



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월26일
(11) 등록번호 10-1951410
(24) 등록일자 2019년02월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C07K 16/22 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7021717
(22) 출원일자(국제) 2011년01월21일
심사청구일자 2016년01월05일
(85) 번역문제출일자 2012년08월20일
(65) 공개번호 10-2013-0004568
(43) 공개일자 2013년01월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2011/022125
(87) 국제공개번호 WO 2011/091305
국제공개일자 2011년07월28일
(30) 우선권주장
61/336,478 2010년01월22일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2005278631 A*
WO2004108748 A2*
WO2006118308 A1
EMBO J. 2006 Jan 11; 25(1): 80-87.
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
더 보드 어브 트러스티스 어브 더 리랜드 스탠포드 주니어 유니버시티
미국 94305-2038 캘리포니아주 스탠포드 피오 박스 20386 메인 퀴드 빌딩 170 3층 오피스 오브 더 체너럴 카운셀
(72) 발명자
기아시아, 아마토 제이
미국 캘리포니아 94305 스탠포드 에스플라나다 웨이 856
랜킨, 에린 브루노
미국 매사추세츠 02452 윌트햄 아파트 314 리저레인 271
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤의섭, 김수진

전체 청구항 수 : 총 7 항

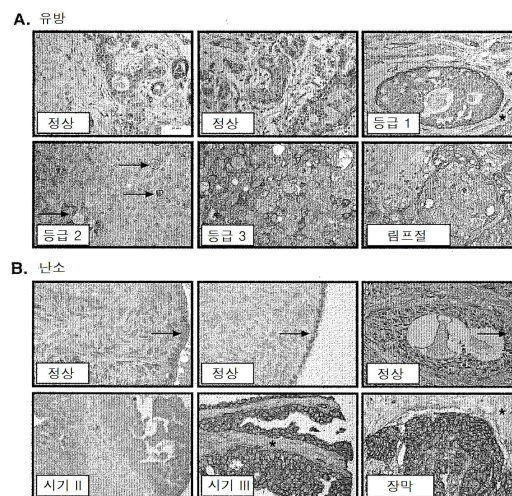
심사관 : 안규정

(54) 발명의 명칭 항-전이성 요법에서 AXL 신호전달의 저해

(57) 요약

예로써, AXL 및 이의 리간드 GAS6 사이에 결합 상호작용의 경쟁적 또는 비-경쟁적 저해에 의해 AXL 단백질의 활성을 저해하는 제약학적 조성물의 치료 용량을 투여함으로써, 포유동물에서 암을 경감하기 위한 조성물과 방법이 제시된다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

코크란, 제니퍼 알

미국 캘리포니아 94305 스탠포드 피터 쿡스 서클
86

존스, 더글라스

미국 매사추세츠 02141 케임브리지 케임브리지 스트리트 301 599

카리올리스, 미할리스

미국 캘리포니아 94305 스탠포드 옴스테드 로드
404 344

푸, 캐서린

미국 캘리포니아 94306 팔로 알토 사우스 캘리포니아 애비뉴 지200 155

미아오, 유

미국 캘리포니아 94087 서니배일 아파트 116 코너
마라 웨이 125

명세서

청구범위

청구항 1

가용성 AXL 변이체 폴리펩티드에 있어서, 상기 폴리펩티드는 AXL 막통과 도메인이 없고 야생형 AXL 서열(서열 번호:1)에 비하여 1) Gly32Ser, Asp87Gly, Val192Ala, 및 Gly127Arg, 2) Glu26Gly, Val179Met, Val192Ala, 및 Gly127Glu 3) Gly32Ser, Ala72Val, Asp87Gly, Val192Ala, 및 Gly127Arg로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 변형 세트를 가지고;

그리고 여기서 상기 변화는 GAS6에 대한 AXL 폴리펩티드 결합의 친화성을 증가시키고;

상기 아미노산의 변형 위치를 n으로 나타낼 때, $n \neq 7$ 은 서열 번호 :1의 넘버링(numbering)과 동일하며;

상기 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 야생형 AXL 폴리펩티드 및 GAS6 단백질 사이에 결합을 저해하는 것을 특징으로 하는 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

청구항 1에 있어서, 폴리펩티드는 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질인 것을 특징으로 하는 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 GAS6에 대하여 적어도 1×10^{-8} M 또는 1×10^{-9} M의

친화성을 갖는 것을 특징으로 하는 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

청구항 1, 10, 및 11 중 어느 하나 이상의 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드 또는 이의 제약학적으로 허용되는 염의 치료 유효량을 포함하는 항종양 제약학적 조성물.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 적어도 하나의 세포독성제 또는 제약학적으로 허용되는 부형제 또는 이들의 조합을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

청구항 15에 있어서, 포유동물 환자에서 종양의 전이 또는 침입을 치료하거나, 감소시키거나, 또는 예방하기 위한 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 28

청구항 27에 있어서, 상기 종양은 난소 종양, 유방 종양, 폐 종양, 간 종양, 결장 종양, 담낭 종양, 췌장 종양, 전립선 종양, 그리고 교아종으로 구성된 군에서 선택되는 종양인 것을 특징으로 하는 제약학적 조성물.

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 2010년 1월 22일자 제출된 U.S. 가출원 No. 61/336,478에 우선권을 주장하고, 이의 내용은 본 발명에 순전히 참조로서 편입된다.

[0002] 발명의 기술 분야

[0003] 본 발명은 종양 침입과 전이, 예를 들면, AXL 및/또는 GAS6에 관련된 경로를 통한 종양 침입 또는 전이의 치료 또는 진단에 관계한다.

배경 기술

[0004] 본 발명의 배경 기술

[0005] 침입과 전이는 암의 가장 잠재적이고 치명적인 면이다. 침입이 최소이거나 없는 종양은 성공적으로 제거될 수 있는 반면, 신생물이 일단 침해성이 되면, 이것은 림프관 및/또는 혈관 채널을 거쳐 복수의 부위로 파종될 수

있고, 그리고 완전한 제거가 매우 어려워진다. 침입과 전이는 2가지 과정을 통해 숙주를 죽인다: 국소 침입 및 원위 기관 콜로니형성 (organ colonization)과 손상. 국소 침입은 국소 압박, 국소 파괴, 또는 정상적인 기관 기능의 차단에 의해, 관련된 조직의 기능을 약화시킬 수 있다. 하지만, 암에서 가장 유의미한 전환점은 원위 전이의 확립이다. 환자는 이 시점에서, 국소 요법만으로는 더 이상 치료될 수 없다.

[0006] 전이 과정은 복잡한 숙주-종양 상호작용을 수반하는 연관된 순차적 단계의 캐스케이드이다. 이러한 복잡한 과정은 이들 세포가 혈관 또는 림프 순환 (lymphatic circulation) 내로 들어가고, 원위 혈관 또는 림프 층 (lymphatic bed)에서 정지하고, 기관 간극과 실질 내로 활발하게 일출하고, 그리고 이차 콜로니로서 증식하도록 요구한다. 전이 잠재력 (metastatic potential)은 국소 미소환경 (microenvironment), 혈관형성 (angiogenesis), 스트로마-종양 상호작용, 국소 조직에 의한 사이토킨의 동화 (elaboration), 그리고 종양과 숙주 세포의 분자 표현형 (molecular phenotype)에 의해 영향을 받는다.

[0007] 국소 미소침입은 비록 원위 파종 (distant dissemination)이 명백하지 않거나, 또는 아직 시작되지 않았을 지라도, 초기에 일어날 수 있다. 종양 세포는 상피 기적 막 (epithelial basement membrane)을 침투하고, 그리고 in situ에서 침해성 암종으로의 이행 동안 기초 간질성 스트로마로 들어간다. 일단 종양 세포가 기초 스트로마를 침입하면, 이들은 매트릭스 단편과 성장 인자를 방출하면서, 원위 파종을 위해 림프관과 혈관에 접근한다. 양성 암종에서 침해성 암종으로의 이행 동안 상피 기저 막의 조직화, 분포, 그리고 양에서 전반적이고 광범위한 변화가 일어난다.

[0008] 암 예방과 치료에서 치료 노력은 신호전달 경로 또는 선택성 조절 단백질의 수준에서 집중되고 있다. 단백질 키나아제 활성화, 칼슘 항상성, 그리고 종양단백질 활성화는 주동 신호 (driving signal)이고, 따라서 치료 개입을 위한 핵심적인 조절 부위 (regulatory site)일 수 있다. 침입과 혈관형성을 조절하는 신호전달 경로에서 키나아제는 전이의 중요한 조절인자일 수 있다. 생화학적 분자 표적의 최대 부류 중에서 한 가지는 수용체 티로신 키나아제 (RTKs)의 패밀리아다. 현재까지 가장 일반적인 수용체 티로신 키나아제 분자 표적은 EGF와 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 수용체이다. 더욱 새로운 키나아제 분자 표적에는 c-kit, 그리고 abl의 타입 III RTK 패밀리가 포함된다. 이들 분자의 저해물질은 고전적인 화학치료제와 공동으로 투여되고 있다.

[0009] 전이는 궁극적으로, 암으로부터 많은 고통과 사망의 원인이 된다. 전이성 암 세포를 확정짓는 분자 마커와 기능적 마커를 확인하고 표적으로 하며, 그리고 이들의 특이적 저해를 위한 시제를 산출하는 것이 요구된다.

[0010] 이러한 분야에서 간행물에는 특히, Li et al. Oncogene. (2009) 28(39) :3442-55; United States Patent Application, 20050186571 (Ullrich et al.); United States Patent Application 20080293733 (Bearss et al.); Sun et al. Oncology. 2004;66(6):450-7; Gustafsson et al. Clin Cancer Res. (2009) 15(14):4742-9; Wimmel et al. Eur J Cancer. 2001 37(17):2264-74; Koorstra et al. Cancer Biol Ther. 2009 8(7):618-26; Tai et al. Oncogene. (2008) 27(29) :4044-55가 포함된다.

[0011] 수용체 티로신 키나아제 AXL (일명, Ufo와 Tyro7)은 Tyro3 (Sky)과 Mer (Tyro2)을 포함하는 티로신 수용체의 패밀리에 속한다. AXL 패밀리에 대한 공통의 리간드는 GAS6 (성장 정지-특이적 단백질 6, growth arrest-specific protein 6)이다. 인간 AXL은 894-아미노산 폴리펩티드의 합성을 주동할 수 있는 2,682-bp 개방 해독틀 (open reading frame)이다. 2가지 변이체 mRNA가 특성화되었는데, 전사체 변이체 1은 Genbank, NM_021913.3에서 접근될 수 있고, 그리고 전사체 변이체 2는 NM_001699.4에서 접근될 수 있다. 이러한 고유 단백질의 폴리펩티드 서열은 서열 번호:1로서 제공되고, 그리고 아미노산 변형에 관련하여 상기 서열이 특정하게 참조될 수 있다. GAS6/AXL의 중요한 세포 기능에는 세포 부착, 이동, 식작용, 그리고 아포토시스의 저해가 포함된다. GAS6과 AXL 패밀리 수용체는 조직과 질병 특이적 방식으로 고도로 조절된다.

[0012] AXL은 세포내 영역이 수용체 티로신 키나아제의 전형적인 구조를 갖고, 그리고 세포외 도메인이 카데린-유형 부착 분자에 유사한 피브로넥틴 III과 Ig 모티프를 내포한다는 점에서, 독특한 분자 구조로 특징된다. 발달 동안, AXL은 뇌를 비롯한 다양한 기관에서 발현되는데, 이것은 RTK가 간엽과 신경 발달에 관련된다는 것을 암시한다. 성체에서, AXL 발현은 낮지만 다양한 종양에서 높은 발현 수준으로 환원된다. GAS6는 현재까지, AXL에 대한 유일한 활성화 리간드이다.

[0013] 수용체 티로신 키나아제 (RTK)는 일반적으로, 수용체 이량체화 (dimerisation)를 촉진하고, 차례로 세포질 도메인 내에서 티로신 잔기의 자가인산화 (autophosphorylation)를 촉진하는 리간드에 의해 활성화된다. 그 다음, 이들 인산화된 티로신 잔기에 신호전달 단백질의 결합은 하류 신호전달을 유발한다. AXL 패밀리 RTK는 그들이 전형적인 성장 인자보다는 혈액 응고 인자에 가까운 비타민 K-의존성 단백질 패밀리의 구성원인 GAS6에 의해 활

성화된다는 점에서 독특하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 요약

[0015] 본 발명은 AXL 및/또는 GAS6 관련된 경로가 종양 침입 및/또는 전이에 관련된다는 발견에 부분적으로 기초한다. 따라서 본 발명에서는 예로써, AXL 및/또는 GAS6 관련된 경로의 저해를 통해 종양 침입 및/또는 전이를 치료하는데 유용한 조성물과 방법을 제시한다. 이에 더하여, 본 발명에서는 예로써, AXL 및/또는 GAS6의 활성의 수준을 검출함으로써, 종양이 침해성 및/또는 전이성이 되는 감수성 (susceptibility) 또는 가능성 (likelihood)을 결정하는데 유용한 시제와 방법을 제시한다.

[0016] 한 구체예에서, 본 발명에서는 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드를 제시하고, 여기서 상기 폴리펩티드는 AXL 막통과 도메인, 그리고 선택적으로 세포내 도메인이 없고 야생형 AXL 서열에 비하여 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함하고, 그리고 여기서 상기 변화는 GAS6에 대한 AXL 폴리펩티드 결합의 친화성을 증가시킨다. 일부 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 야생형 AXL 서열 (서열 번호:1)의 1) 15 내지 50, 2) 60 내지 120, 그리고 3) 125 내지 135로 구성된 군에서 선택되는 영역 내에서 적어도 하나의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 다른 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 야생형 AXL 서열 (서열 번호: 1)의 위치 19, 23, 26, 27, 32, 33, 38, 44, 61, 65, 72, 74, 78, 79, 86, 87, 88, 90, 92, 97, 98, 105, 109, 112, 113, 116, 118, 127 또는 129에서 적어도 하나의 아미노산 변형 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 다른 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 1) A19T, 2) T23M, 3) E26G, 4) E27G 또는 E27K, 5) G32S, 6) N33S, 7) T38I, 8) T44A, 9) H61Y, 10) D65N, 11) A72V, 12) S74N, 13) Q78E, 14) V79M, 15) Q86R, 16) D87G, 17) D88N, 18) I90M 또는 I90V, 19) V92A, V92G 또는 V92D, 20) I97R, 21) T98A 또는 T98P, 22) T105M, 23) Q109R, 24) V112A, 25) F113L, 26) H116R, 27) T118A, 28) G127R 또는 G127E, 그리고 29) G129E로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 변형 및 이들의 조합과 보존성 증가물을 포함한다.

[0017] 또 다른 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 하기 위치에서 야생형 AXL 서열 (서열 번호: 1)에 비하여 아미노산 변화를 포함한다: (a) 글리신 32; (b) 아스파르트산 87; (c) 발린 92; 그리고 (d) 글리신 127. 또 다른 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 세린 잔기로 대체된 글리신 32 잔기, 글리신 잔기로 대체된 아스파르트산 87 잔기, 알라닌 잔기로 대체된 발린 92 잔기, 또는 아르기닌 잔기로 대체된 글리신 127 잔기, 또는 이들의 조합 또는 보존성 증가물을 내포한다. 또 다른 일부 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 하기 위치에서 야생형 AXL 서열 (서열 번호: 1)에 비하여 아미노산 변화를 포함한다: (a) 글루타민산 26; (b) 발린 79; (c) 발린 92; 그리고 (d) 글리신 127. 또 다른 일부 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 글리신 잔기로 대체된 글루타민산 26 잔기, 메티오닌 잔기로 대체된 발린 79 잔기, 알라닌 잔기로 대체된 발린 92 잔기, 또는 글루타민산 잔기로 대체된 글리신 127 잔기, 또는 이들의 조합 또는 보존성 증가물을 내포한다.

[0018] 또 다른 일부 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 야생형 AXL 폴리펩티드 (서열 번호: 1)의 아미노산 영역 1-437, 19-437, 130-437, 19-132, 1-132로 구성된 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 영역을 포함한다. 또 다른 일부 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 Fc 도메인을 포함하는 융합 단백질이다.

[0019] 한 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 GAS6에 대한 적어도 대략 1×10^{-5} M의 친화성을 갖는다. 다른 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 GAS6에 대한 적어도 대략 1×10^{-6} M의 친화성을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 GAS6에 대한 적어도 대략 1×10^{-7} M의 친화성을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 GAS6에 대한 적어도 대략 1×10^{-8} M의 친화성을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 GAS6에 대한 적어도 대략 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 또는 1×10^{-12} M의 친화성을 갖는다. 본 명세서에서 기술된 다양한 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 GAS6에 대하여, 야생형 AXL 폴리펩티드의 친화성보다 적어도 대략 2-배 강한 친화성을 나타낸다. 일부 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 GAS6에 대하여, 야생형 AXL 폴리펩티드의 친화성보다 적어도 대략 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 15-배, 20-배, 25-배, 또는 30-배 강한 친화성을 나타낸다.

[0020] 다른 구체예에서, 본 발명에서는 GAS6 단백질 (서열 번호: 2)에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 또는 이들의

단편을 제시한다. 일부 구체예에서, 단리된 항체 또는 이의 단편은 단일클론 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단일 사슬 항체 (ScFv), 또는 이들의 조합이다. 일부 다른 구체예에서, 단리된 항체 또는 이의 단편은 R299-T317, V364-P372, R389-N396, D398-A406, E413-H429, 그리고 W450-M468로 구성된 군에서 선택되는 GAS6의 하나 또는 그 이상의 아미노산 영역에 포함되는 에피토프에 결합한다. 또 다른 구체예에서, 단리된 항체 또는 이의 단편은 RMFSGTPVIRLRFKRLQPT (서열 번호: 3), VGRVTSSGP (서열 번호: 4), RNLVIKVN (서열 번호: 5), DAVMKIAVA (서열 번호: 6), ERGLYHLNLTVGGIPIFH (서열 번호: 7), 그리고 WLNGEDTTIQETVKVNTRM (서열 번호: 8)으로 구성된 군에서 선택되는 아미노산 영역에 포함되는 에피토프에 결합한다.

[0021] 또 다른 구체예에서, 본 발명에서는 포유동물 환자에서 종양의 전이 또는 침입을 치료하거나, 감소시키거나, 또는 예방하는 방법을 제시한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드, 또는 단리된 항-GAS6 항체 또는 이의 단편의 효과 용량을 상기 환자에 투여하는 단계를 포함한다.

[0022] 또 다른 구체예에서, 본 발명에서는 포유동물 환자에서 종양의 전이 또는 침입을 치료하거나, 감소시키거나, 또는 예방하는 방법을 제시한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 (a) AXL 활성의 저해물질 (b) GAS6 활성의 저해물질; 그리고 (c) AXL-GAS6 상호작용의 저해물질로 구성된 군에서 선택되는 하나 또는 그 이상의 저해물질을 투여하는 단계를 포함한다. 본 명세서에 기술된 다양한 구체예에서, 저해물질은 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 소형 분자, 항체, 항체 단편, 또는 항체 약물-접합체이다.

[0023] 또 다른 구체예에서, 본 발명에서는 개체에서 침입 또는 전이를 겪는 종양의 능력을 결정하는 방법을 제시한다. 한 구체예에서, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: 종양을 앓는 개체로부터 생물학적 샘플에서 AXL 활성 및/또는 GAS6 활성의 수준을 검출하는 단계; 그리고 생물학적 샘플에서 AXL 활성 및/또는 GAS6 활성의 수준을 미리 결정된 수준과 비교하는 단계, 여기서 미리 결정된 수준을 초과하는 증가는 침입 또는 전이에 대한 종양의 소인을 지시한다.

과제의 해결 수단

[0024] 정의

[0025] 하기 설명에서, 세포 배양 분야에서 전통적으로 이용되는 다수의 용어가 폭넓게 이용된다. 명세서와 특허청구범위, 그리고 이런 용어에 부여되는 범위의 명확하고 일관된 이해를 제공하기 위해, 하기 정의가 제공된다.

[0026] 전이성 세포 또는 이의 리간드 GAS6 상에서 AXL의 "저해물질", "활성자", 그리고 "조절자"는 수용체 또는 리간드 결합 또는 신호전달에 대한 시험관내와 생체내 분석평가를 이용하여 확인된, 각각 저해 분자, 활성 분자, 또는 조절 분자, 예를 들면, 리간드, 수용체, 작용약, 길항약, 그리고 이들의 동족체 (homolog)와 모방체 (mimetic)를 지칭하는데 이용된다.

[0027] 본 명세서에서, 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 동의어로 이용되고 아미노산 잔기의 중합체를 지칭한다. 상기 용어는 자연 발생 아미노산 중합체와 비-자연 발생 아미노산 중합체뿐만 아니라, 하나 또는 그 이상의 아미노산 잔기가 상응하는 자연 발생 아미노산의 인공 화학적 모방체인 아미노산 중합체에 적용된다.

[0028] 용어 "아미노산"은 자연 발생과 합성 아미노산, 그리고 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체와 아미노산 모방체를 지칭한다. 자연 발생 아미노산은 유전자 코드 (genetic code)에 의해 인코딩된 아미노산, 그리고 이후에 변형된 아미노산, 예를 들면, 히드록시프롤린, 감마-카르복시글루타메이트, 그리고 O-포스포세린이다. 아미노산 유사체는 자연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 다시 말하면, 수소에 결합된 알파 탄소, 카르복실 기, 아미노 기, 그리고 R 기를 갖는 화합물, 예를 들면, 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설폭시드, 메티오닌 메틸 설폭소를 지칭한다. 이런 유사체는 변형된 R 기 (가령, 노르류신) 또는 변형된 펩티드 골격을 갖지만, 자연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 보전한다. 아미노산 모방체는 아미노산의 일반적인 화학 구조와 상이한 구조를 갖지만, 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 화학적 화합물을 지칭한다. 아미노산을 표현하기 위해 본 발명에서 이용된 모든 단일 문자는 당분야에서 일과적으로 이용되는 인정된 아미노산 기호에 따라 이용된다, 예를 들면, A는 알라닌을 의미하고, C는 시스테인을 의미한다. 아미노산은 최초 아미노산 (위치 앞에)에서 변경된 아미노산 (위치 뒤에)으로의 변화를 반영하기 위해, 관련된 위치 전후에 단일 문자에 의해 표현된다. 가령, A19T는 위치 19에서 아미노산 알라닌이 트레오닌으로 변경된다는 것을 의미한다.

[0029] 본 명세서에서, 용어 "개체", "개인" 및 "환자"는 동의어로 이용되고 치료를 위해 평가되는 및/또는 치료되는 포유동물을 지칭한다. 한 구체예에서, 포유동물은 인간이다. 따라서 용어 "개체", "개인" 및 "환자"는 암성 조

직을 제거하기 위해 절제(술)을 받았거나 받을 예정인 개체를 비롯하여, 난소 또는 전립선의 선암종, 유방 암, 교아종 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는 암을 앓는 개체를 포함한다. 개체는 인간뿐만 아니라, 다른 포유 동물, 특히 인간 질병에 대한 실험실 모형으로서 유용한 포유동물, 예를 들면, 생쥐, 쥐 등을 포함할 수 있다.

[0030] 본 명세서에서, 용어 "종양"은 악성 또는 양성에 상관없이 모든 신생물 세포 성장과 증식, 그리고 모든 전-암성과 암성 세포와 조직을 지칭한다.

[0031] 본 명세서에서, 용어 "암", "신생물" 및 "종양"은 동의어로 이용되고 자발적인 통제되지 않은 성장을 나타내는 세포를 지칭하고, 따라서 이들은 세포 증식에 대한 제어의 유의미한 상실로 특징되는 비정상적 성장 표현형을 나타낸다. 일반적으로, 본 출원에서 검출, 분석, 분류, 또는 치료를 위한 목적되는 세포에는 전암성 (가령, 양성), 악성, 전-전이성, 전이성, 그리고 비-전이성 세포가 포함된다. 암의 실례에는 난소 암, 교아종, 유방 암, 결장 암, 폐 암, 전립선 암, 간세포 암, 위 암, 췌장 암, 자궁경부 암, 난소 암, 간 암, 방광 암, 요로의 암, 갑상선 암, 신장 암, 암종, 흑색종, 두경부 암, 그리고 뇌 암이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0032] 암의 "병리"에는 환자의 복지를 악화시키는 모든 현상이 포함된다. 여기에는 제한 없이, 비정상적인 또는 제어되지 않은 세포 성장, 전이, 이웃 세포의 정상적인 기능의 간섭, 비정상적인 수준으로 사이토킨 또는 기타 분비산물의 방출, 염증 반응 또는 면역 반응의 억제 또는 악화, 신조직형성, 전암성, 악성, 주변 또는 원위 조직 또는 기관, 예를 들면, 림프절의 침입 등이 포함된다.

[0033] 본 명세서에서, 용어 "암 재발", "종양 재발" 및 이들의 문법적 변이체는 암의 진단후 신생물 또는 암성 세포의 진단된 성장을 지칭한다. 특히, 재발은 진단된 암성 세포 성장이 암성 조직에서 일어날 때 발생할 수 있다. "종양 확산"은 유사하게, 종양 세포가 국소 또는 원위 조직과 기관으로 파종할 때 발생한다; 이런 이유로, 종양 확산은 종양 전이를 포함한다. "종양 침입"은 종양 성장이 국소적으로 확산되어 정상적인 기관 기능의 압박, 파괴, 또는 차단에 의해 관련된 조직의 기능이 약화될 때 발생한다.

[0034] 본 명세서에서, 용어 "전이"는 최초 암성 종양의 기관에 직접적으로 연결되지 않은 기관 또는 신체 일부에서 암성 종양의 성장을 지칭한다. 전이는 최초 암성 종양의 기관에 직접적으로 연결되지 않은 기관 또는 신체 일부에서 암성 세포가 검출되지 않는 양으로 존재하는 미소전이를 포함하는 것으로 이해될 것이다. 전이는 또한, 과정의 몇몇 단계, 예를 들면, 최초 종양 부위로부터 암 세포의 이탈, 그리고 암 세포의 다른 신체 부위로의 이동 및/또는 침입으로서 정의될 수 있다. 이런 이유로, 본 발명은 최초 암성 종양의 기관에 직접적으로 연결되지 않은 기관 또는 신체 일부에서 하나 또는 그 이상의 암성 종양의 진단된 성장 및/또는 이러한 성장에 이르는 과정에서 임의의 단계의 위험을 결정하는 방법을 예기한다.

[0035] 암의 성격에 따라, 적절한 환자 샘플이 획득된다. 본 명세서에서, 구(句) "암성 조직 샘플"은 암성 종양으로부터 획득된 임의의 세포를 지칭한다. 전이되지 않은 고형 종양의 경우에, 외과적으로 제거된 종양으로부터 조직 샘플은 전형적으로, 전통적인 기술에 의한 시험을 위해 획득되고 준비될 것이다.

[0036] 상기 정의는 생물학적 기원의 혈액과 기타 유체 샘플, 고형 조직 샘플, 예를 들면, 생검 표본 또는 조직 배양액, 또는 이들로부터 유래된 세포와 이들의 자손을 포함한다. 상기 정의는 또한, 획득 이후에 임의의 방식으로, 예를 들면, 시제로 처리; 세척; 또는 일정한 세포 집단, 예를 들면, 암 세포에 대한 농축 (enrichment)에 의해 조작된 샘플을 포함한다. 상기 정의는 또한, 특정 유형의 분자, 예를 들면, 핵산, 폴리펩티드 등에 대하여 농축된 샘플을 포함한다. 용어 "생물학적 샘플"은 임상적 샘플을 포함하고, 또한 외과적 절제에 의해 획득된 조직, 생검에 의해 획득된 조직, 배양 중인 세포, 세포 상층액, 세포 용해물, 조직 샘플, 기관, 골수, 혈액, 혈장, 혈청 등을 포함한다. "생물학적 샘플"에는 환자의 암 세포로부터 획득된 샘플, 예를 들면, 환자의 암 세포로부터 획득되는 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드를 포함하는 샘플 (가령, 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드를 포함하는 세포 용해물 또는 기타 세포 추출물); 그리고 환자로부터 암 세포를 포함하는 샘플이 포함된다. 환자로부터 암 세포를 포함하는 생물학적 샘플은 또한, 비-암성 세포를 포함할 수 있다.

