



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년05월07일

(11) 등록번호 10-1391472

(24) 등록일자 2014년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 16/28 (2006.01) *C12N 15/13* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7012483(분할)

(22) 출원일자(국제) 2010년03월16일

심사청구일자 2013년05월14일

(85) 번역문제출일자 2013년05월14일

(65) 공개번호 10-2013-0067314

(43) 공개일자 2013년06월21일

(62) 원출원 특허 10-2011-7024649

원출원일자(국제) 2010년03월16일

심사청구일자 2011년10월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2010/027422

(87) 국제공개번호 WO 2010/107752

국제공개일자 2010년09월23일

(30) 우선권주장

61/162,154 2009년03월20일 미국(US)

61/306,829 2010년02월22일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현

WO2001078779 A2

전체 청구항 수 : 총 23 항

심사관 : 이미옥

(54) 발명의 명칭 알파-4-베타-7 이종이량체 특이적 길항제 항체

(57) 요약

알파4베타7 이종이량체-특이적 항원 결합 단백질, 이를 코딩하는 핵산, 및 이들의 제조 및 사용 방법이 개시된다.

(72) 발명자

아로라, 타루나

미국 91320 캘리포니아 사우전드 오크스 비아 피사
5380

제이콥슨, 프레데릭, 더블유.

미국 91320 캘리포니아 뉴베리 파크 흄스테이크 플
레이스 1168

특허청구의 범위

청구항 1

CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가지고, 여기서 상기 가변 영역들은

- (a) 서열 32로부터의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 4로부터의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역; 및
- (b) 서열 52로부터의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및 서열 21로부터의 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, (a) 경쇄 가변 영역이 서열 56에 기재된 골격 영역에서의 치환을 함유하는 것에 의해 서열 4와 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 59에 기재된 골격 영역에서의 치환을 함유하는 것에 의해 서열 32와 90% 이상 동일하거나; 또는 (b) 경쇄 가변 영역이 서열 21과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 52와 90% 이상 동일한 것인 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 3

제2항에 있어서, (a) 경쇄 가변 영역이 서열 4를 포함하고, 중쇄 가변 영역이 서열 32를 포함하거나; 또는 (b) 경쇄 가변 영역이 서열 21을 포함하고, 중쇄 가변 영역이 서열 52를 포함하는 것인 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 경쇄 불변 영역 및 중쇄 불변 영역을 추가로 포함하는 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, 경쇄 불변 영역이 카파-유형 경쇄 불변 영역이고, 중쇄 불변 영역이

- a') IgD 항체로부터의 불변 영역;
- b') IgE 항체로부터의 불변 영역;
- c') IgM 항체로부터의 불변 영역;
- d') IgG1 항체로부터의 불변 영역;
- e') IgG2 항체로부터의 불변 영역;
- f') IgG3 항체로부터의 불변 영역;
- g') IgG4 항체로부터의 불변 영역; 및

h') 중쇄내 디슬피드 결합을 형성하는 경향을 경감시키는 힌지(hinge) 영역 내의 하나 이상의 돌연변이를 갖는 IgG4 항체로부터의 불변 영역

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 6

제4항에 있어서, 경쇄 불변 영역이

- a) 서열 70을 포함하는 폴리펩티드;
- b) 서열 70과 90% 이상 동일한 폴리펩티드;

c) 글루타민의 피로글루탐산으로의 전환, 아미노산의 탈아미드화, 아미노산의 이성화, 아미노산의 당화, 아미노산의 산화, N-연결 글리코실화, 및 O-연결 글리코실화로 이루어진 군으로부터 선택되는 번역후 변형이 혼합된 a)의 폴리펩티드;

d) 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 N-말단 아미노산이 제거된 서열 70에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드;

e) 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 C-말단 아미노산이 제거된 서열 70에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 및

f) 상기의 조합

으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 중쇄 불변 영역이

a') 서열 72를 포함하는 폴리펩티드;

b') 서열 72와 90% 이상 동일한 폴리펩티드;

c') 글루타민의 피로글루탐산으로의 전환, 아미노산의 탈아미드화, 아미노산의 이성화, 아미노산의 당화, 아미노산의 산화, N-연결 글리코실화, 및 O-연결 글리코실화로 이루어진 군으로부터 선택되는 번역후 변형이 혼합된 a')의 폴리펩티드;

d') 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 N-말단 아미노산이 제거된 서열 72에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드;

e') 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 C-말단 아미노산이 제거된 서열 72에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 및

f') 상기의 조합

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 7

제2항에 있어서, 경쇄 불변 영역 및 중쇄 불변 영역을 추가로 포함하는 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 8

제7항에 있어서, 경쇄 불변 영역이 카파-유형 경쇄 불변 영역이고, 중쇄 불변 영역이

a') IgD 항체로부터의 불변 영역;

b') IgE 항체로부터의 불변 영역;

c') IgM 항체로부터의 불변 영역;

d') IgG1 항체로부터의 불변 영역;

e') IgG2 항체로부터의 불변 영역;

f') IgG3 항체로부터의 불변 영역;

g') IgG4 항체로부터의 불변 영역; 및

h') 중쇄내 디슬퍼드 결합을 형성하는 경향을 경감시키는 힌지(hinge) 영역 내의 하나 이상의 돌연변이를 갖는 IgG4 항체로부터의 불변 영역

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 9

제7항에 있어서, 경쇄 불변 영역이

a) 서열 70을 포함하는 폴리펩티드;

- b) 서열 70과 90% 이상 동일한 폴리펩티드;
 - c) 글루타민의 피로글루탐산으로의 전환, 아미노산의 탈아미드화, 아미노산의 이성화, 아미노산의 당화, 아미노산의 산화, N-연결 글리코실화, 및 O-연결 글리코실화로 이루어진 군으로부터 선택되는 번역후 변형이 혼합된 a)의 폴리펩티드;
 - d) 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 N-말단 아미노산이 제거된 서열 70에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드;
 - e) 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 C-말단 아미노산이 제거된 서열 70에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 및
 - f) 상기의 조합
으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 중쇄 불변 영역이
- a') 서열 72를 포함하는 폴리펩티드;
 - b') 서열 72와 90% 이상 동일한 폴리펩티드;
 - c') 글루타민의 피로글루탐산으로의 전환, 아미노산의 탈아미드화, 아미노산의 이성화, 아미노산의 당화, 아미노산의 산화, N-연결 글리코실화, 및 O-연결 글리코실화로 이루어진 군으로부터 선택되는 번역후 변형이 혼합된 a')의 폴리펩티드;
 - d') 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 N-말단 아미노산이 제거된 서열 72에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드;
 - e') 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 C-말단 아미노산이 제거된 서열 72에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 및
 - f') 상기의 조합
으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 10

제3항에 있어서, 경쇄 불변 영역 및 중쇄 불변 영역을 추가로 포함하는 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 11

제10항에 있어서, 경쇄 불변 영역이 카파-유형 경쇄 불변 영역이고, 중쇄 불변 영역이

- a') IgD 항체로부터의 불변 영역;
- b') IgE 항체로부터의 불변 영역;
- c') IgM 항체로부터의 불변 영역;
- d') IgG1 항체로부터의 불변 영역;
- e') IgG2 항체로부터의 불변 영역;
- f') IgG3 항체로부터의 불변 영역;
- g') IgG4 항체로부터의 불변 영역; 및
- h') 중쇄내 디슬피드 결합을 형성하는 경향을 경감시키는 힌지(hinge) 영역 내의 하나 이상의 돌연변이를 갖는 IgG4 항체로부터의 불변 영역

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 12

제10항에 있어서, 경쇄 불변 영역이

- a) 서열 70을 포함하는 폴리펩티드;
- b) 서열 70과 90% 이상 동일한 폴리펩티드;
- c) 글루타민의 피로글루탐산으로의 전환, 아미노산의 탈아미드화, 아미노산의 이성화, 아미노산의 당화, 아미노산의 산화, N-연결 글리코실화, 및 O-연결 글리코실화로 이루어진 군으로부터 선택되는 번역후 변형이 혼합된 a)의 폴리펩티드;
- d) 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 N-말단 아미노산이 제거된 서열 70에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드;
- e) 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 C-말단 아미노산이 제거된 서열 70에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 및
- f) 상기의 조합

으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 중쇄 불변 영역이

- a') 서열 72를 포함하는 폴리펩티드;
- b') 서열 72와 90% 이상 동일한 폴리펩티드;
- c') 글루타민의 피로글루탐산으로의 전환, 아미노산의 탈아미드화, 아미노산의 이성화, 아미노산의 당화, 아미노산의 산화, N-연결 글리코실화, 및 O-연결 글리코실화로 이루어진 군으로부터 선택되는 번역후 변형이 혼합된 a')의 폴리펩티드;
- d') 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 N-말단 아미노산이 제거된 서열 72에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드;
- e') 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 C-말단 아미노산이 제거된 서열 72에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드; 및
- f') 상기의 조합

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 13

중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 가지고, 여기서 상기 가변 영역들은

- (a) 서열 32를 코딩하는 핵산에 의해 코딩되는 중쇄 가변 영역, 및 서열 4를 코딩하는 핵산에 의해 코딩되는 경쇄 가변 영역; 및
- (b) 서열 52를 코딩하는 핵산에 의해 코딩되는 중쇄 가변 영역, 및 서열 21을 코딩하는 핵산에 의해 코딩되는 경쇄 가변 영역

으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 14

제13항에 있어서, (a) 중쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산이 서열 68을 포함하고, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산이 서열 67을 포함하거나; 또는 (b) 중쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산이 서열 66을 포함하고, 경쇄 가변 영역을 코딩하는 핵산이 서열 65를 포함하는 것인 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 15

제13항에 있어서, 서열 70을 코딩하는 핵산에 의해 코딩되는 경쇄 불변 영역, 및 서열 72를 코딩하는 핵산에 의해 코딩되는 중쇄 불변 영역을 추가로 포함하는 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 16

제15항에 있어서, 경쇄 불변 영역이 서열 69를 포함하는 핵산에 의해 코딩되고, 중쇄 불변 영역이 서열 71을 포함하는 핵산에 의해 코딩되는 것인 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 17

제14항에 있어서, 서열 70을 코딩하는 핵산에 의해 코딩되는 경쇄 불변 영역, 및 서열 72를 코딩하는 핵산에 의해 코딩되는 중쇄 불변 영역을 추가로 포함하는 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 18

제17항에 있어서, 경쇄 불변 영역이 서열 69를 포함하는 핵산에 의해 코딩되고, 중쇄 불변 영역이 서열 71을 포함하는 핵산에 의해 코딩되는 것인 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 단백질, 및 생리학상 허용되는 희석제, 부형제 또는 담체를 포함하는, 염증성 장 질환, 궤장염, 인슐린-의존적 당뇨병, 유방염, 담낭염, 담관염, 담도주위염, 만성 기관지염, 만성 부비동염, 천식, 또는 이식편 대 숙주 질환을 치료하기 위한 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 항원 결합 단백질을 코딩하는 단리된 핵산.

청구항 21

제20항의 핵산을 포함하는 백터.

청구항 22

제21항의 백터로 형질감염 또는 형질전환된 단리된 숙주 세포.

청구항 23

제22항의 숙주 세포를 배양하여 항원 결합 단백질을 발현시키는 단계 및 배양 배지로부터 상기 항원 결합 단백질을 회수하는 단계를 포함하는 항원 결합 단백질의 생산 방법.

명세서**기술분야**

[0001]

관련 출원에 대한 교차 참조

[0002]

본 출원은 35 U.S.C. 119(e) 하에 미국 특허 출원 번호 61/162,154 (2009년 3월 20일 출원) 및 미국 특허 출원 번호 61/306,829 (2010년 2월 22일 출원)를 우선권으로 청구하고, 이들은 참고로 본원에 포함된다.

[0003]

기술분야

[0004]

본 출원은 알파4베타7 이종이량체-특이적 항원 결합 단백질에 관한 조성물 및 방법을 제공한다.

배경기술

[0005]

배경기술

[0006]

인테그린은 2개의 서브유닛 (1개의 알파 서브유닛 및 1개의 베타 서브유닛)으로 형성된 이종이량체성 제I형 막 횡단 단백질이고, 다수의 상이한 세포-세포 및 세포-세포의 매트릭스 상호작용을 매개한다. 기능적으로, 인테그린은 백혈구 이동 및 재순환 및 면역 응답이 포함되는 다양한 생물학적 프로세스에서 수반되는 것으로 나타났다. 포유동물에는, 18가지의 공지된 알파 서브유닛 및 8가지의 공지된 베타 서브유닛이 있고, 이들이 조합되어 24가지의 독특한 인테그린을 형성한다. 리간드 특이성은 발현된 알파 및 베타 서브유닛의 특정 조합에 의해 대부분 결정되는 한편, 리간드에 대한 친화력은 인테그린 형상 변화에 의해 조정되고 2가-양이온 의존적이다.

[0007]

인테그린에 대한 리간드는 세포의 매트릭스 단백질 예컨대 콜라겐, 피브로네틴, 비트로네틴 및 라미닌; 카운터 (counter)-수용체 예컨대 세포 부착 분자 (예를 들어, 혈관 세포 부착 분자 또는 VCAM), 및 혈장 단백질이 포함되는 구조적으로 다양한 군을 형성한다. 다수의 병원성 미생물이 감염을 개시하는데 또는 독소 결합 부위로서 인테그린을 또한 활용한다. 구조적으로 다양한 리간드들은 노출된 글루탐산 또는 아스파르트산 잔기 (일반적으

로, 연장된 가요성 루프 내에 존재함)를 공유하고, 이는 인테그린에 의한 인식에 중요하다.

[0008] 알파4 인테그린 (베타1 또는 베타7 서브유닛과 짹을 이룬 알파4)은 면역계에서 중요한 역할을 한다. 알파4베타1은 림프구 및 골수 세포 상에서 발현된다; 이는 혈관 세포 부착 분자 (VCAM)에 대한 주요 결합 파트너인 것으로 보인다. VCAM은 혈관 내피 상에서 편재성으로 발현되고, 염증 동안 상향 조절되며, 알파4베타1뿐만 아니라 알파4베타7에 결합한다 (비록 알파4베타7에 약하게 결합하긴 하지만). 말초 T 세포, B 세포, NK 세포 및 호산구 상에서 또한 검출되긴 하지만, 알파4베타7은 창자로 우선적으로 귀소하는 것으로 나타난 CD4+CD45RA- 메모리 T 세포들의 하위집단 상에서 가장 고도로 발현된다. 알파4베타7 이종이량체에 대한 1차적인 리간드는 창자 내피에서 발현되는 점막 어드레신(addressin) 세포 부착 분자 1 (MAdCAM-1 또는 MAdCAM)이다.

[0009] 알파4 사슬과 쌍을 이루는 것에 더하여, 베타7 서브유닛은 알파E와 또한 짹을 이루어 알파E베타7을 형성하고, 이는 장, 폐 및 비뇨생식관 내의 상피내 림프구 (IEL) 상에서 주로 발현된다. 알파E베타7은 창자 내의 수지상 세포 상에서 또한 발현된다. 알파E베타7 이종이량체는 상피 세포 상에서 발현되는 E-카드헤린에 결합한다. IEL 세포는 상피 구획 내에서의 면역감시에 대한 메커니즘을 제공하는 것으로 생각된다.

[0010] 알파4에 결합하고 VCAM-1 및 피브로넥틴에 대한 알파4베타1의 결합을 억제하는 항체가 잔기 152와 203 사이의 알파4의 아미노산 52개 영역에 대해 매핑(mapping)되었다 (문헌 [Schiffer et al., J. Biol. Chem. 270:14270; 1995]). 티드스웰(Tidswell) 등 (문헌 [J. Immunol. 159:1497; 1997])은 마우스/인간 키메라 베타7 서브유닛 접근법에서 베타7에 결합하는 항체들의 패널을 이용하여 MAdCAM-1에 대한 결합에서 중요한 베타7의 도메인들을 확인하였다. 이들은 MAdCAM-1 및 E-카드헤린에 대한 결합을 억제한 7개의 항체 중 6개가 아미노산 176 내지 250을 포함하는 영역에 매핑되었음을 발견하였고, 상기 영역은 다른 인테그린 서브유닛들의 금속-이온 의존적 부착 부위 (MIDAS)에 대한 상동성이 있는 것으로 보인다. 티드스웰 등이 사용한 항체들 중 하나는 ACT-1로서 지칭되는 알파4베타7 이종이량체 특이적 항체였다.

[0011] ACT-1 항체는 마우스를 PBMC로부터의 인간 파상풍 톡소이드(toxoid)-특이적 T 림프구 세포주로 면역화시킴으로써 발달된 항체로 라자로비츠(Lazarovitz) 등 (문헌 [J. Immunol. 133:1857; 1984])에 의해 최초로 기술되었다. 추후에, ACT-1이 알파4베타7 이종이량체에 특이적으로 결합하는 것으로 나타났다 (문헌 [Schweighoffer et al., J. Immunol. 151:717, 1993]). ACT-1은 뮤린(murine) 알파4베타7에는 결합하지 않는 한편, 적어도 일부 비-인간 영장류 종으로부터의 알파4베타7에 결합하고, 포획된 목화머리(cotton-top) 타마린에서 자발성 대장염을 약화시키는 것으로 나타났다 (문헌 [Hesterberg et al., Gastroenterology 111:1373; 1996])

[0012] ACT-1이 인간화되었고, 궤양성 대장염 (문헌 [Feagan et al., N Engl J Med. 352:2499; 2005])에서, 그리고 최근에는 크론병 (문헌 [Feagan et al., Clinical Gastroenterology and Hepatology, 6:1370, 2008])에서 인간 치료제로서 평가되었다. 베돌리주맙(vedolizumab)으로 또한 공지된 인간화 ACT-1이 WO 98/06248 및 미국 특허 7,147,85, 뿐만 아니라 WO 07/061679 및 미국 2007-0122404에 기술되어 있다. 또 다른 인간화 항체인 나탈리주맙(natalizumab) (타이사브리(Tysabri)®)이 크론병을 치료하는데 사용되었다. 나탈리주맙은 알파4-특이적 뮤린 항체의 인간화 버전이다. 베돌리주맙은 일부 환자에서 중화성 항-인간화 항체 응답에 이르는 것으로 나타났고, 나탈리주맙은 면역손상 개체에서의 이전의 JC 바이러스 감염의 재활성화와 관련된 신경학적 장애인 진행성 다초점 백질뇌병증 (PML)과 관련되었다. 따라서, 알파4베타7/MAdCAM-1 경로를 과괴하는 한편 이러한 단점을 개선하는 치료제가 요구된다.

