-탈-면역화된 항체와 비교하여, 항체의 면역원성의 감소를 결과하는 이의 아미노산 서열에서 하나 이상의 변경을 갖는다. 이러한 항체 돌연변이를 발생시키기 위한 절차 중 하나는, 항체 분자의 T-세포 에피토프의 확인 및 제거를 포함한다. 제1 단계에서, 항체 분자의 면역원성은, 기술분야에 알려진 바와 같은, 몇 가지 방법, 예를 들어, T-세포 에피토프의 시험관 내 결정 또는 이러한 에피토프의 인실리코 예측에 의해 결정될 수 있다. T-세포 에피토프 기능에 대한 중요한 잔기가 확인되면, 돌연변이는, 면역원성을 제거하고, 항체 활성을 유지하기 위해 만들어질 수 있다. 검토를 위해, 예를 들어, Jones et al., 2009, *Methods in Molecular Biology* 525:405-23을 참조한다.

[0363] 20. 시험관 내 친화도 성숙

[0364] 몇몇 구체 예에서, 모 항체와 비교하여 친화도, 안정성, 또는 발현 수준과 같은 개선된 특성을 갖는 항체 변이체는, 시험관에서 친화도 성숙에 의해 제조될 수 있다. 자연적인 원형과 마찬가지로, 시험관 내 친화도 성숙은 돌연변이 및 선택의 원리에 기초한다. 항체의 라이브러리는, 유기체 (예를 들어, 파지, 박테리아, 효모, 또는 포유동물 세포)의 표면 상에 또는 이들의 인코딩 mRNA 또는 DNA와의 연관성 (예를 들어, 공유 또는 비-공유)에서 Fab, scFv, 또는 V 도메인 단편으로 디스플레이된다. 디스플레이된 항체의 친화력 선택 (Affinity selection)은, 항체를 인코딩하는 유전 정보를 수반하는 유기체 또는 복합체의 단리를 가능하게 한다. 파지 디스플레이와 같은 디스플레이 방법을 사용한 2 또는 3 라운드 (rounds)의 돌연변이 및 선택은, 일반적으로 낮은 나노몰 범위에서 친화도를 갖는 항체 단편을 결과한다. 친화도 성숙된 항체는, 표적 항원에 대해 나노몰 또는 심지어 피코몰 친화도를 가질 수 있다.

[0365] 파지 디스플레이는, 항체의 디스플레이 및 선택을 위한 광범위한 방법이다. 항체는, 박테리오파지 코트 단백질에 대한 융합물질로서 Fd 또는 M13 박테리오파지의 표면 상에 디스플레이된다. 선택은, 파지-디스플레이된 항체가, "패닝 (panning)"으로 지칭되는 공정인, 이들의 표적에 결합하는 것을 가능하도록 항원에 대한 노출을 포함한다. 항원에 결합된 파지는 회수되고, 박테리아를 감염시키는데 사용되어 추가 라운드의 선택을 위한 파지를 생성한다. 검토를 위해, 예를 들어, Hoogenboom, 2002, *Methods. Mol. Biol.* 178:1-37; 및 Bradbury and Marks, 2004, *J. Immunol. Methods* 290:29-49를 참조한다.

[0366] 효모 디스플레이 시스템 (예를 들어, Boder et al., 1997, *Nat. Biotech.* 15:553-57; 및 Chao et al., 2006, *Nat. Protocols* 1:755-68, 참조)에서, 항체는 중쇄 및 경쇄가 유연한 링커에 의해 연결된 단일-쇄 가변 융합 (scFv)으로 디스플레이될 수 있다. scFv는, Agalp에 대한 이화화 결합을 통해 효모 세포벽에 부착되는, 효모 아글루티닌 단백질 Aga2p의 접착 서브유닛 (adhesion subunit)에 융합된다. Aga2p를 통한 단백질의 디스플레이는, 단백질을 세포 표면으로부터 멀어지게하여, 효모 세포 벽 상에 다른 분자와의 잠재적인 상호작용을 최소화시킨다. 자기 분리 (Magnetic separation) 및 유동 세포분석법 (flow cytometry)은, 개선된 친화도 또는 안정성을 갖는 항체를 선택하기 위해 라이브러리를 스크리닝하는데 사용된다. 관심의 가용성 항원에 대한 결합은, 효모를 바이오티닐화된 항원 및 형광단에 결합된 스트렙타비딘과 같은 2차 시약으로 표지시켜 결정된다. 항체의 표면 발현에서 변화는, scFv 측면에 위치하는 적혈구응집소 (hemagglutinin) 또는 c-Myc 에피토프 태그의 면역형광 표지를 통해 측정될 수 있다. 발현은, 디스플레이된 단백질의 안정성과 상관관계가 있는 것으로 나타났으며, 따라서 친화도뿐만 아니라 개선된 안정성을 위해 항체는 선택될 수 있다 (예를 들어, Shusta et al., 1999, *J. Mol. Biol.* 292:949-56, 참조). 효모 디스플레이의 부가적인 장점은, 디스플레이된 단백질이 진행 효모 세포의 세포질 망상 구조 (endoplasmic reticulum)에서 폴딩되어, 세포질 망상 구조 샤프론 (chaperones) 및 품질-관리 기구 (quality-control machinery)의 장점을 취한다는 점이다. 성숙이 완료되면, 항체 친화도는, 효모의 표면 상에 디스플레이되는 동안 편리하게 "적정"될 수 있어, 각 클론의 발현 및 정제에 대한 필요를 제거한다. 효모 표면 디스플레이의 이론적 제한은, 다른 디스플레이 방법의 것보다 기능 라이브러리 크기가 잠재적으로 작다는 것이지만; 그러나, 최근의 접근법은, 크기가 10¹⁴인 것으로 추정되는 조합 다양성을 생성하기 위해 효모 세포의 교배 시스템을 사용한다 (예를 들어, 미국 공개 특허 2003/0186374; 및 Blaise et al., 2004, *Gene* 342:211-18, 참조).

[0367] 리보솜 디스플레이에서, 항체-리보솜-mRNA (ARM) 복합체는 무-세포 시스템에서 선택하기 위해 발생된다. 항체의 특정 라이브러리를 인코딩하는 DNA 라이브러리는, 정지 코돈이 없는 스페이서 서열에 유전자적으로 융합된다. 이 스페이서 서열은, 번역시, 펩티딜 tRNA에 여전히 부착되고, 리보솜 터널 (ribosomal tunnel)을 차지하며, 따라서, 관심의 단백질이 리보솜 밖으로 돌출되고 폴딩되는 것을 가능하게 한다. 그 결과로 생긴 mRNA, 리보솜,

및 단백질의 복합체는, 표면-결합 리간드에 결합할 수 있어, 리간드로 친화도 포획을 통해 항체 및 이의 인코딩 mRNA의 동시 단리를 가능하게 한다. 리보솜-결합된 mRNA는 그 다음 cDNA로 역전사되며, 이어서 돌연변이유발을 겪을 수 있고, 다음 라운드의 선택에서 사용될 수 있다 (예를 들어, Fukuda et al., 2006, Nucleic Acids Res. 34:e127, 참조). mRNA 디스플레이에서, 항체와 mRNA 사이에 공유 결합은, 푸로마이신 (puromycin)을 어댑터 분자로서 사용하여 확립된다 (Wilson et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:3750-55).

[0368] 이들 방법이 시험관 내에서 전적으로 수행되므로, 이들은 다른 선택 기술에 비해 2개의 주요 장점을 제공한다. 먼저, 라이브러리의 다양성은, 박테리아 세포의 형질전환 효율에 의해 제한되는 것이 아니라, 시험관에 존재하는 다른 mRNA 분자 및 리보솜의 수에 의해서만 제한된다. 둘째, 랜덤 돌연변이는, 라이브러리가 임의의 다양화 단계 후에 형질변환되지 않아야 함에 따라, 예를 들어, 비-교정 중합효소 (non-proofreading polymerases)에 의해, 각 선택 라운드 후에 쉽게 도입될 수 있다.

[0369] 포유동물 세포 디스플레이 시스템 (예를 들어, Bowers et al., 2011, Proc Natl Acad Sci USA. 108:20455-60, 참조)에서, IgG의 완전 인간 라이브러리는, 예비제조함된 D(J) 영역에 연결된 생식계열 서열 V-유전자 세그먼트에 기초하여 구축된다. 중쇄 및 경쇄의 전-장 V 영역들은, 인간 중쇄 및 경쇄 불변 영역들로 조립되고, 포유동물 세포주 (예를 들어, HEK293) 내로 형질감염된다. 형질감염된 라이브러리는 확장되고, 스트렙타비딘 (SA)-연결 자기 비드에 대해 여러 라운드의 음성 선택에 적용된 다음, 비오틴화된 표적 단백질, 펩티드 단편, 또는 에피토프로 코팅된 SA-연결 자기 비드에 대한 한 라운드의 양성 선택이 수반된다. 양성적으로 선택된 세포는 확장된 후, 그 다음 FACS의 라운드로 분류되어 표적 단백질, 펩티드 단편, 또는 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체를 디스플레이하는 단일 세포 클론을 단리시킨다. 이들 단일 세포 클론 유래의 중쇄 및 경쇄 쌍은, 추가 성숙을 위해 AID로 재감염된다. AID-촉발된 체세포 초돌연변이 (AID-triggered somatic hypermutation)와 연결된, 몇몇 라운드의 포유동물 세포 디스플레이는, 높은 특이성, 높은 친화도 항체를 발생시킨다.

[0370] 다양성은 또한 표적화된 방식으로 또는 무작위 도입을 통해 항체 라이브러리의 CDRs 또는 전체 V 유전자 내로 도입될 수 있다. 전자의 접근법은, 높거나 또는 낮은 수준의 돌연변이유발을 통해 항체의 모든 CDRs를 순차적으로 표적화하거나 또는 체세포 초돌연변이의 단리된 핫 스팟 (isolated hot spots) (예를 들어, Ho et al., 2005, J. Biol. Chem. 280:607-17, 참조) 또는 실험적 근거 또는 구조적 이유로 친화도에 영향을 미치는 것으로 의심되는 잔기를 표적화하는 것을 포함한다. 다양성은 또한 DNA 서플링 또는 유사한 기술을 통해 자연적으로 다양한 영역들의 대체에 의해 도입될 수 있다 (예를 들어, Lu et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:43496-507; US 5,565,332 및 6,989,250). 프레임워크-영역 잔기 내로 연장되는 추가변 루프를 표적으로 하는 선택적 기술 (예를 들어, Bond et al., 2005, J. Mol. Biol. 348:699-709, 참조)은, CDRs에서 루프 결실 및 삽입을 이용하거나 또는 하이브리드화-기반 다양화를 사용한다 (예를 들어, 미국 공개 특허 2004/0005709, 참조). CDRs에서 다양성을 발생시키는 부가적인 방법은, 예를 들어, 미국 특허 제7,985,840호에 개시되어 있다. 항체 라이브러리 및/또는 항체 친화도 성숙을 발생시키는데 사용될 수 있는 추가의 방법은, 예를 들어, 미국 특허 8,685,897 및 8,603,930, 및 미국 공개 특허 2014/0170705, 2014/0094392, 2012/0028301, 2011/0183855 및 2009/0075378에 기재되어 있으며, 이들 각각은 여기에 참조로 병합된다.

[0371] 라이브러리의 스크리닝은 기술분야에 알려진 다양한 기술에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 넥틴-4는, 고체 지지체, 컬럼, 핀, 또는 셀룰로오스/폴리(비닐리덴 플루오라이드) 막/기타 필터 상에 고정될 수 있거나, 흡착판에 부착되거나 또는 세포 분류에 사용된 숙주 세포 상에 발현될 수 있거나, 또는 스트렙타비딘-코팅 비드로 포획을 위해 바이오틴에 접합되거나 또는 디스플레이 라이브러리를 패닝하기 위한 어떤 다른 방법에 사용될 수 있다.

[0372] 시험관 내 친화도 성숙 방법의 검토를 위해, 예를 들어, Hoogenboom, 2005, Nature Biotechnology 23:1105-16; Quiroz and Sinclair, 2010, Revista Ingenieria Biomedica 4:39-51; 및 이들에 언급된 참조문헌을 참조.

[0373] 21. 항-넥틴-4 항체의 변형

[0374] 항-넥틴-4 항체의 공유 변형 (Covalent modifications)은, 본 개시의 범주 내에 포함된다. 공유 변형은, 항-넥틴-4 항체의 표적화된 아미노산 잔기를 항-넥틴-4 항체의 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응할 수 있는 유기 유도체화제 (organic derivatizing agent)와 반응시키는 것을 포함한다. 기타 변형은, 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기를 각각 상응하는 글루타미닐 및 아스파르틸 잔기로 탈아미드화, 프롤린 및 리신의 히드록실화, 세틸 또는 트레오닐 잔기의 히드록실기의 인산화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의 α-아미노기의 메틸화, (예를 들어, Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties 79-86 (1983), 참조), N-말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C-말단 카르복실기의 아미드화를 포함한다.

- [0375] 본 개시의 범주 내에 포함된 항-넥틴-4 항체의 다른 타입의 공유 변형은, 항체 또는 폴리펩티드의 천연 글리코실화 패턴을 변경시키는 단계 (예를 들어, Beck et al., 2008, Curr. Pharm. Biotechnol. 9:482-501; 및 Walsh, 2010, Drug Discov. Today 15:773-80, 참조), 및 다양한 비단백질성 중합체, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리프로필렌 글리콜, 또는 폴리옥시알킬렌 중 하나에, 예를 들어, 미국 특허 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192; 또는 4,179,337에 서술된 방식으로, 항체를 연결시키는 단계를 포함한다.
- [0376] 본 개시의 항-넥틴-4 항체는 또한 또 다른, 이중 폴리펩티드 또는 아미노산 서열, 예를 들어, 에피토프 태그 (예를 들어, Terpe, 2003, Appl. Microbiol. Biotechnol. 60:523-33, 참조) 또는 IgG 분자의 Fc 영역 (예를 들어, Aruffo, Antibody Fusion Proteins 221-42 (Chamow and Ashkenazi eds., 1999), 참조)에 융합된 항-넥틴-4 항체를 포함하는 키메라 분자를 형성하도록 변형될 수 있다.
- [0377] 또한, 넥틴-4 항원 및 이중 폴리펩티드에 결합하는 여기에 제공된 항체를 포함하는 융합 단백질은 여기에서 제공된다. 몇몇 구체 예에서, 항체가 융합된 이중 폴리펩티드는, 세포 표면-발현된 넥틴-4를 갖는 세포에 항체를 표적화하는데 유용하다.
- [0378] 또한, 넥틴-4 항원에 결합하는 항체의 패널 (panels)은 여기에서 제공된다. 특별한 구체 예에서, 항체의 패널은, 다른 결합 속도, 다른 해리 속도, 넥틴-4 항원에 대한 다른 친화도, 및/또는 넥틴-4 항원에 대한 다른 특이성을 갖는다. 몇몇 구체 예에서, 패널은, 약 10, 약 25, 약 50, 약 75, 약 100, 약 125, 약 150, 약 175, 약 200, 약 250, 약 300, 약 350, 약 400, 약 450, 약 500, 약 550, 약 600, 약 650, 약 700, 약 750, 약 800, 약 850, 약 900, 약 950, 또는 약 1000 항체 이상을 포함하거나 또는 이루어진다. 항체의 패널은, ELISA와 같은 분석을 위해, 예를 들어, 96-웰 또는 384-웰 플레이트 (well plates)에서 사용될 수 있다.
- [0379] 22. 항-넥틴-4 항체의 제조
- [0380] 항-넥틴-4 항체는, 항-넥틴-4 항체-인코딩 핵산을 함유하는 벡터로 형질전환 또는 형질감염된 세포를 배양하여 생성될 수 있다. 본 개시의 항체의 폴리펩티드 성분을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은, 표준 재조합 기술을 사용하여 얻어질 수 있다. 원하는 폴리뉴클레오티드 서열은, 하이브리도마 세포와 같은, 항체 생성 세포로부터 단리 및 서열분석될 수 있다. 선택적으로, 폴리뉴클레오티드는, 뉴클레오티드 합성기 또는 PCR 기술을 사용하여 합성될 수 있다. 일단 얻어지면, 폴리펩티드를 인코딩하는 서열은, 숙주 세포에서 이중 폴리뉴클레오티드를 복제하고 발현할 수 있는 재조합 벡터 내로 삽입된다. 기술분야에 이용 가능하고, 알려진 많은 벡터들은, 본 개시의 목적을 위해 사용될 수 있다. 적절한 벡터의 선택은, 주로 벡터 내로 삽입될 핵산의 크기 및 벡터로 형질전환될 특정 숙주 세포에 의존할 것이다. 본 개시의 항체를 발현시키기에 적절한 숙주 세포는, 그람-음성 또는 그람-양성 유기체를 포함하는, 고세균 및 유박테리아와 같은 원핵생물, 사상균 또는 효모와 같은 진핵 미생물, 곤충 또는 식물 세포와 같은 무척추동물 세포, 및 포유동물 숙주 세포주와 같은 척추동물 세포를 포함한다. 숙주 세포는, 전-솔된 발현 벡터로 형질전환되고, 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 또는 원하는 서열을 인코딩하는 유전자를 증폭시키기에 적합하게 변형된 전통적인 영양 배지에서 배양된다. 숙주 세포에 의해 생성된 항체는, 기술분야에 알려진 표준 단백질 정제 방법을 사용하여 정제된다.
- [0381] 벡터 구축, 발현, 및 정제를 포함하는 항체 생성 방법은, Plückthun et al., Antibody Engineering: Producing antibodies in Escherichia coli: From PCR to fermentation 203-52 (McCafferty et al. eds., 1996); Kwong and Rader, E. coli Expression and Purification of Fab Antibody Fragments, in Current Protocols in Protein Science (2009); Tachibana and Takekoshi, Production of Antibody Fab Fragments in Escherichia coli, in Antibody Expression and Production (Al-Rubeai ed., 2011); 및 Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic (An ed., 2009)에 더욱 기재되어 있다.
- [0382] 물론, 기술분야에 잘 알려진, 선택적인 방법이 항-넥틴-4 항체를 제조하는데 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 예를 들어, 적절한 아미노산 서열, 또는 이의 일부는, 고-상 기법을 사용하여 직접 펩티드 합성에 의해 생성될 수 있다 (예를 들어, Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis (1969); 및 Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-54, 참조). 시험관 내 단백질 합성은, 수동 기술을 사용하거나 또는 자동화에 의해 수행될 수 있다. 항-넥틴-4 항체의 다양한 부분은, 화학적 또는 효소적 방법을 사용하여 별도로 화학적으로 합성되고 조합되어, 원하는 항-넥틴-4 항체를 생성할 수 있다. 선택적으로, 항체는, 예를 들어, 미국 특허 제5,545,807 및 5,827,690호에 개시된 바와 같이, 항체를 발현하도록 조작된 형질전환 동물의 세포 또는 체액, 예컨대, 우유로부터 정제될 수 있다.

- [0383] 23. 면역접합체 (Immunoconjugates)
- [0384] 본 개시는 또한 합성 링커에 의해 하나 이상의 비-항체 작용제 (non-antibody agents)에 공유 결합된 본 개시의 항-넥틴-4 항체 중 어느 하나를 포함하는 접합체를 제공한다.
- [0385] 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는, 예를 들어, 진단 또는 검출가능한 분자에 접합 또는 재조합적으로 융합된다. 접합 또는 재조합적으로 융합된 항체는, 예를 들어, 넥틴-4-매개 질환의 발병, 발달, 진행, 및/또는 중증도를 모니터링하거나 또는 예측하는데 유용할 수 있다.
- [0386] 이러한 진단 및 검출은, 예를 들어, 서양고추냉이 과산화효소, 알칼리 포스파타제, 베타-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스테라제와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, 다양한 효소; 스트렙타비딘/비오틴 또는 아비딘/비오틴과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, 보결 분자단 (prosthetic groups); 엄벨리페론, 플루오레세인, 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민, 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인, 단실 클로라이드, 또는 피코에리트린과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, 형광 물질; 루미놀과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, 발광 물질; 루시페라제, 루시페린, 또는 에퀴린과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, 생체발광 물질; 아크리디늄계 화합물 또는 HALOTAG와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, 화학발광 물질; 요오드 (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , 및 ^{121}I), 탄소 (^{14}C), 황 (^{35}S), 삼중수소 (^3H), 인듐 (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , 및 ^{111}In), 테크네튬 (^{99}Tc), 티튬 (^{201}Ti), 갈륨 (^{68}Ga 및 ^{67}Ga), 팔라듐 (^{103}Pd), 몰리브덴 (^{99}Mo), 크세논 (^{133}Xe), 불소 (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , 또는 ^{117}Sn 과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, 방사성 물질; 다양한 양전자 방출 단층 촬영법을 사용하는 양전자 방출 금속; 및 비-방사성 상자성체의 금속 이온을 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 검출가능한 물질에 항체를 연결시켜 달성될 수 있다.
- [0387] 또한, 융합 단백질을 발생시키기 위해 이중 단백질 또는 폴리펩티드 (또는 이의 단편, 예를 들어, 약 10, 약 20, 약 30, 약 40, 약 50, 약 60, 약 70, 약 80, 약 90 또는 약 100 아미노산의 폴리펩티드)에 재조합적으로 융합되거나 또는 화학적으로 접합된 (공유 또는 비-공유 접합) 항체뿐만 아니라, 이의 용도는 제공된다. 특히, 여기에 제공된 항체의 항원-결합 단편 (예를 들어, Fab 단편, Fc 단편, Fv 단편, F(ab)₂ 단편, VH 도메인, VH CDR, VL 도메인, 또는 VL CDR), 및 이중 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드를 포함하는 융합 단백질은 여기에서 제공된다. 하나의 구체 예에서, 항체가 융합되는 이중 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드는, 넥틴-4를 발현하는 세포와 같은, 특정 세포 타입에 항체를 표적화하는데 유용하다. 예를 들어, 특정 세포 타입에 의해 발현된 세포 표면 수용체에 결합하는 항체는, 여기에 제공된 변형된 항체에 융합되거나 또는 접합될 수 있다.
- [0388] 게다가, 여기에 제공된 항체는, 정제를 용이하게 하기 위해, 펩티드와 같은, 마커 또는 "태그" 서열에 융합될 수 있다. 특별한 구체 예에서, 마커 또는 태그 아미노산 서열은, 여럿 중에서, pQE 벡터 (예를 들어, QIAGEN, Inc., 참조)에 제공된 태그와 같은, 헥사-히스티딘 펩티드이며, 이들 중 다수는 상업적으로 이용가능하다. 예를 들어, Gentz et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-24에 기재된 바와 같은, 헥사-히스티딘은, 융합 단백질의 편리한 정제를 위해 제공된다. 정제에 유용한 기타 펩티드 태그는, 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질 (Wilson et al., 1984, Cell 37:767-78)로부터 유래된 에피토프에 상응하는, 헤마글루티닌 ("HA") 태그, 스트렙타비딘/아비딘 결합 펩티드, 및 "FLAG" 태그를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0389] 항체에 (폴리펩티드를 포함하는) 모이어티를 융합 또는 접합시키기 위한 방법은 잘 알려져 있다 (예를 들어, Arnon et al., Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy, in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy 243-56 (Reisfeld et al. eds., 1985); Hellstrom et al., Antibodies for Drug Delivery, in Controlled Drug Delivery 623-53 (Robinson et al. eds., 2d ed.1987); Thorpe, Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review, in Monoclonal Antibodies: Biological and Clinical Applications 475-506 (Pinchera et al. eds., 1985); Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy, in Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy 303-16 (Baldwin et al. eds., 1985); Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62:119-58; 미국 특허 5,336,603; 5,622,929; 5,359,046; 5,349,053; 5,447,851; 5,723,125; 5,783,181; 5,908,626; 5,844,095; 및 5,112,946; EP 307,434; EP 367,166; EP 394,827; PCT 공개 WO 91/06570, WO 96/04388, WO 96/22024, WO 97/34631, 및 WO 99/04813; Ashkenazi et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:10535-39; Traunecker et al., 1988, Nature, 331:84-86; Zheng et al., 1995, J. Immunol. 154:5590-600; 및 Vil

et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-41, 참조).

- [0390] 융합 단백질은, 예를 들어, 유전자-서플링, 모티프-서플링, 엑손-서플링, 및/또는 코돈-서플링 (통칭하여 "DNA 서플링"으로 지칭함)의 기술을 통해, 발생될 수 있다. DNA 서플링은, 예를 들어, 더 높은 친화도 및 더 낮은 해리 속도를 갖는 항체를 포함하여, 여기에 제공된 바와 같은 항-넥틴-4 항체의 활성을 변경시키는데 사용될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 5,605,793; 5,811,238; 5,830,721; 5,834,252; 및 5,837,458; Patten et al., 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2):76-82; Hansson et al., 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; 및 Lorenzo and Blasco, 1998, Biotechniques 24(2):308-13, 참조). 항체, 또는 인코딩된 항체는, 오류가 발생하기 쉬운 PCR, 랜덤 뉴클레오티드 삽입, 또는 재조합 전에 기타 방법들에 의해 랜덤 돌연변이유발에 적용되어 변경될 수 있다. 여기에 제공된 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 하나 이상의 이중 분자의 하나 이상의 성분, 모티프, 절편, 부분, 도메인, 단편, 등과 재조합될 수 있다.
- [0391] 여기에 제공된 항체는 또한, 예를 들어, 미국 특허 제4,676,980호에 기재된 바와 같은, 항체 이중접합체를 형성하기 위해 제2 항체에 접합될 수 있다.
- [0392] 여기에 제공된 바와 같이 넥틴-4에 결합하는 항체는, 또한 표적 항원의 면역분석 또는 정제에 특히 유용한 고체 지지체에 부착될 수 있다. 이러한 고체 지지체는, 유리, 셀룰로오스, 폴리아크릴아미드, 나일론, 폴리스티렌, 폴리염화비닐, 또는 폴리프로필렌을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0393] 링커는 세포에서 접합된 작용제의 방출을 용이하게 하는 "절단가능한 링커"일 수 있지만, 비-절단 링커 또한 여기에서 고려된다. 본 개시의 접합체에 사용하기 위한 링커는, 산 불안정 링커 (예를 들어, 히드라존 링커), 디설파이드-함유 링커, 펩티다제-민감성 링커 (예를 들어, 아미노산, 예를 들어, 시트룰린-발린 또는 페닐알라닌-리신과 같은, 발린 및/또는 시트룰린을 포함하는 펩티드 링커), 광불안정성 링커, 디메틸 링커 (예를 들어, Chari et al., 1992, Cancer Res. 52:127-31; 및 미국 특허 5,208,020, 참조), 티오에테르 링커, 또는 다중약물 수송체-매개 저항을 회피하도록 설계된 친수성 링커 (예를 들어, Kovtun et al., 2010, Cancer Res. 70:2528-37, 참조)를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0394] 항체 및 작용제의 접합은, 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, 술포-SMPB, 및 SVSB (숙산이미딜-(4-비닐 술포)벤조에이트)와 같은, 다양한 이기능성 단백질 연결제를 사용하여 이루어질 수 있다. 본 개시는, 항체 및 작용제의 접합이 기술분야에 개시된 임의의 적절한 방법을 사용하여 제조될 수 있음을 더욱 고려한다 (예를 들어, Bioconjugate Techniques (Hermanson ed., 2d ed. 2008), 참조).
- [0395] 항체 및 작용제에 대한 전통적인 접합 전략은, Lys 잔기의 ϵ -아미노기 또는 Cys 잔기의 티올기를 포함하는 랜덤 접합 화학적 작용에 기초하며, 이는 이중 접합체를 결과한다. 최근에 개발된 기술은, 항체에 대한 부위-특이적 접합을 가능하게 하여, 균질한 로딩 (homogeneous loading)을 결과하고, 변경된 항원-결합 또는 약물 동력학 (pharmacokinetics)으로 접합체 서브모집단 (conjugate subpopulations)을 피한다. 이들은 반응성 티올기를 제공하고, 면역글로불린 폴딩 및 조립을 방해하지 않거나 또는 항원 결합을 변경시키지 않는 중쇄 및 경쇄 상에 위치에서 시스테인 치환을 포함하는 "티오맵 (thiomaps)"의 엔지니어링 단계를 포함한다 (예를 들어, Junutula et al., 2008, J. Immunol. Meth. 332:41-52; 및 Junutula et al., 2008, Nature Biotechnol. 26:925-32, 참조). 또 다른 방법에서, 셀레노시스테인은, 종결로부터 셀레노시스테인 삽입으로 정지 코돈 UGA를 리코딩 (recoding)하여 항체 서열 내로 공변적으로 삽입되어, 다른 천연 아미노산의 존재하에서 셀레노시스테인의 친핵성 셀레놀기에서 부위 특이적 공유 접합을 가능하게 한다 (예를 들어, Hofer et al., 2008, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:12451-56; and Hofer et al., 2009, Biochemistry 48 (50):12047-57, 참조).
- [0396] 다른 구체 예에서, 치료적 모이어티 (또는 하나 이상의 치료적 모이어티)에 접합 또는 재조합적으로 융합된 항체는 여기에서 제공된다. 항체는, 치료적 모이어티, 예컨대, 세포독소, 예를 들어, 세포증식 억제제 또는 세포 파괴제, 치료제 또는 방사성 금속 이온, 예를 들어, 알파-방출체 (alpha-emitters)에 접합되거나 또는 재조합적으로 융합될 수 있다. 세포독소 또는 세포독성제는 세포에 유해한 임의의 작용제를 포함한다. 치료 모이어티는, 항대사제 (예를 들어, 메토트렉세이트 (methotrexate), 6-메르캅토피린, 6-티오구아닌, 시타라빈, 5-플루오로우라실 데카바진); 알킬화제 (예를 들어, 메클로레타민, 티오파 클로람부실, 멜팔란, 카르무스틴 (BCNU) 및 로무스틴 (CCNU), 시클로토스파미드, 부술판, 디브로모만니톨, 스트렙토조토신, 미토마이신 C, 및 시스디클로로다이아민 백금 (ii) (DDP), 및 시스플라틴); 안트라사이클린 (예를 들어, 다우노루비신 (이전에 다우노마이신) 및 독소루비신); 항생제 (예를 들어, d 악티노마이신 (이전에 악티노마이신), 블레오마이신, 미트라마이신, 및 안트라마이신 (AMC)); 아우리스타틴 분자 (Auristatin molecules) (예를 들어, 아우리스타틴 PHE, 브리오스타틴 1

및 솔라 스텐 10; Woyke et al., Antimicrob. Agents Chemother. 46:3802-8 (2002), Woyke et al., Antimicrob. Agents Chemother. 45:3580-4 (2001), Mohammad et al., Anticancer Drugs 12:735-40 (2001), Wall et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:76-80 (1999), Mohammad et al., Int. J. Oncol. 15:367-72 (1999), 참조, 이들 모두는 참조로 여기에 병합됨); 호르몬 (예를 들어, 글루코코르티코이드, 프로게스틴, 안드로겐, 및 에스트로겐), DNA-복구 효소 억제제 (예를 들어, 에토포시드 또는 토포테칸), 키나제 억제제 (예를 들어, 화합물 ST1571, 이마티닙 메실레이트 (Kantarjian et al., Clin Cancer Res. 8(7):2167-76 (2002)); 세포독성제 (예를 들어, 파클리탁셀, 시토칼라신 B, 그라미시딘 D, 에티뎀 브로마이드, 에메틴, 미토마이신, 에토포시드, 테노포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 콜히친, 독소루비신, 다우노루비신, 디하이드록시 안트라신 디온, 미토톡산트론, 미트로마이신, 악티노마이신 D, 1-디하이드로테스토스테론, 글루코코르티코이드, 프로카인, 테트라카인, 리도카인, 프로프라놀롤, 및 퓨로마이신 및 이의 유사체 또는 상동체 및 미국 특허 6,245,759, 6,399,633, 6,383,790, 6,335,156, 6,271,242, 6,242,196, 6,218,410, 6,218,372, 6,057,300, 6,034,053, 5,985,877, 5,958,769, 5,925,376, 5,922,844, 5,911,995, 5,872,223, 5,863,904, 5,840,745, 5,728,868, 5,648,239, 5,587,459에 개시된 화합물들); 파네실 전이효소 억제제 (farnesyl transferase inhibitor) (예를 들어, R115777, BMS-214662, 및 U.S. Patent Nos: 6,458,935, 6,451,812, 6,440,974, 6,436,960, 6,432,959, 6,420,387, 6,414,145, 6,410,541, 6,410,539, 6,403,581, 6,399,615, 6,387,905, 6,372,747, 6,369,034, 6,362,188, 6,342,765, 6,342,487, 6,300,501, 6,268,363, 6,265,422, 6,248,756, 6,239,140, 6,232,338, 6,228,865, 6,228,856, 6,225,322, 6,218,406, 6,211,193, 6,187,786, 6,169,096, 6,159,984, 6,143,766, 6,133,303, 6,127,366, 6,124,465, 6,124,295, 6,103,723, 6,093,737, 6,090,948, 6,080,870, 6,077,853, 6,071,935, 6,066,738, 6,063,930, 6,054,466, 6,051,582, 6,051,574, 및 6,040,305에 개시된 것들); 토포이소머라제 억제제 (예를 들어, 캄프토테신; 이리노테칸; SN-38; 토포 테칸; 9-아미노캄프토테신; GG-211 (GI 147211); DX-8951f; IST-622; 루비테칸; 피라졸로아크리딘; XR-5000; 상토피 (saintopin); UCE6; UCE1022; TAN-1518A; TAN 1518B; KT6006; KT6528; ED-110; NB-506; ED-110; NB-506; 및 레베카마이신); 불가레인 (bulgarein); Hoescht 염료 33342 (Hoescht dye 33342) 및 Hoechst 염료 33258과 같은 DNA MGB (minor groove binder); 니티딘; 파카로닌; 에피베베린; 산호초; 베타-라파콘; BC-4-1; 비스포스포네이트 (예를 들어, 알렌드로네이트, 시마드론테, 클로드로네이트, 티로드로네이트, 에티드로네이트, 이반드로네이트, 네리드로네이트, 올판드로 네이트, 리세드로네이트, 피리드로네이트, 파미드로네이트, 졸렌드로네이트), HMG-CoA 환원효소 억제제 (예를 들어, 로바스타틴, 심바스타틴, 아토르바스타틴, 프라바스타틴, 플루바스타틴, 스타틴, 세리바스타틴, 레콜, 루피터, 로수바스타틴 및 아토르바스타틴); 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 미국 특허 6,277,832, 5,998,596, 5,885,834, 5,734,033, 및 5,618,709에 개시된 것들); 아데노신 데아미나제 억제제 (예를 들어, 플루다라빈 포스페이트 및 2-클로로데옥시아데노신); 이브리투모마브 독세탄 (Zevalin[®] tositumomab (Bexxar[®])) 및 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 클라세이트 (clathrates) 및 프로드러그 (prodrugs)를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0397]

더욱이, 여기에 제공된 항체는, 정해진 생물학적 반응을 변형시키는 치료 모이어티 또는 약물 모이어티에 접합 또는 재조합적으로 융합될 수 있다. 치료적 모이어티 또는 약물 모이어티는, 고전적인 화학 치료제로 제한되는 것으로 해석되지 않아야 한다. 예를 들어, 약물 모이어티는, 원하는 생물학적 활성을 보유하는 단백질, 펩티드, 또는 폴리펩티드일 수 있다. 이러한 단백질은, 예를 들어, 아브린, 리신 A, 슈도모나스 외독소, 콜레라 독소, 또는 디프테리아 독소와 같은 독소; 종양 괴사 인자, γ -인터페론, α -인터페론, 신경 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 조직 플라스미노겐 활성화제, 세포 자멸제, 예를 들어, TNF- γ , TNF- γ , AIM I (국제 공개 WO 97/33899, 참조), AIMII (국제 공개 WO 97/34911, 참조), Fas Ligand (Takahashi et al., 1994, J. Immunol., 6:1567-1574, 참조), 및 VEGF (국제 공개 WO 99/23105, 참조), 항-혈관 형성제, 예를 들어, 안지오테스틴, 엔도스타틴 또는 응고 경로의 구성요소 (예를 들어, 조직 인자)와 같은 단백질; 또는, 예를 들어, 림포카인 (예를 들어, 인터페론 감마, 인터루킨-1 ("IL-1"), 인터루킨-2 ("IL-2"), 인터루킨-5 ("IL-5"), 인터루킨-6 ("IL-6"), 인터루킨-7 ("IL-7"), 인터루킨 9 ("IL-9"), 인터루킨-10 ("IL-10"), 인터루킨-12 ("IL-12"), 인터루킨-15 ("IL-15"), 인터루킨-23 ("IL-23"), 과립구 대식세포 콜로니 자극 인자 ("GM-CSF"), 및 과립구 콜로니 자극 인자 ("G-CSF")), 또는 성장 인자 (예를 들어, 성장 호르몬 ("GH"))과 같은 생체 반응 조절인자, 또는 응고제 (예를 들어, 칼슘, 비타민 K, 조직 인자, 예컨대, 제한 없이, Hageman 인자 (인자 XII), 고-분자량 키니노젠 (HMWK), 프리칼리크레인 (PK), 응집 단백질-인자 II (프로트롬빈), 인자 V, XIIa, VIII, XIIIa, XI, XIa, IX, IXa, X, 인지질, 및 피브리 단백질)를 포함할 수 있다.

[0398]

넥틴-4 항원에 면역특이적으로 결합하는 여기에 제공된 항체에 접합 또는 재조합적으로 융합된 치료적 모이어티

또는 약물은, 원하는 예방 또는 치료 효과(들)를 달성하도록 선택되어야 한다. 어떤 구체 예에서, 항체는 변형된 항체이다. 임상의 또는 다른 의료인은, 여기에 제공된 항체에 접합 또는 재조합적으로 융합할 치료 모이어티 또는 약물을 결정할 때 다음을 고려해야 한다: 질환의 성질, 질병의 중증도, 및 피험자의 상태.

[0399] 여기서 사용된 바와 같은, "항-넥틴-4 항체 약물 접합체" 또는 "항-넥틴-4 ADC"는, 치료 모이어티 (또는 하나 이상의 치료 모이어티들)에 접합되거나 또는 재조합적으로 융합된 항-넥틴-4 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 또는 전술한 바와 같이, 정해진 생물학적 반응을 변형시키는 치료적 모이어티 또는 약물 모이어티에 접합되거나 또는 재조합적으로 융합된 항-넥틴-4 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 지칭한다.

[0400] 넥틴-4에 특이적으로 결합하는 항-넥틴-4 항체를 포함하는 항-넥틴-4 ADC는 여기에서 제공된다. 또한, 여기에서 제공된 항-넥틴-4 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함하는 항-넥틴-4 ADC는 여기에서 제공된다.

[0401] 24. 항체 및 조성물의 사용 방법

[0402] 하나의 관점에서, 세포를 유효량의 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC와 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포의 증식을 억제 (예를 들어, 세포 수의 배가 속도 감소, 세포 수의 증가 속도의 둔화, 또는 세포 수의 증가를 차단 또는 방지)하는 방법은, 여기에서 제공된다.

[0403] 하나의 관점에서, 여기서 제공된 바와 같은, 넥틴-4 (예를 들어, 인간 넥틴-4의 ECD 또는 인간 넥틴-4의 ECD의 에피토프)에 특이적으로 결합하는 항-넥틴-4 항체를 포함하는 항-넥틴-4 ADC와 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포의 증식을 억제하는 방법은 여기에서 제공된다. 어떤 구체 예에서, 세포는 여기에 기재된 바와 같은 유효량의 항-넥틴-4 ADC와 접촉된다. 몇몇 구체 예에서, 항-넥틴-4 ADC는, 인간 넥틴-4의 ECD에 결합한다. 몇몇 구체 예에서, 항-넥틴-4 ADC는, 인간 넥틴-4의 ECD의 에피토프에 결합한다. 어떤 구체 예에서, 항-넥틴-4 ADC는, 넥틴-4 리간드 결합 부위와 구별되는 인간 넥틴-4의 ECD의 에피토프에 특이적으로 결합한다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 10% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 15% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 20% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 25% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 30% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 35% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 40% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 45% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 50% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 55% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 60% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 65% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 70% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 75% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 80% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 85% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 90% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 95% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 98% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 99% 만큼 억제된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 100% 만큼 억제된다. 어떤 구체 예에서, 세포의 증식은 적어도 약 25% 내지 약 65% 만큼 억제된다. 특별한 구체 예에서, 세포의 증식 억제는 여기에 기재된 방법에 의해 평가된다. 몇몇 구체 예에서, 세포의 증식 억제는 기술분야의 당업자에게 알려진 방법에 의해 평가된다. 어떤 구체 예에서, 세포의 증식 억제는 항-넥틴-4 ADC와 접촉하지 않는 세포의 증식 억제에 비례한다. 어떤 구체 예에서, 세포의 증식의 억제는, 관련되지 않은 항체 (예를 들어, 넥틴-4에 특이적으로 결합하지 않는 항체), 관련되지 않은 항체의 ADC, 또는 접합되지 않은 항-넥틴-4 항체와 접촉하는 세포의 증식의 억제에 비례한다.

[0404] 25. 약제학적 조성물

[0405] 하나의 관점에서, 본 개시는 본 개시의 적어도 하나의 항-넥틴-4 ADC를 포함하는 약제학적 조성물을 더욱 제공한다. 몇몇 구체 예에서, 약제학적 조성물은, 1) 항-넥틴-4 항체, 및 2) 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함한다.

[0406] 항-넥틴-4 ADC를 포함하는 약제학적 조성물은, 저장을 위해, 수용액의 형태 또는 동결건조된 또는 기타 건조된 형태에서 원하는 순도를 갖는 항-넥틴-4 ADC와 선택적으로 생리학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 안정제 (예를 들어, Remington, Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed. 1980), 참조)를 혼합하여 제조된다.

[0407] 본 개시의 항체는, 표적 세포/조직에 전달하기 위한 임의의 적절한 형태로, 예를 들어, 마이크로캡슐 또는 마크로에멀전 (상기 Remington; Park et al., 2005, Molecules 10:146-61; Malik et al., 2007, Curr. Drug. Deliv. 4:141-51), 서방성 제형 (Putney and Burke, 1998, Nature Biotechnol. 16:153-57) 또는 리포솜

(Maclean et al., 1997, Int. J. Oncol. 11:325-32; Kontermann, 2006, Curr. Opin. Mol. Ther. 8:39-45)으로 제형화될 수 있다.

[0408] 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC는 또한, 예를 들어, 코아세르베이션 기술 (coacervation techniques) 또는 계면 중합, 예를 들어, 콜로이드 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀전, 나노-입자, 및 나노캡슐)에서 또는 마크로에멀전에서, 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로 캡슐 및 폴리-(메틸메타아크릴레이트) 마이크로 캡슐에 의해 각각 제조된 마이크로 캡슐에 포획될 수 있다. 이러한 기술은, 예를 들어, 상기 Remington에 개시되어 있다.

[0409] 다양한 조성물 및 전달 시스템은 공지되어 있고, 리포솜 내에 마이크로캡슐, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 항-넥틴-4 ADC를 발현할 수 있는 재조합 세포, 수용체-매개 세포내섭취 (endocytosis) (예를 들어, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-32, 참조), 레트로바이러스 일부로서 핵산의 구성 또는 기타 벡터, 등을 포함하는, 그러나, 이에 제한되지 않는, 여기에 기재된 바와 같은 넥틴-4에 결합하는 항-넥틴-4 ADC와 함께 사용할 수 있다. 또 다른 구체 예에서, 조성물은 제어된 방출 또는 서방성 시스템 (sustained release system)으로서 제공될 수 있다. 하나의 구체 예에서, 펌프 (pump)는 제어된 방출 또는 서방성을 달성하기 위해 사용될 수 있다 (예를 들어, Langer, supra; Sefton, 1987, Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201-40; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507-16; 및 Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:569-74, 참조). 또 다른 구체 예에서, 중합체성 물질은, 예방제 또는 치료제 (예를 들어, 여기에 기재된 바와 같은 항-넥틴-4 ADC) 또는 여기에 제공된 조성물 (예를 들어, Medical Applications of Controlled Release (Langer and Wise eds., 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen and Ball eds., 1984); Ranger and Peppas, 1983, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61-126; Levy et al., 1985, Science 228:190-92; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351-56; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105-12; 미국 특허 5,679,377; 5,916,597; 5,912,015; 5,989,463; 및 5,128,326; PCT 공개 WO 99/15154 및 WO 99/20253, 참조)의 제어된 또는 서방성을 달성하기 위해 사용될 수 있다. 서방성 제형에 사용되는 중합체의 예로는, 폴리(2-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타아크릴산), 폴리글리콜라이드 (PLG), 폴리무수물, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐알코올), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌글리콜), 폴리락티드 (PLA), 폴리(락티드-코-글리콜라이드) (PLGA), 및 폴리오르토에스테르를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 하나의 구체 예에서, 서방성 제형에 사용되는 중합체는, 불활성이고, 침출성 불순물이 없으며, 저장 안정성이고, 멸균이며, 생분해성이다.

[0410] 또 다른 구체 예에서, 제어된 방출 또는 서방성 시스템은, 특정 표적 조직, 예를 들어, 비강 또는 폐에 가까이 배치될 수 있으며, 따라서 전신 투여량 (systemic dose)의 일부만을 필요로 한다 (예를 들어, Goodson, Medical Applications of Controlled Release Vol.2, 115-38 (1984), 참조). 제어된 방출 시스템은, 예를 들어, Langer, 1990, Science 249:1527-33에 의해 논의된다. 기술분야의 당업자에게 알려진 임의의 기술은, 여기에 기재된 바와 같은 넥틴-4에 결합하는 하나 이상의 항체를 포함하는 서방성 제형을 생성하는데 사용될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 4,526,938, PCT 공개 WO 91/05548 및 WO 96/20698, Ning et al., 1996, Radiotherapy & Oncology 39:179-89; Song et al., 1995, PDA J. of Pharma. Sci. & Tech. 50:372-97; Cleek et al., 1997, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-54; 및 Lam et al., 1997, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-60, 참조).

[0411] 여기에 제공된 하나 이상의 항체를 함유하는 치료적 제형은, 저장을 위해, 동결건조된 제형 또는 수용액 형태에서, 원하는 순도를 갖는 항-넥틴-4 ADC와 선택적으로 생리학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 안정제 (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA)를 혼합하여 제조될 수 있다. 허용가능한 담체, 부형제, 또는 안정화제는, 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 무독성이며, 포스페이트, 시트레이트, 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 리신과 같은 아미노산; 당당류, 이당류, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하는 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨과 같은 당; 나트륨과 같은 염-형성 반대-이온; 금속 착물 (metal complexes) (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 TWEEN™, PLURONICS™ 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비-이온성 계면활성제를 포함한다.