[0037] 본 명세서에서, 용어 "진단"은 분자 또는 병리학적 상태, 질병 또는 장애의 확인, 예를 들면, 유방 암, 전립선 암, 또는 기타 유형의 암의 분자 아류형의 확인을 지칭한다.

[0038] 본 명세서에서, 용어 "예후"는 신생물 질병, 예를 들면, 난소 암의 재발, 전이성 확산, 그리고 약물 내성 (drug resistance)을 비롯한, 암-기인한 사망 또는 진행의 가능성의 예측을 지칭하는데 이용된다. 본 명세서에서, 용어 "예측"은 관찰 결과, 경험, 또는 과학적 추론 (scientific reasoning)에 기초하여, 예언하거나 판단하는 행동을 지칭하는데 이용된다. 한 실례에서, 의사는 환자가 일정한 기간 동안 암 재발없이 원발성 종양 및/또는 화학요법의 외과적 제거 이후에, 생존할 가능성을 예측할 수 있다.

- [0039] 본 명세서에서, 용어 "치료," "치료하는" 등은 효과를 얻기 위한 목적으로, 작용제를 투여하거나, 또는 절차 (가령, 방사, 외과적 절차 등)를 수행하는 것을 지칭한다. 효과는 질병 또는 이의 증상을 완전하게 또는 부분적으로 예방하는 관점에서 예방적일 수 있고 및/또는 질병 및/또는 질병의 증상에 대한 부분적인 또는 완전한 치료를 달성하는 관점에서 치료적일 수 있다. 본 명세서에서, "치료"는 포유동물, 특히 인간에서 임의의 전이성 종양의 치료를 커버하고, 그리고 (a) 질병 (가령, 원발성 질병과 연관되거나 원발성 질병에 의해 유발되는 질병 포함)의 소인이 있지만 아직 진단되지 않은 개체에서 질병 또는 질병의 증상이 발생하는 것을 예방하고; (b) 질병을 저해하고, 다시 말하면, 이의 발달을 정지시키고; 그리고 (c) 질병을 경감시키고, 다시 말하면, 질병의 퇴행을 유발하는 것을 포함한다. 종양 (가령, 암) 치료에서, 치료제는 종양 세포의 전이를 직접적으로 감소시킬 수도 있다.
- [0040] 치료는 임의의 객관적 또는 주관적 파라미터, 예를 들면, 경감; 완화; 증상의 소멸 또는 환자가 질병 상태에 더욱 내성이 되도록 만듦; 악화 또는 쇠퇴의 속도의 늦춤; 또는 악화의 최종점에서 덜 쇠약해지도록 만듦을 비롯하여, 암의 치료 또는 개선 또는 예방에서 성공의 임의의 징후 (indicia)를 지칭할 수도 있다. 증상의 치료 또는 개선은 의사에 의한 검사의 결과를 비롯한 주관적 또는 객관적 파라미터에 기초될 수 있다. 따라서 용어 "치료하는"은 신조직형성, 예를 들면, 종양 또는 암과 연관된 증상 또는 장애의 발생을 예방하거나 지연시키거나, 경감하거나, 또는 정지시키거나 저해하기 위해 본 발명의 화합물 또는 작용제의 투여를 포함한다. 용어 "치료 효과"는 개체에서 질병, 질병의 증상, 또는 질병의 부작용의 감소, 소멸, 또는 예방을 지칭한다.
- [0041] "와 공동으로", "복합 요법" 및 "복합 산물"은 일부 구체예에서, 첫 번째 치료제 및 본 명세서에서 이용된 화합물의 환자에 동반 투여를 지칭한다. 공동으로 투여될 때, 각 성분은 동일한 시점에, 또는 상이한 시점에서 임의의 순서로 순차적으로 투여될 수 있다. 따라서 각 성분은 원하는 치료 효과를 제공하기 위해 별개로, 하지만 시간적으로 충분히 가깝게 투여될 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따라서, 첫 번째 치료제는 임의의 적절한 치료제, 예를 들면, 세포독성제일 수 있다. 세포독성제의 한 가지 예시적인 부류는 화학치료제이다, 예를 들면, 이들은 AXL 또는 GAS6 신호전달을 저해하는 치료제와 병용될 수 있다. 예시적인 화학치료제에는 알데스류킨 (aldesleukin), 알트레타민 (altretamine), 아마포스틴 (amifostine), 아스파라기나아제 (asparaginase), 블레오마이신 (bleomycin), 카페시타빈 (capecitabine), 카르보플라틴 (carboplatin), 카르무스틴 (carmustine), 클라드리빈 (cladribine), 시사프라이드 (cisapride), 시스플라틴 (cisplatin), 시클로포스파미드 (cyclophosphamide), 시타라빈 (cytarabine), 다카르바진 (dacarbazine) (DTIC), 닥티노마이신 (dactinomycin), 도세탁셀 (docetaxel), 독소루비신 (doxorubicin), 드로나비놀 (dronabinol), 듀오카르마이신 (duocarmycin), 에포에틴 알파 (epoetin alpha), 에토포시드 (etoposide), 필그라스티민 (filgrastim), 플루다라빈 (fludarabine), 플루오르우라실 (fluorouracil), 겔시타빈 (gemcitabine), 그라니세트론 (granisetron), 히드록시우레아 (hydroxyurea), 이다루비신 (idarubicin), 이포스파미드 (ifosfamide), 인터페론 알파 (interferon alpha), 이리노테칸 (irinotecan), 란소프라졸 (lansoprazole), 레바미솔 (levamisole), 류코보린 (leucovorin), 메게스트롤 (megestrol), 메스나 (mesna), 메토트렉세이트 (methotrexate), 메토클로프라미드 (metoclopramide), 미토마이신 (mitomycin), 미토탄 (mitotane), 미톡산트론 (mitoxantrone), 오메프라졸 (omeprazole), 온단세트론 (ondansetron), 파클리탁셀 (paclitaxel) (TaxolTM), 필로카르핀 (pilocarpine), 프로클로페라진 (prochloroperazine), 리툽시맙 (rituximab), 사프로인 (saproin), 타목시펜 (tamoxifen), 탁솔 (taxol), 토포테칸 염산염 (topotecan hydrochloride), 트라스투주맙 (trastuzumab), 빈블라스틴 (vinblastine), 빈크리스틴 (vincristine) 및 비노렐빈 타르트레이트 (vinorelbine tartrate)가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 난소 암 치료를 위하여, AXL 또는 GAS6 신호전달 저해물질과 병용될 수 있는 바람직한 화학치료제는 파클리탁셀 (TaxolTM)이다.
- [0043] 다른 복합 요법은 방사선 요법, 수술, 그리고 호르몬 박탈 (hormone deprivation)이다 (Kwon et al, Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A., 96: 15074-9, 1999). 혈관형성 저해물질 역시 본 발명의 방법과 병용될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 제약학적 조성물과 함께 공지된 암 치료 약물의 "동반 투여"는 공지된 약물과 본 발명의 조성물이 치료 효과를 나타내는 시점에서 상기 약물과 AXL 저해물질의 투여를 의미한다. 이런 동반 투여는 본 발명의 화합물의 투여에 관련하여, 약물의 동시 (즉, 동일 시점에), 이전, 또는 차후 투여를 수반할 수 있다. 당업자는 특정 약물과 본 발명의 조성물에 대한 투여의 적절한 타이밍, 순서와 용량을 어려움 없이 결정할 것이다.
- [0045] 본 명세서에서, 구(句) "질병-없는 생존"은 환자의 수명에 대한 암의 효과와 관련하여, 이런 종양 재발 및/또는 확산 및 진단후 환자의 죽음의 부재를 지칭한다. 구(句) "전체 생존 (overall survival)"은 환자에서 사망 원인이 암의 효과에 직접적으로 기인하지 않을 가능성에도 불구하고, 진단후 환자의 죽음을 지칭한다. 구(句), "질

병-없는 생존의 가능성", "재발의 위험" 및 이들의 변이체는 암의 진단에 후속으로 환자에서 종양 재발 또는 확산의 가능성을 지칭하고, 여기서 이러한 가능성은 본 발명의 방법에 따라 결정된다.

[0046] 본 명세서에서, 용어 "상관한다" 또는 "와 상관한다" 및 유사한 용어는 2가지 사건의 사례 간에 통계학적 연관성 (statistical association)을 지칭하고, 여기서 사건은 숫자, 데이터 세트 등을 포함한다. 가령, 이들 사건이 숫자와 관련될 때, 양성 상관 (positive correlation) (일명, "직접적인 상관")은 하나가 증가함에 따라서, 다른 것도 증가한다는 것을 의미한다. 음성 상관 (negative correlation) (일명, "역 상관")은 하나가 증가함에 따라서, 다른 것은 감소한다는 것을 의미한다.

[0047] "투약 단위 (dosage unit)"는 치료되는 특정 개체에 대한 단위 용량 (unitary dosage)으로 적합한 물리적으로 별개의 단위를 지칭한다. 각 단위는 필요한 제약학적 담체와 함께, 원하는 치료 효과(들)를 산출하도록 계산된 미리 결정된 양의 활성 화합물(들)을 내포할 수 있다. 투약 단위 형태에 대한 명세는 (a) 활성 화합물(들) 및 달성되는 특정 치료 효과(들)의 독특한 특징, 그리고 (b) 이런 활성 화합물(들)을 합성하는 분야에서 내재된 제한에 의해 결정될 수 있다.

[0048] "제약학적으로 허용되는 부형제"는 전반적으로 안전하고, 비-독성이고, 그리고 바람직한 제약학적 조성물을 제조하는데 유용한 부형제를 의미하고, 그리고 인간 제약학적 용도뿐만 아니라 수의학적 용도를 위해 허용되는 부형제를 포함한다. 이런 부형제는 고형, 액상, 반고형, 또는 에어로졸 조성물의 경우에, 가스일 수 있다.

[0049] "제약학적으로 허용되는 염과 에스테르"는 제약학적으로 허용되는 염과 에스테르를 의미하고 바람직한 약리학성질을 갖는다. 이런 염에는 화합물 내에 존재하는 산성 양성자 (acidic proton)가 무기 또는 유기 염기와 반응할 있는 경우에 형성될 수 있는 염이 포함된다. 적절한 무기 염에는 알칼리성 금속, 예를 들면, 나트륨과 칼륨, 마그네슘, 칼슘, 그리고 알루미늄으로 형성된 것들이 포함된다. 적절한 유기 염에는 유기 염기, 예를 들면, 아민 염기, 예를 들면, 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 트로메타민, N 메틸글루카민 등으로 형성된 것들이 포함된다. 이런 염에는 또한, 무기 산 (가령, 염화수소산과 브롬화수소산) 및 유기 산 (가령, 아세트산, 시트르산, 말레산, 그리고 알칸-과 아렌-설폰산, 예를 들면, 메탄설폰산과 벤젠설폰산)으로 형성된 산 부가 염이 포함된다. 제약학적으로 허용되는 에스테르에는 화합물 내에 존재하는 카르복시, 설포닐옥시, 그리고 포스포녹시 기, 예를 들면, C₁₋₆ 알킬 에스테르로부터 형성된 에스테르가 포함된다. 2개의 산성 기가 존재할 때, 제약학적으로 허용되는 염 또는 에스테르는 모노-산-모노-염 또는 에스테르, 또는 디-염 또는 에스테르일 수 있다; 그리고 유사하게, 2개 이상의 산성 기가 존재하는 경우에, 이런 기 중에서 일부 또는 전부는 염화 또는 에스테르화될 수 있다. 본 발명에서 명명된 화합물은 염화되지 않은 또는 에스테르화되지 않은 형태, 또는 염화된 및/또는 에스테르화된 형태로 존재할 수 있고, 그리고 이런 화합물의 명명은 최초 (염화되지 않고 에스테르화되지 않은) 화합물 및 이의 제약학적으로 허용되는 염과 에스테르 둘 모두를 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 본 발명에서 명명된 일정한 화합물은 한 가지 이상의 입체이성질체성 형태로 존재할 수 있고, 그리고 이런 화합물의 명명은 모든 단일 입체이성질체 및 이런 입체이성질체의 모든 혼합물 (라세미 또는 그렇지 않은 지에 상관없이)을 포함하는 것으로 의도된다.

[0050] 용어 "제약학적으로 허용되는", "생리학적으로 관용되는" 및 이들의 문법적 이형은 이들이 조성물, 담체, 희석제 및 시제와 관련될 때 동의어로 이용되고, 그리고 이들 물질이 조성물의 투여가 금지될 정도까지 바람직하지 않은 생리학적 효과를 유발하지 않으면서, 인간에게 투여될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0051] "치료 효과량"은 질병을 치료하기 위해 개체에 투여될 때, 상기 질병에 대한 치료를 달성할 만큼 충분한 양을 의미한다.

[0052] 상세한 설명

[0053] 본 발명에 따라서, 가용성 AXL 변이체, 예를 들면, 야생형 AXL 폴리펩티드의 결합 활성과 실질적으로 동등하거나 이보다 높은, GAS6에 대한 결합 활성을 갖는 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드가 제시된다. 본 발명의 일부 구체예에서, 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드는 치료제로서 이용된다.

[0054] AXL 단백질은 서열 번호: 1의 고유 서열과 관련하여, 잔기 27-128로부터 면역글로불린 (Ig)-유사 도메인, 잔기 139-222로부터 두 번째 Ig-유사 도메인, 잔기 225-332와 333-427로부터 피브로넥틴 타입 3 도메인, 티로신 키나아제 도메인을 포함하는 잔기 473-894로부터 세포내 도메인을 포함한다. 779, 821과 866에서 티로신 잔기는 수용체 이량체화 시에 자가인산화되고 세포내 신호전달 분자에 대한 도킹 부위 (docking site)로서 기능한다. 폴

리펩티드의 가용성 형태를 방출하는 고유 절단 부위는 잔기 437-451에 있다.

- [0055] 본 발명에서, AXL의 가용성 형태는 인식가능한 친화성, 예를 들면, 높은 친화성으로 GAS6에 결합할 만큼 충분한 상기 폴리펩티드의 일부이고, 이것은 정상적으로, 신호 서열과 막통과 도메인 사이에, 다시 말하면, 일반적으로 대략 서열 번호:1 잔기 19-437에 위치하지만, 대략 잔기 19, 25, 30, 35, 40, 45, 50에서부터 대략 잔기 132, 450, 440, 430, 420, 410, 400, 375, 350까지, 321까지의 절두된 이형 (truncated version), 예를 들면, 잔기 19-132을 포함하거나 이것으로 본질적으로 구성될 수 있다. 일부 구체예에서, AXL의 가용성 형태는 막통과 도메인, 그리고 선택적으로 세포내 도메인이 없다.
- [0056] 본 발명의 가용성 AXL 변이체 폴리펩티드 (sAXL 변이체)는 야생형 AXL의 가용성 형태 내에 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형, 예를 들면, GAS6에 대한 친화성을 증가시키는 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함한다. 본 발명에 따라서, 아미노산 변형에는 당분야에 공지되거나 차후에 발견되는 임의의 자연 발생 또는 합성 아미노산 변형이 포함된다. 일부 구체예에서, 아미노산 변형에는 임의의 자연 발생 돌연변이, 예를 들면, 치환, 결실, 부가, 삽입 등이 포함된다. 일부 다른 구체예에서, 아미노산 변형에는 기존 아미노산의 다른 아미노산, 예를 들면, 이의 보존성 등가물로 대체가 포함된다. 또 다른 구체예에서, 아미노산 변형에는 하나 또는 그 이상의 기존 아미노산의 비-자연 아미노산으로 대체, 또는 하나 또는 그 이상의 비-자연 아미노산의 삽입이 포함된다. 또 다른 일부 구체예에서, 아미노산 변형에는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 또는 10개 아미노산 돌연변이 또는 변경이 포함된다.
- [0057] 일부 예시적인 구체예에서, 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형은 AXL의 가용성 형태의 성질을 변경하는데, 예를 들면, 안정성, 결합 활성 및/또는 특이성 등에 영향을 주는데 이용될 수 있다. 클로닝된 유전자의 시험관내에서 돌연변이유발 (mutagenesis)을 위한 기술은 공지되어 있다. 돌연변이를 스캐닝하기 위한 프로토콜의 실례는 Gustin et al., *Biotechniques* 14:22 (1993); Barany, *Gene* 37:111-23 (1985); Colicelli et al., *Mol Gen Genet* 199:537-9 (1985); 그리고 Prentki et al., *Gene* 29:303-13 (1984)에서 찾아볼 수 있다. 특정 부위 돌연변이유발 (site specific mutagenesis)을 위한 방법은 Sambrook et al, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, CSH Press 1989, pp. 15.3-15.108; Weiner et al, *Gene* 126:35-41 (1993); Sayers et al., *Biotechniques* 13:592-6 (1992); Jones and Winistorfer, *Biotechniques* 12:528-30 (1992); Barton et al., *Nucleic Acids Res* 18:7349-55 (1990); Marotti and Tomich, *Gene Anal Tech* 6:67-70 (1989); 그리고 Zhu Anal Biochem 177:120-4 (1989)에서 찾아볼 수 있다.
- [0058] 일부 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 야생형 AXL (서열 번호: 1)의 잔기 18 내지 130, 잔기 10 내지 135, 잔기 15 내지 45, 잔기 60 내지 65, 잔기 70 내지 80, 잔기 85 내지 90, 잔기 91 내지 99, 잔기 104 내지 110, 잔기 111 내지 120, 잔기 125 내지 130, 잔기 19 내지 437, 잔기 130 내지 437, 잔기 19 내지 132, 잔기 21 내지 132, 잔기 21 내지 121, 잔기 26 내지 132, 또는 잔기 26 내지 121 중에서 하나 또는 그 이상의 영역 내에 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함한다. 일부 다른 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 야생형 AXL (서열 번호: 1)의 잔기 20 내지 130, 잔기 37 내지 124 또는 잔기 141 내지 212 중에서 하나 또는 그 이상의 영역 내에 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 야생형 AXL (서열 번호: 1)의 위치 19, 23, 26, 27, 32, 33, 38, 44, 61, 65, 72, 74, 78, 79, 86, 87, 88, 90, 92, 97, 98, 105, 109, 112, 113, 116, 118, 127, 또는 129 중에서 하나 또는 그 이상의 위치에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함한다.
- [0059] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 임의의 제한 없이, 1) A19T, 2) T23M, 3) E26G, 4) E27G 또는 E27K, 5) G32S, 6) N33S, 7) T38I, 8) T44A, 9) H61Y, 10) D65N, 11) A72V, 12) S74N, 13) Q78E, 14) V79M, 15) Q86R, 16) D87G, 17) D88N, 18) I90M 또는 I90V, 19) V92A, V92G 또는 V92D, 20) I97R, 21) T98A 또는 T98P, 22) T105M, 23) Q109R, 24) V112A, 25) F113L, 26) H116R, 27) T118A, 28) G127R 또는 G127E, 그리고 29) E129K 및 이들의 조합을 비롯한 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형을 포함한다.
- [0060] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 야생형 AXL (서열 번호: 1)의 위치 32, 87, 92, 또는 127에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형 또는 이들의 조합, 예를 들면, G32S; D87G; V92A 및/또는 G127R을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 야생형 AXL (서열 번호: 1)의 위치 26, 79, 92, 127에서 하나 또는 그 이상의 아미노산 변형 또는 이들의 조합, 예를 들면, E26G; V79M; V92A 및/또는 G127E을 포함한다.
- [0061] 본 발명에 따라서, 본 발명의 sAXL 변이체는 다양한 목적을 위해 더욱 변형될 수 있다, 예를 들면, 다른 다양한 올리고펩티드 또는 단백질에 연결될 수 있다. 가령, 다양한 번역후 또는 발현후 변형이 본 발명의 sAXL 변이체와 관련하여 수행될 수 있다. 가령, 적절한 코딩 서열을 이용함으로써, 파르네실화 (farnesylation) 또는 프레

닐화 (prenylation)를 제공할 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 PEG화될 수 있는데, 여기서 폴리에틸렌옥시 기는 혈류 내에서 증강된 수명을 제공한다. 본 발명의 sAXL 변이체는 또한, 다른 단백질, 예를 들면, 보체 결합될 수 있는 IgG 아이소타입의 Fc, 독소, 예를 들면, 리신 (ricin), 아브린 (abrin), 디프테리아 독소 (diphtheria toxin) 등, 또는 표적 세포 상에서 특정 모이어티로 표적화를 가능하게 하는 특정한 결합제와 결합될 수 있다.

[0062] 일부 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 예로써, 두 번째 폴리펩티드와 인 프레임 (in frame) 융합된 융합 단백질이다. 일부 구체예에서, 두 번째 폴리펩티드는 예로써, 융합 단백질이 순환으로부터 빠르게 제거되지 않도록 하기 위해 융합 단백질의 크기를 증가시킬 수 있다. 일부 다른 구체예에서, 두 번째 폴리펩티드는 Fc 영역의 일부 또는 전부이다. 일부 다른 구체예에서, 두 번째 폴리펩티드는 Fc와 실질적으로 유사하고, 예로써 증가된 크기 및/또는 Ig 분자와의 추가의 결합 또는 상호작용을 제공하는 임의의 적합한 폴리펩티드이다. 또 다른 구체예에서, 두 번째 폴리펩티드는 알부민 단백질, 예를 들면, 인간 혈청 알부민 단백질의 일부 또는 전부이다.

[0063] 일부 다른 구체예에서, 두 번째 폴리펩티드는 sAXL 변이체를 취급하거나, 예를 들면, sAXL 변이체를 정제하거나, 또는 시험관내에서 또는 생체내에서 이의 안정성을 증가시키는데 유용하다. 가령, 본 발명의 sAXL 변이체는 면역글로불린 (IgG)의 불변 도메인의 일부와 결합되어 키메라 또는 융합 폴리펩티드를 산출할 수 있다. 이들 융합 단백질은 정제를 용이하게 하고 생체내에서 증가된 반감기를 보인다. 한 가지 보고된 실례는 인간 CD4-폴리펩티드의 첫 2개의 도메인, 그리고 포유동물 면역글로불린의 중쇄 또는 경쇄의 불변 영역의 다양한 도메인으로 구성되는 키메라 단백질을 기술한다. EP A 394,827; Traunecker et al., Nature, 331: 84-86, 1988. 이항화-연결된 이량체 구조 (IgG에 기인)를 갖는 융합 단백질은 또한, 단위체 분비된 단백질 또는 단백질 단편 단독보다 다른 분자에 결합하고 이들을 중화시키는데 더욱 효과적일 수 있다. Fountoulakis et al., J. Biochem. 270: 3958-3964, 1995.

[0064] 또 다른 구체예에서, 두 번째 폴리펩티드는 마커 서열, 예를 들면, 융합된 폴리펩티드의 정제를 용이하게 하는 펩티드이다. 가령, 마커 아미노산 서열은 헥사-히스티딘 펩티드, 예를 들면, 특히 pQE 벡터에서 제공된 태그 (tag) (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311)인데, 이들 중에서 다수가 상업적으로 구입가능하다. Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824, 1989에서 기술된 바와 같이, 예로써 헥사-히스티딘은 융합 단백질의 편의한 정제를 제공한다. 정제에 유용한 다른 펩티드 태그, "HA" 태그는 인플루엔자 적혈구응집소 단백질로부터 유래된 에피토프에 상응한다. Wilson et al., Cell 37: 767, 1984.

[0065] 또 다른 일부 구체예에서, 두 번째 폴리펩티드는 본 발명의 sAXL 변이체의 특징을 향상시키는데 유용한 존재 (entity)이다. 가령, 숙주 세포로부터 정제 또는 차후 취급과 보관 동안 안정성과 지속성 (persistence)을 향상시키기 위해 추가의 아미노산, 특히 하전된 아미노산의 영역이 폴리펩티드의 N-말단에 부가될 수 있다. 또한, 펩티드 모이어티가 정제를 용이하게 하기 위해 본 발명의 sAXL 변이체에 부가되고, 그리고 폴리펩티드의 최종 제조에 앞서 차후 제거될 수 있다. 폴리펩티드의 취급을 용이하게 하기 위한 펩티드 모이어티의 부가는 당분야에서 익숙하고 일과적인 기술이다.

[0066] 또 다른 일부 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 야생형 AXL과 적어도 동등하거나 이보다 높은, GAS6에 대한 결합 활성을 갖는다. 일부 다른 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 야생형 AXL의 결합 활성 또는 친화성보다 적어도 1-배, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 또는 6-배 높은, GAS6에 대한 결합 활성 또는 친화성을 갖는다. 일부 다른 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 GAS6에 대해, 적어도 대략 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} 또는 1×10^{-9} M의 결합 활성 또는 친화성을 갖는다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 생체내에서, 시험관내에서 또는 둘 모두에서, GAS6에 대한 야생형 AXL 결합을 저해할 수 있거나, 저해하거나, 또는 이러한 결합과 경쟁한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 본 출원의 실시예 2에서 제시된 바와 같이, AXL S6-1, AXL S6-2, 및/또는 AXL S6-5의 결합을 저해하거나, 또는 이러한 결합과 경쟁한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 본 출원의 실시예 2에서 제시된 바와 같이, 임의의 sAXL 변이체의 결합을 저해하거나, 또는 이러한 결합과 경쟁한다.

[0067] GAS6에 결합하는 분자의 능력은 예로써, 분석평가 평판 상에 코팅된 GAS6에 결합하는 추정 리간드의 능력에 의해 결정될 수 있다. 한 구체예에서, GAS6에 대한 본 발명의 sAXL 변이체의 결합 활성은 리간드, 예를 들면, GAS6 또는 sAXL 변이체를 고정시킴으로써 평가될 수 있다. 가령, 이러한 분석평가는 His 태그에 융합된 GAS6을 Ni-활성화된 NTA 수지 구슬 상에 고정시키는 것을 포함한다. 작용제는 적절한 완충액에 담겨 첨가될 수 있고, 그리고 구슬은 소정의 온도에서 일정한 기간 동안 항온처리될 수 있다. 결합되지 않은 물질을 제거하기 위한 세

적후, 결합된 단백질은 예로써, 높은 pH를 갖는 SDS 완충제 등으로 방출되고 분석될 수 있다.