발명의 내용

발명의 개요

[0014] 한 측면에서, 본 발명은 인간 알파4베타7에 특이적으로 결합하는 단리된 항원 결합 단백질 (즉, 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질)을 제공한다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 항원 결합 단백질은 비-인간 영장류, 사이노몰구스 원숭이, 침팬지, 비-영장류 포유동물, 설치류, 마우스, 래트, 햄스터, 기니피그, 고양이 또는 개의 알파4베타7에 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 단리된 항원 결합 단백질은 인간 항체; 키메라 항체; 모노클로날 항체; 재조합 항체; 항원-결합 항체 단편; 단일체 항체; 디아바디(diabody); 트리아바디(triabody); 테트라바디(tetrabody); Fab 단편; F(ab')₂ 단편; 도메인 항체; IgD 항체; IgE 항체; IgM 항체; IgG1 항체; IgG2 항체; IgG3 항체; IgG4 항체; 또는 중쇄내 디솔피드 결합을 형성하는 경향을 경감시키는 힌지(hinge) 영역 내의 하나 이상의 돌연변이를 갖는 IgG4 항체를 포함한다. 또 다른 측면에서, 단리된 항원 결합 단백질은 상기 언급된 항체들 중 하나로부터의 중쇄 불변 영역을 포함한다; 또 다른 측면에서, 이러한 불변 영

역은 서열 72를 포함하는 폴리펩티드, 서열 72와 90% 이상 동일한 폴리펩티드, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 N-말단 및/또는 C-말단 아미노산이 제거된 서열 72에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 또는 하나 이상의 번역후 변형이 혼입된 상기 언급된 폴리펩티드들 중 하나이다. 한 실시양태에서, 단리된 항원 결합 단백질은 카파 경쇄 불변 영역을 포함하고, 또 다른 실시양태에서는 람다 경쇄 영역을 포함한다. 한 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 서열 70을 포함하는 폴리펩티드, 서열 70과 90% 이상 동일한 폴리펩티드, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 N-말단 및/또는 C-말단 아미노산이 제거된 서열 70에 기재된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드, 또는 하나 이상의 번역후 변형이 혼입된 상기 언급된 폴리펩티드들 중 하나이다.

[0015] 본 발명의 한 실시양태는 하나 이상의 상보성 결정 영역 또는 CDR을 각각 포함하는 중쇄 및 경쇄가 있는 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질을 제공한다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 중쇄 가변 영역은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하며, 이때 각각의 CDR은 서열 55로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 58로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 56으로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 59로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 및 서열 57로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 60으로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0016] 본 발명의 또 다른 측면에서, 중쇄 가변 영역은 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 명시되는 4개의 프레임워크 영역 (FR)을 추가로 포함하고, 경쇄 가변 영역은 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 명시되는 4개의 프레임워크 영역 (FR)을 추가로 포함한다. 한 측면에서, 이러한 FR은 CDR과 동일한 서열 번호로부터 선택된다; 또 다른 측면에서, FR은 상이한 서열 번호로부터 선택된다. 추가적인 실시양태에서, 본 발명은 경쇄 가변 영역이 서열 55를 포함하고 중쇄 가변 영역이 서열 58을 포함하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 56을 포함하고 중쇄 가변 영역이 서열 59를 포함하거나; 또는 경쇄 가변 영역이 서열 57을 포함하고 중쇄 가변 영역이 서열 60을 포함하는 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질을 제공한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 상보성 결정 영역 또는 CDR을 각각 포함하는 중쇄 및 경쇄가 있는 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질을 제공한다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 중쇄 가변 영역은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하고, 경쇄 가변 영역은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함한다. 한 실시양태에서, 경쇄 CDR은 서열 3의 CDR1, CDR2 및 CDR3과 각각 90% 이상 동일한 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 5의 CDR1, CDR2 및 CDR3과 각각 90% 이상 동일한 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 7의 CDR1, CDR2 및 CDR3과 각각 90% 이상 동일한 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 22의 CDR1, CDR2 및 CDR3과 각각 90% 이상 동일한 CDR1, CDR2 및 CDR3; 및 서열 24의 CDR1, CDR2 및 CDR3과 각각 90% 이상 동일한 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 군으로부터 선택되고, 중쇄 가변 CDR1, CDR2 및 CDR3은 서열 58로부터의 것이다.

[0018] 본 발명의 또 다른 측면에서, 중쇄 가변 영역은 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 명시되는 4개의 프레임워크 영역 (FR)을 추가로 포함하고, 경쇄 가변 영역은 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 명시되는 4개의 프레임워크 영역 (FR)을 추가로 포함한다. 한 측면에서, 이러한 FR은 CDR과 동일한 서열 번호로부터 선택된다; 또 다른 측면에서, FR은 상이한 서열 번호로부터 선택된다. 추가적인 실시양태에서, 본 발명은 경쇄 가변 영역이 서열 3과 90% 이상 동일한 경쇄 가변 영역; 서열 5와 90% 이상 동일한 경쇄 가변 영역; 서열 7과 90% 이상 동일한 경쇄 가변 영역; 서열 22와 90% 이상 동일한 경쇄 가변 영역; 및 서열 24와 90% 이상 동일한 경쇄 가변 영역으로 구성된 군으로부터 선택되고, 중쇄 가변 영역이 서열 58을 포함하는 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질을 제공한다.

[0019] 본 발명의 또 다른 측면은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가지며, 여기서 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3이 서열 12의 CDR1, CDR2 및 CDR3과 각각 90% 이상 동일한 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 25의 CDR1, CDR2 및 CDR3과 각각 90% 이상 동일한 CDR1, CDR2 및 CDR3; 및 서열 26의 CDR1, CDR2 및 CDR3과 각각 90% 이상 동일한 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 군으로부터 선택되고, 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3이 서열 41의 CDR1, CDR2 및 CDR3과 각각 90% 이상 동일한 CDR1, CDR2 및 CDR3; 및 서열 54의 CDR1, CDR2 및 CDR3과 각각 90% 이상 동일한 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 구성된 군으로부터 선택되는 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질을 제공한다. 한 실시양태에서, 경쇄 가변 영역은 서열 12, 25 및 26 중 어느 하나와 90% 이상 동일한 가변 영역으로 구성된 군으로부터 선택되고, 중쇄 가변 영역은 서열 41 및 54 중 어느 하나와 90% 이상 동일한 가변 영역으로 구성된 군으로부터 선택된다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 중쇄 가변 영역은 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 명시되는 4개의 프레임워크 영역 (FR)을 추가로 포함하고, 경쇄 가변 영역은 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 명시되는 4개의 프레임워크 영역 (FR)을 추가로 포함한다. 한 측면에서, 이러한 FR은 CDR과 동일한 서열 번호로부터 선택된다; 또 다른 측면에서, FR은 상이한 서열 번호로부터 선택된다.

[0020]

한 실시양태에서, 본 발명은 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역 및 CDR1, CDR2 및 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 가지며, 여기서 각각의 CDR이 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 CDR과 90% 이상 동일한 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질을 제공한다: 서열 10으로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 38로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 2로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 30으로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 20으로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 51로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 11로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 39로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 13으로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 42로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 17로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 46으로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 8로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 36으로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 19로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 49로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 18로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 47로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 21로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 52로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 3로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 31로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 7로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 35로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 6으로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 34로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 1로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 29로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 22로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 50으로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 24로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 40으로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 9로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 37로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 4로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 32로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 28으로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 53으로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 16으로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 45로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 14로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 43으로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 27으로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 43으로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 5로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 41로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 23으로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 48로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 서열 25로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 54로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3; 및 서열 26으로부터의 경쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3, 및 서열 54로부터의 중쇄 CDR1, CDR2 및 CDR3. 또 다른 측면에서, 중쇄 및 경쇄 CDR은 열거된 서열 번호의 각각의 CDR과 동일하다. 본 발명의 한 실시양태에서, 중쇄 가변 영역은 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 명시되는 4개의 프레임워크 영역 (FR)을 추가로 포함하고, 경쇄 가변 영역은 FR1, FR2, FR3 및 FR4로 명시되는 4개의 프레임워크 영역 (FR)을 추가로 포함한다. 한 측면에서, 이러한 FR은 CDR과 동일한 서열 번호로부터 선택된다; 또 다른 측면에서, FR은 상이한 서열 번호로부터 선택된다.

[0021]

또 다른 실시양태에서, 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질은 경쇄 가변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하고, 이때 경쇄 가변 영역이 서열 10과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 38과 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 2와 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 30과 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 20과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 51과 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 11과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 39와 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 13과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 42와 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 17과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 46과 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 8과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 36과 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 19와 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 49와 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 18과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 47과 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 21과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 52와 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 3과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 31과 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 7과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 35와 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 6과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 34와 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 1과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 29와 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 22와 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 50과 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 24와 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 40과 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 9와 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 37과 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 4와 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 32와 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 28과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 53과 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 16과 90% 이상 동

일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 45와 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 15와 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 44와 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 14와 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 43과 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 27과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 33과 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 12와 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 41과 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 23과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 48과 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 25와 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 54와 90% 이상 동일하거나; 경쇄 가변 영역이 서열 26과 90% 이상 동일하고, 중쇄 가변 영역이 서열 54와 90% 이상 동일하다. 또 다른 측면에서, 중쇄 및 경쇄 가변 영역은 열거된 서열 번호의 각각의 가변 영역과 동일하다.

[0022] 본 발명의 한 측면은 CD4+ 메모리 T 세포 결합 분석법에서 EC50이 35 ng/ml 미만인 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질을 제공한다; 또 다른 측면은 CD4+ 메모리 T 세포 결합 분석법에서 EC50이 10 ng/ml 미만인 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 MAdCAM 경쟁 분석법에서의 IC50이 30 ng/ml 미만인 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질을 제공한다; 또 다른 실시양태에서, MAdCAM 경쟁 분석법에서의 IC50이 10 ng/ml 미만인 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합이 제공된다. 본 발명의 한 측면은 알파4베타7의 S250N 돌연변이체에 결합하는 단리된 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질을 제공한다.

[0023] 본 발명의 한 측면에서, 본 발명은 상기 언급된 폴리펩티드를 코딩하는 핵산을 제공한다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 이러한 핵산은 벡터이다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 핵산으로 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포를 제공한다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 이러한 숙주 세포를 폴리펩티드의 발현을 촉진하는 조건 하에 인큐베이션하는 단계 및 폴리펩티드를 수확하는 단계를 포함하는 폴리펩티드의 제조 방법이 제공된다.

[0024] 또 다른 측면에서, 본 발명은 알파4베타7에 결합하는 항원 결합 단백질을 분비하는 단리된 세포를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 이러한 세포는 하이브리도마(hybridoma)이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 상기 단리된 세포를 세포가 상기 항원 결합 단백질을 발현하도록 하는 조건 하에 인큐베이션하는 것을 포함하는, 알파4베타7 (즉, 인간 알파4베타7)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질의 제조 방법을 제공한다.

[0025] 한 측면에서, 본 발명은 알파4베타7 이종이량체에 특이적으로 결합하는 단리된 항원 결합 단백질을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 이러한 단리된 항원 결합 단백질은, 인간 알파4베타7에 결합했을 때, 알파4베타7이 MAdCAM-1에 결합하는 것을 억제한다. 따라서, 본 발명의 한 실시양태는 활성이 부분적으로 또는 완전히 억제되도록 알파4베타7을 발현하는 세포를 알파4베타7 이종이량체-특이적 항원 결합 단백질과 접촉시키는 것을 포함하는, 알파4베타7의 하나 이상의 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 한 측면에서, 이같은 방법은 생체 내에서 수행된다. 본 발명의 한 측면에서, 단리된 항원 결합 단백질은 알파4베타7을 발현하는 세포가 MAdCAM-1을 발현하는 세포에 부착하는 것을 억제한다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 단리된 항원 결합 단백질은 알파4베타7을 발현하는 세포가 MAdCAM-1을 발현하는 세포가 거주하는 구역 또는 조직으로 운송되는 것을 억제한다; 이같은 실시양태의 한 예에서, 단리된 항원 결합 단백질은 럼프구가 창자로 운송되는 것을 억제한다.

[0026] 또 다른 측면에서, 본 발명은 이러한 항원 결합 단백질을 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 이러한 제약 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는 대상에서의 상태를 치료하는 방법을 제공하고, 이때 상태는 대상에서 알파4베타7의 활성을 (부분적으로 또는 완전히) 감소시킴으로써 치료 가능하다. 또 다른 실시양태에서, 대상은 인간이다. 또 다른 실시양태에서, 상태는 위장계의 염증성 상태이다. 따라서, 알파4베타7을 발현하는 세포가 MAdCAM을 발현하는 세포를 포함하는 조직으로 운송되는 것을 (부분적으로 또는 완전히) 억제하는데 충분한 양으로 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질을 개체에게 투여하는 것을 포함하는, 알파4베타7을 발현하는 세포가 MAdCAM을 발현하는 세포를 포함하는 조직으로 부적합하게 운송되는 것을 특징으로 하는 상태를 가진 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 한 실시양태에서, 상태는 염증성 장 질환, 예를 들어, 궤양성 대장염, 크론병, 복강 질환 (비열대성 스프루), 혈청반응 음성 관절병증과 관련된 장병증, 혈미경적 또는 교원성 대장염, 호산구성 위장염, 및 대장절제술 및 회장항문 문합술 후에 초래된 낭염이다. 또 다른 실시양태에서, 상태는 궤장염, 인슐린-의존적 당뇨병, 유방염, 담낭염, 담관염, 담도주위염, 만성 기관지염, 만성 부비동염, 천식 또는 이식편 대 숙주 질환이다.

[0027] 또 다른 실시양태에서, 이러한 방법은 대상에게 제2 치료를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제2 치료는 제약 조성물이 대상에게 투여되기 전에 및/또는 투여되는 것과 동시에 및/또는 투여된 후에

대상에게 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 제2 치료는 항염증제를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 제2 제약 조성물은 비-스테로이드성 항염증 약물, 스테로이드, 및 면역조정제로 구성된 군으로부터 선택된 작용제를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 이러한 방법은 대상에게 제3 치료를 투여하는 것을 포함한다.

[0028] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상에게 이러한 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는 대상의 수명을 증가시키는 방법을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상에게 이러한 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 알파4베타7 활성을 감소시키는 것을 필요로 하는 대상에서 이를 감소시키는 방법을 제공한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상에게 이러한 제약 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 알파4베타7-매개 운송 (예를 들어, 알파4베타7-매개 장자 귀소)을 감소시키는 것을 필요로 하는 대상에서 이를 감소시키는 방법을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

발명의 상세한 설명

[0030] 본 발명은 알파4베타7을 작동시키거나 길항하는 문자, 예컨대 항-알파4베타7 항체, 항체 단편, 및 항체 유도체, 예를 들어, 길항성 항-알파4베타7 항체, 항체 단편, 또는 항체 유도체가 포함되는, 인테그린 알파4베타7 ("알파4베타7")에 결합하는 문자에 관한 조성물, 키트 및 방법을 제공한다. 알파4베타7에 결합하는 폴리펩티드 전체 또는 이의 일부분을 코딩하는 뉴클레오티드의 서열을 포함하는 핵산, 및 이의 유도체 및 단편, 예를 들어, 항-알파4베타7 항체, 항체 단편 또는 항체 유도체 전체 또는 이의 일부분을 코딩하는 핵산, 이같은 핵산을 포함하는 플라스미드 및 벡터, 및 이같은 핵산 및/또는 벡터 및 플라스미드를 포함하는 세포 또는 세포주가 또한 제공된다. 제공되는 방법에는, 예를 들어, 알파4베타7에 결합하는 문자, 예컨대 항-알파4베타7 항체를 제조, 확인 또는 단리하는 방법, 문자가 알파4베타7에 결합하는지 여부를 결정하는 방법, 문자가 알파4베타7을 작동시키는지 또는 길항하는지 여부를 결정하는 방법, 알파4베타7에 결합하는 문자를 포함하는 조성물, 예컨대 제약 조성물을 제조하는 방법, 및 알파4베타7에 결합하는 문자를 대상에게 투여하는 방법, 예를 들어, 알파4베타7에 의해 매개되는 상태를 치료하기 위한 방법 및 생체 내에서 또는 시험관 내에서 알파4베타7의 생물학적 활성을 작동시키거나 길항하기 위한 방법이 포함된다.

[0031] 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열은 표준 단일 문자 또는 3문자 약어를 사용하여 표시된다. 달리 지시되지 않는 한, 각각의 폴리펩티드 서열은 왼쪽이 아미노 말단이고, 오른쪽이 카르복시 말단이다; 각각의 단일 가닥 핵산 서열, 및 각각의 이중 가닥 핵산 서열의 위쪽 가닥은 왼쪽이 5' 말단이고, 오른쪽이 3' 말단이다. 특정 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 기준 서열과 어떻게 다른지를 설명함으로써 또한 기술될 수 있다.

[0032] 본원에서 달리 정의되지 않는 한, 본 발명과 관련하여 사용된 과학 용어 및 기술 용어는 당업자가 통상적으로 이해하는 의미를 지닐 것이다. 또한, 문맥적으로 달리 요구되지 않는 한, 단수형 용어는 복수를 포함할 것이고, 복수형 용어는 단수를 포함할 것이다. 일반적으로, 세포 및 조직 배양, 문자 생물학, 면역학, 미생물학, 유전학 및 단백질 및 핵산 화학 및 혼성화와 관련하여 사용된 명명법 및 이의 기술은 당업계에 주지되어 있고 당업계에서 통상적으로 사용되는 것들이다. 일반적으로 본 발명의 방법 및 기술은, 달리 지시되지 않는 한, 당업계에 주지되어 있는 통상적인 방법에 따라, 그리고 본 명세서 전반에 걸쳐 인용 및 논의된 다양한 일반적이고 더욱 구체적인 참고문헌에 기술된 바와 같이 수행된다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)] 및 [Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992)], 및 [Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990)]을 참조하고, 이들은 참고로 본원에 포함된다. 효소 반응 및 정제 기술은 제조사의 설명서에 따라, 당업계에서 통상적으로 수행되는 바와 같이 또는 본원에 기술된 바와 같이 수행된다. 본원에 기술된 분석 화학, 합성 유기 화학 및 의약 및 제약 화학과 관련하여 사용된 용어법, 및 이의 실험 절차 및 기술은 당업계에 주지되어 있고 당업계에서 통상적으로 사용되는 것들이다. 화학적 합성, 화학적 분석, 제약학적 제조, 제형, 및 전달, 및 환자의 치료를 위해 표준 기술이 사용될 수 있다.

[0033] 달리 지시되지 않는 한, 하기의 용어들은 하기의 의미를 지니는 것으로 이해될 것이다:

[0034] 용어 "단리된 문자" (분자는, 예를 들어, 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드, 또는 항체이다)는 이의 유래 기원 또는 공급원에 의해 (1) 이의 천연 상태에서 동반되는 천연적으로 회합되는 성분과 회합되지 않거나, (2) 동일한 종으로부터의 다른 문자가 실질적으로 없거나, (3) 상이한 종으로부터의 세포에 의해 발현되거나, 또는 (4) 인간의 개입 없이 천연에서 발생하지 않는 문자이다. 따라서, 화학적으로 합성되거나, 또는 자신이 천연적으로 유래되는 세포와 상이한 세포 시스템에서 합성되는 문자는 자신의 천연적으로 회합되는 성분으로부터 "단리"될

것이다. 당업계에 주지된 정제 기술을 사용하여, 단리에 의해 천연적으로 회합된 성분이 분자에 실질적으로 없게 될 수 있다. 당업계에 주지된 다수의 수단에 의해 분자 순도 또는 균질성이 분석될 수 있다. 예를 들어, 폴리아크릴아미드 젤 전기영동을 사용하고 당업계에 주지된 기술을 사용하여 폴리펩티드를 가시화하도록 젤을 염색하여 폴리펩티드 샘플의 순도를 분석할 수 있다. 특정 목적을 위해, HPLC 또는 정제를 위해 당업계에 주지된 기타 수단을 사용함으로써 더 높은 해상도가 제공될 수 있다.