- [0412] 여기에 제공된 항체는 또한, 예를 들어, 리포솜에서 제형화될 수 있다. 관심의 분자를 함유하는 리포솜은, 예컨대, Epstein et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang et al. (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; 및 미국 특허 4,485,045 및 4,544,545에 기재된, 기술분야의 당업자에게 잘 알려진 방법에 의해 제조된다. 향상된 순환 시간 (circulation time)을 갖는 리포솜은, 미국 특허 5,013,556에 개시되어 있다.
- [0413] 특히 유용한 면역리포솜은, 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 PEG-유도된 포스파티딜에탄올아민 (PEG-PE)을 함유하는 지질 조성물을 이용하여 역상 증발법에 의해 발생될 수 있다. 리포솜은, 규정된 기공 크기의 필터를 통해 압출되어 원하는 직경을 갖는 리포솜을 산출한다. 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC의 Fab'단편은, 이황화 교환 반응을 통해 Martin et al. (1982) J. Biol. Chem. 257:286-288에 기재된 바와 같은 리포솜에 접합될 수 있다. 화학요법제 (예컨대 독소루비신)는, 리포솜 내에 선택적으로 함유된다; Gabizon et al., (1989) J. National Cancer Inst. 81(19):1484, 참조.
- [0414] 여기에 기재된 것과 같은, 제형은 또한 치료되는 특정 징후에 필요한 하나 이상의 활성 화합물을 함유할 수 있다. 어떤 구체 예에서, 제형은, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC 및 서로 악영향을 미치지 않는 상보적 활성을 갖는 하나 이상의 활성 화합물을 포함한다. 이러한 분자는, 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합하여 적절하게 존재한다. 예를 들어, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC는, 하나 이상의 다른 치료제와 조합될 수 있다. 이러한 조합된 요법은, 환자에게 연속적으로 또는 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.
- [0415] 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC는 또한, 예를 들어, 코아세르베이션 기술 또는 계면 중합, 예를 들어, 콜로이드 약물 전달 시스템 (예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀전, 나노-입자, 및 나노캡슐)에서 또는 마크로에멀전에서, 하이드록시메틸셀룰로스 또는 젤라틴-마이크로 캡슐 및 폴리-(메틸메타실레이트) 마이크로 캡슐에 의해 각각 제조된 마이크로 캡슐에 포획될 수 있다. 이러한 기술은 Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA에 개시되어 있다.
- [0416] 생체 내 투여를 위해 사용되는 제형은 멸균될 수 있다. 이는, 예를 들어, 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.
- [0417] 서방성 제형 또한 제조될 수 있다. 서방성 제제의 적절한 예로는, 항-넥틴-4 ADC를 함유하는 고체 소수성 중합체의 반투과성 매트릭스를 포함하며, 상기 매트릭스는 형상화된 물품, 예를 들어, 필름 또는 마이크로캡슐의 형태이다. 서방성 매트릭스의 예로는, 폴리에스테르, 하이드로겔 (예를 들어, 폴리(2-하이드록시에틸-메타크릴레이트) 또는 폴리(비닐알코올)), 폴리락티드 (미국 특허 3,773,919), L-글루탐산 및 에틸-L-글루타메이트의 공중합체, 비-분해성 에틸렌-비닐 아세테이트, LUPRON DEPOT™ (락트산-글리콜산 공중합체 및 류프롤라이드 아세테이트로 구성된 주사가능한 마이크로스피어)과 같은 분해성 락트산-글리콜산 공중합체, 및 폴리-D-(-)-3-하이드록시부티르산을 포함한다. 에틸렌-비닐 아세테이트 및 락트산-글리콜 산과 같은 중합체가 100일 이상 동안 분자의 방출을 가능하게 하는 반면, 특정 하이드로겔은 짧은 시간 동안 단백질을 방출한다. 캡슐화된 항체가 오랫동안 체내에 남아있는 경우, 이들은 37°C의 수분에 노출된 결과로서 변성 또는 응집될 수 있어, 생물학적 활성이 상실되고 면역원성이 변할 수 있다. 합리적인 전략은, 관련된 메커니즘에 의존하여 안정화를 위해 고안될 수 있다. 예를 들어, 응집 메커니즘이 티오-이황화물 교환을 통한 분자간 S-S 결합 형성인 것으로 밝혀지면, 안정화는, 설프하이드릴 잔기의 변형시키는 단계, 산성 용액으로부터 동결건조시키는 단계, 수분 함량을 조절하는 단계, 적절한 첨가제를 사용하는 단계, 및 특별한 중합체 매트릭스 조성물을 개발하는 단계에 의해 달성될 수 있다.
- [0418] 여기에 제공된 약제학적 조성물은, 치료 유효량의 여기에 제공된 하나 이상의 항체, 및 선택적으로, 약제학적상 허용가능한 담체에서, 하나 이상의 부가적인 예방제 또는 치료제를 함유한다. 이러한 약제학적 조성물은, 넥틴-4-매개 질환, 또는 이의 하나 이상의 증상의 예방, 치료, 관리 또는 개선에 유용하다.
- [0419] 여기에 제공된 화합물의 투여에 적절한 약제학적 담체는, 특정 방식의 투여에 적절한 것으로 기술분야의 당업자에게 알려진 해당 담체를 포함한다.
- [0420] 부가적으로, 여기에 제공된 항체는, 조성물에서 유일한 약제학적 활성 성분으로서 제형화될 수 있거나 또는 다른 활성 성분 (예컨대, 하나 이상의 다른 예방제 또는 치료제)과 조합될 수 있다.
- [0421] 조성물은 여기에 제공된 하나 이상의 항체를 함유할 수 있다. 하나의 구체 예에서, 항체는, 경피 패치 제제 및 건조 분말 흡입기뿐만 아니라, 경구 투여용, 용액, 현탁액, 정제, 분산성 정제, 환제, 캡슐, 분말, 서방성 제형 또는 엘릭시르 (elixirs)와 같은, 적절한 약제학적 제제로, 또는 비경구 투여용, 멸균 용액 또는 현탁액으로 제형화된다. 하나의 구체 예에서, 전술된 항체는, 기술분야에 잘 알려진 기술 및 절차를 사용하여 약제학적 조성

물로 제형화된다 (예를 들어, Ansel (1985) Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 4th Ed., p.126, 참조).

- [0422] 조성물에서, 하나 이상의 항체 또는 이의 유도체의 유효 농도는, 적절한 약제학적 담체와 혼합된다. 조성물에서 화합물의 농도는, 투여시, 넥틴-4-매개 질환 또는 이의 증상을 치료, 예방, 또는 개선시키는 양의 전달에 효과적이다.
- [0423] 하나의 구체 예에서, 조성물은 단일 투여량 투여 (dosage administration)를 위해 제형화된다. 조성물을 제형화하기 위해, 화합물의 무게 분율 (weight fraction)은, 치료된 상태가 완화, 예방되거나, 또는 하나 이상의 증상이 개선되도록, 효과적인 농도로 선택된 담체에서 용해, 현탁, 분산되거나 또는 다른 방식으로 혼합된다.
- [0424] 여기서 제공된 항-넥틴-4 ADC는, 치료된 환자에게 바람직하지 않은 부작용이 없어서 치료적으로 유용한 효과를 발휘하기에 충분한 유효량으로 약제학적 허용가능한 담체에 포함된다. 치료적으로 유효한 농도는, 일상적인 방법을 사용하여 시험관 내 및 생체 내 시스템에서 화합물을 시험하여 실험적으로 결정될 수 있고, 그 다음 이로부터 인간에 대한 투여량에 대해 외삽법에 의해 추정될 수 있다.
- [0425] 약제학적 조성물에서 항-넥틴-4 ADC의 농도는, 예를 들어, 항-넥틴-4 ADC의 물리화학적 특성, 투여량 스케줄, 및 투여된 양뿐만 아니라 기술분야의 당업자에게 알려진 기타 인자에 의존할 것이다.
- [0426] 하나의 구체 예에서, 치료적으로 유효한 투여량은, 약 0.1 ng/ml 내지 약 50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항-넥틴-4 ADC의 혈청 농도를 생성한다. 또 다른 구체 예에서, 약제학적 조성물은, 1일에 대해 체중의 킬로그램 당 약 0.001 mg 내지 약 2000 mg의 항-넥틴-4 ADC의 투여량을 제공한다. 약제학적 투여 단위 형태는, 투여 단위 형태에 대해 약 0.01 mg, 0.1 mg 또는 1 mg 내지 약 500 mg, 1000 mg 또는 2000 mg, 및 하나의 구체 예에서 약 10 mg 내지 약 500 mg의 항-넥틴-4 ADC 및/또는 기타 선택적 필수 성분의 조합을 제공하도록 제조될 수 있다.
- [0427] 항-넥틴-4 ADC는 1회에 투여될 수 있거나, 또는 시간 간격으로 투여되도록 다수의 더 작은 투여량으로 분할될 수 있다. 정확한 투여량 및 치료의 기간은, 치료되는 질환의 함수이고, 알려진 시험 프로토콜을 사용하거나 또는 생체 내 또는 시험관 내 시험 데이터로부터 외삽법에 의한 추정에 의해 실험적으로 결정될 수 있는 것으로 이해된다. 농도 및 투여량 값들은, 완화될 질병의 중증도에 따라 변할 수 있음에 유의해야 한다. 임의의 특정 피험자의 경우, 조성물의 투여를 관리 또는 감독하는 사람의 개인적 필요 및 전문적 판단에 따라, 특별한 투여 레짐 (dosage regimens)이 시간에 따라 조정될 수 있고, 여기에 서술된 농도 범위는, 단지 대표적인 것이며, 청구된 조성물의 범주 또는 실행을 제한하는 것으로 의도되지 않는 것으로 더욱 이해될 것이다.
- [0428] 항-넥틴-4 ADC의 혼합 또는 첨가시, 그 결과로 생긴 혼합물은, 용액, 현탁액, 에멀전 또는 이와 유사한 것일 수 있다. 그 결과로 생긴 혼합물의 형태는, 투여의 의도된 방식 및 선택된 담체 또는 비히클에서 화합물의 용해도를 비롯한, 다수의 인자에 의존한다. 유효 농도는, 치료되는 질환, 장애 또는 질병의 증상을 개선하기에 충분하며, 경험적으로 결정될 수 있다.
- [0429] 약제학적 조성물은, 정제, 캡슐제, 환제, 분말, 과립제, 멸균 비경구 용액 또는 현탁액, 및 경구용 용액 또는 현탁액, 및 적절한 양의 화합물 또는 이의 약제학적 허용가능한 유도체를 함유하는 유-수 에멀전과 같은, 단위 투여 형태로 인간 및 동물에게 투여하기 위해 제공된다. 하나의 구체 예에서, 항-넥틴-4 ADC는, 단위-투여 형태 또는 다중-투여 형태로 제형화되고 투여된다. 여기서 사용된 바와 같은 단위-투여 형태는, 인간 및 동물 피험자에 적절하고, 기술분야에 알려진 바와 같은 개별적으로 포장된 물리적 개별 단위를 지칭한다. 각 단위-투여는, 필요한 약제학적 담체, 비히클 또는 희석제와 공동으로, 원하는 치료 효과를 생성하기에 충분한 미리결정된 양의 항-넥틴-4 ADC를 함유한다. 단위-투여 형태의 예로는, 앰플 및 주사기 및 개별적으로 포장된 정제 또는 캡슐을 포함한다. 단위-투여 형태는, 단편 (fractions) 또는 이의 배수로 투여될 수 있다. 다중-투여 형태는, 분리된 단위-투여 형태로 투여되도록 단일 용기에 포장된 복수의 동일한 단위-투여 형태가다. 다중-투여 형태의 예로는, 바이알, 정제 또는 캡슐 또는 파인트 또는 겔런의 병을 포함한다. 그러므로, 다중 투여 형태는, 포장에서 분리되지 않은 다수의 단위-투여이다.
- [0430] 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 하나 이상의 항-넥틴-4 항체는, 액체 약제학적 제형이다. 액체 약제학적으로 투여가능한 조성물은, 예를 들어, 위에서 정의된 바와 같은 활성 화합물 및 선택적 약제학적 보조제를, 예를 들어, 물, 식염수, 수성 텍스트로스, 글리세롤, 글리콜, 에탄올 및 이와 유사한 것과 같은, 담체에 용해, 분산, 또는 그렇지 않으면 혼합하여 제조될 수 있고, 이에 의해 용액 또는 현탁액을 형성한다. 원하는 경우, 투여되는 약제학적 조성물은, 소량의 비독성 보조 물질, 예컨대, 습윤제, 유화제, 가용화제, pH 완충제 및 이와 유사한 것, 예를 들어, 아세테이트, 나트륨 시트레이트, 시클로텍스트린 유도체, 솔비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아

민 소듐 아세테이트, 트리에탄올아민 올레이트, 및 기타 이러한 작용제를 또한 함유할 수 있다.

- [0431] 이러한 투여 형태의 실제 제조 방법은, 기술분야의 당업자에게 공지되어 있거나 명백할 것이다; 예를 들어, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA, 참조.
- [0432] 무-독성 담체로 구성된 밸런스 (balance)와 함께 0.005% 내지 100%의 범위에서 항-넥틴-4 ADC를 함유하는 투여 형태 또는 조성물은, 제조될 수 있다. 이들 조성물의 제조 방법은, 기술분야의 당업자에게 공지되어 있다.
- [0433] 경구 약제학적 투여 형태는 고체, 젤 또는 액체이다. 고체 투여 형태는, 정제, 캡슐, 과립, 및 벌크 분말이다. 경구 정제의 타입은, 장용-코팅 (enteric-coated), 당-코팅 또는 필름-코팅될 수 있는 압축된, 씹을 수 있는 마름모꼴 및 정제를 포함한다. 캡슐은, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐일 수 있는 반면, 과립 및 분말은 기술분야의 당업자에게 알려진 기타 성분의 조합과 함께 비-발포성 또는 발포성 형태 (effervescent form)로 제공될 수 있다.
- [0434] 어떤 구체 예에서, 제형은 고체 투여 형태이다. 어떤 구체 예에서, 제형은 캡슐 또는 정제이다. 정제, 환제, 캡슐, 트로키 및 이와 유사한 것은, 유사한 성질의 하기 화합물, 또는 성분: 결합제; 윤활제; 희석제; 활택제; 붕해제; 착색제; 감미제; 향미제; 습윤제; 구토 코팅 (emetic coating); 및 필름 코팅; 중 하나 이상을 함유할 수 있다. 결합제의 예로는, 미세결정질 셀룰로스, 감 트래거겐스, 글루코스 용액, 아카시아 점액, 젤라틴 용액, 당밀, 폴리비닐피롤리딘, 포비돈, 크로스포비돈, 수크로스 및 전분 페이스트를 포함한다. 윤활제는, 탈크, 전분, 마그네슘 또는 칼슘 스테아레이트, 리코포듐 및 스테아르산을 포함한다. 희석제는, 예를 들어, 락토스, 슈크로스, 전분, 카올린, 염, 만니톨 및 디칼슘 포스페이트를 포함한다. 활택제는, 콜로이드 이산화규소를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 붕해제는, 크로스카멜로스 나트륨, 나트륨 전분 글리콜레이트, 알긴산, 옥수수 전분, 감자 전분, 벤토나이트, 메틸셀룰로스, 한천 및 카르복시메틸셀룰로스를 포함한다. 착색제는, 예를 들어, 승인 인증된 수용성 FD 및 C 염료 중 어느 하나, 이의 혼합물; 및 알루미늄 수화물에 현탁된 수불용성 FD 및 C 염료를 포함한다. 감미제는 수크로스, 락토스, 만니톨 및 인공 감미제, 예컨대, 사카린, 및 임의의 수의 분무 건조 풍미제를 포함한다. 향미제는, 페퍼민트 및 메틸 살리실레이트와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, 청량감을 생성하는 화합물의 합성 블렌드 (blends) 및 과일과 같은 식물로부터 추출된 천연 향미제를 포함한다. 습윤제는, 프로필렌 글리콜 모노스테아레이트, 솔비탄 모노올레이트, 디에틸렌 글리콜 모노라우레이트 및 폴리옥시에틸렌 라우랄 에테르를 포함한다. 구토-코팅은, 지방산, 지방, 왁스, 셀락 (shellac), 암모니아화 셀락 및 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트를 포함한다. 필름 코팅은, 하이드록시에틸셀룰로스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 폴리에틸렌 글리콜 4000 및 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트를 포함한다.
- [0435] 항체는, 위의 산성 환경으로부터 항체를 보호하는 조성물로 제공될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 위장에서 완전성을 유지하고, 장에서 활성 화합물을 방출하는 장용 코팅으로 제형화될 수 있다. 조성물은 또한 제산제 또는 기타 이러한 성분과 조합하여 제형화될 수 있다.
- [0436] 투여 단위 형태가 캡슐인 경우, 이는 상기 타입의 물질에 부가하여, 지방유와 같은 액체 담체를 함유할 수 있다. 부가적으로, 투여 단위 형태는, 투여 단위의 물리적 형태, 예를 들어, 당 및 기타 장 작용제 (enteric agents)의 코팅을 변형시키는 다양한 기타 물질을 함유할 수 있다. 화합물은 또한 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼, 스프링클, 츄잉검 또는 이와 유사한 것의 성분으로 투여될 수 있다. 시럽은, 활성 화합물에 부가하여, 감미제로서 수크로스 및 특정한 보존제, 염료 및 착색제 및 향료를 함유할 수 있다.
- [0437] 항-넥틴-4 ADC는 또한, 원하는 작용을 손상시키지 않는 기타 활성 물질, 또는 제산제, H₂ 차단제, 및 이뇨제와 같은, 원하는 작용을 보충하는 물질과 혼합될 수 있다. 활성 성분은, 여기에 기재된 바와 같은 항-넥틴-4 ADC 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 유도체이다. 활성 성분의 약 98 중량%까지의, 더 높은 농도는, 포함될 수 있다.
- [0438] 모든 구체 예에서, 정제 및 캡슐 제형은 활성 성분의 용해를 변형시키거나 유지하기 위해 기술분야의 당업자에게 알려진 바와 같이 코팅될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 이들은, 페닐살리실레이트, 왁스 및 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트와 같은, 전통적인 장용 소화성 코팅으로 코팅될 수 있다.
- [0439] 몇몇 구체 예에서, 제형은 액체 투여 형태이다. 액체 경구 투여 형태는, 수용액, 에멀전, 현탁액, 비-발포성 과립으로부터 재구성된 용액 및/또는 현탁액, 및 발포성 과립으로부터 재구성된 발포성 제제를 포함한다. 수성 용액은, 예를 들어, 엘릭시르 및 시럽을 포함한다. 에멀전은 수-중-유 또는 유-중-수이다.
- [0440] 엘릭시르는, 투명하고, 단맛이 나는, 하이드로알코올성 제제이다. 엘릭시르에 사용되는 약제학적으로 허용가능한 담체는 용매를 포함한다. 시럽은, 설탕, 예를 들어, 슈크로스의 농축된 수용액이며, 보존제를 함유할 수 있

다. 에멀전은, 하나의 액체가 또 다른 액체 전체에 작은 소구체 (globules)의 형태로 분산되는 2-상계 (two-phase system)이다. 에멀전에 사용되는 약제학적으로 허용가능한 담체는, 비-수성 액체, 유화제 및 보존제이다. 현탁액은 약제학적으로 허용가능한 현탁제 및 보존제를 사용한다. 비-경구 과립에 사용되어, 액체 경구 투여 형태로 재구성되는, 약제학적으로 허용가능한 물질은, 희석제, 감미제 및 습윤제를 포함한다. 액체 경구 투여 형태로 재구성되는, 발포성 과립에 사용되는 약제학적 허용가능한 물질은, 유기산 및 이산화탄소의 공급원을 포함한다. 착색제 및 풍미제는 모든 상기 투여 형태에 사용된다.

[0441] 용매는, 글리세린, 솔비톨, 에틸 알코올 및 시럽을 포함한다. 보존제의 예로는, 글리세린, 메틸 및 프로필파라벤, 벤조산, 벤조산 나트륨 및 알코올을 포함한다. 에멀전에 활용되는 비-수성 액체의 예로는, 미네랄 오일 및 면실유를 포함한다. 유화제의 예로는, 젤라틴, 아카시아, 트래거캔스, 벤토나이트, 및 계면활성제, 예컨대, 폴리옥시에틸렌 솔비탄 모노올레이트를 포함한다. 현탁제는, 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 펙틴, 크래거캔스, 비검 (Veegum) 및 아카시아를 포함한다. 감미제는, 수크로스, 시럽, 글리세린 및 인공 감미제, 예컨대, 사카린을 포함한다. 습윤제는, 프로필렌 글리콜 모노스테아레이트, 솔비탄 모노올레이트, 디에틸렌글리콜 모노라우레이트 및 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르를 포함한다. 유기산은, 시트르산 및 타르타르산을 포함한다. 이산화탄소의 공급원은, 중탄산 나트륨 및 탄산나트륨을 포함한다. 착색제는, 승인 인증된 수용성 FD 및 C 염료 중 어느 하나, 및 이들의 혼합물을 포함한다. 향미제는, 과일과 같은 식물로부터 추출된 천연 향미료, 및 청량감을 생성하는 화합물의 합성 블렌드를 포함한다.

[0442] 고체 투여 형태의 경우, 예를 들어, 프로필렌 카보네이트, 식물성 오일 또는 트리글리세리드 내에, 용액 또는 현탁액은, 하나의 구체 예에서, 젤라틴 캡슐에 캡슐화된다. 이러한 용액, 및 이의 제조 및 캡슐화는, 미국 특허 4,328,245; 4,409,239; 및 4,410,545에 개시되어 있다. 액체 투여 형태의 경우, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 내에 용액은, 충분한 양의 약제학적으로 허용가능한 액체 담체, 예를 들어, 투여를 위해 용이하게 측정되는, 물로 희석될 수 있다.

[0443] 선택적으로, 액체 또는 반-고체 경구 제형은, 활성 화합물 또는 염을 식물성 오일, 글리콜, 트리글리세리드, 프로필렌 글리콜 에스테르 (예를 들어, 프로필렌 카보네이트) 및 기타 이러한 담체에 용해 또는 분산시키고, 이들 용액 또는 현탁액을 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐 쉘 (shells)에서 캡슐화하여 제조될 수 있다. 기타 유용한 제형은, 미국 특허 RE28,819 and 4,358,603에 서술된 것을 포함한다. 간략하게, 이러한 제형은, 여기에 제공된 화합물을 함유하는 것들; 1,2-디메톡시메탄, 디글림, 트리글림, 테트라글림, 폴리에틸렌 글리콜-350-디메틸 에테르, 폴리에틸렌 글리콜-550-디메틸 에테르, 폴리에틸렌 글리콜-750-디메틸 에테르 (여기서, 350, 550 및 750은 폴리에틸렌 글리콜의 대략적인 평균 분자량을 지칭함)를 포함하는, 그러나 이에 제한되지 않는, 디알킬화 모노-또는 폴리-알킬렌 글리콜; 및 부틸화히드록시톨루엔 (BHT), 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 프로필 갈레이트, 비타민 E, 히드로퀴논, 히드록시쿠마린, 에탄올아민, 레시틴, 세팔린, 아스코르브산, 말산, 솔비톨, 인산, 티오디프로피온산 및 이의 에스테르, 및 디티오카르바 메이트와 같은, 하나 이상의 항산화제를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0444] 기타 제형은, 약제학적상 허용가능한 아세탈을 포함하는 수성 알코올 용액을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 제형에 사용되는 알코올은, 프로필렌 글리콜 및 에탄올을 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 하나 이상의 하이드록실기를 갖는 임의의 약제학적으로 허용가능한 수-혼화성 용매이다. 아세탈은, 아세트알데히드 디에틸 아세탈과 같은 저급 알킬 알데히드의 디(저급 알킬) 아세탈을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0445] 하나의 구체 예에서, 비경구 투여는, 피하, 근육 내 또는 정맥 내 주사 또한 여기서 고려된 특징이다. 주사제는, 액체 용액 또는 현탁액, 주사 전에 액체의 용액 또는 현탁액에 대해 적절한 고체 형태, 또는 에멀전과 같은 전통적인 형태로 제조될 수 있다. 주사제, 용액 및 에멀전은 또한 하나 이상의 부형제를 함유한다. 적절한 부형제는, 예를 들어, 물, 식염수, 텍스트로스, 글리세롤 또는 에탄올이다. 부가적으로, 원하는 경우, 투여되는 약제학적 조성물은 또한 소량의 비-독성 보조 물질, 예컨대, 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정화제, 용해성 증강제, 및 예를 들어, 나트륨 아세테이트, 솔비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레이트 및 시클로텍스트린과 같은, 기타 이러한 작용제를 함유할 수 있다.

[0446] 일정한 투여량 수준이 유지되도록 완용형 (slow-release) 또는 서방성 시스템의 주입 (Implantation) (예를 들어, 미국 특허 제3,710,795 호, 참조)은 또한 여기서 고려된다. 간략하게, 여기에 제공된 화합물은, 외부 중합체 막, 예를 들어, 체액 내 불용성인, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 에틸렌/프로필렌 공중합체, 에틸렌/에틸 아크릴레이트 공중합체, 에틸렌/비닐아세테이트 공중합체, 실리콘 고무, 폴리디메틸 실록산, 네오프렌 고무, 염소 처리된 폴리에틸렌, 폴리비닐클로라이드, 비닐 아세테이트를 갖는 비닐클로라이드 공중합체, 비닐리텐 클로라이

드, 에틸렌 및 프로필렌, 이오노머 폴리메틸렌 테레프탈레이트, 부틸 고무 에피클로로하이드린 고무, 에틸렌/비닐 알코올 공중합체, 에틸렌/비닐 아세테이트/비닐 알코올 3량체, 및 에틸렌/비닐옥시에탄올 공중합체에 의해 둘러싸인, 고체 내부 매트릭스 (solid inner matrix), 예를 들어, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리부틸메타크릴레이트, 가소화 또는 비가소화 폴리비닐클로라이드, 가소화 나일론, 가소화 폴리메틸렌테레프탈레이트, 천연 고무, 폴리이소프렌, 폴리이소부틸렌, 폴리부타디엔, 폴리메틸렌, 에틸렌-비닐아세테이트 공중합체, 실리콘 고무, 폴리디메틸실록산, 실리콘 카보네이트 공중합체, 친수성 중합체, 예컨대, 아크릴산 및 메타크릴산의 에스테르의 하이드로겔, 콜라겐, 가교 폴리비닐알코올 및 가교 부분 가수분해 폴리비닐 아세테이트에 분산된다. 항-넥틴-4 ADC는, 방출 속도 제어 단계에서 외부 중합체 막을 통해 확산된다. 이러한 비경구 조성물에 함유된 항-넥틴-4 ADC의 양은, 이의 특이적 성질뿐만 아니라, 화합물의 활성 및 피험자의 요구에 크게 의존한다.

- [0447] 비경구 투여를 위한 제제는, 주사용 멸균 용액, 피하주사용 정제를 포함하는, 사용 직전에 용제와 조합된, 동결 건조된 분말과 같은, 멸균 건조 용해성 제품, 주사용 멸균 현탁액, 사용 직전에 비히클과 조합될 멸균 건조 불용성 제품 및 멸균 에멀전을 포함한다. 용액은 수성 또는 비수성일 수 있다.
- [0448] 정맥 내 투여되는 경우, 적절한 담체는, 생리 식염수 또는 인산염 완충 식염수 (PBS), 및 증점제 및 가용화제, 예컨대, 글루코스, 폴리메틸렌 글리콜, 및 폴리프로필렌 글리콜 및 이들의 혼합물을 함유하는 용액을 포함한다.
- [0449] 비경구 제제에 사용되는 약제학적으로 허용가능한 담체는, 수성 비히클, 비 수성 비히클, 향미생물제, 등장제, 완충제, 산화방지제, 국부 마취제, 현탁제 및 분산제, 유화제, 격리제 또는 킬레이트제 및 기타 약제학적으로 허용가능한 물질을 포함한다.
- [0450] 수성 비히클의 예로는, 염화나트륨 주사, 링거 주사, 등장성 포도당 주사, 멸균수 주사, 포도당 및 락티드 링거 주사를 포함한다. 비수성 비경구 비히클에는, 식물 기원의 불휘발성유 (fixed oils), 면실유, 옥수수유, 참기름 및 땅콩유를 포함한다. 정세균성 (bacteriostatic) 또는 진균성 농축액에서 항균제는, 페놀 또는 크레졸, 수은, 벤질 알코올, 클로로부탄올, 메틸 및 프로필 p-히드록시벤조산 에스테르, 티메로살, 벤즈알코늄 클로라이드 및 벤제토늄 클로라이드를 포함하는 다중-투여 용기에 포장된 비경구 제제에 첨가될 수 있다. 등장제는, 염화나트륨 및 텍스트로스를 포함한다. 완충제는 포스페이트 및 시트레이트를 포함한다. 산화방지제는 중황산나트륨을 포함한다. 국부 마취제에는 프로카인 하이드로클로라이드를 포함한다. 현탁제 및 분산제는, 소듐 카르복시메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스 및 폴리비닐피롤리돈을 포함한다. 유화제는 폴리솔베이트 80 (TWEEN® 80)을 포함한다. 금속 이온의 격리제 또는 킬레이트제는 EDTA를 포함한다. 약제학적 담체는 또한, 수산화성 비히클을 위한 에틸 알코올, 폴리메틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜; 및 pH 조절을 위한 수산화나트륨, 염산, 시트르산 또는 락트산을 포함한다.
- [0451] 약제학적 활성 화합물의 농도는, 원하는 약리학적 효과를 생성하기 위해 주사가 유효량을 제공하도록 조정된다. 정확한 투여량은, 기술분야에 알려진 바와 같이 환자 또는 동물의 연령, 체중 및 상태에 의존한다.
- [0452] 단위-투여량 비경구 제제는, 앰플, 바이알 또는 바늘이 달린 주사기에 포장될 수 있다. 비경구 투여를 위한 모든 제제는, 기술분야에 알려지고 실행되는 바와 같이, 멸균될 수 있다.
- [0453] 예시적으로, 활성 화합물을 함유하는 멸균 수용액의 정맥 내 또는 동맥 내 주입은, 효과적인 투여 방식이다. 또 다른 구체 예는, 원하는 약리학적 효과를 생성하기 위해 필요에 따라 주사되는 활성 물질을 함유하는 멸균 수성 또는 유성 용액 또는 현탁액이다.
- [0454] 주사제는 국부 및 전신 투여용으로 설계된다. 하나의 구체 예에서, 치료적으로 유효한 투여량은, 치료된 조직 (들)에 대해 활성 화합물의 적어도 약 0.1% w/w 내지 약 90% w/w 또는 그 이상의 농도, 어떤 구체 예에서, 1% w/w 초과 농도를 함유하도록 제형화된다.
- [0455] 항-넥틴-4 ADC는 미분화 (micronized) 또는 기타 적절한 형태로 현탁될 수 있다. 그 결과로 생긴 혼합물의 형태는, 의도된 투여 방식 및 선택된 담체 또는 비히클에서의 화합물의 용해도를 비롯한, 다수의 인자에 의존한다. 유효 농도는, 질병의 증상을 개선하기에 충분하며, 경험적으로 결정될 수 있다.
- [0456] 다른 구체 예에서, 약제학적 제형은, 용액, 에멀전 및 기타 혼합물로서 투여를 위해 재구성될 수 있는, 동결 건조된 분말이다. 이들은 또한 고체 또는 겔로 재구성되고 제형화될 수 있다.
- [0457] 동결 건조된 분말은, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC, 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 유도체를, 적절한 용매에서 용해시켜 제조된다. 몇몇 구체 예에서, 동결 건조된 분말은 살균된다. 용매는, 분말로부터 제조된, 재구성된 용액 또는 분말의 안정성 또는 기타 약리학적 성분을 개선시키는 부형제를 함유할 수 있다. 사용될 수 있는

부형제는, 텍스트로스, 솔비탈, 과당, 옥수수 시럽, 자일리톨, 글리세린, 글루코스, 수크로스 또는 기타 적절한 작용제를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 용매는 또한 시트레이트, 나트륨 또는 칼륨 포스페이트와 같은 완충액 또는 하나의 구체 예에서, 약 중성 pH로, 기술분야의 당업자에게 알려진 기타 완충액을 함유할 수 있다. 용액의 후속 멸균 여과 후에, 기술분야의 당업자에게 알려진 표준 조건하에서 동결건조는 원하는 제형을 제공한다. 하나의 구체 예에서, 그 결과로 생긴 용액은, 동결건조를 위해 바이알로 배분될 것이다. 각 바이알은, 화합물의 단일 투여량 또는 다중 투여량을 함유할 것이다. 동결건조된 분말은, 약 4℃ 내지 실온과 같은, 적절한 조건하에서 저장될 수 있다.

[0458] 주사용 물로 이 동결건조된 분말의 재구성은, 비경구 투여에 사용하기 위한 제형을 제공한다. 재구성을 위해, 동결건조된 분말은 멸균수 또는 기타 적절한 담체에 첨가된다. 정확한 양은 선택된 화합물에 의존한다. 이러한 양은 경험적으로 결정될 수 있다.

[0459] 국부 및 전신 투여를 위해 기재된 바와 같이 국소 혼합물은 제조된다. 그 결과로 생긴 혼합물은, 용액, 현탁액, 에멀전 또는 이와 유사한 것일 수 있고, 크림, 젤, 연고, 에멀전, 용액, 엘릭시르, 로션, 현탁액, 팅크 (tinctures), 페이스트, 폼, 에어로졸, 관개, 스프레이, 좌약, 붕대, 피부 패치 또는 국소 투여에 적절한 임의의 기타 제형으로 제형화될 수 있다.

[0460] 여기에 제공된 항체는, 흡입과 같은, 국소 적용을 위한 에어로졸로서 제형화될 수 있다 (예를 들어, 염증성 질환, 특히 천식의 치료에 유용한 스테로이드의 전달을 위한 에어로졸을 기재하는, 미국 특허 4,044,126, 4,414,209 및 4,364,923, 참조). 호흡기에 투여하기 위한 이들 제형은, 분무기용 에어로졸 또는 용액의 형태, 또는 단독으로 또는 락토스와 같은 불활성 담체와 조합하여, 흡입용 초미세 분말일 수 있다. 이러한 경우에, 제형의 입자는, 하나의 구체 예에서, 50 microns 미만, 하나의 구체 예에서, 10 microns 미만의 직경을 가질 것이다.

[0461] 화합물은, 국부 또는 국소 적용, 예컨대, 눈에서와 같이, 피부 및 점막에 국부 적용을 위해, 젤, 크림, 및 로션의 형태로, 눈에 적용하기 위해 또는 낭내 (intracisternal) 또는 척수내 적용하기 위해 제형화될 수 있다. 국소 투여 (Topical administration)는, 경피 전달 및 또한 눈 또는 점막에 투여, 또는 흡입 요법 (inhalation therapies)을 위해 고려된다. 활성 화합물의 비강 용액은 단독으로 또는 다른 약제학적으로 허용가능한 부형제와 함께 투여할 수도 있다.

[0462] 이들 용액, 특히 안과용으로 의도된 용액은, 적절한 염과 함께, pH 약 5-7의, 0.01%-10% 등장성 용액으로 제형화될 수 있다.

[0463] 이온영동 및 전기영동 장치를 포함하는, 경피 패치, 및 직장 투여와 같은, 다른 투여 경로는 또한 여기서 고려된다.

[0464] 이온영동 및 전기영동 장치를 포함한, 경피 패치는, 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 이러한 패치는, 미국 특허 6,267,983, 6,261,595, 6,256,533, 6,167,301, 6,024,975, 6,010,715, 5,985,317, 5,983,134, 5,948,433, 및 5,860,957에 개시되어 있다.

[0465] 예를 들어, 직장 투여를 위한 약제학적 투여 형태는, 전신 효과를 위해 직장 좌약, 캡슐 및 정제이다. 여기에서 사용된 직장 좌약은, 하나 이상의 약리학적 또는 치료학적 활성 성분을 방출하는, 체온에서 용융 또는 연화되는 직장으로 삽입을 위한 고체를 의미한다. 직장 좌약에 활용되는 약제학적으로 허용가능한 물질은, 융점을 높이기 위한 주성분 (bases) 또는 비히클 및 작용제이다. 주성분의 예로는, 코코아 버터 (테오브로마 오일), 글리세린-젤라틴, 카보왁스 (폴리옥시에틸렌 글리콜) 및 지방산의 모노-, 디- 및 트리글리세라이드의 적절한 혼합물을 포함한다. 다양한 주성분의 조합은 사용될 수 있다. 좌약의 융점을 높이는 작용제는, 경뇌유 및 왁스를 포함한다. 직장 좌약은 압축 방법 또는 성형에 의해 제조될 수 있다. 하나의 구체 예에서, 직장 좌약의 중량은, 약 2 내지 3 gm이다.

[0466] 직장 투여 용 정제 및 캡슐은, 경구 투여용 제형과 동일한 약제학적으로 허용가능한 물질을 사용하고, 동일한 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0467] 여기에 제공된 항체 및 기타 조성물은 또한, 치료될 피험자의 신체의 특정 조직, 수용체, 또는 기타 영역을 표적으로 하도록 제형화될 수 있다. 많은 이러한 표적화 방법은, 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있다. 이러한 모든 표적화 방법은, 인스턴트 조성물에 사용하기 위해 여기서 고려된다. 표적화 방법의 비-제한 예들에 대해, 예를 들어, 미국 특허 6,316,652, 6,274,552, 6,271,359, 6,253,872, 6,139,865, 6,131,570, 6,120,751, 6,071,495, 6,060,082, 6,048,736, 6,039,975, 6,004,534, 5,985,307, 5,972,366, 5,900,252, 5,840,674,

5,759,542 및 5,709,874을 참조한다. 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항-넥틴-4 항체는, 예컨대, 넥틴-4-매개 질환을 갖거나 또는 가질 위험이 있는 환자의, 결정에 표적화 (또는 그렇지 않으면 투여)된다.

[0468] 하나의 구체 예에서, 종양-표적 리포솜과 같은, 조직-표적 리포솜을 포함하는, 리포솜 현탁액은 또한, 약제학적으로 허용가능한 담체로서 적절할 수 있다. 이들은 기술분야의 당업자에게 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 리포솜 제형은, 미국 특허 제4,522,811호에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 간단히 말하면, 다중 라멜라 소포 (multilamellar vesicles: MLV's)와 같은 리포솜은, 플라스크의 내부에서 난 포스파티딜 콜린 (egg phosphatidyl choline) 및 뇌 포스파티딜 세린 (7:3 몰비)을 건조시켜 형성될 수 있다. 2가 양이온이 없는 포스페이트 완충 식염수 (PBS)에 여기에 제공된 화합물의 용액은 첨가되고, 지질막 (lipid film)이 분산될 때까지 플라스크는 흔들려진다. 그 결과로 생긴 소포는 세척되어 캡슐화되지 않은 화합물을 제거하고, 원심분리에 의해 펠렛화된 다음, PBS에서 재현탁된다.

[0469] 26. 투여 및 복용 방법

[0470] 특별한 구체 예에서, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC를 포함하는 넥틴-4-매개 질환의 예방, 관리, 치료 및/또는 개선에 사용하기 위한 조성물은 여기에서 제공된다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4-매개 질환의 예방에 사용하기 위한 조성물은 여기에 제공되며, 여기서, 조성물은 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4-매개 질환의 관리에 사용하기 위한 조성물은 여기에 제공되며, 여기서, 조성물은 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4-매개 질환의 치료에 사용하기 위한 조성물은 여기에 제공되며, 여기서 조성물은 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4-매개 질환의 개선에 사용하기 위한 조성물은 여기에 제공되며, 여기서 조성물은 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC를 포함한다. 어떤 구체 예에서, 피험자는 이를 필요로 하는 피험자이다. 몇몇 구체 예에서, 피험자는 넥틴-4-매개 질환을 앓고 있다. 다른 구체 예에서, 피험자는 넥틴-4-매개 질환에 걸릴 위험에 있다. 몇몇 구체 예에서, 투여는, 넥틴-4-매개 질환의 예방, 관리, 치료 또는 개선을 결과한다. 하나의 구체 예에서, 항-넥틴-4 ADC는, 항-넥틴-4 항체가 항체 M22-321b41.1 인 ADC이다.

[0471] 하나의 구체 예에서, 넥틴-4-매개 질환의 증상의 예방, 관리, 치료 및/또는 개선에 사용하기 위한 조성물은 여기에 제공되며, 여기서 조성물은 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4-매개 질환의 증상의 예방에 사용하기 위한 조성물은 여기에 제공되며, 여기서 조성물은 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4-매개 질환의 증상의 관리에 사용하기 위한 조성물은 여기에 제공되며, 여기서 조성물은 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4-매개 질환의 증상의 치료에 사용하기 위한 조성물은 여기에 제공되며, 여기서 조성물은 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4-매개 질환의 증상의 개선에 사용하기 위한 조성물은 여기에 제공되며, 여기서 조성물은 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC를 포함한다. 어떤 구체 예에서, 피험자는 이를 필요로 하는 피험자이다. 몇몇 구체 예에서, 피험자는 넥틴-4-매개 질환을 앓고 있다. 다른 구체 예에서, 피험자는 넥틴-4-매개 질환에 걸릴 위험에 있다. 몇몇 구체 예에서, 투여는 넥틴-4-매개 질환의 증상의 예방, 관리, 치료 또는 개선을 결과한다. 하나의 구체 예에서, 넥틴-4 항체는 항체 M22-321b41.1이다.

[0472] 또 다른 구체 예에서, 여기에 제공된 유효량의 항-넥틴-4 ADC를 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 넥틴-4-매개 질환을 예방, 관리, 치료 및/또는 개선하는 방법은 여기에서 제공된다. 하나의 구체 예에서, 여기에 제공된 유효량의 항-넥틴-4 ADC를 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 넥틴-4-매개 질환을 예방하는 방법은 여기에서 제공된다. 하나의 구체 예에서, 여기에 제공된 유효량의 항-넥틴-4 ADC를 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 넥틴-4-매개 질환을 관리하는 방법은 여기에서 제공된다. 하나의 구체 예에서, 여기에 제공된 유효량의 항-넥틴-4 ADC를 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 넥틴-4-매개 질환을 치료하는 방법은 여기에서 제공된다. 하나의 구체 예에서, 여기에 제공된 유효량의 항-넥틴-4 ADC를 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 넥틴-4-매개 질환을 개선시키는 방법은 여기에서 제공된다. 어떤 구체 예에서, 피험자는 이를 필요로 하는 피험자이다. 몇몇 구체 예에서, 피험자는 넥틴-4-매개 질환을 앓고 있다. 다른 구체 예에서, 피험자는 넥틴-4-매개 질환에 걸릴 위험에 있다. 몇몇 구체 예에서, 투여는 넥틴-4-매개 질환의 예방, 관리, 치료 또는 개선을 결과한다. 하나의 구체 예에서, 항-넥틴-4 ADC는 항-넥틴-4 항체가 항체 M22-321b41.1 인 ADC이다.

[0473] 또 다른 구체 예에서, 여기에 제공된 유효량의 항-넥틴-4 ADC를 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 넥틴-4-매개 질환의 증상을 예방, 관리, 치료 및/또는 개선하는 방법은 여기에서 제공된다. 하나의 구체 예에서, 여기에 제공된 유효량의 항-넥틴-4 ADC를 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 넥틴-4-매개 질환의 증상을 예방하는 방법은 여기에서 제공된다. 하나의 구체 예에서, 여기에 제공된 유효량의 항-넥틴-4 ADC를 투여하는 단계를

포함하는, 피험자에서 넥틴-4-매개 질환의 증상을 관리하는 방법은 여기에서 제공된다. 하나의 구체 예에서, 여기에 제공된 유효량의 항-넥틴-4 ADC를 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 넥틴-4-매개 질환의 증상을 치료하는 방법은 여기에서 제공된다. 하나의 구체 예에서, 여기에 제공된 유효량의 항-넥틴-4 ADC를 투여하는 단계를 포함하는, 피험자에서 넥틴-4-매개 질환을 개선시키는 방법은 여기에서 제공된다. 어떤 구체 예에서, 피험자는 이를 필요로 하는 피험자이다. 몇몇 구체 예에서, 피험자는 넥틴-4-매개 질환을 앓고 있다. 다른 구체 예에서, 피험자는 넥틴-4-매개 질환에 걸릴 위험에 있다. 몇몇 구체 예에서, 투여는 넥틴-4-매개 질환의 증상의 예방, 관리, 치료 또는 개선을 결과한다. 하나의 구체 예에서, 항-넥틴-4 ADC는 항-넥틴-4 항체가 항체 M22-321b41.1 인 ADC이다.

[0474] 여기에 제공된 항체는 또한, 예를 들어, 시험관 내 및 생체 내 진단 및 치료 방법 모두에서, 넥틴-4 항원을 정제, 검출, 및 표적화하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 변형된 항체는, 생물학적 샘플에서 넥틴-4의 수준을 정성적 및 정량적으로 측정하기 위한 면역분석에 사용된다. 예를 들어, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988) (여기서 이의 전체적인 내용은 참조로서 병합됨)를 참조한다.

[0475] 또한, 여기서 제공된 유효량의 항-넥틴-4 ADC, 또는 항-넥틴-4 ADC를 포함하는 약제학적 조성물을 피험자에게 투여하여 넥틴-4-매개 질환을 예방, 관리, 치료 및/또는 개선하는 방법은 여기에서 제공된다. 하나의 관점에서, 항-넥틴-4 ADC는 실질적으로 정제된다 (즉, 이의 효과를 제한하거나 또는 바람직하지 않은 부작용을 일으키는 물질이 실질적으로 없다). 어떤 구체 예에서, 항-넥틴-4 ADC에서 항체는, 완전 인간 단일클론 항체와 같이, 완전 인간 단일클론 항체이다. 요법이 투여되는 피험자는, 비-영장류 (예를 들어, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 쥐, 등) 또는 영장류 (예를 들어, 사이노몰구스 원숭이와 같은, 원숭이, 또는 인간)와 같은 포유동물일 수 있다. 하나의 구체 예에서, 피험자는 인간이다. 또 다른 구체 예에서, 피험자는 넥틴-4-매개 질환을 가진 인간이다.

[0476] 다양한 전달 시스템은 알려져 있고, 리포솜에서 캡슐화, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 항-넥틴-4 ADC를 발현할 수 있는 제조합 세포, 수용체-매개 세포내섭취 (예를 들어, Wu and Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987), 참조), 레트로바이러스 일부로서 핵산의 구성 또는 기타 벡터, 등을 포함하는, 그러나, 이에 제한되지 않는, 예방제 또는 치료제 (예를 들어, 여기서 제공된 항-넥틴-4 ADC)를 투여하는데 사용될 수 있다. 예방제 또는 치료제 (예를 들어, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC), 또는 약제학적 조성물의 투여 방법은, 비경구 투여 (예를 들어, 피부 내, 근육내, 복강내, 정맥 내 및 피하), 경막외, 및 점막 (예를 들어, 비강내 및 경구 경로)를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 특별한 구체 예에서, 예방제 또는 치료제 (예를 들어, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC) 또는 약제학적 조성물은, 비강 내, 근육 내, 정맥 내 또는 피하로 투여된다. 예방제 또는 치료제, 또는 조성물은, 임의의 편리한 경로, 예를 들어, 주입 또는 정맥 주사에 의해, 상피 또는 점막 피부 내벽 (예를 들어, 구강 점막, 비강 점막, 직장 및 장 점막, 등)을 통한 흡수에 의해 투여될 수 있고, 기타 생물학적 활성제와 함께 투여될 수 있다. 투여는 전신 또는 국부일 수 있다. 부가적으로, 폐 투여 (pulmonary administration)는 또한, 예를 들어, 흡입기 또는 분무기 (nebulizer)의 사용, 및 에어로졸화제를 이용한 제형에 의해 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540 및 4,880,078; 및 PCT 공개 WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346, 및 WO 99/66903을 포함하며, 이들 각각은 이들의 전체적인 내용이 여기에 참조로서 병합된다.

[0477] 특별한 구체 예에서, 여기에 제공된 예방제 또는 치료제, 또는 약제학적 조성물을 치료가 필요한 영역에 국부적으로 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 이것은, 제한 없는 예로서, 국부 주입에 의해, 국소 투여에 의해 (예를 들어, 비강내 스프레이에 의해), 주사에 의해, 또는 실라스틱 막 (sialastic membranes), 또는 섬유와 같은, 막을 포함하는, 다공성, 비-다공성, 또는 젤라틴 물질인, 임플란트의 수단에 의해, 달성될 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC를 투여하는 경우, 항-넥틴-4 ADC가 흡수하지 않는 물질을 사용하도록 주의가 기울여야 한다.

[0478] 또 다른 구체 예에서, 예방제 또는 치료제, 또는 여기에 제공된 조성물은, 소포, 특히 리포솜에 전달될 수 있다 (Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Treat et al., in *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp.353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp.317-327; see generally *ibid.*, 참조).

[0479] 또 다른 구체 예에서, 여기에 제공된 예방제 또는 치료제, 또는 조성물은, 제어 방출 또는 서방성 시스템으로 전달될 수 있다. 하나의 구체 예에서, 제어 방출 또는 서방성을 달성하기 위해 펌프는 사용될 수 있다 (Langer, *supra*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:20; Buchwald et al., 1980, *Surgery* 88:507; Saudek

et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574, 참조). 또 다른 구체 예에서, 중합체성 물질은, 여기에 제공된 예방제 또는 치료제 (예를 들어, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC) 또는 조성물 (예를 들어, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.23:61; see also Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg.71:105; 미국 특허 5,679,377; 미국 특허 5,916,597; 미국 특허 5,912,015; 미국 특허 5,989,463; 미국 특허 5,128,326; PCT 공개 WO 99/15154; 및 PCT 공개 WO 99/20253, 참조)의 조절 방출 또는 서방성을 달성하는데 사용될 수 있다. 서방성 제형에 사용되는 중합체의 예로는, 폴리(2-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜라이드 (PLG), 폴리무수물, 폴리(N-비닐 피 롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리(아크릴아미드), 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드 (PLA), 폴리(락티드-코-글리콜라이드) (PLGA), 및 폴리오르토에스테르를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 하나의 구체 예에서, 서방성 제형에 사용되는 중합체는, 불활성이며, 침출성 불순물이 없고, 저장 안정성이고, 멸균이며, 생분해성이다. 또 다른 구체 예에서, 제어 방출 또는 서방성 시스템은, 치료 표적, 즉, 비강 또는 폐 가까이에 배치될 수 있으며, 따라서 전신 투여량의 일부만을 필요로 한다 (예를 들어, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol.2, pp.115-138 (1984), 참조). 제어된 방출 시스템은, Langer (1990, Science 249:1527-1533)의 보고서에서 논의된다. 기술분야의 당업자에게 알려진 임의의 기술은 사용되어 여기에 제공된 하나 이상의 항체를 포함하는 서방성 제형을 생성할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 4,526,938, PCT 공개 WO 91/05548, PCT 공개 WO 96/20698, Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," Radiotherapy & Oncology 39:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-854, and Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-760를 참조하고, 이들 각각은 이들의 전체적인 내용이 여기에 참조로 병합된다.