- [0068] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 야생형 AXL의 열 안정성보다 우수한 열 안정성을 갖는다. 일부 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체의 용융 온도 (melting temperature)는 야생형 AXL의 용융 온도보다 적어도 5°C, 10°C, 15°C, 또는 20°C 높다.
- [0069] 본 발명에 따라서, 본 발명의 sAXL 변이체는 또한, 본 발명의 sAXL 변이체의 일차 서열을 변경하지 않는 하나 또는 그 이상의 변형을 포함한다. 가령, 이런 변형에는 폴리펩티드의 화학적 유도체화 (chemical derivatization), 예를 들면, 아세틸화 (acetylation), 아미드화 (amidation), 카복실화 (carboxylation) 등이 포함될 수 있다. 이런 변형에는 또한, 당화 (glycosylation)의 변형, 예를 들면, 합성과 가공처리 동안 또는 추가의 가공처리 단계에서 폴리펩티드의 당화 패턴을 변경함으로써, 예를 들면, 당화에 영향을 주는 효소, 예를 들면, 포유동물 당화 또는 탈당화 (deglycosylation) 효소에 폴리펩티드를 노출시킴으로써 만들어진 변형이 포함될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체에는 인산화된 아미노산 잔기, 예를 들면, 포스포티로신, 포스포세린, 또는 포스포트레오닌을 갖는 sAXL 변이체가 포함된다.
- [0070] 일부 다른 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체에는 단백질 분해 변성 (proteolytic degradation)에 대한 내성을 향상시키거나, 또는 용해성을 최적화시키거나, 또는 이들을 치료제로서 더욱 적합하도록 만들기 위해 더욱 변형된 sAXL 변이체가 포함된다. 가령, 본 발명의 sAXL 변이체에는 자연 발생 L-아미노산 이외의 잔기, 예를 들면, D-아미노산 또는 비-자연 발생 합성 아미노산을 내포하는 sAXL 변이체의 유사체가 더욱 포함된다. D-아미노산은 아미노산 잔기 중에서 일부 또는 전부를 대체할 수 있다.
- [0071] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 공유 또는 비-공유 연결된 적어도 2개의 동일한 또는 상이한 sAXL 변이체를 포함한다. 가령, 일부 구체예에서, 본 발명의 sAXL 변이체는 예로써, 그들이 적절한 크기를 가지면서도 바람직하지 않은 집합 (aggregation)을 회피하기 위해 공유 연결된 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 동일한 또는 상이한 sAXL 변이체를 포함한다.
- [0072] 본 발명에 따라서, 본 발명의 sAXL 변이체는 당분야에 공지되거나 차후에 발견되는 임의의 적절한 수단에 의해 생산될 수 있다, 예를 들면, 진핵 또는 원핵 세포로부터 생산되거나, 시험관내에서 합성되거나, 기타 등등일 수 있다. 단백질이 원핵 세포에 의해 생산되는 경우에, 이것은 폴립 (unfolding), 예를 들면, 열 변성 (heat denaturation), DTT 환원 등에 의해 더욱 가공되고, 그리고 당분야에 공지된 방법을 이용하여 더욱 재접힘 (refolding)될 수 있다.
- [0073] 이들 폴리펩티드는 당분야에 공지된 전통적인 방법을 이용하여, 시험관내 합성에 의해 제조될 수 있다. 다양한 상업적 합성 기구, 예를 들면, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, Beckma 등에 의한 자동화 합성장치 (automated synthesizer) 등이 구입가능하다. 합성장치를 이용함으로써, 자연 발생 아미노산은 비자연 아미노산으로 치환될 수 있다. 특정 서열 및 제조 방식은 편의성, 경제학, 요구되는 순도 등에 의해 결정될 것이다.
- [0074] 이들 폴리펩티드는 또한, 재조합 합성의 전통적인 방법에 따라서 분리되고 정제될 수 있다. 용해물은 발현 숙주로부터 준비되고, 그리고 용해물은 HPLC, 배제 크로마토그래피 (exclusion chromatography), 겔 전기영동 (gel electrophoresis), 친화성 크로마토그래피, 또는 기타 정제 기술을 이용하여 정제된다. 대부분의 경우에, 이용되는 조성물은 산물의 제조와 정제 방법에 관련된 오염물질에 대하여, 중량으로 적어도 20%, 더욱 통상적으로 중량으로 적어도 대략 75%, 바람직하게는 중량으로 적어도 대략 95%, 그리고 치료 목적의 경우에, 통상적으로 중량으로 적어도 대략 99.5%의 원하는 산물을 포함할 것이다. 일반적으로, 이들 백분율은 총 단백질에 기초될 것이다.
- [0075] 코딩 서열 및 적절한 전사/번역 제어 신호를 내포하는 발현 벡터를 작제하기 위해 당업자에게 널리 공지된 방법이 이용될 수 있다. 이들 방법에는 예로써, 시험관내 재조합 DNA 기술, 합성 기술 및 생체내 재조합/유전학적 재조합이 포함된다. 대안으로, 목적되는 폴리펩티드를 인코딩할 수 있는 RNA가 화학적으로 합성될 수 있다. 당업자는 본 발명의 임의의 폴리펩티드에 대한 적절한 코딩 서열을 제공하기 위해 널리 공지된 코돈 선호도 (codon usage) 표 및 합성 방법을 용이하게 인지할 수 있다. 직접적인 화학적 합성 방법에는 예로써, Narang et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 90-99의 포스포트리에스테르 방법; Brown et al. (1979) Meth. Enzymol. 68: 109-151의 포스포디에스테르 방법; Beaucage et al. (1981) Tetra. Lett., 22: 1859-1862의 디에틸포스포라미디트 방법; 그리고 U.S. Patent No. 4,458,066의 고품서포트 방법이 포함된다. 화학적 합성은 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 생산한다. 이것은 상보성 서열과의 혼성화 (hybridization)에 의해, 또는 단일 가닥을 주형으로서 이용한 DNA 중합효소로 중합화에 의해 이중 가닥 DNA로 전환될 수 있다. DNA의 화학적 합성이 종종, 대략

100개 염기의 서열로 제한되긴 하지만, 짧은 서열의 결찰 (ligation)에 의해 긴 서열이 획득될 수 있다. 대안으로, 하위서열은 클로닝되고, 그리고 적절한 하위서열은 적절한 제한 효소를 이용하여 절단될 수 있다.

[0076] 이들 핵산은 실질적인 순도에서 단리되고 획득될 수 있다. 일반적으로, DNA 또는 RNA로서 핵산은 다른 자연-발생 핵산 서열이 실질적으로 없게, 통상적으로 적어도 대략 50%, 적어도 대략 90% 순수하게 획득되고, 그리고 전형적으로 "재조합"이다, 예를 들면, 자연 발생 염색체 상에서 정상적으로 연관되지 않는 하나 또는 그 이상의 뉴클레오타이드와 접한다. 본 발명의 핵산은 선형 분자로서 또는 환형 분자 내에 제공될 수 있고, 그리고 자발적 복제 분자 (벡터) 또는 복제 서열이 없는 분자 내에 제공될 수 있다. 핵산의 발현은 그들 자신의 조절 서열에 의해, 또는 당분야에 공지된 다른 조절 서열에 의해 조절될 수 있다. 본 발명의 핵산은 당분야에서 가용한 다양한 기술, 예를 들면, 트랜스페린 다가양이온 (transferrin polycation)-매개된 DNA 운반, 나신 또는 캡슐화된 핵산으로 형질감염, 리포좀-매개된 DNA 운반, DNA-코팅된 라텍스 구슬의 세포내 수송, 원형질체 (protoplast) 융합, 바이러스 감염, 전기천공 (electroporation), 유전자 총 (gene gun), 인산칼슘-매개된 형질감염 등을 이용하여 적절한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다.

[0077] 일부 구체예에서, 본 발명에서는 구조성으로 또는 하나 또는 그 이상의 조절 요소 하에, 본 발명의 하나 또는 그 이상의 sAXL 변이체의 시험관내 또는 생체내 발현을 위한 발현 벡터를 제시한다. 일부 구체예에서, 본 발명에서는 구조성으로 또는 하나 또는 그 이상의 조절 요소 하에, 본 발명의 sAXL 변이체를 발현하기 위한 하나 또는 그 이상의 발현 벡터를 포함하는 세포 집단을 제시한다.

[0078] 본 발명의 다른 측면에 따라서, GAS6 단백질에 특이적으로 결합하는 단리된 항체 또는 이들의 단편이 제시된다. GAS6 (성장 정지-특이적 6, growth arrest-specific 6)은 구조적으로, 혈장 비타민 K-의존성 단백질의 패밀리에 속한다. GAS6은 자연 항응혈성 단백질 S와 높은 구조 상동성 (structural homology)을 갖고, 동일한 모듈식 조성을 공유하고, 40% 서열 동일성을 갖는다. GAS6은 TAM 패밀리의 수용체 티로신 키나아제: Tyro3, AXL 및 MerTK와의 상호작용을 통해 성장 인자-유사 성질을 갖는다. 인간 GAS6은 인지질 막 (phospholipid membrane)에 결합을 매개하는 감마-카르복시글루타메이트 (Gla)-풍부한 도메인, 4개의 외피 성장 인자-유사 도메인, 그리고 2개의 라미닌 G-유사 (LG) 도메인으로 구성되는 678개 아미노산 단백질이다. 인간 GAS6의 전사체 변이체의 서열은 각각, Genbank NM_001143946.1; NM_001143945.1; 그리고 NM_000820.2에서 접근될 수 있다.

[0079] GAS6은 독특한 작용 기전을 이용하고, 비타민 K-의존성 GLA (감마-카르복시글루타민산) 모듈을 통해 포스파티딜 세린-내포 막과 상호작용하고, 그리고 카르복시-말단 LamG 도메인을 통해 TAM 막 수용체와 상호작용한다.

[0080] 본 발명에 따라서, 본 발명의 단리된 항체는 GAS6에 대하여 인식가능한 결합 특이성을 갖는 임의의 단리된 항체를 포함한다. 일부 구체예에서, 단리된 항체는 부분적인 또는 완전한 인간화 항체이다. 일부 다른 구체예에서, 단리된 항체는 단일클론 또는 다중클론 항체이다. 또 다른 구체예에서, 단리된 항체는 예로써, 상이한 출처로부터 불변 영역, 가변 영역 및/또는 CDR3 또는 이들의 조합을 포함하는 키메라 항체이다. 또 다른 구체예에서, 단리된 항체는 본 명세서에서 기술된 다양한 특징의 조합이다.

[0081] 본 발명에 따라서, 본 발명의 단리된 항체의 단편은 GAS6을 향한 폴리펩티드의 인식가능한 특이적 결합에 충분한 또는 필요한 항체의 영역 (항체 뼈대 또는 비-항체 뼈대의 배경에서)을 내포하는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 단리된 항체의 단편은 가변 경쇄, 가변 중쇄, 중쇄 또는 경쇄의 하나 또는 그 이상의 CDR, 또는 이들의 조합, 예를 들면, Fab, Fv 등을 포함한다. 일부 구체예에서, 본 발명의 단리된 항체의 단편은 단일 사슬 항체, 예를 들면, ScFv를 내포하는 폴리펩티드를 포함한다. 다른 일부 구체예에서, 본 발명의 단리된 항체의 단편은 가변 영역 단독, 또는 Fc 영역의 일부, 예를 들면, CH1 영역과 공동으로 가변 영역을 포함한다. 또 다른 일부 구체예에서, 본 발명의 단리된 항체의 단편은 미니바디 (minibody), 예를 들면, VL-VH-CH3 또는 디아바디 (diabody)를 포함한다.

[0082] 일부 구체예에서, 본 발명의 단리된 항체는 AXL과 상호작용하는 하나 또는 그 이상의 아미노산 영역에 포함되거나 이들 영역에 의해 제공되는 에피토프에 결합한다. 일부 다른 구체예에서, 본 발명의 단리된 항체는 GAS6의 하나 또는 그 이상의 아미노산 영역, 예를 들면, L295-T317, E356-P372, R389-N396, D398-A406, E413-H429, 그리고 W450-M468 of GAS6에 포함되거나 이들 영역에 의해 제공되는 에피토프에 결합한다.

[0083] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 단리된 항체는 하나 또는 그 이상의 아미노산 영역, 예를 들면, LRMFGSTPVIIRLFKRLQPT (서열 번호: 3), EIVGRVTSSGP (서열 번호: 4), RNLVIKVN (서열 번호: 5), DAVMKIAYA (서열 번호: 6), ERGLYHLNLTGVIPFH (서열 번호: 7), 그리고 WLNGEDTTIOETVVNRM (서열 번호: 8)에 포함되거나 이들 영역에 의해 제공되는 에피토프에 결합한다.

- [0084] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 단리된 항체는 GAS6의 L295-T317, E356-P372, R389-N396, D398-A406, E413-H429, 그리고 W450-M468의 영역 내에서 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개 아미노산에 포함되거나 이들 영역에 의해 제공되는 에피토프에 결합한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 단리된 항체는 LRMFSGTPVIRLRFKRLQPT (서열 번호: 3), EIVGRVTSSGP (서열 번호: 4), RNLVIKVN (서열 번호: 5), DAVMKIAVA (서열 번호: 6), ERGLYHLNLTVGIPFH (서열 번호: 7), 그리고 WLNGEDTTIOETVNVNM (서열 번호: 8)의 영역 내에서 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개 아미노산에 포함되거나 이들 영역에 의해 제공되는 에피토프에 결합한다. 또 다른 일부 구체예에서, 본 발명의 단리된 항체는 야생형 AXL 또는 본 발명의 sAXL 변이체 및 GAS6 사이에 결합을 저해할 수 있거나, 저해하거나, 또는 이러한 결합과 경쟁한다.
- [0085] 본 발명에 따라서, 본 발명의 sAXL 변이체와 단리된 항체 둘 모두 치료 용도, 예를 들면, 인간 치료에 적합한 제약학적 조성물에 담겨 제공될 수 있다. 일부 구체예에서, 본 발명의 제약학적 조성물은 본 발명의 하나 또는 그 이상의 치료 존재, 예를 들면, sAXL 변이체 및/또는 GAS6에 대한 단리된 항체 또는 이들의 제약학적으로 허용되는 염, 에스테르 또는 용매화합물 또는 이들의 임의의 프로드러그를 포함한다. 일부 다른 구체예에서, 본 발명의 제약학적 조성물은 다른 세포독성제, 예를 들면, 다른 항-종양제와 공동으로 본 발명의 하나 또는 그 이상의 치료 존재를 포함한다. 또 다른 구체예에서, 본 발명의 제약학적 조성물은 다른 제약학적으로 허용되는 부형제와 공동으로 본 발명의 하나 또는 그 이상의 치료 존재를 포함한다.
- [0086] 또 다른 일부 구체예에서, 본 발명의 치료 존재는 종종, 활성 치료제, 그리고 다양한 다른 제약학적으로 허용되는 성분을 포함하는 제약학적 조성물로서 투여된다 (참조: Remington's Pharmaceutical Science, 15.sup.th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980). 바람직한 형태는 의도된 투여 방식과 치료 적용에 좌우된다. 조성물은 또한, 원하는 제제에 따라, 제약학적으로-허용되는, 비-독성 담체 또는 희석제를 포함하는데, 이들은 동물 또는 인간 투여를 위한 제약학적 조성물을 조제하는데 통상적으로 이용되는 운반체로서 정의된다. 희석제는 이러한 조합의 생물학적 활성에 영향을 주지 않도록 선택된다. 이런 희석제의 실례는 증류된 물, 생리학적 인산염-완충된 염수, 링거 용액, 텍스트로스 용액, 그리고 Hank 용액이다. 이에 더하여, 제약학적 조성물 또는 제제는 또한, 기타 담체, 어쥬번트, 또는 비-독성, 비-치료성, 비-면역원성 안정제 등을 포함할 수 있다.
- [0087] 또 다른 일부 구체예에서, 본 발명의 제약학적 조성물은 또한, 크고 느리게 물질대사되는 거대분자, 예를 들면, 단백질, 다당류, 예를 들면, 키토산 (chitosan), 폴리락트산, 폴리글리콜산과 공중합체 (가령, 라텍스 기능화된 Sepharose™, 아가로오스, 셀룰로오스 등), 중합성 아미노산, 아미노산 공중합체, 그리고 지질 집합체 (lipid aggregate) (가령, 유적 (oil droplet) 또는 리포솜)를 포함할 수 있다. 부가적으로, 이들 담체는 면역촉진제 (immunostimulating agent) (즉, 어쥬번트)로서 기능할 수 있다.
- [0088] 본 발명의 또 다른 측면에 따라서, AXL 신호전달 경로 및/또는 GAS6 신호전달 경로를 저해함으로써 종양 전이 또는 종양 침입을 치료하거나, 감소시키거나, 또는 예방하는 방법이 제시된다. 일부 구체예에서, 본 발명의 방법은 AXL의 활성, GAS6의 활성, 또는 AXL과 GAS6 사이에 상호작용을 저해하는 단계를 포함한다. 가령, AXL 또는 GAS6의 활성은 유전자 발현 수준, mRNA 가공 수준, 번역 수준, 번역후 수준, 단백질 활성화 수준 등에서 저해될 수 있다. 일부 다른 실례에서, AXL 또는 GAS6의 활성은 소형 분자, 생물학적 분자, 예를 들면, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 항체, 항체 약물 집합체 등에 의해 저해될 수 있다. 일부 다른 실례에서, AXL 또는 GAS6의 활성은 본 발명의 하나 또는 그 이상의 sAXL 변이체 또는 단리된 항체에 의해 저해될 수 있다.
- [0089] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 본 발명의 치료 존재, 예를 들면, AXL 활성 또는 GAS6 활성의 저해물질, 또는 AXL과 GAS6 사이에 상호작용의 저해물질의 치료 효과량 또는 효과 용량을 치료가 필요한 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구체예에서, 예로써 전이성 암의 치료를 위한 본 발명의 치료 존재의 효과 용량은 투여 수단, 표적 부위, 환자의 생리학적 상태, 환자가 인간 또는 동물인지의 여부, 투여된 다른 약제, 그리고 치료가 예방적 또는 치료적인지의 여부를 비롯한 많은 상이한 인자에 따라 달라진다. 일반적으로, 환자는 인간이지만 유전자도입 포유동물을 비롯한 비인간 포유동물 역시 치료될 수 있다. 치료 용량은 안정성과 효능을 최적화하기 위해 적정되어야 한다.
- [0090] 일부 구체예에서, 용량은 호스트 체중의 대략 0.0001 내지 100 mg/kg, 그리고 더욱 일반적으로, 0.01 내지 5 mg/kg 범위에서 변할 수 있다. 가령, 용량은 1 mg/kg 체중 또는 10 mg/kg 체중 또는 1-10 mg/kg의 범위 이내일 수 있다. 예시적인 치료 섭생 (treatment regime)은 2주마다 1회, 또는 월 1회, 또는 3 내지 6개월마다 1회 투여를 수반한다. 본 발명의 치료 존재는 통상적으로, 여러 번 투여된다. 단일 투약 간에 간격은 1주, 1개월 또는 1년 일 수 있다. 간격은 또한, 환자에서 치료 존재의 혈액 수준을 측정함으로써 지시되는 바와 같이 부정기적일 수 있다. 대안으로, 본 발명의 치료 존재는 서방 제제 (sustained release formulation)로 투여될 수 있는데, 이

런 경우에 더욱 적은 빈도의 투여가 요구된다. 용량 및 빈도는 환자에서 폴리펩티드의 반감기에 따라 달라진다.

- [0091] 예방적 적용에서, 상대적으로 적은 용량이 긴 기간 동안 상대적으로 드문 간격에서 투여된다. 일부 환자는 그들의 나머지 삶 동안 치료를 계속해서 받는다. 치료적 적용에서, 질병의 진행이 감소되거나 종결될 때까지, 그리고 바람직하게는, 환자가 질병 증상의 부분적인 또는 완전한 개선을 보일 때까지, 상대적으로 짧은 간격에서 상대적으로 높은 용량이 때때로 요구된다. 그 이후에, 환자는 예방적 섭생 (prophylactic regime)이 투여될 수 있다.
- [0092] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 방법은 난소 암, 유방 암, 폐 암, 간 암, 결장 암, 담낭 암, 췌장 암, 전립선 암, 및/또는 교아종의 종양 전이 또는 종양 침입을 치료하거나, 감소시키거나, 또는 예방하는 단계를 포함한다.
- [0093] 또 다른 일부 구체예에서, 예방적 적용을 위하여, 제약학적 조성물 또는 약제는 질병 또는 장애에 민감하거나, 또는 그렇지 않으면, 질병 또는 장애의 위험에 처해있는 환자에, 질병의 생화학적, 조직학적 및/또는 행동적 증상, 이의 합병증 및 질병의 발생 동안 나타나는 중간 병리학적 표현형을 비롯한 질병의 위험을 제거 또는 감소시키거나, 질병의 심각도를 줄이거나, 또는 질병의 발생을 지연시키는데 충분한 양으로 투여된다.
- [0094] 또 다른 일부 구체예에서, 치료적 적용을 위하여, 본 발명의 치료 존재는 이런 질병이 의심되거나, 또는 이런 질병을 이미 앓고 있는 환자에, 이의 합병증 및 질병의 발생 동안 중간 병리학적 표현형을 비롯한 질병 증상 (생화학적, 조직학적 및/또는 행동적)을 치료하거나, 또는 적어도 부분적으로 정지시키는데 충분한 양으로 투여된다. 치료적 또는 예방적 처치를 달성하는데 적합한 양은 치료적- 또는 예방적-효과 용량으로 정의된다. 예방적 및 치료적 섭생 둘 모두에서, 작용제는 통상적으로, 충분한 반응이 달성될 때까지, 여러 번 투약으로 투여된다. 전형적으로, 반응은 모니터링되고, 그리고 암의 재발이 있으면 반복 투약이 제공된다.
- [0095] 본 발명에 따라서, 전이성 암의 치료를 위한 조성물은 비경구, 국소, 정맥내, 종양내, 경구, 피하, 동맥내, 두개내, 복막내, 비내 또는 근육내 수단에 의해 투여될 수 있다. 비록 다른 루트가 동등하게 효과적일 수 있긴 하지만, 가장 전형적인 투여 루트는 정맥내 또는 종양내이다.
- [0096] 비경구 투여의 경우에, 본 발명의 조성물은 무균 액체, 예를 들면, 물, 오일, 염수, 글리세롤, 또는 에탄올일 수 있는 제약학적 담체와 함께, 생리학적으로 허용되는 희석제에서 상기 물질의 용액 또는 현탁액의 주사가 가능 조제로서 투여될 수 있다. 부가적으로, 보조 물질, 예를 들면, 습윤제 또는 유화제, 계면활성제, pH 완충 물질 등이 조성물 내에 존재할 수 있다. 제약학적 조성물의 다른 성분은 석유, 동물, 식물, 또는 합성 기원의 성분, 예를 들면, 낙화생유, 대두유, 그리고 광유이다. 일반적으로, 글리콜, 예를 들면, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜이 특히 주사가 가능 용액에 대한 선호되는 액상 담체이다. 항체는 활성 성분의 서방 (sustained release)을 가능하게 하는 방식으로 조제될 수 있는 데포 주사 (depot injection) 또는 이식 제조물 (implant preparation)의 형태로 투여될 수 있다. 예시적인 조성물은 5 mg/mL에서 단일클론 항체를 포함하고, 50 mM L-히스티딘, 150 mM NaCl로 구성되고 HCl로 pH 6.0으로 조정된 수성 완충액에서 조제된다.
- [0097] 전형적으로, 조성물은 액상 용액 또는 현탁액 중에서 어느 한쪽의 주사가 가능 물질로서 제조된다; 주사에 앞서 액상 운반제에서 용액 또는 현탁액에 적합한 고형 형태 역시 제조될 수 있다. 이러한 제조물은 또한, 앞서 논의된 바와 같이 유화되거나, 또는 리포솜 또는 미소입자, 예를 들면, 폴리락티드, 폴리글리콜리드, 또는 증강된 어쥬먼트 효과를 위한 공중합체에서 캡슐화될 수 있다. Langer, Science 249: 1527, 1990 및 Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28: 97-119, 1997. 본 발명의 작용제는 활성 성분의 서방 (sustained release) 또는 맥동 방출 (pulsatile release)을 가능하게 하는 방식으로 조제될 수 있는 데포 주사 (depot injection) 또는 이식 제조물 (implant preparation)의 형태로 투여될 수 있다.
- [0098] 다른 투여 방식에 적합한 추가의 제제에는 경구, 비내, 그리고 폐 제제, 좌약, 그리고 경피 적용이 포함된다.
- [0099] 좌약의 경우에, 접합제와 담체에는 예로써, 폴리알킬렌 글리콜 또는 트리글리세리드가 포함된다; 이런 좌약은 0.5% 내지 10%, 바람직하게는 1%-2%의 범위에서 활성 성분을 내포하는 혼합물로부터 형성될 수 있다. 경구 제제는 부형제, 예를 들면, 제약학적 등급의 만니톨, 락토오스, 전분, 스테아르산마그네슘, 사카린나트륨, 셀룰로오스, 그리고 탄산마그네슘을 포함한다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 알약, 캡슐, 서방 제제 또는 분말의 형태를 취하고 10%-95%, 바람직하게는 25%-70%의 활성 성분을 내포한다.
- [0100] 국소 적용은 경피 또는 피내 전달을 유발할 수 있다. 국소 투여는 콜레라 독소 또는 이의 해독된 유도체 또는 아단위 또는 다른 유사한 세균 독소와 본 발명의 작용제의 공동-투여에 의해 조장될 수 있다. Glenn et al., Nature 391: 851, 1998. 공동-투여는 이들 성분을 혼합물로서, 또는 화학적 가교연결 또는 융합 단백질로서 발

현에 의해 획득된 연결된 분자로서 이용함으로써 달성될 수 있다.

- [0101] 대안으로, 경피 전달은 피부 패치 (skin patch)를 이용하거나, 또는 트랜스페로솜 (transfersome)을 이용하여 달성될 수 있다. Paul et al., Eur. J. Immunol. 25: 3521-24, 1995; Cevc et al., Biochem. Biophys. Acta 1368: 201-15, 1998.
- [0102] 제약학적 조성물은 일반적으로, 미국 식품의약국 (U.S. Food and Drug Administration)의 모든 우수약품제조 관리 Good Manufacturing Practice (GMP) 기준을 완벽하게 준수하는 무균의 실질적으로 등장성 조성물로서 조제된다.
- [0103] 바람직하게는, 본 명세서에서 기술된 항체 조성물의 치료적 효과 용량은 실질적인 독성을 유발하지 않으면서 치료 혜택을 제공할 것이다.
- [0104] 본 명세서에서 기술된 단백질의 독성은 예로써, LD₅₀ (집단의 50%에 치명적인 1회분) 또는 LD₁₀₀ (집단의 100%에 치명적인 1회분)을 측정함으로써, 세포 배양액 또는 실험 동물에서 표준 제약학적 절차에 의해 결정될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이에 용량 비율 (dose ratio)은 치료 지수 (therapeutic index)이다. 이들 세포 배양 분석평가와 동물 연구로부터 획득된 데이터는 인간에서 이용을 위한 비-독성의 용량 범위를 공식화하는데 이용될 수 있다. 본 명세서에서 기술된 단백질의 용량은 바람직하게는, 독성이 거의 또는 전혀 없는 효과 용량을 포함하는 순환 농도 (circulating concentration)의 범위 내에 있다. 용량은 이용되는 투약 형태 및 투여 루트에 따라, 이러한 범위 내에서 달라질 수 있다. 정확한 제제, 투여 루트 및 용량은 환자의 상태를 고려하여, 개별 의사에 의해 선택될 수 있다 (참조: Fingl et al., 1975, In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1).
- [0105] 본 발명의 조성물 (가령, 가용성 AXL 변이체 및 이들의 제제) 및 사용설명서를 포함하는 키트 역시 본 발명의 범위 내에 있다. 키트는 적어도 하나의 추가 시제를 더욱 내포할 수 있다. 키트는 전형적으로, 키트의 내용물의 의도된 용도를 지시하는 라벨을 포함한다.
- [0106] 용어 라벨은 키트 상에 또는 키트와 함께 제공되거나, 또는 그렇지 않으면, 키트에 동반되는 임의의 문서, 또는 기록물을 포함한다.
- [0107] 본 발명의 또 다른 측면에 따라서, 목적되는 개체로부터 생물학적 샘플에서 AXL 활성 또는 GAS6 활성의 수준을 검출하고 및/또는 측정함으로써 종양 침입 및/또는 전이를 겪는 종양의 능력을 결정하는 방법이 제시된다. 일부 구체예에서, AXL 활성 또는 GAS6 활성의 수준은 mRNA 발현의 수준, 단백질 발현의 수준, 단백질 활성화의 수준, 또는 직접적으로 또는 간접적으로 AXL 또는 GAS6의 활성화에 상응하는 임의의 적절한 지시자에 의해 측정된다. 일부 구체예에서, 생물학적 샘플에서 AXL 활성 또는 GAS6 활성의 수준은 미리 결정된 수준, 예를 들면, 종양 침입 또는 종양 전이가 발생하지 않은 종양으로부터 또는 정상적인 조직으로부터 샘플 집단에 기초하여 AXL 활성 또는 GAS6 활성의 정상적인 수준 또는 범위를 확립함으로써 획득된 표준 수준에 더욱 비교된다. 가령, 미리 결정된 수준 또는 표준 수준을 초과하는 AXL 활성 또는 GAS6 활성의 증가는 종양 침입 또는 종양 전이를 겪는 종양의 소인을 지시한다.
- [0108] 본 명세서에서 인용된 모든 간행물과 특허는 마치 각 개별 간행물과 특허가 참조로서 편입되는 것으로 명확하게 및 개별적으로 지시된 것처럼 본 발명에 참조로서 편입되고, 그리고 이들 인용 간행물이 관련되는 방법 및/또는 재료를 개시하고 기술하기 위해 본 발명에 참조로서 편입된다. 임의의 간행물의 인용은 출원일 이전에 이의 개시를 목적으로 하고, 그리고 본 발명이 선행 발명에 의해서 이런 간행물에 앞서는 권리가 없음을 인정하는 것으로 간주되지 않아야 한다. 게다가, 제공된 공개 일자는 실제 공개 일자와 상이할 수 있으며, 이것은 독립적으로 확인될 필요가 있다.
- [0109] 본 명세서를 읽고 난 이후에 당업자에게 명백한 바와 같이, 본 명세서에서 기술되고 예시된 각 개별 구체예는 본 발명의 범위 또는 기술적 사상으로부터 벗어나지 않으면서, 다른 여러 구체예 중에서 한 가지의 특징으로부터 용이하게 분리되거나, 또는 이들 특징과 결합될 수 있는 구별된 성분과 특징을 갖는다. 임의의 언급된 방법은 언급된 사건의 순서로 수행되거나, 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서로 수행될 수 있다. 하기에서, 실시예는 본 발명의 일부를 예시하기 위해 기술될 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0110] 도면의 간단한 설명

도 1. AXL 발현은 인간 유방과 난소 암에서 종양 진행과 전이와 상관한다. A. 정상적인 유방 조직 (정상), 원발성 침윤성 유관 암종 (등급 1, 2, 그리고 3) 및 림프절 전이 (림프절)에서 AXL 면역조직화학적 염색의 대표적인 이미지. 주의: 높은 수준의 막 AXL 염색이 등급 2 (화살표), 등급 3, 그리고 림프절 전이에서 존재하였다. 정상적인 또는 종양 스트로마에서 AXL 염색은 관찰되지 않았다 (*). B. 정상적인 난소 상피 (화살표), 시기 II, 시기 III, 그리고 장액 선암종을 앓는 환자로부터 유래된 장막 전이에서 AXL 면역조직화학적 염색의 대표적인 이미지. 주의: 정상과 종양 스트로마는 AXL 염색에 대하여 음성이었다 (*).