[0035] 용어 "알파4베타7 억제제" 및 "알파4베타7 길항제"는 상호교환가능하게 사용된다. 각각은 알파4베타7의 하나 이상의 기능을 검출가능하게 억제하는 분자이다. 역으로, "알파4베타7 작동제"는 알파4베타7의 하나 이상의 기능을 검출가능하게 증가시키는 분자이다. 알파4베타7 억제제에 의해 야기되는 억제는 검출가능하다면, 예를 들어 분석법을 사용함으로써 검출가능하다면, 완전할 필요가 없다. 알파4베타7 기능의 임의의 분석법이 사용될 수 있고, 이의 예가 본원에서 제공된다. 알파4베타7 억제제에 의해 억제될 수 있는 (또는 알파4베타7 작동제에 의해 증가될 수 있는) 알파4베타7의 기능의 예로는 리간드 결합 (즉, MadCAM-1에 대한 결합), 리간드-발현 세포에 대한 부착, 특정 구획 예컨대 창자로의 운송, 사이토카인, 케모카인 및 기타 매개물의 방출, 염증성 응답 및 조직 손상의 강화 또는 악화 등이 포함된다. 알파4베타7 억제제 및 알파4베타7 작동제의 유형의 예로는 알파4베타7 결합 폴리펩티드 예컨대 항원 결합 단백질 (예를 들어, 알파4베타7 항원 결합 단백질), 항체, 항체 단편, 및 항체 유도체가 포함된다.

[0036] 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질" 각각은 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 분자를 지칭한다. 이러한 용어는, 예를 들어, 천연 및 인공 단백질, 단백질 서열의 단백질 단편 및 폴리펩티드 유사체 (예컨대 뮤테인(mutein), 변이체, 및 융합 단백질), 뿐만 아니라 번역 후에 또는 다른 방식으로 공유결합에 의해 또는 비-공유결합에 의해 변형된 단백질을 포함한다. 펩티드, 폴리펩티드, 또는 단백질은 단량체성 또는 중합체성일 수 있다.

[0037] 본원에서 사용된 용어 "폴리펩티드 단편"은 상응하는 전장 단백질과 비교하여 아미노-말단 및/또는 카르복시-말단 결실이 있는 폴리펩티드를 지칭한다. 단편의 길이는, 예를 들어, 최소 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 20개, 50개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개 또는 200개의 아미노산일 수 있다. 또한 단편의 길이는, 예를 들어, 최대 1,000개, 750개, 500개, 250개, 200개, 175개, 150개, 125개, 100개, 90개, 80개, 70개, 60개, 50개, 40개, 30개, 20개, 15개, 14개, 13개, 12개, 11개, 또는 10개의 아미노산일 수 있다. 단편은 예상되는 것으로부터 1개 내지 5개의 아미노산의 아미노 및/또는 카르복시 말단에서의 변동을 예를 들어 초래하는 단백질분해성 (또는 기타) 프로세싱으로부터 또한 초래될 수 있다. 단편은, 한쪽 또는 양쪽 말단에서, 하나 이상의 추가적인 아미노산, 예를 들어, 상이한 천연-발생 단백질로부터의 아미노산들의 서열 (예를 들어, Fc 또는 류신 지퍼 도메인) 또는 인공적인 아미노산 서열 (예를 들어, 인공 링커(linker) 서열 또는 태그(tag) 단백질)을 추가로 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명의 폴리펩티드는 임의의 방식으로, 임의의 목적을 위해, 예를 들어, (1) 단백질분해에 대한 감수성을 감소시키고, (2) 산화에 대한 감수성을 감소시키고, (3) 단백질 복합체를 형성하기 위한 결합 친화력을 변경시키고, (4) 결합 친화력을 변경시키고, (4) 기타 물리화학적 또는 기능적 성질을 부여하거나 변형시키기 위해 변형된 폴리펩티드를 포함한다. 유사체에는 폴리펩티드의 뮤테인이 포함된다. 예를 들어, 단일 또는 다중 아미노산 치환 (예를 들어, 보존적 아미노산 치환)이 천연 발생 서열에서 (예를 들어, 문자간 접촉을 형성하는 도메인(들)의 외부의 폴리펩티드 부분에서) 이루어질 수 있다. 컨센서스(consensus) 서열이 치환용 아미노산 잔기를 선택하는데 사용될 수 있다; 당업자는 추가적인 아미노산 잔기가 또한 치환될 수 있음을 인지한다.

[0039] "보존적 아미노산 치환"은 어버이 서열의 구조적 특성을 실질적으로 변화시키지 않는 치환이다 (예를 들어, 교체 아미노산은 어버이 서열에서 발생하는 나선을 중단시키거나, 또는 어버이 서열을 특성화하거나 이의 기능성에 필요한 기타 유형의 2차 구조를 파괴하는 경향이 없어야 한다). 업계에 알려져 있는 폴리펩티드 2차 및 3차 구조의 예가 문헌 [Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984))]; [Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991))]; 및 [Thornton et al., Nature 354:105 (1991)]에 기술되어 있고, 이들은 각각 참고로 본원에 포함된다.

[0040] 본 발명은 알파4베타7 결합 폴리펩티드의 비-펩티드 유사체를 또한 제공한다. 비-펩티드 유사체는 주형 펩티드와 유사한 성질이 있는 약물로서 제약 산업에서 통상적으로 사용된다. 이러한 유형의 비-펩티드 화합물은 "펩티드 모방체" 또는 "펩티도모방체(peptidomimetic)"로 명명되고, 예를 들어, 문헌 [Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15:29 (1986)]; [Veber and Freidinger TINS p.392 (1985)]; 및 [Evans et al., J. Med. Chem. 30:1229

(1987)]을 참조하며, 이들은 본원에 참고로 포함된다. 치료상 유용한 웨티드와 구조적으로 유사한 웨티드 모방체가 등가의 치료 또는 예방 효과를 일으키는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 웨티드모방체는 패러다임 폴리웨티드 (즉, 원하는 생화학적 성질 또는 약리학적 활성이 있는 폴리웨티드), 예컨대 인간 항체와 구조적으로 유사하지만, 당업계에 주지된 방법에 의해 하나 이상의 웨티드 결합이 $--\text{CH}_2\text{NH}--$, $--\text{CH}_2\text{S}--$, $--\text{CH}_2--\text{CH}_2--$, $--\text{CH}=\text{CH}--$ (시스 및 트랜스), $--\text{COCH}_2--$, $--\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2--$, 및 $--\text{CH}_2\text{SO}--$ 로 구성된 군으로부터 선택된 연결로 임의적으로 교체된다. 컨센서스 서열의 하나 이상의 아미노산의 동일한 유형의 D-아미노산으로의 체계적인 치환 (예를 들어, L-라이신 대신 D-라이신)이 더욱 안정적인 웨티드를 생성시키는데 또한 사용될 수 있다. 또한, 컨센서스 서열 또는 실질적으로 동일한 컨센서스 서열 변이를 포함하는 구속형(constrained) 웨티드가 당업계에 공지된 방법 (본원에 참고로 포함된 문헌 [Rizo and Giersch Ann. Rev. Biochem. 61:387 (1992)])에 의해, 예를 들어, 웨티드를 고리화시키는 문자내 디슬피드 다리를 형성할 수 있는 내부 시스테인 잔기를 부가함으로써 생성될 수 있다.

[0041] 폴리웨티드 (예를 들어, 항체)의 "변이체"는 다른 폴리웨티드 서열과 비교하여 하나 이상의 아미노산 잔기가 아미노산 서열 새로 삽입되고/되거나, 아미노산 서열로부터 결실되고/되거나 아미노산 서열 새로 치환된 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 변이체는 융합 단백질을 포함한다.

[0042] 폴리웨티드의 "유도체"는, 예를 들어, 또 다른 화학 모이어티(moiety) (예컨대 폴리에틸렌 글리콜 또는 알부민, 예를 들어 인간 혈청 알부민)에의 접합, 인산화, 및/또는 글리코실화를 통해, 화학적으로 변형된 폴리웨티드 (예를 들어, 항체)이다. 달리 지시되지 않는 한, 용어 "항체"는, 2개의 전장 중쇄 및 2개의 전장 경쇄를 포함하는 항체에 대하여, 이의 유도체, 변이체, 단편 및 뮤테인을 포함하며, 이들의 예가 하기에 기술된다.

[0043] "항원 결합 단백질"은 항원에 결합하는 부분을 포함하고, 항원 결합 부분이 항원에 대한 항원 결합 단백질의 결합을 촉진하는 형상을 채택하도록 하는 스캐폴드(scaffold) 또는 프레임워크 부분을 임의적으로 포함하는 단백질이다. 항원 결합 단백질의 예로는 항체, 항체 단편 (예를 들어, 항체의 항원 결합 부분), 항체 유도체, 및 항체 유사체가 포함된다. 항원 결합 단백질은, 예를 들어, CDR 또는 CDR 유도체가 그래프팅된 별법적인 단백질 스캐폴드 또는 인공 스캐폴드를 포함할 수 있다. 이같은 스캐폴드에는 예를 들어 항원 결합 단백질의 3차원 구조를 안정화시키기 위해 도입된 돌연변이를 포함하는 항체-유래 스캐폴드, 뿐만 아니라 생체적 합성 중합체가 예를 들어 포함되는 완전히 합성형인 스캐폴드가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 예를 들어, 문헌 [Korndorfer et al., 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volume 53, Issue 1:121-129]; [Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654] 참조. 또한, 웨티드 항체 모방체 ("PAM"), 뿐만 아니라 스캐폴드로서 피브로넥틴 성분을 이용하는 항체 모방체를 기초로 하는 스캐폴드가 사용될 수 있다.

[0044] 항원 결합 단백질은, 예를 들어, 천연 발생 면역글로불린의 구조를 지닐 수 있다. "면역글로불린"은 사량체성 분자이다. 천연 발생 면역글로불린에서, 각각의 사량체는 2개의 동일한 쌍의 폴리웨티드 사슬로 구성되고, 각각의 쌍에는 1개의 "경쇄" (약 25 kDa) 및 1개의 "중쇄" (약 50-70 kDa)가 있다. 각각의 사슬의 아미노-말단 부분은 항원 인식을 주로 담당하는 약 100개 내지 110개 이상의 아미노산의 가변 영역을 포함한다. 각각의 사슬의 카르복시-말단 부분은 이펙터 기능을 주로 담당하는 불변 영역을 규정한다. 인간 경쇄는 카파 또는 람다 경쇄로 분류된다. 중쇄는 뮤, 델타, 갑마, 알파 또는 엡실론으로 분류되고, 항체의 이소타입을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA, 및 IgE로 규정한다. 경쇄 및 중쇄 내에서, 가변 영역과 불변 영역은 아미노산 약 12개 이상의 "J" 영역에 의해 연결되고, 중쇄는 아미노산 약 10개 이상의 "D" 영역을 또한 포함한다. 일반적으로, 문헌 [Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))] (모든 목적을 위해 전문이 참고로 포함됨)을 참조한다. 각각의 경쇄/중쇄 쌍의 가변 영역이 항체 결합 부위를 형성하여, 무손상 면역글로불린에는 2개의 결합 부위가 있다.

[0045] 천연 발생 면역글로불린 사슬의 가변 영역은 비교적 보존된 프레임워크 영역 (FR)이 3개의 초가변 영역 (상보성 결절 영역 또는 CDR로 또한 칭해짐)에 의해 연결되어 있는 동일한 일반 구조를 나타낸다. N-말단에서 C-말단으로, 경쇄 및 중쇄 양쪽 모두 도메인 FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 및 FR4를 포함한다. 각각의 도메인에 대한 아미노산의 할당은 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991]의 정의를 따른다. 면역글로불린 사슬 내의 아미노산에 대한 기타 번호매김 시스템에는 IMGT® (국제 면역유전학 정보 시스템 (international ImMunoGeneTics information system); 문헌 [Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 29:185-203; 2005]) 및 AHo (문헌 [Honegger and Pluckthun, J. Mol. Biol. 309(3):657-670; 2001])가 포함된다.

[0046] 항원 특이성이 다양한 면역글로불린을 함유하는 혈청 또는 혈장과 같은 공급원으로부터 항체를 수득할 수 있다.

이같은 항체가 친화성 정제에 적용되면, 항체가 특정한 항원 특이성에 대해 강화될 수 있다. 일반적으로, 이렇게 강화된 항체 제제는 약 10% 미만의 특정 항원에 대한 특이적 결합 활성이 있는 항체로 구성된다. 이러한 제제를 친화성 정제에 여러 번 적용시키면 항원에 대한 특이적 결합 활성이 있는 항체의 비율이 증가될 수 있다. 이러한 방식으로 제조된 항체는 종종 "단일특이적"으로 지칭된다. 단일특이적 항체 제제는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 또는 99.9%의 특정 항원에 대한 특이적 결합 활성이 있는 항체로 구성될 수 있다.

[0047] 달리 상술되지 않는 한, "항체"는 무손상 면역글로불린, 또는 특이적 결합에 대해 무손상 항체와 경쟁하는 이의 항원 결합 부분을 지칭한다. 항원 결합 부분은 재조합 DNA 기술에 의해 또는 무손상 항체의 효소에 의한 절단 또는 화학 절단에 의해 생산될 수 있다. 항원 결합 부분에는, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, 도메인 항체 (dAb), 및 상보성 결정 영역 (CDR) 단편, 가변 영역 단편, 단일쇄 항체 (scFv), 키메라 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 및 특이적 항원 결합을 폴리펩티드에 부여하는데 충분한 면역글로불린의 일부분을 적어도 함유하는 폴리펩티드가 특히 포함된다.

[0048] Fab 단편은 V_L, V_H, C_L 및 C_{H1} 도메인이 있는 1가 단편이고; F(ab')₂ 단편은 헌지 영역에서 디슬피드 다리에 의해 연결된 2개의 Fab 단편이 있는 2가 단편이며; Fd 단편에는 V_H 및 C_{H1} 도메인이 있고; Fv 단편에는 항체의 한쪽 팔의 V_L 및 V_H 도메인이 있고; dAb 단편에는 V_H 도메인, V_L 도메인, 또는 V_H 또는 V_L 도메인의 항원-결합 단편이 있다 (미국 특허 번호 6,846,634, 6,696,245, 미국 출원 공개 번호 05/0202512, 04/0202995, 04/0038291, 04/0009507, 03/0039958, 문헌 [Ward et al., Nature 341:544-546, 1989]).

[0049] 단일쇄 항체 (scFv)는 연속적인 단백질 사슬을 형성하도록 링커 (예를 들어, 아미노산 잔기들의 합성 서열)를 통해 V_L 및 V_H 영역이 연결된 항체이고, 이때 링커는 단백질 사슬이 사슬 자체 상에서 풀딩되어 1가 항원 결합 부위를 형성하도록 하기에 충분히 길다 (예를 들어, 문헌 [Bird et al., 1988, Science 242:423-26] 및 [Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83] 참조). 디아바디는 2개의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 2가 항체이고, 이때 각각의 폴리펩티드 사슬은 동일한 사슬 상의 2개의 도메인 사이에 쌍이 형성되도록 하기에는 너무 짧아서 각각의 도메인이 또 다른 폴리펩티드 사슬 상의 상보적인 도메인과 쌍을 이루도록 하는 링커에 의해 연결된 V_H 및 V_L 도메인을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48], 및 [Poljak et al., 1994, Structure 2:1121-23] 참조). 디아바디의 2개의 폴리펩티드 사슬이 동일하면, 이들이 쌍을 이루는 것으로부터 초래된 디아바디에는 2개의 동일한 항원 결합 부위가 있을 것이다. 상이한 서열의 폴리펩티드 사슬들이 2개의 상이한 항원 결합 부위가 있는 디아바디를 제조하는데 사용될 수 있다. 유사하게, 트리아바디 및 테트라바디는 각각 3개 및 4개의 폴리펩티드 사슬을 포함하고 각각 3개 및 4개의 항원 결합 부위 (동일하거나 상이할 수 있음)를 형성하는 항체이다.

[0050] [Kabat et al. 상기 문헌]; [Lefranc et al., 상기 문헌] 및/또는 [Honegger and Pluckthun, 상기 문헌]에 기술된 시스템을 사용하여, 소정의 항체의 상보성 결정 영역 (CDR) 및 프레임워크 영역 (FR)을 확인할 수 있다. 하나 이상의 CDR이 공유결합에 의해 또는 비-공유결합에 의해 문자 내로 혼입되어 문자를 항원 결합 단백질로 만들 수 있다. 항원 결합 단백질은 더 큰 폴리펩티드 사슬의 일부분으로서 CDR(들)을 혼입시킬 수 있거나, 또 다른 폴리펩티드 사슬에 CDR(들)을 공유결합으로 연결시킬 수 있거나, 또는 CDR(들)을 비-공유결합으로 혼입시킬 수 있다. CDR은 항원 결합 단백질이 특정 관심 항원에 특이적으로 결합하도록 한다.

[0051] 항원 결합 단백질에는 하나 이상의 결합 부위가 있을 수 있다. 1개를 초과하는 결합 부위가 있는 경우, 결합 부위는 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 예를 들어, 천연 발생 인간 면역글로불린에는 전형적으로 2개의 동일한 결합 부위가 있는 한편, "이중특이적" 또는 "2관능성" 항체에는 2개의 상이한 결합 부위가 있다.

[0052] 용어 "인간 항체"에는 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된 하나 이상의 가변 및 불변 영역이 있는 모든 항체가 포함된다. 한 실시양태에서, 모든 가변 및 불변 도메인이 인간 면역글로불린 서열로부터 유래된다 (완전히 인간형인 항체). 이러한 항체는 인간 중쇄 및/또는 경쇄-코딩 유전자로부터 유래되는 항체를 발현하도록 유전자 조작된 마우스를 관심 항원으로 면역화시키는 것을 통한 방식이 포함되는, 하기에 예가 제공되는 다양한 방식으로 제조될 수 있다.

[0053] 인간화 항체의 서열은 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 및/또는 부가에 의해 비-인간 종으로부터 유래된 항체의 서열과 상이하여, 인간 대상에게 투여되는 경우, 인간화 항체는 비-인간 종 항체와 비교하여 면역 응답을 유도할 가능성이 낮고/낮거나 덜 중증인 면역 응답을 유도한다. 한 실시양태에서, 비-인간 종 항체의 중쇄 및/또

는 경쇄의 프레임워크 및 불변 도메인 내의 특정 아미노산이 돌연변이되어 인간화 항체가 생산된다. 또 다른 실시양태에서, 인간 항체의 불변 도메인(들)이 비-인간 종의 가변 도메인(들)에 융합된다. 또 다른 실시양태에서, 비-인간 항체의 하나 이상의 CDR 서열 내의 하나 이상의 아미노산 잔기가 비-인간 항체가 인간 대상에게 투여되는 경우 비-인간 항체의 가능한 면역원성을 감소시키도록 변화되고, 이때 변화된 아미노산 잔기가 자신의 항원에 대한 항체의 면역특이적 결합에 결정적이지 않거나, 또는 아미노산 서열에 대해 이루어진 변화가 보존적 변화여서, 항원에 대한 인간화 항체의 결합이 항원에 대한 비-인간 항체의 결합보다 유의하게 악화되지 않는다. 인간화 항체를 제조하는 방법의 예를 미국 특허 번호 6,054,297, 5,886,152 및 5,877,293에서 확인할 수 있다.