[0480] 특별한 구체 예에서, 여기서 제공된 조성물이 예방제 또는 치료제 (예를 들어, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC)를 인코딩하는 핵산인 경우, 상기 핵산은, 이의 인코딩된 예방제 또는 치료제의 발현을 촉진하기 위해, 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 이를 구축하고, 이것이 세포 내가 되도록, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터 (미국 특허 4,980,286, 참조)의 사용에 의해, 또는 직접 주사에 의해, 또는 미세입자 충격 주입법 (microparticle bombardment)의 사용 (예를 들어, 유전자 총; Biolistic, Dupont)에 의해, 이를 투여하여, 또는 지질 또는 세포 표면 수용체 또는 형질감염 작용제로 코팅하여, 또는 핵에 들어가는 것으로 알려진 호메오박스-형 펩티드 (homeobox-like peptide)에 연결하여 이를 투여하여 (예를 들어, Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868, 참조), 생체 내에서 투여될 수 있다. 선택적으로, 핵산은, 세포 내로 도입될 수 있고, 상동 재조합에 의한 발현을 위해 숙주 세포 DNA 내에 혼입될 수 있다.

[0481] 특별한 구체 예에서, 여기에 제공된 조성물은, 여기에 제공된 하나, 둘 또는 그 이상의 항체를 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 여기에 제공된 조성물은, 여기에 제공된 하나, 둘 또는 그 이상의 항체 및 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC 이외의 예방제 또는 치료제를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 상기 작용제는 넥틴-4-매개 질환의 예방, 관리, 치료 및/또는 개선에 유용한 것으로 알려지거나 또는 사용되었거나 또는 현재 사용된다. 예방제 또는 치료제에 부가하여, 여기에 제공된 조성물은 또한 담체를 포함할 수 있다.

[0482] 여기에 제공된 조성물은, 단위 투여 형태의 제조에 사용될 수 있는 약제학적 조성물 (예를 들어, 피험자 또는 환자에게 투여하기에 적절한 조성물)의 제조에 유용한 벌크 약물 조성물을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 여기에 제공된 조성물은 약제학적 조성물이다. 이러한 조성물은, 예방적 또는 치료적 유효량의 하나 이상의 예방제 또는 치료제 (예를 들어, 여기에 제공된 항체 또는 기타 예방제 또는 치료제), 및 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 약제학적 조성물은, 피험자에게 투여의 경로에 적절하도록 제형화될 수 있다.

[0483] 특별한 구체 예에서, 용어 "담체"는, 치료제가 함께 투여되는 희석제, 보조제 (예를 들어, 프로인트 보조제 (완전 및 불완전)), 부형제, 또는 비히클을 지칭한다. 이러한 약제학적 담체는, 땅콩유, 대두유, 미네랄 오일, 참기름 및 이와 유사한 것과 같은, 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 것들을 포함하는, 오일 및 물과 같은, 멸균 액체일 수 있다. 약제학적 조성물이 정맥 내 투여되는 경우, 물은 대표적인 담체이다. 식염수 용액 및 수성

텍스트로스 및 글리세롤 용액은 또한, 특히, 주사가 가능한 용액을 위한 액체 담체로서 사용될 수 있다. 적절한 약제학적 부형제는, 전분, 포도당, 락토오스, 슈크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 초크, 실리카 겔, 나트륨 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 건조 탈지유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 및 이와 유사한 것을 포함한다. 원한다면, 조성물은 또한 미량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 이들 조성물은, 용액, 현탁액, 에멀전, 정제, 환제, 캡슐, 분말, 서방성 제형 및 이와 유사한 것의 형태를 취할 수 있다. 경구 제형은, 약제학적 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 스테아르산 마그네슘, 나트륨 사카린, 셀룰로오스, 탄산 마그네슘, 등과 같은, 표준 담체를 포함할 수 있다. 적절한 약제학적 담체의 예로는, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA에 기재되어 있다. 이러한 조성물은, 예방적 또는 치료적 유효량의 항-넥틴-4 ADC, 예컨대, 정제된 형태를, 환자에게 적절한 투여를 위한 형태를 제공하기 위해 적절한 양의 담체와 함께, 함유할 것이다. 제형은 투여의 방식에 적절해야 한다.

[0484] 하나의 구체 예에서, 조성물은, 인간에게 정맥 내 투여를 위해 조정된 약제학적 조성물로서 일상적인 절차에 따라 제형화된다. 통상적으로, 정맥 내 투여용 조성물은, 멸균 등장성 수성 완충제 내에 용액이다. 필요한 경우, 조성물은 또한 주사 부위에서의 통증을 완화시키기 위해 리그노캄 (lignocaine)과 같은 국부 마취제 및 가용화제를 포함할 수 있다. 그러나, 이러한 조성물은, 정맥 이외의 경로로 투여될 수 있다.

[0485] 일반적으로, 여기에 제공된 조성물의 성분은, 예를 들어, 활성제의 양을 나타내는 앰플 또는 샷렛 (sachette)와 같은 기밀된 용기에 건조 동결건조된 분말 또는 물이 없는 농축물로서, 단위 투여 형태로 개별적으로 공급되거나 또는 함께 혼합된다. 조성물이 주입에 의해 투여되는 경우, 이것은 멸균 약제학적 등급의 물 또는 식염수를 함유하는 주입 병으로 분배될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 성분이 투여 전에 혼합될 수 있도록, 주사용 멸균수 또는 식염수의 앰플은 제공될 수 있다.

[0486] 여기에 제공된 항체 또는 항-넥틴-4 ADC는, 항체 또는 항-넥틴-4 ADC의 양을 나타내는 앰플 또는 샷렛과 같은 기밀된 용기에 포장될 수 있다. 하나의 구체 예에서, 항체 또는 항-넥틴-4 ADC는, 기밀된 용기에 건조 멸균된 동결건조된 분말 또는 물이 없는 농축물로서 공급되고, 예를 들어, 피험자에게 투여를 위해 적절한 농도로 물 또는 식염수로 재구성될 수 있다. 어떤 구체 예에서, 항체 또는 항-넥틴-4 ADC는, 기밀 용기에 건조 멸균 동결건조된 분말로서, 적어도 0.1 mg, 적어도 0.5 mg, 적어도 1 mg, 적어도 2 mg, 또는 적어도 3 mg, 예컨대, 적어도 5 mg, 적어도 10 mg, 적어도 15 mg, 적어도 25 mg, 적어도 30 mg, 적어도 35 mg, 적어도 45 mg, 적어도 50 mg, 적어도 60 mg, 적어도 75 mg, 적어도 80 mg, 적어도 85 mg, 적어도 90 mg, 적어도 95 mg, 또는 적어도 100 mg의 단위 투여량으로 공급된다. 동결건조된 항-넥틴-4 ADC는, 이의 원래의 용기에 2 내지 8°C로 저장될 수 있고, 항-넥틴-4 ADC는 재구성된 후 6시간 내에, 5시간 내에, 3시간 내에, 또는 1시간 이내와 같은, 12시간 내에 투여될 수 있다. 선택적인 구체 예에서, 항체 또는 항-넥틴-4 ADC는, 항체 또는 항-넥틴-4 ADC의 양 및 농도를 나타내는 기밀된 용기에 액체 형태로 공급된다. 어떤 구체 예에서, 액체 형태의 항체 또는 항-넥틴-4 ADC는, 기밀된 용기에 적어도 0.1 mg/ml, 적어도 0.5 mg/ml, 또는 적어도 1 mg/ml, 예컨대, 적어도 5 mg/ml, 적어도 10 mg/ml, 적어도 15 mg/ml, 적어도 25 mg/ml, 적어도 30 mg/ml, 적어도 40 mg/ml, 적어도 50 mg/ml, 적어도 60 mg/ml, 적어도 70 mg/ml, 적어도 80 mg/ml, 적어도 90 mg/ml, 또는 적어도 100 mg/ml로 공급된다.

[0487] 여기에 제공된 조성물은 중성 또는 염 형태로 제형화될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염은, 염산, 인산, 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 등으로부터 유래된 것과 같은 음이온으로 형성된 것, 및 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 수산화 제2 철, 이소프로필아민, 트리에틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인, 등으로부터 유래된 것과 같은 양이온으로 형성된 것을 포함한다.

[0488] 넥틴-4-매개 질환의 예방, 관리, 치료 및/또는 개선에 효과적일, 여기서 제공된 예방제 또는 치료제 (예를 들어, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC), 또는 조성물의 양은, 표준 임상 기술에 의해 결정될 수 있다.

[0489] 따라서, 0.1 µg/ml 내지 약 450 µg/ml, 몇몇 구체 예에서, 적어도 0.1 µg/ml, 적어도 0.2 µg/ml, 적어도 0.4 µg/ml, 적어도 0.5 µg/ml, 적어도 0.6 µg/ml, 적어도 0.8 µg/ml, 적어도 1 µg/ml, 적어도 1.5 µg/ml, 예컨대 적어도 2 µg/ml, 적어도 5 µg/ml, 적어도 10 µg/ml, 적어도 15 µg/ml, 적어도 20 µg/ml, 적어도 25 µg/ml, 적어도 30 µg/ml, 적어도 35 µg/ml, 적어도 40 µg/ml, 적어도 50 µg/ml, 적어도 75 µg/ml, 적어도 100 µg/ml, 적어도 125 µg/ml, 적어도 150 µg/ml, 적어도 200 µg/ml, 적어도 250 µg/ml, 적어도 300 µg/ml, 적어도 350 µg/ml, 적어도 400 µg/ml, 또는 적어도 450 µg/ml의 혈청 역가를 결과하는 항-넥틴-4 ADC 또는 조성물의 투여량은, 넥틴-4-매개 질환의 예방, 관리, 치료 및/또는 개선을 위해 인간에게 투여될 수 있다. 부가적으로, 최적의 투여량 범위의 확인을 돕기 위해 시험관 내 분석법은 선택적으로 사용될 수 있다. 제형에 사용되는 정확한 투여량은 또한, 투여의 경로, 및 넥틴-4-매개 질환의 심각성에 따라 달라질 것이며, 의사의 판단과 각 환자의 상황에 따

라 결정되어야 한다.

- [0490] 시험관 내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유래된 투여량-반응 곡선으로부터 유효량은 외삽법으로 추정될 수 있다.
- [0491] 여기에 제공된 항체의 경우, 환자에게 투여되는 투여량은, 통상적으로 환자 체중의 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg이다. 몇몇 구체 예에서, 환자에게 투여되는 투여량은, 환자 체중의 약 1 mg/kg 내지 약 75 mg/kg이다. 몇몇 구체 예에서, 환자에게 투여되는 투여량은, 환자 체중의 1mg/kg 내지 20mg/kg, 예컨대, 환자 체중의 1mg/kg 내지 5mg/kg이다. 일반적으로, 인간 항체는, 외래 폴리펩티드에 대한 면역 반응으로 인해 다른 종 유래의 항체보다 인체 내에서 더 긴 반감기를 갖는다. 따라서, 더 적은 투여량의 인간 항체 및 덜 빈번한 투여는 종종 가능하다. 더욱이, 여기에 제공된 항체의 투여량 및 투여 빈도는, 예를 들어, 지질화와 같은, 변형에 의해 항체의 흡수 및 조직 침투를 향상시켜 감소될 수 있다.
- [0492] 하나의 구체 예에서, 대략 100 mg/kg 이하, 대략 75 mg/kg 이하, 대략 50 mg/kg 이하, 대략 25 mg/kg 이하, 대략 10 mg/kg 이하, 대략 5 mg/kg 이하, 대략 1mg/kg 이하, 대략 0.5mg/kg 이하, 또는 대략 0.1mg/kg 이하의 항-넥틴-4 ADC는, 넥틴-4-매개 질환 관리하기 위해 5회, 4회, 3회, 2회 또는 1회 투여된다. 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC는, 약 1-12회 투여되며, 여기서, 투여량은, 의사에 의해 결정된 대로, 예를 들어, 주, 격주, 월간, 격월, 삼개월, 등으로 필요에 따라 투여될 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 더 적은 투여량 (예를 들어, 1-15 mg/kg)은, 더 빈번하게 (예를 들어, 3-6회) 투여될 수 있다. 다른 구체 예에서, 더 많은 투여량 (예를 들어, 25-100 mg/kg)은, 덜 빈번하게 (예를 들어, 1-3회) 투여될 수 있다. 그러나, 기술분야의 당업자에게 명백한 바와 같이, 다른 투여량 및 스케줄은, 여기에 제공된 범위 내에서 용이하게 결정될 수 있다.
- [0493] 특별한 구체 예에서, 서방성 제형에서 대략 100 mg/kg, 대략 75 mg/kg 이하, 대략 50 mg/kg 이하, 대략 25 mg/kg 이하, 대략 10 mg/kg 이하, 대략 5 mg/kg 이하, 대략 1 mg/kg 이하, 대략 0.5 mg/kg 이하, 대략 0.1 mg/kg 이하의 항-넥틴-4 ADC는, 피험자, 예컨대, 인간에게 투여되어 넥틴-4-매개 질환을 예방, 관리, 치료 및/또는 개선시킨다. 또 다른 특별한 구체 예에서, 대략 100mg/kg, 대략 75mg/kg 이하, 대략 50mg/kg 이하, 대략 25mg/kg 이하, 대략 10mg/kg 이하, 대략 5mg/kg, 대략 1 mg/kg 이하, 대략 0.5 mg/kg 이하, 또는 대략 0.1 mg/kg 이하의 서방성 제형이 아닌 항-넥틴-4 ADC의 큰 환약 (bolus)은, 피험자, 예컨대, 인간에게, 넥틴-4-매개 질환의 예방, 관리, 치료 및/또는 개선을 위해 투여되고, 어떤 기간 후에, 대략 100 mg/kg, 대략 75 mg/kg 이하, 대략 50 mg/kg 이하, 대략 25mg/kg 이하, 대략 10mg/kg 이하, 대략 5mg/kg 이하, 대략 1mg/kg 이하, 대략 0.5mg/kg 이하, 또는 대략 5mg/kg 이하의 서방성 제제로 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC는, 상기 피험자에게 (예를 들어, 비강내 또는 근육내로) (예컨대, 한 번에) 2회, 3회 또는 4회 투여된다. 이 구체 예에 따르면, 특정 기간은, 1 내지 5일, 1주일, 2주일 또는 1개월 일 수 있다.
- [0494] 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC의 단일 투여량은, 일년에 걸쳐 격주 (예를 들어, 14일) 간격에서, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 21, 21, 22, 23, 24, 25, 또는 26회로, 넥틴-4-매개 질환을 예방, 관리, 치료 및/또는 개선하기 위해 환자에게 투여되고, 여기서, 투여량은, 약 0.1 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 15 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30 mg/kg, 약 35 mg/kg, 약 40 mg/kg, 약 45 mg/kg, 약 50 mg/kg, 약 55 mg/kg, 약 60 mg/kg, 약 65 mg/kg, 약 70 mg/kg, 약 75 mg/kg, 약 80 mg/kg, 약 85 mg/kg, 약 90 mg/kg, 약 95 mg/kg, 약 100 mg/kg, 또는 이들의 조합 (즉, 각 투여량의 격주간 투여량은 같거나 또는 같지 않을 수 있음)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0495] 또 다른 구체 예에서, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC의 단일 투여량은, 일년에 걸쳐 약 한달 (예를 들어, 약 30 일) 간격에서, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12회로, 넥틴-4-매개 질환을 예방, 관리, 치료 및/또는 개선하기 위해 환자에게 투여되고, 여기서, 투여량은 약 0.1 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 15 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30 mg/kg, 약 35 mg/kg, 약 40 mg/kg, 약 45 mg/kg, 약 50 mg/kg, 약 55 mg/kg, 약 60 mg/kg, 약 65 mg/kg, 약 70 mg/kg, 약 75 mg/kg, 약 80 mg/kg, 약 85 mg/kg, 약 90 mg/kg, 약 95 mg/kg, 약 100 mg/kg, 또는 이들의 조합 (즉, 각 투여량의 월간 투여량은 같거나 또는 같지 않을 수 있음)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0496] 하나의 구체 예에서, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC의 단일 투여량은, 일년에 걸쳐 약 두달 (예를 들어, 약 60일) 간격에서, 2, 3, 4, 5, 또는 6회로, 넥틴-4-매개 질환을 예방, 관리, 치료 및/또는 개선하기 위해 환자에게 투여되고, 여기서, 투여량은 약 0.1 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 15 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30 mg/kg, 약 35 mg/kg, 약 40 mg/kg, 약 45 mg/kg, 약 50 mg/kg, 약

55 mg/kg, 약 60 mg/kg, 약 65 mg/kg, 약 70 mg/kg, 약 75 mg/kg, 약 80 mg/kg, 약 85 mg/kg, 약 90 mg/kg, 약 95 mg/kg, 약 100 mg/kg, 또는 이들의 조합 (즉, 각 두달 투여량은 같거나 또는 같지 않을 수 있음)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0497] 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC의 단일 투여량은, 일년에 걸쳐 약 세달 (예를 들어, 약 120일) 간격에서, 2, 3, 또는 4회로, 넥틴-4-매개 질환을 예방, 관리, 치료 및/또는 개선하기 위해 환자에게 투여되고, 여기서 투여량은, 약 0.1 mg/kg, 약 0.5 mg/kg, 약 1 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 10 mg/kg, 약 15 mg/kg, 약 20 mg/kg, 약 25 mg/kg, 약 30 mg/kg, 약 35 mg/kg, 약 40 mg/kg, 약 45 mg/kg, 약 50 mg/kg, 약 55 mg/kg, 약 60 mg/kg, 약 65 mg/kg, 약 70 mg/kg, 약 75 mg/kg, 약 80 mg/kg, 약 85 mg/kg, 약 90 mg/kg, 약 95 mg/kg, 약 100 mg/kg, 또는 이들의 조합 (즉, 각 세달 투여량은 같거나 또는 같지 않을 수 있음)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0498] 어떤 구체 예에서, 환자에게 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC의 투여량에 대한 투여 경로는, 비강내, 근육내, 정맥 내 또는 이들의 조합이지만, 여기에 기재된 다른 경로도 허용가능하다. 각 투여량은 동일한 투여 경로에 의해 투여되거나 또는 투여되지 않을 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC는, 여기에 제공된 같거나 또는 다른 항-넥틴-4 ADC의 다른 투여량으로 동시에 또는 나중에 다중 투여 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0499] 어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC는, 피험자에게 예방적으로 또는 치료적으로 투여된다. 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC는, 넥틴-4-매개 질환 또는 이의 증상을 예방, 완화 또는 개선시키기 위해 피험자에게 예방적으로 또는 치료적으로 투여될 수 있다.

[0500] 27. 유전자 치료

[0501] 특별한 구체 예에서, 항체 또는 이의 기능적 유도체를 인코딩하는 서열을 포함하는 핵산은, 여기에 제공된 방법에 사용하기 위해, 예를 들어, 유전자 요법에 의한, 넥틴-4-매개 질환, 장애 또는 질병을 예방, 관리, 치료 및/또는 개선하기 위해, 피험자에게 투여된다. 이러한 요법은, 발현된 또는 발현 가능한 핵산의 피험자에게 투여에 의해 수행되는 요법을 포괄한다. 하나의 구체 예에서, 핵산은 항-넥틴-4 ADC를 제공하기 위해 접합될 수 있는 이들의 인코딩된 항체를 생성하고, 항체 또는 항-넥틴-4 ADC는, 예방 또는 치료 효과를 매개한다.

[0502] 기술분야에서 이용가능한 재조합 유전자 발현 (또는 유전자 요법)을 위한 방법들 중 어느 하나는 사용될 수 있다. 대표적인 방법은 하기에 기재되고, 실시예 섹션에서 제공된다.

[0503] 유전자 요법의 방법의 일반적인 검토를 위해, Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; 및 Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIBTECH 11(5):155-215를 참조한다. 사용될 수 있는 재조합 DNA 기술의 분야에 통상적으로 알려진 방법은, Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); 및 Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990)에 기재되어 있다.

[0504] 특별한 구체 예에서, 조성물은 여기에 제공된 항-넥틴-4 항체를 인코딩하는 핵산을 포함하고, 상기 핵산은 적절한 숙주에서 항체 또는 키메라 단백질 또는 중쇄 또는 경쇄 또는 이의 치료 모이어티 또는 약물 모이어티를 발현하는 발현 벡터의 일부이다. 특히, 이러한 핵산은, 항-넥틴-4 항체 인코딩 영역에 작동가능하게 연결된, 이중 프로모터와 같은, 프로모터를 가지며, 상기 프로모터는 유도성 또는 구성적이며, 선택적으로, 조직-특이적이다. 또 다른 특정 구체 예에서, 핵산 분자는 사용되고, 여기서, 항-넥틴-4 항체 인코딩 서열 및 임의의 기타 원하는 서열은, 게놈의 원하는 부위에서 상동성 재조합을 촉진하는 영역의 측면에 있고, 따라서, 항-넥틴-4 ADC 인코딩 핵산의 염색체 내 발현을 제공한다 (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438). 몇몇 구체 예에서, 발현된 항-넥틴-4 항체 분자는, 단일쇄 항체를 포함하고; 선택적으로, 핵산 서열은 항-넥틴-4 항체에서 중쇄 및 경쇄, 또는 이의 단편 모두를 인코딩하는 서열을 포함한다.

[0505] 피험자 내로 핵산의 전달은 직접적일 수 있고, 이 경우, 피험자는 핵산 또는 핵산-운반 벡터 (nucleic acid-carrying vectors)에 직접 노출되거나, 또는 간접적일 수 있으며, 이 경우, 세포는 먼저 시험관 내에서 핵산으로 형질전환되고, 그 다음 피험자에게 이식된다. 이들 두 가지 접근법은, 생체 내 또는 생체 외 유전자 요법으로, 각각 알려져 있다.

[0506] 특별한 구체 예에서, 핵산 서열은 생체 내에서 직접 투여되며, 여기서, 서열은 인코딩된 생성물을 생성하도록

발현된다. 이것은, 기술분야에 알려진 수많은 방법 중 어느 하나에 의해, 예를 들어, 이들을 적절한 핵산 발현 벡터의 일부로서 구축하고, 서열이, 예를 들어, 결합 또는 약화된 레트로바이러스 또는 기타 바이러스 벡터를 사용하여 감염시켜 (미국 특허 4,980,286, 참조), 또는 네이키드 DNA (naked DNA)의 직접 주입에 의해, 또는 미세입자 충격 주입법의 사용에 의해 (예를 들어, 유전자 총; Biolistic, Dupont), 세포 내가 되도록 벡터를 투여하여, 또는 지질 또는 세포 표면 수용체 또는 형질감염 작용제, 리포솜, 미세입자, 또는 미세캡슐로 코팅시켜, 또는 핵에 들어가는 것으로 알려진 펩티드에 연결하여 이들을 투여시켜, 수용체-매개 세포내섭취에 적용된 리간드 (예를 들어, Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 참조) (수용체를 특이적으로 발현하는 세포 타입을 표적으로 하는데 사용될 수 있음)에 연결하여 이를 투여시켜, 등등에 의해, 달성될 수 있다. 또 다른 구체 예에서, 핵산-리간드 복합체는 형성될 수 있고, 여기서, 리간드는 엔도솜 (endosomes)을 파괴하기 위해 융합성 바이러스 펩티드를 포함하여, 핵산이 리소솜 분해를 피하는 것을 가능하게 한다. 또 다른 구체 예에서, 핵산은, 세포 특이적 흡수 및 발현을 위해, 특이적 수용체를 표적화하여, 생체 내에서 표적화될 수 있다 (예를 들어, PCT 공개 WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; W093/14188, WO 93/20221, 참조). 선택적으로, 핵산은 세포 내에서 도입될 수 있고, 상동성 조합에 의해, 발현을 위해 숙주 세포 DNA 내에 혼입될 수 있다 (Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935; 및 Zijlstra et al., 1989, Nature 342:435-438, 참조).

[0507] 특별한 구체 예에서, 항-넥틴-4 항체를 인코딩하는 핵산 서열을 함유하는 바이러스 벡터는 사용된다. 예를 들어, 레트로바이러스 벡터는 사용될 수 있다 (Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599, 참조). 이들 레트로바이러스 벡터는, 바이러스 게놈의 올바른 패키징 및 숙주 세포 DNA 내로 혼입에 필요한 구성요소를 함유한다. 유전자 요법에 사용되는 항-넥틴-4 항체를 인코딩하는 핵산 서열은, 피험자 내로 유전자의 전달을 용이하게 하는, 하나 이상의 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 레트로바이러스 벡터에 대한 좀 더 상세한 내용은, 화학요법에 대해 더 내성이 있는 줄기 세포를 만들기 위해 *mdr 1* 유전자를 조절 줄기 세포 (hematopoietic stem cells)에 전달하는 레트로바이러스 벡터의 사용을 기재하고 있는, Boesen et al., 1994, Biotherapy 6:291-302에서 확인될 수 있다. 유전자 요법에서 레트로바이러스 벡터의 사용을 예시하는 기타 참고문헌은: Clowes et al., 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Klein et al., 1994, Blood 83:1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141; 및 Grossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114이다.

[0508] 아데노바이러스는 항체의 재조합 생산에 사용될 수 있는 다른 바이러스 벡터이다. 아데노바이러스는, 호흡 상피에 유전자를 전달하는데 특히 매력적인 비히클이다. 아데노바이러스는, 호흡기 상피에 자연적으로 감염되어, 경증 질환을 유발한다. 아데노바이러스-기반 전달 시스템의 다른 표적은, 간, 중추 신경계, 내피 세포, 및 근육이다. 아데노바이러스는, 비-분열 세포 (non-dividing cells)를 감염시킬 수 있는 장점이 있다. Kozarsky and Wilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503은, 아데노바이러스-기반 유전자 요법에 대한 검토를 제시한다. Bout et al., 1994, Human Gene Therapy 5:3-10은, 유전자를 붉은 털 원숭이의 호흡 상피로 전달하는데 아데노바이러스 벡터의 사용을 보여준다. 유전자 요법에서 아데노바이러스를 사용하는 기타 사례는, Rosenfeld et al., 1991, Science 252:431-434; Rosenfeld et al., 1992, Cell 68:143-155; Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; PCT 공개 W094/12649; 및 Wang et al., 1995, Gene Therapy 2:775-783에서 확인할 수 있다. 특별한 구체 예에서, 아데노바이러스 벡터는 사용된다.

[0509] 아데노-연관 바이러스 (AAV)는 또한 활용될 수 있다 (Walsh et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300; 및 미국 특허 5,436,146). 특별한 구체 예에서, AAV 벡터는, 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC를 발현시키는데 사용된다. 어떤 구체 예에서, AAV는 VH 도메인을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 다른 구체 예에서, AAV는 VL 도메인을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 어떤 구체 예에서, AAV는 VH 도메인 및 VL 도메인을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 여기에 제공된 방법의 몇몇 구체 예에서, 피험자는, VH 도메인을 인코딩하는 핵산을 포함하는 AAV 및 VL 도메인을 인코딩하는 핵산을 포함하는 AAV가 투여된다. 다른 구체 예에서, 피험자는 VH 도메인 및 VL 도메인을 인코딩하는 핵산을 포함하는 AAV가 투여된다. 어떤 구체 예에서, VH 및 VL 도메인은 과-발현된다.

[0510] 유전자 요법에 대한 또 다른 접근법은, 전기천공, 리포펙션 (lipofection), 인산 칼슘 매개 형질감염, 또는 바이러스 감염과 같은 방법에 의해 조직 배양에서 세포에 유전자를 전달하는 단계를 포함한다. 일반적으로, 전달 방법은, 세포에 선택 가능한 마커의 전달을 포함한다. 세포는 그 다음 전달된 유전자를 취하고 발현하는 세포를 단리시키기 위해 선택된다. 해당 세포는 그 다음 피험자에게 전달된다.

[0511] 이러한 구체 예에서, 핵산은 그 결과로 생긴 재조합 세포의 생체 내 투여 전에 세포 내로 도입된다. 이러한 도

입은, 형질감염, 전기천공, 미세주입, 핵산 서열을 함유하는 바이러스 또는 박테리오파지 벡터로 감염, 세포 융합, 염색체-매개 유전자 전달, 미세세포매개된 유전자 전달, 회전타원체 융합, 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 기술분야에 알려진 임의의 방법에 의해 수행될 수 있다. 세포 내로 외래 유전자의 도입을 위한 수많은 기술은 알려져 있고 (예를 들어, Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; Clin. Pharma. Ther. 29:69-92 (1985), 참조), 수용자 세포의 필요한 발생적 및 생리학적 기능들이 방해받지 않는 한, 여기에 제공된 방법에 따라 사용될 수 있다. 상기 기술은, 핵산이 세포에 의해 발현될 수 있도록, 예컨대, 이의 세포 자손에 의해 유전 및 발현될 수 있도록, 세포에 핵산의 안정적 전달을 가능하게 해야 한다.

[0512] 그 결과로 생긴 재조합 세포는, 기술분야에 알려진 다양한 방법에 의해 피험자에게 전달될 수 있다. 재조합 혈액 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포)는, 정맥 내로 투여될 수 있다. 사용을 위해 예상되는 세포의 양은, 원하는 효과, 환자 상태, 등에 의존하고, 기술분야의 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0513] 유전자 요법의 목적을 위해 핵산이 도입될 수 있는 세포는, 임의의 원하는, 이용가능한 세포 타입을 포괄하고, 상피 세포, 내피 세포, 각질세포, 섬유모세포, 근육 세포, 간세포; 림프구 및 골수 세포, 예컨대 T 림프구, B 림프구, 단핵구, 대식세포, 호중구, 호산구, 거핵구, 과립구; 다양한 줄기 또는 전구 세포, 특히 조혈 줄기 또는 전구 세포, 예를 들어, 골수, 제대혈, 말초 혈액, 태아 간, 등으로부터 얻어진 세포를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0514] 특별한 구체 예에서, 유전자 요법에 사용되는 세포는, 피험자에게 자가 조직이다.

[0515] 유전자 치료에 재조합 세포가 사용되는 구체 예에서, 항-넥틴-4 항체를 인코딩하는 핵산 서열은, 이들이 세포 또는 그들의 자손에 의해 발현될 수 있도록 세포 내로 도입되고, 그 다음 재조합 세포는 치료 효과를 위해 생체 내에 투여된다. 특별한 구체 예에서, 줄기 세포 또는 전구 세포는 사용된다. 시험관 내에서 단리 및 유지될 수 있는 임의의 줄기 및/또는 전구 세포는, 여기에 제공된 방법의 이러한 구체 예에 따라 잠재적으로 사용될 수 있다 (예를 들어, PCT 공개 WO 94/08598; Stemple and Anderson, 1992, Cell 71:973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229; 및 Pittelkow and Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771, 참조).

[0516] 특별한 구체 예에서, 유전자 요법의 목적을 위해 도입될 핵산은, 인코딩 영역에 작동 가능하게 연결된 유도성 프로모터를 포함하여, 전사의 적절한 유도물질 (inducer)의 존재 또는 부재를 제어하여 핵산의 발현을 제어할 수 있다.

[0517] 28. 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드

[0518] 또한, 넥틴-4 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 여기에 제공된 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드는 제공된다. 또한, 여기에 제공된 변형된 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드에, 예를 들어, 상기 정의된 바와 같은, 높은 엄격성, 중간 또는 낮은 엄격성 혼성화 조건하에서 혼성화되는 폴리뉴클레오티드는 여기에서 제공된다.

[0519] 기술분야에 알려진 어떤 방법에 의해, 폴리뉴클레오티드는 얻어질 수 있고, 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열은 결정된다. 여기에 제공된 어떤 넥틴-4 항체의 아미노산 서열이 알려져 있기 때문에, 이들 항체를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 이들 항체의 변형된 버전은, 기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 결정될 수 있다, 즉, 특정 아미노산을 인코딩하는 것으로 알려진 뉴클레오티드 코돈은 항체를 인코딩하는 핵산을 발생하는 방식으로 조립된다. 항체를 인코딩하는 이러한 폴리뉴클레오티드는, 간단히 말해서, 항체, 이의 단편 또는 변이체를 인코딩하는 서열의 일부를 함유하는 중첩 올리고뉴클레오티드의 합성, 이들 올리고뉴클레오티드의 어닐링 및 결합, 및 그 다음 PCR에 의해 결합된 올리고뉴클레오티드의 증폭을 포함하는, (예를 들어, Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242에 기재된 바와 같이) 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오티드로부터 조립될 수 있다.

[0520] 선택적으로, 여기에 제공된 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 적절한 공급원 (예를 들어, 2017년 6월 13 일자에 기탁된, ATCC 수탁 번호 PTA-124245를 갖는 여기에 제공된 바와 같은 M22-321b41.1 하이브리도마) 유래의 핵산으로부터 발생될 수 있다. 만약 특정 항체를 인코딩하는 핵산을 함유하는 클론이 이용가능하지 않지만, 항체 분자의 서열이 알려져 있다면, 면역글로불린을 인코딩하는 핵산은, 서열의 3' 및 5' 말단에 혼성화가능한 합성 프라이머를 사용한 PCR 증폭에 의해 또는 확인을 위한 특정 유전자 서열에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프로브, 예를 들어, 항체를 인코딩하는 cDNA 라이브러리 유래의 cDNA 클론을 사용하는 클로닝에 의해, 적절한 공급원 (예를 들어, 여기에 제공된 항체를 발현하도록 선택된 하이브리도마 세포와 같은 항체를 발현하는, 임의

의 조직 또는 세포로부터, 발생된 항체 cDNA 라이브러리 또는 cDNA 라이브러리, 또는 단리된, 폴리 A+ RNA와 같은, 핵산)으로부터 얻어질 수 있거나 또는 화학적으로 합성될 수 있다. PCR에 의해 발생된 증폭된 핵산은 그 다음, 기술분야에 잘 알려진 임의의 방법을 사용하여 복제가능한 클로닝 벡터 내로 클로닝될 수 있다.

[0521] 어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 핵산 분자는, (VH를 인코딩하는) SEQ ID NO:38 및/또는 (VL을 인코딩하는) SEQ ID NO:37 중 어느 하나에 나타난 바와 같은 핵산 서열, 또는 (예를 들어, 여기에 제공된 항체, 예컨대, 전장 항체, 항체의 중쇄 및/또는 경쇄, 또는 여기에 제공된 단일쇄 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열로서) 이의 임의의 조합을 포함하거나 또는 이루어진다.

[0522] 어떤 관점에서, 벡틴-4 항원에 면역특이적으로 결합하는, 여기에 기재된 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 또는 이의 단편 (예를 들어, 가변 경쇄 영역 및/또는 가변 중쇄 영역)을 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 및 벡터, 예를 들어, 숙주 세포 (예를 들어, E. coli 및 포유동물 세포)에서 재조합 발현을 위한 이러한 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터는 여기에서 제공된다. 어떤 관점에서, 세포 (예를 들어, 숙주 세포)는 여기에서 제공된다. 또한, 여기에 기재된 항체 및 항원-결합 단편의 제조 방법은 여기에서 제공된다.

[0523] 어떤 관점에서, 여기에 기재된 항체의 경쇄 또는 중쇄를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 여기에서 제공된다. 어떤 구체 예에서, 여기에 기재된 항체의 경쇄 및 중쇄를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 여기에서 제공된다. 폴리뉴클레오타이드는, 여기에 기재된 항체의 VL FRs 및 CDRs를 포함하는 경쇄를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다 (예를 들어, 각각 표 1-2 참조). 폴리뉴클레오타이드는, 여기에 기재된 항체의 VH FRs 및 CDRs를 포함하는 중쇄를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다 (예를 들어, 각각 표 1-2 참조). 특별한 구체 예에서, 여기에 기재된 폴리뉴클레오타이드는, SEQ ID NO:37의 아미노산 서열을 포함하는 VL 사슬 영역을 인코딩한다. 특별한 구체 예에서, 여기에 기재된 폴리뉴클레오타이드는, SEQ ID NO:38 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 VH 사슬 영역을 인코딩한다.

[0524] 특정 구체 예에서, 예를 들어, 항체 M22-321b41.1의 VL CDR1, VL CDR2, 및 VL CDR3을 함유하는 3개의 VL 사슬 CDRs를 포함하는 항-벡틴-4 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 여기에서 제공된다 (예를 들어, 표 1 참조). 특별한 구체 예에서, 예를 들어, 항체 M22-321b41.1의 VH CDR1, VH CDR2, 및 VH CDR3을 함유하는 3개의 VH 사슬 CDRs를 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 여기에서 제공된다 (예를 들어, 표 1 참조).

[0525] 특정 구체 예에서, 여기에 기재된 아미노산 서열을 포함하는, 예를 들어, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4를 함유하는, VL 사슬 영역을 포함하는 항-벡틴-4 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 여기에서 제공된다 (예를 들어, 표 1-2 참조). 특별한 구체 예에서, 여기에 기재된 아미노산 서열을 포함하는, 예를 들어, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4를 함유하는, VH 사슬 영역을 포함하는 항-벡틴-4 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드는 여기에서 제공된다 (예를 들어, 표 1-2 참조).

[0526] 어떤 구체 예에서, 여기에 기재된 폴리뉴클레오타이드는, 여기에 기재된 아미노산을 포함하는 가변 경쇄 (VL) 사슬 영역을 포함하는 여기에 제공된 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하고 (예를 들어, 표 1 참조), 여기서, 항체는 벡틴-4-폴리펩티드에 면역특이적으로 결합한다.

[0527] 어떤 구체 예에서, 여기에 기재된 폴리뉴클레오타이드는, 여기에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 가변 중쇄 (VH) 사슬 영역을 포함하는 여기에 제공된 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 (예를 들어, 표 1 참조)을 포함하며, 여기서, 항체는 벡틴-4 폴리펩티드에 면역특이적으로 결합한다.

[0528] 어떤 관점에서, 폴리뉴클레오타이드는, 여기에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 VL FRs를 포함하는 VL 사슬 영역을 포함하는 여기에 제공된 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 (예를 들어, 표 2 참조)을 포함하며, 여기서, 항체는 벡틴-4 폴리펩티드에 면역특이적으로 결합한다. 어떤 관점에서, 폴리뉴클레오타이드는, 여기에 기재된 아미노산 서열을 갖는 하나 이상의 VH FRs를 포함하는 VH 사슬 영역을 포함하는 여기에 제공된 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 (예를 들어, 표 2 참조)을 포함하며, 여기서, 항체는 벡틴-4 폴리펩티드, 예를 들어, 인간 벡틴-4-폴리펩티드에 면역특이적으로 결합한다.

[0529] 특별한 구체 예에서, 여기에 제공된 폴리뉴클레오타이드는, 인간 프레임워크 영역인 프레임워크 영역 (예를 들어, VL 도메인 및 VH 도메인의 프레임워크 영역)을 포함하는 여기에 기재된 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 여기서, 항체는 벡틴-4 폴리펩티드에 면역특이적으로 결합한다.

[0530] 어떤 구체 예에서, 여기에 제공된 폴리뉴클레오타이드는, 벡틴-4 폴리펩티드에 면역특이적으로 결합하는, 여기에 기재된 항체 M22-321b41.1의 VH 또는 VL, 각각을 인코딩하는, 표 3에 기재된 바와 같은 뉴클레오타이드 서열을 포

함한다.

[0531] 항체의 재조합 생산

[0532] 벡터-4 항원에 면역특이적으로 결합하는 여기에 제공된 항체 (예를 들어, 여기에 제공된 전-장 항체, 항체의 중쇄 및/또는 경쇄, 또는 단일쇄 항체)의 재조합 발현은, 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 발현 벡터의 구축을 필요로 한다. 여기에 제공된 항체 분자, 항체의 중쇄 또는 경쇄, 또는 (예컨대, 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인을 함유하는, 그러나 필수적이지는 않은) 이의 단편을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 얻어지면, 항체 분자의 생산을 위한 벡터는, 기술분야에 잘-알려진 기술을 사용하여 재조합 DNA 기술에 의해 생성될 수 있다. 따라서, 뉴클레오타이드 서열을 인코딩하는 항체를 함유하는 폴리뉴클레오타이드를 발현시켜 단백질을 제조하는 방법은 여기에 기재된다. 기술분야의 당업자에게 알려진 방법은, 적절한 전사 및 번역 제어 신호 및 항체 인코딩 서열을 함유하는 발현 벡터를 구축하는데 사용될 수 있다. 이들 방법은, 예를 들어, 시험관 내 재조합 DNA 기술, 합성 기술, 및 생체 내 유전자 재조합을 포함한다. 여기에 제공된 항체 분자, 항체의 중쇄 또는 경쇄, 항체 또는 이의 단편의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인, 또는 프로모터에 작동가능하게 연결된 중쇄 또는 경쇄 CDR을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 복제가능한 벡터는 또한 제공된다. 이러한 벡터는, 항체 분자의 불변 영역을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 (예를 들어, 국제 공개 WO 86/05807 및 WO 89/01036; 및 미국 특허 5,122,464, 참조)을 포함할 수 있고, 항체의 가변 도메인은, 전체 중쇄, 전체 경쇄, 또는 전체 중쇄 및 경쇄 모두의 발현을 위해 이러한 벡터 내로 클론될 수 있다.

[0533] 발현 벡터는, 통상적인 기술에 의해 숙주 세포로 전달되고, 형질감염된 세포는 통상적인 기술에 의해 배양되어 여기에 제공된 항체를 생성한다. 따라서, 또한, 이중 프로모터에 작동가능하게 연결된, 여기에 제공된 항체 또는 이의 단편, 또는 이의 중쇄 또는 경쇄, 또는 이의 단편, 또는 여기에 제공된 단일쇄 항체를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 숙주 세포는 여기에서 제공된다. 이중-쇄 항체의 발현을 위한 어떤 구체 예에서, 중쇄 및 경쇄 모두를 인코딩하는 벡터는, 이하 상세히 기재된 바와 같이, 전체 면역글로불린 분자의 발현을 위해 숙주 세포에서 공동-발현될 수 있다.

[0534] 다양한 숙주-발현 벡터 시스템은, 여기에 제공된 항체 분자를 발현하는데 활용될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 5,807,715, 참조). 이러한 숙주-발현 시스템은, 관심의 인코딩 서열이 생성되고 나중에 정제될 수 있는 비히클을 나타내지만, 또한 적절한 뉴클레오타이드 인코딩 서열로 형질전환된 또는 형질감염된 경우, 여기에서 제공된 항체 분자를 인시튜 발현할 수 있는 세포를 나타낸다. 이들은, 항체 인코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터들로 형질전환된 박테리아 (예를 들어, *E. coli* 및 *B. subtilis*); 항체 인코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터로 형질전환된 효모 (예를 들어, *Saccharomyces Pichia*); 항체 인코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, baculovirus)로 감염된 곤충 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터 (예를 들어, 콜리플라워 모자이크 바이러스 (CaMV), 담배 모자이크 바이러스 (TMV))로 감염되거나 또는 항체 인코딩 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터 (예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포의 계놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터 (late promoter); 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 구축물을 품은 포유류 세포 시스템 (예를 들어, COS, CHO, BHK, 293, NS0, 및 3T3 세포들)과 같은, 미생물을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 특히 전체 재조합 항체 분자의 발현을 위해, 대장균과 같은 박테리아 세포, 또는 진핵 세포는, 재조합 항체 분자의 발현에 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간 사이토메갈로바이러스 유래의 주요 중간 초기 유전자 프로모터 요소 (gene promoter element)와 같은 벡터와 함께 중국 햄스터 난소 세포 (CHO)와 같은 포유동물 세포는, 항체에 대한 효과적인 발현 시스템이다 (Foecking et al., 1986, Gene 45:101; 및 Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2). 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 항체는 CHO 세포에서 생성된다. 특별한 구체 예에서, 벡터-4 항원에 면역특이적으로 결합하는 여기에 제공된 항체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 발현은, 구성적 프로모터, 유도성 프로모터 또는 조직 특이적 프로모터에 의해 조절된다.

[0535] 박테리아 시스템에서, 다수의 발현 벡터는, 발현되는 항체 분자에 의도된 용도에 따라 유리하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 대량의 이러한 항체가 생성되는 경우, 항체 분자의 약제학적 조성물의 발생을 위해, 쉽게 정제된 높은 수준의 용해 단백질 생성물의 발현을 지향하는 벡터는 바람직할 수 있다. 이러한 벡터는, *E. coli* 발현 벡터 pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO 12:1791), 여기서, 항체 인코딩 서열은, 용해 단백질이 생성도록, lac Z 인코딩 영역을 갖는 프레임에서 벡터 내로 개별적으로 결합될 수 있음; pIN 벡터 (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); 및 이와 유사한 것을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. pGEX 벡터는 또한 글루타티온 5-트랜스퍼라제 (GST)로

융합 단백질로서 외래 폴리펩티드를 발현시키는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이며, 매트릭스 글루타티온 아가로스 비드에 흡착 및 결합한 후에 자유 글루타티온 (free glutathione)의 존재하에 용리시켜 용해된 세포로부터 쉽게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는, 클로닝된 표적 유전자 생성물이 GST 모이어티로부터 방출될 수 있도록 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 설계된다.

[0536] 곤충 시스템에서, *Autographa californica* 핵 다면체병 바이러스 (AcNPV)는, 외래 유전자를 발현시키기 위한 벡터로 사용된다. 바이러스는 스포도프테라 프루기페르다 (*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 성장한다. 항체 인코딩 서열은, 바이러스의 비-필수 영역 (예를 들어, 폴리헤드린 유전자)으로 개별적으로 클로닝될 수 있고, AcNPV 프로모터 (예를 들어, 폴리헤드린 프로모터)의 제어하에 놓일 수 있다.

[0537] 포유동물 숙주 세포에서, 다수의 바이러스-기반 발현 시스템은 활용될 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우, 관심의 항체 인코딩 서열은, 아데노바이러스 전사/번역 제어 복합체, 예를 들어, 후기 프로모터 및 트리파티트 리더 서열 (tripartite leader sequence)에 결합될 수 있다. 이러한 키메라 유전자는 그 다음 시험관 내 또는 생체 내 재조합에 의해 아데노바이러스 게놈에 삽입될 수 있다. 바이러스 게놈의 비-필수 영역 (예를 들어, 영역 E1 또는 E3)에서 삽입은, 감염된 숙주에서 항체 분자를 발현할 수 있고 생존할 수 있는 재조합 바이러스를 결과할 것이다 (예를 들어, Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359, 참조). 삽입된 항체 인코딩 서열의 효율적인 번역을 위해 특별한 개시 신호는 필요할 수도 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접 서열을 포함한다. 게다가, 개시 코돈은 전체 삽입물의 번역을 보장하기 위해 원하는 인코딩 서열의 관독 프레임에 맞게 작동하여야 한다. 이들 외인성 번역 제어 신호 및 개시 코돈은, 천연 및 합성 모두에서, 다양한 기원일 수 있다. 발현의 효율은 적절한 전사 인핸서 요소, 전사 종결자, 등의 포함에 의해 향상될 수 있다 (예를 들어, Bittner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544, 참조).

[0538] 부가적으로, 삽입된 서열의 발현을 조절하거나, 또는 원하는 특별한 방식으로 유전자 생성물을 변형 및 처리하는, 숙주 세포 균주는 선택될 수 있다. 단백질 생성물의 이러한 변형 (예를 들어, 글리코실화) 및 처리 (예를 들어, 절단)은, 단백질의 기능에 중요할 수 있다. 다른 숙주 세포들은, 단백질 및 유전자 생성물의 번역-후 과정 및 변형을 위해 특징적이고 특별한 메카니즘을 갖는다. 발현된 외래 단백질의 정확한 변형 및 처리를 보장하기 위해, 적절한 세포주 또는 숙주 시스템은, 선택될 수 있다. 이를 위해, 유전자 생성물의 일차 전사체, 글리코실화, 및 인산화의 적절한 처리를 위한 세포의 기구 (cellular machinery)를 보유하는 진핵 생물 숙주 세포는 사용될 수 있다. 이러한 포유동물 숙주 세포는, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, NSO (임의의 면역글로블린 사슬을 내생적으로 생성하지 않는 쥐과 골수종 세포주), CRL7030 및 HsS78Bst 세포들을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 몇몇 구체 예에서, 여기에 제공된 완전 인간, 단일클론 항-벡틴-4 항체는, 포유동물 세포, 예컨대 CHO 세포들에서 생성된다.

[0539] 재조합 단백질의 장기, 고-수율 생성을 위해, 안정적인 발현은 활용될 수 있다. 예를 들어, 항체 분자를 안정적으로 발현하는 세포주는 유전자조작될 수 있다. 복제의 바이러스 기원을 함유하는 발현 벡터를 사용하는 대신, 숙주 세포는, 적절한 발현 제어 요소 (예를 들어, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위, 등) 및 선택가능한 마커에 의해 제어되는 DNA로 형질전환될 수 있다. 외래 DNA의 도입 후에, 조작된 세포는 농축 배지에서 1-2일 동안 성장한 후, 선택 배지로 전환될 수 있다. 재조합 플라스미드에서 선택가능한 마커는, 선택에 대한 내성을 부여하고, 세포가 플라스미드를 그들의 염색체에 안정적으로 혼입시키고 성장하여, 결국 세포주로 클로닝되고 확장될 수 있는, 병소 (foci)를 형성하는 것을 가능하게 한다. 이러한 방법은, 항체 분자를 발현하는 세포주를 조작하는데 유리하게 사용될 수 있다. 이러한 조작된 세포주는, 항체 분자와 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 조성물의 스크리닝 및 평가에 특히 유용할 수 있다.