도 2. AXL의 유전학적 비활성화는 유방과 난소 전이를 차단하는데 충분하다. A. shscramble (shSCRM)과 shAXL (shAXL) MDA-231 세포가 꼬리 정맥 주입된 생쥐의 폐에서 H&E와 AXL 면역조직화학적 염색. 사진은 군당 5마리 생쥐를 나타낸다. 그래프는 shSCRM 또는 shAXL MDA-231 세포가 주입된 생쥐 (n=5)로부터 전체 폐에서 인간 GSPDH와 AXL 발현의 실시간 PCR 분석을 묘사한다. B. shscramble (shSCRM)와 shAXL (shAXL) SKOV3ip.1 세포의 주입후 28일 시점에 촬영된 생쥐의 사진. 주의: shSCRM 주입된 생쥐는 복강 전역에 다수의 전이가 발생하였다 (원으로 표시됨). shAXL 군의 경우에, 최대 종양 부담 (tumor burden)을 갖는 생쥐가 도식된다. 오른쪽 그래프는 생쥐당 크기가 >5mm인 복막 전이의 평균 숫자 및 최대 종양의 평균 중량을 묘사한다. 사진은 군당 5마리 생쥐를 나타낸다. C. shSCRM과 shAXL OVCAR-8 세포의 주입후 34일 시점에 촬영된 생쥐의 사진. 주의: shSCRM 주입된 생쥐는 복강 전역에 다수의 전이가 발생하였다 (원으로 표시됨). 오른쪽 그래프는 생쥐당 복막 전이의 평균 총수 및 평균 총 종양 중량을 묘사한다. 사진은 군당 8마리 생쥐를 나타낸다.

도 3. AXL의 유전학적 비활성화는 시험관내에서 유방 또는 난소 종양 세포 증식 또는 생체내에서 성장에 영향을 주지 않는다. A. shscramble 대조 (shSCRM) 또는 AXL (shAXL)에 대한 shRNA 표적화 서열을 안정적으로 발현하는 MDA-231, SKOV3ip.1, 그리고 OVCAR-8 세포에 대한 세포 성장 곡선. 측정은 삼중으로 수행되고, 그리고 오차 막대는 S.E.M을 나타낸다. B. 48-일 시간 과정 동안 성장된 정위 (orthotopic) MDA-231 (n = 군당 8마리 생쥐)과 피하 SKOV3ip.1 종양 (n = 군당 4마리 생쥐)의 평균 종양 체적. 오차 막대는 S.E.M을 나타낸다.

도 4. AXL은 시험관내에서 난소와 유방 종양 세포 침입을 조절한다. A. 대조 (shSCRM)와 AXL 결함성 (shAXL) MDA-231, SKOV3ip.1, 그리고 OVCAR-8 세포의 콜라겐 침입 분석평가. 사진은 군당 3개 샘플을 나타내고, 그리고 세포를 콜라겐에서 옷을 입힌 후 7일 시점에 촬영되었다. 주의: 침해성 표현형이 AXL 결함성 세포 (등갈게 됨)와 비교하여 AXL 야생형 세포 (분기)에서 관찰되었다. 그래프는 콜라겐 침입 분석평가의 정량화를 보여준다. B. shAXL과 shSCRM SKOV3ip.1 세포에서 MMP-2 발현의 실시간 PCR 분석. 발현 값은 18S에 정상화되었다; n = 3. 오차 막대는 S.E.M을 나타낸다. 별표는 스튜던트 t-검정 (student's t-test)에 의한 측정에서, shSCRM과 비교하여 발현에서 유의한 증가 또는 감소를 표시한다 (**, P < 0.001). C. shSCRM 또는 shAXL SKOV3ip.1 세포 (n = 6)의 MMP-2 리포터 분석평가. D. 혈청 기아 SKOV3ip.1 세포로부터 수집된 조건 배지에서 프로 (pro)-와 활동성 (active)-MMP2 활성에 대한 젤라틴 자이모그래피 분석평가. E. shscramble 대조 (shSCRM) 또는 AXL (shAXL)을 표적으로 하는 shRNA 서열을 발현하는 SKOV3ip.1 세포, 그리고 GAS6으로 처리되거나, 또는 PI3K 저해물질 Ly294002 (Ly)와 함께 GAS6으로 처리된 기아 SKOV3ip.1 세포 (strve)에서 Ser473에서 포스포-AKT (P-AKT), 총 AKT (AKT), 그리고 AXL 발현의 웨스턴 블롯 분석. F. GAS6으로 처리되거나, 또는 PI3K 저해물질 Ly294002 (Ly+GAS6)와 함께 GAS6으로 처리된 기아 SKOV3ip.1 세포 (strve)에서 MMP-2 리포터 분석평가.

도 5. 가용성 AXL 엑토도메인 요법은 시험관내에서 AXL 신호전달과 침입을 저해한다. A. 가용성 AXL 요법에 대한 기전의 개략적 표현. 가용성 AXL (sAXL)은 내인성 AXL 신호전달을 저해하는 미끼 수용체로서 기능한다. B. shscramble 대조 (shSCRM) 또는 AXL (shAXL)을 표적으로 하는 shRNA 서열을 발현하는 MDA231, SKOV3ip.1, 그리고 OVCAR-8 세포, 그리고 GAS6으로 처리되거나, 또는 PI3K 저해물질 Ly294002 (Ly)와 함께 GAS6으로 처리된 기아 SKOV3ip.1 세포 (strve)에서 Ser473에서 포스포-AKT (P-AKT), 총 AKT (AKT), 그리고 AXL 발현의 웨스턴 블롯 분석. C. 가용성 AXL 수용체 (sAXL) 또는 대조 배지 (-)를 내포하는 조건 배지로 처리된 세포에서 포스포-AKT Ser473 발현의 웨스턴 블롯 분석. 모든 세포는 48시간 동안 기아 배양되고 GAS6 (+) 또는 운반제 (-)로 처리되었다. D. 대조 벡터 또는 sAXL을 내포하는 조건 배지로 처리된 MDA-231 세포에서 콜라겐 침입 분석평가.

도 6. 가용성 AXL 수용체로 치료는 확립된 전이를 앓는 생쥐에서 전이성 종양 부담을 억제한다. A. 가용성 AXL 수용체 치료 연구의 개략적 표현. 누드 생쥐는 1×10^6 개 SKOV3ip.1 세포가 i.p. 주입되었다. 체내이식 (implantation)후 5일 시점에, 생쥐에서 거시적 병소의 존재가 확증되었다 (주입후 5일자에 복막 전이를 앓는 생쥐의 대표적인 사진이 도식되고, 전이성 병소는 원으로 표시된다). 7일자에, 생쥐는 아데노바이러스 발현 IgG2a-Fc 대조 (Ad-Fc) 또는 가용성 AXL 수용체 (Ad-sAXL)가 주입되었다. sAXL 발현의 혈청 수준은 아데노바이러스 주입후 3-4일마다 웨스턴 블롯 분석에 의해 평가되었다. 종양 세포 체내이식후 28일자에, 종양 부담이 모

든 생쥐에서 평가되었다. B. 종양 세포 주입후 28일 시점에 Ad-sAXL 또는 Ad-Fc를 발현하는 아데노바이러스로 치료된 생쥐의 대표적인 사진. 전이성 병소는 원으로 표시된다. 그래프는 군당 7마리 생쥐에 대한 평균 총 종양 숫자와 중량을 보여준다. 오차 막대는 S.E.M을 나타낸다. 주의: Ad-Fc 치료된 생쥐와 Ad-sAXL 치료된 생쥐 사이에 종양 숫자와 중량에서 통계학적 차이가 관찰되었다 ($p=0.01$, 스튜던트 t-검정) (*). C. Ad-Fc 또는 Ad-sAXL로 치료된 생쥐의 종양에서 MMP-2 발현의 실시간 PCR 분석.

도 7. 가용성 AXL 엑토도메인 요법은 정상 조직에 독성을 유발하지 않는다. A. 대조 (Fc) 또는 가용성 AXL 요법 (sAXL)으로 치료된 생쥐의 전체 CBC와 혈청 화학 분석. B. Fc 또는 sAXL로 치료된 생쥐로부터 회수된 간과 신장 조직의 H&E 염색.

도 8. 전이의 가용성 AXL 수용체 저해와 연관된 분자 기전을 설명하는 개략적 다이어그램. 가용성 AXL 수용체 (sAXL) 요법은 AXL 리간드 GAS6에 결합하는 미끼 수용체로서 기능한다. sAXL은 세포 침입과 전이를 자극하는 내인성 GAS6-AXL 신호전달 사건을 억제한다.

도 9. AXL 결합성 유방과 난소 암 세포주의 산출. A. 인간 유방과 난소 암 세포주의 패널에서 AXL 발현의 웨스턴 블롯 분석. 열 쇼크 단백질 70 (Hsp70)은 단백질 적하 대조로서 이용되었다. B. shscramble 대조 (shSCRM) 또는 AXL (shAXL)에 대한 shRNA 표적화 서열로 안정적으로 형질감염된 전이성 유방 (MDA-231)과 난소 (SKOV3ip.1과 OVCAR-8) 암 세포주에서 AXL 발현의 웨스턴 블롯 분석. 주의: shAXL 세포주는 AXL 발현에서 유의미한 감소를 갖는다.

도 10. AXL은 유방과 난소 종양 세포 부착 또는 생존에 영향을 주지 않는다. A-B. 보이든 챔버 (boyden chamber) 이동 분석평가에서 화학유인물질로서 혈청을 향한 MDA-231 (A)과 SKOV3ip.1 (B) 세포의 세포 이동 퍼센트. C-D. 세포의 기질 단백질에 MDA-231 (A)과 SKOV3ip.1 (B) 세포 부착의 분석. 약어: 소 혈청 알부민 (BSA), 피브로넥틴 (FN), 콜라겐 타입 I (Col I), 콜라겐 타입 IV (Col IV), 라미닌 (LN), 피브리노겐 (FBN). 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. E-F. XTT 분석평가에 의한 측정에서, 혈청 제거 (serum withdrawal) 이후에 AXL 야생형과 AXL 결합성 MDA-231 (E)과 SKOV3ip.1 (F) 종양 세포의 생존 분석.

도 11. 가용성 AXL 수용체로 치료는 확립된 OVCAR-8 전이를 앓는 생쥐에서 전이성 종양 부담을 억제한다. A. 가용성 AXL 수용체 치료 연구의 개략적 표현. 누드 생쥐는 5×10^6 개 OVCAR-8 세포가 i.p. 주입되었다. 체내이식 (implantation)후 14일 시점에, 생쥐에서 거시적 병소의 존재가 입증되었다 (주입후 14일자에 복막 전이를 앓는 생쥐의 대표적인 사진이 도시되고, 전이성 병소는 원으로 표시된다). 14일자에, 생쥐는 아데노바이러스 발현 IgG2a-Fc 대조 (Ad-Fc) 또는 가용성 AXL 수용체 (Ad-sAXL)가 주입되었다. sAXL 발현의 혈청 수준은 웨스턴 블롯 분석에 의해 평가되었다. 종양 세포 체내이식후 34일자에, 종양 부담이 모든 생쥐에서 평가되었다. B. 종양 세포 주입후 28일 시점에 Ad-sAXL 또는 Ad-Fc를 발현하는 아데노바이러스로 치료된 생쥐의 대표적인 사진. 전이성 병소는 원으로 표시된다. C. 그래프는 군당 8마리 생쥐에 대한 평균 총 종양 숫자와 중량을 보여준다. 오차 막대는 S.E.M을 나타낸다. 주의: Ad-Fc 치료된 생쥐와 Ad-sAXL 치료된 생쥐 사이에 종양 숫자와 중량에서 통계학적 차이가 관찰되었다 ($p<0.01$, 스튜던트 t-검정) (*).

도 12. GAS6에 AXL 라이브러리의 선별 5 산물의 결합. 야생형 AXL (A) 또는 방향적 진화 작업 (directed evolution work)으로부터 혼주된 AXL 선별 5 산물 (B)을 발현하는 효모 세포의 유세포분석 도트 플롯 (dot plot). 데이터는 실시예 2에서 기술된 바와 같은 오프-레이트 검사 (off-rate test) 이후에 결합을 증명한다. 2 nM Gas6에 대한 결합 수준은 왼쪽 칼럼에 도시되고, 4시간 풀림 단계 이후에 Gas6에 대한 결합 수준은 중간 칼럼에 도시되고, 그리고 6시간 풀림 단계 이후에 Gas6에 대한 결합의 수준은 오른쪽 칼럼에 도시된다. 세포 표면 상에서 특정 단백질의 발현에 양성인 세포 (각 유세포분석 도트 플롯의 오른쪽 위편 사분면)의 경우에, Gas6에 대한 결합 수준 (y-축)은 막대그래프 아래쪽에 정량된다. 혼주된 선별 5 산물은 야생형 AXL과 비교하여 유의미하게 향상된 Gas6 결합을 보인다.

도 13. GAS6에 증강된 AXL 변이체의 결합. 왼쪽 패널은 야생형 AXL (녹색 원)과 비교하여 AXL 돌연변이체 S6-1 (적색 정사각형)과 S6-2 (청색 다이아몬드)에 의한 Gas6을 향한 평형 결합을 보여준다. 돌연변이체 S6-1과 S6-2는 더욱 낮은 농도의 Gas6에 대한 훨씬 높은 수준의 결합을 나타내는데, 이것은 야생형 AXL에 비하여 이들 돌연변이체에 대한 더욱 강한 결합 친화성을 증명한다. 오른쪽 패널은 야생형 또는 조작된 Gas6-AXL 상호작용의 해리 동역학을 보여준다. 야생형 Gas6-AXL 상호작용 ("야생형")은 시간의 함수로서 빠르게 해리하는 반면, Gas6과 S6-1 ("S6-1") 또는 S6-2 ("S6-2") 사이에 조작된 상호작용은 결합의 유의미하게 증가된 보전을 증명한다.

도 14. 정제된 AXL S6-1-Fc의 복막내 전달은 야생형 AXL-Fc와 AXL E59R/T77R-Fc에 비하여 증강된 치료 효과를

보인다. 3가지 치료 군, AXL E59R/T77R-Fc, 야생형 AXL-Fc, 그리고 AXL S6-1-Fc로부터 생쥐의 검시로부터 2개의 대표적인 이미지가 도시된다. 검은색 원은 이미지에서 두드러진 전이성 병소를 표시하지만 모든 전이성 부위를 표시하는 것은 아니다. 야생형 AXL-Fc는 음성 대조 (negative control), AXL E59R/T77R에 비하여 전이의 온전한 저해를 보이는 반면, AXL S6-1은 전이의 거의 완전한 저해를 보인다.

도 15. SKOV3ip.1 이종이식편 모형에서 전이의 저해. 위쪽 2개의 그래프에서, 각 치료 군에서 계산된 전이성 병소의 평균 숫자를 표시하기 위하여, 동일한 데이터 세트가 2가지 상이한 방식으로 제공된다. 유사하게, 아래쪽 2개의 그래프는 각 치료 군에서 생쥐로부터 절개된 모든 전이의 총 중량을 개설했는 동일한 데이터 세트를 도시한다. 야생형 AXL-Fc는 병소 숫자 (위쪽 패널) 및 전체 중량 (아래쪽 패널) 둘 모두에서 감소에 의해 지시되는 바와 같이, 음성 대조 E59R/T77R-Fc와 비교하여 전이의 확산을 억제한다. AXL S6-1-Fc는 병소 숫자 (위쪽 패널) 및 전체 중량 (아래쪽 패널)에 의한 평가에서, 야생형 AXL-Fc와 AXL E59R/T77R-Fc 둘 모두와 비교하여 종양 부담에서 유의미한 감소를 보인다. 이들 데이터는 AXL S6-1의 증강된 친화성이 야생형에 비하여 향상된 치료 효능을 제공하고, 그리고 AXL S6-1-Fc가 전이의 관리를 위한 실용적인 치료제라는 것을 증명한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0111] 실험

[0112] 실시예 1

[0113] AXL 신호전달의 치료적 차단은 전이성 종양 진행을 저해한다

[0114] 전이성 질병에 대한 치료 표적으로서 AXL의 증명은 거의 탐구되지 않았고, 그리고 더욱 중요하게는, AXL 표적화의 어떤 생체내 상관도 증명되지 않았다. 본 실시예에서, AXL은 인간 유방과 난소 암 환자에서 전이의 마커이고, 그리고 이들 환자에서 질병의 심각도가 원발성 종양에서 AXL 단백질의 양과 상관하는 것으로 증명된다. 가장 중요하게는, 종양 전이가 가용성 AXL 엑토도메인의 투여에 의해, 기존의 전이를 앓는 생쥐에서 성공적으로 치료될 수 있는 것으로 증명된다. 기계론적으로, 전이성 질병을 앓는 동물에서 AXL 신호전달의 저해는 감소된 침입과 MMP 활성을 유발한다. 이들 조사 결과는 가용성 AXL 엑토도메인의 투여를 통한 종양 세포에서 AXL 신호전달 캐스케이드의 저해가 전이성 종양 진행을 저해하는데 충분하다는 것을 증명한다.

[0115] 본 연구에서, AXL이 인간 암에서 전이를 위한 결정적인 인자이고, 그리고 AXL 신호전달의 치료적 차단이 전이성 질병에 대한 효과적인 치료법인지를 조사한다. 전이성 유방과 난소 암의 시작과 진행에서 AXL의 역할을 직접적으로 평가하기 위해 유전학적 접근법 및 치료적 접근법 둘 모두 이용된다.

[0116] AXL은 인간 암에서 종양 진행과 전이의 마커이다. 먼저, 정상적인 조직, 원발성 종양, 그리고 유방 또는 난소 암을 앓는 환자로부터 전이에서 AXL 발현을 비교하였다. 정상적인 인접 유방 암 표본의 100%에서, 유선 상피 세포는 AXL이 막 결합된 수용체임을 고려하면, 배경 염색으로 간주되는 AXL에 대한 미만성 세포질과 핵 염색을 보였다 (n = 27, 도 1A). 하지만, 원발성 유방 종양에서, 종양 상피 내에 막 AXL 염색이 등급 1 표본의 25% (1/4), 등급 2 표본의 76% (10/13), 그리고 등급 3 표본의 100% (18/18)에 존재하였다 (도 1A와 표 1). 부가적으로, AXL은 림프절 전이의 88% (8/9)에서 발현되었다.

[0117] 장액 난소 암 표본에서, AXL 발현은 먼저, 정상적인 난소 표면 상피 (OSE)에서 조사되었는데, 그 이유는 대부분의 난소 종양이 이들 세포로부터 발생하는 것으로 생각되기 때문이다. 정상적인 OSE를 보전하는 난소 암 환자 샘플에서, AXL은 표본의 0% (0/5)에서 발현되었다 (도 1B). 대조적으로, 원발성 종양 상피에서 막 AXL 염색은 시기 II 환자 샘플의 66% (6/9) 및 시기 III 환자 샘플의 83% (53/64)에 존재하였다 (도 1B와 표 1). 이에 더하여, 장막과 복막과 같은 통상의 전이성 부위로부터 종양 샘플은 각각, 표본의 75% (24/32)와 90% (27/30)에서 높은 AXL 발현을 보였다 (도 1B와 표 1). 이들 조사 결과는 원발성 종양 내에서 AXL 발현이 진전된 질병과 전이성 종양에서 나타나는 전이와 상관한다는 것을 증명한다. 더 나아가, 이들 데이터는 인간 유방과 난소 암으로부터 유래된 전이가 높은 수준의 AXL을 발현한다는 것을 증명한다.

[0118] AXL은 종양 전이를 위한 결정적인 인자이다. 전이에서 AXL의 기능적 역할을 조사하기 위하여, 유방과 난소 전이의 생쥐 모형에서 AXL을 저해하기 위한 유전학적 접근법이 이용되었다. 이런 목적으로, 높은 수준의 AXL 발현을 갖는 전이성 세포주를 확인하기 위해 AXL 단백질 발현에 대하여 한 무리의 인간 유방과 난소 암 세포주가 스크리닝되었다. 임상적 조사 결과와 유사하게, AXL은 대부분의 전이성 유방 (NCI-ADR-RES, MDA-231, HS 578T, BT-549)과 난소 (SKOV3, OVCAR-8, ES-2, MESOV, HEYA8) 세포주에서 고도로 발현되는 반면, AXL은 낮은 전이 잠재력을 갖는 세포주 (MCF7, MDA-MB435, T47D, IGROV1, OVCAR-3)에서 검출되지 않는 또는 낮은 수준에서 발현되었

다 (도 9). AXL 결합성 전이성 유방 (MDA-231)과 난소 (SKOV3ip.1과 OVCAR-8) 세포주는 앞서 기술된 AXL shRNA 표적화 서열을 이용하여 산출되었다. 웨스턴 블롯 분석은 shAXL 표적화 서열을 발현하는 세포가 shscramble 대조 shRNA 표적화 서열 (shSCRM)을 발현하는 세포와 비교하여 5% 이하의 AXL 단백질을 발현한다는 것을 확증하였다 (도 9B).

[0119] 유방 종양 전이의 후기 시기에서 AXL의 역할을 직접적으로 평가하기 위하여, AXL-야생형 (shSCRM)과 AXL-결합성 (shAXL) MDA-231 세포가 누드 생쥐의 꼬리 정맥 내로 주입되고 28일자에 폐에서 종양 부담이 평가되었다. 폐의 현미경적 평가는 shRNA shscramble (shSCRM) MDA-231 세포가 주입된 5/5마리 생쥐에서 AXL에 대하여 양성으로 염색되는 전이성 병소가 발생한다는 것을 드러냈다 (도 2A). 대조적으로, shRNA AXL (shAXL)가 주입된 5마리 생쥐는 조직학적 평가 시에 폐 전이가 전혀 발생하지 않았다 (도 2A). 이들 생쥐의 폐에서 종양 부담을 정량하기 위하여, 인간 GAPDH에 대한 실시간 PCR 분석이 수행되었다. 도 2A는 shSCRM MDA-231 세포가 주입된 생쥐의 폐가 높은 수준의 인간 GAPDH를 발현한다는 것을 증명하고, 이것은 MDA-231 세포로부터 유래된 전이성 병소의 존재를 암시하였다. 이에 더하여, shSCRM 주입된 생쥐는 폐에서 인간 AXL을 발현하였는데, 이것은 AXL 양성 종양 세포의 존재를 암시하였다 (도 2A). 대조적으로, shAXL 종양 세포가 주입된 생쥐는 폐에서 인간 GAPDH 또는 AXL을 발현하지 않았다. 이들 조사 결과는 AXL의 유전학적 비활성화가 이러한 모형에서 폐 전이의 형성을 완전하게 억제하는데 충분하다는 것을 증명한다.

[0120] AXL의 유전학적 비활성화가 생체내에서 전이하는 난소 암 세포의 능력에 영향을 주는 지를 결정하기 위하여, 난소 암의 복막 이종이식된 모형을 이용하여 전이를 형성하는 shSCRM과 shAXL SKOV3ip.1 세포의 능력을 비교하였다. 이러한 모형은 인간 난소 전이의 복막 파종의 발달 단계를 반복하는데, 여기서 생쥐는 SKOV3ip.1 세포의 복막 주입 이후에, 복수 및 장간막, 횡격막, 간, 그리고 다른 복막 표면에 부착된 100개 이상의 작은 전이성 병소로 구성되는 급격하게 진행되는 질병이 발생한다 (도 3B).

[0121] SKOV3ip.1 복막 전이에서 AXL 발현의 면역조직화학적 분석은 인간 난소 전이에서와 유사하게, AXL이 SKOV3ip.1 전이성 병소에서 고도로 발현된다는 것을 드러냈고, 이것이 난소 전이에서 AXL의 역할을 조사하는데 적절한 모형 시스템이라는 것을 암시하였다 (데이터 제시되지 않음). shSCRM과 shAXL 세포의 복막 주입후 28일 시점에, shSCRM 생쥐는 심각한 복수와 이환 (morbidity)의 징후를 보였고, 따라서 이들 생쥐를 희생시키고 shSCRM과 shAXL 주입된 생쥐 사이에 종양 부담에서 변화를 조사해야 했다. shSCRM 세포가 주입된 생쥐는 복수 및 >100 복막 전이가 발생하는 반면, shAXL 세포가 주입된 생쥐는 극소수의 전이가 발생하였다 (도 2B). 크기에서 5mm보다 큰 복막 전이의 평균 숫자는 shSCRM 주입된 생쥐에서 13.4+/-4.3에서 shAXL 주입된 생쥐에서 0.8+/-0.5로 유의미하게 감소하였다 (도 2B). 유사하게, 이들 종양의 평균 중량은 shSCRM-주입된 생쥐에서 236 +/- 74 mg에서 shAXL-주입된 생쥐에서 39.2 +/-18 mg으로 유의미하게 감소하였다 (도 2B). 이들 조사 결과의 뒷받침에서, OVCAR-8 세포에서 AXL 발현의 적중 (knockdown)은 총 난소 복막 종양 덩어리와 종양 숫자를 유의미하게 저해하였다 (도 2C). 종합적으로, 이들 조사 결과는 AXL이 유방과 난소 종양 전이를 위한 결정적인 인자라는 것을 증명한다.

[0122] 그 다음, 생체내에서 전이 형성에서 AXL의 중요한 역할을 고려하여, AXL이 전이를 특이적으로 조절하는 지, 또는 AXL이 종양 세포 증식과 성장의 조절에서 총괄적인 역할을 수행하는 지를 결정하고자 하였다. 이들 의문점을 해결하기 위하여, 시험관내 증식 분석평가가 수행되었는데, 여기서 AXL 야생형 (shSCRM)과 AXL 결합성 (shAXL) 세포 사이에 총 세포 숫자가 10-14일 기간 동안 계산되었다. shSCRM과 shAXL MDA-231, SKOV3ip.1 또는 OVCAR-8 세포 사이에 세포 성장 곡선에서 유의미한 차이가 관찰되지 않았다 (도 3). 유사하게, shSCRM과 shAXL 세포 사이에 정위 MDA-231 또는 피하 SKOV3ip.1 종양 성장에서 유의미한 차이가 관찰되지 않았다 (도 3). 이들 조사 결과는 AXL이 생체내에서 종양 세포 증식 또는 피하 성장에 요구되지 않는다는 것을 암시한다. 전체적으로, 이들 조사 결과는 AXL이 유방과 난소 종양에서 종양 전이를 특이적으로 조절한다는 것을 암시한다.