[0054]

용어 "키메라 항체"는 한 항체로부터의 하나 이상의 영역 및 하나 이상의 다른 항체로부터의 하나 이상의 영역을 함유하는 항체를 지칭한다. 한 실시양태에서, CDR들 중 하나 이상이 인간 항-알파4베타7 항체로부터 유래된다. 또 다른 실시양태에서, 모든 CDR이 인간 항-알파4베타7 항체로부터 유래된다. 또 다른 실시양태에서, 1가지를 초과하는 인간 항-알파4베타7 항체로부터의 CDR들이 키메라 항체 내에서 혼합 및 매칭(matching)된다. 예를 들어, 키메라 항체는 제1 인간 항-알파4베타7 항체의 경쇄로부터의 CDR1, 제2 인간 항-알파4베타7 항체의 경쇄로부터의 CDR2 및 CDR3, 및 제3 인간 항-알파4베타7 항체로부터의 중쇄의 CDR들을 포함할 수 있다. 기타 조합이 가능하고, 본 발명의 실시양태 내에 포함된다.

[0055]

또한, 프레임워크 영역이 동일한 항-알파4베타7들 중 하나로부터, 하나 이상의 상이한 항체, 예컨대 인간 항체로부터, 또는 인간화 항체로부터 유래될 수 있다. 키메라 항체의 한 예에서, 중쇄 및/또는 경쇄의 일부분은 특정 종으로부터의 항체 또는 특정 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체와 동일하거나, 이와 상동성이거나 또는 이로부터 유래되는 한편, 사슬(들)의 나머지는 또 다른 종으로부터의 항체(들) 또는 또 다른 항체 클래스 또는 서브클래스에 속하는 항체(들)과 동일하거나, 이와 상동성이거나 또는 이로부터 유래된다. 원하는 생물학적 활성 (즉, 알파4베타7에 특이적으로 결합하는 능력)을 나타내는 이같은 항체들의 단편이 또한 포함된다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,816,567 및 문헌 [Morrison, 1985, Science 229:1202-07] 참조.

[0056]

"중화 항체" 또는 "억제 항체"는 본원에서 실시예에 기술된 것과 같은 분석법을 사용하여 과량의 항-알파4베타7 항체가 적어도 약 20%만큼 상호작용의 양을 감소시키는 경우의 알파4베타7과 MAdCAM-1의 상호작용을 억제하는 항체이다. 다양한 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 알파4베타7과 MAdCAM-1 알파4베타7의 상호작용을 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 및 99.9%만큼 감소시킨다.

[0057]

항체의 단편 또는 유사체는 본 명세서의 교시 내용을 따라, 그리고 당업계에 주지된 기술을 사용하여 당업자에 의해 쉽게 제조될 수 있다. 단편 또는 유사체의 아미노- 및 카르복시-말단은 기능성 도메인의 경계에 근접하게 발생한다. 구조적 및 기능성 도메인은 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열 데이터를 공공 또는 사유 서열 데이터베이스에 비교함으로써 확인될 수 있다. 전산화된 비교 방법이 구조 및/또는 기능이 공지된 다른 단백질에서 발생하는 서열 모티프 또는 예상 단백질 형상 도메인을 확인하는데 사용될 수 있다. 공지된 3차원 구조로 폴딩되는 단백질 서열을 확인하는 방법이 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Bowie et al., 1991, Science 253:164] 참조.

[0058]

"CDR-그래프트 항체"는 특정 종 또는 이소타입의 항체로부터 유래된 하나 이상의 CDR, 및 동일하거나 상이한 종 또는 이소타입의 또 다른 항체의 프레임워크를 포함하는 항체이다.

[0059]

"다중특이적 항체"는 하나 이상의 항원 상의 1가지를 초과하는 에피토프를 인식하는 항체이다. 이러한 항체 유형의 서브클래스는 동일하거나 상이한 항원 상의 2개의 별개의 에피토프를 인식하는 "이중특이적 항체"이다.

[0060]

1 나노몰 이하의 해리 상수로 항원과 결합한다면, 항원 결합 단백질이 항원 (예를 들어, 인간 알파4베타7)에 "특이적으로 결합"한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 제1 이종이량체성 인테그린에는 결합하지만 제1 인테그린과 하나의 사슬을 공유하는 다른 인테그린에는 결합하지 않는다면, 항원 결합 단백질이 "이종이량체 특이적"이다. 예를 들어, 알파4베타7 이종이량체 특이적인 항체는 알파4베타7에는 결합하지만 알파4베타1 또는 알파E베타7에는 결합하지 않을 것이다.

[0061]

인테그린은 이를 발현하는 세포(들)의 활성화 상태에 따라, 그리고 특정 금속 이온의 존재 또는 부재에 따라, 상이한 형상을 채택하는 것으로 공지되어 있다. "활성" 형상의 인테그린은 "불활성" 형상의 동일한 인테그린보다 높은 친화력으로 자신의 동족 리간드에 결합한다. 항원 결합 단백질은 활성 형상의 인테그린에만, 불활성 형상의 인테그린에만, 또는 양쪽 형상의 인테그린에 결합할 수 있다. 예를 들어, 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질은 2가 양이온 망간²⁺ (Mn^{2+})의 존재 또는 부재 하에 알파4베타7에 결합할 수 있고, 이는 항원 결합 단백질이 활성 알파4베타7 및 불활성 4베타7 양쪽 모두에 결합함을 가리킨다.

- [0062] "항원 결합 도메인", "항원 결합 영역", 또는 "항원 결합 부위"는 항원과 상호작용하고 항원에 대한 항원 결합 단백질의 특이성 및 친화력에 기여하는 아미노산 잔기 (또는 기타 모이어티)를 함유하는 항원 결합 단백질의 일부분이다. 자신의 항원에 특이적으로 결합하는 항체에 대해, 이는 항체의 CDR 도메인들 중 하나 이상의 적어도 일부를 포함할 것이다.
- [0063] "에피토프"는 항원 결합 단백질 (예를 들어, 항체)이 결합하는 분자의 일부분이다. 에피토프는 분자의 비-인접 부분들 (예를 들어, 폴리펩티드 내에서, 폴리펩티드의 1차 서열 내에서는 인접하지 않지만, 폴리펩티드의 3차 및 4차 구조의 맥락에서는 항원 결합 단백질이 결합하도록 서로 충분히 근접한 아미노산 잔기들)을 포함할 수 있다.
- [0064] 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 2개의 폴리펩티드 서열의 "백분율 동일성"은 GAP 컴퓨터 프로그램 (GCG 위스콘신 패키지(Wisconsin Package), 버전 10.3 (액셀리스(Accelrys) (캘리포니아주 샌디에고)의 일부분)을 사용하여 이의 디폴트 파라메터를 사용하여 서열들을 비교함으로서 결정된다.
- [0065] 용어 "폴리뉴클레오티드", "올리고뉴클레오티드" 및 "핵산"은 전반적으로 상호교환가능하게 사용되고, DNA 분자 (예를 들어, cDNA 또는 게놈 DNA), RNA 분자 (예를 들어, mRNA), 뉴클레오티드 유사체 (예를 들어, 펩티드 핵산 및 비-천연 발생 뉴클레오티드 유사체)를 사용하여 생성된 DNA 또는 RNA의 유사체, 및 이들의 하이브리드를 포함한다. 핵산 분자는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 핵산 분자는 본 발명의 항체, 또는 이의 단편, 유도체, 뮤테인 또는 변이체를 코딩하는 인접 오픈 리딩 프레임(open reading frame)을 포함한다.
- [0066] 2개의 단일-가닥 폴리뉴클레오티드는 갭의 도입 없이, 그리고 어느 한쪽 서열의 5' 또는 3' 말단에 쌍을 이루지 않은 뉴클레오티드가 없으면서, 하나의 폴리뉴클레오티드 내의 모든 뉴클레오티드가 다른 폴리뉴클레오티드 내의 자신의 상보적 뉴클레오티드의 맞은 편에 있도록 이들의 서열이 역평행 배향으로 정렬될 수 있다면 서로의 "상보물"이다. 2개의 폴리뉴클레오티드가 중등도로 염격한 조건 하에 서로 혼성화될 수 있다면 폴리뉴클레오티드는 또 다른 폴리뉴클레오티드에 대해 "상보적"이다. 따라서, 폴리뉴클레오티드는 또 다른 폴리뉴클레오티드의 상보물이 아니면서 이에 대해 상보적일 수 있다.
- [0067] "벡터"는 자신에게 연결된 또 다른 핵산을 세포 내로 도입하는데 사용될 수 있는 핵산이다. 벡터의 한 유형은 "플라스미드"이고, 이는 추가적인 핵산 절편이 내부로 결찰될 수 있는 선형 또는 원형 이중 가닥 DNA 분자를 지칭한다. 벡터의 또 다른 유형은 바이러스 벡터 (예를 들어, 복제 결손 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노-관련 바이러스)이고, 이때 바이러스 게놈 내로 추가적인 DNA 절편이 도입될 수 있다. 특정 벡터는 자신이 도입된 숙주 세포 내에서 자가 복제가 가능하다 (예를 들어, 박테리아 복제 기원을 포함하는 박테리아 벡터, 및 에피솜형 포유류 벡터). 기타 벡터 (예를 들어, 비-에피솜형 포유류 벡터)는 숙주 세포 내로의 도입 시 숙주 세포의 게놈 내로 통합됨으로써, 숙주 게놈과 함께 복제된다. "발현 벡터"는 선택된 폴리뉴클레오티드의 발현을 지시할 수 있는 벡터 유형이다.
- [0068] 조절 서열이 뉴클레오티드 서열의 발현 (예를 들어, 발현 수준, 시기 또는 장소)에 영향을 미친다면 뉴클레오티드 서열이 조절 서열에 "작동가능하게 연결"된다. "조절 서열"은 자신이 작동가능하게 연결된 핵산의 발현 (예를 들어, 발현 수준, 시기 또는 장소)에 영향을 미치는 핵산이다. 조절 서열은, 예를 들어, 조절되는 핵산에 직접적으로, 또는 하나 이상의 다른 분자 (예를 들어, 조절 서열 및/또는 핵산에 결합하는 폴리펩티드)의 작용을 통해 자신의 효과를 발휘할 수 있다. 조절 서열의 예로는 프로모터, 인핸서 및 기타 발현 제어 요소 (예를 들어, 폴리아데닐화 신호)가 포함된다. 조절 서열의 추가적인 예가, 예를 들어, 문헌 [Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA] 및 [Baron et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06]에 기술되어 있다.
- [0069] "숙주 세포"는 핵산, 예를 들어, 본 발명의 핵산을 발현시키는데 사용될 수 있는 세포이다. 숙주 세포는 원핵 생물, 예를 들어, 대장균일 수 있거나, 또는 진핵생물, 예를 들어, 단세포 진핵생물 (예를 들어, 효모 또는 기타 진균류), 식물 세포 (예를 들어, 담배 또는 토마토 식물 세포), 동물 세포 (예를 들어, 인간 세포, 원숭이 세포, 햄스터 세포, 래트 세포, 마우스 세포, 또는 곤충 세포) 또는 하이브리도마일 수 있다. 숙주 세포의 예로는 원숭이 신장 세포의 COS-7 세포주 (ATCC CRL 1651) (문헌 [Gluzman et al., 1981, Cell 23:175] 참조), L 세포, C127 세포, 3T3 세포 (ATCC CCL 163), 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 이의 유도체 예컨대 무혈청 배지에서 성장하는 베지(Veggie) CHO 및 관련 세포주 (문헌 [Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31] 참조) 또는 DHFR 결핍성인 CHO 계통 DX-B11 (문헌 [Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20] 참조), HeLa 세포, BHK (ATCC CRL 10) 세포주, 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주 CV1로부터 유래

된 CV1/EBNA 세포주 (ATCC CCL 70) (문헌 [McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821] 참조), 인간 배아 신장 세포 예컨대 293, 293 EBNA 또는 MSR 293, 인간 상피 A431 세포, 인간 Colo205 세포, 기타 형질전환된 영장류 세포주, 정상적인 이배수체 세포, 1차 조직의 시험관내 배양물로부터 유래된 세포 계통, 1차 체외이식편, HL-60, U937, HaK 또는 유카(Jurkat) 세포가 포함된다. 전형적으로, 숙주 세포는 폴리펩티드-코딩 핵산으로 형질전환 또는 형질감염될 수 있는 배양 세포이고, 그 후 상기 핵산이 숙주 세포 내에서 발현될 수 있다. "재조합 숙주 세포"라는 구절은 발현될 핵산으로 형질전환 또는 형질감염된 숙주 세포를 나타내도록 사용될 수 있다. 또한 숙주 세포는 핵산을 포함하지만, 조절 서열이 핵산과 작동가능하게 연결되도록 조절 서열이 숙주 세포 내로 도입되지 않는 한 이러한 핵산을 원하는 수준으로 발현하지 않는 세포일 수 있다. 용어 숙주 세포는 특정 대상 세포뿐만 아니라 이같은 세포의 자손 또는 잠재적인 자손을 또한 지칭하는 것으로 이해된다. 예를 들어, 돌연변이 또는 환경적인 영향으로 인해, 후속 세대에서 특정 변형이 일어날 수 있기 때문에, 이같은 자손은 실제로는 어버이 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에서 사용되는 이러한 용어의 범주 내에 여전히 포함된다.

항원 결합 단백질

[0070] 한 측면에서, 본 발명은 알파4베타7, 예를 들어, 인간 알파4베타7에 결합하는 항원 결합 단백질 (예를 들어, 항체, 항체 단편, 항체 유도체, 항체 뮤테인, 및 항체 변이체)를 제공한다.

[0071] 본 발명에 따른 항원 결합 단백질에는 알파4베타7의 생물학적 활성을 억제하는 항원 결합 단백질이 포함된다. 이같은 생물학적 활성의 예로는 알파4베타7이 MAdCAM-1에 결합하는 것, 및 알파4베타7을 발현하는 세포와 MAdCAM-1을 발현하는 세포 사이의 부착이 포함된다. 기타 생물학적 활성에는 생체 내에서 알파4베타7에 의해 매개되는 활성, 예컨대 운송 또는 귀소가 포함된다; 특히, 알파4베타7은 창자로 림프구를 운송하는 것에서 수반된다. 염증이 생긴 창자에서의 증가된 MAdCAM-1 발현은 알파4베타7 발현 림프구가 창자로 동원되는 것을 강화하고, 여기에서 비정상적인 림프구 활성화가 염증성 응답 및 조직 손상을 증대시킨다.

[0072] 상이한 항원 결합 단백질들이 알파4베타7의 상이한 도메인 또는 에피토프에 결합하거나 또는 상이한 작용 메커니즘에 의해 작용할 수 있다. 예로는 알파4베타7이 MAdCAM-1에 결합하는 능력을 방해하거나, 또는 세포 상호작용 예컨대 알파4베타7을 발현하는 세포와 MAdCAM-1을 발현하는 세포 사이의 부착을 억제하는 항원 결합 단백질이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 작용 부위는, 예를 들어, 세포내 (예를 들어, 세포내 신호전달 캐스케이드를 방해함으로써), 또는 세포외일 수 있다. 항원 결합 단백질은 본 발명에서 사용되기 위해 알파4베타7 유도 활성을 완전히 억제할 필요가 없다; 그보다는, 알파4베타7의 특정 활성을 감소시키는 항원 결합 단백질이 또한 사용이 고려된다. (특정 질환의 치료에서의 알파4베타7-결합 항원 결합 단백질에 대한 특정 작용 메커니즘에 관한 본원에서의 논의는 단지 예시적이고, 본원에서 제시된 방법은 이에 의해 제한되지 않는다.)

[0073] 본 발명의 범주 내의 항-알파4베타7 항체의 다른 유도체에는 항-알파4베타7 항체 또는 이의 단편과 다른 단백질 또는 폴리펩티드의 공유결합 또는 응집성 접합체, 예컨대 항-알파4베타7 항체 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 응합된 이종성 폴리펩티드를 포함하는 재조합 응합 단백질의 발현에 의한 것이 포함된다. 예를 들어, 접합된 펩티드는 이종성 신호 (또는 리더(leader)) 폴리펩티드, 예를 들어, 효모 알파-인자 리더, 또는 에피토프 태그와 같은 펩티드일 수 있다. 항원 결합 단백질-함유 응합 단백질은 항원 결합 단백질의 정체 또는 확인을 용이하게 하기 위해 부가된 펩티드 (예를 들어, 폴리-His)를 포함할 수 있다. 항원 결합 단백질은, 문헌 [Hopp et al., Bio/Technology 6:1204, 1988], 및 미국 특허 5,011,912에 기술된 바와 같이, FLAG® 펩티드 Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK) (서열 62)에 또한 연결될 수 있다. FLAG® 펩티드는 고도로 항원성이고, 특정 모노클로날 항체 (mAb)가 가역적으로 결합하는 에피토프를 제공하여, 발현된 재조합 단백질의 신속한 분석 및 용이한 정체를 가능하게 한다. FLAG® 펩티드가 소정의 폴리펩티드에 응합된 응합 단백질을 제조하는데 유용한 시약이 시판된다 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 미주리주 세인트 루이스).

[0074] 하나 이상의 항원 결합 단백질을 함유하는 올리고머가 알파4베타7 길항체로서 사용될 수 있다. 올리고머는 공유결합으로 연결된 또는 비-공유결합으로 연결된 이량체, 삼량체, 또는 이보다 차수가 높은 올리고머의 형태일 수 있다. 2개 이상의 항원 결합 단백질을 포함하는 올리고머가 사용이 고려되고, 이때 한 예는 동종이량체이다. 기타 올리고머에는 이종이량체, 동종삼량체, 이종삼량체, 동종사량체, 이종사량체 등이 포함된다.

[0075] 한 실시양태는 항원 결합 단백질에 응합된 펩티드 모이어티들 간의 공유결합 또는 비-공유결합 상호작용을 통해 연결된 다중 항원 결합 단백질을 포함하는 올리고머에 관한 것이다. 이같은 펩티드는 펩티드 링커 (스페이서(spacer)), 또는 올리고머화를 촉진하는 성질이 있는 펩티드일 수 있다. 류신 지퍼 및 항체로부터 유래된 특정 폴리펩티드는, 하기에 더욱 상세하게 기술되는 바와 같이, 이에 부착된 항원 결합 단백질의 올리고머화를 촉진

할 수 있는 웹티드들 중 하나이다.

[0077] 특정 실시양태에서, 올리고머는 2개 내지 4개의 항원 결합 단백질을 포함한다. 올리고머의 항원 결합 단백질은 임의의 형태, 예컨대 상기 기술된 형태들 중 임의의 것, 예를 들어, 변이체 또는 단편일 수 있다. 바람직하게는, 올리고머는 알파4베타7 결합 활성이 있는 항원 결합 단백질을 포함한다.

[0078] 한 실시양태에서, 면역글로불린으로부터 유래된 폴리웹티드를 사용하여 올리고머가 제조된다. 항체-유래 폴리웹티드의 다양한 부분 (Fc 도메인 포함)에 융합된 특정한 이종성 폴리웹티드를 포함하는 융합 단백질의 제조가, 예를 들어, 문헌 [Ashkenazi et al., 1991, PNAS USA 88:10535]; [Byrn et al., 1990, Nature 344:677]; 및 [Hollenbaugh et al., 1992 "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pp. 10.19.1 - 10.19.11]에 기술되어 있다.