[0540] 다수의 선택 시스템은 tk-, hgprrt- 또는 aprt-세포에 각각 사용될 수 있는 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제 (Wigler et al., 1977, Cell 11:223), 하이포크산틴구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (Szybalska & Szybalski, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202) 및 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (Lowy et al., 1980, Cell 22:8-17) 유전자를 포함하지만, 이에 제한 없이, 사용될 수 있다. 또한, 항대사물질 내성 (antimetabolite resistance)은 다음의 유전자: 메토티렉세이트에 대한 내성을 부여하는, dhfr (Wigler et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hare et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); 미코페놀산에 대한 내성을 부여하는, gpt (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); 아미노글리코사이드 G-418에 대한 내성을 부여하는, neo (Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev, 1993, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan, 1993, Science 260:926-932; 및 Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62:191-217; May, 1993, TIB TECH 11(5):155-215); 및 하이그로마이신에 내성을 부여하는, hygro (Santerre et al., 1984, Gene 30:147)에 대한 선택의 기준으로 사용될 수 있다. 재조합 DNA 기술

의 분야에 통상적으로 알려진 방법은, 원하는 재조합 클론을 선택하기 위해 일상적으로 적용될 수 있으며, 이러한 방법은, 예를 들어, in Ausubel et al.(eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY(1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY(1990); and in Chapters 12 and 13, Dracopoli et al.(eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY(1994); Colberre-Garapin et al., 1981, J. Mol. Biol.150:1에 기재되어 있으며, 이들의 전체적인 내용은 참조로서 여기에 병합된다.

[0541] 항체 분자의 발현 수준은, 벡터 증폭에 의해 증가될 수 있다 (검토를 위해, Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3 (Academic Press, New York, 1987), 참조). 벡터 시스템 발현 항체에서 마커가 증폭가능한 경우, 숙주 세포의 배양물에 존재하는 억제제 수준의 증가는, 마커 유전자의 복사의 수를 증가시킬 것이다. 증폭된 영역이 항체 유전자와 관련되어 있기 때문에, 항체의 생성은, 또한 증가할 것이다 (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol.3:257).

[0542] 숙주 세포는, 여기에 제공된 2개의 발현 벡터인, 중쇄 유래 폴리펩티드를 인코딩하는 제1 벡터 및 경쇄 유래 폴리펩티드를 인코딩하는 제2 벡터로 공동-형질감염될 수 있다. 두 벡터는 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드의 같은 발현을 가능하게 하는 동일한 선택가능한 마커를 함유할 수 있다. 선택적으로, 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드 모두를 인코딩하고, 발현할 수 있는 단일 벡터는 사용될 수 있다. 이러한 상황에서, 과잉의 무독성 중쇄를 피하기 위해, 경쇄는 중쇄 전에 배치되어야 한다 (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; 및 Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197-2199). 중쇄 및 경쇄에 대한 인코딩 서열은, cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수 있다.

[0543] 여기에 제공된 항체 분자가 재조합 발현에 의해 생성되면, 이것은, 면역글로불린 분자의 정제를 위해 기술분야에 알려진 임의의 방법, 예를 들어, 크로마토그래피 (예를 들어, 이온 교환, 친화도, 특히 단백질 A 이후 특이적 항원에 대한 친화도, 및 사이징 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차별 용해도 (differential solubility), 또는 단백질의 정제를 위한 임의의 기타 표준 기술에 의해 정제될 수 있다. 더욱이, 여기에 제공된 항체는, 정제를 용이하게 하기 위해 여기에 기재되거나 그렇지 않으면 기술분야에 알려진 이중 폴리펩티드 서열에 융합될 수 있다.

[0544] 29. 진단 분석 및 검출의 방법

[0545] 하나의 관점에서, 본 개시의 항-넥틴-4 항체 및 이의 단편은, 생물학적 샘플에서 넥틴-4의 존재를 검출하는데 유용하다. 이러한 항-넥틴-4 항체는, 인간 넥틴-4에 결합하지만, 넥틴-4 신호전달 활성을 유도하지 않는 것을 포함할 수 있다. 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "검출하는" 또는 "검출"은, 정량적 또는 정성적 검출을 포괄하고, 샘플에서 넥틴-4의 존재/부재, 샘플에서 넥틴-4의 상대 발현 수준 (예를 들어, 하나 이상의 기준 발현에 대한, 기타 샘플에 대한, 또는 하나 이상의 발현 스케일에 대한), 또는 샘플에서 넥틴-4의 농도에 관한 결정을 만들기 위해 분석의 판독 또는 결과를 사용하는 것을 지칭한다. 분석으로부터 검출된 판독은, 예를 들어, 수치 데이터, 예를 들어, qPCR의 결과, 면역분석의 결과, 또는 측정된 단백질 농도일 수 있고; 검출된 판독은, 비-수치 데이터, 예를 들어, 현미경 이미지에서 항-넥틴-4 항체로 염색하거나 또는 이미징 유동 세포분석법에서 넥틴-4의 염색한 세포 또는 조직일 수 있으며; 또는 검출된 판독은, 기술분야의 당업자에게 잘 알려진, 예를 들어, 형광 강도, 발광 강도, 비색 판독, 및 흡수/방출 분광법으로 넥틴-4 발현에 대한 프록시 (proxy)로 사용될 수 있는 임의의 실험적 데이터일 수 있다. 분석에서 검출된 판독은 분석의 신호로 여기에서 지칭된다.

[0546] 여기에 제공된 바와 같은, 생물학적 샘플은 생물학적 기원을 갖는 샘플 또는 물질이다. 생물학적 샘플은 체액, 세포 또는 조직 샘플을 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 세포는, 피험자, 예를 들어, 인간 피험자로부터 얻어진 세포의 배양된 세포주, 조작된 세포, 시험관 내 또는 생체 외 배양물, 또는 피험자로부터 얻은 세포일 수 있다. 다른 구체 예에서, 조직 샘플은, 인간 피험자를 포함하는 피험자로부터 얻어진 체액 또는 조직을 포함할 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 조직 샘플은, 질환이 의심되는 피험자의 영역 유래의 샘플을 포함한다. 따라서, 조직 샘플은, 포유동물, 특히 인간과 같은 유기체로부터 단리된, 조직, 체액, 조직 분획, 및/또는 세포일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 특정 구체 예에서, 조직 샘플은, 포르말린 고정, 파라핀 포매 (formalin fixed, paraffin embedded: FFPE) 절편으로 제조된다. 세포, 체액 및/또는 조직은, 피험자, 예를 들어, 인간 피험자로부터, 기술분야의 당업자에게 잘 알려진 방법, 예를 들어, (액체 생체 검사 (liquid biopsy)을 포함하는) 생체 검사, 수술 절차, 세포 도말 (cell smear), 및 정맥절개에 의해 얻어질 수 있다.

[0547] 하나의 관점에서, 본 개시는 생물학적 샘플에서 넥틴-4의 존재를 검출하는 방법을 제공한다. 어떤 구체 예에서, 상기 방법은, 항-넥틴-4 항체의 넥틴-4에 대한 결합에 허용되는 조건하에서 생물학적 샘플을 항-넥틴-4 항체와

접촉시키는 단계, 및 항-넥틴-4 항체와 넥틴-4 사이에 결합을 검출하는 단계를 포함한다.

- [0548] 기술분야의 당업자에게 잘 알려진 바와 같이, 생물학적 샘플에서 항원에 결합된 항체의 양은, 생물학적 샘플에 항원의 양과 관련이 있다. 따라서, 생물학적 샘플에서 여기에 제공된 항-넥틴-4 항체의 넥틴-4에 대한 결합의 양은, 생물학적 샘플에서 넥틴-4의 양 또는 발현 수준을 측정하는데 사용될 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 생물학적 샘플에서 넥틴-4의 양은, 항-넥틴-4 항체의 선형 검출 범위 (linear detection range)에서 검출된다. "선형 검출 범위"는, 결합된 항체가 생물학적 샘플에서 항원의 양 또는 농도와 선형으로 상관되는 항원의 양 또는 농도의 범위를 지칭한다. 이러한 선형 범위는, 항체와 항원 사이에 친화도, 항체-항원 결합에 사용되는 항체의 농도, 및 항체-항원 결합에 사용되는 조건과 같은 인자에 의존한다.
- [0549] 항체-항원 결합에 사용된 항체의 농도는, 적정 실험에서 평가될 수 있다. 이러한 적정 실험의 하나의 구체 예에서, 항체의 농도는, 2배, 3배, 5배 또는 10배 만큼 연속적으로 희석되고, 연속적으로 희석된 항체는, 상응하는 항원의 알려진 양으로 대조군 샘플에 각각 결합된다. 하나의 구체 예에서, 바람직한 항체 농도는, 항체 결합의 양이 가장 넓은 선형 검출 범위를 미분시킨 농도이다.
- [0550] 생물학적 샘플에서 넥틴-4의 발현은, 정해진 시간에서 생물학적 샘플 내에 넥틴-4의 양을 지칭한다. 측정된 바와 같은 넥틴-4의 발현은, 일정 기간 동안 생물학적 샘플에서 넥틴-4의 축적을 반영하고, 전장 넥틴-4, 넥틴-4의 단편, 및 자연적으로 변형된, 예를 들어, 글리코실화된, 넥틴-4와 같은, 분해 또는 변형 생성물을 포함할 수 있다. 단백질이 mRNA로부터 번역됨에 따라, 생물학적 샘플에서 mRNA의 수준은, 생물학적 샘플에서 넥틴-4의 발현에 대한 프록시로서 사용될 수 있다.
- [0551] 암으로 의심되는 피험자 유래의 조직 샘플에서 넥틴-4 발현을 평가하는 방법은 여기에서 제공되며, 상기 방법은: (a) 상기 조직 샘플을 여기에 제공된 바와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계; (b) 상기 조직 샘플에 대한 상기 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 결합을 검출하는 단계; (c) 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현을 결정하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준은, 넥틴-4의 기준 발현 수준과 비교된다.
- [0552] 암이 의심되는 피험자 유래의 조직 샘플에서 넥틴-4 발현을 평가하기 위한 방법은 또한 여기에서 제공되며, 상기 방법은: (a) 여기에 제공된 바와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로 조직 샘플에 대해 IHC 분석을 수행하는 단계; (b) 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현을 결정하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준은 넥틴-4의 기준 발현 수준과 비교된다.
- [0553] 또한, 암 환자의 항-암 치료제에 대한 반응성을 평가하는 방법은 여기에서 제공되며, 상기 방법은 상기 환자 유래의 조직 샘플에서 넥틴-4 발현에 기초하며, (a) 상기 조직 샘플을 여기서 제공된 바와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계; (b) 상기 조직 샘플에 대한 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 결합을 검출하는 단계; (c) 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현을 결정하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준은 넥틴-4의 기준 발현 수준과 비교되며; 상기 기준과 비교된 넥틴-4의 증가된 발현 수준은, 상기 항-암 요법에 대한 반응성을 나타낸다.
- [0554] 또한, 암 환자의 항-암 치료제에 대한 반응성을 평가하는 방법은 여기에서 제공되며, 상기 방법은 상기 환자 유래의 조직 샘플에서 넥틴-4 발현에 기초하며, (a) 상기 조직 샘플에 대해 여기에 제공된 바와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로 IHC 분석을 수행하는 단계; (b) 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현을 결정하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준은, 넥틴-4의 기준 발현 수준과 비교되며, 여기서, 상기 기준과 비교된 조직 샘플에서 상기 넥틴-4의 발현 수준은, 상기 항-암 요법에 대한 반응성을 나타낸다.
- [0555] 피험자에서 암을 치료하는 방법은 여기서 제공되며, 상기 방법은, (a) 여기에 제공된 바와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로 피험자 유래의 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준을 결정하는 단계로서, 여기서, 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준은, 넥틴-4의 기준 발현 수준보다 높고; (b) 항-암 치료제를 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0556] 피험자에서 암을 치료하는 방법은 여기서 제공되며, 상기 방법은, (a) 상기 피험자 유래의 조직 샘플을 여기에 제공된 바와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계; (b) 상기 피험자 유래의 조직 샘플에서 넥틴-4 발현 수준을 여기에 제공된 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로 결정하는 단계로서, 여기서, 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준은 넥틴-4의 기준 발현 수준보다 높고; (c) 상기 피험자에게 항-암 치료제를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0557] 피험자에서 암을 치료하는 방법은 여기서 제공되며, 상기 방법은, (a) 상기 피험자 유래의 조직 샘플을 얻는 단

계; (b) 상기 피험자 유래의 조직 샘플을 여기에 제공된 바와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편과 접촉시키는 단계; (c) 상기 피험자 유래의 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준을 여기에 제공된 바와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로 결정하는 단계, 여기서, 상기 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준은 넥틴-4의 기준 발현 수준보다 높고; (d) 상기 피험자에게 항-암 치료제를 투여하는 단계를 포함한다.

[0558] 여기에 제공된 방법 중 어느 하나에서 피험자는, 인간 피험자일 수 있고, 피험자는, 넥틴-4 발현의 결정이 수행될 수 있고 및/또는 넥틴-4 발현이 진단, 예후, 또는 예측 값을 제공할 수 있는 임의의 암을 가질 수 있다. 대표적인 암은, 급성 림프모구성 백혈병; 급성 림프모구성 림프종; 급성 림프 구성 백혈병; 급성 골수성 백혈병; 급성 골수성 백혈병 (성인/유년기); 부신피질 암종; 에이즈-관련 암; 에이즈-관련 림프종; 항문암; 충수암; 성상 세포종; 비정형 기형종/사상돌기 종양; 기저-세포 암; 담관암, 간외 (담관암); 방광암; 골육종/악성섬유 조직 구종; 뇌암 (성인/유년기); 뇌종양, 소뇌 성상 세포종 (성인/유년기); 뇌종양, 뇌성성상 세포종/악성 신경교종 뇌종양; 뇌종양, 신경종; 뇌종양, 수모세포종; 뇌종양, 상충 원시 신경외배엽 종양; 뇌종양, 시각 경로 및 시상 하부 신경 교종; 뇌간신경아 교종; 유방암; 기관지 선종/카르시노이드; 기관지 종양; 버킷 림프종; 유아기의 암; 카르시노이드 위장관 종양; 카르시노이드 종양; 성인의 암종, 알려지지 않은 원발 부위 (primary site); 알려지지 않은 원발의 암종; 중추 신경계 배아 종양; 중추 신경계 림프종, 원발성; 자궁 경부암; 유년기 부신피질 암종; 아동기 암; 아동기 뇌성성상 세포종; 척색 종, 아동기; 만성 림프구성 백혈병; 만성 골수성 백혈병; 만성 골수성 백혈병; 만성 골수증식성 장애; 대장암; 결장 직장암; 두개 인두종; 피부 T-세포 림프종; 이형성 소세포 종양; 기종; 자궁내막 암; 뇌성 모세포종; 신경종; 식도암; 유잉 종의 종양에서 유잉 육종; 두개의 생식 세포 종양; 성선의 생식 세포 종양; 간외 담관암; 담낭암; 위암; 위 카르시노이드; 위장 카르시노이드 종양; 위장 간질 종양; 생식 세포 종양; 두개의, 성선의, 또는 난소 임신 영양막성 종양; 임신 영양아성 종양, 알려지지 않은 원발 부위; 신경 교종; 뇌간 신경 교종; 신경 교종, 아동 시각 경로 및 시상 하부; 모발 세포 백혈병; 두경부암; 심장암; 간세포 (간)암; 호지킨 림프종; 인두암; 시상 하부 및 시각 경로 신경 교종; 안내 흑색 종; 섬세포 암종 (내분비 췌장); 카포시 육종; 신경암 (신세포암); 랑게르한스 세포 조직구종; 후두암; 입술 및 구강암; 지방 육종; 간암 (1 차); 폐암; 림프종, 일차 중추 신경계; 발덴스트롬, 거대글로불린혈증; 남성 유방암; 뼈/골육종의 악성 섬유 조직 구종; 수모세포종; 수모 상피 종; 흑색 종; 안구내 (눈), 흑색 종; 머켈 세포 암; 메르켈 세포 피부 암종; 중피종; 중피종, 성인 악성; 잠복성 원발성 전이성 편평 경부암; 구강암; 다발성 내분비 신생물 증후군; 다발성 골수종/혈장 세포 신생물; 진균증 진균류, 골수이형성 증후군; 골수이형성/골수증식성 질환; 만성 골수성 백혈병; 골수성 백혈병, 성인 급성; 골수성 백혈병, 소아기 급성; 골수종, 다발 (골수의 암); 만성 골수증식성 장애; 비강 및 부비동 암; 비인두 암종; 신경 모세포종, 비소세포 폐암; 비-호지킨 림프종; 희돌기(펍돌기)교종; 구강암; 구강암; 인두암; 뼈의 골육종/악성 섬유 조직구종; 난소암; 난소 상피암 (표면 상피-간질 종양); 난소 생식 세포 종양; 난소 저 악성 잠재성 종양; 췌장암; 섬세포의, 췌장암; 유두종 증; 부비동 및 비강암; 부 갑상선암; 음경암; 인두암; 갈색 세포종; 송과체 성상세포종; 송과선 종; 중간 분화의 송과체 실질 종양; 소나무모세포종 및 상피 원시 신경외배엽 종양; 허구 종양; 뇌하수체 선종; 형질 세포 신생물 증/다발성 골수종; 흉막 폐 모세포종; 원발 중추 신경계 림프종; 전립선 암; 직장암; 신세포 암종 (신장암); 신장 골반 및 요관, 전이 세포 암; 염색체 15의 NUT 유전자와 관련된 호흡기 암종; 망막 모세포종; 횡문근 육종, 아동기; 침샘 암; 육종, 유잉 종양 군; 세자리 증후군 (Sézary syndrome); 피부암 (흑색종); 피부암 (비-흑색종); 소세포 폐암; 소장 암 연조직 육종; 연조직 육종; 척수 종양; 편평 세포 암종; 잠복 원발, 전이성의 편평상피암; 위장 (위)암; 상부 원시 신경외배엽 종양; T-세포 림프종, 피부 (진균증 진균 및 세자리 증후군); 고환암; 후두암; 흉선종; 흉선종 및 흉선 암종; 갑상선 암; 갑상선 암, 아동기; 신장 골반 및 요관의 전이 세포 암; 요도암; 자궁암, 자궁 내막; 요로상피암, 방광암, 요관암, 요도암 및 요막관암, 자궁 육종; 질암; 외음부 암; 윌름스 종양; 및 넥틴-4가 발현되는 상피 기원의 기타 암을 포함한다.

[0559] 여기에 제공된 방법의 몇몇 구체 예에서, 피험자, 예를 들어, 인간 피험자는, 자궁내막암, 요로상피암, 방광암, 요관암, 요도암, 폐암, 난소암, 유방암, 식도암, 췌장암, 두경부암, 전립선암, 음경암, 항문암, 외음부암, 요막관암, 및 넥틴-4가 발현되는 상피 기원의 기타 암으로 이루어진 군으로부터 선택된 암을 갖는 것으로 의심된다.

[0560] 여기에 사용된 바와 같은, 용어 "반응성"은, 항-암 치료제의 치료에 반응하거나 또는 반응을 갖는 세포 또는 개체 또는 환자 또는 피험자의 확률을 지칭한다. 반응성은, 항-암 치료제에 대한 광범위한 반응의 확률, 제한 없는 예를 들어, 암종 세포의 감소된 증식 또는 성장, 암종 세포의 증가된 세포 사멸, 암종 세포의 수 또는 종양의 크기의 감소, 종양 크기의 감소된 증가율, 암의 단계의 지연된 진행, 암의 단계 또는 종양의 크기의 퇴보, 암의 감소된 전이, 및/또는 환자의 체질량의 회복과 같은 개선된 환자 결과, 6개월, 1-년, 2-년, 3-년, 또는 5-년 환자 생존율 및/또는 환자의 생존 기간을 포함할 수 있다. 어떤 구체 예에서, 반응성은, 둔감한 (즉, 반응

가능성이 적음), 민감성 (반응할 가능성이 높음) 및/또는 불확실한 것으로 평가될 수 있다. 어떤 구체 예에서, 세포 또는 조직, 개체 또는 환자 또는 피험자는, 세포, 조직, 환자 또는 피험자가 이의 종양 또는 암종 세포에서 유의한 발현 넥틴-4를 나타내는 경우, 항-암 치료제에 좀 더 반응할 가능성이 높다. 어떤 구체 예에서, 반응성은, 종양 또는 암종 세포/조직에서 넥틴-4의 증가된 수준에 따라 증가한다. 어떤 구체 예에서, 반응성은 종양 또는 암종 세포/조직에서 넥틴-4 발현의 수준과 상관 관계가 있다. 어떤 구체 예에서, 반응성은, 종양 또는 암종 세포/조직에서의 넥틴-4 발현의 수준에 선형적으로 비례한다. 다른 구체 예에서, 항-암 치료제에 대한 세포, 조직, 환자, 또는 피험자의 반응성은, 넥틴-4 발현에 대해 음성인 세포보다 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 750%, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 또는 그 이상일 수 있다.

[0561] 여기서 사용된 바와 같은, "반응성을 나타내는"은, 하나의 세포, 조직, 인간 개체, 또는 피험자에서 또 다른 세포, 조직, 인간 개체, 또는 피험자에 비해 반응성이 더 높을 것이라는 예측을 지칭한다. 이러한 예측은 특정 기준에 기초하여 만들어진다. 몇몇 구체 예에서, 반응성의 예측은, 세포, 조직, 종양, 인간 개체, 또는 피험자에서 넥틴-4의 발현 수준에 기초하여 만들어진다. 전술한 바와 같이, 어떤 구체 예에서, 세포, 조직, 환자 또는 피험자가 넥틴-4가 이의 종양 또는 암종 세포에서 유의한 발현을 나타내는 경우, 세포 또는 조직 또는 개체 또는 환자 또는 피험자는, 항-암 치료제에 좀 더 반응할 가능성이 높다고 예측된다. 어떤 구체 예에서, 반응성은, 종양 또는 암종 세포/조직에서 넥틴-4의 수준이 증가함에 따라 증가할 것으로 예측된다. 어떤 구체 예에서, 반응성은, 종양 또는 암종 세포/조직에서의 넥틴-4 발현 수준과 상관 관계가 있는 것으로 예측된다. 어떤 구체 예에서, 반응성은, 종양 또는 암종 세포/조직에서의 넥틴-4 발현 수준에 선형 비례할 것으로 예측된다. 다른 구체 예에서, 항-암 치료제에 대한 세포, 조직, 환자, 또는 피험자의 반응성은, 넥틴-4 발현에 대해 음성인 세포보다 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 750%, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 또는 그 이상인 것으로 예측된다.

[0562] 항-암 치료제는, 넥틴-4 발현이 진단, 예후, 또는 예측 값을 제공할 수 있는 임의의 항-암 치료제 또는 어떤 항-암 요법일 수 있다. 어떤 구체 예에서, 치료제는, 생물학적 과정, 예를 들어, 넥틴-4가 역할을 하는 신호전달 경로, 대사 경로, 또는 단백질 합성/분해 경로를 표적으로 하는 것이다. 어떤 구체 예에서, 치료제는, 넥틴-4 활성화, 넥틴-4 신호전달, 또는 넥틴-4 매개 질환을 표적으로 하는 것이다. 특별한 구체 예에서, 치료제는, 항-넥틴-4 항체 또는 항-넥틴-4 항체 약물 접합체이다.

[0563] 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현을 결정하기 위해, 조직 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준은, 넥틴-4의 기준 발현 수준과 비교되거나 연관되어 있다. 여기서 사용된 바와 같은 "기준 발현 수준"은, 시험 샘플에서 넥틴-4 발현 수준과 비교되는 경우, 시험 샘플에서 넥틴-4 발현에 대한 상대 정보를 제공하는, 기준 샘플에서의 발현 수준을 지칭한다. 기준 발현 수준은, 알려진 발현 수준일 수 있으며, 예를 들어, 넥틴-4의 양, 농도, 및/또는 몰 양이 알려진 기준 샘플에서의 발현 수준일 수 있다. 예를 들어, 기준 발현 수준은, 세포가 알려진 양의 넥틴-4를 발현하도록 형질감염되거나 그렇지 않으면 조작된, 세포주에서의 넥틴-4 발현일 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4 발현이, ELISA, SDS-PAGE, 정량적 면역침전법, 및/또는 정량적 웨스턴 블로팅과 같이, 기술분야의 당업자에게 알려져 있거나 또는 여기에 제공된 방법에 의해 정량화되는 경우, 기준 발현 수준은 세포에서 넥틴-4 발현일 수 있다. 다른 구체 예에서, 기준 발현 수준은, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 및 그 이상의 기준과 같이, 하나를 초과하는 기준을 포함한다. 하나의 구체 예에서, 기준 수준은 4개의 기준: 넥틴-4 발현에 대해 음성인 것, 약한 넥틴-4 발현을 갖는 것, 중간의 넥틴-4 발현을 갖는 것, 및 높은/강한 넥틴-4 발현을 갖는 것의 기준을 갖는다.

[0564] 선택적으로, 기준 발현 수준은, 넥틴-4의 정확한 농도 또는 양이 알려져 있지 않지만, 기준 샘플의 상태, 활성화, 및/또는 기능이 알려진 경우의, 수준일 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 기준 발현 수준은, 암이 의심되는 동일한 환자 유래의 비-암종 세포의 수준일 수 있다. 이러한 구체 예에서, 시험 샘플에서의 넥틴-4 발현을 기준 샘플에서의 발현과 비교하여, 비-암종 세포의 넥틴-4 발현과 비교한 (예를 들어, 더 높거나, 더 낮거나, 또는 실질적으로 동일한) 시험 샘플에서의 넥틴-4 발현은 결정될 수 있다. 다른 구체 예에서, 기준 발현 수준은, 암종 세포의 수준일 수 있으며, 여기서 시험 샘플에서의 넥틴-4 발현을 기준 샘플에서의 넥틴-4 발현과 비교하여, 암종 세포의 넥틴-4 발현 수준과 비교한 (예를 들어, 더 높거나, 더 낮거나, 또는 실질적으로 동일한) 시험 샘플에서 넥틴-4 발현 수준은 결정될 수 있다. 다른 구체 예에서, 기준 발현 수준은, 제2 피험자 유래의 세포의 수준일 수 있으며, 여기서, 시험 샘플에서의 넥틴-4 발현을 기준 샘플에서의 넥틴-4 발현과 비교하여, 제2 피험자 유래의 세포의 넥틴-4 발현 수준과 비교한 (예를 들어, 더 높거나, 더 낮거나, 또는 실질적으로 동일한) 시험 샘플에서의 넥틴-4 발현 수준은 결정될 수 있다. 제2 피험자는, 암이 없는 정상적인 인간 피험자, 환자로 의심되는

것과 동일한 종류의 암을 갖는 인간 피험자, 또는 환자로 의심되는 것과 다른 종류의 암을 갖는 인간 피험자일 수 있다.

[0565] 여기에 기재된 바와 같은 기준 샘플 및 기준 세포들은, 암이 의심되는 환자로부터 얻은 세포의 시험관 내 또는 생체 외 배양물, 암이 의심되는 환자로부터 얻은 세포, 제2 피험자로부터 얻은 세포의 시험관 내 또는 생체 외 배양물, 또는 제2 피험자로부터 얻은 세포인, 세포주일 수 있다.

[0566] 따라서, 여기에 제공된 방법의 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4의 기준 발현 수준은, 암종 세포, 상기 피험자의 비-암 종 세포, 또는 제2 피험자 유래의 비-암종 세포에서의 넥틴-4 발현 수준일 수 있다.

[0567] 전술한 바와 같이, 몇몇 구체 예에서, 샘플에서 넥틴-4 발현은, 샘플에 대한 항-넥틴-4 항체 결합을 음성 및 양성 기준에 대한 항-넥틴-4 항체 결합과 상관시키거나 또는 비교하여 결정될 수 있고, 여기서, 상기 기준에서 넥틴-4 발현의 수준은 알려져 있다. 기준 넥틴-4 발현은, 양성 넥틴-4 대조군 또는 음성 넥틴-4 대조군일 수 있다. 여기서 사용된 바와 같은, "양성 넥틴-4 대조군" 또는 "양성 대조군"은, 유의미한 양의 넥틴-4를 발현하는 것으로 알려진 세포, 조직, 종양, 인간, 및/또는 피험자를 지칭한다. "음성 넥틴-4 대조군" 또는 "음성 대조군"은, 세포 또는 조직에서 넥틴-4가 생물학적으로 유의미하지 않은 낮은 수준의 넥틴-4의 발현 또는 넥틴-4를 발현하지 않는 것으로 알려진 세포 및/또는 조직을 지칭한다. 넥틴-4 수준은: (1) 기술분야의 당업자가 하우스 키팅 유전자 (house keeping gene)의 단백질 생성물에 비추어 넥틴-4 발현 수준을 낮은 것으로 고려하는 경우; (2) 소량의 넥틴-4의 존재 또는 부재가 세포 또는 조직에 생물학적 차이를 만들지 않는 경우; 및 (3) 만약 무의미한 양의 넥틴-4가 세포 또는 조직으로부터 제거 또는 결실된다면, 세포 또는 조직이 이러한 제거 또는 결실 전과 실질적으로 동일한 방식으로 계속 기능하는 경우, 생물학적으로 무의미하다. 알려진 넥틴-4 발현은, qPCR 분석에 의해 독립적으로 결정될 수 있다. 알려진 넥틴-4 발현은 또한 넥틴-4에 특이적인 것으로 결정된 항-넥틴-4 항체 (예를 들어, 전술된 특이성-스크리닝 방법에서 확인된 넥틴-4 특이적 항체)로 이하 기재된 임의의 면역 분석법을 사용하여 독립적으로 결정될 수 있다. 적절한 면역분석은, 어떤 제한 없는 예로서, IHC 분석, 면역블로팅 분석, FACS 분석, 또는 ELISA를 포함한다. 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4 mRNA 수준은, 분석의 배경 소음 또는 생물학적으로 무의미한 낮은 수준의 잔류 넥틴-4로 인해 음성 대조군에서 0이 아닐 수 있다. 예를 들어, qPCR 분석에서 넥틴-4 mRNA 수준이 비특이적 프라이머의 세트에 검출된 mRNA의 수준과 실질적으로 유사하거나, 또는 넥틴-4 mRNA 수준이 양성 넥틴-4 대조군에서 넥틴-4 mRNA 수준에 비추어 생물학적으로 무의미한 경우, 음성 넥틴-4 대조군은 넥틴-4에 대해 음성인 것으로 적절히 고려될 수 있다. 유사하게, 음성 대조군에서 또 다른 넥틴-4 특이적 항체를 사용하는 면역분석에 의해 검출된 넥틴-4는, 분석의 배경 소음 또는 생물학적으로 무의미한 낮은 수준의 잔류 넥틴-4로 인해 0이 아닐 수 있다. 배경 소음은 항-넥틴-4 항체 이외의 분석 시약과 샘플 사이에 비-특이적 상호작용에 의해 야기될 수 있다. 예를 들어, 항-넥틴-4 항체에 의해 검출된 음성 대조군에서 넥틴-4 수준이 동일한 분석에서 이소타입 대조군 항체로부터의 검출 수준과 실질적으로 유사한 경우, 음성 넥틴-4 대조군은 넥틴-4에 대해 음성인 것으로 적절히 고려될 수 있다. 몇몇 분석에서, 배경 소음은, 넥틴-4 발현으로부터 검출된 신호의 실질적인 퍼센트를 설명할 수 있다.

[0568] 부가적으로, 양성 및/또는 음성 조직, (예를 들어, 세포주를 포함하는) 세포, 및 병리학적 샘플을 포함하는, 양성 및 음성 대조군은, 기술분야의 당업자에 의해 문헌에서 확인되어 있고, 공개되어 있다. 이러한 문헌은, (예를 들어, 넥틴-4, 발현, 양성, 음성, 및/또는 분포와 같은 검색어를 사용하여) Pubmed와 같은 데이터베이스를 검색하고, 검색 적중을 분석하여 쉽게 확인될 수 있다.

[0569] 따라서, 넥틴-4 발현이 없는 음성 대조군 세포에 결합된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 상대적인 양은, 넥틴-4를 발현하는 샘플 세포에 결합된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 양의 약 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, 0.03%, 0.01%, 0.001% 또는 그 이하일 수 있다.

[0570] 따라서, 여기에 제공된 방법의 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4의 기준 발현 수준은, 음성 대조군에서의 넥틴-4 발현 수준이며, 여기서, 음성 대조군에서의 넥틴-4 발현은, 독립적으로 qPCR 분석, 제2 항체를 이용한 IHC 분석, 제2 항체를 이용한 면역블로팅 분석, 제2 항체를 이용한 FACS 분석, 또는 제2 항체를 이용한 ELISA에 의해 결정된다.

[0571] 여기에 제공된 방법의 다른 구체 예에서, 넥틴-4의 기준 발현 수준은, 넥틴-4를 발현하는 양성 대조군 세포에서의 넥틴-4 발현 수준이고, 여기서, 양성 대조군에서의 넥틴-4 발현은, qPCR 분석, 제2 항체를 이용한 IHC 분석, 제2 항체를 이용한 면역블로팅 분석, 제2 항체를 이용한 FACS 분석, 또는 제2 항체를 이용한 ELISA에 의해 독립적으로 결정된다.

- [0572] 샘플에서 넥틴-4의 발현 수준은, 양성 대조군에서의 발현 수준과 다를 수 있다. 조직 샘플에 결합된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 상대적인 양은, 넥틴-4를 발현하는 양성 대조군 세포에 결합된 항체 또는 이의 항원-결합 단편의 양의, 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120%, 150%, 200%, 250%, 300%, 400%, 500%, 750%, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 500배, 또는 그 이상일 수 있다.
- [0573] 다수의 다른 PCR 또는 qPCR 프로토콜은, 기술분야에 공지되어 있고, 이하 여기에서 예시되며, 샘플 또는 대조군에서 넥틴-4 mRNA 수준을 결정하기 위해 직접 적용되거나 또는 조정될 수 있으며, 이는 샘플 또는 대조군에서 넥틴-4 단백질의 발현 수준에 대한 프록시로서 사용될 수 있다. 정량적 PCR (qPCR) (또한, 실-시간 PCR이라고 함)은, 이것이 정량적 측정뿐만 아니라, 감소된 시간 및 오염을 제공함에 따라, 몇몇 구체 예에서 적용되고 조정된다. 여기에 사용된 바와 같은, "정량적 PCR (또는 "qPCR")은, 반응 생성물의 반복된 샘플링에 대한 필요없이 이것이 발생함에 따라 PCR 증폭의 진행의 직접 모니터링을 지칭한다. 정량적 PCR에서, 반응 생성물은 신호전달 메커니즘 (예를 들어, 형광)을 통해 모니터링될 수 있는데, 이는 이들이 발생되고, 신호가 배경 수준 이상으로 상승한 후 그러나 반응이 안정기에 도달하기 전에 추적되기 때문이다. 검출가능한 또는 "임계값" 수준의 형광을 달성하는데 요구되는 사이클의 수는, PCR 공정의 시작에서 증폭가능한 표적의 농도에 따라 직접적으로 변하여, 신호 강도의 측정이 실시간으로 샘플에서 표적 핵산의 양의 측정을 제공하는 것을 가능하게 한다. qPCR이 mRNA 발현 수준을 결정하는데 적용되는 경우, DNA로 mRNA의 역-전사의 추가 단계는 qPCR 분석 전에 수행된다. PCR 방법의 예로는 문헌 (Wong et al., BioTechniques 39:75-85 (2005); D'haene et al., Methods 50:262-270 (2010))에서 찾을 수 있으며, 이의 전체적인 내용은 참조로서 여기에 병합된다. PCR 분석의 예로는, 미국 특허 6,927,024에서 찾을 수 있으며, 이의 전체적인 내용은 참조로서 여기에 병합된다. RT-PCR 방법의 예로는, 미국 특허 7,122,799에서 찾을 수 있으며, 이의 전체적인 내용은 참조로서 여기에 병합된다. 형광 인시튜 PCR의 방법은, 미국 특허 7,186,507에 기재되어 있으며, 이의 전체적인 내용은 참조로서 여기에 병합된다.
- [0574] 하나의 특별한 구체 예에서, qPCR은 다음과 같이 넥틴-4 mRNA 수준을 결정 또는 측정하기 위해 수행될 수 있다. 간략히 말하면, 넥틴-4 및 하나 이상의 하우스키핑 유전자에 대한 복제 qPCR 반응의 평균 Ct (사이클 임계 값) 값 (또는 여기에서 상호 교환적으로 Cq (정량화 사이클)이라 함)은 결정된다. 넥틴-4에 대한 평균 Ct 값은 그 다음 하기 대표적인 식을 사용하여 하우스키핑 유전자의 Ct 값으로 정규화될 수 있다: 넥틴-4- Δ Ct = (넥틴-4-평균 Ct - 하우스키핑 유전자 A의 평균 Ct). 상대 넥틴-4- Δ Ct는, 예를 들어, mRNA 발현= $2^{-\Delta Ct}$ 의 식을 사용하여, 넥틴-4 mRNA에 대한 상대 수준을 결정하는데 그 다음 사용될 수 있다. Ct 및 Cq 값들의 요약에 대해서, MIQE 지침 (Bustin et al., The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, Clinical Chemistry 55:4 (2009))을 참조.
- [0575] 노던 블로팅 및 인시튜 혼성화 (Parker & Barnes, Methods in Molecular Biology 106:247-283 (1999)); RNase 보호 분석 (Hod, Biotechniques 13:852-854 (1992)); 마이크로어레이 (Hoheisel et al., Nature Reviews Genetics 7:200-210 (2006); Jaluria et al., Microbial Cell Factories 6:4 (2007)); 및 중합효소 연쇄 반응 (PCR) (Weis et al., Trends in Genetics 8:263-264 (1992))을 포함하는, 샘플에서 mRNA 발현의 정량화를 위해 기술분야에서 알려진 일반적으로 사용된 기타 방법은 또한 사용될 수 있다. 선택적으로, mRNA 발현의 수준은 시퀀싱 기술 (sequencing techniques)에 의해 결정될 수 있다. 시퀀싱-기반 유전자 발현 분석을 위한 대표적인 방법은, SAGE (Serial Analysis of Gene Expression), 및 MPSS (massual parallel signature sequencing)에 의한 유전자 발현 분석을 포함한다.
- [0576] 전술한 바와 같이, 조직 샘플은, 포유동물, 특히 인간과 같은 유기체로부터 단리된 조직, 체액, 조직 분획, 및/또는 세포일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 따라서, 조직 샘플은, 인간 피험자를 포함하여, 피험자의 다양한 기관으로부터 얻어질 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 조직 샘플은, 암과 같은 질환, 기능장애 또는 장애가 의심되는 기관으로부터 얻어진다. 다른 구체 예에서, 조직 샘플은, 검사중인 환자 또는 제2 인간 피험자 유래 정상 기관으로부터 얻어진다.
- [0577] 여기에 제공된 방법의 어떤 구체 예에서, 조직은, 방광, 요관, 유방, 폐, 결장, 직장, 난소, 난관, 식도, 자궁 경부, 자궁 내막, 피부, 후두, 골수, 침샘, 신장, 전립선, 뇌, 척수, 태반, 부신, 췌장, 부갑상선, 뇌하수체, 고환, 갑상선, 비장, 편도선, 흉선, 심장, 위, 소장, 간, 골격근, 말초 신경, 중피, 또는 눈 유래의 조직을 포함한다.
- [0578] 샘플에 결합된 항-넥틴-4 항체는, IHC 접근법, 면역블로팅 분석, FACS 분석, 및 ELISA를 포함하여, 기술분야에 알려진 다양한 면역분석에 의해 검출될 수 있다.

- [0579] 넥틴-4는, 다양한 IHC 접근법에서 항-넥틴-4 항체에 의해 검출될 수 있다. 조직 절편 (tissue sections)의 IHC 염색은, 샘플 내에 단백질의 존재를 평가하거나 또는 검출하는 신뢰할 수 있는 방법인 것으로 드러났다. IHC 기술은, 일반적으로 발색 또는 형광 방법에 의해, 인시튜로 세포 항원을 탐침하고 시각화하는데 항체를 활용한다. 넥틴-4를 특이적으로 표적화하는 다클론 항혈청 및 단일클론 항체와 같은, 1차 항체 (primary antibody) 또는 항혈청은, IHC 분석에서 발현을 검출하는데 사용될 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 조직 샘플은, 항체-표적 결합이 일어나기에 충분한 시간의 기간 동안 특정 표적에 대한 1차 항체와 접촉된다. 위에서 상세히 논의된 바와 같이, 항체는, 항체 자체 상에 직접 표지, 예를 들어, 방사성 표지, 형광 표지, 비오틴과 같은 합텐 표지, 또는 서양고추냉이 과산화효소 또는 알칼리성 포스파타제와 같은 효소에 의해 검출될 수 있다. 선택적으로, 1차 항체에 특이적인 단일클론 항체, 다클론 항혈청 또는 항혈청을 포함하는, 비표지된 1차 항체는, 표지된 2차 항체와 함께 사용된다. IHC 프로토콜 및 키트는 기술분야에 잘 알려져 있고, 상업적으로 이용 가능하다. 슬라이드 준비 및 IHC 처리를 위한 자동화 시스템은, 상업적으로 이용 가능하다. Leica BOND Autostainer 및 Leica Bond Refine Detection 시스템은 이러한 자동화 시스템의 예이다.
- [0580] 몇몇 구체 예에서, 간접 분석에서 표지된 2차 항체와 함께 표지되지 않은 1차 항체로 IHC 분석은 수행된다. 간접 분석은, 조직 샘플에서 넥틴-4와 같은 표적 단백질의 검출을 위해 2개의 항체를 활용한다. 먼저, 비접합된 1차 항체는, 조직 샘플에서 표적 항원과 반응하는, 조직 (제1층)에 적용된다. 다음으로, 1차 항체의 항체 이소타입을 특이적으로 인식하는 효소-표지된 2차 항체는 적용된다 (제2층). 2차 항체는 1차 항체와 반응한 후, 기질-크로모겐 적용 (substrate-chromogen application)이 수반된다. 제2-층 항체는, 퍼옥시다제와 같은 효소로 표지될 수 있으며, 이는 크로모겐 3,3'-디아미노벤지딘 (DAB)와 반응하여 반응 부위에서 갈색 침전물을 생성한다. 이러한 방법은, 신호 증폭 시스템을 통한 잠재적 신호 증폭으로 인해 민감하게 반응하고 다목적이다.
- [0581] 검출의 민감도를 증가시키기 위한 특정 구체 예에서, 신호 증폭 시스템은 사용될 수 있다. 여기서 사용된 바와 같은, "신호 증폭 시스템"은, 결합된 1차 또는 2차 항체의 검출로부터 신호를 증가시키는데 사용될 수 있는 시약 및 방법의 시스템을 의미한다. 신호 증폭 시스템은, 표적 단백질 검출의 민감도를 증가시키고, 검출된 신호를 증가시키며, 검출 한도의 하한 경계를 내린다. 효소 표지 시스템 및 매크로표지 시스템 (macrolabeling system)을 포함하여 여러 타입의 신호 증폭 시스템이 있다. 이러한 시스템/접근법은, 상호 배타적이지 않으며, 부가 효과를 위해 조합하여 사용될 수 있다.
- [0582] 매크로표지 또는 매크로표지 시스템은, 공통 스캐폴드에 부착되거나 또는 혼입된 수십 (예를 들어, 피코빌리단 단백질) 내지 수백만 (예를 들어, 형광 미소구)의 표지 넘버링 (labels numbering)의 집합이다. 스캐폴드는, 항체와 같은 표적-특이적 친화성 시약에 연결될 수 있으며, 혼입된 표지는 이에 의해 결합시 표적과 집합적으로 연관된다. 매크로표지에서 표지는, 형광단, 합텐, 효소, 및/또는 방사성 동위원소와 같은 여기에 기재된 표지 중 어느 하나일 수 있다. 신호 증폭 시스템의 하나의 구체 예에서, 표지된 사슬 중합체-접합된 2차 항체는 사용된다. 중합체 기술은, 2차 항체의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 50 또는 그 이상의 분자가 부착될 수 있는 텍스트란의 HRP 효소-표지된 불활성 "스핀 (spine)" 분자를 활용하여, 더욱 민감한 시스템을 만든다.
- [0583] 효소 표지 시스템에 기초한 신호 증폭 시스템은, 서양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP) 또는 알칼리성 포스파타제와 같은, 효소의 촉매 활성을 활용하여 인시튜 표적 단백질 또는 핵산 서열의 고-밀도 표지를 발생시킨다. 하나의 구체 예에서, 티라미드 (tyramide)는 HRP의 신호를 증가시키는데 사용될 수 있다. 이러한 시스템에서, HRP는 표지된 티라미드 유도체를 고 반응성의, 반감기가 짧은 티라미드 라디칼로 효소적으로 전환시킨다. 표지된 활성 티라미드 라디칼은 그 다음 HRP-항체-표적 상호작용 부위에 가까운 잔기 (주로 단백질 티로신 잔기의 페놀 잔기)에 공유적으로 결합하여, 신호 위치의 최소 확산-관련 손실로 부위에서 표지의 수를 증폭시킨다. 결과적으로, 신호는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 50, 75 또는 100배로 증폭될 수 있다. 기술분야의 당업자에게 알려진 바와 같이, 티라미드 상에 표지는, 형광단, 효소, 합텐, 방사성 동위원소 및/또는 발광기 (photophores)를 포함하여, 여기에 기재된 임의의 표지일 수 있다. 기타 효소-기반 반응은 또한 신호 증폭을 생성하는데 활용될 수 있다. 예를 들어, ELF (Enzyme-Labeled Fluorescence) 신호 증폭은, 알칼리성 포스파타제를 이용 가능하며, 여기서, 알칼리성 포스파타제는, 약한 청색-형광 기질 (ELF 97 포스페이트)을 효소적으로 절단하고, 이를 비정상적으로 큰 스톱스 시프트 (Stokes shift) 및 우수한 광안정성을 나타내는, 밝은 황-녹색-형광 침전물로 전환시킨다. 티라미드-기반 신호 증폭 시스템 및 ELF 신호 증폭 모두는, 예를 들어, ThermoFisher Scientific (Waltham, MA USA 02451)로부터 상업적으로 이용가능하다.
- [0584] 따라서, 여기에 제공된 방법의 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4의 발현 수준은, 신호 증폭 시스템으로 검출된다.