[0123] AXL은 종양 세포 침입을 조절한다. AXL-매개된 전이에 대한 잠재적 기전을 결정하기 위하여, 무편향 (unbiased) 접근법을 채택하고, 그리고 증식, 침입, 이동, 부착, 그리고 생존을 비롯한 전이성 캐스케이드와 연관된 결정적인 세포 기능에서 AXL의 역할을 직접적으로 비교하였다. shAXL MDA-231, SKOV3ip.1, 그리고 OVCAR-8 세포는 타입 I 콜라겐을 통해 침입하는 능력이 유의미하게 손상되는 것으로 밝혀졌다 (도 4A). 또한, shAXL 세포에서 세포 이동의 근소한 감소가 관찰되었지만, 혈청 제거후 ECM 단백질에 부착 또는 생존에서 차이가 발견되지 않았는데, 이것은 AXL이 전이성 캐스케이드에서 침입에 지배적인 영향을 준다는 것을 암시하였다.

[0124] 분자 수준에서, MMP-9는 최근에, 유방 암 세포에서 AXL-매개된 침입의 효과기 (effector)로서 확인되었다. 이런 이유로, MMP-9 발현 또는 활성 역시 AXL-결합성 난소 종양 세포에서 변경되는 지를 조사하였다. SKOV3ip.1 세포

는 MMP-9를 발현하진 않지만, MMP-2가 이들 세포에서 고도로 발현되고, MMP-2 mRNA가 shAXL 세포에서 유의미하게 감소하는 것으로 밝혀졌다 (도 4B). MMP-2 루시페라아제 리포터 분석평가는 MMP-2 프로모터 활성이 shSCRM 세포와 비교하여 shAXL 세포에서 유의미하게 감소한다는 것을 드러내고, 이것은 AXL이 전사 수준에서 MMP-2를 조절한다는 것을 암시하였다 (도 4C). 젤라틴 자이모그래피 분석평가는 MMP-2 분비된 단백질 수준 역시 shSCRM SKOV3ip.1 세포와 비교하여 shAXL 세포에서 유의미하게 감소한다는 것을 지시하였다 (도 4D). 종합적으로, 이들 조사 결과는 인간 난소 암 세포에서 MMP-2 발현과 활성의 상류 조절자로서 AXL의 역할을 암시한다.

[0125] 그 다음, AXL-매개된 MMP-2 발현에 관여하는 신호전달 경로를 밝히고자 하였다. GAS6에 의한 AXL의 활성화는 PI3K, RAS, MAPK, SRC, 그리고 PLC를 비롯한 다수의 세포내 신호전달 경로를 직접적으로 유도하는 것으로 보고되었다. 이들 경로 중에서, PI3K 신호전달 경로는 난소 암 세포에서 MMP-2 발현과 침입을 조절하는 것으로 밝혀졌다. PI3K 신호전달이 SKOV3ip.1 세포에서 AXL의 상실에 의해 영향을 받는 지를 결정하기 위하여, AXL-야생형과 AXL-결합성 SKOV3ip.1 세포에서 Ser473에서 포스포-AKT (P-AKT)에 대한 웨스턴 블롯 분석이 수행되었다. shSCRM SKOV3ip.1 세포와 비교하여 shAXL 세포에서 P-AKT 발현의 현저한 저해가 관찰되었다 (도 4E). 부가적으로, 기아 SKOV3ip.1 세포의 GAS6 자극은 P-AKT의 PI3K-의존성 유도를 유발하였는데, 그 이유는 PI3K 저해물질 Ly294002로 치료가 GAS6-유도된 P-AKT 발현을 완전하게 소멸시켰기 때문이다 (도 4E). PI3K 경로가 AXL-매개된 MMP-2 발현에 관여하는 지를 결정하기 위하여, GAS6과 Ly294002의 존재에서 MMP-2 루시페라아제 리포터 분석평가가 수행되었다. GAS6 자극후 MMP-2 프로모터 활성의 유도는 Ly294002 치료에 의해 완전하게 차단되었는데, 이것은 GAS6/AXL 신호전달이 PI3K 신호전달 사건을 통해 MMP-2 발현을 조절한다는 것을 암시하였다 (도 4F).

[0126] AXL의 치료적 저해는 생쥐에서 전이성 종양 진행을 유의미하게 억제한다. 지금까지의 조사 결과는 AXL이 전이를 위한 결정적인 인자임을 증명하고, 그리고 치료적 차단이 전이성 질병에 대한 효과적인 치료법일 수 있다는 가설을 뒷받침한다. 이러한 가설을 검증하기 위하여, 가용성 AXL 엑토도메인이 AXL 신호전달을 저해하는 치료 전략으로서 이용되었다. 가용성 AXL 엑토도메인은 미끼 수용체로서 기능적으로 작용하고, 그리고 사전에, 시험관 내에서 및 생체내에서 나노물 친화성으로 GAS6에 결합하는 것으로 밝혀졌다 (도 5A). 먼저, 가용성 AXL 엑토도메인으로 치료가 전이성 종양 세포에서 AXL 신호전달과 침입을 저해하는데 충분한 지를 조사하였다. PI3K/AKT 신호전달은 다양한 세포 유형에서 AXL에 의해 조절된다. PI3K/AKT 신호전달은 SKOV3ip.1 세포에서 GAS6/AXL 신호전달에 의해 조절되고, 그리고 가용성 AXL 엑토도메인 (sAXL)으로 치료는 GAS6 처리된 SKOV3ip.1 세포에서 PI3K/AKT 활성화를 감소시킬 수 있는 것으로 밝혀졌다 (도 5B와 C). 유사하게, 콜라겐에서 MDA-231 세포의 sAXL로 처리는 세포 침입을 극적으로 감소시키는데 충분하였는데, 이것은 sAXL 처리가 시험관내에서 AXL 신호전달과 침입에 영향을 준다는 것을 증명하였다 (도 5D).

[0127] 그 다음, sAXL 치료가 난소 암의 고도 전이성 모형에서 전이성 종양 진행에 영향을 주는 지를 조사하였다. 먼저, 누드 생쥐에서 SKOV3ip.1 전이성 병소를 확립하고 (1일자) 거시적 병소의 확인후 7일자에 sAXL로 치료를 시작하였다. sAXL 요법은 아테노바이러스 시스템을 이용하여 전달되었는데, 여기서 간은 주입후 28일자까지 생쥐의 혈청 내로 sAXL 단백질의 전신 생산을 방출한다 (도 6A). 28일자에 종양 부담의 거시적 분석은 sAXL 요법을 받는 생쥐가 Fc 대조 요법으로 치료된 생쥐와 비교하여 종양 부담에서 유의한 ($p < 0.01$) 감소를 갖는다는 것을 드러냈다. SKOV3ip.1 종양 모형에서, 총 종양 중량과 종양 숫자는 Fc 치료된 생쥐와 비교하여 sAXL로 치료된 생쥐에서 63% 감소하였다 (도 6B). 유사하게, OVCAR-8 모형에서, 총 종양 중량과 종양 숫자는 각각, 유의미하게 47%와 42% 감소하였다 (도 11). SKOV3ip.1 종양에서 MMP2 발현 수준은 실시간 PCR 분석에 의해 조사되고, 그리고 MMP2 수준은 Fc 대조 치료된 생쥐와 비교하여 sAXL 치료된 생쥐의 종양에서 유의미하게 감소하는 것으로 밝혀졌다 (도 6C). 이들 결과는 단일 작용제 AXL 요법이 확립된 질병을 앓는 생쥐에서 전이성 종양 부담을 유의미하게 감소시키는데 충분하다는 것을 증명한다. 이에 더하여, 이들 조사 결과는 전이성 종양 성장에 대한 AXL의 치료 효과가 적어도 부분적으로 MMP 활성의 조절을 통해 침입의 저해를 수반할 수 있다는 것을 암시한다.

[0128] MMP를 표적으로 하는 기존의 항-전이성 저해물질이 정상 조직의 독성에 대한 유의미한 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다는 점을 고려하여, 21일 동안 sAXL 요법으로 치료된 생쥐에서 정상 조직의 독성의 포괄적인 분석이 수행되었다. sAXL 또는 Fc 요법으로 치료된 누드 생쥐에서 어떤 행동적, 거시적, 또는 현미경적 비정상도 관찰되지 않았다 (도 7).

[0129] 침입과 이동은 종양 전이의 병인 (pathogenesis)에 기여하는 중요한 세포 내재적 성질이다. 이들 과정을 표적으로 하는 치료제는 전이를 저해하는 유용한 전략일 수 있고 전이성 질병을 앓는 환자에 임상적 혜택을 제공할 수 있는 것으로 가정된다. 본 보고서에서, 수용체 티로신 키나아제 AXL은 종양 세포 침입과 전이를 지배하는 결정적인 인자인 것으로 증명된다. 가장 중요하게는, 가용성 AXL 수용체를 이용한 AXL 신호전달의 치료적 차단은 기존의 전이성 질병을 앓는 생쥐에서 전이성 종양 진행을 유의미하게 저해하는데 충분한 것으로 증명된다. 기계론

적으로, 이들 연구 결과는 가용성 AXL 요법이 적어도 부분적으로 MMP 활성화와 침입의 저해를 통해 종양 전이를 저해한다는 것을 암시한다. 최종적으로, AXL은 인간 난소와 유방 암 환자로부터 전이 및 진전된 시기 원발성 종양에서 고도로 발현되는 것으로 증명되고, 이것은 이들 조사 결과의 임상적 중요성을 강조한다.

[0130] 여기서, AXL은 인간 암에서 전이를 위한 결정적인 인자이고, 그리고 AXL 신호전달의 치료적 차단은 전이성 질병에 대한 효과적인 치료법인 것으로 증명된다. 여기서, AXL은 유방과 난소 암 환자로부터 전이 및 진전된 원발성 종양 샘플에서 고도로 발현되는 것으로 증명된다. AXL은 누드 생쥐 질병 모형을 이용하여 전이성 유방과 난소 암의 시작에 결정적인 것으로 유전학적으로 증명된다. 가장 중요하게는, 고도로 특이적인 비-독성 가용성 AXL 수용체가 항-AXL 요법으로서 개발되었고, 그리고 가용성 AXL 수용체 요법은 기존의 전이성 질병을 앓는 생쥐에서 전이성 종양 진행을 유의미하게 저해하는데 충분한 것으로 증명되었다. 이들 조사 결과는 종양 세포에서 AXL 신호전달 캐스케이드의 저해가 전이성 질병의 시작과 진행 둘 모두를 차단할 수 있다는 것을 증명한다. 이들 데이터는 AXL을 진전된 및 전이성 유방과 난소 암에 대한 새로운 치료 표적으로서 목시하고, 그리고 항-AXL 요법이 전이성 질병의 시작과 진행 둘 모두를 제어할 수 있다는 것을 암시한다.

[0131] MMP는 종양 세포 침입과 전이의 조절에서 중요한 역할을 수행한다. 하지만, 종양 세포가 MMP 활성을 유도하는 기전은 여전히 불명확하다. MMP 발현은 인간 암에서 증가되고 종양 진행 및 불량한 환자 생존과 상관한다. MMP에서 유전자 증폭 및 돌연변이 활성화는 인간 암에서 거의 관찰되지 않는데, 이것은 다른 인자가 암에서 증강된 MMP 발현을 주도한다는 것을 암시한다. 이들 데이터는 MMP-2 발현이 인간 난소 암 세포에서 전사 수준에서 AXL에 의해 조절된다는 증거를 제공한다. AXL이 MMP-2 발현을 조절하는 정확한 기전이 여전히 결정되지 않았지만, PI3K 경로의 약리학적 저해가 GAS6 자극된 세포에서 MMP-2 프로모터 활성을 감소시키는 것으로 증명되고, 이것은 PI3K 경로에 대한 역할을 암시한다 (도 8). 중요하게는, 이들 결과는 AXL의 치료적 차단이 종양에서 MMP 활성을 저해하는 효과적인 비-독성 전략일 수 있음을 암시한다. 넓은 스펙트럼 MMP 저해물질이 부분적으로, 높은 수준의 정상 조직의 독성으로 인하여 암 시험에서 성공적이지 못하였다. 이들 조사 결과는 항-AXL 요법의 예측된 부작용이 최소한이라는 것을 암시한다. 생쥐에서 가용성 AXL 엑토도메인 요법의 아데노바이러스-매개된 전달과 연관된 어떤 정상 조직의 독성도 관찰되지 않았다. 게다가, 생식계열 (germline) AXL과 GAS6 적중 생쥐는 생존하고 성체로서 표현형적으로 정상적인데, 이것은 AXL 또는 GAS6이 발달 또는 정상적인 조직 기능에 요구되지 않는다는 것을 암시한다.

[0132] 단일-작용제 AXL 요법은 전이성 난소 암의 고도 전이성 모형에서 전이성 종양 진행을 저해하는데 충분한 것으로 증명된다. 이들 조사 결과는 난소 암의 치료를 위한 중요한 임상적 함의를 갖는다. 미국에서 대략 14,600명이 매년 난소 암으로 사망한다. 비록 아바스틴 (Avastin) (mAb 표적화 VEGF)과 타르세바 (Tarceva) (소형 분자 EGFR 키나아제 저해물질)가 진전된 및 재발성 난소 암의 치료용으로 임상 시험 중에 있긴 하지만, 현재 난소 암의 치료를 위한 FDA 승인된 생물제제는 없다. 난소 암에 대한 표준 요법은 질병의 최적 용적축소 (debulking) 수술, 그 이후에 세포독성 백금-탁산 (platinum-taxane) 복합 요법을 포함한다. 이들 노력에도 불구하고, 난소 암으로 진단된 환자 중에서 80%는 재발성 질병이 발생하고 이들 환자 중에서 단지 30%만 진단후 5년을 생존한다.

[0133] 이들 데이터는 AXL 요법이 진전된 및 재발성 난소 암의 치료를 위한 효과적인 어췌먼트 요법임을 증명한다. 본 연구에 이용되는 전이성 난소 종양 진행의 모형은 외과적 용적축소 (surgical debulking) 이후에 인간 환자에서 재발성 질병의 발생과 유사하다. AXL 요법은 확립된 질병을 앓는 생쥐에서 전이성 종양 부담을 63% 감소시킬 수 있는 것으로 관찰되었다. 질병의 진행 동안 새로운 전이성 병소의 확립이 유의미하게 감소하였다. 이러한 관찰 결과는 AXL이 세포 증식 또는 성장보다는 종양 세포 침입에 주로 영향을 준다는 것을 증명하는 조사 결과와 일치한다. 종합하면, 이들 결과는 AXL 요법이 일차적으로 항-전이성 작용제로서 기능하고, 그리고 현재의 세포독성제와의 복합 요법으로서 가장 효과적일 수 있다는 것을 암시한다.

[0134] 요약하면, AXL은 전이를 위한 결정적인 인자이고, 그리고 AXL 신호전달의 차단은 전이에서 치료적 혜택을 갖는다. 이들 연구는 전이성 질병에 대한 항-AXL 요법의 중요한 전임상 데이터를 제공한다.

[0135] 방법

[0136] 세포주. 난소 SKOV3, SKOV3ip.1, 그리고 HEYA8 세포는 Dr. Gordon Mills (MD Anderson Cancer Center)로부터 선물로서 획득되었다. 난소 ES-2와 MESOV 세포는 Dr. Branimir Sikic (Stanford University)로부터 선물이었다. MDA-231, OVCAR-3, 그리고 MCF-7 세포는 ATCC로부터 구입되었다. IGROV-1과 OVCAR-8 세포는 NCI-Frederick DCTD 종양 세포주 저장소로부터 구입되었다. 세포는 37°C에서 5% CO₂ 배양기에서, 10% 열 불활화된 소 태아 혈청 및 1% 페니실린과 스트렙토마이신으로 보충된 적절한 배지에서 배양되었다. 유방과 난소 암 세포

주의 NCI60 패널로부터 세포 펠릿 (pellet)은 Dr. Giovanni Melillo (NCI-Frederick)에 의해 제공되었다.

- [0137] 환자와 조직 마이크로어레이. 인간 유방 조직 마이크로어레이는 US Biomax (BR1002)로부터 구입되었다. 난소 인 간 조직 마이크로어레이는 Stanford University Pathology Department로부터 구입되었다. 총 73개의 파라핀 포 매된 종양 샘플은 Stanford Hospital에서 1995년부터 2001년까지, 이전에 치료되지 않은 난소 암 환자로부터 획 득되었다. 이들 원발성 난소 종양 샘플은 환자당 2개의 샘플로 구성되는 조직 마이크로어레이 내로 집합되었다. 복막으로부터 추가의 30개 종양 샘플 역시 이러한 마이크로어레이에서 평가되었다. 모든 환자는 장액 난소 암을 앓고, 그리고 단계 정보는 International Federation of Gynecology and Obstetrics 표준에 따라 획득되었다. 모든 표본 및 그들의 상응하는 임상적 정보는 Stanford University에서 임상시험 심사 위원회 (institutional review board)에 의해 승인된 프로토콜 하에 수집되었다. 추가의 상업적으로 가용한 종양 마이크로어레이는 장 막 (US Biomax)으로부터 32개의 전이성 병소를 조사하는데 이용되었다.
- [0138] AXL 면역조직화학. 파라핀 포매된 조직 슬라이드는 표준 면역조직화학적 방법에 따라, 자일렌으로 탈파라핀화되 고, 재수화되고, 그리고 탈피되었다. AXL 원발성 항체 (RandD Systems)는 1:500 희석도에서 이용되었다. 모든 샘플에 대한 음성 대조는 이차 항체 단독을 이용하여 수행되었다. 항원-항체 복합체는 제조업체의 프로토콜에 따라, VECTASTAIN ABC system (Vector Laboratories) 및 DAB Substrate Kit for Peroxidase (Vector Laboratories)를 이용하여 가시화되었다. 슬라이드는 헤마톡실린 (hematoxylin)으로 대조염색되었다. 종양 세포 의 막 상에서 AXL 염색은 AXL 발현에 양성인 세포의 백분율에 따라 현미경적으로 채점되었다 (없는 경우에 0, 불량한 품질 샘플의 경우에 1, 5-60%의 경우에 2, 그리고 61-100%의 경우에 3).
- [0139] 리포터 분석평가. MMP-2 프로모터의 1659 bp에 의해 구동된 MMP-2 리포터 플라스미드는 선물로서 제공되었다. 루시페라아제 활성은 shSCRM과 shAXL SKOV3ip.1 세포에서 Dual-Glo 루시페라아제 분석평가 시제 (Promega)에 의해 결정되고 Monolight 2010 광도계 (Analytical Luminescence Laboratory)에서 측정되었다. 반딧불이 루 시페라아제 활성은 레닐라 (Renilla) 활성에 대해 정상화되었다. 분석평가는 삼중으로 수행되고 2회 반복되었다.
- [0140] 일시적인 레트로바이러스 형질감염. 일시적인 DNA 형질감염은 제조업체의 지시에 따라, Lipofectamine 2000 (Invitrogen)으로 수행되었다. 0.1 μ g의 MMP-2 cDNA (OpenBiosystems)는 6개 웰 접시로 형질감염되었다.
- [0141] siRNA: AXL 또는 대조를 표적화하는 siRNA 서열은 Dharmacon으로부터 구입되었다. 모든 siRNA 형질감염은 제조 업체 (Dharmacon, Lafayette, CO)의 프로토콜에 따라, Dharmafect 1 형질감염 시제와 함께 Dharmacon Smart Pools을 이용하여 수행되었다.
- [0142] shRNA: AXL RNA의 특이적 분해를 위한 올리고는 앞서 기술된 5'-GATTGGGAGAACACTGA-3'로서 합성되었다. schramble 서열은 비-표적화 shRNA 5'-AATTGTACTACACAAAAGTAC-3'으로서 이용되었다. 이들 올리고는 RNAi-Ready pSiren RetroQ (BD Bioscience) 벡터 내로 클로닝되고, 그리고 SKOV3ip.1, MDA-231, 그리고 OVCAR-8 세포는 이 들 벡터로 레트로바이러스 형질도입되었다. 감염된 세포는 푸로마이신 (puromycin) (Sigma)에서 선별되고, 그리 고 다중클론 집단은 웨스턴 블롯 분석에 의해 감소된 AXL 발현 수준에 대하여 조사되었다.
- [0143] 플라스미드. 아미노산 1-451에 상응하는 AXL 엑토도메인은 인간 AXL cDNA (Open Biosystems)로부터 증폭되고 CMV-구동된 pADD2 아데노바이러스 서틀 벡터 내로 클로닝되었다. 대조 벡터 또는 AXL 1-451로 일시적인 DNA 형 질감염은 제조업체의 지시에 따라, Lipofectamine 2000 (Invitrogen)으로 HCT116 세포 내로 수행되었다. 조건 배지는 형질감염후 48-72시간 시점에 수집되었다.
- [0144] 부착 분석평가. SKOV3ip.1 shSCRM과 shAXL 세포는 5 μ m CMFDA (Molecular Probes)로 형광 표지되었다. 세포는 세척되고 비-효소성 세포 해리 완충액 (Gibco)을 이용하여 분리되었다. 세포 (5X10⁵)는 96 웰 평판 내로 도말 되고 50 μ g/ μ l의 콜라겐 타입 I (BD Bioscience)로 미리 코팅되었다. 37°C에서 60-분 배양후, 세포는 조심스럽 게 5회 세척되었다. 형광 활성 (여기, 494 nm; 방출, 517 nm)은 형광 분광광도계를 이용하여 측정되었다.
- [0145] 콜라겐 타입 I에 SKOV3ip.1 부착. SKOV3ip.1 shSCRM과 shAXL 세포는 5 μ m CMFDA (Molecular Probes)로 형광 표 지되었다. 세포는 세척되고 비-효소성 세포 해리 완충액 (Gibco)을 이용하여 분리되었다. 세포 (5X10⁵)는 96 웰 평판 내로 삼중으로 도말되고 50 μ g/ μ l의 콜라겐 타입 I (BD Bioscience)로 미리 코팅되었다. 37°C에서 60- 분 배양후, 세포는 조심스럽게 5회 세척되었다. 형광 활성 (여기, 494 nm; 방출, 517 nm)은 형광 분광광도계를 이용하여 측정되었다.
- [0146] ECM 단백질에 MDA-231 부착. MDA-231 shSCRM과 shAXL (0.5x10⁶) 세포는 라미닌, 콜라겐 I과 IV, 피브로넥틴, 그리고 피브리노겐을 비롯한 ECM 단백질의 어레이를 내포하는 웰 상에 삼중으로 도말되었다. 세포는 37°C에서 1

시간 동안 배양되고 PBS에서 세척되었다. 부착 세포는 제조업체의 프로토콜 (CellBiolabs)에 따라, 염색되고 OD 560에서 정량되었다.

[0147] 이동 분석평가. 세포 이동은 앞서 기술된 바와 같이 시험관내에서 조사되었다. 간단히 말하면, 세포는 24시간 동안 혈청-기아 배양되고 코팅되지 않은 삽입물 (BD Biosciences) 상에 삼중으로 접종되고 (2.5×10^4 개 세포), 화학주성인자로서 FBS를 내포하는 챔버로 이전되고, 그리고 24시간 동안 배양되었다. 비-침입 세포를 제거한 이후, 이들 막의 아래쪽에서 세포는 고정되고, 염색되고, 계산되었다. 각 막에 대하여 5개 필드가 계산되었다. 이동%는 아래와 같이 결정되었다: (shAXL 세포에서 이동하는 세포의 평균 # / shSCRM 세포에서 이동하는 세포의 평균 #) $\times 100$. 실험은 삼중으로 수행되고 3회 반복되었다.

[0148] 콜라겐 침입 분석평가. 콜라겐 침입 분석평가는 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다. 간단히 말하면, 533개 세포는 48 웰 평판 상에서 콜라겐 타입 I 내로 도말되었다. 세포는 표준 배지, 또는 조건 대조 배지 또는 sAXL-조건 배지가 첨가된 배지에서 5-7일 동안 배양되고 사진이 촬영되었다. 콜라겐을 통한 침입은 20X 필드당 분기 표현형을 나타내는 종양 세포의 백분율을 계산함으로써 정량되었다. 샘플당 3개 필드가 계산되었다. 실험은 삼중으로 수행되고 2회 반복되었다.

[0149] 젤라틴 기질 자이모그래피. SKOV3ip.1 shSCRM과 shAXL 세포는 48시간 동안 혈청 기아 배양되었다. 25,000개 세포는 96 웰 평판 내로 도말되고, 그리고 조건 배지는 24시간후 수집되었다. 각 부피의 조건 배지는 비-환원 조건 하에 10% 자이모그램 겔 (Invitrogen) 상에서 이동되었다. 전기영동후, 겔은 SDS를 제거하기 위해 2.5% (v/v) Triton X-100에서 세척되고, 50 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl_2 , 그리고 0.1% Triton X-100 (pH 7.8)에서 세척되고, 그리고 37°C에서 하룻밤동안 배양되었다. 자이모그램은 40% 메탄올과 10% 빙초산에 용해된 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250으로 30분 동안 염색되었다. 겔은 40% 메탄올과 10% 빙초산에서 변색되었다. 실험은 삼중으로 수행되고 3회 반복되었다.

[0150] 세포 증식 분석평가. 단층 성장 곡선의 경우에, 세포 (50,000)는 60mm 접시 내로 삼중으로 도말되었다. 3일마다, 이들 세포는 트립신화되고, 세포 계수기 (coulter counter)를 이용하여 계산되고, 그리고 50,000개 세포가 재도말되고 계산되었다.

[0151] XTT 생존 분석평가. 세포 생존능은 앞서 기술된 바와 같이 XTT 분석평가에 의해 측정되었다. 간단히 말하면, 혈청 공급 또는 혈청 기아 세포 (0, 3, 6, 그리고 7일)는 0.3 mg/ml XTT 및 2.65 $\mu\text{g}/\text{ml}$ N-메틸 디벤조피라진 메틸 설페이트를 포함하는 페놀 레드-없는 배지에서 배양되었다. 96-웰 평판은 1 내지 2시간 동안 37°C 배양기로 환원되었다. XTT의 대사는 450 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량되었다.

[0152] 단백질 단리와 웨스턴 블롯 분석. 단백질 용해물은 9M 요소, 0.075M Tris 완충액 (pH 7.6)에서 수확되었다. 단백질 용해물은 Bradford 분석평가를 이용하여 정량되고, 그리고 표준 방법을 이용한 환원 SDS-PAGE에 종속되었다. 웨스턴 블롯은 AXL (RandD Systems), 알파 튜불린 (Fitzgerald Antibodies), AKT (Cell Signalling), 포스포-AKT (Cell Signaling)에 대한 항체로 탐침되었다.

[0153] GAS6 자극을 위해, 세포는 24시간 동안 혈청 기아 배양되었다. 세포는 이후, 25 μm 의 PI3K 저해물질 (Ly294002, Bio Mol Research Laboratory), 또는 AXL Ecto 도메인을 내포하는 100 l의 조건 배지로 4시간 동안 처리되고, 그 이후 400ng/ml의 GAS6으로 15분 동안 처리되었다.

[0154] 생쥐의 혈청에서 sAXL 발현의 분석을 위해, 각 샘플로부터 1.5 l의 혈청이 겔 전기영동에 의해 분석되었다.

[0155] 아데노바이러스의 산출과 생산. 아미노산 1-451에 상응하는 AXL 엑토도메인은 앞서 기술된 바와 같이, 상동성 재조합, 그 이후에 293 세포에서 아데노바이러스 생산과 CsCl 구배 정제 (gradient purification)에 의해 AXL cDNA (Open Biosystems)로부터 증폭되고 E1 $\text{E}3^-$ Ad 균주 5의 E1 영역 내로 클로닝되었다. sAXL 아데노바이러스의 생산과 정제는 앞서 기술된 바와 같이 수행되었다. 유리 IgG2-Fc 면역글로불린 단편을 발현하는 음성 대조 바이러스의 산출과 생산은 앞서 기술되었다.

[0156] 복막 이종이식편으로서 SKOV3ip.1과 OVCAR-8 세포의 성장. 동물 및 이들의 관리와 관련된 모든 절차는 실험 가이드라인과 NIH 가이드라인에 따라서, Stanford University의 실험 동물 운영 위원회 (Institutional Animal Care and Usage Committee)에 의해 승인되었다.

[0157] 대조 및 AXL SKOV3ip.1과 OVCAR-8 세포는 0.5 ml의 PBS에서 각각, 1×10^6 개와 5×10^6 개 세포로 암컷 누드 생쥐 내로 i.p. 주입되었다. 회생후, 복수는 정량되고, 전이성 병소가 계산되고, 그리고 모든 가시적 병소가 종양 중

량을 칭량하기 위해 절개되고 이전되었다.