[0079] 본 발명의 한 실시양태는 항-알파4베타7 항체의 알파4베타7 결합 단편을 항체의 Fc 영역에 융합시킴으로서 생성되는 융합 단백질 2개를 포함하는 이량체에 관한 것이다. 예를 들어, 융합 단백질을 코딩하는 유전자 융합체를 적합한 발현 벡터 내로 삽입하고, 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포에서 유전자 융합체를 발현시키고, 발현된 융합 단백질을 항체 분자와 유사하게 조립되도록 하여, Fc 모이어티들 간에 사슬간 디솔피드 결합이 형성되어 이량체가 산출됨으로써, 이량체가 제조될 수 있다.

[0080] 본원에서 사용된 용어 "Fc 폴리웹티드"는 항체의 Fc 영역으로부터 유래된 천연 및 뮤테인 형태의 폴리웹티드를 포함한다. 이량체화를 촉진하는 힌지 영역을 함유하는 이같은 폴리웹티드의 말단절단 형태가 또한 포함된다. Fc 모이어티를 포함하는 융합 단백질 (및 이로부터 형성된 올리고머)은 단백질 A 또는 단백질 G 칼럼 상에서의 친화성 크로마토그래피에 의한 용이한 정제의 장점을 제공한다.

[0081] PCT 출원 WO 93/10151 (본원에 참고로 포함됨)에 기술된 한 적절한 Fc 폴리웹티드는 인간 IgG1 항체의 Fc 영역의 N-말단 힌지 영역에서 천연 C-말단까지에 이르는 단일쇄 폴리웹티드이다. 또 다른 유용한 Fc 폴리웹티드는 미국 특허 5,457,035 및 문헌 [Baum et al., 1994, EMBO J. 13:3992-4001]에 기술된 Fc 뮤테인이다. 이러한 뮤테인의 아미노산 서열은 아미노산 19가 Leu에서 Ala로 변화되었고, 아미노산 20이 Leu에서 Glu로 변화되었으며, 아미노산 22가 Gly에서 Ala로 변화된 것을 제외하고는 WO 93/10151에서 제시된 천연 Fc 서열과 동일하다. 이러한 뮤테인은 Fc 수용체에 대한 감소된 친화력을 나타낸다.

[0082] 다른 실시양태에서, 항-알파4베타7 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 부분이 항체 중쇄 및/또는 경쇄의 가변 부분을 치환할 수 있다.

[0083] 별법적으로, 올리고머는 웹티드 링커 (스페이서 웹티드)가 있거나 없는, 다중 항원 결합 단백질을 포함하는 융합 단백질이다. 적절한 웹티드 링커에는 미국 특허 4,751,180 및 4,935,233에 기술된 것들이 있다.

[0084] 올리고머성 항원 결합 단백질을 제조하는 또 다른 방법은 류신 지퍼의 사용을 수반한다. 류신 지퍼 도메인은 이러한 도메인이 발견되는 단백질의 올리고머화를 촉진하는 웹티드이다. 류신 지퍼는 여러 DNA-결합 단백질에서 최초로 확인되었고 (문헌 [Landschulz et al., 1988, Science 240:1759]), 그 후 다양한 상이한 단백질에서 발견되었다. 공지된 류신 지퍼에는 이량체화 또는 삼량체화하는 천연 발생 웹티드 및 이의 유도체가 있다. 가용성 올리고머성 단백질을 제조하는데 적절한 류신 지퍼 도메인의 예가 PCT 출원 WO 94/10308에 기술되어 있고, 폐 계면활성제 단백질 D (SPD)로부터 유래된 류신 지퍼가 문헌 [Hoppe et al., 1994, FEBS Letters 344:191] (참고로 본원에 포함됨)에 기술되어 있다. 자신에게 융합된 이종성 단백질의 안정적인 삼량체화를 허용하는 변형된 류신 지퍼의 용도가 문헌 [Fanslow et al., 1994, Semin. Immunol. 6:267-78]에 기술되어 있다. 한 접근법에서, 류신 지퍼 웹티드에 융합된 항-알파4베타7 항체 단편 또는 유도체를 포함하는 재조합 융합 단백질이 적절한 숙주 세포에서 발현되고, 형성된 가용성 올리고머성 항-알파4베타7 항체 단편 또는 유도체가 배양 상등액으로부터 회수된다.

[0085] 한 측면에서, 본 발명은 알파4베타7이 MAdCAM-1에 결합하는 것을 방해하는 항원 결합 단백질을 제공한다. 이같은 항원 결합 단백질은 알파4베타7, 또는 이의 단편, 변이체 또는 유도체에 대해 제조될 수 있고, 알파4베타7이 MAdCAM-1에 결합하는 것을 방해하는 능력에 대해 통상적인 분석법으로 스크리닝될 수 있다. 적절한 분석법의 예는 MAdCAM-1 (즉, 가용성 MAdCAM-1)이 알파4베타7을 발현하는 세포에 결합하는 것을 억제하는 능력에 대해 항원 결합 단백질을 테스트하거나, 또는 MAdCAM-1과 알파4베타7의 상호작용 (즉, 알파4베타7을 발현하는 세포가 MAdCAM-1, 또는 MAdCAM-1-발현 세포에 부착하는 것)으로부터 초래되는 생물학적 또는 세포성 응답을 감소시키는 능력에 대해 항원 결합 단백질을 테스트하는 분석법이다. 항원 결합 단백질을 테스트하는 추가적인 분석법에는 알파4베타7 폴리웹티드에 대한 항원 결합 단백질의 결합을 알파4베타7 폴리웹티드에 대한 공지된 항원 결합 단

백질의 결합과 정성적으로 또는 정량적으로 비교하는 분석법이 포함되고, 이의 여러 예가 본원에서 개시된다.

[0086] 또 다른 측면에서, 본 발명은 종 선택성을 나타내는 항원 결합 단백질을 제공한다. 한 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 하나 이상의 포유류 알파4베타7, 예를 들어, 인간 알파4베타7 및 마우스, 래트, 기니피그, 햄스터, 저빌(gerbil), 고양이, 토끼, 개, 염소, 양, 소, 말, 낙타, 및 비-인간 영장류 알파4베타7 중 하나 이상에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 하나 이상의 영장류 알파4베타7, 예를 들어, 인간 알파4베타7 및 사이노몰구스, 명주원숭이, 붉은털원숭이, 타마린 및 침팬지 알파4베타7 중 하나 이상에 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 인간, 사이노몰구스, 명주원숭이, 붉은털원숭이, 타마린 또는 침팬지 알파4베타7에 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 마우스, 래트, 기니피그, 햄스터, 저빌, 고양이, 토끼, 개, 염소, 양, 소, 말, 낙타 및 비-인간 영장류 알파4베타7 중 하나 이상에 결합하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 명주원숭이와 같은 신세계 원숭이 종에 결합하지 않는다.

[0087] 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 알파4베타7 이외의 어떠한 천연 발생 단백질에 대해서도 특이적 결합을 나타내지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 포유류 알파4베타7 이외의 어떠한 천연 발생 단백질에 대해서도 특이적 결합을 나타내지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 영장류 알파4베타7 이외의 어떠한 천연 발생 단백질에 대해서도 특이적 결합을 나타내지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 인간 알파4베타7 이외의 어떠한 천연 발생 단백질에 대해서도 특이적 결합을 나타내지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 하나 이상의 비-인간 영장류, 예를 들어, 사이노몰구스 원숭이로부터의 알파4베타7, 및 인간 알파4베타7에 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 비-인간 영장류, 사이노몰구스 원숭이, 및 인간 알파4베타7에 유사한 결합 친화력으로 특이적으로 결합한다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 비-인간 영장류, 사이노몰구스 원숭이, 및 인간 알파4베타7의 활성을 차단한다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 본원에 기술된 분석법에서 비-인간 영장류, 사이노몰구스 원숭이, 및 인간 알파4베타7에 대한 IC₅₀ 또는 EC₅₀이 유사하다.

[0088] 당업계에 주지된 방법을 사용하여, 그리고 명세서의 교시 내용을 따라, 알파4베타7에 대한 항원 결합 단백질의 선택성을 결정할 수 있다. 예를 들어, 웨스턴 블로트(Western blot), FACS, ELISA 또는 RIA를 사용하여 선택성을 결정할 수 있다.

[0089] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기의 특성을 중 하나 이상을 지니는 알파4베타7 결합 항원 결합 단백질 (예를 들어, 항-알파4베타7 항체)을 제공한다: 인간 및 비-인간 영장류 알파4베타7 양쪽 모두에 결합함, MAdCAM-1이 알파4베타7에 결합하는 것을 억제함, 알파4베타7을 발현하는 세포가 MAdCAM-1에 부착하는 것을 억제함, 알파4베타7을 발현하는 세포가 MAdCAM-1을 발현하는 세포에 부착하는 것을 억제함, 알파4베타7을 발현하는 세포가 MAdCAM-1을 발현하는 세포를 포함하는 조직으로 운송되는 것을 억제함, 활성 및 불활성 형태의 알파4베타7 양쪽 모두에 결합함, 세포-표면 발현 알파4베타7의 하향 조절을 상대적으로 거의 야기하지 않음.

[0090] 통상적인 기술에 의해 본 발명의 항원 결합 단백질의 항원-결합 단편이 생산될 수 있다. 이같은 단편의 예로는 Fab 및 F(ab')₂ 단편이 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다. 유전자 조작 기술에 의해 생산된 항체 단편 및 유도체가 또한 고려된다.

[0091] 추가적인 실시양태에는 키메라 항체, 예를 들어, 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 모노클로날 항체의 인간화 버전이 포함된다. 이같은 인간화 항체는 공지된 기술에 의해 제조될 수 있고, 항체가 인간에게 투여되는 경우 감소된 면역원성의 장점을 제공한다. 한 실시양태에서, 인간화 모노클로날 항체는 뮤린 항체의 가변 도메인 (또는 이의 항원 결합 부위 전체 또는 일부분) 및 인간 항체로부터 유래된 불변 도메인을 포함한다. 별법적으로, 인간화 항체 단편은 뮤린 모노클로날 항체의 항원 결합 부위 및 인간 항체로부터 유래된 가변 도메인 단편 (항원-결합 부위가 없음)을 포함할 수 있다. 키메라 항체 및 추가로 조작된 모노클로날 항체의 생산을 위한 절차에는 문헌 [Riechmann et al., 1988, Nature 332:323], [Liu et al., 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:3439], [Larick et al., 1989, Bio/Technology 7:934], 및 [Winter et al., 1993, TIPS 14:139]에 기술된 것들이 포함된다. 한 실시양태에서, 키메라 항체는 CDR-그래프트 항체이다. 항체를 인간화시키기 위한 기술이, 예를 들어, 미국 특히 출원 번호 10/194,975 (2003년 2월 27일 공개), 미국 특허 번호 5,869,619, 5,225,539, 5,821,337, 5,859,205, 문헌 [Padlan et al., 1995, FASEB J. 9:133-39], 및 [Tamura et al., 2000, J. Immunol. 164:1432-41]에 논의되어 있다.

[0092] 비-인간 동물에서 인간 항체 또는 부분적으로 인간형인 항체를 생성시키기 위해 절차들이 개발되었다. 예를 들

어, 하나 이상의 내인성 면역글로불린 유전자가 다양한 방법에 의해 불활성화된 마우스가 제조되었다. 불활성화된 마우스 유전자를 대체하도록 인간 면역글로불린 유전자가 마우스 내로 도입되었다. 이러한 동물에서 생산된 항체에는 동물 내로 도입된 인간의 유전자 물질에 의해 코딩되는 인간 면역글로불린 폴리펩티드 사슬이 혼입된다. 한 실시양태에서, 비-인간 동물, 예컨대 트랜스제닉(transgenic) 마우스가 알파4베타7 폴리펩티드로 면역화되어, 알파4베타7 폴리펩티드에 대해 지시된 항체가 이러한 동물에서 생성된다. 적절한 면역원의 한 예는 가용성 인간 알파4베타7, 예컨대 알파4베타7의 일부분을 포함하는 폴리펩티드, 또는 기타 면역원성 단편 알파4베타7이다. 적절한 면역원의 또 다른 예는 높은 수준의 알파4베타7을 발현하는 세포, 또는 이로부터의 세포막제제이다.

[0093] 인간 항체 또는 부분적으로 인간형인 항체의 생산을 위한 트랜스제닉 동물의 생산 및 용도를 위한 기술의 예가 미국 특허 5,814,318, 5,569,825, 및 5,545,806, 문헌 [Davis et al., 2003, Production of human antibodies from transgenic mice, Lo, ed. Antibody Engineering: Methods and Protocols, Humana Press, NJ:191-200], [Kellermann et al., 2002, Curr Opin Biotechnol. 13:593-97], [Russel et al., 2000, Infect Immun. 68:1820-26], [Gallo et al., 2000, Eur J Immun. 30:534-40], [Davis et al., 1999, Cancer Metastasis Rev. 18:421-25], [Green, 1999, J Immunol Methods. 231:11-23], [Jakobovits, 1998, Adv Drug Deliv Rev 31:33-42], [Green et al., 1998, J Exp Med. 188:483-95], [Jakobovits A, 1998, Exp. Opin. Invest. Drugs. 7:607-14], [Tsuda et al., 1997, Genomics 42:413-21], [Mendez et al., 1997, Nat Genet. 15:146-56], [Jakobovits, 1994, Curr Biol. 4:761-63], [Arbones et al., 1994, Immunity. 1:247-60], [Green et al., 1994, Nat Genet. 7:13-21], [Jakobovits et al., 1993, Nature 362:255-58], [Jakobovits et al., 1993, Proc Natl Acad Sci U S A. 90:2551-55], [Chen, J. et al., 1993, Int Immunol 5: 647-656], [Choi et al., 1993, Nature Genetics 4: 117-23], [Fishwild et al., 1996, Nat Biotechnol 14: 845-51], [Harding et al., 1995, Ann NY Acad Sci], [Lonberg et al., 1994, Nature 368: 856-59], [Lonberg, 1994, Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies, Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101], [Lonberg et al., 1995, Int Rev Immunol 13: 65-93], [Neuberger, 1996, Nat Biotechnol 14: 826], [Taylor et al., 1992, Nucleic Acids Research 20: 6287-95], [Taylor et al., 1994, Int Immunol 6: 579-91], [Tomizuka et al., 1997, Nat Gen 16: 133-43], [Tomizuka et al., 2000, Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 722-27], [Tuailon et al., 1993, Proc Natl Acad Sci U S A. 90: 3720-24], 및 [Tuailon et al., 1994, J Immunol 152: 2912-20]에 기술되어 있다. 이러한 예 및 기타 예가 미국 특허 출원 공보 2007-0098715 (2007년 5월 3일 공개)에 또한 논의되어 있다.

[0094] 또 다른 측면에서, 본 발명은 알파4베타7에 결합하는 모노클로날 항체를 제공한다. 당업계에 공지된 임의의 기술을 사용하여, 예를 들어, 면역화 일정의 완료 후 트랜스제닉 동물로부터 수확된 지라 세포를 불멸화시킴으로써, 모노클로날 항체를 생산할 수 있다. 당업계에 공지된 임의의 기술을 사용하여, 예를 들어, 골수종 세포와 융합시켜 하이브리도마를 생산함으로써, 지라 세포를 불멸화시킬 수 있다. 하이브리도마-생산 융합 절차에서 사용하기 위한 골수종 세포는 바람직하게는 항체-생산성이 아니고, 융합 효율이 높으며, 원하는 융합된 세포(하이브리도마)만 성장하도록 지지하는 선별 배지에서 골수종 세포가 성장할 수 없게 하는 효소 결핍이 있다. 마우스 융합체에서 사용하기 위한 적절한 세포주의 예로는 Sp-20, P3-X63/Ag8, P3-X63-Ag8.653, NS1/1.Ag 41, Sp210-Ag14, FO, NS0/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7 및 S194/5XX0 Bu1이 포함된다; 래트 융합체에서 사용되는 세포주의 예로는 R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F 및 4B210이 포함된다. 세포 융합체에서 유용한 기타 세포주는 U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2 및 UC729-6이다.

[0095] 한 실시양태에서, 동물 (예를 들어, 인간 면역글로불린 서열이 있는 트랜스제닉 동물)을 알파4베타7 면역원으로 면역화시키고, 면역화된 동물로부터 지라 세포를 수확하고, 수확된 지라 세포를 골수종 세포에 융합시킴으로써 하이브리도마 세포를 생성시키고, 하이브리도마 세포로부터 하이브리도마 세포주를 확립하고, 알파4베타7 폴리펩티드에 결합하는 항체를 생산하는 하이브리도마 세포주를 확인함으로써, 하이브리도마 세포주가 생산된다. 이같은 하이브리도마 세포주, 및 이에 의해 생산된 항-알파4베타7 모노클로날 항체가 본 발명에 포함된다.

[0096] 하이브리도마 세포주에 의해 분비되는 모노클로날 항체를 당업계에 공지된 임의의 기술을 사용하여 정제할 수 있다. 하이브리도마 또는 mAb를 추가로 스크리닝하여, 특정 성질, 예컨대 알파4베타7 유도 활성을 차단하는 능력이 있는 mAb를 확인할 수 있다. 이같은 스크린의 예가 하기 실시예에서 제공된다.

[0097] 유전 면역화로 지칭되는 프로세스를 사용하여 모노클로날 항체가 또한 생산될 수 있다. 예를 들어, 관심 항원을 코딩하는 핵산이 바이러스 벡터 (예컨대 아데노바이러스 벡터) 내로 혼입될 수 있다. 그 후, 생성된 벡터가 적절한 숙주 동물 (예를 들어, 비-비만 당뇨병 또는 NOD 마우스)에서 관심 항원에 대한 면역 응답을 일으키는데

사용된다. 이러한 기술이 문헌 [Ritter et al., *Biodrugs* 16(1): 3-10 (2002)]에 실질적으로 기술되어 있고, 이의 개시내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0098] 항체 결합 부위의 중심부 내의 상보성 결정 영역 (CDR)의 분자적 진화가, 문헌 [Schier et al., 1996, *J. Mol. Biol.* 263:551]에 기술된 바와 같이, 친화력이 증가된 항체, 예를 들어, c-erbB-2에 대한 친화력이 증가된 항체를 단리하는데 또한 사용되었다. 따라서, 같은 기술이 알파4베타7에 대한 항체를 제조하는데 유용하다.

[0099] 알파4베타7에 대해 지시된 항원 결합 단백질은, 예를 들어, 시험관 내에서 또는 생체 내에서 알파4베타7 폴리펩티드 또는 알파4베타7을 발현하는 세포의 존재를 검출하는 분석법에서 사용될 수 있다. 항원 결합 단백질은 면역친화성 크로마토그래피에 의해 알파4베타7 단백질을 정제하는데 또한 사용될 수 있다. MAdCAM-1과 알파4베타7의 상호작용을 추가적으로 차단할 수 있는 항원 결합 단백질은 같은 상호작용으로부터 초래되는 생물학적 활성을 억제하는데 사용될 수 있다. 차단성 항원 결합 단백질은 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 알파4베타7 길항체로서 기능하는 같은 항원 결합 단백질은 염증성 상태를 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 알파4베타7-유도 상태를 치료하는데 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 트랜스제닉 마우스의 면역화를 수반하는 절차에 의해 생성된 인간 항-알파4베타7 모노클로날 항체가 같은 상태를 치료하는데 사용된다.