- [0585] 몇몇 구체 예에서, 표본 (specimen)은 그 다음 세포의 및 서브세포 요소들을 확인하기 위해 대비 염색제로 염색된다.
- [0586] 몇몇 구체 예에서, 넥틴-4의 발현 수준은 또한 면역블로팅 분석을 사용하여 여기에 기재된 항체로 검출될 수 있다. 면역블로팅 분석의 몇몇 구체 예에서, 단백질은 전기영동에 의해 종종 분리되고 (그러나 필요는 없음), 막 (보통 니트로셀룰로스 또는 PVDF 막)으로 전달된다. IHC 분석과 유사하게, 넥틴-4를 특이적으로 표적화하는 다클론 항혈청 및 단일클론 항체와 같은, 1차 항체 또는 항혈청은, 단백질 발현을 검출하는데 사용될 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 상기 막은, 항체-항원 결합이 발생하기에 충분한 시간의 기간 동안 특정 표적에 대한 1차 항체와 접촉되고, 결합된 항체는, 1차 항체 자체 상에 직접적인 표지, 예를 들어, 방사성 표지, 형광 표지, 비오틴과 같은 합텐 표지, 또는 서양고추냉이 퍼옥시다제 또는 알칼리성 포스파타제와 같은 효소에 의해 검출될 수 있다. 다른 구체 예에서, 비표지된 1차 항체는, 1차 항체에 특이적인 표지된 2차 항체와 함께 전술된 바와 같은 간접 분석에 사용된다. 여기에 기재된 바와 같이, 2차 항체는, 예를 들어, 효소 또는 다른 검출가능한 표지, 예컨대, 형광 표지, 발광 표지, 비색 표지, 또는 방사성 동위원소로 표지될 수 있다. 면역블로팅 프로토콜 및 키트는 기술분야에 잘 알려져 있고, 상업적으로 이용가능하다. 면역블로팅을 위한 자동화 시스템, 예를 들어, 웨스턴 블로팅을 위한 iBind Western Systems (ThermoFisher, Waltham, MA USA 02451)은 상업적으로 이용가능하다. 면역블로팅은, 웨스턴 블롯, 세포-내 웨스턴 블롯, 및 도트 블롯 (Dot blot)을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 도트 블롯은, 단백질 샘플이 전기영동에 의해 분리되지 않고, 막 상으로 직접 스폿팅되는 (spotted) 간단한 절차이다. 세포에서, 웨스턴 블롯은 마이크로타이터 플레이트에 세포를 접종하는 단계, 상기 세포를 고정/침투시키는 (permeabilizing) 단계, 및 일차 표지된 1차 항체로 후속 검출 또는 비표지된 1차 항체, 뒤이어 여기에 기재된 바와 같은 표지된 2차 항체로 후속 검출하는 단계를 포함한다.
- [0587] 다른 구체 예에서, 넥틴-4의 발현 수준은 또한 형광-활성화 세포 분류기 (FACS) 분석을 포함하는, 유동 세포분석법에서 여기에 기재된 항체로 검출될 수 있다. IHC 또는 면역블로팅 분석법과 유사하게, 넥틴-4를 특이적으로 표적화하는 다클론 항혈청 및 단일클론 항체와 같은, 1차 항체 또는 항혈청은 FACS 분석에서 단백질 발현을 검출하는데 사용될 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 세포는 항체-항원 결합이 발생하기에 충분한 시간의 기간 동안 특정 표적 단백질에 대해 1차 항체로 염색되고, 결합된 항체는 1차 항체 상에 직접 표지, 예를 들어, 1차 항체 상에 비오틴과 같은, 형광 표지 또는 합텐 표지에 의해 검출될 수 있다. 다른 구체 예에서, 비표지된 1차 항체는, 1차 항체에 특이적인 형광 표지된 2차 항체와 함께, 전술된 바와 같은 간접 분석에 사용된다. FACS는, 각 세포의 특별한 광 산란 및 형광 특징에 기초하여, 한 번에 하나의 세포로, 형광 표지된 생물학적 세포의 혼합물을 분류하거나 또는 분석하는 방법을 제공한다. 따라서, 유동 세포분석기는, 표적 단백질의 발현 수준을 나타내는, 형광색소-태그된 항체의 강도를 검출하고 보고한다. 따라서, (넥틴-4와 같은) 표면 단백질의 발현 수준은, 표적 단백질에 대한 항체를 사용하여 검출될 수 있다. 비-형광 세포질 단백질은 또한 침투된 세포를 염색하여 관찰될 수 있다. FACS 염색 및 분석을 수행하는 방법은, 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있으며, Teresa S. Hawley and Robert G. Hawley in Flow Cytometry Protocols, Humana Press, 2011 (ISBN 1617379506, 9781617379505)에 의해 기재되어 있다.
- [0588] 다른 구체 예에서, 넥틴-4의 발현 수준은 또한 효소 면역분석법 (EIA) 또는 ELISA와 같은 면역분석을 사용하여 검출될 수 있다. 예를 들어, 혈액, 혈장, 혈청 또는 골수를 포함하는, 다양한 조직 및 샘플을 분석하는데, EIA 및 ELISA 분석 모두는, 기술분야에 알려져 있다. 광범위한 ELISA 분석 포맷은, 예를 들어, 미국 특허 4,016,043, 4,424,279, 및 4,018,653을 참조하여, 이용가능하고, 이의 전체적인 내용은 참조로서 여기에 병합된다. 이들은, 비-경쟁 타입의 단일-부위 및 두-부위 모두 또는 "샌드위치" 분석뿐만 아니라 전통적인 경쟁 결합 분석을 포함한다. 이들 분석은 또한 표적 단백질에 대한 표지된 항체의 직접적인 결합을 포함한다. 샌드위치 분석은 일반적으로 사용되는 분석이다. 샌드위치 분석 기술의 다수의 변형은 존재한다. 예를 들어, 통상적인 정방향 분석 (forward assay)에서, 비표지된 항체는 고체 기질 상에 고정되고, 시험될 샘플은 결합된 분자와 접촉을 일으킨다. 적절한 배양 기간 후, 항체-항원 복합체의 형성이 가능한 충분한 시간의 기간 동안, 검출가능한 신호를 생성할 수 있는 리포터 분자로 표지된, 항원에 특이적인 제2 항체는 그 다음 첨가되고 배양되어, 항체-항원-표지된 항체의 또 다른 복합체의 형성을 위한 충분한 시간을 허용한다. 임의의 미반응된 물질은 세척되고, 리포터 분자에 의해 생성된 신호를 관찰하여 항원의 존재는 결정된다. 그 결과는 가시 신호의 간단한 관찰에 의해 정성적일 수 있거나, 또는 알려진 양의 표적 단백질을 함유하는 대조군 샘플과 비교하여 정량화될 수 있다.
- [0589] EIA 또는 ELISA 분석의 몇몇 구체 예에서, 효소는 제2 항체에 접합된다. 다른 구체 예에서, ELISA 분석 포맷의 검출가능한 신호를 생성하기 위해 형광 표지된 2차 항체는 효소-표지된 2차 항체 대신에 사용될 수 있다. 특정 파장의 빛으로 조명에 의해 활성화된 경우, 형광색소-표지된 항체는, 빛 에너지를 흡수하여, 분자에서 흥분성

상태를 유도한 후, 광학 현미경으로 시각적으로 검출가능한 특징적인 색에서 빛을 방출한다. EIA 및 ELISA에서와 같이, 형광 표지된 항체는, 제1 항체-표적 단백질 복합체에 결합될 수 있다. 미결합된 시약을 세척한 후, 잔여 3차 복합체는 그 다음 적절한 파장의 빛에 노출되며, 관찰된 형광은 관심의 표적 단백질의 존재를 나타낸다. 면역형광법 및 EIA 기술 모두는 기술분야에 매우 잘 확립되어 있고, 여기에 개시되어 있다.

[0590] 여기에 기재된 면역분석의 경우, 효소 활성 또는 비-효소 표지가 각각 검출될 수 있는 한, 다수의 효소 또는 비-효소 표지 중 어느 하나는, 사용될 수 있다. 이에 의해 효소는 검출가능한 신호를 생성하고, 이는 표적 단백질을 검출하는데 활용될 수 있다. 특히 유용한 검출가능한 신호는 발색성 또는 형광성 신호이다. 따라서, 표지로서 사용하기에 특히 유용한 효소는, 발색성 또는 형광성 기질이 이용가능한 효소를 포함한다. 이러한 발색성 또는 형광성 기질은, 효소 반응에 의해 쉽게 검출가능한 발색 또는 형광 생성물로 전환될 수 있으며, 현미경 또는 분광법을 사용하여 용이하게 검출 및/또는 정량화될 수 있다. 서양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제, β -갈락토시다제, 글루코스 옥시다제, 및 이와 유사한 것들, 제한 없이 포함하는, 이러한 효소는, 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있다 (Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996), 참조). 잘 알려진 발색성 또는 형광성 기질을 갖는 기타 효소는, 다양한 펩티다제를 포함하며, 여기서 발색성 또는 형광성 펩티드 기질은 단백질분해 절단 반응을 검출하는데 활용될 수 있다. α - 및 β -갈락토시다제, β -글루쿠로니다제, 6-포스포- β -D-갈락토사이드 6-포스포갈락토하이드롤라제, β -글루오시다아제, α -글루코시다제, 아밀라제, 뉴라미니다제, 에스테라제, 리파제, 및 이와 유사한 것 (Manafi et al., Microbiol. Rev. 55:335-348 (1991))의 사용을, 제한 없이 포함하는, 발색성 및 형광성 기질의 사용은 또한 박테리아 진단 (bacterial diagnostics)에 잘 알려져 있고, 알려진 발색성 또는 형광성 기질과 함께 이러한 효소는, 본 발명의 방법에 사용하기 위해 쉽게 조정될 수 있다.

[0591] 검출가능한 신호를 생성하기 위한 다양한 발색성 또는 형광성 기질은, 기술분야의 당업자에게 잘 공지되어 있고, 상업적으로 이용가능하다. 검출가능한 신호를 생성하는데 활용될 수 있는 대표적인 기질은, 서양고추냉이 퍼옥시다아제에 대해 3,3'-디아미노벤지딘 (DAB), 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB), 클로로나프톨(4-CN) (4-클로로-1-나프톨), 2,2'-아지노-비스(3-에틸벤조티아졸린-6-술포닌산) (ABTS), o-페닐렌디아민 디하이드로클로라이드 (OPD), 및 3-아미노-9-에틸카바졸 (AEC); 알칼린 포스페타아제에 대해 5-브로모-4-클로로-3-인돌일-1-포스페이트 (BCIP), 니트로블루 테트라졸륨 (NBT), Fast Red (Fast Red TR/AS-MX), 및 p-니트로페닐 포스페이트 (PNPP); β -갈락토시다제에 대해 1-메틸-3-인돌일- β -D-갈락토피라노시드 및 2-메톡시-4-(2-니트로비닐)페닐 β -D-갈락토피라노시드; β -글루코시다제에 대해 2-메톡시-4-(2-니트로비닐)페닐 β -D-글루코피라노사이드; 및 이와 유사한 것들 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 대표적인 형광성 기질은, 알칼리 포스포타아제에 대해 4-(트리플로로메틸)움벨리페릴 포스페이트; 포스페타아제에 대해 4-메틸움벨리페릴 포스페이트 비스 (2-아미노-2-메틸-1,3-프로판디올), 4-메틸움벨리페릴 포스페이트 비스 (클로로헥실아모늄) 및 4-메틸움벨리페릴 포스페이트; 서양고추냉이 퍼옥시다제에 대해 QuantaBlu™ 및 QuantaRed™; β -갈락토시다제에 대해 4-메틸움벨리페릴 β -D-갈락토피라노시드, 플루오레세인 디(β -D-갈락토피라노시드) 및 나프토폴루오로세인 디-(β -D-갈락토피라노시드); β -글루코시다제에 대해 3-아세틸움벨리페릴 β -D-글루코피라노시드 및 4-메틸움벨리페릴- β -D-글루코피라노시드; 및 α -갈락토시다제에 대해 4-메틸움벨리페릴- α -D-갈락토피라노시드를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 검출가능한 신호를 생성하기 위한 대표적인 효소 및 기질은 또한, 예를 들어, 미국 공개 2012/0100540호에 기재되어 있다. 발색성 또는 형광성 기질을 포함하는, 다양한 검출가능한 효소 기질은, 잘 알려져 있고, 상업적으로 이용 가능하다 (Pierce, Rockford IL; Santa Cruz Biotechnology, Dallas TX; Invitrogen, Carlsbad CA; 42 Life Science; Biocare). 일반적으로, 기질은 표적 핵산의 부위에 침착된 침전물을 형성하는 생성물로 전환된다. 기타 대표적인 기질은, HRP-Green (42 Life Science), Betazoid DAB, Cardassian DAB, Romulin AEC, Bajoran Purple, Vina Green, Deep Space Black™, Warp Red™, Vulcan Fast Red 및 Biocare의 Ferangi Blue (Concord CA; biocare.net/products/detection/chromogens)를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0592] 면역분석의 몇몇 구체 예에서, 검출가능한 표지는, 1차 항체 또는 비표지된 1차 항체를 검출할 수 있는 2차 항체에 직접 연결될 수 있다. 발색성 또는 형광성 표지를 포함하지만, 이에 제한되지 않는, 대표적인 검출가능한 표지는, 기술분야의 당업자에게 잘 알려져 있다 (Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, San Diego (1996), 참조). 표지로서 유용한 대표적인 형광단은, 로다민 유도체, 예를 들어, 테트라메틸로다민, 로다민 B, 로다민 6G, 술폴로다민 B, 텍사스 레드 (술폴로다민 101), 로다민 110, 및 이의 유도체, 예컨대, 테트라메틸로다민-5-(또는 6), 리사민 로다민 B, 및 이와 유사한 것; 7-니트로벤즈-2-옥사-1,3-디아졸 (NBD); 플루오로센 및 이의 유도체; 다실(5-디에틸아미노나프탈렌-1-술포닐)과 같은 나프탈렌; 7-아미노-4-메틸쿠마린-3-아세트산 (AMCA), 7-디에틸아미노-3-[4'(요오드아세틸)아미노]페닐]-4-메틸쿠마린 (DCIA), 알렉사 플루오르 염료

(Molecular Probes), 및 이와 유사한 것과 같은 쿠마린 유도체; 4,4-디플루오로-4'-보로-3a,4a-디아자-s-인다센 (BODIPY™) 및 이의 유도체 (Molecular Probes; Eugene Oreg.); 8-메톡시피렌-1,3,6-트리스ulfon산, 및 이와 유사한 것을 포함하는, Cascade Blue™ 및 이의 유도체와 같은 피렌 및 sulfon화된 피렌; 피리딜옥사졸 유도체 및 다폭실 유도체 (Molecular Probes); Lucifer Yellow (3,6-디sulfonyl-4-아미노-나프탈이미드) 및 이의 유도체; CyDye™ 형광 염료 (Amersham/GE Healthcare Life Sciences; Piscataway NJ), 및 이와 유사한 것을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 대표적인 발색단은, 페놀프탈레인, 말라카이트 그린, 니트로 페닐과 같은 니트로방향족 화합물, 디아조 염료, 다실(4-디메틸아미노아조벤젠-4'-sulfonyl), 및 이와 유사한 것을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0593] 현미경 또는 분광법과 같은 기술분야의 당업자에게 널리 알려진 방법은, 결합된 1차 또는 2차 항체와 관련된 발색성 또는 형광성 검출가능한 신호를 시각화하는데 활용될 수 있다.

[0594] "넥틴-4의 발현을 결정"은, 기준 시스템 (또는 기준 척도)에서 시험 생물학적 샘플 내에 넥틴-4의 발현을 평가하는 것을 지칭하고, 그래서 기준 시스템에 익숙한 사람은 기준 시스템에 위치한 다른 샘플들과 관련하여 시험 샘플에서 넥틴-4의 상대 발현을 보여줄 수 있다. 결과적으로, 이러한 결정은, 시험 조직 샘플 내에 넥틴-4의 발현을 넥틴-4의 기준 발현 수준과 비교하는 단계를 포함한다.

[0595] 몇몇 구체 예에서, 기준 시스템은, 시험 샘플에서 넥틴-4의 실제 몰 농도 또는 몰 분량이 기준 발현 수준의 몰 농도 또는 몰 분량과 비교되는 정량적 시스템일 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 몰 농도 또는 몰 분량에 선형 비례하는 기타 대리 수치 측정은 사용될 수 있다. 이러한 대리 측정의 예로는 결합된 항체의 형광 강도 측정, 결합된 항체의 발광 강도 측정, 결합된 항체의 방사능 측정, 및/또는 결합된 항체의 비색 또는 발색 측정을 포함한다.

[0596] 다른 구체 예에서, 기준 시스템은 분류 시스템일 수 있다. 분류 시스템은, 최소 2개의 범주 및 최대 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 또는 그 이상의 범주를 가질 수 있다. 하나의 구체 예에서, 기준 시스템은, 넥틴-4 발현에 양성인 샘플에 대한 양성 범주 (양성) 및 넥틴-4 발현에 음성인 샘플에 대한 음성 범주 (음성)를 갖는다. 이러한 분류 시스템에서, 시험 샘플에서 넥틴-4의 발현을 결정하는 것은, 시험 샘플에서의 넥틴-4의 발현을 양성 기준 및/또는 음성 기준 샘플의 넥틴-4 발현 과 비교하는 단계, 및 시험 샘플이 양성 기준과 유사하거나 또는 더 높은 수준으로 넥틴-4를 발현하는 경우 양성 범주에 시험 샘플을 배치하는 단계를 포함한다. 또 다른 구체 예에서, 분류 시스템은 3개의 범주, 예를 들어, 음성, 중간, 및 높은 발현 범주를 갖는다. 또 다른 구체 예에서, 분류 시스템은, 4개의 범주, 예를 들어, 음성, 낮은/약한, 중간/보통, 및 높은/강한 발현 범주를 갖는다. 몇몇 관점에서, 시험 샘플에서 넥틴-4의 발현을 결정하는 것은, 시험 샘플에서의 넥틴-4의 발현을 알려진 범주의 넥틴-4 발현의 하나 이상의 기준과 비교하는 단계, 및 시험 샘플을 기준(들)에 대한 이의 상대적인 발현에 따른 범주에 배치하는 단계를 포함한다.

[0597] 몇몇 구체 예에서, 기준 시스템은 스코어링 시스템 (scoring system)일 수 있다. 스코어링 시스템은 범주가 스코어로 대체된다는 점을 제외하고는 분류 시스템과 유사할 수 있다. 예를 들어, 음성 및 양성 넥틴-4 발현의 2-범주 시스템은, 0 및 1의 스코어링 시스템일 수 있으며, 여기서 0은 음성, 1은 양성을 의미한다. 또 다른 구체 예에서, 3-범주 시스템은, 0, 1 및 2의 스코어링 시스템일 수 있으며, 여기서, 0은 음성이고, 1은 낮은/약한 발현이며, 2는 중간/보통 및 높은/강한 발현이다. 또 다른 구체 예에서, 4-범주 시스템은, 0, 1, 2, 및 3의 스코어링 시스템일 수 있으며, 여기서 0은 음성이고, 1은 낮은/약한, 2는 중간/보통이며, 3은 높은/강한 발현이다. 분류 시스템과 유사하게, 스코어링 시스템에서 시험 샘플 내에 넥틴-4의 발현을 결정하는 것은, 시험 샘플에서 넥틴-4의 발현을 알려진 스코어를 갖는 넥틴-4 발현의 하나 이상의 기준과 비교하는 단계 및 시험 샘플을 기준에 대한 이의 상대적인 발현에 따라 스코어를 할당하는 단계를 포함한다. 그러나, 스코어 시스템은, 생물학적 샘플에서 상대적 단백질 발현을 추적하는 데 사용될 수 있는, 불연속 및 분리된 숫자의 스코어 (예를 들어, 0, 2, 4, 6, 8 및 10의 시스템, 또는 1, 4, 6, 11, 13 및 19의 시스템), 분수가 있는 숫자 (예를 들어, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 등), 음수, 임의의 숫자로부터 시작하는 숫자 (예를 들어, 1000, 2000, 3000, 등) 및 어떤 수의 세트일 수 있다.

[0598] 몇몇 구체 예에서, 기준 시스템은 분류 또는 스코어링 시스템과 관련하여 세포의 퍼센트일 수 있다. 분류 또는 스코어링 시스템과 세포의 퍼센트의 조합은, 샘플의 더 고급의 등급을 제공한다. 이러한 조합된 시스템에서, 생물학적 샘플 유래의 각 세포는, 분류 또는 스코어링 시스템에 할당 또는 배치되고, 각 범주 또는 스코어에서 시험 샘플의 세포의 대략적인 퍼센트는 결정된다. 일 실시예에서, 세포의 퍼센트의 측정은, 양성 및 음성 넥틴-4 발현의 2-범주 시스템과 연결될 수 있으며, 여기서, 샘플은 전체로서 측정되는 것이 아니고, 넥틴-4 발현에 대

해 음성인 세포의 퍼센트 및 넥틴-4 발현에 대해 양성인 세포의 퍼센트로 나뉜다. 예를 들어, 양성 및 음성 넥틴-4 발현의 2-범주 시스템에서, 시험 샘플은 2 범주 시스템에 배치되지만 10% 세포가 넥틴-4 발현에 양성이고 90% 세포가 넥틴-4 발현에 대해 음성이라면, 넥틴-4 발현에 대해 음성일 수 있다. 하나의 구체 예에서, 기준 시스템은 2-범주 또는 2-스코어 시스템과 관련하여 세포의 퍼센트를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 기준 시스템은 3-범주 또는 3-스코어 시스템과 관련하여 세포의 퍼센트를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 기준 시스템은 4-범주 또는 4-스코어 시스템과 관련하여 세포의 퍼센트를 포함한다. 하나의 구체예에서, 기준 시스템은 5-범주 또는 5-스코어 시스템과 관련하여 세포의 퍼센트를 포함한다. 하나의 구체예에서, 기준 시스템은 6-범주 또는 6-스코어 시스템과 관련하여 세포의 퍼센트를 포함한다. 하나의 구체예에서, 기준 시스템은 7-범주 또는 7-스코어 시스템과 관련하여 세포의 퍼센트를 포함한다. 하나의 구체예에서, 기준 시스템은 8-범주 또는 8-스코어 시스템과 관련하여 세포의 퍼센트를 포함한다. 하나의 구체예에서, 기준 시스템은 9-범주 또는 9-스코어 시스템과 관련하여 세포의 퍼센트를 포함한다. 하나의 구체예에서, 기준 시스템은 10-범주 또는 10-스코어 시스템과 관련하여 세포의 퍼센트를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 기준 시스템은 어떤 분류 또는 임의의 스코어링 시스템과 관련하여 세포의 퍼센트를 포함한다. 하나의 구체 예에서, 기준 시스템은, 0 (넥틴-4에 대해 음성), 1 (낮은/약한 넥틴-4 발현), 2 (중간/보통 넥틴-4 발현), 및 3 (높은/강한 넥틴-4 발현)을 포함하는 4-스코어 시스템과 관련하여 세포의 퍼센트를 포함한다.

[0599] 몇몇 관점에서, 기준 시스템은, 넥틴-4 발현 대 적어도 하나의 기준 단백질의 발현의 비일 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 비는 넥틴-4 발현의 정량 측정 및 기준 단백질의 정량 측정의 비일 수 있으며, 여기서, 정량 측정은, 여기에 기재된 것들, 예컨대, 몰 농도, 몰 분량, 결합된 항체의 형광 강도 측정, 결합된 항체의 발광 강도 측정, 결합된 항체의 방사능 측정, 및/또는 결합된 항체의 비색 또는 발색 측정을 포함한다. 다른 구체 예에서, 비는 또한 여기에 제공된 임의의 스코어링 시스템에 따른 기준 단백질 및 넥틴-4 발현에 할당된 스코어의 비일 수 있다. 기준 단백질은, 액틴과 같은 보통 세포 기능의 단백질, GAPDH, GDI, 또는 하우스-키퍼 유전자에 의해 발현된 임의의 단백질일 수 있다. 예를 들어, 시험 샘플이 넥틴-4 발현에 대해 3의 스코어 및 액틴의 발현에 대해 1의 스코어를 갖는다면, 비는 3인 것으로 결정될 수 있다.

[0600] 다른 관점에서, 기준 시스템은, 입력으로서 분류, 스코어, 비, 퍼센트, 및 정량적 측정 중 하나 이상을 사용하여 수학적 함수의 결과를 활용할 수 있다. 몇몇 구체 예에서, 수학적 함수는, 샘플에서 넥틴-4 발현에 관한 더 상세한 정보 및/또는 넥틴-4 발현 스케일에 대한 더 고급의 등급을 제공하는 결과를 생성하기 위해 다양한 입력을 조합하는데 이들 연산자의 합성, 덧셈, 곱셈, 또는 조합을 사용한다. 하나의 구체 예에서, 수학적 함수는, 퍼센트 및 4-스코어 시스템의 조합에 기초하여 H 스코어를 계산한다. 예를 들어, H-스코어는, 각각의 넥틴-4 발현 스코어 (0=음성, 1=낮은/약한, 2=중간/보통, 및 3=높은/강한)을 갖는 세포의 퍼센트 (0-100)의 곱을 합산하여 계산된다. 예를 들어: 10%의 세포 스코어링 3, 30%의 세포 스코어링 2, 20%의 세포 스코어링 1, 및 40%의 세포 스코어링 0인 표본은 $(3 \times 10) + (2 \times 30) + (1 \times 20) + (0 \times 40) = 110$ 의 H-스코어를 가질 것이다.

[0601] 따라서, 여기에 제공된 바와 같이, 넥틴-4의 발현 수준은, 분류 시스템, 스코어링 시스템, 적어도 하나의 기준 단백질의 발현에 대한 넥틴-4 발현의 비, 상기 분류 또는 스코어링에서의 세포의 퍼센트, 넥틴-4 염색 신호의 정량적 측정, 또는 입력으로서 상기 분류, 스코어, 비, 퍼센트, 및 정량적 측정 중 하나 이상을 사용한 수학적 함수의 결과를 사용하여 결정될 수 있다.

[0602] 대부분의 포르말린-고정 조직은, 면역조직화학 염색 전에 항원 복구 (antigen retrieval) 단계를 필요로 한다. 메틸렌 브릿지 (Methylene bridges)는 가교-결합 단백질의 고정화 및 항원의 에피토프의 마스크 동안 형성된다. 항원 복구 방법은, 이들 메틸렌 브릿지를 파괴하고, 에피토프를 노출시켜, 항체가 결합하는 것을 가능하게 한다. 몇몇 구체 예에서, 항원은 열 유도 에피토프 복구 (HIER) 방법에 의해 복구된다. 다른 구체 예에서, 항원은 효소적 복구 (예를 들어, 단백질 가수분해 소화) 방법에 의해 복구된다. HIER의 경우, 포르말린-고정, 파라핀-포매 (FFPE) 조직 절편은, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃, 80℃, 85℃, 90℃, 95℃, 100℃, 105℃, 110℃, 115℃, 120℃, 125℃, 또는 130℃에서 가열될 수 있다. FFPE 조직 절편은, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 420, 480, 540, 600, 660, 720, 780, 840, 900, 960, 1020, 1080, 1140, 1200, 1260, 1320, 1380, 및 1440분 동안 이들 온도 중 어느 하나에서 가열될 수 있다. 전술된 온도 중 어느 하나에서 및 전술된 지속기간 동안 중 어느 하나 동안 HIER 절차는, pH 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.2, 5.4, 5.6, 5.8, 6.0, 6.2, 6.4, 6.6, 6.8, 7, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8, 8.2, 8.4, 8.6, 8.8, 9, 9.2, 9.4, 9.6, 9.8, 10, 10.2, 10.4, 10.6, 10.8, 11, 11.5, 또는 12를 갖는 용액에서 수행될 수 있다. 몇몇 구체 예에서, HIER는, 80℃, 85℃, 90℃, 95℃, 100℃, 105℃, 110℃, 115℃로 이루어진 군으로부터 선택된 온도에서, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40으로 이루어진

군으로부터 선택된 지속기간 동안, 및 8, 8.2, 8.4, 8.6, 8.8, 9, 9.2, 9.4, 9.6, 9.8, 10, 10.2, 10.4로 이루어진 군으로부터 선택된 pH에서 수행될 수 있다.

[0603] 따라서, 여기에 제공된 방법은 열-유도된 에피토프 복구 (HIER)에 의해 넥틴-4의 에피토프를 복구하는 단계를 더욱 포함한다.

[0604] 넥틴-4 항원에 면역특이적으로 결합하는, 비표지된 항체, 표지된 항체, 및 이의 유도체 및 유사체는, 진단 목적을 위해 넥틴-4-매개 질환을 검출, 진단, 또는 모니터링하는데 사용될 수 있다. 따라서, 넥틴-4 매개 질환의 검출 방법은 여기에서 제공되며, 상기 방법은: (a) 넥틴-4 항원에 면역특이적으로 결합하는 여기에 제공된 하나 이상의 항체를 사용하여 피험자의 세포 또는 조직 샘플에서 넥틴-4 항원의 발현을 분석하는 단계; 및 (b) 넥틴-4 항원의 수준을 기준 수준, 예를 들어, 정상 조직 샘플 (예를 들어, 넥틴-4-매개 질환이 없는 환자 유래의 조직 샘플, 질병 발생 전 동일한 환자 유래의 조직 샘플, 동일한 환자 유래의 조직 샘플에서 정상 세포, 또는 동일한 환자 유래의 정상 기관으로부터의 정상 조직 샘플)과 비교하는 단계를 포함하며, 이에 의해, 넥틴-4 항원의 대조군 수준에 비해 넥틴-4 항원의 분석된 수준의 증가는 넥틴-4-매개 질환의 나타낸다.

[0605] 또한, 넥틴-4-매개 질환을 진단하기 위한 진단 분석 방법은 여기에서 제공되며, 상기 방법은: (a) 넥틴-4 항원에 면역특이적으로 결합하는 여기에 제공된 하나 이상의 항체를 사용하여 개체의 세포 또는 조직 샘플에서 넥틴-4 항원의 수준에 대해 분석하는 단계; 및 (b) 넥틴-4 항원의 수준을 기준 수준, 예를 들어, 정상 조직 샘플에서의 수준과 비교하는 단계를 포함하고, 이에 의해, 넥틴-4 항원의 기준 수준과 비교된 분석된 넥틴-4 항원 수준에서 증가는 넥틴-4-매개 질환을 나타낸다. 특정 구체 예에서, 피험자에서 넥틴-4-매개 질환을 치료하는 방법은 여기에서 제공되며, 상기 방법은: (a) 넥틴-4 항원에 면역특이적으로 결합하는 여기에 제공된 하나 이상의 항체를 사용하여 피험자의 세포 또는 조직 샘플에서 넥틴-4 항원의 수준을 분석하는 단계; 및 (b) 넥틴-4 항원의 수준을 기준 수준, 예를 들어, 정상 조직 샘플에서의 수준과 비교하는 단계를 포함하고, 이에 의해, 넥틴-4 항원의 기준 수준과 비교된 분석된 넥틴-4 항원 수준에서 증가는 넥틴-4-매개 질환을 나타낸다. 몇몇 구체 예에서, 상기 방법은, (c) 넥틴-4-매개 질환을 갖는 것으로 확인된 피험자에게 여기에 제공된 유효량의 항체를 투여하는 단계를 더욱 포함한다. 넥틴-4-매개 질환의 더 명확한 진단은, 건강 전문가가 조기에 예방 조치 또는 공격적인 치료법을 사용하는 것을 가능하게 하여, 넥틴-4-매개 질환의 발병 또는 추가 진행을 예방한다.

[0606] 여기에 제공된 항체는, 여기에 기재되거나 또는 기술분야의 당업자에게 알려진 바와 같은 고전적인 면역조직학적 방법을 사용하여 생물학적 샘플에서 넥틴-4 항원 수준을 분석하는데 사용될 수 있다 (예를 들어, Jalkanen et al., 1985, J. Cell. Biol. 101:976-985; 및 Jalkanen et al., 1987, J. Cell Biol. 105:3087-3096, 참조). 단백질 유전자 발현을 검출하는데 유용한 기타 항체-기반 방법은, ELISA 및 방사선면역분석 (RIA)과 같은, 면역분석을 포함한다. 적절한 항체 분석 표지는 기술분야에 알려져 있으며, 글루코스 옥시다제와 같은, 효소 표지; 요오드 (^{125}I , ^{121}I), 탄소 (^{14}C), 황 (^{35}S), 삼중수소 (^3H), 인듐 (^{121}In) 및 테크네튬 (^{99}Tc)과 같은, 방사성 동위원소; 루미놀과 같은, 발광성 표지; 및 플루오레세인 및 로다민과 같은 형광 표지, 및 비오틴을 포함한다.

[0607] 여기에 제공되는 하나의 관점은 인간에서 넥틴-4-매개 질환의 검출 및 진단이다. 하나의 구체 예에서, 진단은: a) 넥틴-4 항원에 면역특이적으로 결합하는 유효량의 표지된 항체를 피험자에게 (예를 들어, 비경구, 피하, 또는 복강 내) 투여하는 단계; b) 표지된 항체가 넥틴-4 항원이 발현되는 피험자의 부위에 농축되도록 (및 미결합된 표지 분자가 배경 수준으로 제거되도록) 투여 후 시간 간격 동안 기다리는 단계; c) 배경 수준을 결정하는 단계; 및 d) 피험자에서 표지된 항체를 검출하여, 배경 수준 이상의 표지된 항체의 검출이 피험자가 넥틴-4-매개 질환을 갖는 것으로 나타나는, 검출 단계를 포함한다. 배경 수준은, 검출된 표지 분자의 양을 특정 시스템에 대해 이전에 결정된 표준 값과 비교하는 단계를, 포함하는 다양한 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0608] 사용된 이미징 시스템 및 피험자의 크기가, 진단 이미지를 생성하는데 필요한 이미징 모이어티의 양을 결정할 것이라는 것은 기술분야에서 이해될 것이다. 방사성 동위원소 모이어티의 경우에서, 인간 피험자의 경우, 주사된 방사능의 양은, 보통 ^{99}Tc 의 약 5 내지 20 millicuries의 범위일 것이다. 표지된 항체는 그 다음 특정 단백질 함유하는 세포의 위치에 축적될 것이다. 생체 내 중앙 이미징은, S.W. Burchiel et al., "Immunopharmacokinetics of Radiolabeled Antibodies and Their Fragments." (Chapter 13 in Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer, S.W. Burchiel and B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)에 기재되어 있다.

[0609] 사용된 표지의 타입 및 투여의 방식을 비롯한, 몇몇 변수에 따라, 표지된 항체가 피험자 내에 부위에 농축되고, 미결합된 표지 항체가 배경 수준으로 제거를 위한 투여 후 시간 간격은, 6 내지 48시간 또는 6 내지 24시간 또

는 6 내지 12시간이다. 또 다른 구체 예에서, 투여 후 시간 간격은 5 내지 20일 또는 5 내지 10일이다.

- [0610] 하나의 구체 예에서, 넥틴-4-매개 질환의 모니터링은, 넥틴-4-매개 질환의 진단 방법을, 예를 들어, 초기 진단 후 1개월, 초기 진단 후 6개월, 초기 진단 후 1년, 등등 동안 반복하여 수행된다.
- [0611] 표지된 분자의 존재는, 생체 내 스캐닝을 위해 기술분야에 알려진 방법을 사용하여 피험자에서 검출될 수 있다. 이들 방법은 사용된 표지의 타입에 의존한다. 숙련된 기술자는 특정 표지를 검출하기 위한 적절한 방법을 결정할 수 있을 것이다. 여기에 제공된 진단 방법에 사용될 수 있는 방법 및 장치는, 컴퓨터 단층촬영 (CT), 위치 방출 단층촬영 (PET)과 같은 전신 스캔, 자기 공명 영상 (MRI), 및 초음파촬영을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0612] 특별한 구체 예에서, 분자는 방사성 동위원소로 표지되고, 방사선 반응성 수술 기구 (radiation responsive surgical instrument)를 사용하여 환자에서 검출된다 (Thurston et al., 미국 특허 5,441,050). 또 다른 구체 예에서, 분자는 형광 화합물로 표지되고, 형광 반응성 스캐닝 기구를 사용하여 환자에서 검출된다. 또 다른 구체 예에서, 분자는 양전자 방출 금속으로 표지되고, 양전자 방출-단층촬영을 사용하여 환자에서 검출된다. 또 다른 구체 예에서, 분자는 상자성 표지로 표지되고, 자기 공명 영상 (MRI)을 사용하여 환자에서 검출된다.
- [0613] 30. 키트
- [0614] 또한, 여기에 제공된 항체 (예를 들어, 항-넥틴-4 항체) 또는 적절한 포장 물질로 포장된, 이의 조성물 (예를 들어, 약제학적 조성물)을 포함하는 키트는 여기에 제공된다. 키트는, 시험관 내, 생체 내 또는 생체 외에서 그 안에 성분의 사용을 위한 설명서 또는 성분의 설명을 포함하는 표지 또는 포장 삽입물을 선택적으로 포함한다.
- [0615] 용어 "포장 물질"은 키트의 성분을 수용하는 물리적 구조물을 지칭한다. 포장 물질은, 성분을 멸균 상태로 유지할 수 있으며, 이러한 목적을 위해 일반적으로 사용되는 물질 (예를 들어, 종이, 골판 섬유, 유리, 플라스틱, 호일, 애플, 바이알, 튜브, 등)로 제조될 수 있다.
- [0616] 여기에 제공된 키트는 표지 또는 삽입물을 포함할 수 있다. 표지 또는 삽입물에는, 예를 들어, 키트 성분을 함유하는 애플, 튜브, 또는 바이알에 부착되거나, 또는 구성요소, 키트 또는 포장 재료 (예를 들어, 상자)에 부착되거나 또는 분리된, "인쇄물", 예를 들어, 종이 또는 판지를 포함한다. 표지 또는 삽입물은, 부가적으로 디스크 (예를 들어, 하드 디스크, 카드, 또는 메모리 디스크)와 같은 컴퓨터 판독가능한 매체, CD- 또는 DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, 자기 테이프와 같은 광학 디스크, 또는 RAM 및 ROM과 같은 전기 저장 매체 또는 자기/광학 저장 매체, FLASH 매체, 또는 메모리 타입 카드와 같은 것들의 하이브리드 (hybrids)를 포함한다. 표지 또는 삽입물은, 제조업체 정보, 로트 번호, 제조업체 위치, 및 날짜를 확인하는 정보를 포함할 수 있다.
- [0617] 여기에 제공된 키트는 다른 구성요소를 부가적으로 포함할 수 있다. 키트의 각 성분은 개별 용기 안에 밀봉될 수 있으며, 모든 다양한 용기는 단일 포장 내에 있을 수 있다. 키트는 또한 저온 보관용으로 설계될 수 있다. 키트는, 여기에 제공된 항체, 또는 여기에 제공된 항체를 인코딩하는 핵산을 함유하는 세포를 함유하도록 더욱 설계될 수 있다. 키트 내에 세포는, 사용할 준비가 될 때까지 적절한 보관 조건에서 유지될 수 있다. 부가적인 성분은, 예로서, 양성 또는 음성 기준 샘플 (예를 들어, 넥틴-4-매개 질환을 갖는 것으로 알려진 환자 유래의 조직 샘플, 넥틴-4-매개 질환을 갖지 않는 환자의 조직 샘플, 질병 발병 전 동일한 환자 유래의 조직 샘플, 넥틴-4 매개 질환을 앓고 있는 피험자 유래의 조직 샘플에서의 정상 세포, 또는 동일한 환자 유래의 정상 기관으로부터의 정상 조직 샘플), 완충제, 세척액, 항체 검출 시약, 및/또는 신호 증폭 시약을 포함할 수 있다.
- [0618] 또한, 넥틴-4 항원에 면역특이적으로 결합하는 항체의 패널은 여기에서 제공된다. 특별한 구체 예에서, 다른 결합 속도 상수, 다른 해리 속도 상수, 넥틴-4 항원에 대한 다른 친화도, 및/또는 넥틴-4 항원에 대한 다른 특이성을 갖는 항체의 패널은 여기에서 제공된다. 어떤 구체 예에서, 약 10, 바람직하게는, 약 25, 약 50, 약 75, 약 100, 약 125, 약 150, 약 175, 약 200, 약 250, 약 300, 약 350, 약 400, 약 450, 약 500, 약 550, 약 600, 약 650, 약 700, 약 750, 약 800, 약 850, 약 900, 약 950, 또는 약 1000 항체 이상의 패널은 여기에서 제공된다. 항체의 패널은, 예컨대 ELISA와 같은 분석을 위해, 예를 들어, 96 웰 또는 384 웰 플레이트에서 사용될 수 있다.
- [0619] 별도로 정의되지 않는 한, 여기서 사용된 모든 기술 및 과학 용어들은, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 여기에 기재된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 시험에 사용될 수 있을지라도, 적절한 방법 및 물질은 여기에 기재되어 있다.
- [0620] 여기에 인용된 모든 출원, 공보, 특허 및 기타 참고문헌, GenBank 인용 및 ATCC 인용은, 이의 전체적인 내용이

참조로서 여기에 병합된다. 불일치가 발생하면, 정의를 포함하는, 본 명세서가 우선한다.

[0621] 여기서 사용된 바와 같은, 단수 형태는, 문맥 상 명백하게 다르게 나타내지 않는 한, 복수 형태를 포함한다. 따라서, 예를 들어, "펩티드 서열"에 대한 언급은, 복수의 이러한 서열 등을 포함한다.

[0622] 여기서 사용되는 바와 같이, 수치는 종종 본 문서 전체에 걸쳐 범위 형식으로 제시된다. 범위 형식의 사용은, 단지 편의 및 간결성을 위한 것이며, 문맥이 명확하게 달리 나타내지 않는 한, 본 발명의 범주에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안된다. 따라서, 범위의 사용은, 문맥상 명백하게 달리 나타내지 않는 한, 가능한 모든 하위 범위, 그 범위 내의 모든 개별 수치, 및 이러한 범위 및 수치의 분수 또는 범위 내의 정수를 포함하는 모든 수치 또는 수치 범위를 명시적으로 포함한다. 이러한 구성은, 범위의 폭에 관계 없이 본 특허 문서 전반에 걸친 모든 맥락에 적용된다. 따라서, 예를 들어, 90-100%의 범위에 대한 언급은, 91-99%, 92-98%, 93-95%, 91-98%, 91-97%, 91-96%, 91-95%, 91-94%, 91-93%, 등을 포함한다. 90-100%의 범위에 대한 언급은, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 95%, 97%, 등 뿐만 아니라, 91.1%, 91.2%, 91.3%, 91.4%, 91.5% 등, 92.1%, 92.2%, 92.3%, 92.4%, 92.5%, 등을 포함한다.

[0623] 부가적으로, 1-3, 3-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, 90-100, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 150-160, 160-170, 170-180, 180-190, 190-200, 200-225, 225-250의 범위에 대한 기준은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 등을 포함한다. 또 다른 예에서, 25-250, 250-500, 500-1,000, 1,000-2,500, 2,500-5,000, 5,000-25,000, 25,000-50,000의 범위의 기준은, 이러한 값 내에 또는 이를 포괄하는 임의의 수치 또는 범위, 예를 들어, 25, 26, 27, 28, 29... 250, 251, 252, 253, 254500, 501, 502, 503, 504, 등을 포함한다.

[0624] 여기서 사용된 바와 같이, 일련의 범위는 이 문서 전체에 걸쳐 개시된다. 일련의 범위의 사용은, 또 다른 범위를 제공하기 위해 상한 및 하한 범위의 조합을 포함한다. 이러한 구성은, 범위의 폭에 관계없이 본 특허 문서의 모든 맥락에서 적용된다. 따라서, 예를 들어, 5-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-75, 75-100, 100-150과 같은 일련의 범위에 대한 기준은, 5-20, 5-30, 5-40, 5-50, 5-75, 5-100, 5-150 및 10-30, 10-40, 10-50, 10-75, 10-100, 10-150 및 20-40, 20-50, 20-75, 20-100, 20-150, 등등과 같은 범위를 포함한다.

[0625] 간결성을 위해, 특정 약어는 여기에서 사용된다. 하나의 예는, 아미노산 잔기를 나타내는 단일 문자 약어이다. 아미노산과 이에 상응하는 세 글자 및 한 글자 약어는 다음과 같다:

알라닌	Ala	(A)
아르기닌	Arg	(R)
아스파라긴	Asn	(N)
아스파르트산	Asp	(D)
시스테인	Cys	(C)
글루탐산	Glu	(E)
글루타민	Gln	(Q)
글리신	Gly	(G)
히스티딘	His	(H)
이소류신	Ile	(I)
류신	Leu	(L)
라이신	Lys	(K)
메티오닌	Met	(M)
페닐알라닌	Phe	(F)
프롤린	Pro	(P)
세린	Ser	(S)
트레오닌	Thr	(T)
트립토판	Trp	(W)
티로신	Tyr	(Y)
발린	Val	(V)

[0626]

[0627] 본 발명은 일반적으로 다수의 구체 예를 묘사하는데 긍정적 언어 (affirmative language)를 사용하여 여기에 개시된다. 본 발명은 또한, 물질 또는 재료, 방법 단계들 및 조건들, 프로토콜, 절차, 분석법 또는 분석과 같은,

특정 주제가 완전히 또는 부분적으로 배제되는 구체 예를 구체적으로 포함한다. 따라서, 본 발명이 일반적으로 본 발명이 포함하지 않는 어떤 측면에서 여기에 표현되지 않을지라도, 본 발명에 명확히 포함되지 않은 관점은 그럼에도 불구하고 여기에 개시된다.

[0628] 본 발명의 다수의 구체 예는 기재된다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 사상 및 범주를 벗어나지 않고 다양한 변형이 이루어질 수 있는 것으로 이해될 것이다. 따라서, 하기 실시예는 청구범위에 기재된 발명의 범주를 예시하기 위한 것이지 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0629] 실시예

[0630] 본 섹션에서 실시 예는 예시를 위해 제공되는 것이지, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0631] 실시예 1: 항원 제조

[0632] 인간 벡틴-4 단편, 예를 들어, 인간 벡틴-4 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 서열 31-346 (SEQ ID NO: 2)을 포함하는 단편은, 후속 면역화 캠페인 (immunization campaigns)을 위한 항원으로서 발생되고 사용된다.

[0633] 6×HN-태그 벡틴 4 (aa 31-346)는, 시판되는 pET 발현 벡터를 사용하여 생성된다. 발현은, 제조업자의 지시에 따라 BL21 (DE3) 대장균에서 수행되고, IMAC-기반 정제 (고정화된 금속 친화성 크로마토그래피)를 사용하여 정제된다. 정제된 벡틴 4 (aa31-346)은 면역원으로 사용된다.

[0634] 항체 스크리닝을 위한 재조합 벡틴 4 (aa (1-348))는, 제조업자의 지시에 따라 변형된 pTag5/mychis 발현 벡터를 사용하여 293FT 세포에서 생성된다. 단백질은 표준 IMAC 기반 정제를 사용하여 정제된다.

[0635] 실시예 2: 항체의 발생

[0636] A. 항체 발생 및 생성

[0637] 단일클론 항체 M22-321b41.1은, Kohler and Milstein, Eur. J. Immunol. 6, 511 (1976)에 원래 기재된 표준 하이브리도마 기술을 사용하여 인간 벡틴 4 단백질의 세포의 도메인의 박테리아 생성 재조합 단편 (31-346; SEQ ID NO:2)으로 Balb/C 마우스를 면역화하여 발생된다. 하이브리도마 M22-321b41은, ELISA에 의해 인간 벡틴-4 단백질의 재조합 세포의 도메인에 특이적으로 결합하는 마우스 IgG2a 카파 항체를 생성하는 M22-321b41.1로 서브클로닝된다. 부가적으로, 단백질 A 정제된 항체 M22-321b41.1은, IHC에 의해 벡틴 4를 발현하는 시험된 조직을 특이적으로 염색하는 것으로 나타났다.

[0638] M22-321b41.1 하이브리도마 세포는, 나중에 액체 질소에서 장기 저장을 위해 성장, 확장, 및 생존 가능하게 동결된다.

[0639] B. 하이브리도마 시퀀싱 (Hybridoma Sequencing)

[0640] RT-PCR을 사용하여 M22-321b41.1 하이브리도마 항체 중쇄 및 경쇄 유전자는 서열분석된다.

[0641] 실시예 3: 항체의 스크리닝 및 선택

[0642] A. 스크리닝 분석 (또는 결합 분석)

[0643] 1차 ELISA 스크린은, 전술된 바와 같이 생성된 벡틴-4 세포의 도메인 단편 (아미노산 잔기 31-346)으로 수행된다.

[0644] 2차 ELISA 스크린은, E. coli에서 생성된 벡틴-4 세포의 도메인 단편 (아미노산 잔기 31-346), 293FT 세포에서 생성된 벡틴-4 세포의 도메인 단편 (아미노산 잔기 1-346), 벡틴-4-tag5, 및 2개의 대조군 단백질 (하나는 pET로 생산된 것 및 하나는 tag5로 생산된 것)을 사용하여 수행된다.

[0645] B. 항체의 선택

[0646] 재조합 3T3-벡틴-4 세포에서 염색을 나타내고, 대조군에서 염색이 없는 경우, 항체는 처음에 선택된다. 뒤이어, 초기 선택된 항체는, qPCR 스코어에 의해 결정된 것으로 알려진 벡틴-4 mRNA 발현을 갖는 양성 및 음성 대조군 조직의 패널에서 시험된다. 항체는, 다양한 농도에서 및 다양한 항원 복구 프로토콜로 시험된다. 항체가 벡틴-4-mRNA 양성 조직에서 특이적 염색을 생성하고, 벡틴-4-mRNA 음성 조직에서 염색이 결핍되며, 및 염색 강도, 염색된 세포의 비, 및 비특이적 배경 염색의 측면에서 시험된 대조군 항-벡틴-4 항체보다 우수한 경우, 항체는 선택된다.