- [0158] SKOV3ip.1과 OVCAR-8 부모 세포는 0.5 ml의 PBS에서 각각 1×10^6 개와 5×10^6 개 세포로 암컷 누드 생쥐 내로 i.p. 주입되었다. 종양 세포 주입후 7일 (SKOV3ip.1) 또는 14일 (OVCAR-8) 시점에, 생쥐는 0.1 ml PBS에서 sAXL 또는 대조 1.9×10^8 개 아데노바이러스 pfu가 꼬리 정맥 내로 주입되었다. 희생후, 복수는 정량되고, 전이성 병소가 계산되고, 그리고 모든 가시적 병소가 총 종양 중량을 칭량하기 위해 절개되고 이전되었다.
- [0159] 조직 독성 연구. SKOV3ip.1 부모 세포는 0.5 ml의 PBS에서 각각 1×10^6 개와 5×10^6 개 세포로 암컷 누드 생쥐 내로 i.p. 주입되었다. 종양 세포 주입후 7일 시점에, 생쥐는 0.1 ml PBS에서 sAXL 또는 대조 1.9×10^8 개 아데노바이러스 pfu가 꼬리 정맥 내로 주입되었다. 28일자에, 생쥐는 희생되었다. 혈액은 수집되고, 그리고 포괄적 대사 검사 (comprehensive metabolic panel)와 CBC 분석이 Stanford University에서 Department of Comparative Medicine에 의해 수행되었다. 조직 샘플은 간, 신장, 뇌, 그리고 비장을 비롯한 모든 주요 기관으로부터 수집되고, 10% 포르말린에서 고정되고, 파라핀에서 포매되고, 분할되고, 그리고 헤마톡실린 (hematoxylin)과 에오신 (eosin)으로 대조염색되었다.
- [0160] 생체내에서 꼬리-정맥 전이 분석평가. 대조와 AXL shRNA MDA-231 세포는 0.1 ml의 PBS에서 5×10^5 개 세포로 누드 생쥐의 꼬리 정맥 내로 정맥내 주입되었다. 주입후 4주 시점에, 생쥐는 희생되었다. 폐 병소의 현미경적 평가는 헤마톡실린과 에오신으로 염색된 포르말린-고정되고 파라핀-포매된 폐의 대표적인 횡단면 (cross-section) 상에서 수행되었다. 거대 핵을 갖고 AXL 발현에 양성인 최소한 4개의 인간 세포를 내포하는 폐 병소의 정확한 확인은 보드-인증 병리학자 (board-certified pathologist)에 의해 확증된다. 생쥐의 폐에서 종양 부담은 전체 폐로부터 단리된 RNA에서 인간 GAPDH와 AXL 발현의 실시간 PCR 분석에 의해 정량되었다.
- [0161] 정위 종양으로서 MDA-231 세포의 성장. MDA-231 세포는 0.1 ml의 PBS에서 10^7 개 세포의 유방 지방 패드 (mammary fat pad) 내로 피내 주입후, 6주령 암컷 누드 (nu/nu) 생쥐에서 피하 정위 종양으로서 성장되었다. 종양은 38-일 시간 과정 동안 캘리퍼스로 측정되었다. 체적은 하기 공식을 이용하여 계산되었다: $\text{너비}^2 \times \text{길이} \times 0.5$.
- [0162] 피하 종양으로서 SKOV3ip.1 세포의 성장. 0.1 ml의 PBS에서 5백만 개 세포가 누드 (nu/nu) 6주령 암컷 생쥐의 옆구리 내로 피하 이식되었다. 종양은 45-일 시간 과정 동안 캘리퍼스로 측정되었다. 체적은 하기 공식을 이용하여 계산되었다: $\text{너비}^2 \times \text{길이} \times 0.5$.
- [0163] RNA와 실시간 PCR 분석. RNA는 제조업체의 프로토콜 (Invitrogen)에 따라 트리졸을 이용하여 세포와 조직으로부터 단리되었다. cDNA는 역전사-PCR (Invitrogen)을 위한 Superscript 일차-가닥 합성 시스템을 이용하여 2 μg 의 DNase (Invitrogen)-처리된 RNA로부터 합성되었다. 1 μl 의 cDNA는 SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems)를 이용한 PCR 증폭에 종속되었다. 하기 프라이머 세트는 특정 표적 유전자를 증폭하는데 이용되었다: 18S FWD: 5-GCCCGAAGCGTTTACTTTGA-3 REV: 5-TCCATTATTCCTAGCTGCGGTATC-3; AXL FWD: 5-GTGGGCAACCCAGGGAATATC-3 REV: 5-GTACTGTCCCGTTCGGAAG; GAPDH 5-ATGGGGAAGGTGAAGGTTCG-3 REV: 5-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3; MMP-2 FWD: 5-GCCCCAGACAGGTGATCTTG-3 REV 5-GCTTGCGAGGGAAGAAGTTGT-3. PCR 증폭은 Prism 7900 서열 검출 시스템 (Applied Biosystems) 상에서 수행되었다. 이용된 고온 반응 프로파일 (thermal-cycling profile)은 50°C에서 2분 및 95°C에서 10분 동안 변성, 그 이후에 95°C에서 15초 및 60°C에서 1분 동안 변성의 사이클이었다. 18S는 mRNA를 정상화시키는데 이용되었다. 상대적인 mRNA 발현 수준은 제조업체 (Applied Biosystems)의 지시에 따라, 상대적인 표준 곡선 방법을 이용하여 측정되었다.
- [0164] 통계학적 분석. AXL 발현 및 종양 형성과 전이 사이에 연관성에 대한 검사는 피셔의 정확 검정 (Fisher's exact test)을 이용하여 수행되었다. 모든 다른 통계학적 검사는 스튜던트 t-검정 (Student's t test)을 이용하여 수행되었다. < 0.05 의 p 값을 갖는 값은 통계학적으로 유의한 것으로 간주되었다.
- [0165] 약어: GAS6, 성장 정지 특이적 유전자 6; MMP-2, 기질금속단백질가수분해효소; EOC, 상피 난소 암; ECM, 세포외 기질; AKT, v-akt 무린 홍선종 바이러스 종양유전자 동족체.

[0166]

종양 파라미터에 대한 AXL 염색의 통계학적 분석

스코어	0	1	2	3	총합
유방					
침윤성 유관 암종					
등급 1	3 (75)	0 (0)	0 (0)	1 (25)	4
등급 2	3 (23)	0 (0)	5 (38)	5 (38)	13
등급 3	0 (0)	0 (0)	7 (39)	11 (61)	18
총합	6	0	12	17	35
피어슨 X2 P 값 =					
전이성 침윤성 유관 암종					
림프절	0 (0)	1 (11)	4 (44)	4 (44)	9
난소					
장액 선암종					
시기 II	3 (33)	0 (0)	3 (33)	3 (33)	9
시기 III/IV	6 (9)	5 (8)	14 (22)	39 (61)	64
총합	9	5	17	42	73
피어슨 X2 P 값 =					
전이성 장액 선암종					
장막	3 (9)	5 (16)	6 (19)	18 (56)	32
복막	1 (3)	2 (7)	12 (40)	15 (50)	30
총합	4	7	18	33	62

[0167]

값은 n (%)으로 표시된다. 종양 세포의 경우에, 막 염색은 0, 부재; 1, 채점 불가능; 2, 5 내지 60% 양성; 3, 61 내지 100% 양성으로 채점되었다.

[0168]

실시예 2

[0169]

본 실시예에서는 처리되지 않은 대조와 비교하여, 종양 숫자와 크기에 의한 측정에서, 아데노바이러스 발현 시스템을 이용한 생쥐에서 야생형 가용성 AXL의 과다발현을 통한 세포 AXL에 GAS6 리간드 결합의 저해가 감소된 종양 부담을 유발한다는 것을 증명하고, 전-임상적 생쥐 모형에서 전이의 진행을 저해하기 위한 결정적인 표적 및 효과적인 전략으로서 GAS6과 AXL의 중요성을 더욱 강조하였다.

[0170]

AXL 세포외 도메인의 조작된 가용성 변이체가 본 명세서에서 제시되는데, 이들은 리간드 GAS6에 대한 높은 친화성을 갖고, 따라서 상기 리간드는 격리되고 내인성 AXL 신호전달이 감소될 수 있다. 조작된 변이체는 야생형 AXL과 비교하여 Gas6에 대한 실질적으로 향상된 친화성을 갖는다.

[0171]

AXL의 세포외 도메인은 2개의 IgG-유사 도메인 및 2개의 피브로넥틴-유사 도메인을 포함한다. 주요 GAS6 결합 부위는 Ig1 도메인 내에 있고, 그리고 작은 GAS6 결합 부위는 Ig2 도메인 내에 있다.

[0172]

주요 결합 부위의 친화성을 더욱 증강시키기 위하여, AXL SwissProt 등록 P30530에 상응하는 19 - 132의 중단점 (break point)을 갖도록 Ig1 도메인이 조작되었다. 돌연변이 라이브러리는 표준 분자 생물학 기술을 이용하여 AXL 수용체의 Ig1 도메인 상에서 오류-유발 (error-prone) PCR을 수행함으로써 산출되었다. 이러한 라이브러리는 가용성 GAS6에 대한 증강된 결합 친화성을 나타내는 돌연변이체를 분리하기 위하여, 효모 표면 전이를 이용하여 발현되고 형광-활성 세포 선별 (fluorescence-activated cell sorting, FACS)에 의해 스크리닝되었다. 이러한 라이브러리 스크리닝 접근법에서, 돌연변이 단백질 라이브러리는 복수 라운드의 선별에 종속되었고, 여기서 각 연속 라운드는 라이브러리의 크기를 감소시키고, 이와 동시에 원하는 돌연변이 단백질 성질, 본 발명의 경우에 GAS6에 대한 높은 친화성 결합을 강화시켰다.

[0173]

GAS6에 대한 유의미하게 강한 친화성을 갖는 AXL 돌연변이체를 획득하기 위하여, 후기 선별 라운드에서 "오프-레이트 (off-rat)" 선별이 이용되었다. 오프-레이트 선별의 경우에, 단백질 돌연변이체의 라이브러리는 먼저, 가용성 GAS6와 함께 항온처리되고, 이후 결합되지 않은 GAS6을 용액으로부터 제거하기 위해 완충액으로 세척된다. 그 다음, 돌연변이 라이브러리는 실온에서 2, 4, 6, 12, 또는 24시간 동안 과잉의 가용성 경쟁자의 존재에서 항온처리된다. 과잉의 경쟁자는 효모-전사된 AXL로부터 해리하는 GAS6을 격리시켜, 풀림 단계가 비가역성이 되도록 하는 기능을 한다. GAS6에 결합을 보전하는 돌연변이 AXL 단백질은 FACS를 이용하여 수집된다. 0, 4와 6

시간의 오프-레이트 단계 이후에 혼주된 선별 5 산물에 의한 GAS6에 결합의 분석은 이들 산물이 GAS6에 지속적인 결합의 측면에서 야생형 AXL에 비하여 유의미한 향상을 나타낸다는 것을 증명한다 (도 12 참조). 막대 그래프는 도트 플롯로부터 데이터를 정량하고, 이들 라이브러리 구성원의 유의미한 향상을 증명한다. 이들 산물의 염기서열분석은 혼주된 선별 5 산물에 대해 관찰된 Gas6을 향한 증강된 친화성을 공여하는 Ax1 Ig1 도메인 내에 여러 돌연변이를 확인하였다 (도 12와 표 2). 6번째 라운드의 선별은 선별 5 산물로부터 3개의 특정 클론으로 더욱 강화된다. 표 2에서는 5 라운드와 6 라운드 선별 산물에 내포되는 AXL 서열 내에 독특한 아미노산 돌연변이를 도시한다. 상기 표에서, 위쪽 열에서 잔기 번호는 야생형 AXL 내에서 아미노산 잔기를 지시한다. 두 번째 열은 야생형 AXL 내에 소정의 위치에서 발견되는 잔기를 지시한다. 후속 열에서, 소정의 돌연변이체 내에 존재하는 아미노산 돌연변이가 명기된다. 돌연변이체 내에서 특정 잔기에 대한 아미노산의 부재 (가령, 표 2에서 비어있는 공간 또는 비어있는 셀)은 이러한 아미노산 잔기가 야생형 잔기로부터 돌연변이되지 않는다는 것을 나타낸다. 아미노산 잔기에 대한 표준 단일 문자 지정은 당업자에 의해 널리 이해되는 바와 같이 이용된다.

[0174] 선별 5와 6 산물로부터 독특한 서열, 그리고 야생형 AXL과 비교하여 혼주된 클론의 결합 특성이 도시되고, 이것은 혼주된 선별 5 산물에 대한 GAS6 결합에서 실질적인 향상을 증명한다.

[0175] 이러한 방향적 진화 접근법을 이용하여 단리된 돌연변이체는 표 3에 도시된 아미노산 치환을 포함한다.

표 3

[0176] 방향적 진화 (directed evolution)를 이용하여 단리된 돌연변이체

	26	32	33	74	79	87	92	127
Wt-AXL	<i>E</i>	<i>G</i>	<i>N</i>	<i>S</i>	<i>V</i>	<i>D</i>	<i>V</i>	<i>G</i>
Ax1 S6-1		S				G	A	R
Ax1 S6-2	G				M		A	E
Ax1 S6-5			S	N		G	A	

[0177] Sasaki et al. (EMBO J 2006)에 의해 보고된 GAS6-AXL 복합체의 결정 구조에 따라, E26G, G32S, N33S 및 G127R/E를 제외하고 앞서 제시된 모든 돌연변이는 AXL과 GAS6 사이의 결합 계면에 위치한다.

[0178] 6번째 라운드의 선별로부터 개별 돌연변이체, AXL S6-1과 AXL S6-2가 추가 조사를 위해 선택되었다. 야생형 AXL, AXL S6-1, 그리고 AXL S6-2의 평형 결합 적정은 야생형 또는 돌연변이 AXL 단백질의 GAS6과의 상호작용의 친화성을 비교하기 위하여 수행되었다. 데이터는 4-포인트 S자형 곡선에 맞춤 (fitting)되고, 그리고 중점 (midpoint)은 평형 결합 상수, K_D 로서 채택되었다. 돌연변이체 AXL S6-1과 AXL S6-2는 야생형 AXL과 비교하여 GAS6 결합 친화성에서 실질적인 향상을 보인다 (도 13과 표 4). 야생형 AXL은 Gas6을 향한 $2.4 \pm 1.2 \times 10^{-9}$ M의 결합 친화성 (K_D)을 갖는다; AXL S6-2는 Gas6을 향한 $1.89 \pm 0.37 \times 10^{-10}$ M의 결합 친화성 (K_D)을 갖는다; 그리고 AXL S6-1은 Gas6을 향한 $1.12 \pm 0.23 \times 10^{-10}$ M의 결합 친화성 (K_D)을 갖는다. AXL S6-1과 AXL S6-2의 경우에, GAS6 결합 친화성이 야생형 AXL과 비교하여, 각각 22-배와 12.8-배 강하다 (표 4).

표 4

[0179] Gas6에 대한 야생형과 돌연변이 AXL 단백질의 결합 친화성 (K_D).

평형 Gas6 결합			
	K_D (M)	+/- (M)	wt에 비하여 배수
wt AXL	2.4×10^{-9}	1.2×10^{-9}	...
S6-1	1.12×10^{-10}	0.23×10^{-10}	22
S6-2	1.89×10^{-10}	0.37×10^{-10}	12.8

[0180] 또한, 가변 온도 원편광 이색성 스캔 (circular dichroism scan)을 이용하여 야생형과 돌연변이 AXL 단백질의 열 안정성을 조사하였다. 이러한 기술은 온도의 함수로서 접힘된 단백질의 이차 구조 요소 (secondary structural element)의 풀림을 모니터링한다. 각 단백질의 타원율 (ellipticity)은 온도의 함수로서 모니터링되

고, 그리고 데이터는 표준 양상 폴립 (two-state unfolding) 곡선에 맞추어졌다. 용융 온도 (melting temperature, T_m)는 폴립 곡선의 중점이다. 야생형 AXL은 41.3 ± 0.6 °C의 용융 온도를 보였다; AXL S6-1은 54.0 ± 0.9 °C (야생형 AXL보다 대략 13°C 높은 열 안정성)의 용융 온도를 보였다; AXL S6-2는 41.55 ± 0.02 °C의 용융 온도 (야생형 AXL과 거의 유사한 열 안정성)를 보였다 (표 5).

표 5

[0181]

가변 온도 원편광 이색성 스캔에 의한 측정에서 야생형과 돌연변이 AXL 단백질의 열 안정성

	평균 T_m (°C)	+/- (°C)	wt에 비하여 증가 (°C)
wt AXL	41.27	0.63	
S6-1	54.01	0.86	12.73
S6-2	41.55	0.02	0.28

표 2

신별 5와 6으로부터 AXL Ig1 돌연변이체 (염기서열분석된 141개 총 무작위 클론, 25개의 독특한 변이체)

클론	bp	AA	19	23	26	27	32	33	38	44	61	65	72	74	78	79	86	87	88	90	92	97	98	105	109	112	113	116	118	127	129	반복의 #	
wt AXL			A	T	E	E	G	N	T	T	H	D	A	S	Q	V	Q	D	D	I	V	I	T	T	Q	V	F	H	T	G	E		
AXL S6-1	6	4					S											G		A										R		62	
AXL S6-2	5	4			G											M				A										E		21	
AXL S6-5	5	4						S						N				G		A												1	
AXL S5-1	3	3										V									R							R				1	
AXL S5-2	2	1																														16	
AXL S5-4	1	1											V		E																	1	
AXL S5-6	1	1																														7	
AXL S5-9	4	3															R		V	A												10	
AXL S5-13	3	2											V							D												1	
AXL S5-22	2	2									N							G														1	
AXL S5-24	4	2																G		A												2	
AXL S5-29	9	6					K			Y			V						N	A	A		A									1	
AXL S5-30	4	2																		A					R							1	
AXL S5-39	10	5							A			V							V				M								K	1	
AXL S5-40	3	1																														2	
AXL S5-45	5	4																		A						A	L	A				1	
AXL S5-51	3	2																		A	A	P										1	
AXL S5-53	3	2					G											G														1	
AXL S5-59	3	2						I												A												2	
AXL S5-66	2	1																														3	
AXL S5-68	5	2		M														G		A												1	
AXL S5-74	2	2										V														L						1	
AXL S5-76	2	2															R			A												1	
AXL S5-77	4	T			G	G														A												1	
AXL S5-78	2	2																	M	A												1	
																																총 합계:	141

*bp = DNA 미스매치의 숫자, AA = 아미노산 돌연변이의 숫자. 주의: 이들 DNA 돌연변이 중에서 일부는 침묵 돌연변이다.
특정 클론이 나타나는 횟수의 총수는 가장 오른쪽 컬럼에 제시된다.

실시예 3

가용성 AXL 변이체는 생체내에서 전이성 종양 진행을 저해한다

GAS6-AXL 신호전달은 유방 암, 폐 암과 결장 암, 그리고 본 명세서에 제공된 연구를 통해 최근에, 난소 암을 비롯한 많은 공격적 형태의 고형 종양의 진행에 관여한다. AXL 발현 및 질병 시기와 환자 예후 사이에 분명한 상관성이 관찰되긴 했지만, 전이의 치료를 위한 치료 표적으로서 AXL의 검증은 거의 탐구된 바가 없다. 실시예 1에서, AXL은 실제로, 인간 유방과 난소 암 환자에서 전이의 마커이고, 그리고 원발성 종양에서 AXL 발현 수준은 상기 질병의 심각도와 상관하는 것으로 밝혀졌다. 이들 결과는 GAS6-AXL 신호전달 경로의 길항이 전이성 질병을 치료하기 위한 치료 윈도우 (therapeutic window)를 제공할 수 있다는 것을 암시하였다. 실시예 1에서 개설했던 바와 같이, 치료 표적으로서 AXL의 잠재력을 검증하기 위하여, AXL의 야생형 세포외 도메인의 가용성 형태가 인

간 난소 암의 공격적 생쥐 모형에서 아데노바이러스 전달을 이용하여 투여되었다. 종양 전이는 대조와 비교하여, 가용성 AXL 치료를 받은 생쥐에서 유의미하게 감소하는 것으로 밝혀졌다. 이들 데이터는 가용성 AXL을 이용한 종양 세포에서 GAS6-AXL 신호전달의 길항이 상기 질병의 전이성 진행을 저해할 수 있다는 것을 증명하였다. 이들 결과에 기초하여, GAS6에 대한 더욱 높은 친화성을 갖는 조작된 AXL 돌연변이체는 항-전이성 작용제로서 더욱 큰 효능을 유도하고, 그리고 가용성 AXL을 전달하는 치료적으로 더욱 적절한 방식은 더욱 유의미한 결과를 산출하는 것으로 밝혀졌다.

[0186] 본 연구에서, 실험 1에서 개설된 동일한 인간 난소 암 모형이 이용되고, 그리고 정제된 가용성 AXL (sAXL) 변이체가 기존의 전이성 질병을 앓는 생쥐에 복막내 투여되었다. 야생형 AXL 및 조작된 높은 친화성 돌연변이체인 AXL S6-1 둘 모두 조사되고, 그리고 GAS6 결합이 소멸되는 형태의 AXL, E59R/T77R과 비교되었다. 획득된 결과는 AXL S6-1의 증강된 친화성이 더욱 큰 치료 효능을 유발한다는 것을 명확하게 증명하는데, 그 이유는 모든 전이성 병소의 숫자와 총 중량 둘 모두에 의한 평가에서 종양 부담의 감소가 야생형 AXL 및 AXL E59R/T77R의 음성 대조 둘 모두에 비하여 유의미하게 감소하였기 때문이다. 이들 조사 결과는 전이의 저해를 위한 치료 표적으로서 AXL과 GAS6을 더욱 확증하고, 그리고 GAS6-AXL 신호전달 시스템의 강력한 길항약으로서 조작된 높은 친화성 AXL 돌연변이체 S6-1을 뒷받침한다.

[0187] 실시예 1이 sAXL의 아데노바이러스 전달이 치료 효능을 산출한다는 것을 증명하긴 하지만, 이러한 전달 방법은 임상적으로 적절하지 않고, 따라서 정제된 sAXL의 전달이 유사한 결과를 산출하는 것으로 확증되었다. 야생형 AXL, AXL S6-1 및 AXL E59R/T77R은 약물동력학을 향상시키기 위하여 생쥐 IgG2a의 단편 결정화가능 영역 (Fc)에 융합되었다. 이들 3가지 AXL 융합 (AXL-Fc) 변이체 사이에 유일한 차이점은 AXL Ig1 도메인에서 발견되는 돌연변이인데, 이들은 표 6A에 개설된다. AXL-Fc 단백질을 인코딩하는 DNA는 EcoRI과 SalI 제한 부위 (restriction site)를 이용하여 CMV-구동된 pADD2 아데노바이러스 서플 벡터 내로 클로닝되었다. 이들 3가지 AXL 돌연변이체를 인코딩하는 pADD2 플라스미드는 제조업체에 의해 기술된 바와 같이, Life Technologies로부터 Freestyle 발현 키트를 이용하여 HEK 293 세포 내로 독립적으로 형질감염되었다. 단백질은 단백질 A 친화성 크로마토그래피, 그 이후에 크기 배제 크로마토그래피 (size exclusion chromatography)를 이용하여 배양 상층액으로부터 정제되었다.

표 6

단백질 명칭	설명
야생형 AXL-Fc	생쥐 IgG2a의 Fc에 융합된 야생형 AXL 세포외 도메인, 아미노산 19-440
AXL S6-1-Fc	야생형 AXL-Fc에 대한 전술한 AXL-Fc 융합, 하지만, AXL Ig1 도메인은 S6-1에 대한 하기 돌연변이를 내포한다: G32S, D87G, V92A, G127R
AXL E59R/T77R-Fc	야생형 AXL-Fc에 대한 전술한 AXL-Fc 융합, 하지만, AXL Ig1 도메인은 E59R과 T77R 돌연변이를 내포하고, 이들은 Gas6을 향한 결합을 유의미하게 감소시킨다

[0189] 생체내에서 전이를 저해하는 AXL-Fc 돌연변이체의 능력을 평가하기 위하여, 실시예 1에서 개설된 바와 같이, 인간 난소 암의 동일한 복막 이종이식편 모형이 이용되었다. 이러한 모형은 인간 난소 암 전이의 복막 파종의 발달 단계를 반복하는데, 그 이유는 생쥐에서 SKOV3ip.1 세포의 투여후 4주 시점에 복수 및 많은 (>100) 소형 전이성 병소로 구성되는 고도 침해성 질병이 급속하게 발생하기 때문이다. 이러한 모형은 대부분의 환자가 진단 시에 유의미한 전이성 질병을 나타내기 때문에, 인간 난소 암의 매우 정확한 표현이다. 생쥐는 SKOV3ip.1 세포가 주입되었고, 그리고 종양은 7일 동안 파종되었다. 7일자에, 이들 생쥐는 3가지 연구 군으로 무작위로 분할되고 야생형 AXL-Fc, S6-1-Fc 또는 E59R/T77R-Fc의 투약 치료가 시작되었다. 인간염 완충된 염수에 용해된 정제된 단백질은 총 6회 투약을 위해, 10 mg/kg의 용량에서 3주 동안 주2회 생쥐에 투여되었다. 28일자에, 모든 생쥐는 희생되었고, 그리고 가시적 전이성 병소의 숫자 및 모든 병소의 총 중량에 의한 측정에서 전체 종양 부담을 평가하기 위하여 검사가 수행되었다. 치료 군 간에 현저한 차이가 존재하였고, 그리고 대표적인 이미지는 도 14에 도시된다. E59R/T77R-Fc의 음성 대조 치료가 제공된 생쥐는 86.3 ± 21.9 복막 전이의 평균을 가졌다. 야생형 AXL-Fc가 제공된 생쥐의 경우에, 숫자는 48.1 ± 6.9 로 감소하는 반면, 조작된 AXL 군, S6-1-Fc에서 생쥐의 경우에, 평균적으로 단지 8.3 ± 1.6 전이성 병소만 관찰되었다 (도 15 (위쪽 패널)). 모든 가시적 병소는 전체적인 전이성 종양 부담을 평가하기 위하여 각 생쥐에 대해 절개되고 집합적으로 칭량되었다. 조작된 AXL 치료 군 (S6-1-Fc)은 이번에도 가장 현저한 반응을 보였는데, 그 이유는 E59R/T77R-Fc, 야생형-Fc 및 S6-1-Fc 치료 군

이 각각, 567 ± 92 , 430 ± 36 및 188 ± 55 mg의 종양 부담을 보였기 때문이다 (도 15, 아래쪽 패널).

[0190] 종합하면, 이들 조사 결과는 AXL을 전이의 치료를 위한 치료 표적으로서 더욱 확증하고, 그리고 중화 AXL의 리간드, GAS6이 효과적인 항-전이성 치료 전략이라는 것을 증명한다. 중요하게는, Gas6에 대한 검출가능한 결합을 보이지 않는 AXL-Fc 융합 (AXL E59R/T77R-Fc)을 포함하는 단백질은 종양 전이를 예방하지 못한다; 온전한 친화성으로 Gas6에 결합하는 AXL-Fc 융합 (야생형 AXL-Fc)을 포함하는 단백질은 종양 전이의 약한 저해를 보인다; Gas6에 대한 매우 강한 친화성을 갖는 AXL-Fc 융합 (AXL S6-1-Fc)을 포함하는 단백질은 종양 전이의 유의미한 저해를 보인다. 종합하면, 이것은 Gas6과 AXL에 대한 상호작용의 에피토프가 종양 전이에서 결정적이고, 그리고 AXL S6-1-Fc 단백질을 통한 Gas6 상에서 이러한 에피토프의 강력한 저해가 종양 전이를 유의미하게 저해한다는 것을 증명한다. 따라서 AXL S6-1-Fc 단백질, 또는 Gas6-Axl 상호작용을 강력하게 차단하는 임의의 단백질은 전이성 질병에 대한 유망한 치료 후보이다. 이에 더하여, 정제된 가용성 AXL 단백질의 직접 투여는 실행가능한 치료 방법으로 증명되고, 이러한 접근법은 임상적으로 확증된다.