[0100] 항원 결합 단백질은 시험관내 절차에서 사용되거나 또는 생체 내에서 투여되어 알파4베타7-유도 생물학적 활성을 억제할 수 있다. 알파4베타7 및 이와 MAdCAM-1의 상호작용에 의해 (직접적으로 또는 간접적으로) 야기 또는 악화되는 장애 (본원에서 이의 예가 제공됨)가 따라서 치료될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 알파4베타7-유도 생물학적 활성을 감소시키는데 효과적인 양으로 알파4베타7 차단 항원 결합 단백질을 이를 필요로 하는 포유동물에게 생체내 투여하는 것을 포함하는 치료 방법을 제공한다.

[0101] 본 발명의 항원 결합 단백질은 알파4베타7의 생물학적 활성을 억제하는 부분적으로 인간형인 모노클로날 항체 및 완전히 인간형인 모노클로날 항체를 포함한다. 한 실시양태는 인간 알파4베타7과 MAdCAM-1의 상호작용을 적어도 부분적으로 차단하는 인간 모노클로날 항체에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 알파4베타7 면역원으로 트랜스제닉 마우스를 면역화시킴으로써 이러한 항체가 생성된다. 또 다른 실시양태에서, 면역원은 인간 알파4베타7 폴리펩티드 (예를 들어, 알파4베타7을 발현하도록 형질전환 또는 형질감염된 세포, 또는 알파4베타7을 천연적으로 발현하는 세포)이다. 같은 면역화된 마우스로부터 유래되고, 알파4베타7에 결합하는 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마 세포주가 본원에서 또한 제공된다.

[0102] 인간 항체, 부분적으로 인간형인 항체, 또는 인간화 항체가 다수의 용도, 특히 항체를 인간 대상에게 투여하는 것을 수반하는 용도에 적절할 것이지만, 기타 유형의 항원 결합 단백질이 특정 용도에 적절할 것이다. 본 발명의 비-인간 항체가, 예를 들어, 임의의 항체-생산 동물, 예컨대 마우스, 래트, 토끼, 염소, 당나귀, 또는 비-인간 영장류 (예컨대 원숭이 (예를 들어, 사이노몰구스 또는 붉은털 원숭이) 또는 유인원 (예를 들어, 침팬지))로부터 유래될 수 있다. 본 발명의 비-인간 항체는, 예를 들어, 시험관내 및 세포-배양 기반 용도, 또는 본 발명의 항체에 대한 면역 응답이 일어나지 않거나, 무의미하거나, 방지될 수 있거나, 중요하지 않거나 또는 요망되는 임의의 기타 용도에서 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 비-인간 항체는 비-인간 대상에게 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 비-인간 항체는 비-인간 대상에서 면역 응답을 유발하지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 비-인간 항체는 비-인간 대상과 동일한 종으로부터의 항체이고, 예를 들어, 본 발명의 마우스 항체가 마우스에게 투여된다. 특정 종으로부터의 항체는, 예를 들어, 이러한 종의 동물을 원하는 면역원 (예를 들어, 알파4베타7을 발현하는 세포, 또는 가용성 알파4베타7 폴리펩티드)으로 면역화시키는 것 또는 이러한 종의 항체를 생성시키기 위한 인공 시스템 (예를 들어, 특정 종의 항체를 생성시키기 위한 박테리아 또는 파지 디스플레이-기반 시스템)을 사용하는 것에 의해, 또는, 예를 들어, 항체의 불변 영역을 또 다른 종으로부터의 불변 영역으로 교체함으로써 또는 항체의 하나 이상의 아미노산 잔기를 이러한 항체가 또 다른 종으로부터의 항체의 서열을 더욱 밀접하게 닮도록 교체함으로써, 한 종으로부터의 항체를 또 다른 종으로부터의 항체로 전환시키는 것에 의해 제조될 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 2가지 이상의 상이한 종으로부터의 항체들로부터 유래된 아미노산 서열들을 포함하는 키메라 항체이다.

[0103] 다수의 통상적인 기술 중 임의의 것에 의해 항원 결합 단백질이 제조될 수 있다. 예를 들어, 당업계에 공지된 임의의 기술을 사용하여, 항원 결합 단백질이 이를 천연적으로 발현하는 세포로부터 정제될 수 있거나 (예를 들어, 항체가 이를 생산하는 하이브리도마로부터 정제될 수 있다), 또는 재조합 발현 시스템에서 생산될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, New York (1980)]; 및 [Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988)] 참조.

- [0104] 당업계에 공지된 임의의 발현 시스템이 본 발명의 재조합 폴리펩티드를 제조하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 숙주 세포가 원하는 폴리펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 발현 벡터로 형질전환된다. 사용될 수 있는 숙주 세포에는 원핵생물, 효모 또는 고급 진핵생물 세포가 있다. 원핵생물에는 그람 음성 또는 그람 양성 생물, 예를 들어 대장균 또는 바실루스(bacillus)가 포함된다. 고급 진핵생물 세포에는 곤충 세포, 및 포유류 기원의 확립 세포주가 포함된다. 적절한 포유류 숙주 세포주의 예로는 원숭이 신장 세포의 COS-7 세포주 (ATCC CRL 1651) (문헌 [Gluzman et al., 1981, Cell 23:175]), L 세포, 293 세포, C127 세포, 3T3 세포 (ATCC CCL 163), 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포, HeLa 세포, BHK (ATCC CRL 10) 세포주, 및 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주 CV1로부터 유래된 CV1/EBNA 세포주 (ATCC CCL 70) (문헌 [McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 282 1]에 기술됨)가 포함된다. 박테리아, 진균류, 효모 및 포유류 세포 숙주와 함께 사용하기 위한 적합한 클로닝 및 발현 벡터가 문헌 [Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985]에 기술되어 있다.
- [0105] 형질전환된 세포를 폴리펩티드의 발현을 촉진하는 조건 하에 배양할 수 있고, 통상적인 단백질 정제 절차에 의해 폴리펩티드를 회수할 수 있다. 한 이같은 정제 절차는, 예를 들어, 알파4베타7 전체 또는 일부분 (예를 들어, 세포외 도메인)이 결합되어 있는 매트릭스 상에서, 친화성 크로마토그래피를 사용하는 것을 포함한다. 본 원에서 사용이 고려되는 폴리펩티드에는 내인성 오염 물질이 실질적으로 없는, 실질적으로 균질한 재조합 포유류 항-알파4베타7 항체 폴리펩티드가 포함된다.
- [0106] 폴리펩티드의 아미노산 서열이 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 확인될 수 있고, 서열 목록에서 본원에 개시된 서열과 동일할 수 있거나 또는 프로세싱의 결과로 하나 이상의 아미노산 잔기에서 이러한 서열과 상이할 수 있다. 예를 들어, 실질적으로 균질한 폴리펩티드 전체 또는 이의 일부분 상에서, 단백질분해성 프로세싱 또는 배양 동안 발생하는 기타 프로세싱, 예를 들어, C-말단 Lys 잔기의 프로세싱에 의해, 경쇄 또는 중쇄 (또는 관련된 단일쇄 분자)로부터의 C-말단 아미노산이 제거될 수 있다. 별법적으로, 1개를 초과하는 C-말단 아미노산 잔기, 예를 들어 2개의 C-말단 아미노산, 또는 3개, 4개 또는 5개의 C-말단 아미노산가 제거된다. 예를 들어, 개시된 바와 같은 항체의 중쇄의 아미드화 프롤린으로 C-말단이 말단절단될 수 있다. 유사하게, N-말단 아미노산이 없을 수 있고, 예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 N-말단 아미노산이 없을 수 있다.
- [0107] 별법적으로, 또는 추가적으로, 아미노산 잔기에 번역후 변형이 진행될 수 있고, 예를 들어, 글루타민 (특히, N-말단의 글루타민)이 고리화되거나 피로글루탐산으로 전환될 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다; 추가적으로 또는 별법적으로, 아미노산에 탈아미드화, 이성화, 당화 및/또는 산화가 진행될 수 있다. 당업계에 주지된 부위에서, 본 발명의 폴리펩티드에 글리코실화, 예를 들어 N-연결 또는 O-연결 글리코실화가 포함되는 추가적인 번역후 변형이 진행될 수 있다. 앞서 기술된 바와 같이, 이같은 변경을 방지하거나 최소화하도록, 또는 이같은 프로세싱이 이로운 경우에는 이를 용이하게 하도록, 폴리펩티드의 아미노산 서열에서 변화가 이루어질 수 있다.
- [0108] 실질적으로 균질한 폴리펩티드들의 제제는 약 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 또는 99%의 특정 형태 (또는 형태들)의 프로세싱이 진행된 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 실질적으로 균질한 폴리펩티드들의 제제는 특정 형태(들)의 프로세싱된 폴리펩티드를 약간 (50% 이하), 대부분 (50% 초과, 90% 미만) 또는 실질적으로 전적으로 (90% 초과) 포함할 수 있다. 또한, 이같은 제제는 1가지를 초과하는 유형의 프로세싱-관련 변형의 수준이 다양한 폴리펩티드들을 포함할 수 있고, 예를 들어, 폴리펩티드에서 약간의, 대부분의 또는 실질적으로 모든 C-말단 라이신이 제거될 수 있고 (예를 들어, 서열 72에서의 C-말단 라이신), 약간의, 대부분의 또는 실질적으로 모든 N-말단 아미노산이 피로글루탐산으로 전환될 수 있다 (예를 들어, 표 1 및/또는 2 또는 컨센서스 서열에서 제시된 임의의 폴리펩티드).
- [0109] 다수의 공지된 기술 중 임의의 것에 의해, 항원 결합 단백질이 제조될 수 있고 원하는 성질에 대해 스크리닝될 수 있다. 이러한 기술들 중 일부는 관심 항원 단백질 (예를 들어, 항-알파4베타7 항체)의 폴리펩티드 사슬 (또는 이의 일부분)을 코딩하는 핵산을 단리하는 단계, 및 이러한 핵산을 재조합 DNA 기술을 통해 조작하는 단계를 수반한다. 핵산이 또 다른 관심 핵산에 융합될 수 있거나, 또는 예를 들어 하나 이상의 아미노산 잔기를 부가하거나, 결실시키거나 또는 치환하도록 변경될 수 있다 (예를 들어, 돌연변이유발 또는 기타 통상적인 기술에 의해).
- [0110] 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항-알파4베타7 항체의 항원-결합 단편을 제공한다. 이같은 단편은 전적으로 항체-유래 서열로 구성될 수 있거나, 또는 추가적인 서열을 포함할 수 있다. 항원-결합 단편의 예로는 Fab, F(ab')₂, 단일쇄 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 및 도메인 항체가 포함된다. 기타 예가 문헌 [Lunde et al., 2002, Biochem. Soc. Trans. 30:500-06]에서 제공된다.

[0111]

아미노산 다리 (짧은 펩티드 링커)를 통해 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 (F_v 영역) 단편을 연결시켜 단일 폴리펩티드 사슬을 초래함으로써, 단일쇄 항체가 형성될 수 있다. 이같은 단일쇄 F_v ($scFv$)는 펩티드 링커를 코딩하는 DNA를 2개의 가변 도메인 폴리펩티드 (V_L 및 V_H)를 코딩하는 DNA 사이에 융합시킴으로써 제조되었다. 2개의 가변 도메인 사이의 가요성 링커의 길이에 따라, 생성된 폴리펩티드는 자체 상에서 다시 폴딩되어 항원-결합 단량체를 형성할 수 있거나, 또는 다량체 (예를 들어, 이량체, 삼량체, 또는 사량체)를 형성할 수 있다 (문헌 [Kortt et al., 1997, Prot. Eng. 10:423]; [Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108]). 상이한 V_L 및 V_H -포함 폴리펩티드들을 조합함으로써, 상이한 에피토프에 결합하는 다량체성 $scFv$ 를 형성시킬 수 있다 (문헌 [Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40]). 단일쇄 항체의 생산을 위해 개발된 기술에는 미국 특허 번호 4,946,778; 문헌 [Bird, 1988, Science 242:423]; [Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879]; [Ward et al., 1989, Nature 334:544], [de Graaf et al., 2002, Methods Mol Biol. 178:379-87]에 기술된 것들이 포함된다.

[0112]

본 발명의 항원 결합 단백질 (예를 들어, 항체, 항체 단편, 및 항체 유도체)은 당업계에 공지된 임의의 불변 영역을 포함할 수 있다. 경쇄 불변 영역은, 예를 들어, 카파- 또는 람다-유형 경쇄 불변 영역, 예를 들어, 인간 카파- 또는 람다-유형 경쇄 불변 영역일 수 있다. 중쇄 불변 영역은, 예를 들어, 알파-, 멜타-, 엡실론-, 감마-, 또는 뮤-유형 중쇄 불변 영역, 예를 들어, 인간 알파-, 멜타-, 엡실론-, 감마-, 또는 뮤-유형 중쇄 불변 영역일 수 있다. 한 실시양태에서, 경쇄 또는 중쇄 불변 영역은 천연 발생 불변 영역의 단편, 유도체, 변이체 또는 뮤테인이다.

[0113]

관심 항체로부터 상이한 서브클래스 또는 이소타입의 항체를 유도하는 것, 즉 서브클래스 스위칭(switching)을 위한 기술들이 공지되어 있다. 따라서, 예를 들어, IgG 항체가 IgM 항체로부터 유도될 수 있고, 반대로 가능하다. 이같은 기술은 소정의 항체 (어버이 항체)의 항원-결합 성질을 보유하지만 어버이 항체와 상이한 항체 이소타입 또는 서브클래스와 관련된 생물학적 성질을 또한 나타내는 새로운 항체가 제조되도록 한다. 재조합 DNA 기술이 또한 사용될 수 있다. 특정 항체 폴리펩티드를 코딩하는 클로닝된 DNA, 예를 들어, 원하는 이소타입의 항체의 불변 도메인을 코딩하는 DNA가 이같은 절차에서 사용될 수 있다. 문헌 [Lantto et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:303-16]을 또한 참조한다. 또한, IgG4를 원하는 경우, 문헌 [Bloom et al., 1997, Protein Science 6:407] (본원에 참고로 포함됨)에 기술된 바와 같이 헌지 영역 내에 점 돌연변이 (CPSCP → CPPCP)를 도입하여, IgG4 항체에서의 비균질성을 초래할 수 있는 중쇄내 디스플레이 결합을 형성하는 경향을 경감시키는 것이 또한 바람직할 수 있다.

[0114]

또한, 성질이 상이한 (즉, 자신이 결합하는 항원에 대한 친화력이 다양한) 항원 결합 단백질을 유도하기 위한 기술이 또한 공지되어 있다. 사슬 셔플링(shuffling)으로 지칭되는 한 이같은 기술은 면역글로불린 가변 도메인 유전자 레퍼토리를 필라멘트형 박테리오파지의 표면 상에 디스플레이하는 것 (종종 파지 디스플레이로 지칭됨)을 수반한다. 문헌 [Marks et al., 1992, BioTechnology, 10:779]에 기술된 바와 같이, 힙텐 2-페닐옥사졸-5-온에 대한 고-친화력 항체를 제조하는데 사슬 셔플링이 사용되었다.

[0115]

또 다른 실시양태에서, 본 발명은 알파4베타7로부터의 해리 상수가 낮은 항원 결합 단백질을 제공한다. 한 실시양태에서, 항원 결합 단백질의 K_d 는 100 pM 이하이다. 또 다른 실시양태에서, K_d 는 10 pM 이하이다; 또 다른 실시양태에서, 이는 5 pM 이하이거나, 또는 1 pM 이하이다. 또 다른 실시양태에서, K_d 가 본원의 실시예에 기술된 항체와 실질적으로 동일하다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 본원의 실시예에 기술된 항체와 실질적으로 동일한 K_d 로 알파4베타7에 결합한다.

[0116]

또 다른 측면에서, 본 발명은 알파4베타7의 활성, 예를 들어 MAdCAM-1에 결합하는 것 (또는 부착), MAdCAM-1을 발현하는 세포에 결합하는 것, 또는 알파4베타7을 발현하는 세포와 MAdCAM-1을 발현하는 세포 간의 부착을 억제하는 항원 결합 단백질을 제공한다. 한 실시양태에서, 항원 결합 단백질의 IC_{50} 은 1000 pM 이하이다. 또 다른 실시양태에서, IC_{50} 은 500 pM 이하이다; 또 다른 실시양태에서, IC_{50} 은 100 pM 이하이다. 또 다른 실시양태에서, IC_{50} 이 본원의 실시예에 기술된 항체와 실질적으로 동일하다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 본원의 실시예에 기술된 항체와 실질적으로 동일한 IC_{50} 으로 알파4베타7의 활성을 억제한다.

[0117]

한 실시양태에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 알파4베타7 (또는 알파4베타7을 발현하는 세포)에 대한 겉보기 친화력이 1000 pM 이하이다. 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 500 pM 이하, 200 pM 이하, 100 pM 이하,

80 pM 이하, 40 pM 이하, 또는 15 pM 이하의 결보기 친화력을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 본원의 실시예에 기술된 항체와 실질적으로 동일한 결보기 친화력을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 결보기 친화력이 본원의 실시예에 기술된 항체와 실질적으로 동일하다.

[0118] 또 다른 측면에서, 본 발명은 활성 및 불활성 형태의 알파4베타7 양쪽 모두에 결합하는 항원 결합 단백질을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 한가지 형태의 알파4베타7에만, 또는 한가지 형태의 알파4베타7에 우선적으로 결합한다. 예를 들어, 항원 결합 단백질은 Mn²⁺의 존재 또는 부재 하에 알파4베타7에 결합할 수 있다 (즉, 활성 및 불활성 형태 양쪽 모두에 결합한다). 별법적으로, 항원 결합 단백질은 Mn²⁺의 존재 하에서만 또는 Mn²⁺의 부재 하에서만 알파4베타7에 결합할 수 있거나, 또는 한 이같은 조건 하에 다른 조건 하에서 보다 높은 친화력으로 결합할 수 있고, 이는 특정 형태의 알파4베타7에 대한 우선적인 결합을 가리킨다.

[0119] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 알파4베타7에의 결합에 대해 본원에 개시된 항체와 경쟁하는 항원 결합 단백질을 제공한다. 이같은 경쟁 능력은 당업계에 주지된 방법에 의해, 예를 들어, 형광 활성화 세포 분류 (FACS) 기술 또는 기타 유사한 기술을 사용하여 관찰되는, 알파4베타7-발현 세포에 결합하는 것에서의 경쟁에 의해, 부착 분석법 (즉, 알파4베타7을 발현하는 세포와 MAAdCAM-1을 발현하는 세포 사이의 부착 분석법)과 같은 분석법에서의 경쟁에 의해, 또는 본원에 기술된 또 다른 분석법에서의 경쟁에 의해 결정될 수 있다. 한 측면에서, 알파4베타7에의 결합에 대해 본원에 개시된 항체와 경쟁하는 항원 결합 단백질은 항체와 동일한 에피토프 또는 중첩되는 (또는 인접한) 에피토프에 결합한다. 또 다른 측면에서, 알파4베타7에의 결합에 대해 본원에 개시된 항체와 경쟁하는 항원 결합 단백질은 알파4베타7의 활성을 억제한다.