- [0647] 실시 예 4: 넥틴-4에 대해 특이적인 항체에 대한 스크리닝
- [0648] 전술한 바와 같이 발생된 항체는 스크리닝되어 넥틴-4에 특이적인 항체를 선택한다. 스크리닝은, 예를 들어, IHC 분석을 사용하여 수행된다. 간단히 말하면, 다양한 기원, 예를 들어, 방광, 유방, 난소, 췌장, 신장, 피부, 폐 및 결장 유래의 인간 이종이식 암 조직은, qPCR에서 먼저 시험되어 이들 조직에서의 넥틴-4 발현 수준을 결정한다.
- [0649] 실시간 정량적 PCR (qPCR) 분석은 사용되어 상대 넥틴-4 mRNA 발현 수준을 결정한다. qPCR 분석은, 5ng RNA 당량의 cDNA 주형 및 SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad)을 갖는 Bio-Rad CFX384 실시간 PCR 검출 시스템을 사용하여 수행된다. 넥틴-4 mRNA 발현 수준은, 하기 식: $10,000 \times 2^{-(Cq_{\text{넥틴-4}} - Cq_{\text{GAPDH}})}$ 을 이용하는 변형된 델타 Cq 방법을 사용하여, 하우스키핑 유전자인, GAPDH의 발현 수준에 대해 계산되고; 넥틴-4 상대 발현은 GAPDH 단위에 대하여 기재된다.
- [0650] 넥틴-4의 qPCR 분석에 사용된 프라이머는: 191P4D12.1 정방향 프라이머: 5'-GGCTGGAGTTCATGAGGTTTATTT-3' (SEQ ID NO:41); 및 191P4D12.2 역 프라이머: 5'-TCCAGCAGATTCAGACTAAGAAGA-3' (SEQ ID NO:42)를 포함한다. GAPDH의 qPCR 분석에 사용된 프라이머는: GAPDH.1 정방향 프라이머: 5'-AGAACATCATCCTGCCTCTACTG-3' (SEQ ID NO:43); 및 GAPDH.2 역 프라이머: 5'-AAAAAGAGCTTGACAAAGTGGTCGT-3' (SEQ ID NO:44)을 포함한다.
- [0651] qPCR에 대한 cDNA 주형은, TRIzol RNA 추출 방법을 사용하여 조직 또는 세포주 샘플로부터 단리된 RNA로부터 Bio-Rad iScript Advanced cDNA 합성 키트를 사용하여 합성되고, Qiagen RNeasy Cleanup 키트를 사용하여 RNA 세척 및 DNase I 소화가 수반된다.
- [0652] 대표적인 인간 이종이식 조직은 표 5에 나타낸다. 위에서 발생된 항-넥틴-4 항체는 그 다음 알려진 수준의 넥틴-4 발현을 갖는 조직을 염색하기 위해 IHC 분석에 사용된다. IHC 분석은, 하기 실시예 5에 상세히 기재된 것과 유사하게 수행된다. 다양한 조직에서 넥틴-4의 IHC 염색은, 이들 조직에서 넥틴-4 mRNA 수준과 상관관계가 있다. 항체는, 이것이 넥틴-4 mRNA 수준과 상관관계가 있는 IHC 염색 신호, 예를 들어, 높은 수준의 넥틴-4 mRNA를 갖는 조직에서의 강한 염색, 중간 수준의 넥틴-4 mRNA를 갖는 조직에서의 보통 IHC 염색 신호, 낮은 넥틴-4 mRNA를 갖는 조직에서의 약한 IHC 염색 신호, 및 넥틴-4 mRNA를 발현하지 않는 조직에서 무 IHC 염색 신호를 생성하는 경우, 넥틴-4 특이적 항체로서 선택된다. 전체로서, 적어도 283의 항체 클론은 스크리닝되어, M22-321b41.1 및 M22-244b3.1.1.1의 넥틴-4 특이적 항체의 확인으로 이어진다.
- [0653] 실시예 5: 기능성 분석: 이종이식 조직의 면역조직화학 염색
- [0654] 예를 들어, 여기에 기재된 바와 같이, 발생, 스크리닝, 발현, 및 정제된 항체는, IHC 분석에서 넥틴-4를 발현하는 인간 이종이식 조직을 특이적으로 염색하는 이들의 능력에 대해 더욱 평가된다.
- [0655] 예를 들어, 2개의 항-넥틴-4 마우스 단일클론 항체인, M22-244b3.1.1.1 및 M22-321b41.1 (각각 IgG1 및 IgG2a 이소타입)은, IHC 분석에서 시험된다. M22-244b3.1.1.1 및 M22-321b41.1 항체는, pH 7.4인, 포스페이트 완충 식염수에서 1.54 mg/ml 및 1.3 mg/ml로 제공된다. 음성 대조군으로서, 인간 넥틴-4 또는 다른 포유 동물 항원에 결합하지 않는 β -2,6-프룩토산으로 발생된 뮤린 골수종 (클론: UPC10, Sigma-Aldrich, MO, St. Louis, MO)으로부터 상업용 마우스 IgG2a 이소타입 대조군은 사용된다.
- [0656] IHC 염색은 하기 대표적인 프로토콜에 따라 수행된다. 간단히 말하면, IHC 분석에서 넥틴-4를 검출하기 위해 간접 IHC 기술은 사용된다. 샘플은 10% 완충 중성 포르말린에 고정되고, 파라핀 왁스에서 가공되며 내장되고, 4 μ m 조직 절편으로서 준비된다. 탈파라핀화 및 재-수화 후, 절편은 항원 복구를 위해 처리된다. 넥틴-4의 항원 에피토프는, 예를 들어, 열-유도 에피토프 복구 (HIER) 절차로 통상 지칭되는, 수성 매질에서 조직 절편에 열을 가하여 복구된다. 예를 들어, 넥틴-4의 항원 에피토프는, 100°C에서 20분 동안 Leica 자동화 플랫폼에 Epitope Retrieval 2 (ER2, 8.9-9.1의 EDTA-기반 완충액)를 적용하여 복구된다. 항원 복구 후 조직 절편은 그 다음 마우스 1차 항체 M22-321b41.1, M22-244b3.1.1.1, 또는 IgG2a (항체 대조군)와 함께 배양된다. 1차 항체와 결합된 조직 절편은 세척되고, 효소-표지된, 예를 들어, 퍼옥시다제-표지된, 2차 항체로 검출된다. 결합된 2차 항체는, 예를 들어, Leica Bond Refine Polymer Detection 시스템을 사용하여, 발색되며, 이는 페록시다제와 크로모젠 3,3'-디아미노벤지딘 (DAB) 사이에 반응을 사용하여 반응 부위에서 갈색 침전물을 생성할 수 있다. 염색된 조직 절편은 그 다음 스캔되고, 이미지화되며, 예를 들어, Aperio ScanScope CS (Aperio, Vista, CA)를 사용하여 광학 현미경으로 평가된다.
- [0657] 항체 염색의 수준에 의해 조직 절편에서 넥틴-4 발현의 수준을 평가하기 위해, 염색된 조직 절편은, IHC 염색의

강도 및 암 세포 양성 비에 따라 다른 범주 또는 스코어로 할당되고, 평가되며, 분류되고, 기록된다. 범주는, 강함 ("3" 또는 "3+"와 상호교환 가능), 보통 ("2" 또는 "2+"와 상호교환 가능), 및 약함 ("1" 또는 "1+"와 상호교환 가능)을 포함한다. 특이적 염색 결핍은, 음성 ("0" 또는 "-"와 상호교환 가능)으로 기록된다.

[0658]

알려진 벡틴-4 mRNA 발현 수준을 갖는, 다양한 기원, 예를 들어, 방광, 유방, 난소, 췌장, 신장, 피부, 폐 및 결장 유래의 인간 이종이식 암 조직은 시험된다. 이들 대표적인 인간 이종이식 조직에서 벡틴-4 mRNA의 수준은 먼저 qPCR을 사용하여 평가되고, 표 5에 나타냈다.

표 5

[0659]

항체 적정 실험을 위한 조직

인간 이종이식 조직	마우스 ID	이종이식 조직의 기원	벡틴-4 mRNA (qPCR)
AG-B1	61668	방광 유두 상피 암종	681
AG-B11	68618	방광 침습성 각질 편평 세포 암종	391
AG-Br29	71838	유방 침윤 관 암종	76
AG-OV35	67431	난소 고-급 장액 암종	45
AG-Panc3	62103	췌장 중등도의 침습성 선암	12
AG-C6	61674	중등도 분화 선암	6
AG-K24	65766	신장 세포 암종	0.4
AG-Mel10	70845	악성 흑색종	0
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	유방 선암	0

[0660]

항체에 대한 적절한 염색 농도를 찾기 위해, 항체 M22-321b41.1 및 M22-244b3.1.1.1는 먼저 전술된 바와 같은 IHC 염색 분석에서 표 5에 열거된 대표적인 이종이식 조직을 사용하여 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 및 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 적정된다. 결과는 표 6에 나타낸다.

표 6

[0661]

M22-321b41.1 및 M22-244b3.1.1.1의 적정에 대한 결과의 요약

인간 이종이식 조직	마우스 ID	벡틴-4 mRNA (qPCR)	M22-321b41.1		M22-244b3.1.1.1	
			농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	스코어	농도 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	스코어
AG-B1	61668	681	2.5	3+	2.5	3+
AG-B11	68618	391	2.5	3+	2.5	2+
AG-Br29	71838	76	2.5	2+	2.5	3+
AG-OV35	67431	45	2.5	3+	2.5	2+
AG-Panc3	62103	12	2.5	3+	2.5	3+
AG-C6	61674	6	2.5	1+	2.5	+
AG-K24	65766	0.4	2.5	-	2.5	2+
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	2.5	-	2.5	1+
AG-Mel10	70845	0	2.5	-	2.5	-
AG-B1	61668	681	5	3+	5	3+
AG-B11	68618	391	5	3+	5	2+
AG-Br29	71838	76	5	2+	5	3+
AG-OV35	67431	45	5	3+	5	3+
AG-Panc3	62103	12	5	3+	5	3+
AG-C6	61674	6	5	+	5	+
AG-K24	65766	0.4	5	-	5	3+
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	5	+	5	1+
AG-Mel10	70845	0	5	-	5	-
AG-B1	61668	681	7.5	3+	7.5	3+
AG-B11	68618	391	7.5	3+	7.5	2+
AG-Br29	71838	76	7.5	2+	7.5	3+
AG-OV35	67431	45	7.5	3+	7.5	3+
AG-Panc3	62103	12	7.5	3+	7.5	3+
AG-C6	61674	6	7.5	+	7.5	+

AG-K24	65766	0.4	7.5	+	7.5	3+
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	7.5	+	7.5	1+
AG-Mel10	70845	0	7.5	-	7.5	-

[0662]

항-넥틴-4 항체 IHC 염색에 대한 최적 농도는, 항-넥틴-4 항체 IHC 염색이 넥틴-4 mRNA-발현 조직에서는 관찰되었지만 넥틴-4-음성 조직에서는 관찰되지 않는 농도로서 결정된다. 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서, M22-321b41.1 및 M22-244b3.1.1.1 항체 모두는, 인간 이종이식 조직에서 넥틴-4 mRNA에 대해 양성인 양성 염색을 나타내고 (도 1 및 도 2), 음성 대조군 조직에서 가장 적은 배경 염색을 나타낸다. 표 6 및 표 7에서의 상세한 염색 결과는, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도가 두 항체 모두에 대한 대표적인 최적 농도임을 나타낸다.

표 7

[0663]

M22-321b41.1 및 M22-244b3.1.1.1의 적정에 대한 상세한 염색 결과

이종이식	마우스 번호	넥틴-4 mRNA (qPCR)	1차 항체	농도 ($\mu\text{m}/\text{mL}$)	염색 결과
AG-B1	61668	681	M22-244b3.1.1.1	2.5	3+
AG-B11	68618	391	M22-244b3.1.1.1	2.5	2+
AG-Br29	71838	76	M22-244b3.1.1.1	2.5	3+
AG-OV35	67431	45	M22-244b3.1.1.1	2.5	2+
AG-Panc3	62103	12	M22-244b3.1.1.1	2.5	3+
AG-C6	61674	6	M22-244b3.1.1.1	2.5	+
AG-K24	65766	0.4	M22-244b3.1.1.1	2.5	2+
AG-Mel10	70845	0	M22-244b3.1.1.1	2.5	-
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	M22-244b3.1.1.1	2.5	+
AG-B1	61668	681	M22-244b3.1.1.1	5.0	3+
AG-B11	68618	391	M22-244b3.1.1.1	5.0	2+
AG-Br29	71838	76	M22-244b3.1.1.1	5.0	3+
AG-OV35	67431	45	M22-244b3.1.1.1	5.0	3+
AG-Panc3	62103	12	M22-244b3.1.1.1	5.0	3+
AG-C6	61674	6	M22-244b3.1.1.1	5.0	+
AG-K24	65766	0.4	M22-244b3.1.1.1	5.0	3+
AG-Mel10	70845	0	M22-244b3.1.1.1	5.0	-
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	M22-244b3.1.1.1	5.0	+
AG-B1	61668	681	M22-244b3.1.1.1	7.5	3+
AG-B11	68618	391	M22-244b3.1.1.1	7.5	2+
AG-Br29	71838	76	M22-244b3.1.1.1	7.5	3+
AG-OV35	67431	45	M22-244b3.1.1.1	7.5	3+
AG-Panc3	62103	12	M22-244b3.1.1.1	7.5	3+
AG-C6	61674	6	M22-244b3.1.1.1	7.5	+
AG-K24	65766	0.4	M22-244b3.1.1.1	7.5	3+
AG-Mel10	70845	0	M22-244b3.1.1.1	7.5	-
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	M22-244b3.1.1.1	7.5	+
AG-B1	61668	681	M22-321b41.1	2.5	3+
AG-B11	68618	391	M22-321b41.1	2.5	3+
AG-Br29	71838	76	M22-321b41.1	2.5	2+
AG-OV35	67431	45	M22-321b41.1	2.5	3+
AG-Panc3	62103	12	M22-321b41.1	2.5	3+
AG-C6	61674	6	M22-321b41.1	2.5	+
AG-K24	65766	0.4	M22-321b41.1	2.5	-
AG-Mel10	70845	0	M22-321b41.1	2.5	-
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	M22-321b41.1	2.5	-
AG-B1	61668	681	M22-321b41.1	5.0	3+
AG-B11	68618	391	M22-321b41.1	5.0	3+
AG-Br29	71838	76	M22-321b41.1	5.0	2+
AG-OV35	67431	45	M22-321b41.1	5.0	3+
AG-Panc3	62103	12	M22-321b41.1	5.0	3+
AG-C6	61674	6	M22-321b41.1	5.0	+

AG-K24	65766	0.4	M22-321b41.1	5.0	-
AG-Mel10	70845	0	M22-321b41.1	5.0	-
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	M22-321b41.1	5.0	+
AG-B1	61668	681	M22-321b41.1	7.5	3+
AG-B11	68618	391	M22-321b41.1	7.5	3+
AG-Br29	71838	76	M22-321b41.1	7.5	2+
AG-OV35	67431	45	M22-321b41.1	7.5	3+
AG-Panc3	62103	12	M22-321b41.1	7.5	3+
AG-C6	61674	6	M22-321b41.1	7.5	+
AG-K24	65766	0.4	M22-321b41.1	7.5	+
AG-Mel10	70845	0	M22-321b41.1	7.5	-
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	M22-321b41.1	7.5	+

[0664] 2.5 μ g/ml에서 M22-321b41.1 항체는, 넥틴-4 mRNA-음성 조직 AG-K24 및 MDAMB-231-MFP-XCL에서 염색을 나타내지 않는다 (도 3 및 도 5); 반면에 M22-244b3.1.1.1은, 넥틴-4 mRNA-음성 이중이식 암 세포 AG-K24 (도 4) 및 MDAMB-231-MFP-XCL (도 6)에서 비특이적 염색을 갖는다. 마우스 IgG2a 음성 대조군 항체와 함께 배양된 절편에서 염색은 보이지 않았다 (도 7). 따라서, M22-321b41.1은, 넥틴-4 mRNA를 발현하는 조직을 특이적으로 염색시키고, 그리고 넥틴-4 mRNA를 발현하지 않는 조직에 대해, 염색을 일으키지 않거나, 또는 이소타입 IgG 대조군만큼 낮은 염색을 일으킨다.

[0665] M22-321b41.1의 특이성은, 표 8에 나타난 바와 같이 양성 및 음성 대조군 조직의 확장된 패널에서 추가로 시험된다. 결과는, 2.5 μ g/ml에서 항체가 AG-B 1, AG-UTS, AG-L16 (도 8), AG-Br29, AG-B1 1 (도 9), AG-OV35, AG-Panc3, AG-C16, AG-C6, Rat1 (E)-넥틴-4 및 T47D를 포함하는, 넥틴-4 mRNA-발현 조직 및 세포에 대해 특이적임을 나타낸다. 결과는 또한, 항체가 조직 및 231-MFPXCL (도 5), AG-Mel5, AG-K31, CALU-1, MDA-MB-231, UG-K3, Rat1(E)-neo, Rat1(E)-넥틴-1, Rat1(E)-넥틴-2, Rat1(E)-넥틴-3, JMSU-1, Hep3B 및 ACHN에 대해 음성인 것을 나타낸다. 이러한 발견은, M22-321b41.1이, 여기에서 시험된 모든 조직 및 세포에 대해, 넥틴-4 mRNA를 발현하는 조직 및 세포를 양성으로 염색시키고, 그렇지 않은 것을 음성으로 염색시키기 때문에, M22-321b41.1이 IHC 분석에서 넥틴-4에 대해 특이적임을 입증한다 (표 8 및 표 9).

표 8

[0666] 2.5 μ g/ml에서 M22-321b41.1을 사용한 FFPE 샘플의 확장 패널에서 넥틴-4 발현의 요약

샘플	ID 번호	넥틴-4 mRNA (qPCR)	스코어 (M22-321b41.1 염색)
Rat1 (E) Neo	C974	음성	-
Rat1 (E) 넥틴1	C975	음성	-
Rat1 (E) 넥틴2	C976	음성	-
Rat1 (E) 넥틴3	C977	음성	-
Rat1 (E) 넥틴4	C978	양성	3
T47D	C1035	양성	3
MDA-MB-231	C1033	음성	-
JMSU-1	C979	음성	-
Hep3B	C951	음성	-
ACHN	C955	음성	-
AG-B1	61668	681	3
AG-B11	68618	391	3
AG-B10	68687	374	3
AG-UT5	71078	188	2
AG-L16	62092	105	3
AG-Br29	71838	76	2
AG-OV35	67431	45	3
AG-Panc3	62103	12	3
AG-C16	66746	7	1
AG-C6	61674	6	1
AG-K24	65766	0.4	-
AG-Mel10	70845	0	-

MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	-
MDA-MB-231	58480	0	-
AG-Mel15	57775	0	-
AG-K31	600-B681	0	-

표 9

확장 패널로부터의 M22-244b3.1.1.1 염색 결과

이종이식	마우스 번호	넥틴-4 mRNA (qPCR)	1차 항체	농도 (μ m/mL)	염색 결 과
AG-B1	61668	681	M22-321b41.1	2.5	3+
AG-B11	68618	391	M22-321b41.1	2.5	3+
AG-Br 29	71838	76	M22-321b41.1	2.5	2+
AG-OV35	67431	45	M22-321b41.1	2.5	3+
AG-Panc3	62103	12	M22-321b41.1	2.5	3+
AG-C6	61674	6	M22-321b41.1	2.5	+
AG-K24	65766	0.4	M22-321b41.1	2.5	-
AG-Mel10	70845	0	M22-321b41.1	2.5	-
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	M22-321b41.1	2.5	-
AG-B1	61668	681	M22-321b41.1	5.0	3+
AG-B11	68618	391	M22-321b41.1	5.0	3+
AG-Br 29	71838	76	M22-321b41.1	5.0	2+
AG-OV35	67431	45	M22-321b41.1	5.0	3+
AG-Panc3	62103	12	M22-321b41.1	5.0	3+
AG-C6	61674	6	M22-321b41.1	5.0	+
AG-K24	65766	0.4	M22-321b41.1	5.0	-
AG-Mel10	70845	0	M22-321b41.1	5.0	-
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	M22-321b41.1	5.0	+
AG-B1	61668	681	M22-321b41.1	7.5	3+
AG-B11	68618	391	M22-321b41.1	7.5	3+
AG-Br 29	71838	76	M22-321b41.1	7.5	2+
AG-OV35	67431	45	M22-321b41.1	7.5	3+
AG-Panc3	62103	12	M22-321b41.1	7.5	3+
AG-C6	61674	6	M22-321b41.1	7.5	+
AG-K24	65766	0.4	M22-321b41.1	7.5	+
AG-Mel10	70845	0	M22-321b41.1	7.5	-
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	M22-321b41.1	7.5	+
Rat1 (E) Neo	C974	음성	M22-321b41.1	2.5	-
Rat1 (E) 넥틴1	C975	음성	M22-321b41.1	2.5	-
Rat1 (E) 넥틴2	C976	음성	M22-321b41.1	2.5	-
Rat1 (E) 넥틴3	C977	음성	M22-321b41.1	2.5	-
Rat1 (E) 넥틴4	C978	음성	M22-321b41.1	2.5	3+
T47D	C1035	음성	M22-321b41.1	2.5	3+
MDA-MB-231	C1033	음성	M22-321b41.1	2.5	-
JMSU-1	C979	음성	M22-321b41.1	2.5	-
Hep3B	C951	음성	M22-321b41.1	2.5	-
ACHN	C955	음성	M22-321b41.1	2.5	-
AG-B1	61668	681	M22-321b41.1	2.5	3+
AG-B11	68618	391	M22-321b41.1	2.5	3+
AG-B10	68687	374	M22-321b41.1	2.5	3+
AG-UT5	71078	188	M22-321b41.1	2.5	2+
AG-L16	62092	105	M22-321b41.1	2.5	3+
AG-Br 29	71838	76	M22-321b41.1	2.5	2+
AG-OV35	67431	45	M22-321b41.1	2.5	3+
AG-Panc3	62103	12	M22-321b41.1	2.5	3+
AG-C16	66746	7	M22-321b41.1	2.5	+
AG-C6	61674	6	M22-321b41.1	2.5	+

AG-K24	65766	0.4	M22-321b41.1	2.5	-
AG-Me110	70845	0	M22-321b41.1	2.5	-
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	M22-321b41.1	2.5	-
MDA-MB-231	58480	0	M22-321b41.1	2.5	-
AG-Me15	57775	0	M22-321b41.1	2.5	-
AG-K31	600-B681	0	M22-321b41.1	2.5	-
CALU-1	72902	0	M22-321b41.1	2.5	-
UG-K3	74323	0	M22-321b41.1	2.5	-

[0668]

전술된 바와 같이 발생되고 스크리닝된 항-넥틴-4 항체는, IHC 분석에서 다른 상업용 항-넥틴-4 항체와 더욱 비교된다. 예를 들어, 토끼 다클론 항-넥틴-4 항체인, Novus Biologicals (카탈로그 번호 NBP1-82829)로부터 넥틴-4/PVRL4 항체 ("Novus PVRL4 항체"라고도 함)는, 얻어지고, 다양한 이종이식 조직에서 IHC 분석으로 넥틴-4를 특이적으로 염색시키는 이의 능력에 대해 시험되며, 여기서 넥틴-4 mRNA 수준은 qPCR에 의해 결정된다. Novus PVRL4 항체가 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 및 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 적정되는 실험에서, Novus PVRL4 항체는, M22-244b3.1.1.1.1 항체에 의해 생성된 것보다 약한 특이적 넥틴-4 염색을 생성하고, 표 10에 나타난 바와 같이, 넥틴-4 mRNA 발현이 없는 MDA-MB-231 xeno의 모든 농도에서 비-특이적 염색을 생성한다. 따라서, Novus PVRL4 항체는 넥틴-4에 대해 비-특이적이다.

표 10

[0669]

다른 농도에서 Novus PVRL4 항체의 염색 결과

조직	마우스#	RNA	IHC 결과
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서도 산재된 양성 세포.
AG-B10 P8	64069	286	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 패치 중간-강함. 더 낮은 농도에서 약함
AG-Me110 P5	72088	0	1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 약한 세포질 배경으로 중양 음성
AG-OV20 P7	72260	67	중간의 양성 세포의 작은 병소로 전체적으로 약한 세포질
AG-C18 P9	67921	3	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 패치 약함 내지 음성.
AG-C16 P4	68679	50	약함-중간, 패치, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 정점

[0670]

Novus PVRL4 항체는, 넥틴-4 mRNA 수준이 qPCR에 의해 결정되는 조직의 범위가 더 넓은 패널에 대하여 IHC 분석에서 더욱 시험된다. 배경 세포질 염색은, 표 11에 나타난 바와 같이, 넥틴-4 mRNA 수준에 관계 없이, 시험된 대부분의 이종이식에서 관찰된다.

표 11

[0671]

이종이식 조직의 범위가 더 넓은 패널에서 Novus PVRL4 항체의 염색 결과

조직	마우스#	RNA	Novus PVRL4 (NBP1-82829) 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
AG-B10 P8	64069	286	강한 패치 막
AG-Me110 P5	72088	0	음성 내지 약한 배경
AG-OV20 P7	72260	67	탁한 세포질
AG-Br8 P3	59161	41	중양의 절반에 중간-강한 막
AG-K24 P3	64812	1	음성 내지 약한 배경
MDA-MB-231-MFP-XCL	58624	0	약한-중간 배경
AG-K9 P17	52376	0.1	약한-양성 배경
AG-OV23 P3	55635	2	중간 패치 막/세포질
AG-C18 P9	67921	3	약한-중간 양성, 패치
AG-C16 P4	68679	50	패치 중간
AG-Br12 P2	62109	1024	전체적으로 강한 막

[0672]

Novus PVRL4 항체가 잠재적 로트 간 변동성 (lot-to-lot variability)을 갖는 소모성 토끼 다클론 항체이므로, ThermoFischer Scientific으로부터 다른 토끼 다클론 항-넥틴-4 항체인, PA5-30837 ("Thermo PVRL4 항체")는 얻고, 시험되며, 및 3개의 다른 이종이식 조직에서 IHC 분석으로 비교되며, 여기서 넥틴-4 mRNA 수준은 qPCR에

의해 결정된다. 시험된 3개의 이중이식 조직은, 478에서 넥틴-4 mRNA 수준을 갖는 AG-B1(+) PS26, 78에서 넥틴-4 mRNA 수준을 갖는 AG-OV35P3, 및 넥틴-4 mRNA를 발현하지 않는 AG-Me15 P17을 포함한다. Thermo PVRL4 항체는, AG-B1에서 약한/중간 IHC 염색 및 AG-OV35에서 음성 IHC 염색을 생성한다.

[0673] 따라서, Novus PVRL4 항체 또는 Thermo PVRL4 항체 어느것도 여기에서 발생되고 스크리닝된 M22-244b3.1.1.1.1 또는 M22-321b41.1 항체 만큼 IHC 분석에서 넥틴-4에 특이적이지 않았다.

[0674] R&D Systems으로부터, 2개의 다른 상용 항체 (단일클론 마우스 항-넥틴-4 항체 MAB2659 및 염소 다클론 항-넥틴-4 항체 AF2659) 모두를 얻고, 3개의 다른 이중이식 조직에서 IHC 분석으로 시험되며, 여기서 넥틴-4 mRNA 수준은 qPCR에 의해 결정된다. 시험된 3개의 이중이식 조직은, 478에서 넥틴-4 mRNA 수준을 갖는 AG-B1(+) PS26, 78에서 넥틴-4 mRNA 수준을 갖는 AG-OV35P3, 및 넥틴-4 mRNA가 없는 AG-Me15 P17을 포함한다. 1 μ g/ml 또는 5 μ g/ml에서 사용된 경우, MAB2659 항체는, AG-B1 및 AG-OV35에서 종양의 주변부에서의 염색과 같은 탁한 점상액/세포질을 생성한다. 염소 다클론 항-넥틴-4 항체 AF2659는, AG-B1 및 AG-OV35에서 5 μ g/ml로 배경 기조직 염색 (stromal staining)으로 강한 막 염색을 생성했지만, 1 μ g/ml에서 약 염색을 생성한다. 따라서, AF2659 항체는 다른 조직에서 2.5 μ g/ml로 더욱 평가된다. 그러나, AF2659 항체는, 넥틴-4 mRNA를 발현하지 않는 MDA-MB-231 이중이식에서 배경 염색을 생성한다. 따라서, MAB2659 항체 및 AF2659 항체 어느것도 여기에서 발생되고 스크리닝된 M22-321b41.1 항체만큼 특이적이지 않다.

[0675] 실시예 6: 기능적 분석: 1차 조직의 면역조직화학 염색

[0676] 항체, 예를 들어, 여기에서의 실시 예에 기재된 바와 같이, 발생되고, 스크리닝되며, 발현되고, 정제된 항체, 예를 들어, 항-넥틴-4 M22-321b41.1은, IHC 분석에서 넥틴-4를 발현하는 1차 인간 조직을 특이적으로 염색하는 이들의 능력에 대해 더욱 평가된다.

[0677] IHC 분석은, 예를 들어, 간접 IHC 기술을 사용하여 수행된다. 간접 IHC 방법은, 조직 항원의 검출을 위해 2개의 항체를 활용했다. 먼저, 비접합된 1차 항체는, 조직 항원과 반응하는, 조직에 적용된다 (제1층). 다음으로, 1차 항체가 형성된 동물 종의 IgG에 대해 향하는, 효소-표지된 2차 항체는, 적용된다 (제2층). 2차 항체는, 1차 항체와 반응한 후, 기질-크로모젠 적용이 뒤따른다. 제2-층 항체는, 효소 퍼옥시다제로 표지되고, 이는 크로모젠 3,3'-디아미노벤지딘 (DAB)과 반응하여, 반응 부위에서 갈색 침전물을 생성한다. 이러한 방법은, 1차 항체의 다른 항원 부위와 수차례 2차 항체 반응을 통한 잠재적인 신호 증폭으로 인해 민감하고 다목적이다.

[0678] 시험의 민감도를 더욱 증가시키기 위한 예로서, 표지된 사슬 중합체-접합된 2차 항체는 사용된다. 중합체 기술은, 최대 10분자의 2차 항체가 부착된 텍스트란의 HRP 효소-표지된 불활성 "스핀" 분자를 활용하여, 시스템을 더욱 민감하게 만든다.

[0679] 표본은 그 다음 대비 염색제로 염색되어 세포 및 아세포 요소를 확인한다.

[0680] 6.A. 염색 절차

[0681] IHC 분석은, 다음의 대표적인 프로토콜에 따라 수행된다. 간단히 말하면, 조직 샘플은 파라핀 왁스 내로 고정, 가공 및 내장되고, 조직 절편으로서 준비된다. 슬라이드는 그 다음 1-2시간 동안 60 \pm 5 $^{\circ}$ C의 오븐에서 배양되고, 오븐에서 꺼내어, 진행하기 전에 실온 (RT)으로 냉각된다. 조직 샘플의 일상적인 탈파라핀화 및 재-수화 후, 포르말린 고정 후 발생한 단백질 가교를 역전시키기 위해 항원 복구는 수행된다. 항원 복구는, 단백질 분해효소 용액에서 조직의 단백질 가수분해 소화를 통해, 또는 보통 HIER 절차로 지칭되는, 수성 매질에서 조직 절편에 열을 가하여 달성된다. 이러한 분석을 위해, 100 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 Leica 자동화 플랫폼 상에서 에피토프 복구 2 (ER2, pH 8.9-9.1의 EDTA-기반 완충제)는 사용된다.

[0682] 특별한 언급이 없는 한, 염색은, RT에서 Leica Bond Autostainers를 사용하여 Bond 기구에서 실행되도록 프로그램된다. 간단히 말하면, 다음 단계들은 염색 프로토콜로서 Leica Bond 자동염색기 (autostainers) 상으로 프로그래밍된다: (1) 에피토프 복구 2 절차 (ER2): 100 $^{\circ}$ C에서 20 분 (Bond Epitope Retrieval Solution 2 (Leica), Part #AR9640); (2) 3 \times Bond 세척: 0분 (Bond Wash Solution (Leica), Part #AR9590); (3) 마커: 15 분 (Bond Primary Antibody Diluent (Leica), Part #AR9352에서 단일클론 마우스 항-넥틴-4 항체 M22-321b41.1 또는 음성 대조군 마우스 IgG2a (BD Biosciences) Part #550339로 염색); (4) 3 \times Bond 세척: 0분 (Bond Wash Solution (Leica), Part #AR9590); (5) 1차 후: 8분 (토끼 항 마우스 IgG2a); (6) 3 \times Bond 세척: 2분 (Bond Wash Solution (Leica), Part #AR9590); (7) 중합체: 8분 (Bond Polymer Refine Detection (Leica)로부터의 항-토끼 폴리-HRP-IgG, Part #DS9800); (8) 2 \times Bond 세척: 0분, 2분; (9) 1 \times 탈이온수: 0분; (10) 퍼옥사이드 블록 (Peroxide Block): 5분 (3-4% 과산화수소) 및 3 \times Bond 세척: 0분; (11) 2 \times 탈이온수: 0분; (12) 혼합 DAB

정제: 0분 (66 mM 3,3-디아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드 및 $\leq 0.1\%$ 과산화수소 (Bond Polymer Refine Detection (Leica), Part #DS9800)); (13) 혼합 DAB 정제: 10분 (66 mM 3,3-디아미노벤지딘 테트라하이드로클로라이드 및 $\leq 0.1\%$ 과산화수소 (Bond Polymer Refine Detection (Leica), Part #DS9800)); (14) 3×탈이온수: 0분; (15) 헤마톡실린 (Hematoxylin): 15분 (Bond Polymer Refine Detection (Leica)로부터의 $<0.1\%$ 헤마톡실린, Part #DS9800); (16) 1×탈이온수: 0분; (17) 1×Bond 세척: 0분; (18) 1×탈이온수: 0분. 절차에 나타난 바와 같이, BD Biosciences로부터의 음성 시약 대조군 마우스 IgG2a는, 비-특이적 (배경) 염색의 존재를 평가하기 위해 시험된 각 표본에 대해 사용된다. 배경 염색의 존재는 또한 특정 분석 실행의 승인/거부에 대한 기준이다.

[0683] 6.B 조직 샘플

[0684] 양성 및 음성 대조군 표본은 활용되어 IHC 분석의 모든 단계를 검증하고 제어 한다. 이러한 분석을 위해, 가변 수준의 넥틴-4 발현을 갖는 마우스 인간 종양 이종이식편은 대조군으로 사용된다.

[0685] 포르말린-고정, 파라핀-포매 인간 조직 표본은, 기관 검토 위원회 승인 공급원, 예를 들어, 정부 보관소 (예를 들어, Cooperative Human Tissue Network), 학술 협력 (예를 들어, UCLA, UC Irvine), 및 예를 들어, 인간 정상 요로 및 전이 세포 암종 (BL802) 및 정상 (FDA999) 조직 마이크로어레이 (TMA), Biomax USA를 포함하는, 상업적 공급원으로부터 수술 또는 부검의 잔류 물질로서 얻어진다. 조직 샘플은, 실시예 6.A에 기재된 프로토콜을 사용하여 넥틴-4 발현에 대해 시험된다. 넥틴-4 발현에 대한 하나의 음성 (X14-126), 하나의 약한 양성 (X14-33), 하나의 중간 양성 (X14-139) 및 하나의 강한 양성 (X14-43)을 포함하는 4개의 마우스 인간 종양 이종이식은 또한 시험된다.

[0686] 6.C 항-넥틴-4 항체의 염색 농도의 적정

[0687] 최적의 1차 항체 역가는, 예를 들어, 실시예 4 및 5 에 기재된 프로토콜을 사용하여, 이종이식 조직 절편에 대한 적정분석을 수행하여 결정된다. IHC 분석을 위한 최적의 항체 농도를 결정하기 위해, 파라핀-포매 표본에 대한 적정 분석은 수행된다. 적정 분석을 수행하기 위해, 실시예 5에서 결정된 바와 같은 최적 농도 ($2.5\mu\text{g}/\text{ml}$)를 일괄하여 다루는 2-배 연속 희석물은 준비되고, 이들의 일치된 음성 대조군 조직 절편으로 시험된다.

[0688] 항-넥틴-4 항체 M22-321b41.1 및 이의 상응하는 음성 대조군 항체는, 실시예 4 및 5에 기재된 바와 같이, 파라핀-포매 표본에 대한 적절한 IHC 프로토콜에 따라 조직 절편에 적용된다. 결과는 광 현미경 (light microscopy)을 사용하여 연구 병리학자에 의해 평가되고 비교된다. 연구 병리학자들은, 현저한 배경 염색 없이 가장 높은 염색 강도를 산출하는 최저 역가 (항체의 최저 농도)로서 최적의 역가 (최적의 항체 농도)를 결정한다. 본 실시예에서, 표 12에 나타난 바와 같이, $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 항체 농도는 선택되어 나중에 IHC 분석에 사용된다.

표 12

[0689] 항-넥틴-4 M22-321b41.1의 최적 항체 농도의 결정

표본 #	실행 ID	항체 농도 $\mu\text{g}/\text{ml}$	배경	%양성	목표 염색 강도	기조직 염색	서브	형태	설명
X14-126	OVE7	3.75	0	0	NA	0	NA	A	주목된 양성 조직의 작은 단편, 오염 물질일 가능성이 있음
X14-126	OVE8	2.5	0	0	NA	0	NA	A	상동
X14-126	OVE9	1.25	0	0	NA	0	NA	A	상동
X14-33	OVDZ	3.75	0	25	1-3+	0	M,C,Ap	A	
X14-33	OVE0	2.5	0	25	1-3+	0	M,C,Ap	A	
X14-33	OVE1	1.25	0	25	1-3+	0	M,C,Ap	A	
X14-139	OVD5	3.75	0	90	1-3+	0	M,C,Ap	A	
X14-139	OVDT	2.5	0	90	1-3+	0	M,C,Ap	A	
X14-139	OVDU	1.25	0	80	1-3+	0	M,C,Ap	A	
X14-43	OVDK	3.75	0	100	3++	1-3+	M,C	A	산재된 IC+
X14-43	OVDL	2.5	0	100	3++	1-2+	M,C	A	
X14-43	OVDM	1.25	0	100	3+	1-2+	M,C	A	2+F

[0690] 6.D. 넥틴-4 IHC 염색의 평가

[0691] IHC 염색의 평가는, 면허가 있는 병리학자에 의해 수행된다. 염색 강도는 평가되고, 0 (음성), 1+ (약), 2+ (중간), 및 3+ (강)으로 보고된다. 각각의 강도 수준 또는 전반적인 양성으로 염색된 세포에서 세포 염색의 대략적인 퍼센트는 평가되고 0 내지 100%로 보고된다.

[0692] 조직간 염색을 비교하기 위해, 넥틴-4 염색 평가의 다양한 파라미터는, 직접 비교되거나 또는 넥틴-4 염색의 결과는 더욱 가공되는데, 예를 들어, 염색 강도 및 특정한 범위의 강도에서 염색된 세포의 퍼센트 모두를 고려한 H-스코어로 계산된다. 예를 들어, 염색 강도 (0-3)와 주어진 염색 강도에서 염색된 세포의 퍼센트 (0-100)의 곱을 합하여 H-스코어는 계산된다. 예를 들어: 10%의 세포 염색 3+, 30%의 세포 염색 2+, 20%의 세포 염색 1+, 및 10%의 염색되지 않은 세포를 갖는 표본은, $(3 \times 10) + (2 \times 30) + (1 \times 20) + (0 \times 40) = 110$ 의 H-스코어를 가질 것이다.

[0693] 변동 계수 (CV)는, H-스코어에서 실행-내 변화 또는 정확도를 평가하는데 사용된다. 3개의 양성 이중이식 표본을 활용하여, 5개의 개별 실행으로부터 분석 수행의 실행-내 정확도는 결정된다. 정성적으로, 실행-내 정확도는, 3개의 개별 실행으로 시험된 각 조직의 일반적으로 일관된 염색 패턴에 의해 허용가능한 것으로 고려된다. CV는 다음과 같이 계산된다:

[0694] $CV = \text{표준 편차} / \text{평균} \times 100$

[0695] 예를 들어, 35% 이하의 CV는, 허용가능한 것으로 고려된다.

[0696] 실행 중 정밀 평가에 대해 표 13에 나타낸 바와 같이, 염색 강도의 패턴 (3+, 2+, 1+의 조합)은, 5회 반복에 걸쳐 각 조직에 대해 일치한다. 더군다나, 모든 조직에 대한 CVs는, 35% 미만이며, 이는 대표적인 허용가능한 범위 내이다. 따라서, M22-321b41.1은, 넥틴-4 IHC 분석에서 넥틴-4를 검출하기 위한 정확성을 제공한다.

표 13

[0697] IHC 분석에서 항-넥틴-4 M22-321b41.1의 실행-중 정확성

일반 표본 정보					특색 있는 세포의 아티클(ARTICLE) 염색의 시험									기타 설명
퀘스트 수탁 #	슬라이드 ID	염색일/기구	조직 (진단)	아이 소타입 대조군	각 강도에서 세포 염색의 % 및 세포 내 위치							H-스코어	% 넥틴-4	
					3+ %	3+서브	2+%	2+서브	1+ %	1+서브	0%			
조직														
X14-43	OVH4	14.06.30. Bond III	이중 이식	0	95	M,C	5	M,C	0	NA	0	295	100	괴사 조직 제외
X14-43	OVH5	14.06.30. Bond III	이중 이식	0	95	M,C	5	M,C	0	NA	0	295	100	
X14-43	OVH6	14.06.30. Bond III	이중 이식	0	98	M,C	2	M,C	0	NA	0	298	100	
X14-43	OVH7	14.06.30. Bond III	이중 이식	0	98	M,C	2	M,C	0	NA	0	298	100	
X14-43	OVH8	14.06.30. Bond III	이중 이식	0	98	M,C	2	M,C	0	NA	0	298	100	
			평균									296.8	100.0	
			STDEV									1.6	0.0	
			CV									0.6	0.0	
X14-139	OVHB	14.06.30. Bond III	이중 이식	0	40	M,C	45	M,C	10	M,C	5	220	95	
X14-139	OVHC	14.06.30. Bond III	이중 이식	0	40	M,C	40	M,C	15	M,C	5	215	95	
X14-139	OVHD	14.06.30. Bond III	이중 이식	0	40	M,C	35	M,C	20	M,C	5	210	95	
X14-139	OVHE	14.06.30. Bond III	이중 이식	0	45	M,C	40	M,C	10	M,C	5	225	95	
X14-139	OVHF	14.06.30. Bond III	이중 이식	0	45	M,C	40	M,C	10	M,C	5	225	95	
			평균									219.0	95.0	
			STDEV									6.5	0.0	
			CV									3.0	0.0	
일반 표본 정보					특색 있는 세포의 아티클 염색의 시험									기타

케스 트 수 탁 #	슬라 이드 ID	염색일/기 구	조직 (진단)	아이 소타입 대조군	각 강도에서 세포 염색의 % 및 세포 내 위치							H-스 코어	% 넥틴-4	설명
					3+ %	3+서 브	2+%	2+서 브	1+ %	1+서 브	0%			
조직														
X14-3 3	OVHI	14.06.30. Bond III	이종 이식	0	10	M,C	15	M,C	5	M,C	70	65	30	
X14-3 3	OVHJ	14.06.30. Bond III	이종 이식	0	10	M,C	10	M,C	10	M,C	70	60	30	
X14-3 3	OVHK	14.06.30. Bond III	이종 이식	0	10	M,C	10	M,C	5	M,C	75	55	25	
X14-3 3	OVHL	14.06.30. Bond III	이종 이식	0	8	M,C	12	M,C	5	M,C	75	53	25	
X14-3 3	OVHM	14.06.30. Bond III	이종 이식	0	5	M,C	15	M,C	5	M,C	75	50	25	
			평균									56.6	27.0	
			STDEV									5.9	2.7	
			CV								10.5	10.1		
일반 설명/주석:				± = 모호한 결과										
				NA = 해당사항 없음				Ca = 암종						
				NS = 보이지 않음										
				c/w = 일관됨										

[0698] 분석 성능의 실행-간 재현성은, 정밀 분석과 동일한 이종이식 표본을 활용하여, 5개의 개별 실행으로 결정된다. 정성적으로, 실행-간 정확도는, 5개의 개별 실행에서 시험된 각 조직의 일반적으로 일관된 염색 패턴에 의해 허용가능한 것으로 고려된다. 실행-간 재현성에 대해 표 14에 나타난 바와 같이, 염색 강도의 패턴 (3+, 2+, 1+의 조합)은, 3회 반복에 걸쳐 각 조직에 대해 일관된다. 더군다나, 모든 조직에 대한 CVs는, 대표적인 허용가능한 범위 내인, 35% 미만이다. 따라서, M22-321b41.1은, 넥틴-4 IHC 분석에서 넥틴-4를 검출하기 위한 재현성을 제공한다.

표 14

[0699] IHC 분석에서 항-넥틴-4 M22-321b41.1의 실행-간 재현성

일반 표본 정보						특색 있는 세포의 아티클 염색의 시험										
케스트 수탁 #	재현성 #	실행일 및 플랫폼	슬라이드 ID	조직 (진단)	아이 소타입 대조군	각 강도에서 세포 염색의 % 및 세포 내 위치							H-스 코어	% 넥틴-4	설명	
						3+ %	3+서브	2+%	2+서브	1+ %	1+서브	0%				
조직																
X14-4 3	#1	14.06.26. Bond III	OVDL	이종 이식	0	100	M,C	0	NA	0	NA	0	300	100		
X14-4 3	#2	14.06.30. Bond III	OVH4	이종 이식	0	95	M,C	5	M,C	0	NA	0	295	100		
X14-4 3	#3	14.06.30. Bond Max	OVHQ	이종 이식	0	95	M,C	5	M,C	0	NA	0	295	100		
X14-4 3	#4	14.07.01. Bond Max	OVJS	이종 이식	0	100	M,C	0	NA	0	NA	0	300	100		
X14-4 3	#5	14.07.01. Bond III	OVJQ	이종 이식	0	98	M,C	2	M,C	0	NA	0	298	100		
				평균									297.6	100.0		
				STDEV									2.5	0.0		
				CV									0.8	0.0		
X14-1 39	#1	14.06.26. Bond III	OVDL	이종 이식	0	40	M,C	40	M,C	15	M,C	5	215	95	주목된 정점형 염색	

X14-1 39	#2	14.06.3 0. Bond III	OVHB	이중 이식	0	40	M,C	45	M,C	10	M,C	5	220	95	
X14-1 39	#3	14.06.3 0. Bond Max	OVHT	이중 이식	0	45	M,C	40	M,C	10	M,C	5	225	95	
X14-1 39	#4	14.07.0 1. Bond Max	OVJX	이중 이식	0	45	M,C	45	M,C	10	M,C	0	235	100	
X14-1 39	#5	14.07.0 1. Bond III	OVJV	이중 이식	0	45	M,C	40	M,C	15	M,C	0	230	100	
				평균									225.0	97.0	
				STDEV									7.9	2.7	
				CV									3.5	2.8	
X14-3 3	#1	14.06.2 6. Bond III	OVED	이중 이식	0	8	M,C	12	M,C	10	C	70	58	30	주목된 정점형 염색
X14-3 3	#2	14.06.3 0. Bond III	OVHI	이중 이식	0	10	M,C	15	M,C	5	M,C	70	65	30	
X14-3 3	#3	14.06.3 0. Bond Max	OVHW	이중 이식	0	8	M,C	12	M,C	5	M,C	75	53	25	
X14-3 3	#4	14.07.0 1. Bond Max	OVK3	이중 이식	0	8	M,C	10	M,C	7	C	75	51	25	
X14-3 3	#5	14.07.0 1. Bond III	OVK0	이중 이식	0	8	M,C	12	M,C	5	C	75	53	25	
				평균									56.0	27.0	
				STDEV									5.7	2.7	
				CV									10.1	10.1	
일반 설명/주석:					± = 모호한 결과			Ap = 정점형 염색			H = 이중 염색			SCC* = 편평 세포 압중	
					NA = 해당사항 없음			B = 기저층 염색			I = 염증 세포			L1 = 링크 1	
					NS = 보이지 않음			C = 세포질 염색			Ca = 압중			L2 = 링크 2	
					c/w = 일관됨			F = 병소 양성			M = 막 염색			N = 핵 염색	

[0700] 6.A 내지 6.D에서 제공된 파라미터 및 결과는 하기 표 15에 요약된다.

표 15

[0701] 대표적인 파라미터, 결과, 및 이들의 범위.

성능 사양	방법 및 결과
분석 정확도: 대표적인 실행-내 CVs	0.6%, 0.3%, 10.5%
분석 재현성: 대표적인 실행-사이 CVs	0.8%, 3.5%, 10.1%
조직에 염색	0 = 없음, 1 = 약함, 2 = 중간, 및 3 = 강한 염색
파라미터, 결과, 및 이들의 범위	H-스코어 (0-300); 0-3+, % 염색된 세포

[0702] 6.E 넥틴-4 IHC 염색의 민감도 및 특이성.

[0703] 넥틴-4 IHC 분석은, 예를 들어, 넥틴-4 항원을 발현하는 조직을 양성으로 염색한 경우, 민감한 것으로

고려된다. 예를 들어, 다양한 조직 타입에 대하여 차동 염색 (differential staining)이 관찰되고, 넥틴-4 IHC 염색이 염색된 조직에서 넥틴-4 항원의 알려진 발현과 상관되는 경우, 넥틴-4 IHC 분석은 특이적인 것으로 고려된다. 특이성 및 민감도의 평가가 상호 배타적이지 않기 때문에, 분석은 종종 민감도 및 특이성 모두에 대한 정보를 제공한다.

[0704]

M22-321b41.1으로 넥틴-4 IHC 분석의 민감도 및 특이성은, 방광 암종의 60개의 고유한 코어 (unique cores) 및 20개의 정상적인 요로 조직의 TMA, 4개의 마우스 인간 종양 이종이식, 및 방광, 폐 및 유방을 포함한 다양한 암종의 13개의 인간 전체 조직 절편 (WTS)으로 결정된다. IHC 분석에서 넥틴-4 염색에 대한 M22-321b41.1 항체의 민감성 및 특이성의 요약은, 하기 표 16 및 표 17에 열거되어 있다. 이들 및 몇몇 다른 대표적인 분석에서, 조직 샘플은, 이들의 H-스코어 결과에 의해 4개의 카테고리 중 하나로 분류된다: 고 (201-300), 중간 (101-200), 저 (1-100), 음성 (0).