[0191] 실시예 3을 위한 방법

[0192] 세포주. 난소 SKOV3ip.1은 37°C에서 5% CO₂ 배양기에서, 10% 소 태아 혈청 및 1% 페니실린과 스트렙토마이신으로 보충된 적절한 배지에서 배양되었다.

[0193] AXL-Fc 융합. 전장 AXL 돌연변이체, 아미노산 19-440은 생쥐 IgG2a Fc 영역에 직접적인 융합으로서, CMV-구동된 pADD2 아데노바이러스 서플렉스 벡터 내로 클로닝되었다. 인간 배아 신장 (HEK) 293 세포의 일시적인 DNA 형질감염은 제조업체에 의해 기술된 바와 같이, Life Technologies로부터 Freestyle 발현 키트를 이용하여 달성되었다. Fc-융합 단백질은 단백질 A 친화성 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피를 이용하여, 5일 후 배양 상층액으로부터 정제되었다. 정제된 단백질은 추가의 첨가제 또는 담체 없이, 인산염 완충된 염수 용액에 넣어졌다.

[0194] SKOV3ip.1 복막 이종이식편. 동물 및 이들의 관리와 관련된 모든 절차는 실험 가이드라인과 NIH 가이드라인에 따라서, Stanford University의 실험 동물 운영 위원회 (Institutional Animal Care and Usage Committee)에 의해 승인되었다. 6주령 암컷 누드 생쥐는 1×10^6 개 SKOV3ip.1 세포가 복막내 주입되었다. 세포의 투여 후 7일 시점에서, 생쥐는 S6-1-Fc, 야생형 AXL-Fc 또는 E59R/T77R-Fc로 치료를 위한 3가지 군으로 무작위로 분할되었다. 정제된 가용성 AXL-Fc 단백질은 10 mg/kg의 용량에서 주2회 복막내 주입에 의해 투여되었다. 투약은 2주 동안 지속되었고, 그 이후 생쥐는 희생되었다. 검사가 수행되었는데, 여기서 전이성 병소가 계산되고, 이후 절개되고 집합적으로 칭량되었다. 종양 부담은 각 생쥐에 대한 모든 병든 조직의 총 병소 수와 전체 중량 둘 모두에 의해 결정되었다.

[0195] 통계학적 분석: 스튜던트 t-검정이 이용되었고, 그리고 보고된 오차는 평균의 표준 오차 (SEM)이다. < 0.01 의 p 값을 갖는 값은 유의한 것으로 간주되었다.

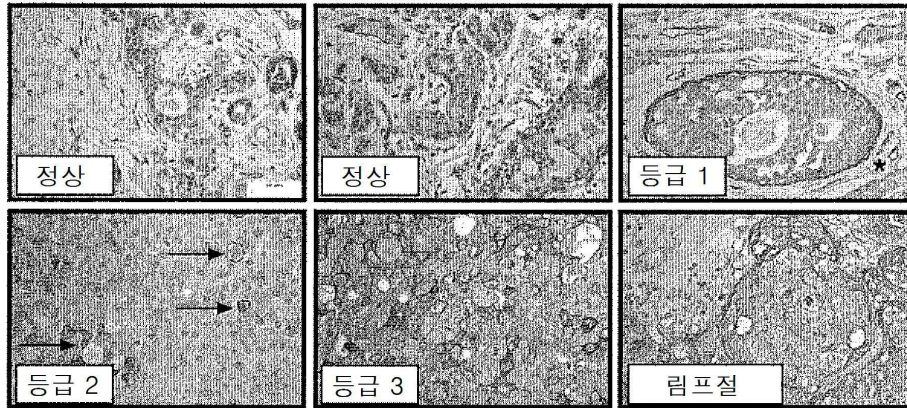
[0196] 비록 전술한 발명이 명확한 이해를 위해 예시와 실례에 의해 상세하게 기술되긴 했지만, 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상 또는 범위를 벗어나지 않으면서 여기에 일정한 개변이 만들어질 수 있음은 본 발명의 교시에 비추어 당업자에게 명백할 것이다.

[0197]

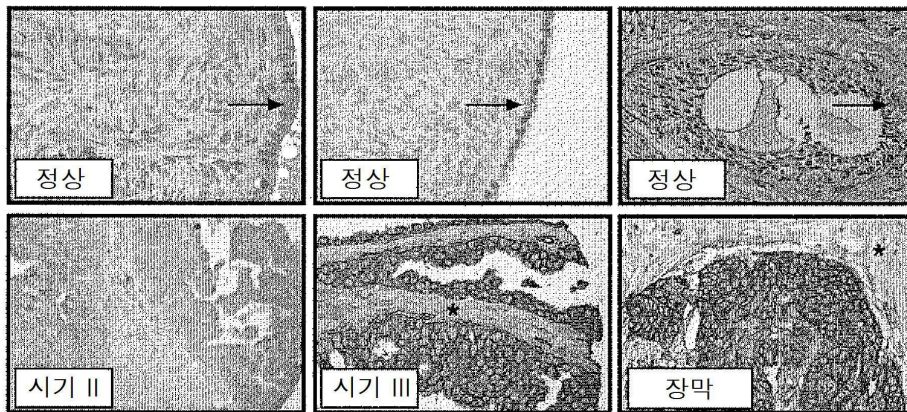
도면

도면1

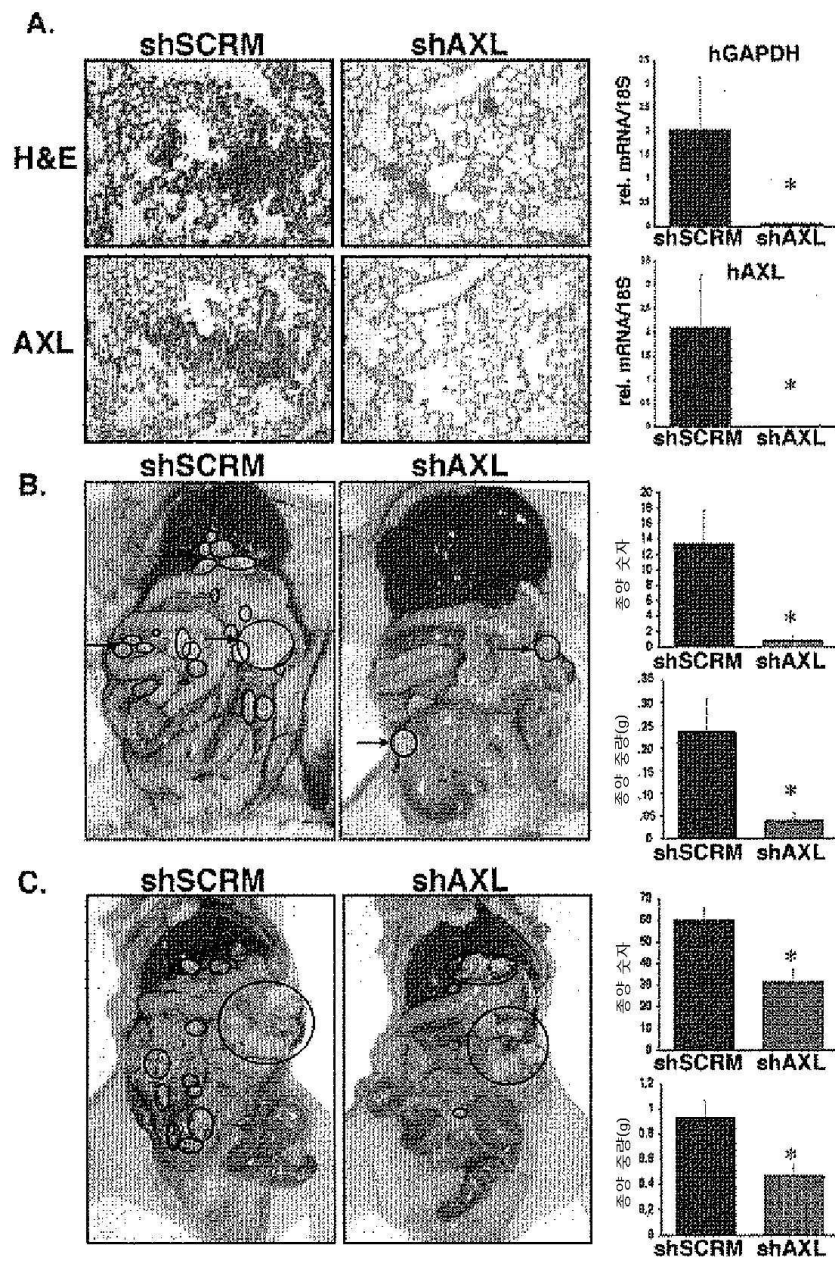
A. 유방



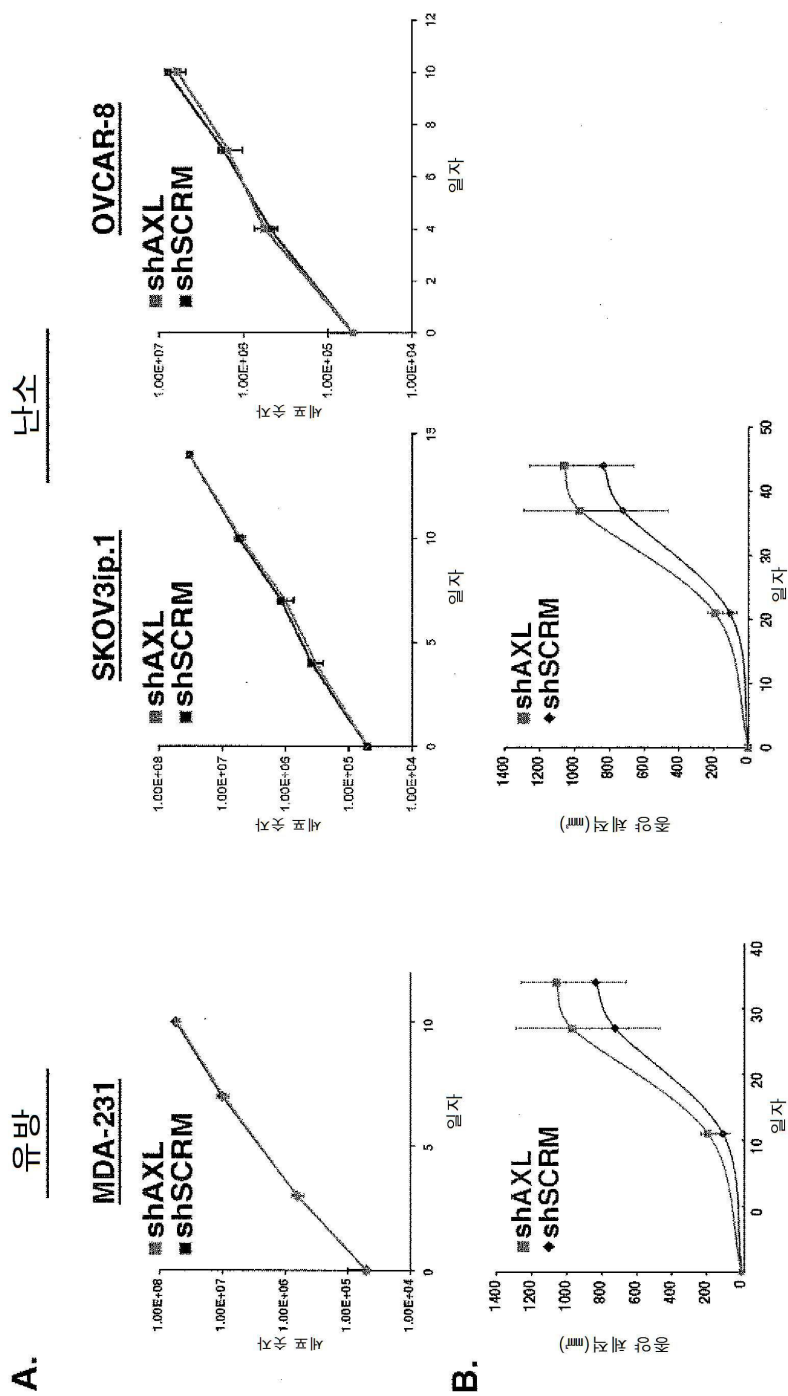
B. 난소



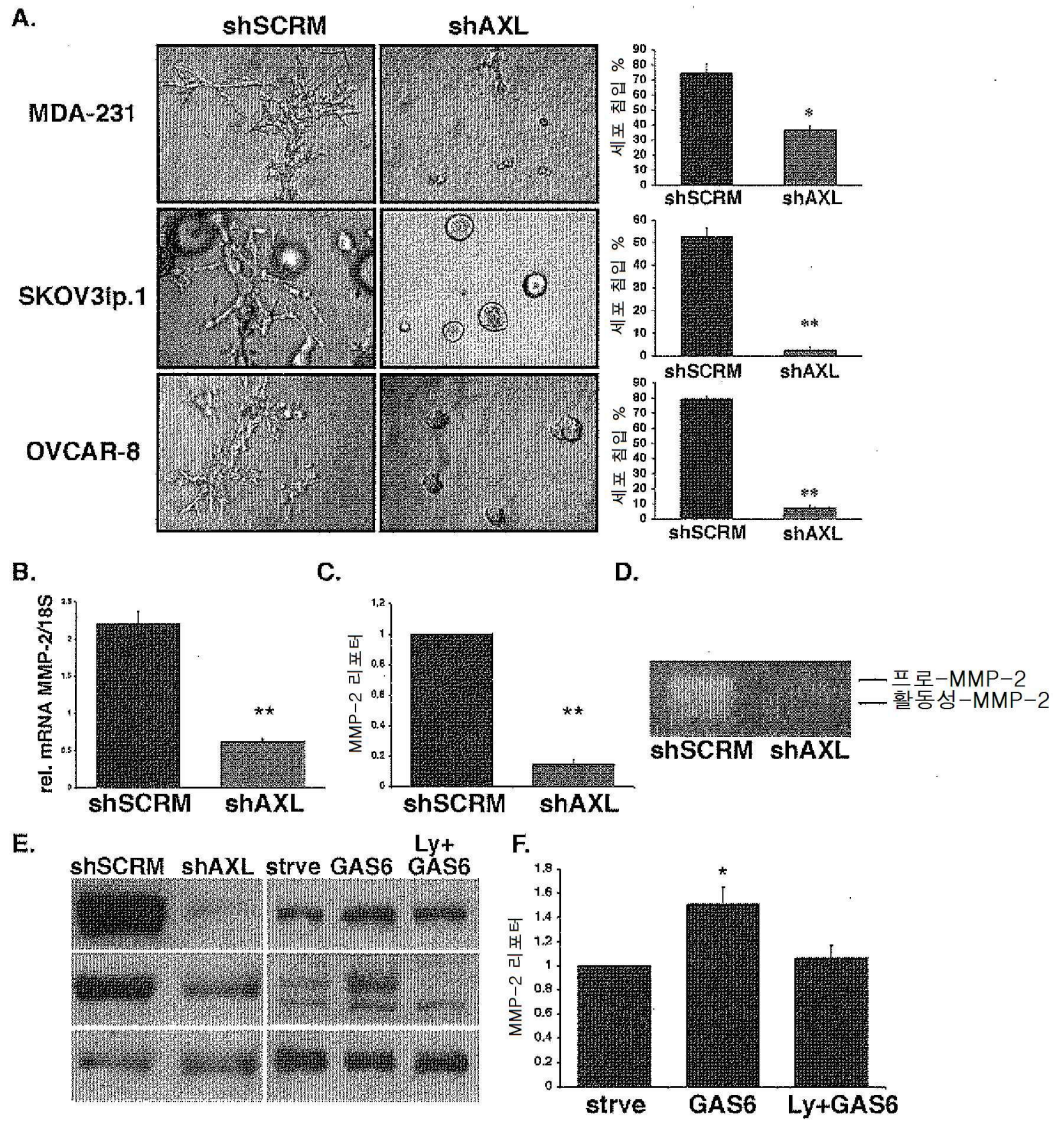
도면2



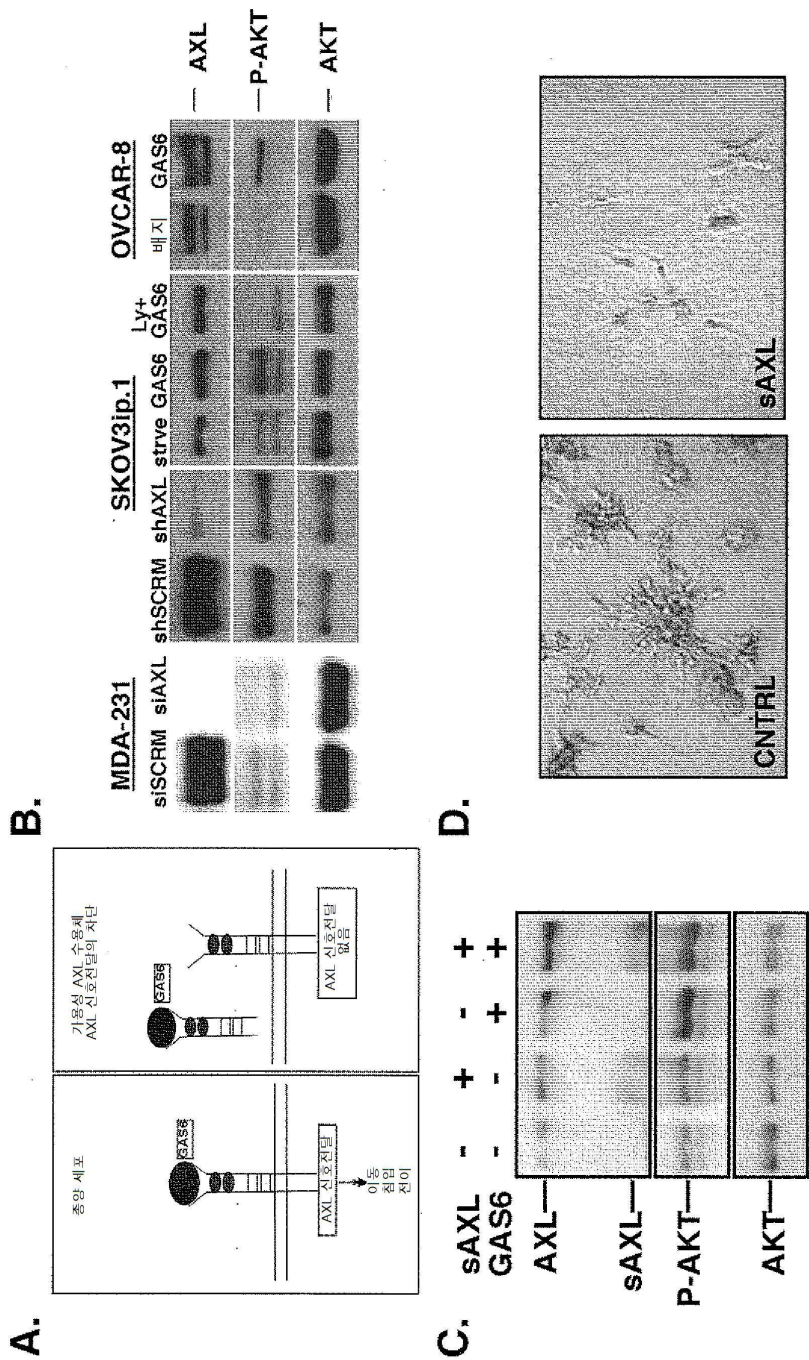
도면3



도면4

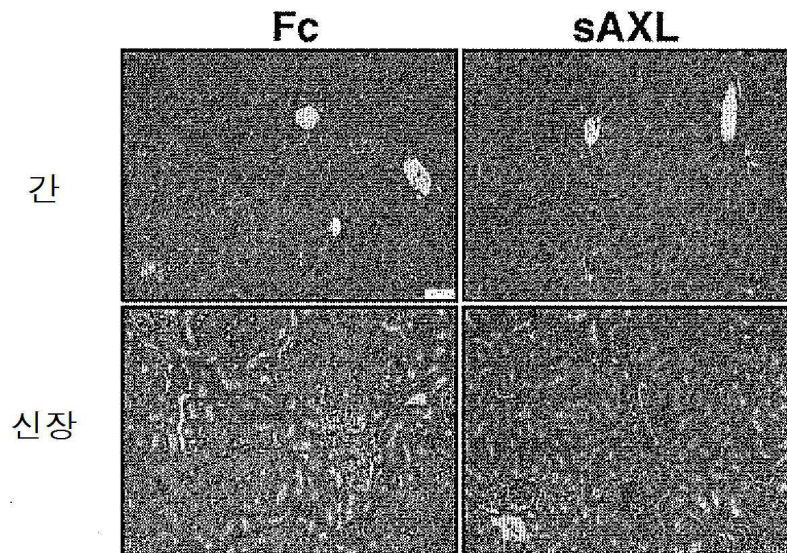


도면5

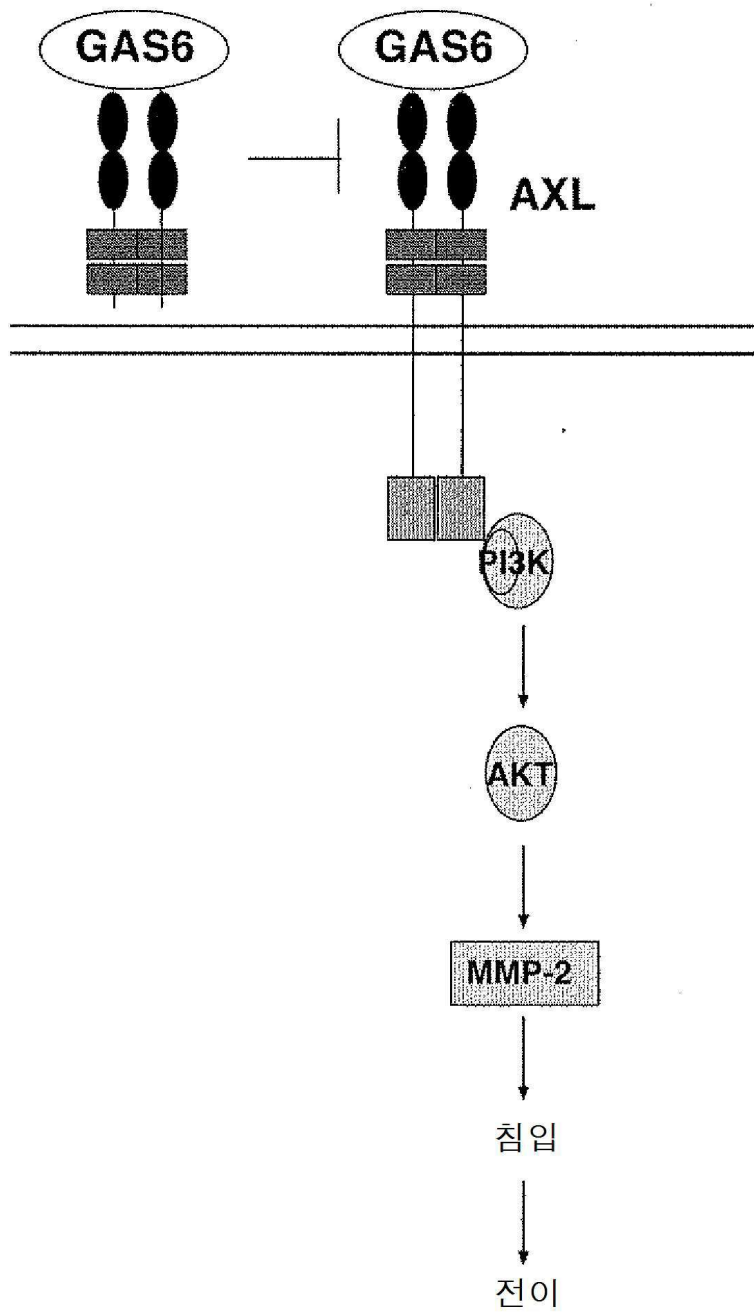


도면7

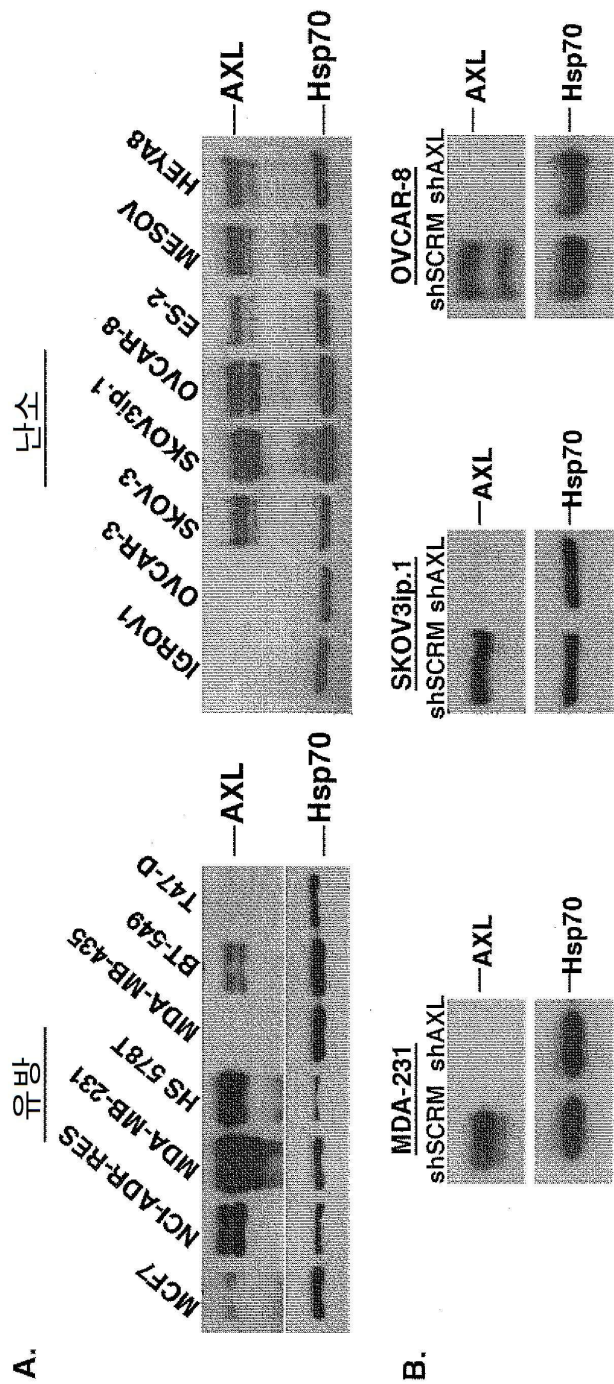
파라미터	Fc	AXL	정상 범위
<u>간</u>			
ALT (U/L)	83 +/- 31	64 +/- 7	76 - 160
AST (U/L)	242 +/- 195	127 +/- 18	192 - 388
<u>신장</u>			
BUN (mg/dL)	23 +/- 8	23 +/- 1	20.3 - 24.7
크레아티닌 (mg/dL)	0.3 +/- 0.1	0.3 +/- 0	0.1 - 1.1
<u>혈액학</u>			
HCT (%)	41 +/- 0.5	41 +/- 0.5	39 - 47
RBC (M/ul)	8 +/- 0.4	8 +/- 0.2	7 - 8.8
HGB (g/dL)	13 +/- 0.2	13 +/- 0.2	13.7 - 16.4
WBC (K/uL)	17 +/- 3	14 +/- 14	5.5 - 9.3