[0120] 또 다른 측면에서, 본 발명은 세포 표면 상에서 발현된 인간 알파4베타7에 결합하고, 이렇게 결합되는 경우, 세포 표면 상의 알파4베타7의 양을 유의하게 감소시키지 않으면서 MAAdCAM-1과의 알파4베타7 상호작용을 억제하는 항원 결합 단백질을 제공한다. 표면 상의 및/또는 세포 내부의 알파4베타7의 양을 결정 또는 추정하기 위한 임의의 방법을 사용할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명은 세포 표면 상에서 발현된 인간 알파4베타7에 결합하고, 이렇게 결합되는 경우, 세포 표면으로부터의 알파4베타7의 내재화 속도를 유의하게 증가시키지 않으면서 MAAdCAM-1과의 알파4베타7 상호작용을 억제하는 항원 결합 단백질을 제공한다. 다른 실시양태에서, 알파4베타7-발현 세포에 대한 항원 결합 단백질의 결합은 약 75%, 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 또는 0.1% 미만의 세포-표면 알파4베타7이 내재화되도록 한다.

[0121] 또 다른 측면에서, 본 발명은 시험관 내에서 또는 생체 내에서 (예를 들어, 인간 대상에게 투여되는 경우) 반감기가 1일 이상인 항원 결합 단백질을 제공한다. 한 실시양태에서, 항원 결합 단백질의 반감기는 3일 이상이다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질의 반감기는 4일 이상이다. 또 다른 실시양태에서, 항원 결합 단백질의 반감기는 8일 이상이다. 또 다른 실시양태에서, 유도체화되지 않거나 변형되지 않은 항원 결합 단백질과 비교하여 반감기가 더 길도록 항원 결합 단백질이 유도체화되거나 변형된다. 또 다른 실시양태에서, 참고로 포함된 WO 00/09560 (2000년 2월 24일 공개)에 기술된 바와 같이, 혈청 반감기를 증가시키기 위한 하나 이상의 점돌연변이를 항원 결합 단백질이 함유한다.

[0122] 본 발명은 다중특이적 항원 결합 단백질, 예를 들어, 이중특이적 항원 결합 단백질, 예를 들어, 2개의 상이한 항원 결합 부위 또는 영역을 통해, 알파4베타7의 2개의 상이한 에피토프에 결합하거나 또는 알파4베타7의 에피토프 및 또 다른 분자의 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질을 제공한다. 또한, 본원에 개시된 이중특이적 항원 결합 단백질은 본원에 기술된 항체들 중 하나로부터의 알파4베타7 결합 부위, 및 다른 간행물에 대한 참고에 의해 본원에 기술된 것들이 포함되는 본원에 기술된 항체들 중 또 다른 것으로부터의 제2 알파4베타7 결합 영역을 포함할 수 있다. 별법적으로, 이중특이적 항원 결합 단백질은 본원에 기술된 항체들 중 하나로부터의 항원 결합 부위, 및 당업계에 공지된 또 다른 알파4베타7 항체 또는 공지된 방법 또는 본원에 기술된 방법에 의해 제조된 항체로부터의 제2 항원 결합 부위를 포함할 수 있다.

[0123] 이중특이적 항체를 제조하는 다수의 방법이 당업계에 공지되어 있고, 미국 특허 출원 09/839,632 (2001년 4월 20일 출원) (본원에 참고로 포함됨)에 논의되어 있다. 이같은 방법에는 문헌 [Milstein et al., 1983, Nature 305:537], 및 기타 문헌 (미국 특허 4,474,893, 미국 특허 6,106,833)에 기술된 바와 같은 하이브리드-하이브리도마의 사용, 및 항체 단편의 화학적 커플링 (문헌 [Brennan et al., 1985, Science 229:81]; [Glennie et al., 1987, J. Immunol. 139:2367]; 미국 특허 6,010,902)이 포함된다. 또한, 재조합 수단을 통해, 예를 들어 류신 지퍼 모이어티 (즉, 이종이량체를 우선적으로 형성하는, Fos 및 Jun 단백질로부터의 것; 문헌 [Kostelnik et al., 1992, J. Immunol. 148:1547]) 또는 미국 특허 5,582,996에 기술된 바와 같은 기타 자물쇠 & 열쇠 상호

작용 도메인 구조를 사용함으로써, 이중특이적 항체가 생산될 수 있다. 추가적인 유용한 기술에는 [Kortt et al., 1997, 상기 문헌]; 미국 특허 5,959,083; 및 미국 특허 5,807,706에 기술된 것들이 포함된다.

[0124] 또 다른 측면에서, 본 발명의 항원 결합 단백질은 항체의 유도체를 포함한다. 유도체화 항체는 원하는 성질, 예컨대 특정 용도에서의 증가된 반감기를 항체에 부여하는 임의의 문자 또는 물질을 포함할 수 있다. 유도체화 항체는, 예를 들어, 검출가능 (또는 표지) 모이어티 (예를 들어, 방사성, 비색성, 항원성 또는 효소 문자, 검출 가능한 비드 (예컨대 자성 또는 전자고밀도 (예를 들어, 금) 비드), 또는 또 다른 문자에 결합하는 문자 (예를 들어, 비오틴 또는 스트렙타비딘)), 치료 또는 진단 모이어티 (예를 들어, 방사성, 세포독성 또는 제약 활성 모이어티), 또는 특정 용도 (예를 들어, 대상, 예컨대 인간 대상에게의 투여, 또는 기타 생체내 또는 시험관내 용도)를 위한 항체의 적합성을 증가시키는 문자를 포함할 수 있다. 항체를 유도체화시키는데 사용될 수 있는 문자의 예로는 알부민 (예를 들어, 인간 혈청 알부민) 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)이 포함된다. 당업계에 주지된 기술을 사용하여 항체의 알부민-연결 및 PEG화 유도체를 제조할 수 있다. 한 실시양태에서, 트랜스티레틴 (TTR) 또는 TTR 변이체에 항체가 접합되거나 또는 다른 방식으로 연결된다. 예를 들어, 텍스트란, 폴리(n-비닐 피롤리돈), 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 단독중합체, 폴리프로필렌 옥시드/에틸렌 옥시드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올 및 폴리비닐 알콜로 구성된 군으로부터 선택되는 화학물질로, TTR 또는 TTR 변이체가 화학적으로 변형될 수 있다. 미국 특허 출원 번호 20030195154.

[0125] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 항원 결합 단백질을 사용하여 알파4베타7에 결합하는 문자를 스크리닝 하는 방법을 제공한다. 임의의 적절한 스크리닝 기술이 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 발명의 항원 결합 단백질이 결합하는 알파4베타7 문자 또는 이의 단편이 본 발명의 항원 결합 단백질 및 또 다른 문자와 접촉되고, 이때 다른 문자가 알파4베타7에 대한 항원 결합 단백질의 결합을 감소시키면 이는 알파4베타7에 결합하는 것이다. 항원 결합 단백질의 결합을 임의의 적절한 방법, 예를 들어, ELISA를 사용하여 검출할 수 있다. 항원 결합 단백질이 알파4베타7에 결합하는 것의 검출이 상기 논의된 바와 같이 항원 결합 단백질을 검출가능하게 표지시키는 것에 의해 단순화될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 알파4베타7-결합 문자가 알파4베타7 활성화 및/ 또는 신호전달을 억제하는지 여부를 결정하기 위해 추가로 분석된다.

핵산

[0127] 한 측면에서, 본 발명은 단리된 핵산 분자를 제공한다. 핵산은, 예를 들어, 전체 항원 결합 단백질 또는 이의 일부분, 예를 들어, 본 발명의 항체의 한쪽 사슬 또는 양쪽 사슬, 또는 이의 단편, 유도체, 뮤테인 또는 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 확인, 분석, 돌연변이 또는 증폭을 위한 혼성화 프로브, PCR 프라이머 또는 서열분석 프라이머로서 사용하기에 충분한 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드의 발현을 억제하기 위한 안티-센스(anti-sense) 핵산, 및 이들의 상보적인 서열을 포함한다. 핵산은 임의의 길이일 수 있다. 이는, 예를 들어, 뉴클레오티드 5개, 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 75개, 100개, 125개, 150개, 175개, 200개, 250개, 300개, 350개, 400개, 450개, 500개, 750개, 1,000개, 1,500개, 3,000개, 5,000개 또는 이를 초과하는 개수의 길이일 수 있고/있거나, 하나 이상의 추가적인 서열, 예를 들어, 조절 서열을 포함할 수 있고/있거나, 더 큰 핵산, 예를 들어, 벡터의 일부분일 수 있다. 핵산은 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있고, RNA 및/또는 DNA 뉴클레오티드, 및 이의 인공 변이체 (예를 들어, 웨პ티드 핵산)를 포함할 수 있다.

[0128] 항체 폴리펩티드 (예를 들어, 중쇄 또는 경쇄, 가변 도메인 단독, 또는 전장)를 코딩하는 핵산은 알파4베타7로 면역화된 마우스의 B 세포로부터 단리될 수 있다. 통상적인 절차 예컨대 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 핵산이 단리될 수 있다.

[0129] 본 발명은 특정 혼성화 조건 하에 다른 핵산에 혼성화하는 핵산을 추가로 제공한다. 핵산들을 혼성화시키는 방법은 당업계에 주지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6] 참조. 본원에 정의된 바와 같이, 중등도로 염격한 혼성화 조건은 $5\times$ 염화나트륨/시트르산나트륨 (SSC), 0.5% SDS, 1.0 mM EDTA (pH 8.0)를 함유하는 예비세정 용액, 약 50% 포름아미드, $6\times$ SSC의 혼성화 완충제, 및 55°C의 혼성화 온도 (또는 기타 유사한 혼성화 용액, 예컨대 약 50% 포름아미드를 함유하는 용액과 42°C의 혼성화 온도), 및 $0.5\times$ SSC, 0.1% SDS에서의 60°C의 세정 조건을 사용한다. 염격한 혼성화 조건에서는, $6\times$ SSC, 45°C에서의 혼성화 후, 68°C에서 $0.1\times$ SSC, 0.2% SDS에서 1회 이상 세정된다. 또한, 당업자는 서로 적어도 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산들이 전형적으로 서로 혼성화되어 남도록 혼성화의 염격도를 증가 또는 감소시키기 위해 혼성화 및/또는 세정 조건을 조작할 수 있다. 혼성화 조건의 선택에 영향을 미치는 기본적인 파라메터, 및 적절한 조

건을 고안하기 위한 지침이, 예를 들어, 문헌 [Sambrook, Fritsch, and Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., chapters 9 and 11]; 및 [Current Protocols in Molecular Biology, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., sections 2.10 and 6.3-6.4]에 기재되어 있고, DNA의 길이 및/또는 염기 조성을 예를 들어 기초로 하여 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다.

[0130] 돌연변이에 의해 핵산 내로 변화가 도입될 수 있고, 이에 의해 핵산이 코딩하는 폴리펩티드 (예를 들어, 항원 결합 단백질)의 아미노산 서열의 변화가 초래된다. 당업계에 공지된 임의의 기술을 사용하여 돌연변이가 도입될 수 있다. 한 실시양태에서, 예를 들어, 부위-지정 돌연변이유발 프로토콜을 사용하여, 하나 이상의 특정 아미노산 잔기가 변화된다. 또 다른 실시양태에서, 예를 들어, 무작위 돌연변이유발 프로토콜을 사용하여, 하나 이상의 무작위로 선택된 잔기가 변화된다. 어떤 방식으로 제조되더라도, 돌연변이체 폴리펩티드가 발현되어 원하는 성질 (예를 들어, 알파4베타7에 결합하는 것, 또는 어드레신 예컨대 MAdCAM에 대한 알파4베타7의 결합을 차단하는 것)에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0131] 핵산이 코딩하는 폴리펩티드의 생물학적 활성을 유의하게 변경시키지 않으면서 핵산 내로 돌연변이가 도입될 수 있다. 예를 들어, 비-필수 아미노산 잔기에서의 아미노산 치환을 일으키는 뉴클레오티드 치환이 이루어질 수 있다. 한 실시양태에서, 아미노산 잔기의 하나 이상의 결실 또는 치환을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하도록, 뉴클레오티드 서열, 또는 이의 원하는 단편, 변이체 또는 유도체가 돌연변이된다. 또 다른 실시양태에서, 돌연변이유발은 하나 이상의 아미노산 잔기에 인접하여 아미노산을 삽입시킨다. 별법적으로, 핵산이 코딩하는 폴리펩티드의 생물학적 활성 (예를 들어, 알파4베타7의 결합, 어드레신 예컨대 MAdCAM에 대한 알파4베타7의 결합을 억제하는 것 등)을 선택적으로 변화시키는 하나 이상의 돌연변이가 핵산 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이가 생물학적 활성을 정량적으로 또는 정성적으로 변화시킬 수 있다. 정량적 변화의 예로는 활성을 증가시키거나, 감소시키거나 또는 제거하는 것이 포함된다. 정성적 변화의 예로는 항원 결합 단백질의 항원 특이성을 변화시키는 것이 포함된다.

[0132] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 핵산 서열의 검출을 위한 프라이머 또는 혼성화 프로브로서 사용하기에 적절한 핵산 분자를 제공한다. 본 발명의 핵산 분자는 본 발명의 전장 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열의 일부분만을 포함할 있고, 예를 들어, 프로브 또는 프라이머로서 사용될 수 있는 단편 또는 본 발명의 폴리펩티드의 활성 부분 (예를 들어, 알파4베타7 결합 부분)을 코딩하는 단편을 포함할 수 있다.

[0133] 본 발명의 핵산의 서열을 기초로 하는 프로브는 이러한 핵산 또는 유사한 핵산, 예를 들어, 본 발명의 폴리펩티드를 코딩하는 전사물을 검출하는데 사용될 수 있다. 프로브는 표지 기, 예를 들어, 방사성동위원소, 형광 화합물, 효소, 또는 효소 보조인자를 포함할 수 있다. 이같은 프로브는 이러한 폴리펩티드를 발현하는 세포를 확인하는데 사용될 수 있다.

[0134] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 폴리펩티드 또는 이의 일부분을 코딩하는 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 벡터의 예로는 플라스미드, 바이러스 벡터, 비-에피솜형 포유류 벡터 및 발현 벡터, 예를 들어, 재조합 발현 벡터가 포함되지만, 이에 한정되지는 않는다.

[0135] 본 발명의 재조합 발현 벡터는 본 발명의 핵산을 숙주 세포에서의 이러한 핵산의 발현에 적절한 형태로 포함할 수 있다. 재조합 발현 벡터는 발현에 사용될 숙주 세포를 기초로 선택되는 하나 이상의 조절 서열을 포함하고, 이는 발현될 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다. 조절 서열에는 다수의 숙주 세포 유형에서 뉴클레오티드 서열의 구성적 발현을 지시하는 것 (예를 들어, SV40 초기 유전자 인핸서, 라우스 육종 바이러스 프로모터 및 사이토메갈로바이러스 프로모터), 특정 숙주 세포에서만 뉴클레오티드 서열의 발현을 지시하는 것 (예를 들어, 조직-특이적 조절 서열; 전문이 본원에 참고로 포함된 문헌 [Voss et al., 1986, Trends Biochem. Sci. 11:287], [Maniatis et al., 1987, Science 236:1237] 참조), 및 특정 처리 또는 조건에 응답하여 뉴클레오티드 서열의 유도성 발현을 지시하는 것 (예를 들어, 포유류 세포에서의 메탈로티오닌 프로모터, 및 진핵생물 및 원핵생물 시스템 양쪽 모두에서의 tet-응답성 및/또는 스트렙토마이신 응답성 프로모터 (동일 문헌 참조))이 포함된다. 당업자는 발현 벡터의 디자인이 형질전환될 숙주 세포의 선택, 원하는 단백질의 발현 수준 등과 같은 요인에 좌우될 수 있음을 이해할 것이다. 본 발명의 발현 벡터는 숙주 세포 내로 도입되어 본원에 기술된 바와 같은 핵산에 의해 코딩되는 단백질 또는 펩티드 (융합 단백질 또는 펩티드 포함)를 생산할 수 있다.

[0136] 또 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 재조합 발현 벡터가 도입된 숙주 세포를 제공한다. 숙주 세포는 임의의 원핵생물 세포 (예를 들어, 대장균) 또는 진핵생물 세포 (예를 들어, 효모, 곤충, 또는 포유류 세포 (예를 들어, CHO 세포))일 수 있다. 벡터 DNA는 통상적인 형질전환 또는 형질감염 기술을 통해 원핵생물 또는 진핵생

물 세포 내로 도입될 수 있다. 포유류 세포의 안정적인 형질감염에 대해, 사용된 발현 벡터 및 형질감염 기술에 따라, 소량의 세포만이 자신의 게놈 내로 외래 DNA를 통합시킬 수 있음이 공지되어 있다. 이러한 통합체(integrand)를 확인 및 선별하기 위해, 선별성 마커(예를 들어, 항생제에 대한 저항성을 위한 마커)를 코딩하는 유전자가 관심 유전자와 함께 숙주 세포 내로 일반적으로 도입된다. 바람직한 선별가능 마커에는 약물, 예컨대 G418, 하이그로마이신 및 메토트렉세이트에 대한 저항성을 부여하는 것들이 포함된다. 도입된 핵산으로 안정적으로 형질감염된 세포가, 여러 방법들 중에서도, 약물 선별에 의해 확인될 수 있다(예를 들어, 선별성 마커 유전자가 혼입된 세포는 생존하는 한편, 다른 세포는 사망할 것이다).

[0137] 적응증

한 측면에서, 본 발명은 대상을 치료하는 방법을 제공한다. 이러한 방법은, 예를 들어, 대상에서 일반적으로 건강에 좋은 효과가 있을 수 있고, 예를 들면, 대상의 예상 수명을 증가시킬 수 있다. 별법적으로, 이러한 방법은, 예를 들어, 질환, 장애, 상태 또는 병("상태")을 치료, 예방, 치유, 완화 또는 경감("치료")할 수 있다. 본 발명에 따라 치료될 상태에는, 알파4베타7의 부적합한 발현 또는 활성을 특징으로 하는 상태가 있다. 이같은 상태에는 세포의 부적합한 운송, 예를 들어, 위장관 또는 MAdCAM-1을 발현하는 세포를 포함하는 기타 조직으로의 백혈구(예컨대 림프구 또는 단핵구)의 운송(MAdCAM-1을 발현하는 세포에 백혈구가 결합하는 것의 결과)과 관련된 것들이 포함된다. 따라서 치료될 수 있는 질환에는 염증성 장 질환, 예컨대 궤양성 대장염, 크론병, 복강 질환(비열대성 스프루), 혈청반응 음성 관절병증과 관련된 장병증, 현미경적 또는 교원성 대장염, 호산구성 위장염, 또는 대장절제술 및 회장항문 문합술 후에 초래된 낭염이 포함된다. 본 발명에 따라 치료될 수 있는 추가적인 상태에는 궤장염, 인슐린-의존적 당뇨병, 유방염, 담낭염, 담관염, 담도주위염, 만성 기관지염, 만성 부비동염, 천식 및 이식편 대 숙주 질환이 포함된다.

[0139] 치료 방법 및 항원 결합 단백질의 투여

본원에서 제공되는 특정 방법들은 알파4베타7 이종이량체 특이적 항원 결합 단백질을 대상에게 투여함으로써, 특정 상태에서 역할을 하는 알파4베타7-유도 생물학적 응답을 감소시키는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법은, 예를 들어, 대상에게 투여를 통해 또는 생체외 절차로, 내인성 알파4베타7을 알파4베타7 항원 결합 단백질과 접촉시키는 것을 수반한다.