표 16

[0705]

조직 염색 민감도의 요약

민감도 조직 염색 요약		
H-스코어 단계	위치	신생물 조직*
		전체 조직 암종
고 (201 - 300)	M,C	방광: 6/8, 유방: 1/4, 폐: 2/4, 이종이식: 2/4
중간 (101 - 200)	M,C	방광: 1/8, 유방: 2/4, 결장: 2/3, 난소: 1/1,
저 (1-100)	NA	방광: 1/8, 폐: 1/4, 결장: 1/3. 이종이식: 1/4; 유방: 1/4
음성 (≤ 0)	NA	폐: 1/4, 결장: 1/3, 이종이식: 1/4

표 17

[0706]

조직 염색 특이성의 요약

특정성 조직 염색 요약		
H-스코어 단계	위치	정상 조직*
		식도: 1/3, 자궁 경부: 1/3, 피부: 2/3
고 (201-300)	M,C	유방 1/3, 자궁 경부 1/3, 후두 1/3
중간 (101-200)	M,C	자궁 경부 1/3, 유방 2/3, 골수 1/3, 폐 1/3, 침샘 3/3, 신장 1/3, 전립선 2/3, 자궁내막 2/3, 후두 1/3
저 (1-100)	M,C	골수 2/3, 폐 2/3, 식도 1/3, 신장 2/3, 전립선 1/3, 자궁내막 1/3, 피부 1/3, 후두 1/3
음성	NA	다음은 모든 복제물에서 음성이다: 뇌 (N), 소뇌 (N), 부신 (N), 난소, 이자, 부갑상선, 뇌하수체, 고환, 갑상선, 비장, 편도선, 흉선, 심장 근육, 위, 소장, 결장, 간, 골격근, 말초 신경, 중배엽, 및 눈

[0707]

M22-321b41.1의 특이성 및 민감도를 평가하기 위한 몇몇 대표적인 분석에서, 각각 2.5 µg/ml에서, 넥틴-4 특이적인 것으로 알려진 X 항체, 또는 항-넥틴-4 항체 M22-321b41.1을 이용한 염색으로부터, 13 WTS 암종에 대한 H-스코어는, 비교된다. 하기 표 18에 나타낸 비교는, M22-321b41.1에 의한 IHC 염색이 대다수의 경우에 X 항체 염색에 의해 나타난 것으로 알려진 넥틴-4 발현과 일치함을 나타낸다.

표 18

[0708]

M22-321b41.1 IHC 염색과 X 항체 IHC 염색 사이에 상관관계

M22-321b41.1와 X 항체 사이에 상관관계			
M22-321b41.1			X 항체
샘플 번호	수탁 번호	H-스코어 2.5µg/ml	H-스코어 2.5µg/ml
1	H882	300	280
2	H704	290	275
3	H716	230	200
4	H785	257	275
5	H878	180	100

6	H695	170	180
7	H734	140	135
8	H700	40	38
9	H737	45	120
10	H788	56	55
11	H838	90	125
12	H739	0	0
13	H774	0	0
14	X14-43	High	300
15	X14-139	High	215
16	X14-33	Low	58
17	X14-126	음성	0

[0709] 표 18의 결과는 양성 및 음성 넥틴-4 염색으로 재-분류되어 X 항체와 항-넥틴-4 항체 M22-321b41.1 사이에 염색 양성인 상관관계를 결정한다. 조직은, H-스코어가 ≥ 150 을 나타내면, 양성인 것으로 고려된다. 하기 표 19의 전반적인 결과는, 양성으로 염색된 조직에 대한 X 항체와 항-넥틴-4 항체 M22-321b41.1 사이에 89%의 일치율, 음성으로 염색된 조직에 대해 100%의 일치율, 및 94%의 전체 일치율을 나타냈다. 따라서, M22-321b41.1으로 넥틴-4 IHC 염색과 조직에서 넥틴-4의 발현 사이에는 높은 상관관계가 존재한다. 따라서, M22-321b41.1으로 넥틴-4 IHC 분석은 민감하고 특이적이다.

표 19

[0710] 임계 값이 H-스코어 ≥ 150 인 경우, 넥틴-4 X 항체 대 M22-321b41.1

		M22-321b41.1		
X 항체		양성	음성	합계
	양성	8	0	8
	음성	1	8	9
	합계	9	8	17

[0711] M22-321b41.1의 특이성 및 민감도는, 방광 암종의 60개의 고유한 코어 및 20개의 정상 요로 조직의 TMA, 4개의 마우스 인간 종양 이종이식, 및 방광, 폐 및 유방암을 포함한 다양한 암종의 13개의 인간 전체 조직 절편 (WTS)를 포함하는 더 큰 세트의 조직 샘플을 사용하여 더욱 결정된다. 총 94개의 경우는, X 항체로 IHC 분석에 의해 95%의 경우 (WTS에서 82% 및 TMA에서 98%)에서 넥틴-4의 전체 검출로 평가할 수 있다. M22-321b41.1으로 암종의 대표적인 IHC 염색은, 도 10 및 11에 나타낸다. 서브-세포 위치는, 대부분 막질 및 세포질이었고, 몇몇 점형 염색 (apical staining)은 막질로 고려된다. 표 20의 결과는, M22-321b41.1으로 종양 표본에서 양성 염색의 퍼센트가 X 항체로 IHC 분석에 의해 제공된 바와 같은 암종에서 넥틴-4의 알려진 발현과 일치하기 때문에, M22-321b41.1으로 넥틴-4 IHC 분석의 민감도 및 특이성을 더욱 입증한다. 따라서, M22-321b41.1으로 넥틴-4 IHC 분석은, 민감하고 특이적인 둘 모두이다.

표 20

다른 조직의 IHC 염색에서 항-넥틴-4 항체 M22-321b41.1 의 민감도.

표 20-파트 I.

일반 표본 정보						특색 있는 세포의 아티클 염색 시험							다른 세포 타입의 아티클 염색 시험							기타
라인 #	수탁 #	실험일/조직 타입	실험 ID	이소 타입 대조군	각 강도에서 세포 염색의 % 및 세포 내 위치							H-스코어	% 넥틴-4	정상	내피	평활근	섬유아세포	스트로마	염증 세포	설명
					3+ %	3+ 서브	2+ %	2+ 서브	1+ %	1+ 서브	0%									
대조군																				
1	X14-126	7/7/2014 이종이식	0VRV	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	NA	0	NS	0	0	NS	
2	X14-139	7/7/2014 이종이식	0VRY	0	30	M,C	45	M,C	20	M,C	5	200	95	NA	0	NS	0	0	NS	
조직																				
1	PTBL01172A	6/23/2014 방광암	0V6J	0	40	M,C	45	M,C	10	M,C	5	220	95	NS	0	0	0	0	2+F	
2	PTBL00626B	6/23/2014 방광암	0V6M	0	50	M,C	15	M,C	15	M,C	20	195	80	NS	0	2+	0	0	2+	
3	PTBL00696A	6/23/2014 방광암	0V6Q	0	30	M,C	55	M,C	10	M,C	5	210	95	NS	0	1+	0	0-1+	2+	
4	PTBL01177A	6/23/2014 방광암	0V6T	0	50	M,C	45	M,C	5	C	0	245	100	NS	0	0	0	0	3+	
5	PTBL01228A	6/23/2014 방광암	0V6W	0	80	M,C	10	M,C	0	NA	10	260	90	NS	0	3+	0	1+	3+	
6	PTBL01247A	6/23/2014 방광암	0V6Z	0	90	M,C	10	M,C	0	NA	0	290	100	NS	0	1+	0	1+	3+	
7	PTLQ01824	6/23/2014 폐 SCC*	0V72	0	70	M,C	20	M,C	10	C	0	260	100	NS	0	0	1+	2+	2+	
8	H882	7/7/2014 비노기 BL	0VS1	0	80	M,C	20	M,C	0	NA	0	280	100	3+	0	2+	0	0	2+F	
9	H704	7/7/2014 유방 (IDC)	0VS4	0	80	M,C	15	M,C	5	C	0	275	100	3+	0	NS	0	1-2+	3+	
10	H716	7/7/2014 유방 (IDC)	0VS7	0	50	M,C	20	M,C	10	C	20	200	80	2+	0	NS	0	0	2+	
11	H785	7/7/2014 폐 (SCC)	0VSA	0	80	M,C	15	M,C	5	C	0	275	100	2+	0	NS	0	1-2+	2+	

[0712]

12	H878	7/7/2014 비뇨기 BL	0VSD	0	20	M,C	15	M,C	10	C	55	100	45	NS	0	0	0	0	2+			
13	H695	7/7/2014 유방 (IDC)	0VSG	0	25	M,C	40	M,C	25	C	10	180	90	2+	0	NS	0	0	2+F			
14	H734	7/7/2014 결장	0VSJ	0	5	M,C	45	M,C	30	C	20	135	80	2+	0	0	0	0	0			
15	H700	7/7/2014 유방 (IDC)	0VSM	0	10	M,C	3	M,C	2	C	85	38	15	NS	0	0	0	0	0			
16	H737	7/7/2014 결장	0VSQ	0	10	M	40	M,C	10	C	40	120	60	0	0	0	0	0	2+F	M = 대부분		
17	H788	7/7/2014 폐	0VST	0	5	C	15	C	10	C	70	55	30	3+	0	0	0	0	3+			
18	H838	7/7/2014 난소	0VSW	0	10	M,C	35	M,C	25	M,C	30	125	70	NS	0	NS	0	0	3+			
19	H739	7/7/2014 결장	0VSZ	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	NS	0	0	0	0	0			
20	H774	7/7/2014 폐	0VT2	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	3+	0	NS	0	0	0			
21	X14-43	6/26/2014 이종이식	0VDL	0	100	M,C	0	NA	0	NA	0	300	100	NS	0	NS	0	0	NS			
22	X14-139	6/26/2014 이종이식	0VDT	0	40	M,C	40	M,C	15	M,C	5	215	95	NS	0	NS	0	0	NS			
23	X14-33	6/26/2014 이종이식	0VED	0	8	M,C	12	M,C	10	C	70	58	30	NS	0	NS	0	0	NS			
24	X14-126	6/26/2014 이종이식	0VE8	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	NS	0	NS	0	0	NS			
일반 설명/주석:			NA = 해당 사항 없음					NC = 음성 대조군					A = 정상					N = 정상				
			NS = 보이지 않음					F = 병소					C = 세포질 염색					PC = 혈장 세포				
			LL = 침습적/관내					N = 핵					IC = 염증 세포					TCC = 전이 세포 암종				
			Ca = 암종					NAT = 암 인접 정상 조직										SCC* = 편평 세포 암종				
			LCC = 거대 세포 암종					PSC Ca = 유두 액성 낭종암										IDC = 침윤성 관 암종				

[0713]

표 20-파트 II.

일반 표본 정보					특색 있는 세포의 아티클 염색 시험							다른 세포 타입의 아티클 염색 시험									
수탁 #	실험 ID	TMA 위치	방광/전단 등급	이소다 입 대조군	각 강도에서 세포 염색의 % 및 세포 내 위치							H- 스코어	% 넥틴 4	정상	내피	평활근	섬유아세포	스트로마	염증 세포	설명	
					3+ %	3+ 서브	2+ %	2+ 서브	1+ %	1+ 서브	0%										
조직																					
BL802	OVK8	A1	TCC G1	0	85	M,C	15	M,C	0	NA	0	285	100	NS	0	0	0	0	NS		
BL802	OVK8	A2	TCC G1-G2	0	25	M,C	50	M,C	15	M,C	10	190	90	NS	0	0	0	0	3+		
BL802	OVK8	A3	TCC G1	0	0	NA	5	M,C	10	M,C	85	20	15	NS	0	0	0	0	2+		
BL802	OVK8	A4	TCC G1-G2	0	15	M,C	40	M,C	35	M,C	10	160	90	NS	0	NS	0	1+	2+		
BL802	OVK8	A5	TCC G2	0	65	M,C	20	M,C	10	M,C	5	245	95	NS	0	0	0	0	NS		
BL802	OVK8	A6	TCC G2-G3	0	25	M,C	55	M,C	15	M,C	5	200	95	NS	0	0	0	1+	3+		
BL802	OVK8	A7	TCC G2	0	25	M,C	35	M,C	25	M,C	15	170	85	NS	0	NS	0	0	3+		
BL802	OVK8	A8	TCC G2	0	30	M,C	45	M,C	15	M,C	10	195	90	NS	0	NS	0	0	3+		
BL802	OVK8	A9	TCC G1	0	0	NA	5	M,C	15	M,C	80	25	20	NS	0	NS	0	0	NS		
BL802	OVK8	A10	TCC G2	0	80	M,C	10	M,C	10	M,C	0	270	100	NS	0	NS	0	0	3+		
BL802	OVK8	B1	TCC G2	0	95	M,C	5	M,C	0	NA	0	295	100	NS	0	NS	0	0	3+		
BL802	OVK8	B2	TCC G2	0	5	M,C	45	M,C	30	M,C	20	135	80	NS	0	NS	0	0	0		
BL802	OVK8	B3	TCC G2	0	60	M,C	20	M,C	10	M,C	10	230	90	NS	0	NS	0	3+F	3+		
BL802	OVK8	B4	TCC G2	0	30	M,C	45	M,C	15	M,C	10	195	90	NS	0	NS	0	2+	3+		
BL802	OVK8	B5	TCC G3	0	70	M,C	15	M,C	5	M,C	10	245	90	NS	0	NS	0	2+F	3+		

[0714]

BL802	OVK8	B6	TCC G2	0	20	M,C	50	M,C	20	M,C	10	180	90	NS	0	NS	0	2+	2+	
BL802	OVK8	B7	TCC G3	0	30	M,C	10	M,C	45	M,C	15	155	85	NS	0	0	0	2+	3+	
BL802	OVK8	B8	TCC G3	0	80	M,C	20	M,C	0	NA	0	280	100	NS	0	NS	0	0	NS	부분 코어
BL802	OVK8	B9	TCC G1	0	20	M,C	40	M,C	20	M,C	20	160	80	NS	0	0	0	0	NS	
BL802	OVK8	B10	TCC G2	0	20	M,C	30	M,C	20	M,C	30	140	70	NS	0	0	0	0	2+	
BL802	OVK8	C1	TCC G1	0	90	M,C	10	M,C	0	NA	0	290	100	NS	0	NS	0	2+	3+	
BL802	OVK8	C2	TCC G2	0	15	M,C	65	M,C	15	M,C	5	190	95	NS	0	NS	0	0	2+	
BL802	OVK8	C3	TCC (회박한) G1	0	60	M,C	20	M,C	10	M,C	10	230	90	NS	0	NS	0	2+,F	3+	
BL802	OVK8	C4	TCC G2-G3	0	40	C	10	C	0	NA	50	140	50	NS	0	NS	0	3+	3+	
BL802	OVK8	C5	TCC G3	0	30	M,C	20	M,C	20	M,C	30	150	70	NS	0	NS	0	2+	3+	
BL802	OVK8	C6	TCC G2	0	0	M,C	40	M,C	40	M,C	20	120	80	NS	0	NS	0	0	2+	
BL802	OVK8	C7	TCC G3	0	80	M,C	20	M,C	0	NA	0	280	100	NS	0	NS	0	2+,F	0	
BL802	OVK8	C8	TCC G3	0	2	M,C	2	M,C	0	NA	96	10	4	NS	0	0	0	0	3+	
BL802	OVK8	C9	TCC G3	0	65	M,C	20	M,C	15	C	0	250	100	NS	0	0	0	1+F	3+	
BL802	OVK8	C10	TCC G2	0	5	M,C	60	M,C	10	M,C	25	145	75	2+	0	0	0	0	0	
BL802	OVK8	D1	TCC G2	0	25	M,C	55	M,C	20	C	0	205	100	NS	0	NS	0	2+	3+	
BL802	OVK8	D2	TCC G2	0	50	M,C	10	M,C	10	C	30	180	70	NS	0	0	0	0	2+	
BL802	OVK8	D3	TCC G3	0	35	M,C	45	M,C	15	C	5	210	95	NS	0	0	0	0	2+	
BL802	OVK8	D4	TCC G2	0	30	M,C	60	M,C	10	C	0	220	100	NS	0	NS	0	2+	2+	
BL802	OVK8	D5	TCC G3	0	40	C	50	C	5	C	5	225	95	NS	0	2+	0	0	2+F	회귀 세포 M+
BL802	OVK8	D6	TCC G3	0	80	M,C	10	M,C	5	C	5	265	95	NS	0	2+	0	2+	2+	
BL802	OVK8	D7	TCC G1-G2	0	55	C	40	C	3	C	2	248	98	NS	0	NS	0	2+	2+	
BL802	OVK8	D8	TCC G2	0	25	M,C	45	M,C	15	M,C	15	180	85	NS	0	2+	0	0	3+	

[0715]

BL802	OVK8	D9	TCC G2	0	0	NA	20	C	30	C	50	70	50	NS	0	NS	0	0	0	
BL802	OVK8	D10	TCC G3	0	40	M,C	40	M,C	20	C	0	220	100	NS	0	NS	0	2+	2+	스트로마 지방 조직.
BL802	OVK8	E1	TCC G2	0	90	M,C	10	M,C	0	NA	0	290	100	NS	0	NS	0	2+	3+	
BL802	OVK8	E2	TCC G2	0	70	C	15	C	10	C	5	250	95	NS	0	NS	0	2+	3+	
BL802	OVK8	E3	TCC G2	0	25	M,C	50	C	20	C	5	195	95	NS	0	1+	0	1+	2+	
BL802	OVK8	E4	TCC G2	0	100	M,C	0	NA	0	NA	0	300	100	NS	0	3+	0	3+	3+	
BL802	OVK8	E5	TCC G2	0	70	M,C	10	M,C	5	M,C	15	235	85	NS	0	NS	0	2+	2+	
BL802	OVK8	E6	TCC G2	0	80	M,C	20	M,C	0	NA	0	280	100	NS	0	NS	0	2+F	0	
BL802	OVK8	E7	TCC G3	0	65	M,C	20	M,C	5	M,C	10	240	90	NS	0	0	0	0	0	
BL802	OVK8	E8	TCC G2	0	30	M,C	50	M,C	15	C	5	205	95	NS	0	NS	0	0	0	
BL802	OVK8	E9	TCC G2	0	75	M,C	20	M,C	5	C	0	270	100	NS	0	NS	0	0	0	
BL802	OVK8	E10	TCC G2	0	2	M,C	18	M,C	30	M,C	50	72	50	NS	0	NS	0	0	0	
BL802	OVK8	F1	TCC G2	0	100	C	0	NA	0	NA	0	300	100	NS	0	NS	0	2+	0	
BL802	OVK8	F2	TCC G2-G3	0	80	M,C	20	M,C	0	NA	0	280	100	NS	0	NS	0	3+	3+	
BL802	OVK8	F3	TCC G3	0	10	C	85	C	3	C	2	203	98	NS	0	1+	0	0	2+	
BL802	OVK8	F4	TCC G3	0	50	C	30	C	18	C	2	228	98	NS	0	NS	0	1+	2+	
BL802	OVK8	F5	TCC G3	0	40	M,C	40	M,C	20	C	0	220	100	NS	0	NS	0	1+	2+	
BL802	OVK8	F6	TCC*	0	20	C	10	C	10	C	60	90	40	NS	0	NS	0	0	0	
BL802	OVK8	F7	TCC G3	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	NS	0	NS	0	0	0	
BL802	OVK8	F8	AdenoCa G2	0	0	NA	3	M,C	0	NA	97	6	3	NS	0	NS	0	0	0	
BL802	OVK8	F9	AdenoCa (SM & BU)	0	0	NA	5	M,C	5	M,C	90	15	10	NS	0	0	0	0	0	
BL802	OVK8	F10	TCC G2	0	95	C	5	C	0	NA	0	295	100	3+	0	NS	0	1+	2+	

[0716]

BL802	OVK8	G1	NAT	0	0	NA	10	C	30	C	60	50	40	NA	0	0	0	0	0	
BL802	OVK8	G2	NAT	0	40	M,C	30	M,C	10	C	20	190	80	NA	0	0	0	0	0	
BL802	OVK8	G3	NAT	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	NA	0	NS	0	0	0	
BL802	OVK8	G4	NAT (SM & BV)	0	15	C	30	C	45	C	10	150	90	NA	0	0	0	0	0	
BL802	OVK8	G5	NAT (점막의 만성 염증)	0	80	M,C	20	M,C	0	NA	0	280	100	NA	0	0	0	0	0	
BL802	OVK8	G6	NAT (점막의 만성 염증)	0	25	M,C	15	M,C	40	C	20	145	80	NA	0	0	0	0	0	
BL802	OVK8	G7	NAT	0	30	M,C	60	M,C	10	M,C	0	220	100	NA	0	0	0	0	0	
BL802	OVK8	G8	NAT	0	20	M,C	20	M,C	30	M,C	30	130	70	NA	0	0	0	0	0	
BL802	OVK8	G9	NAT	0	60	M,C	20	M,C	15	C	5	235	95	NA	0	0	0	0	0	
BL802	OVK8	G10	NAT (섬유 조직 및 혈관)	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	존재하는 요로상피 없음
BL802	OVK8	H1	NAT (회박한) 정상	0	0	NA	15	M,C	15	C	70	45	30	NA	0	0	0	0	0	주목된 석회화
BL802	OVK8	H2	NAT (SM & BV) 정상	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	붕괴된 조직
BL802	OVK8	H3	NAT (회박한) 정상	0	0	NA	70	M,C	30	C	0	170	100	NA	0	0	0	0	0	
BL802	OVK8	H4	NAT (SM & BV) 정상	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	붕괴된 조직
BL802	OVK8	H5	NAT (SM & BV) 정상	0	0	NA	80	M,C	15	M,C	5	175	95	NA	0	0	0	0	0	
BL802	OVK8	H6	NAT (회박한) 정상	0	0	NA	0	NA	10	C	90	10	10	NA	0	0	0	0	0	작은 요로상피
BL802	OVK8	H7	NAT 정상	0	0	NA	25	M,C	15	C	60	65	40	NA	0	0	0	0	0	기저층 음성
BL802	OVK8	H8	NAT 정상	0	70	M,C	20	M,C	0	NA	10	250	90	NA	0	0	0	0	0	
BL802	OVK8	H9	NAT 정상	0	0	NA	0	NA	40	C	60	40	40	NA	0	0	0	0	0	

[0717]

BL802	OVK8	H10	NAT 정상	0	0	NA	0	NA	30	M,C	70	30	30	NA	0	0	0	0	0	존재하는 작은 요로상피
일반 설명/주석:				NA = 해당 사항 없음					Occ= 가끔				N= 정상				F= 병소 양성			
G=등급				NS= 보이지 않음					Sc= 홀어진				C= 세포질 염색				TCC= 전이 세포 암종			
				Ca= 암종					BLA= 방광				M= 막 염색				SM= 평활근			
				*= 섬유 조직 및 혈관의 만성 염증									BV= 혈관				NAT= 종양에 인접한 정상			

[0718]

M22-321b41.1의 특이성 및 민감도는, FDA999d에 3중으로 함유된 모든 33개의 정상 인간 표본으로부터 더욱 결정된다. 표 21에 나타난 바와 같이, 항-넥틴-4 항체 M22-321b41.1으로 IHC 염색은, 정상 유방이 부분적이고 약함 내지 중간의 면역반응성을 나타낸 것을 제외하고, 문헌 (Rabet et al., 2016)에 보고된 정상 세포에서의 넥틴-4의 발현과 일치된다. 넥틴-4에 대해 적혈구 세포는, 중간 내지 강한 강도로 염색된다. 편평 상피 (Squamous epithelium)는 강하게 염색되는 반면 기저층은 음성이다.

표 21

다른 조직의 IHC 염색에서 항-벡틴-4 항체 M22-321b41.1의 특이성.

일반 표본 정보					특색 있는 세포의 아티클 염색의 시험								다른 세포 타입의 아티클 염색의 시험						
수탁 #	실험 ID	TM A 위치	세포주/조직	이소타입 위치	3+ %	3+sub	2+ %	2+sub	1+ %	1+sub	0%	H-스 코어	% 벡틴 -4	내피	평활근	섬유아세포	스트로마	염증 세포	설명
조 직																			
FDA999d	0VK5	A1	뇌 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	NS	0	NS	
FDA999d	0VK5	A2	뇌 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	NS	0	NS	
FDA999d	0VK5	A3	뇌 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	NS	0	NS	
FDA999d	0VK5	A4	뇌 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	NS	0	NS	
FDA999d	0VK5	A5	뇌 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	NS	0	NS	
FDA999d	0VK5	A6	뇌 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	NS	0	NS	
FDA999d	0VK5	A7	소뇌 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	NS	0	NS	
FDA999d	0VK5	A8	소뇌 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	NS	0	NS	
FDA999d	0VK5	A9	소뇌 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	NS	0	NS	
FDA999d	0VK5	B1	부신 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	B2	부신 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	B3	부신 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	존재하는 내인성 색소
FDA999d	0VK5	B4	난소 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	B5	난소 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	B6	난소 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	B7	이자 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	B8	이자 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	B9	이자 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	인공물 occ 세포 2+ 염색
FDA999d	0VK5	C1	부갑상선 (NAT)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	C2	부갑상선 (NAT)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	C3	부갑상선 (NAT)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	

[0719]

FDA999d	0VK5	C4	뇌하수체 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	C5	뇌하수체 (NAT)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	C6	뇌하수체 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	RBC's 2+
FDA999d	0VK5	C7	고환 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	C8	고환 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	C9	고환 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	OCC 간질 세포 2+
FDA999d	0VK5	D1	갑상선 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	D2	갑상선 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	D3	갑상선 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	NS	스트로마 2+F 콜로이드 2+
FDA999d	0VK5	D4	유방 (NAT)	0	0	NA	20	M,C	30	C	50	70	50	0	NS	0	0-1+	0	
FDA999d	0VK5	D5	유방 (NAT)	0	0	NA	15	C	25	C	60	55	40	0	NS	0	0	0	
FDA999d	0VK5	D6	유방 (NAT)	0	10	M	25	M,C	25	M,C	40	105	60	0	NS	0	0	0	
FDA999d	0VK5	D7	비장 (N)	0	0	M	0	M,C	0	NA	100	0	0	0	NS	0	0	0	
FDA999d	0VK5	D8	비장 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	0	1-2+	0	
FDA999d	0VK5	D9	비장 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	0	1-2+	0	
FDA999d	0VK5	E1	편도선 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NA	0	0	0	RBC's 3+
FDA999d	0VK5	E2	편도선 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	0	0	0	
FDA999d	0VK5	E3	편도선 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	0	0-1+F	0	
FDA999d	0VK5	E4	흉선 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	0	0	0	
FDA999d	0VK5	E5	흉선 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	0	0	0	
FDA999d	0VK5	E6	흉선 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	0	0	0	
FDA999d	0VK5	E7	골수 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	0	0	0	
FDA999d	0VK5	E8	골수 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	0	0	0	
FDA999d	0VK5	E9	골수 (N)	0	25	C	5	C	0	NA	70	85	30	0	NS	0	0	0	
FDA999d	0VK5	F1	폐 (N)	0	0	NA	10	M,C	20	M,C	70	40	30	0	0	0	0	0	스코어된 기관지 상피
FDA999d	0VK5	F2	폐 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	
FDA999d	0VK5	F3	폐 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	

[0720]

FDA999d	0VK5	F4	심장 근육 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	NS	0	NS	
FDA999d	0VK5	F5	심장 근육 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	NS	0	NS	
FDA999d	0VK5	F6	심장 근육 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	NS	0	NS	
FDA999d	0VK5	F7	식도(N)	0	70	M,C	10	M,C	0	NA	20	230	80	0	2+	0	0	2+	기저층 음성: RBC's = 3+
FDA999d	0VK5	F8	식도(N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	
FDA999d	0VK5	F9	식도(N)	0	30	M,C	30	M,C	10	M,C	30	160	70	0	3+	0	0	3+	기저층 음성
FDA999d	0VK5	G1	위 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	
FDA999d	0VK5	G2	위 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	
FDA999d	0VK5	G3	위 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	
FDA999d	0VK5	G4	소장 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	
FDA999d	0VK5	G5	소장 (N)	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	보이는 상피 없음
FDA999d	0VK5	G6	소장 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	
FDA999d	0VK5	G7	결장 (NAT)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	2+	
FDA999d	0VK5	G8	결장 (NAT)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	
FDA999d	0VK5	G9	결장 (NAT)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	
FDA999d	0VK5	H1	간 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	
FDA999d	0VK5	H2	간 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	
FDA999d	0VK5	H3	간 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	
FDA999d	0VK5	H4	침샘 (N)	0	0	NA	15	C	10	C	75	40	25	0	NS	0	0	0	대부분 관 세포 염색
FDA999d	0VK5	H5	침샘 (N)	0	0	NA	0	NA	10	C	90	10	10	0	NS	0	0	2+	
FDA999d	0VK5	H6	침샘 (N)	0	10	C	10	C	0	NA	80	50	20	0	NS	0	0	0	장액 세포 + 관 세포 염색
FDA999d	0VK5	H7	신장 (N)	0	0	NA	5	C	0	NA	95	10	5	0	NS	NS	0	NS	근위 세포관 염색
FDA999d	0VK5	H8	신장 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	NS	0	0	
FDA999d	0VK5	H9	신장 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	NS	0	0	

[0721]

FDA999d	0VK5	I1	전립선 (N)	0	0	NA	10	C	30	C	60	50	40	0	3+	0	0	0	
FDA999d	0VK5	I2	전립선 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	2+	0	0	0	
FDA999d	0VK5	I3	전립선 (N)	0	0	NA	10	C	20	C	70	40	30	0	3+	0	0	0	
FDA999d	0VK5	I4	자궁내막 (N)	0	20	M,C	20	M	0	NA	60	100	40	0	0	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	I5	자궁내막 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	I6	자궁내막 (N)	0	0	NA	20	M	20	M	60	60	40	0	0	0	0	NS	대부분 정점 염색
FDA999d	0VK5	I7	자궁 경부 (NAT)	0	0	NA	20	M	10	M	70	50	30	0	0	0	0	0	
FDA999d	0VK5	I8	자궁 경부 (NAT)	0	70	M,C	20	M,C	0	NA	10	250	90	0	0	0	0	0	세포질 기저 3+
FDA999d	0VK5	I9	자궁 경부 (NAT)	0	45	M,C	5	M,C	5	C	45	150	55	0	0	0	0	0	염색이 아닌 외자궁경부 기저
FDA999d	0VK5	J1	골격근 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	J2	골격근 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	J3	골격근 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	J4	피부 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	착색된 피부
FDA999d	0VK5	J5	피부 (N)	0	80	M,C	10	M,C	0	NA	10	260	90	0	0	0	0	0	기저층 음성
FDA999d	0VK5	J6	피부 (N)	0	70	M,C	20	M,C	0	NA	10	250	90	0	0	0	0	3+	
FDA999d	0VK5	J7	말초 신경 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	J8	말초 신경 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	NS	
FDA999d	0VK5	J9	말초 신경 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	NS	Occ IC = 2+
FDA999d	0VK5	K1	중배엽 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	0	0	0	
FDA999d	0VK5	K2	중배엽 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	0	0	0	
FDA999d	0VK5	K3	중배엽 (N)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	0	0	0	
FDA999d	0VK5	K4	눈(NAT)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	0	0	0	
FDA999d	0VK5	K5	눈(NAT)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	0	0	0	

[0722]

FDA999d	0VK5	K6	눈(NAT)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	NS	0	0	0	
FDA999d	0VK5	K7	후두 (NAT)	0	0	NA	5	M,C	5	M,C	90	15	10	0	0	0	0	0	
FDA999d	0VK5	K8	후두 (NAT)	0	25	M,C	15	M,C	0	NA	60	105	40	0	0	0	0-1+	0	기저층 음성
FDA999d	0VK5	K9	후두 (NAT)	0	0	NA	0	NA	0	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	존재하는 작은 상피 단편
일반 설명/주석:				NA = 해당 사항 없음				Occ = 가끔				N = 정상				F = 병소 양성			
				NS = 보이지 않음				Sc = 흩어진				C = 세포질 염색							
				NAT = 암 인접 정상 조직				IC = 염증 세포				M = 막 염색							

[0723]

[0724]

따라서, M22-321b41.1에 기초한 넥틴-4 발현에 대한 IHC 분석은, 넥틴-4 발현에 민감하고 특이적이다. M22-321b41.1으로 IHC 분석은, 우수한 정확도 및 재현성을 나타낸다.

[0725]

실시예 7: 기능적 분석: 면역블로팅

[0726]

mAb M22-321b41.1의 기능적 특성 및 특이성은, 면역블로팅, 예를 들어, 웨스턴 블로팅에서 더욱 평가된다. 간단히 말하면, 다양한 넥틴-4 mRNA-양성 및 넥틴-4 mRNA-음성 샘플로부터 제조된 단백질 용해물은 SDS-PAGE에 적용되고, 니트로셀룰로스 막으로 옮긴 다음, M22-321b41.1으로 프로브된다. 항-인간 GAPDH 항체는, SDS-PAGE의 각 겔 레인 (gel lane)에서 적당하고 동일한 양의 총 세포 용해물이 용해되었음을 확인하기 위해 로딩 대조군으로서 사용된다. 도 12a에 나타난 바와 같이, M22-321b41.1은, 넥틴-4를 과발현하도록 유전자 조작된 넥틴-4-mRNA-양성 NCI H322M, AG-B1, 및 Rat1(E) 세포들의 용해물에서, 예측된 인간 넥틴-4 분자량과 일치하는, ~58-60 kDa의 특정 밴드를 인식하고 블로팅된다. 더 작은 크기의 넥틴-4 절단 생성물은, 넥틴-4의 보고된 분비 (shedding) (Buchanan et al., 2017)와 일치하는, NCIH322M 세포주뿐만 아니라 AG-B1 이중이식 샘플에서도 관

찰된다. 넥틴-4 mRNA 음성 MDA-MB-231 및 Rat1 (E)-Neo 세포에서 밴드는 검출되지 않았다. M22-321b41.1은 또한, 모든 넥틴 계열 구성원 (넥틴 1-4)이 도 12b에 FACS에 의해 나타낸 바와 같이 유전자조작된 Rat1 (E) 세포에서 고도로 발현될지라도, 웨스턴 블로팅에서 유전자조작된 Rat1 (E) 세포에 의해 과-발현된 넥틴-1, 넥틴-2, 및 넥틴-3 중 어느 하나를 검출하지 않는다. 따라서, M22-321b41.1은, 면역블로팅 분석에서 넥틴-4를 특이적으로 검출한다.

[0727] 실시예 8: 에피토프 맵핑

[0728] M22-321b41.1 항체에 의해 인식되는 넥틴-4에 대해 에피토프를 더욱 맵핑하기 위해, 넥틴-4의 다양한 단편은 클로닝되고, 세포로 형질감염되며, 세포에서 발현된다. 다양한 넥틴-4 단편을 발현하는 세포는 배양되고, RIPA 완충액에서 용해된다. RIPA 용해물의 총 단백질 농도는, BSA 표준을 사용하여 정량되고, 총 20 μ g의 감소된 (50mM TCEP) 용해물은, 1x MES 실행 완충액 내에 4-12% BT 15-레인 겔 상에서 SDS-PAGE에 적용되며, 니트로셀룰로오스 막 상으로 I-블롯으로 전달되고, LI-COR 블럭킹 완충액 (blocking buffer)으로 차단되며, 1:1 LI-COR 블럭킹 완충액에서 2 μ g/ml M22-321b41.1 항체로 프로브된다. α -GAPDH 항체 (Chicken pAb, Millipore)의 1:10000 희석물은, 로딩 대조군으로서 GAPDH를 검출하는데 사용된다. 단백질 밴드에 결합된 항체는 그 다음 IRDye 680 (Odyssey)과 접합된 염소-항-마우스 항체의 1:5000 희석물 또는 IRDye 800 (Odyssey)과 접합된 당나귀 항- α -치킨의 1:5000 희석물로 검출되고, Odyssey 시스템에서 시각화된다. M22-321b41.1 항체는, 넥틴-4 단편 V (아미노산 잔기 1-150)를 인식한다 (도 13). 따라서, M22-321b41.1 항체는, 인간 넥틴-4의 아미노산 잔기 1-150 (SEQ ID NO:45)에 위치한 에피토프를 인식한다. 더군다나, M22-321b41.1 항체는, 실시예 1, 2 및 3에 나타낸 바와 같은 인간 넥틴-4의 아미노산 잔기 31-346 (SEQ ID NO:2)의 넥틴-4 단편에 대해 발생되기 때문에, M22-321b41.1 항체는, 인간 넥틴-4의 아미노산 잔기 31-150 (SEQ ID NO:46) (단편 1-150 및 단편 31-346의 중첩 영역)에 위치한 에피토프를 인식할 수 있다.

[0729] 실시예 9: 넥틴-4 IHC 분석의 진단 및 예후 용도

[0730] 넥틴-4 발현은, M22-321b41.1 항체로 IHC 염색을 사용하여 정상 조직 샘플에서 먼저 검사된다. 피부 (표피, 땀샘 및 모낭), 방광의 이행 상피 (transitional epithelium), 침샘 (도관), 식도, 유방, 및 위에서 가변적이지만, 대부분 약하거나 보통의, 넥틴-4 발현은 검출된다. 넥틴-4 발현을 다양한 암과 연관시키기 위해, 넥틴-4 발현은 그 다음 M22-321b41.1 항체로 IHC 염색을 사용하여 다양한 종양 표본에서 검사된다. 넥틴-4는, 방광암에서 고도로 발현되고, 유방암, 췌장암, 폐암 및 난소암 조직 마이크로어레이 (TMA)에서 더 중간으로 발현된다. 동일한 IHC 분석을 사용하여 넥틴-4 발현과 방광암 사이의 상관관계의 검사는, TMA에 대해 방광암의 83% (524 중 434)가 양성이고, 60%가 M22-321b41.1 IHC 염색에 의해 강하거나 또는 중간으로 염색된 것으로 나타났다.

[0731] 환자가 항-암 요법 (예를 들어, 세포 독성제 또는 세포증식 억제제에 접합된 항-넥틴-4를 사용한 항-암 요법)에 반응하는지 여부를 예측하는데 있어서, M22-321b41.1 IHC 염색에 의해 결정된 바와 같은 환자 조직에서 넥틴-4 발현의 유효성은, 예를 들어, 다음 기준을 충족하는 환자에서 암 요법에 대한 반응을 시험하여 그 다음 평가된다: (1) 내성이 있거나 재발된 형태학적으로 확인된 전이성 악성 고형 종양 (육종 제외)을 갖는 환자; (2) 넥틴-4 발현에 양성인 종양을 갖고, 150 이상의 넥틴-4 IHC H-스코어를 갖는 환자; (3) 전이성 질환에 대한 적어도 하나의 이전 화학요법에 실패한 환자 (요로 및 방광암 환자는 시스플라틴-기반 화학요법에 부적합한 것으로 고려되는 경우, 이전 화학요법에 실패한 것으로 요구되지 않음) (Galsky et al., Journal of Clinical Oncology, vol.29, no.17, 2432-2438 (2011)); (4) 가장 최근의 전신 치료가 시험용 면역요법 약물인 경우, 문서로 기록된 질병 진행을 갖는 환자; (5) ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) 수행 상태가 0 또는 1인 환자; (6) RECIST (버전 1.1)에 따라 측정가능한 질병이 있는 환자 (Eisenhauer, et al. European Journal of Cancer; 45(2):228-247 (2009)). 총 184개의 임상 시험 표본은, M22-321b41.1 항체로 IHC 분석을 사용하여 이들의 넥틴-4 발현에 대해 검사된다; 검사된 표본 184 중, 임상 시험 표본의 180 (98%)는, 0 초과 H-스코어를 갖고; 및 171 (93%)은, 중간 내지 높은 넥틴-4 발현 (H-스코어 \geq 150)을 갖는다. 전체적으로, 44의 임상 시험자는 포함 기준과 일치했다. 이들 44명의 환자에서 종양 및/또는 전이의 부위는 표 22에 열거되어 있다.

표 22

[0732] 원발성 종양 및 전이의 부위

원발성 종양의 부위	N (%)
방광	28 (63.6)
신우 (Renal Pelvis)	10 (22.7)
요관	3 (6.8)

방광, 기타 조직 구조	2 (4.5)
기타	1 (2.3)
전이의 부위	N (%)
내장	25 (56.8)
간	10 (22.7)
폐	20 (45.5)

[0733] 중간 내지 높은 넥틴-4 발현 (H-스코어 ≥ 150)을 갖는 이들 44명의 환자는, 미소관-분열 작용제 모노메틸아우리스타틴-E에 접합된 완전 인간 항-넥틴-4 항체 (IgG1 κ)를 포함하는 항-암 치료제로 투여된다. 모든 피험자는, 질병 진행, 치료에 대한 불내성, 조사자 결정 또는 동의 철회까지 매 4주 주기의 3주 동안 (예를 들어, 1, 8 및 15일에) 매주 1회 항-넥틴-4 ADC의 단일 30분 IV 주입을 받는다. 투여된 투여량은, 0.5mg/kg, 0.75mg/kg, 1mg/kg, 및 1.25mg/kg을 포함한다. 환자에서 질환 반응 (disease response)은, Eisenhauer, et. al. European Journal of Cancer; 45(2):228-247 (2009)에 의해 평가된다. 총 36명의 피험자는 평가될 수 있는 결과를 생성했다.

[0734] 항-넥틴-4 ADC는, 넥틴-4를 발현하는 종양을 갖는 모든 치료받은 환자에서 항-종양 활성을 생성했다. 36명의 환자 중 10명은, 부분 반응, 27.8%의 반응율 (반응으로서 부분 반응 또는 완전 반응 모두 계산됨)을 갖는다. 항-넥틴-4 ADC는 또한 간 전이를 갖는 10명의 피험자 중 4명 (40% 반응율) 및 체크포인트 억제제 (checkpoint inhibitors)로 이전에 치료된 12명의 환자 중 3명 (25% 반응율)에서 항-종양 활성을 생성했다.

[0735] 따라서, 항-넥틴-4 ADC는, 넥틴-4를 발현하는 종양을 갖는 환자에서 항-종양 활성을 생성했다.

[0736] 실시예 10: 넥틴-4 IHC 분석의 진단적 및 예후적 사용 - 다른 집단 (Cohort)

[0737] 환자가 항-암 요법 (예를 들어, 세포 독성제 또는 세포증식 억제제에 접합된 항-넥틴-4를 사용하는 항-암 요법)에 반응하는지 여부를 예측하는데 있어서 M22-321b41.1 IHC 염색에 의해 결정된 바와 같은 환자 조직에서 넥틴-4 발현의 유효성은, 예를 들어, 다음 기준을 충족하는 환자의 다른 집단의 암 요법에 대한 반응을 시험하여 그 다음 평가된다: (1) 요로상피암을 포함하여 조직학적으로 확인된 전이성 악성 고형 종양을 갖는 환자; (2) 넥틴-4 발현에 양성인 종양을 갖고, 150 이상의 넥틴-4 IHC H-스코어를 갖는 환자; (3) 시스플라틴-기반 화학요법에 부적합한 전이성 질환 및/또는 요로상피암 환자에 대해 하나 이상의 이전 화학요법에 실패한 환자 (Galsky et al., Journal of Clinical Oncology, vol.29, 17, 2432-2438 (2011)); (4) 연구 직전에 면역 체크포인트 억제제 (CPI)로 치료된 피험자에 대해 문서 기록된 질병 진행을 갖는 환자; (5) ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) 수행 상태가 0 또는 1인 환자; (6) RECIST (버전 1.1)에 따라 측정 가능한 질병이 갖는 환자 (Eisenhauer, et al. European Journal of Cancer; 45(2):228-247 (2009)). 총 295개의 임상 시험 표본은, M22-321b41.1 항체로 IHC 분석을 사용하여 이들의 넥틴-4 발현에 대해 검사된다; 검사된 295개 표본 중, 278 (94%)의 임상 시험 표본은 1 초과 H-스코어를 가지며; 245 (83%)는 중간 내지 높은 넥틴-4 발현 (H-스코어 ≥ 150)을 갖는다. 전체적으로, 58명의 임상 피험자는 포함 기준에 일치했다. 이들 58명의 환자에서 종양 및/또는 전이의 부위는 표 23에 열거되어 있다.

표 23

[0738] 원발성 종양 및 전이의 부위

원발성 종양의 부위	N (%)
방광	39 (67.2)
신우	14 (24.1)
요관	4 (6.9)
기타, 우측 신장	1 (1.7)
전이의 부위	N (%)
내장	34 (58.6)
간	16 (27.6)
폐	26 (44.8)

[0739] 중간 내지 높은 넥틴-4 발현 (H-스코어 ≥ 150)을 갖는 이들 58명의 환자는, 미소관-분열 작용제 모노메틸아우리스타틴-E에 접합된 완전 인간 항-넥틴-4 항체 (IgG1 κ)를 포함하는 항-암 치료제로 투여된다. 모든 피험자는,

질병 진행, 치료에 대한 불내성, 조사자 결정 또는 동의 철회까지 매 4주 주기의 3주 동안 (예를 들어, 1, 8 및 15일에) 매주 1회 항-넥틴-4 ADC의 단일 30분 IV 주입을 받았다. 투여된 투여량은, 0.5mg/kg, 0.75mg/kg, 1mg/kg, 및 1.25mg/kg을 포함한다. 환자에서 질병 반응은, 매 8주마다 (\pm 7일) RECIST 버전 1.1 (Eisenhauer, et al. European Journal of Cancer; 45(2):228-247 (2009)에 기재된 바와 같은 RECIST)에 따라 조사자에 의해 평가된다. 총 49명의 피험자는 평가될 수 있는 결과를 생성했다.

[0740] 항-넥틴-4 ADC는, 넥틴-4를 발현하는 종양을 갖는 모든 치료받은 환자에서 항 종양 활성을 생성했다. 한 환자는 완전 반응을 보였고, 17명의 환자는 총 36.7%의 반응율을 결과하는, 부분 반응을 보였다 (반응으로서 부분 반응 및 완전 반응 모두가 계산됨). 1.25mg/kg 군에서, 항-넥틴-4 ADC는, 치료된 17명의 환자 중 10명에서 반응한, 58.8%의 반응율을 생성했다. 항-넥틴-4 ADC는 또한 간 전이를 갖는 12명의 피험자 중 5명 (41.7% 반응율), 체크 포인트 억제제로 이전에 치료받은 16명의 환자 중 6명 (37.5% 반응율), 및 타산으로 이전에 치료받은 20명의 환자 중 8명 (40% 반응율)에서, 항-종양 활성을 생성했다.

[0741] 따라서, 항-넥틴-4 ADC는, 넥틴-4를 발현하는 종양을 갖는 환자에서 항-종양 활성을 생성한다.

[0742] 실시예 11: 항-넥틴-4 ADC의 치료적 용도.

[0743] 다양한 암 환자를 치료하는데 여기에 제공된 항-넥틴-4 ADC의 효능은, 예를 들어, 인간 또는 인간화된 M22-321b41.1 항체를 포함하는 항-넥틴-4 ADC로 치료된 환자 및 위약으로서 항체 이소타입으로 치료된 대조군 환자의 결과를 비교하여, 평가된다. 간략하게, 환자는 무작위화되고, 대조군 또는 치료군에 할당된다. 치료군에서 환자는, 동물 모델 및/또는 실시예 9 및 10의 모델에서 최적화된 (체중의) kg 당 (항체의) mg의 범위에 따라 결정된, 투여량의 범위에서 항-넥틴-4 ADC로 주사된다. 주사는 일정 기간에 걸쳐 1회 또는 여러 번 놓는다. 치료된 환자의 결과는, 주기적으로 치료군과 위약군 사이에서 분석되고 비교된다.

[0744] 위약으로 치료받은 환자와 비교하는 경우, 항-넥틴-4 ADC로 치료받은 환자의 결과는 개선된다. 위약 치료와 비교하는 경우, 항-넥틴-4 ADC 치료는, 6개월, 1년, 2년, 3년 또는 5년에 더 높은 생존율, 생존 기간 증가, 암 마커의 수준 감소, 감소된 평균 또는 중간 종양 크기, 및/또는 더 느려진 암의 진행으로 이어진다.

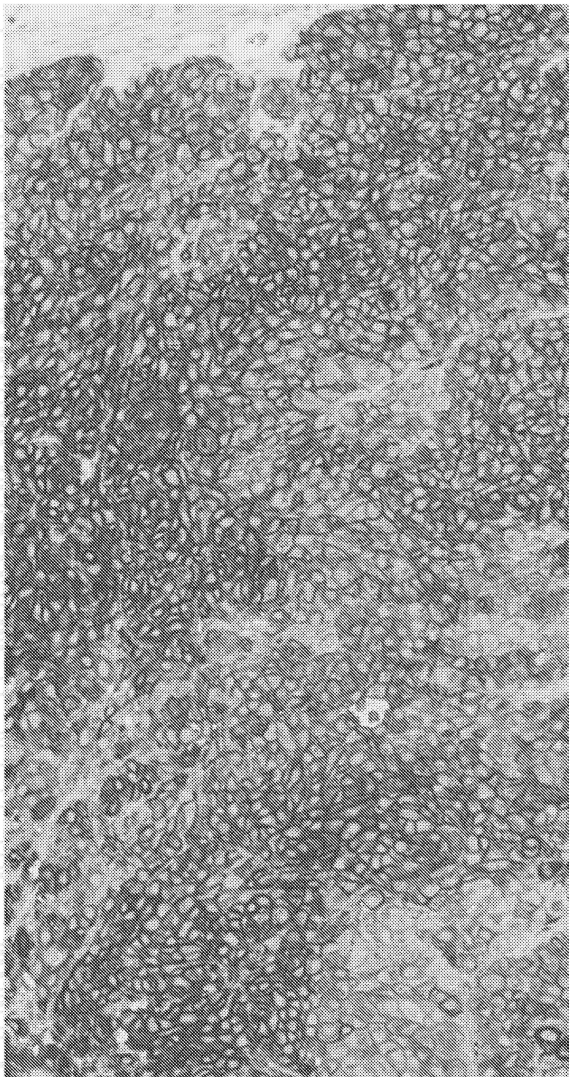
[0745] 실시예 12: 넥틴-4 IHC 분석의 부가적인 진단적 및 예후적 용도.