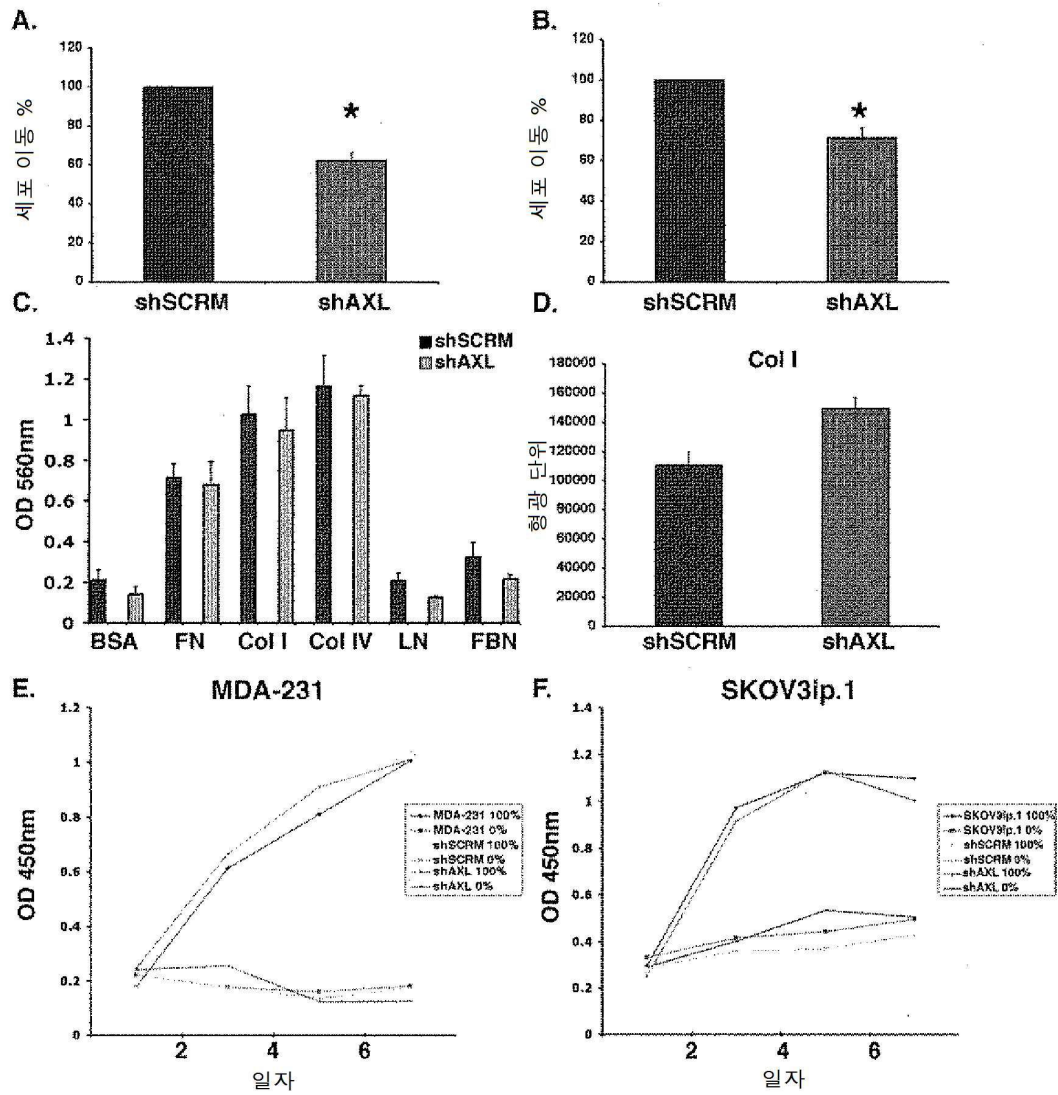
도면8



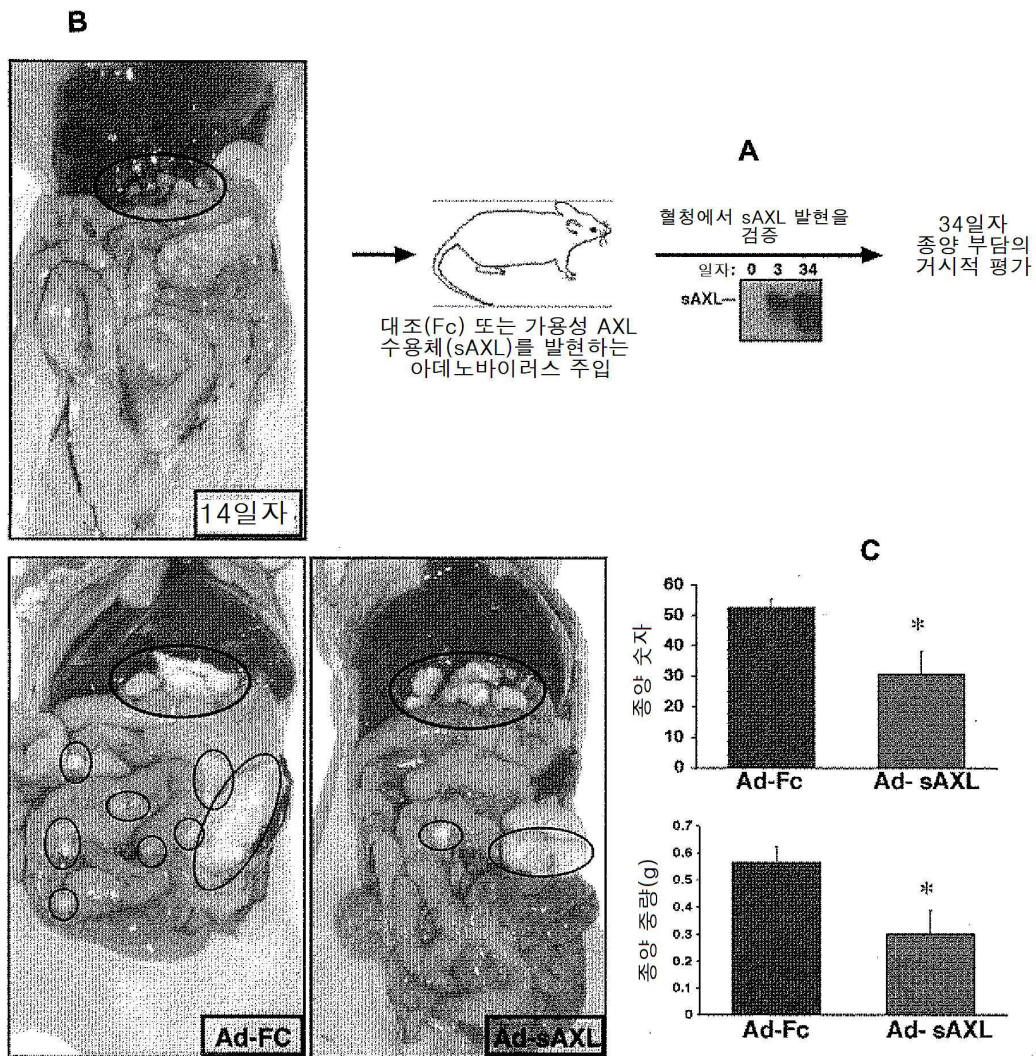
도면9



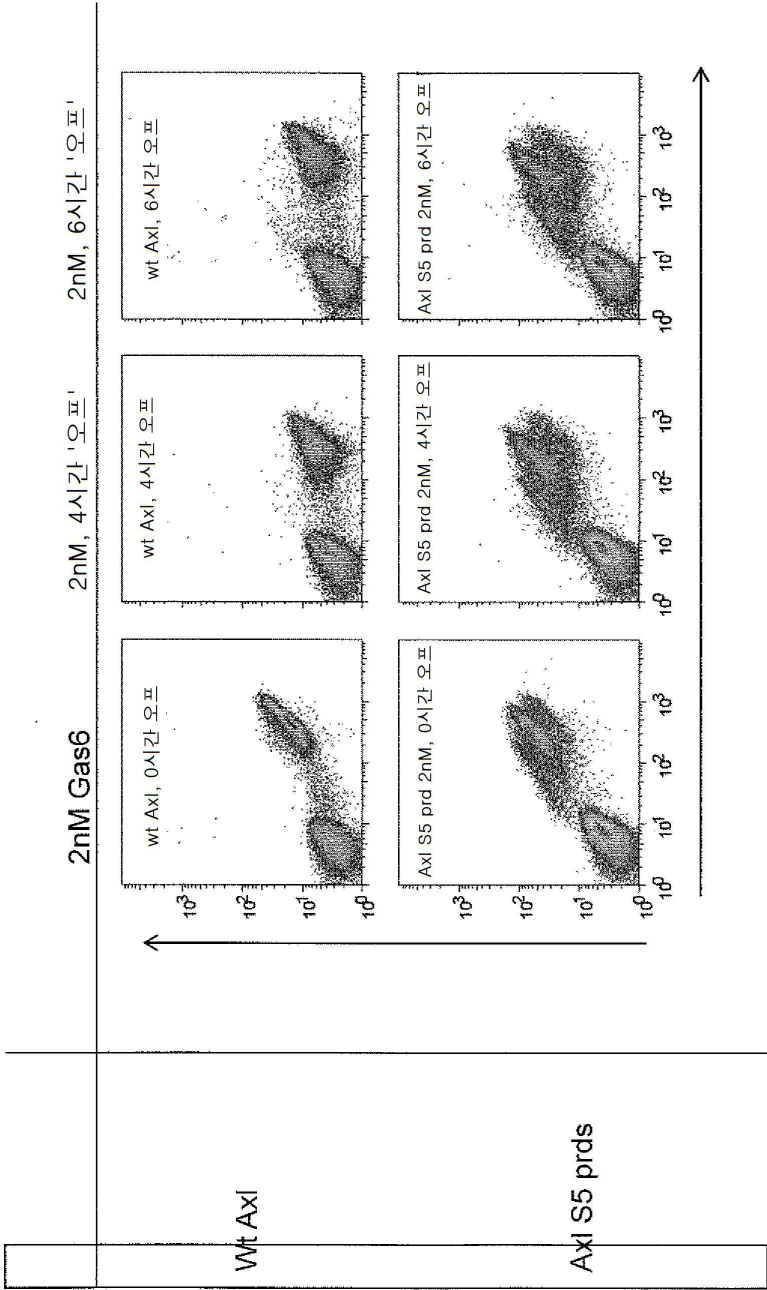
도면10



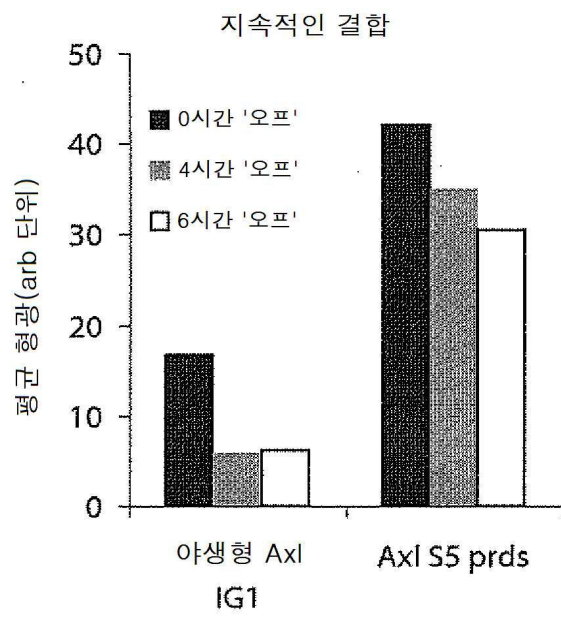
도면11



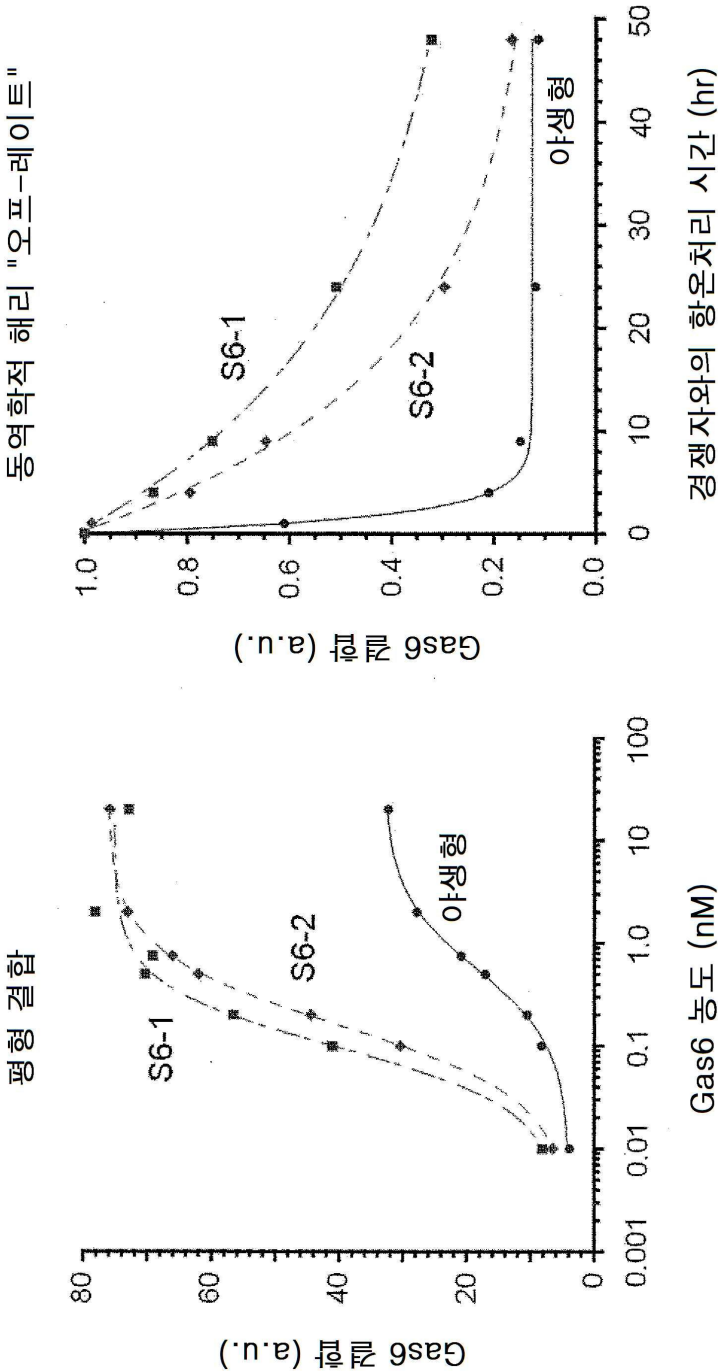
도면12a



도면12b

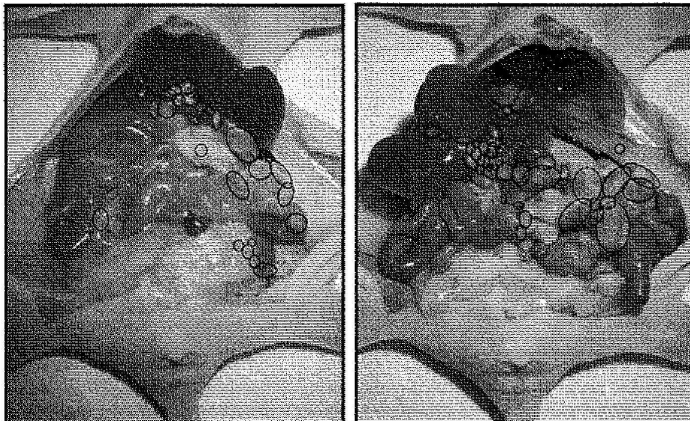


도면13

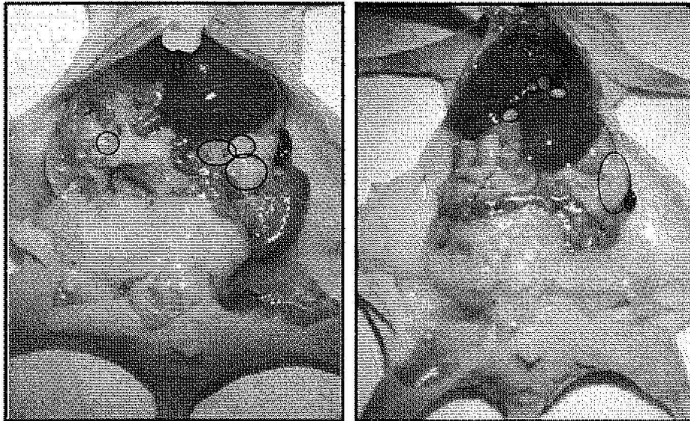


도면14

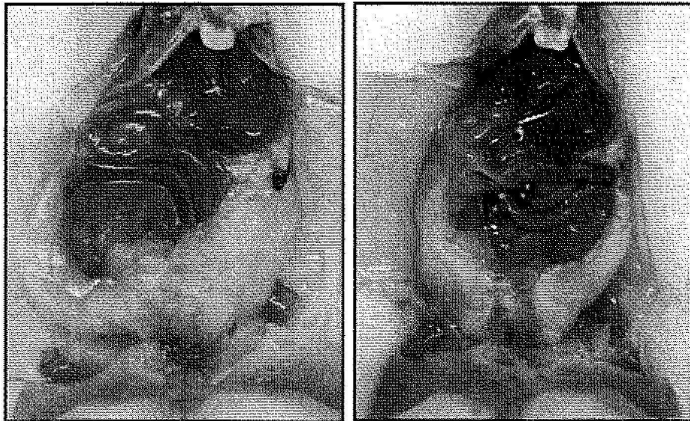
AXL E59R/T77R-Fc



야생형 AXL-Fc

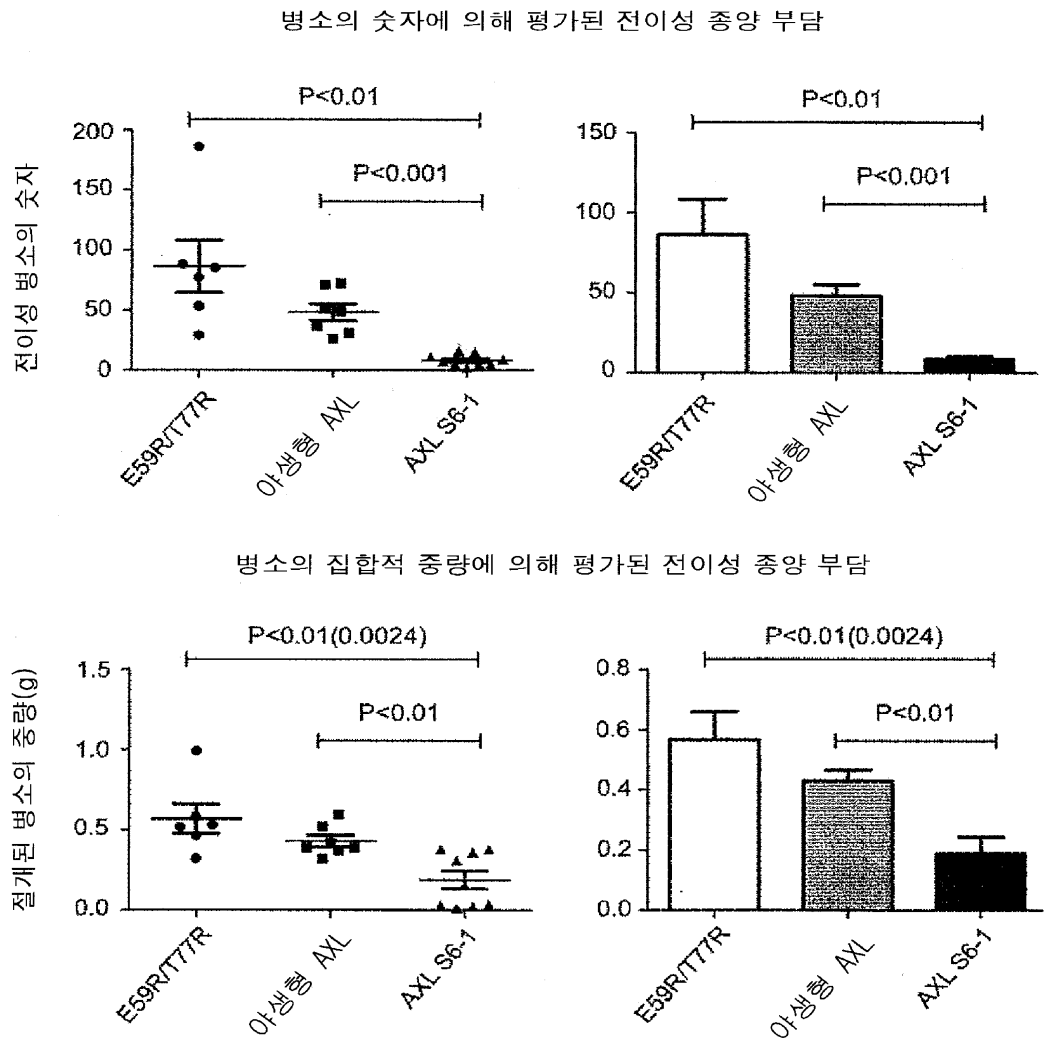


AXL S6-1-Fc



도면15

SKOV3ip.1 난소 종양을 갖는 생쥐에서 sAXL-Fc 단백질로 치료



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Giaccia, Amato J.
 Rankin, Erinn Bruno
 Cochran, Jennifer R.
 Jones, Douglas
 Kariolis, Mihalios
 Fuh, Katherine
- <120> Inhibition of AXL Signaling in
 Anti-Metastatic Therapy
- <130> STAN-626WO
- <140> US2011/022125

<141> 2011-01-21

<150> 61/336,478

<151> 2010-01-22

<160> 17

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 894

<212> PRT

<213> H. sapiens

<400> 1

Met Ala Trp Arg Cys Pro Arg Met Gly Arg Val Pro Leu Ala Trp Cys

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

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

130	135	140	
Pro	Glu	Asp	Arg
Thr	Val	Ala	Ala
Asn	Thr	Pro	Phe
Asn	Leu	Ser	Cys
145	150	155	160
Gln	Ala	Gln	Gly
Pro	Pro	Glu	Pro
Val	Asp	Leu	Leu
Trp	Leu	Gln	Asp
165	170	175	

Ala Val Pro Leu Ala Thr Ala Pro Gly His Gly Pro Gln Arg Ser Leu
180 185 190

His Val Pro Gly Leu Asn Lys Thr Ser Ser Phe Ser Cys Glu Ala His
195 200 205

Asn Ala Lys Gly Val Thr Thr Ser Arg Thr Ala Thr Ile Thr Val Leu
210 215 220

Pro Gln Gln Pro Arg Asn Leu His Leu Val Ser Arg Gln Pro Thr Glu
225 230 235 240

Leu Glu Val Ala Trp Thr Pro Gly Leu Ser Gly Ile Tyr Pro Leu Thr
245 250 255

His Cys Thr Leu Gln Ala Val Leu Ser Asp Asp Gly Met Gly Ile Gln
260 265 270

Ala Gly Glu Pro Asp Pro Pro Glu Glu Pro Leu Thr Ser Gln Ala Ser
275 280 285

Val Pro Pro His Gln Leu Arg Leu Gly Ser Leu His Pro His Thr Pro
290 295 300

Tyr His Ile Arg Val Ala Cys Thr Ser Ser Gln Gly Pro Ser Ser Trp
305 310 315 320

Thr His Trp Leu Pro Val Glu Thr Pro Glu Gly Val Pro Leu Gly Pro
325 330 335

Pro Glu Asn Ile Ser Ala Thr Arg Asn Gly Ser Gln Ala Phe Val His
340 345 350

Trp Gln Glu Pro Arg Ala Pro Leu Gln Gly Thr Leu Leu Gly Tyr Arg
355 360 365

Leu Ala Tyr Gln Gly Gln Asp Thr Pro Glu Val Leu Met Asp Ile Gly
370 375 380

Leu Arg Gln Glu Val Thr Leu Glu Leu Gln Gly Asp Gly Ser Val Ser
385 390 395 400

Asn Leu Thr Val Cys Val Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Gly Asp Gly Pro
405 410 415

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

420 425 430
Pro Val His Gln Leu Val Lys Glu Pro Ser Thr Pro Ala Phe Ser Trp
435 440 445
Pro Trp Trp Tyr Val Leu Leu Gly Ala Val Val Ala Ala Ala Cys Val

450 455 460
Leu Ile Leu Ala Leu Phe Leu Val His Arg Arg Lys Lys Glu Thr Arg
465 470 475 480
Tyr Gly Glu Val Phe Glu Pro Thr Val Glu Arg Gly Glu Leu Val Val
485 490 495
Arg Tyr Arg Val Arg Lys Ser Tyr Ser Arg Arg Thr Thr Glu Ala Thr
500 505 510
Leu Asn Ser Leu Gly Ile Ser Glu Glu Leu Lys Glu Lys Leu Arg Asp

515 520 525
Val Met Val Asp Arg His Lys Val Ala Leu Gly Lys Thr Leu Gly Glu
530 535 540
Gly Glu Phe Gly Ala Val Met Glu Gly Gln Leu Asn Gln Asp Asp Ser
545 550 555 560
Ile Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Ile Ala Ile Cys Thr Arg
565 570 575
Ser Glu Leu Glu Asp Phe Leu Ser Glu Ala Val Cys Met Lys Glu Phe

580 585 590
Asp His Pro Asn Val Met Arg Leu Ile Gly Val Cys Phe Gln Gly Ser
595 600 605
Glu Arg Glu Ser Phe Pro Ala Pro Val Val Ile Leu Pro Phe Met Lys
610 615 620
His Gly Asp Leu His Ser Phe Leu Leu Tyr Ser Arg Leu Gly Asp Gln
625 630 635 640
Pro Val Tyr Leu Pro Thr Gln Met Leu Val Lys Phe Met Ala Asp Ile

645 650 655
Ala Ser Gly Met Glu Tyr Leu Ser Thr Lys Arg Phe Ile His Arg Asp
660 665 670

Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Asn Glu Asn Met Ser Val Cys Val
 675 680 685
 Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Asn Gly Asp Tyr Tyr Arg
 690 695 700
 Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala Ile Glu Ser

 705 710 715 720
 Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp Ser Phe Gly
 725 730 735
 Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Gln Thr Pro Tyr Pro Gly
 740 745 750
 Val Glu Asn Ser Glu Ile Tyr Asp Tyr Leu Arg Gln Gly Asn Arg Leu
 755 760 765
 Lys Gln Pro Ala Asp Cys Leu Asp Gly Leu Tyr Ala Leu Met Ser Arg

 770 775 780
 Cys Trp Glu Leu Asn Pro Gln Asp Arg Pro Ser Phe Thr Glu Leu Arg
 785 790 795 800
 Glu Asp Leu Glu Asn Thr Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ala Gln Glu Pro
 805 810 815
 Asp Glu Ile Leu Tyr Val Asn Met Asp Glu Gly Gly Gly Tyr Pro Glu
 820 825 830
 Pro Pro Gly Ala Ala Gly Gly Ala Asp Pro Pro Thr Gln Pro Asp Pro

 835 840 845
 Lys Asp Ser Cys Ser Cys Leu Thr Ala Ala Glu Val His Pro Ala Gly
 850 855 860
 Arg Tyr Val Leu Cys Pro Ser Thr Thr Pro Ser Pro Ala Gln Pro Ala
 865 870 875 880
 Asp Arg Gly Ser Pro Ala Ala Pro Gly Gln Glu Asp Gly Ala
 885 890

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

>

<223> Synthetic Peptide

<400> 2

Arg Met Phe Ser Gly Thr Pro Val Ile Arg Leu Arg Phe Lys Arg Leu

1 5 10 15

Gln Pro Thr

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 3

Val Gly Arg Val Thr Ser Ser Gly Pro

1 5

<210> 4

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 4

Arg Asn Leu Val Ile Lys Val Asn

1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Peptide

<400> 5

Asp Ala Val Met Lys Ile Ala Val Ala

1 5
 <210> 6
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Peptide
 <400> 6

Glu Arg Gly Leu Tyr His Leu Asn Leu Thr Val Gly Gly Ile Pro Phe

1 5 10 15

His

<210> 7
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Peptide
 <400> 7

Trp Leu Asn Gly Glu Asp Thr Thr Ile Gln Glu Thr Val Lys Val Asn

1 5 10 15

Thr Arg Met

<210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 8

gatttggaga acacactga

19

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 9

aattgtacta cacaaaagta c

21

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 10

gcccgaagcg ttactttga

20

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 11

tccattattc ctactgtcgg tatc

24

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 12

gtgggcaacc cagggaatat c

21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 13
 gtactgtccc gtgtcggaaa g 21
 <210> 14
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 14
 atggggaagg tgaaggtcg 19
 <210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 15
 ggggtcattg atggcaaca ta 22
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide
 <400> 16
 gccccagaca ggtgatcttg 20
 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic Oligonucleotide

<400> 17

gcttgcgagg gaagaagttg t

21