[0746] 환자가 항-암 요법 (예를 들어, 세포 독성제 또는 세포증식 억제제에 접합된 항-넥틴-4를 사용하는 항-암 요법)에 반응하는지 여부를 예측하는데 있어서 M22-321b41.1 IHC 염색에 의해 결정된 바와 같은 환자 조직에서 넥틴-4 발현의 유효성은, 예를 들어, 암 요법에 대한 환자의 반응과 넥틴-4 특이적 항체로 IHC 염색으로부터 결정된 환자 암 조직에서 넥틴-4 발현과의 상관관계에 의해 평가된다. 간단히 말하면, 모든 환자는, 동일한 암 치료 레짐 (regimen)으로 치료되고, 암을 갖는 환자의 조직에서 넥틴-4 발현 수준은, 여기에 기재된 바와 같은 M22-321b41.1 항체를 사용하여 IHC 분석에서 결정된다. 환자는, 이들의 암 조직에서 넥틴-4 발현에 따라 2, 3, 4, 또는 그 이상의 그룹으로 계층화된다. 예를 들어, 4개의 그룹으로 계층화에서, 환자는, 이들의 암 조직에서 높은 넥틴-4 발현을 갖는 제1 그룹, 중간 발현을 갖는 제2 그룹, 낮은 발현을 갖는 제3 그룹, 및 발현이 없는 제4 그룹으로 계층화된다. 각 계층화된 그룹에서 환자의 체질량, 환자의 종양의 크기, 6개월, 1년, 2년, 3년 또는 5년 환자 생존율, 또는 환자의 생존 기간과 같은, 환자 결과에 의해 반영되는 바와 같은, 암 치료 레짐에 대한 반응은 요약되고, 각 그룹에서 환자의 넥틴-4 발현과 상관관계가 있다. 상관관계는, 각 그룹의 평균 또는 중간 값을 사용하여 수행되거나 또는 각 그룹에서 개별 환자에 대해 수행된다.

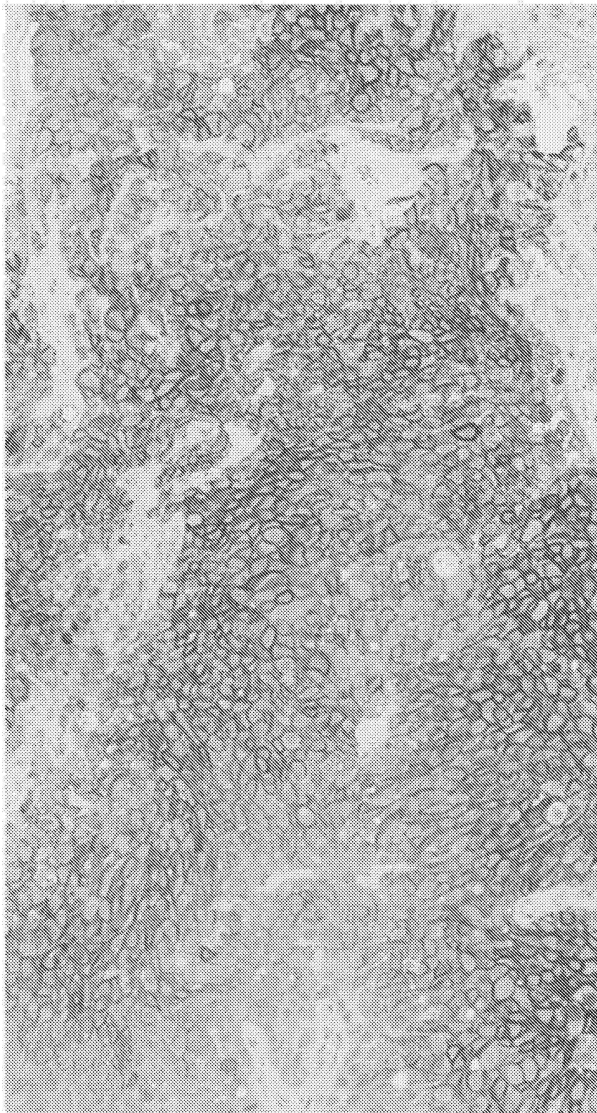
[0747] 환자 암 조직에서 넥틴-4 발현은, 환자가 암 치료 레짐, 예를 들어, (항-넥틴-4 ADC로 치정되는) 세포 독성제 또는 세포증식 억제제에 접합된 항-넥틴-4를 사용한 암 요법에 어떻게 반응할 것인지를 나타낸다. 환자의 암 조직에서 더 높은 넥틴-4 발현을 갖는 환자는, 암 치료 레짐에 더 잘 반응하고, 6개월, 1년, 2년, 3년 또는 5년에 더 높은 생존율을 가지며, 및/또는 이들의 암 조직에서 더 낮은 넥틴-4을 갖는 환자보다 더 길게 생존한다. 환자의 암 조직에서 넥틴-4 발현이 높을수록, 암 요법, 예를 들어, 환자에 대한 항-넥틴-4-ADC 치료는 더욱 효과적이다.

도면

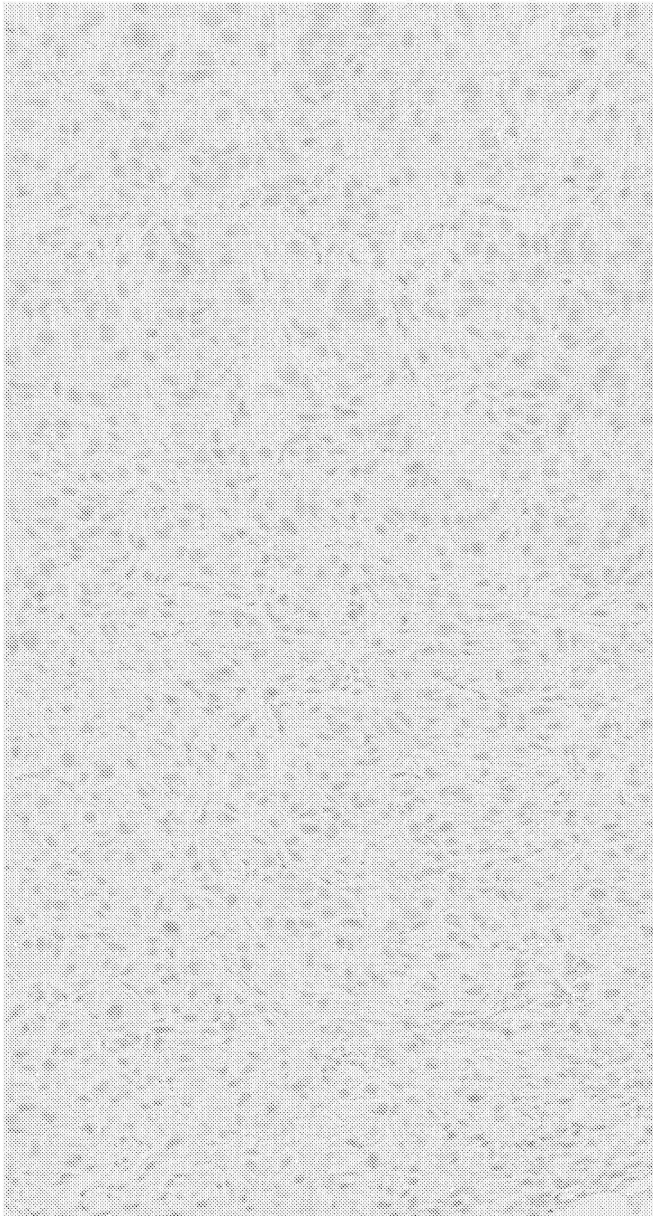
도면1



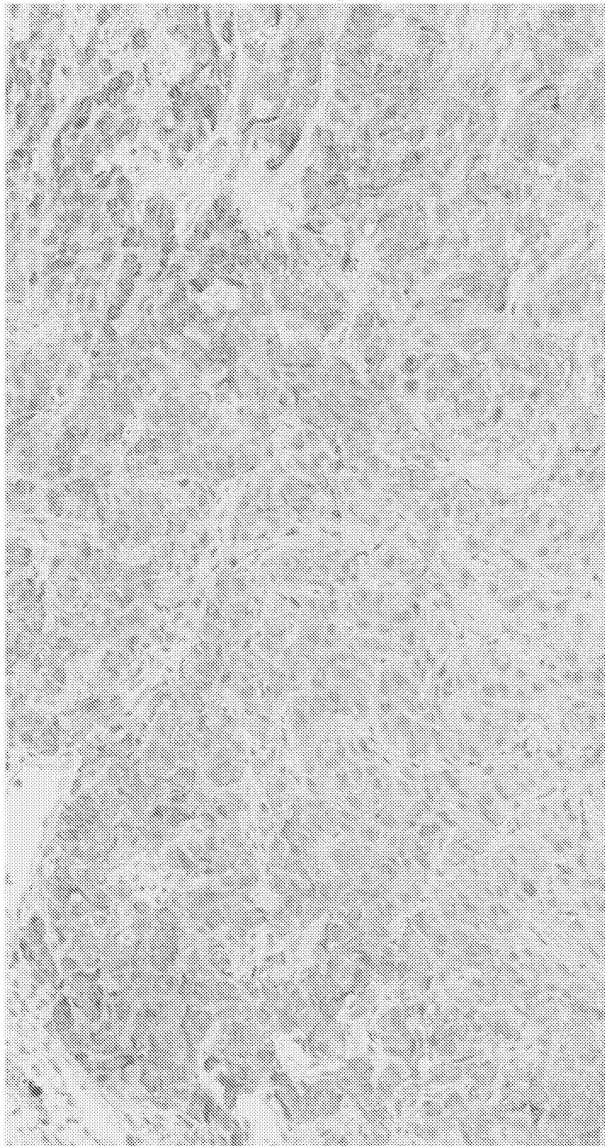
도면2



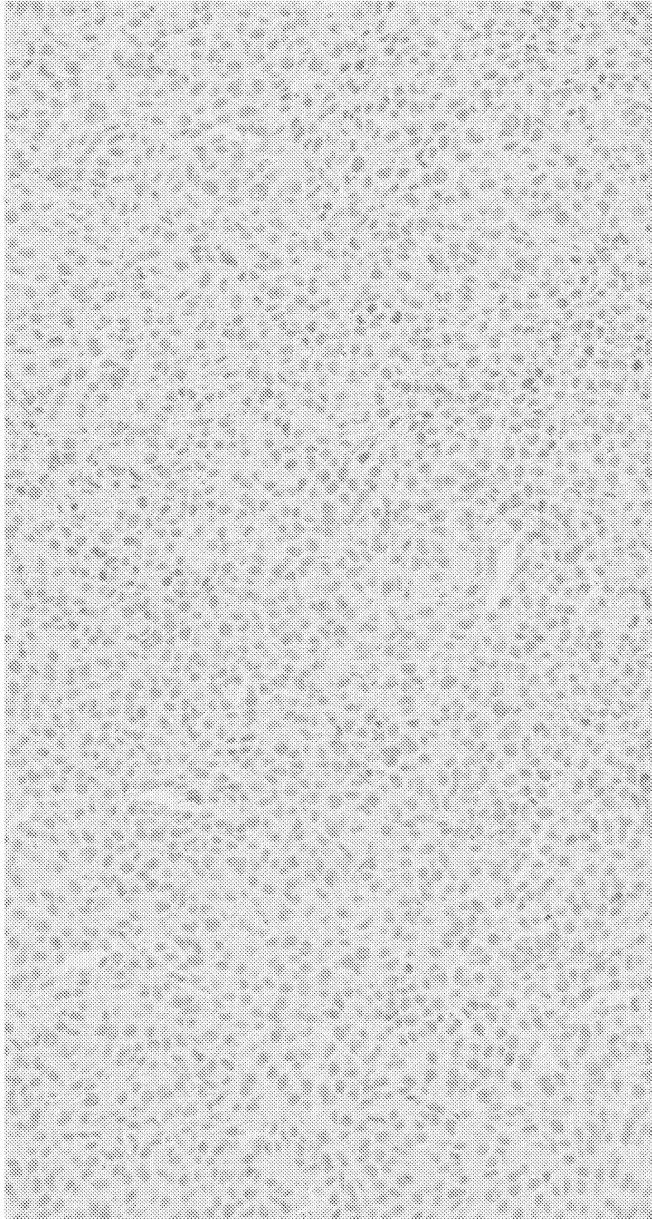
도면3



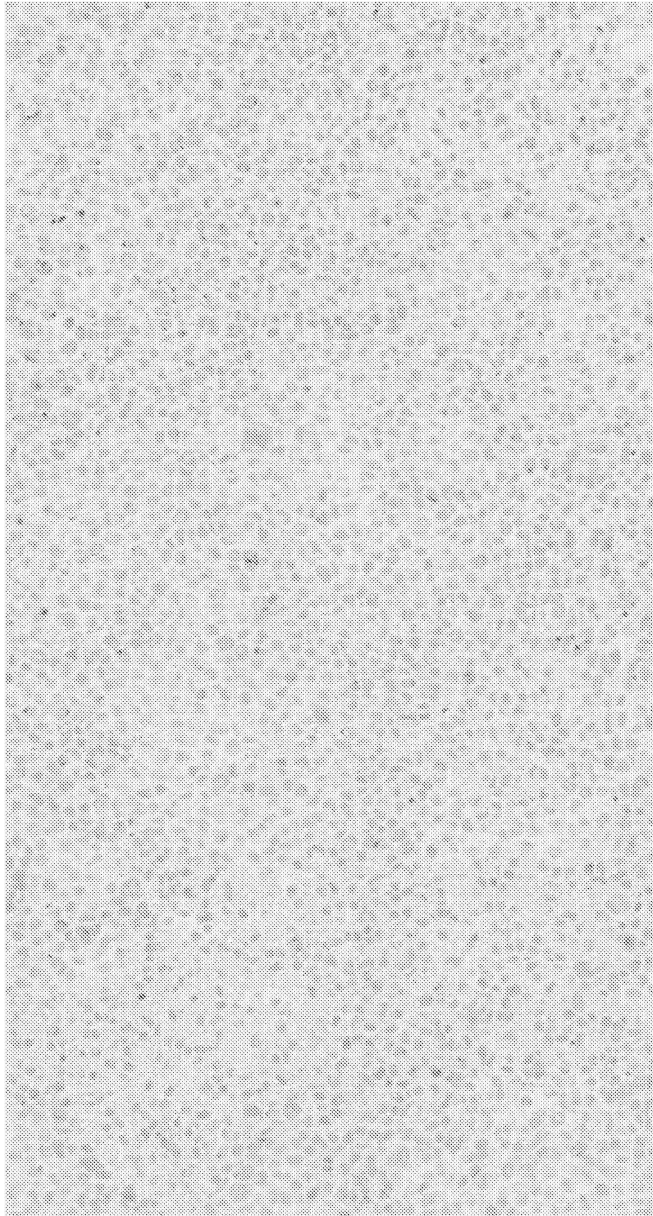
도면4



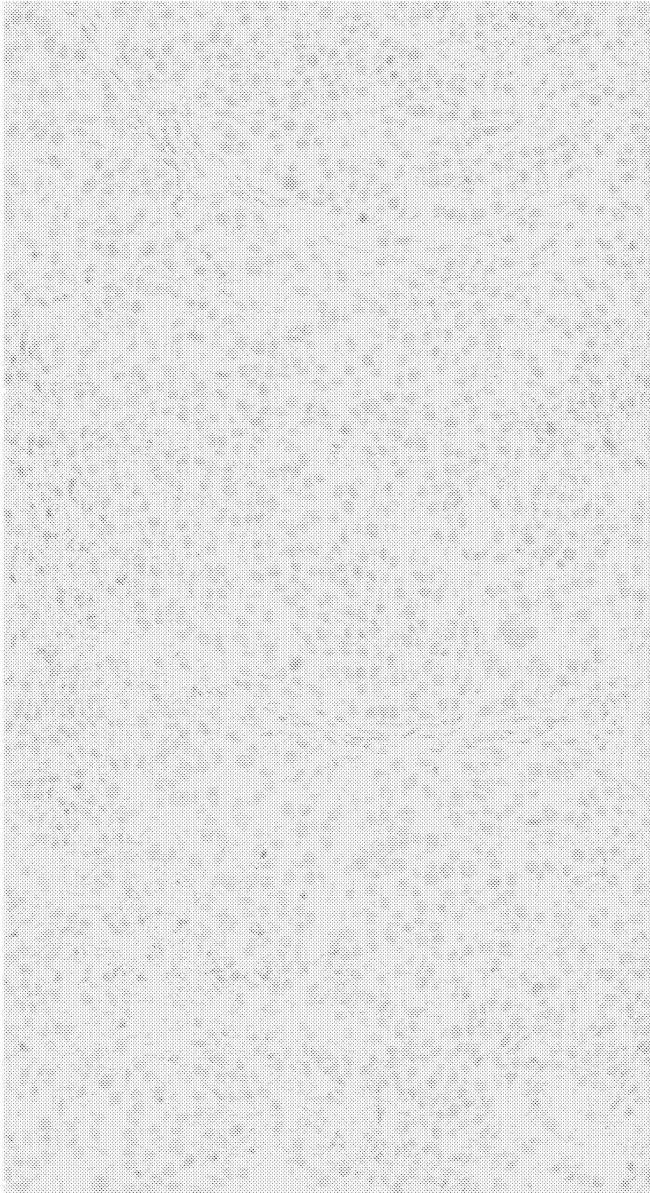
도면5



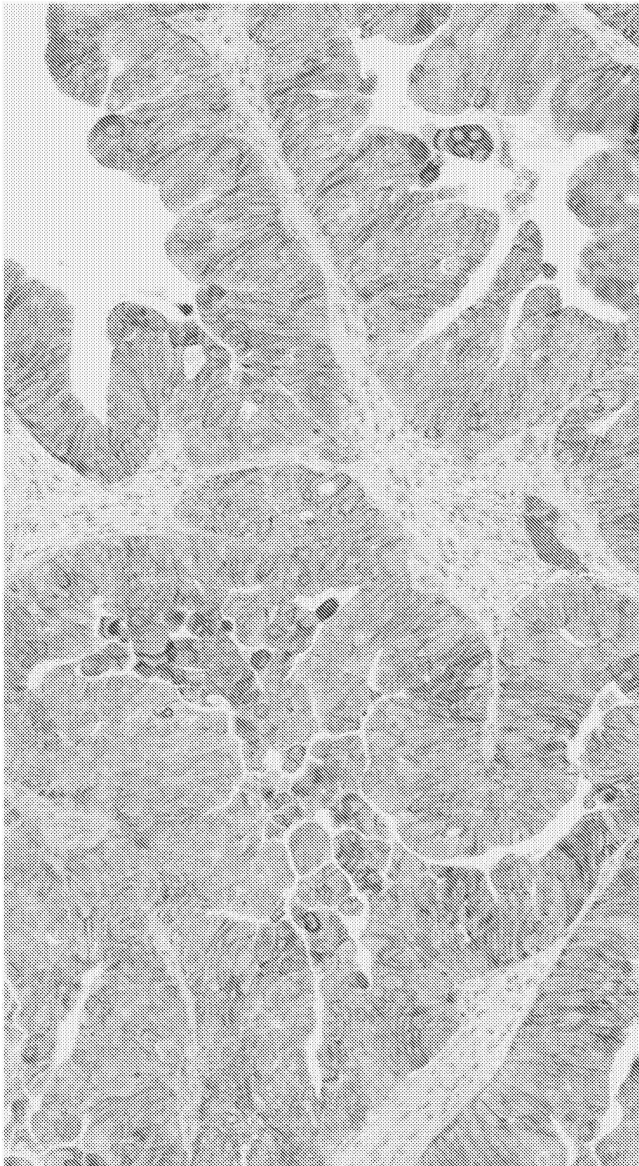
도면6



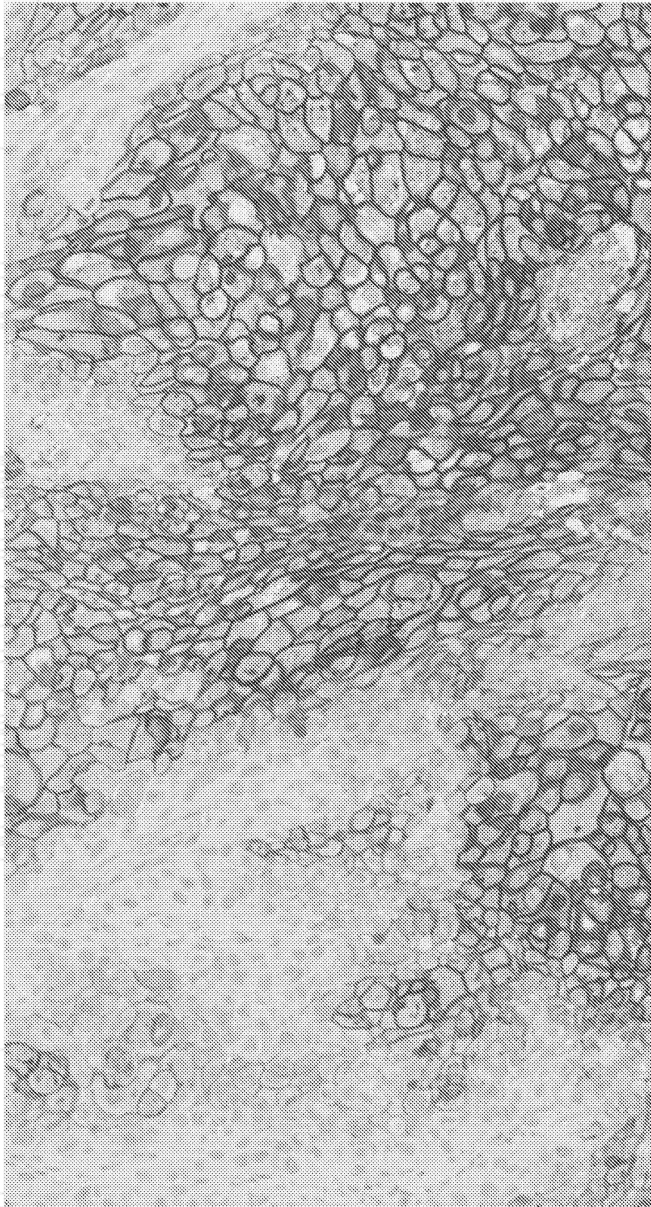
도면7



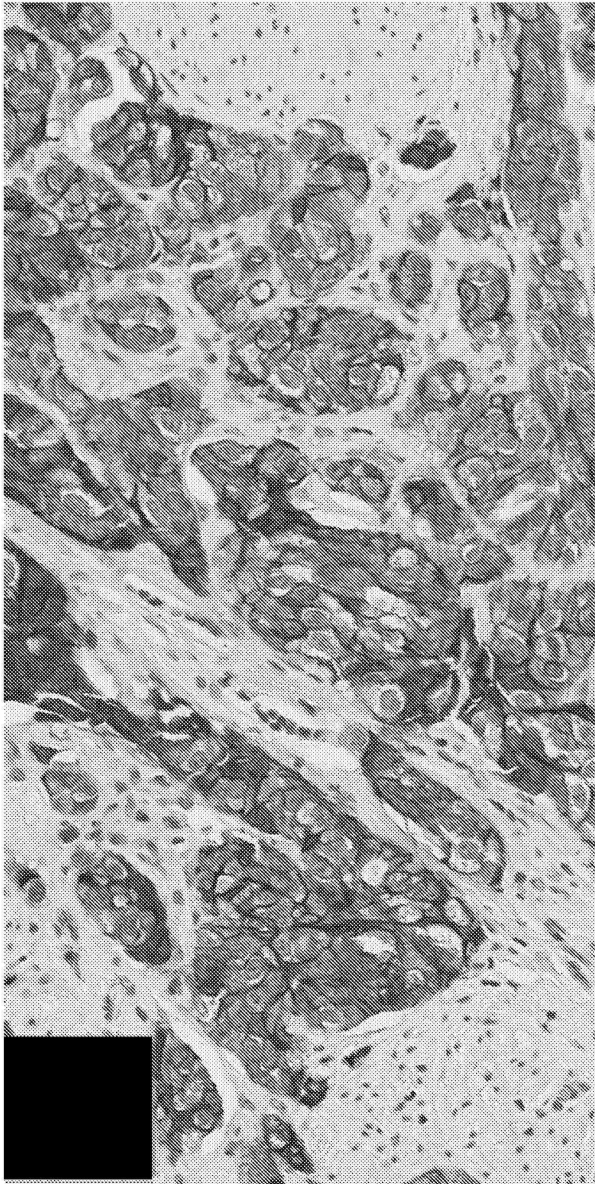
도면8



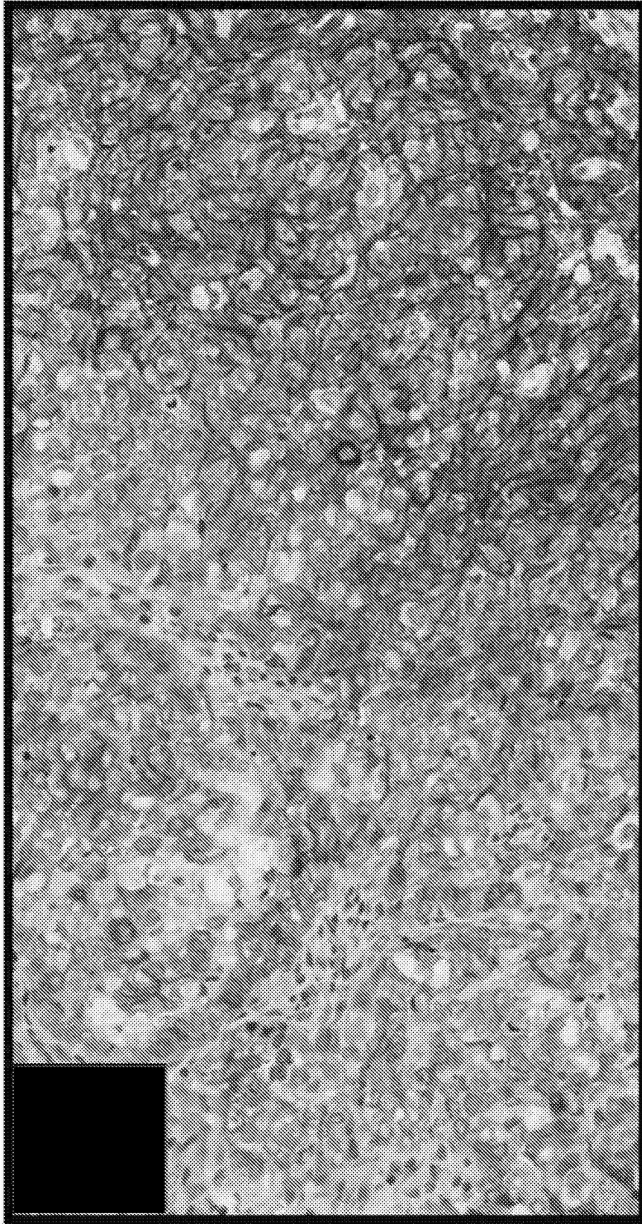
도면9



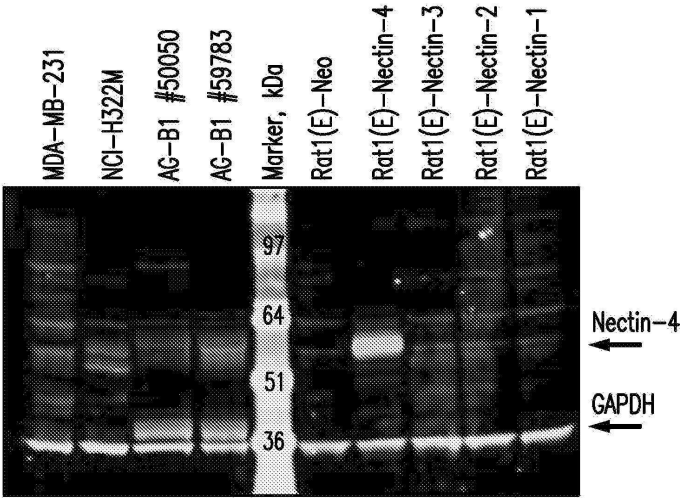
도면10



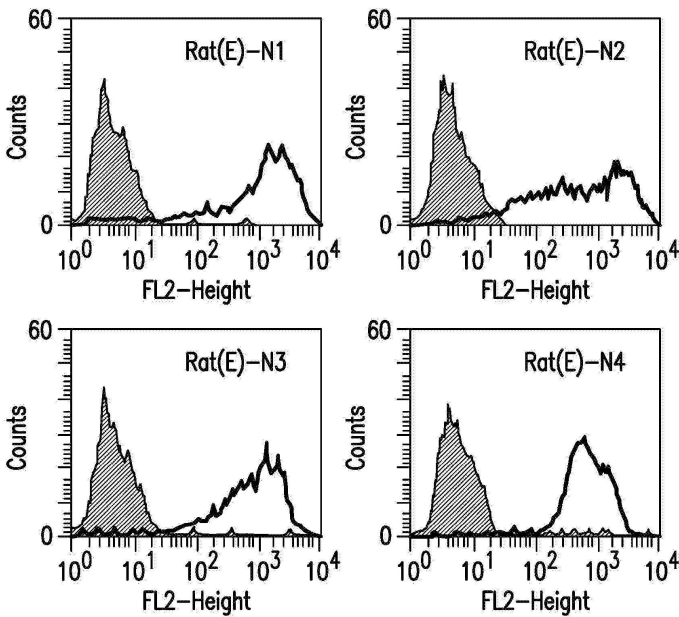
도면11



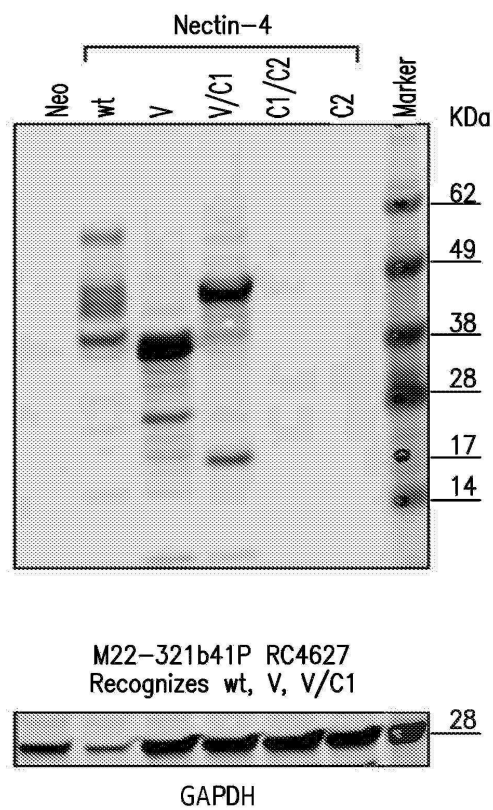
도면12a



도면12b



도면13



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> AGENSYS, INC.
- <120> NECTIN-4 BINDING PROTEINS AND METHODS OF USE THEREOF
- <130> 14369-208-228
- <140> PCT/US2018/035840
- <141> 2018-06-04
- <150> 62/515,454
- <151> 2017-06-05
- <160> 46
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 510
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220><223> GenBank accession number NP_112178
- <400> 1

Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu
1 5 10 15

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

Glu Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val Val Leu Gly Gln Asp Ala
35 40 45

Lys Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Ser Gly Glu Gln Val Gly Gln
50 55 60

Val Ala Trp Ala Arg Val Asp Ala Gly Glu Gly Ala Gln Glu Leu Ala
65 70 75 80

Leu Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Ser Pro Ala Tyr Glu Gly
85 90 95

Arg Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asn Pro Leu Asp Gly Ser Val
100 105 110

Leu Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg
115 120 125

Val Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln Ala Arg Leu Arg Leu Arg
130 135 140

Val Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro Ala Leu Glu
145 150 155 160

Glu Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser Cys Thr Ala Glu Gly Ser
165 170 175

Pro Ala Pro Ser Val Thr Trp Asp Thr Glu Val Lys Gly Thr Thr Ser
180 185 190

Ser Arg Ser Phe Lys His Ser Arg Ser Ala Ala Val Thr Ser Glu Phe
195 200 205

His Leu Val Pro Ser Arg Ser Met Asn Gly Gln Pro Leu Thr Cys Val
210 215 220

Val Ser His Pro Gly Leu Leu Gln Asp Gln Arg Ile Thr His Ile Leu
225 230 235 240

His Val Ser Phe Leu Ala Glu Ala Ser Val Arg Gly Leu Glu Asp Gln

245 250 255
 Asn Leu Trp His Ile Gly Arg Glu Gly Ala Met Leu Lys Cys Leu Ser
 260 265 270

Glu Gly Gln Pro Pro Pro Ser Tyr Asn Trp Thr Arg Leu Asp Gly Pro
 275 280 285

Leu Pro Ser Gly Val Arg Val Asp Gly Asp Thr Leu Gly Phe Pro Pro
 290 295 300

Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Ile Tyr Val Cys His Val Ser Asn Glu
 305 310 315 320

Phe Ser Ser Arg Asp Ser Gln Val Thr Val Asp Val Leu Asp Pro Gln
 325 330 335

Glu Asp Ser Gly Lys Gln Val Asp Leu Val Ser Ala Ser Val Val Val
 340 345 350

Val Gly Val Ile Ala Ala Leu Leu Phe Cys Leu Leu Val Val Val Val
 355 360 365

Val Leu Met Ser Arg Tyr His Arg Arg Lys Ala Gln Gln Met Thr Gln
 370 375 380

Lys Tyr Glu Glu Glu Leu Thr Leu Thr Arg Glu Asn Ser Ile Arg Arg
 385 390 395 400

Leu His Ser His His Thr Asp Pro Arg Ser Gln Pro Glu Glu Ser Val
 405 410 415

Gly Leu Arg Ala Glu Gly His Pro Asp Ser Leu Lys Asp Asn Ser Ser
 420 425 430

Cys Ser Val Met Ser Glu Glu Pro Glu Gly Arg Ser Tyr Ser Thr Leu
 435 440 445

Thr Thr Val Arg Glu Ile Glu Thr Gln Thr Glu Leu Leu Ser Pro Gly
 450 455 460

Ser Gly Arg Ala Glu Glu Glu Glu Asp Gln Asp Glu Gly Ile Lys Gln
 465 470 475 480

Ala Met Asn His Phe Val Gln Glu Asn Gly Thr Leu Arg Ala Lys Pro
 485 490 495

Thr Gly Asn Gly Ile Tyr Ile Asn Gly Arg Gly His Leu Val

500 505 510

<210> 2

<211> 316

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 2

Ala Gly Glu Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val Val Leu Gly Gln

1 5 10 15

Asp Ala Lys Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Ser Gly Glu Gln Val

20 25 30

Gly Gln Val Ala Trp Ala Arg Val Asp Ala Gly Glu Gly Ala Gln Glu

35 40 45

Leu Ala Leu Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Ser Pro Ala Tyr

50 55 60

Glu Gly Arg Val Glu Gln Pro Pro Pro Arg Asn Pro Leu Asp Gly

65 70 75 80

Ser Val Leu Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu

85 90 95

Cys Arg Val Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln Ala Arg Leu Arg

100 105 110

Leu Arg Val Leu Val Pro Pro Leu Pro Ser Leu Asn Pro Gly Pro Ala

115 120 125

Leu Glu Glu Gly Gln Gly Leu Thr Leu Ala Ala Ser Cys Thr Ala Glu

130 135 140

Gly Ser Pro Ala Pro Ser Val Thr Trp Asp Thr Glu Val Lys Gly Thr

145 150 155 160

Thr Ser Ser Arg Ser Phe Lys His Ser Arg Ser Ala Ala Val Thr Ser

165 170 175

Glu Phe His Leu Val Pro Ser Arg Ser Met Asn Gly Gln Pro Leu Thr

180 185 190

Cys Val Val Ser His Pro Gly Leu Leu Gln Asp Gln Arg Ile Thr His

195 200 205

Ile Leu His Val Ser Phe Leu Ala Glu Ala Ser Val Arg Gly Leu Glu

210 215 220

Asp Gln Asn Leu Trp His Ile Gly Arg Glu Gly Ala Met Leu Lys Cys

225 230 235 240

Leu Ser Glu Gly Gln Pro Pro Pro Ser Tyr Asn Trp Thr Arg Leu Asp

245 250 255

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

260 265 270

Pro Pro Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Ile Tyr Val Cys His Val Ser

275 280 285

Asn Glu Phe Ser Ser Arg Asp Ser Gln Val Thr Val Asp Val Leu Asp

290 295 300

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

305 310 315

<210> 3

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 3

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

1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr His Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Thr Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile

65						70						75						80
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Asn			
					85						90						95	
Leu	Glu	Leu	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Thr	Lys			
					100						105						110	
Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu			
					115						120						125	

Gln Leu Thr Ser Gly

130

<210> 4

<211> 136

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Ile Gln Leu Ser Thr Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Tyr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu

100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala

115 120 125

Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly

130 135

<210> 5

<211> 219

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 5

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

1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr His Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Thr Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn

85 90 95

Leu Glu Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Thr Lys

100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu

115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg

145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu

180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser

195 200 205
 Pro Ile Val Lys Thr Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

 <210> 6
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 6
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe

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

 115 120 125
 Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp
 165 170 175

Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro

180 185 190

Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys

195 200 205

Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro

210 215 220

Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe

225 230 235 240

Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro

245 250 255

Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val

260 265 270

Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr

275 280 285

Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala

290 295 300

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys

305 310 315 320

Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser

325 330 335

Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro

340 345 350

Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val

355 360 365

Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly

370 375 380

Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp

385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp

405 410 415

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

420 425 430
Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

435 440 445
<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 7
Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15
<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 8
Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr
1 5
<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<
213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 9
Leu Leu Ile Tyr His Met Ser Asn Leu Ala Ser
1 5 10
<210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 10

His Met Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 11

Leu Leu Ile Tyr His Met Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 12

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Phe Thr

1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 13

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Phe

1 5

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 14

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met Gln

1 5 10

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 15

Thr Tyr Trp Met Gln

1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 16

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr

1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 17

Thr Thr Tyr Trp Met Gln

1 5

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 18

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln

1 5 10 15

Lys Phe Lys Gly

20

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 19

Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 20

Tyr Pro Gly Asp Gly Asp

1 5

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 21

Trp Ile Gly Ser Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg

1 5 10

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 22

Ala Arg Glu Tyr Tyr Gly Leu Asp Tyr

1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 23

Glu Tyr Tyr Gly Leu Asp Tyr

1 5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 24

Ala Arg Glu Tyr Tyr Gly Leu Asp

1 5

<210> 25

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 25

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

1 5 10 15

Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys

20

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 26

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 27

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Synthetic polypeptide

<400> 27

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

1 5 10 15

Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 28

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Thr Lys Arg

1 5 10

<210> 29

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 30

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

1 5 10

<210> 31

<211> 32

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 31

Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Ile Gln

1 5 10 15

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

20 25 30

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Synthetic polypeptide

<400> 32

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 33

<211> 86

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 33

Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile

1 5 10 15

Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu

20 25 30

Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser

35 40 45

Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr

50 55 60

Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Thr

65 70 75 80

Phe Asn Arg Asn Glu Cys

85

<210> 34

<211> 310

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 34

Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro

1 5 10 15

Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr

20 25 30

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val

35 40 45

Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val

50 55 60

Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg

65 70 75 80

Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn

85 90 95

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp

100 105 110

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

115 120 125

Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn

130 135 140
Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
145 150 155 160
Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
165 170 175
Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
180 185 190
Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala

195 200 205
Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys
210 215 220
Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile
225 230 235 240
Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn
245 250 255
Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys

260 265 270
Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys
275 280 285
Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe
290 295 300

Ser Arg Thr Pro Gly Lys

305 310

<210> 35

<211> 232

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 35

Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala

1 5 10 15

Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile

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

 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val
 115 120 125
 Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr

 130 135 140
 Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu
 145 150 155 160
 Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr

 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys
 210 215 220
 Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 36
 <211> 1533
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> GenBank accession number NM_030916

<400> 36

atgccctgt ccctgggagc cgagatgtgg gggcctgagg cctggctgct gctgctgcta	60
ctgctggcat catttacagg ccggtgcccc gcgggtgagc tggagacctc agacgtggtta	120
actgtggtgc tgggccagga cgcaaaactg ccctgcttct accgagggga ctccggcgag	180
caagtggggc aagtggcatg ggctcgggtg gacgcgggcg aaggcgcca ggaactagcg	240
ctactgcact ccaatacagg gcttcatgtg agcccggctt acgagggccg cgtggagcag	300
ccgcccccc cagcaaccc cctggacggc tcagtgtctc tgcgaacgc agtgcaggcg	360
gatgaggcg agtacgagt gcgggtcagc accttccccg ccggcagctt ccaggcgcg	420
ctgcggctcc gagtgtggt gcctccccctg cctcactga atcctggtcc agcactagaa	480
gagggccagg gcctgacctt ggcagcctcc tgcacagtgc agggcagccc agccccagc	540
gtgacctggg acacggaggt caaaggcaca acgtccagcc gttccttcaa gcactccgc	600
tctgtgccg tcacctcaga gttccacttg gtgcctagcc gcagcatgaa tgggcagcca	660
ctgacttgtg tgggtgtcca tcttggcctg ctccaggacc aaaggatcac ccacatctc	720
cacgtgtcct tcttctga ggcctctgtg aggggccttg aagacaaaa tctgtggcac	780
attggcagag aaggagctat gctcaagtgc ctgagtgaag ggcagcccc tccctcatac	840
aactggacac ggcctgatgg gcctctgcc agtgggttac gagtggatgg ggacactttg	900
ggctttcccc cactgaccac tgagcacagc ggcatctacg tctgccatgt cagcaatgag	960
ttctcctcaa gggatttca ggtcactgtg gatgttcttg acccccagga agactctggg	1020
aagcaggtgg acctagtgtc agcctcgggtg gtggtggtgg gtgtgatcgc cgcactcttg	1080
ttctgccttc tgggtggtgt ggtggtgtct atgtccgat accatcgcg caaggcccag	1140
cagatgacct agaaatatga ggaggagctg acctgacca gggagaactc catccggagg	1200
ctgcattccc atcacacgga cccaggagc cagccggagg agagtgtagg gctgagagcc	1260
gagggccacc ctgatagtct caaggacaac agtagctgct ctgtgatgag tgaagagccc	1320
gagggccgca gttactccac gctgaccacg gtgagggaga tagaaacaca gactgaactg	1380
ctgtctccag gctctgggcg ggccgaggag gaggaagatc aggatgaagg catcaaacag	1440
gccatgaacc atttgttca ggagaatggg acctacggg ccaagccac gggcaatggc	1500
atctacatca atgggcgggg acacctgttc tga	1533

<210> 37

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 37

gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc aatccagtca ctcttggaac atcagcttcc	60
atctcctgca ggcttagtaa gagtctccta catagtaatg gcatactta ttgtattgg	120
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcttgattt atcatatgtc caaccttgcc	180

tcaggagtcc cagacaggtt cactagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc	240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgcg ctcaaatct agaacttccg	300
ttcacgttcg gaggggggac caagctggaa acaaaacggg ctgatgctgc accaactgta	360
tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctgga	399

<210> 38

<211> 408

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 38

caggttcagc tccagcagtc tgggctgag ctggcaagac ctggggcttc agtgaaattg	60
tcctgcaagg ctcttgcta tacctttact acctactgga tgcagtgggt aaaacagagg	120

cctggacagg gtctggaatg gattgggtct atttacctg gagatggtga tactaggtac	180
actcagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagata aatcctccag cacagcctac	240
attcaactca gcaccttggc atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagaatac	300
tacggctctg actactggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagc caaaacaaca	360
gccccatcgg tctatccact ggccctgtg tgtggagata caactggc	408

<210> 39

<211> 657

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 39

gatattgtga tgacgcaggc tgcattctcc aatccagtca ctcttggaac atcagcttcc	60
atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta catagtaatg gcatactta ttgtattgg	120
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcttgattt atcatatgtc caaccttgcc	180
tcaggagtcc cagacaggtt cactagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc	240

agcagagtgg aggcctgagga tgtgggtgtt tattactgcg ctcaaaatct agaacttccg 300
 ttcacgttcg gaggggggac caagctggaa acaaacggg ctgatgctgc accaactgta 360
 tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 420
 ttgaacaact tciaccccaa agacatcaat gtcaagtga agattgatgg cagtgaacga 480

caaaatggcg tcctgaacag ttggactgat caggacagca aagacagcac ctacagcatg 540
 agcagcacc tcacgttgac caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag 600
 gccactcaca agacatcaac ttcacccatt gtcaagacct tcaacaggaa tgagtgt 657

<210> 40
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 40

caggttcagc tccagcagtc tgggctgag ctggcaagac ctggggcttc agtgaaattg 60
 tcctgcaagg ctcttgcta tacctttact acctactgga tgcagtgggt aaaacagagg 120
 cctggacagg gtctggaatg gattgggtct atttatcctg gagatggtga tactaggtac 180

actcagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagata aatcctccag cacagcctac 240
 attcaactca gcaccttggc atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagaatac 300
 tacggtcttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctcagc caaaacaaca 360
 gccccatcgg tctatccact ggccccctgtg tgtggagata caactggctc ctcggtgact 420
 ctaggatgcc tggtaagggt ttatttcct gagccagtga ccttgacctg gaactctgga 480
 tccctgtcca gtggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct ctacaccctc 540
 agcagctcag tgactgtaac ctgcagcacc tggcccagcc agtccatcac ctgcaatgtg 600

gcccacccgg caagcagcac caaggtggac aagaaaattg agcccagagg gccacaatc 660
 aagccctgtc ctccatgcaa atgccagca cctaacctct tgggtggacc atccgtcttc 720
 atcttcctc caaagatcaa ggatgtactc atgatctccc tgagcccat agtcacatgt 780
 gtggtggtgg atgtgagcga ggatgacca gatgtccaga tcagctggtt tgtgaacaac 840
 gtggaagtac acacagctca gacacaaacc catagagagg attacaacag tactctccgg 900
 gtggtcagtg ccttccccat ccagcaccag gactggatga gtggcaagga gttcaaatgc 960
 aaggtcaaca acaaagacct cccagcgcct atcgagagaa ccatctcaaa acccaaaggg 1020

tcagtaagag ctccacaggt atatgtcttg cctccaccag aagaagagat gactaagaaa 1080

caggtcactc tgacctgcat ggtcacagac ttcatgcctg aagacattta cgtggagtgg 1140
 accaacaacg ggaaaacaga gctaaactac aagaacactg aaccagtcct ggactctgat 1200
 ggttcttact tcatgtacag caagctgaga gtggaaaaga agaactgggt ggaaagaaat 1260
 agctactcct gttcagtggg ccacgagggt ctgcacaatc accacacgac taagagcttc 1320
 tcccggactc cgggtaaa 1338

<210> 41

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 41

ggctggagtt caatgaggtt tatTT 25

<210> 42

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 42

tccagcagat ttcagactaa gaaga 25

<210> 43

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 43

agaacatcat ccctgcctct actg 24

<210> 44

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 44

aaatgagctt gacaaagtgg tcgt 24

<210> 45

<211> 150

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Met Pro Leu Ser Leu Gly Ala Glu Met Trp Gly Pro Glu Ala Trp Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala Ser Phe Thr Gly Arg Cys Pro Ala Gly

20 25 30

Glu Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val Val Leu Gly Gln Asp Ala

35 40 45

Lys Leu Pro Cys Phe Tyr Arg Gly Asp Ser Gly Glu Gln Val Gly Gln

50 55 60

Val Ala Trp Ala Arg Val Asp Ala Gly Glu Gly Ala Gln Glu Leu Ala

65 70 75 80

Leu Leu His Ser Lys Tyr Gly Leu His Val Ser Pro Ala Tyr Glu Gly

85 90 95

Arg Val Glu Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asn Pro Leu Asp Gly Ser Val

100 105 110

Leu Leu Arg Asn Ala Val Gln Ala Asp Glu Gly Glu Tyr Glu Cys Arg

115 120 125

Val Ser Thr Phe Pro Ala Gly Ser Phe Gln Ala Arg Leu Arg Leu Arg

130 135 140

Val Leu Val Pro Pro Leu

145 150

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>

> 46

Ala Gly Glu Leu Glu Thr Ser Asp Val Val Thr Val Val Leu Gly Gln

1 5 10 15

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

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