용어 "치료"는 장애의 하나 이상의 증상 또는 기타 양상의 완화 또는 예방, 또는 질환 중증도의 감소 등을 포함한다. 항원 결합 단백질은 실용적인 치료제를 구성하기 위해 완전한 치유를 일으키거나 또는 질환의 모든 증상 또는 징후를 극복할 필요가 없다. 관련 분야에서 인지되는 바와 같이, 치료제로서 사용되는 약물은 소정의 질환 상태의 중증도를 감소시킬 수 있지만, 유용한 치료제로 간주되기 위해 질환의 모든 징후를 없앨 필요는 없다. 유사하게, 예방적으로 투여되는 치료는 실용적인 예방제를 구성하기 위해 상태의 발병을 방지하는 것에서 완전히 효과적일 필요가 없다. 단지 질환의 영향을 감소시키거나(예를 들어, 질환 증상의 수 또는 중증도를 감소시킴으로써, 또는 또 다른 치료의 유효성을 증가시킴으로써, 또는 또 다른 이로운 효과를 일으킴으로써), 또는 대상에서 질환이 발생하거나 악화될 가능성을 감소시키는 것이면 충분하다. 본 발명의 한 실시양태는 특정 장애의 중증도를 반영하는 지표의 기준선에 비해 지속적인 개선을 유도하는데 충분한 양 및 시간으로 알파4베타7 길항제를 환자에게 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

관련 분야에서 이해되는 바와 같이, 본 발명의 분자를 포함하는 제약 조성물은 적응증에 적합한 방식으로 대상에게 투여된다. 제약 조성물은 비경구, 경구 또는 흡입을 포함하지만 이에 한정되지 않는 임의의 적절한 기술에 의해 투여될 수 있다. 주사되는 경우, 예를 들어, 동맥내, 정맥내, 근육내, 병변내, 복강내 또는 피하 경로를 통해, 볼루스(bolus) 주사 또는 연속 주입에 의해 제약 조성물이 투여될 수 있다. 이식물로부터의 지속 방출 및 경피 전달과 같이, 국소화된 투여, 예를 들어, 질환 또는 손상 부위에서의 투여가 고려된다. 흡입에 의한 전달에는, 예를 들어, 비강 또는 경구 흡입, 분무기의 사용, 에어로졸 형태의 길항제의 흡입 등이 포함된다. 기타 대안에는 점안제; 알약, 시럽, 로젠지 또는 츄잉검이 포함되는 경구 제제; 및 국소 제제 예컨대 로션, 젤, 스프레이 및 연고가 포함된다.

생체외 절차에서의 항원 결합 단백질의 용도가 또한 고려된다. 예를 들어, 환자의 혈액 또는 기타 체액을 생체외에서 알파4베타7에 결합하는 항원 결합 단백질과 접촉시킬 수 있다. 적절한 불용성 매트릭스 또는 고체 지지체 물질에 항원 결합 단백질이 결합될 수 있다.

유리하게는, 하나 이상의 추가적인 성분 예컨대 생리학상 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 조성물의 형태로 항원 결합 단백질이 투여된다. 임의적으로, 조성물은 하나 이상의 생리학상 활성인 작용제, 예를

들어, 제2의 염증- 또는 면역-억제 물질, 항-혈관형성 물질, 진통 물질 등을 추가로 포함하고, 이들의 비-제한적인 예가 본원에서 제공된다. 다양한 특정 실시양태에서, 조성물은 알파4베타7 결합 항원 결합 단백질에 더하여 1가지, 2가지, 3가지, 4가지, 5가지 또는 6가지의 생리학상 활성인 작용제를 포함한다.

[0145] 한 실시양태에서, 제약 조성물은 본 발명의 항원 결합 단백질을 완충제, 항산화제 예컨대 아스코르브산, 저분자량 폴리펩티드 (예컨대 아미노산 10개 미만인 것), 단백질, 아미노산, 탄수화물 예컨대 글루코스, 수크로스 또는 텍스트린, 칼레이팅제 예컨대 EDTA, 글루타티온, 안정화제, 및 부형제로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질과 함께 포함한다. 중성의 완충 염수 또는 동종 혈청 알부민과 혼합된 염수가 적합한 희석제의 예이다. 적합한 산업 기준에 따라, 방부제 예컨대 벤질 알콜이 또한 첨가될 수 있다. 적합한 부형제 용액 (예컨대 수크로스)을 희석제로 사용하여 조성물이 동결건조물로 제형될 수 있다. 적절한 성분들은 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이다. 제약 제형에서 사용될 수 있는 성분들의 추가적인 예가 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed. (1980) & 20th Ed. (2000), Mack Publishing Company, Easton, PA]에서 제시된다.

[0146] 개업의가 사용하기 위한 키트가 임의의 본원에 논의된 상태를 치료하는 것에서 사용하기 위한 본 발명의 알파4베타7-억제 물질 및 표지 또는 기타 설명서를 포함한다. 한 실시양태에서, 키트는 하나 이상의 알파4베타7 결합 항원 결합 단백질의 무균성 제제를 포함하고, 이는 상기 개시된 바와 같은 조성물의 형태일 수 있고, 하나 이상의 바이알 내에 있을 수 있다.

[0147] 투여량 및 투여 빈도는 투여 경로, 사용되는 특정 항원 결합 단백질, 치료될 질환의 성질 및 중증도, 상태의 급성 또는 만성 여부, 및 대상의 사이즈 및 일반적인 상태와 같은 요인에 따라 변할 수 있다. 관련 업계에 공지된 절차에 의해, 예를 들어, 용량의 단계적인 확대 연구를 수반할 수 있는 임상 시험에서, 적합한 투여량이 결정될 수 있다.

[0148] 본 발명의 알파4베타7 억제 물질은, 예를 들어, 1회 또는 1회 초과로, 예를 들면, 일정 기간에 걸쳐 규칙적인 간격으로 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 적어도 1개월 또는 이를 초과하는 기간에 걸쳐, 예를 들어, 1개월, 2개월 또는 3개월 또는 심지어 무기한 동안 투여된다. 만성 상태를 치료하기 위해, 장기 치료가 일반적으로 가장 효과적이다. 그러나, 급성 상태를 치료하기 위해, 더 짧은 기간, 예를 들어, 1주 내지 6주 동안의 투여가 충분할 수 있다. 일반적으로, 환자가 선택된 지표 또는 지표들에 대해 기준선에 비해 의학적으로 적절한 정도의 개선을 나타낼 때까지 항원 결합 단백질이 투여된다.

[0149] 본 발명의 특정 실시양태는 하루에 대상의 체중 1 kg 당 약 1 ng의 항원 결합 단백질 ("1 ng/kg/일") 내지 약 10 mg/kg/일, 더욱 바람직하게는 약 500 ng/kg/일 내지 약 5 mg/kg/일, 가장 바람직하게는 약 5 µg/kg/일 내지 약 2 mg/kg/일의 투여량으로 대상에게 항원 결합 단백질을 투여하는 것을 수반한다. 추가적인 실시양태에서, 알파4베타7 매개 질환, 상태 또는 장애, 예를 들어, 본원에 개시된 의학적 장애를 치료하기 위해, 항원 결합 단백질이 성인에게 1주일에 1회, 1주일에 2회, 또는 1주일에 3회 이상 투여된다. 주사되는 경우, 성인 용량 당 항원 결합 단백질의 유효량은 1-20 mg/m² 범위일 수 있고, 바람직하게는 약 5-12 mg/m²이다. 별법적으로, 균일 용량이 투여될 수 있다; 이러한 양은 5-100 mg/용량 범위일 수 있다. 균일 용량에 대한 한 범위는 용량 당 약 20-30 mg이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 25 mg/용량의 균일 용량이 주사에 의해 반복적으로 투여된다. 주사 이외의 투여 경로가 사용되는 경우, 표준 의료 관행에 따라 용량이 적합하게 조정된다. 치료 요법의 한 예는 항원 결합 단백질 약 20-30 mg의 용량을 3주 이상의 기간에 걸쳐 주당 1회 내지 3회 주사하는 것을 수반하지만, 원하는 정도의 개선을 유도하기 위해 더 긴 기간 동안의 치료가 필요할 수 있다. 소아과 대상 (4세-17세)에 대해, 한 예시적인 적절한 요법은 0.4 mg/kg, 최대 용량 25 mg까지의 항원 결합 단백질을 피하 주사로 주당 2회 내지 3회 투여하는 것을 수반한다.

[0150] 본원에서 제공되는 방법의 특정 실시양태는 0.5 mg 내지 10 mg, 바람직하게는 3 내지 5 mg의 항원 결합 단백질을 주당 1회 또는 2회 피하 주사하는 것을 수반한다. 또 다른 실시양태는 3 mg 이상의 항원 결합 단백질을 1주일에 1회 폐 투여하는 것 (예를 들어, 분무기에 의해)에 관한 것이다.

[0151] 본원에서 제공되는 치료 요법의 예는 알파4베타7이 역할을 하는 상태를 치료하기 위해 항원 결합 단백질을 1.5 내지 3 mg의 용량으로 1주일에 1회 피하 주사하는 것을 포함한다. 이같은 상태의 예가 본원에서 제공되고, 예를 들어, 상기 기술된 바와 같은 류머티스성 상태, 및 알파4베타7-발현 세포의 과도한 또는 부적합한 운송이 역할을 하는 기타 상태 (본원에서 기술됨; 예를 들어, 염증성 장 질환, 췌장염 등)가 이에 포함된다. 원하는 결과가 달성될 때까지, 예를 들어, 대상의 증상이 진정될 때까지 항원 결합 단백질의 매주 투여가 계속된다. 필요하다면 치료가 재개될 수 있거나, 또는, 별법적으로, 유지 용량이 투여될 수 있다.

- [0152] 본원에서 제공되는 치료 요법의 다른 예는 대상의 체중 1 kg 당 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 또는 20 mg (mg/kg)의 본 발명의 알파4베타7 억제제의 투여를 포함한다. 이러한 용량이 대상에게 1회, 또는 특정 간격으로 1회를 초과하여, 예를 들어, 1일 1회, 1주일에 3회, 1주일에 2회, 1주일에 1회, 1개월에 3회, 1개월에 2회, 1개월에 1회, 2개월에 1회, 3개월에 1회, 6개월에 1회, 또는 1년에 1회 투여될 수 있다. 치료 기간, 및 치료 용량 및/또는 빈도에 대한 임의의 변화가 대상의 특정 요구를 충족시키기 위해 치료 과정 동안 변경되거나 변할 수 있다.
- [0153] 또 다른 실시양태에서, 치료되는 장애의 중증도를 반영하는 하나 이상의 지표에서 개선, 바람직하게는 지속적인 개선을 유도하는데 충분한 양 및 시간으로 항원 결합 단백질이 대상에게 투여된다. 대상의 병, 질환 또는 상태의 정도를 반영하는 다양한 지표가 치료의 양 및 시간이 충분한지 여부를 결정하기 위해 평가될 수 있다. 이같은 지표에는, 예를 들어, 당해 장애의 질환 중증도, 증상 또는 정후의 임상적으로 인정되는 지표가 포함된다. 한 실시양태에서, 대상이 2주 내지 4주 간격의 2회 이상의 시기에 개선을 나타낸다면, 개선이 지속적인 것으로 간주된다. 일반적으로 개선 정도는 의사에 의해 결정되고, 의사의 정후, 증상, 생검 또는 기타 테스트 결과를 기초로 이러한 결정을 내릴 수 있고, 대상에게 실행되는 질문서, 예컨대 소정의 질환에 대해 전개된 삶의 질 질문서를 또한 사용할 수 있다.
- [0154] 알파4베타7 발현 및/또는 알파4베타7 및 또는 이의 결합 파트너 MAdCAM-1의 활성화의 변화는 위장계의 염증성 상태가 예를 들어 포함되는 다수의 장애와 관련된다. 알파4베타7 또는 MAdCAM-1 발현 및/또는 활성화가 변경된 개체를 확인함으로써, 알파4베타7 결합 항원 결합 단백질로의 치료가 가장 이로울 수 있는 대상을 확인하기 위해, 소정의 장애에 걸린 대상을 스크리닝할 수 있다. 따라서, 본원에서 제공되는 치료 방법은 대상의 알파4베타7 또는 MAdCAM-1 활성화 또는 발현 수준을 측정하는 제1 단계를 임의적으로 포함한다. 알파4베타7 및/또는 MAdCAM-1 발현 및/또는 활성화가 정상보다 상승된 대상에게 항원 결합 단백질이 투여될 수 있다.
- [0155] 알파4베타7 또는 MAdCAM-1 활성에서의 변화 (존재하는 경우)를 검출하기 위해, 대상의 알파4베타7 또는 MAdCAM-1 활성 수준을 항원 결합 단백질로의 치료 전, 치료 동안 및/또는 치료 후에 모니터링할 수 있다. 일부 장애에 대해, 상승된 알파4베타7 및/또는 MAdCAM-1 활성의 발생이 질환 단계 또는 질환의 특정 형태와 같은 인자에 따라 변할 수 있다. 공지된 기술이, 예를 들어, 대상의 혈액 또는 조직 샘플에서, 이같은 활성을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 알파4베타7 또는 MAdCAM-1 활성을 임의의 적절한 기술을 사용하여 측정할 수 있다.
- [0156] 본 발명의 방법 및 조성물의 특정 실시양태는 항원 결합 단백질 및 하나 이상의 추가적인 알파4베타7 길항체, 예를 들어, 2가지 이상의 본 발명의 항원 결합 단백질, 또는 본 발명의 항원 결합 단백질 및 하나 이상의 다른 알파4베타7 길항체를 사용하는 것을 수반한다. 추가적인 실시양태에서, 항원 결합 단백질이 단독으로 또는 환자가 앓고 있는 상태를 치료하는데 유용한 다른 작용제와 조합되어 투여된다. 이같은 작용제의 예로는 단백질 성 및 비-단백질 성 약물 양쪽 모두가 포함된다. 다중 치료제가 공동-투여되는 경우, 관련 업계에서 인지되는 바와 같이, 투여량이 이에 따라 조정될 수 있다. "공동-투여" 및 조합 요법은 동시 투여에 한정되지 않고, 1가지 이상의 다른 치료제를 환자에게 투여하는 것을 수반하는 치료 과정 동안 항원 결합 단백질이 1회 이상 투여되는 치료 요법을 또한 포함한다.
- [0157] 항원 결합 단백질과 공동-투여될 수 있는 다른 작용제의 예는 치료될 특정 상태에 따라 선택되는 다른 항원 결합 단백질 또는 치료 폴리펩티드이다. 별법적으로, 상기 논의된 특정 상태들 중 하나를 치료하는데 유용한 비-단백질 성 약물이 알파4베타7 길항제와 공동-투여될 수 있다.
- [0158] 조합 요법
- [0159] 또 다른 측면에서, 본 발명은 알파4베타7 억제 항원 결합 단백질 및 하나 이상의 다른 치료로 대상을 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 이같은 조합 요법은, 예를 들어, 종양 내의 다중 부위 또는 분자 표적을 공격함으로써 상승작용 또는 부가적인 효과를 달성한다. 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 조합 요법의 유형은 단일 질환-관련 경로 내의 다중 분기점, 표적 세포 내의 다중 경로, 및 표적 조직 내의 다중 세포 유형을 (적합하게) 불활성화 또는 활성화시키는 것을 포함한다.
- [0160] 또 다른 실시양태에서, 조합 요법 방법은 2가지, 3가지, 4가지, 5가지, 6가지 또는 이를 초과하는 가짓수의 본원에 기술된 알파4베타7 작동제 또는 길항제를 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 이러한 방법은 알파4베타7-매개 신호 전달을 함께 (직접적으로 또는 간접적으로) 억제하거나 활성화시키는 2가지 이상의 치료를 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 이같은 방법의 예는 2가지 이상의 알파4베타7 억제 항원 결합 단백질의 조합, 알파4베타7 억제 항원 결합 단백질과 항-염증 성질이 있는 하나 이상의 다른 치료 모이어티 (예

를 들어, 비-스테로이드성 항염증제, 스테로이드, 및/또는 면역조정제)의 조합, 또는 알파4베타7 억제 항원 결합 단백질과 하나 이상의 다른 치료(예를 들어, 수술, 초음파, 또는 염증을 감소시키는데 효과적인 치료)의 조합을 사용하는 것을 포함한다. 알파4베타7 억제제와 조합될 수 있는 유용한 작용제에는 크론병 또는 궤양성 대장염을 예를 들어 치료하는데 사용되는 것들, 예컨대 아미노살리실레이트(예를 들어, 메살라민), 코르티코스테로이드(프레드니손 포함), 항생제 예컨대 메트로니다졸 또는 시프로폴록사신(또는 샷길(fistula)을 앓고 있는 환자를 예를 들어 치료하는데 유용한 기타 항생제), 및 면역억제제 예컨대 아자티오프린, 6-메르캅토피린, 메토트렉세이트, 타크롤리무스 및 시클로스포린이 포함된다. 이같은 작용제들의 조합이 본 발명의 알파4베타7 억제제와 함께 사용하는데 또한 고려된다. 이같은 작용제(들)는 경구 투여될 수 있거나, 또는 또 다른 경로에 의해, 예를 들어, 좌약 또는 관장을 통해 투여될 수 있다.

[0161] 또한, 하나 이상의 항-알파4베타7 항체 또는 항체 유도체가 하나 이상의 분자 또는 기타 치료와 조합되어 사용될 수 있고, 이때 이러한 기타 분자(들) 및/또는 치료(들)는 알파4베타7에 직접적으로 결합하거나 영향을 미치지 않지만, 이러한 조합은 치료될 질환을 치료 또는 예방하는데 효과적이다. 예를 들어, 알파4베타7 억제제가 프로바이오틱(probiotic) 요법, 또는 정상적인 장 균무리를 복구하거나 유지시키는 사용되는 기타 요법과 조합되어 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 분자(들) 및/또는 치료(들) 중 하나 이상이 요법 과정 중에 기타 분자(들) 및/또는 치료(들) 중 하나 이상에 의해 야기되는 상태, 예를 들어, 구토, 피로, 탈모, 악액질, 불면증 등을 치료하거나 예방한다. 분자들 및/또는 기타 치료들의 조합이 사용되는 모든 경우에, 개별적인 분자(들) 및/또는 치료(들)는 효과적인 임의의 시간에 걸쳐 임의의 순서로, 예를 들어, 동시에, 연속적으로 또는 교대로 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 치료 방법은 하나의 분자로의 치료 또는 기타 치료의 제1 과정을 완료한 후 제2 치료 과정을 시작하는 것을 포함한다. 제1 치료 과정의 종료와 제2 치료 과정의 시작 사이의 시간은 전체 요법 과정이 효과적이게 하는 임의의 길이의 시간, 예를 들어, 수초, 수분, 수시간, 수일, 수주, 수개월 또는 심지어 수년일 수 있다.

[0162] 또 다른 실시양태에서, 이러한 방법은 본원에 기술된 알파4베타7 길항제 중 하나 이상 및 하나 이상의 기타 치료(예를 들어, 치료적 또는 고식적 치료)를 투여하는 것을 포함한다. 방법이 1가지를 초과하는 치료를 대상에게 투여하는 것을 포함하는 경우, 투여 순서, 시기, 횟수, 농도 및 부피는 치료의 의학적 요건 및 제한사항에 의해서만 제한되는 것으로 이해되어야 하고, 즉, 예를 들어, 동시에, 연속적으로, 교대로 또는 임의의 기타 요법에 따라, 2가지 치료가 대상에게 투여될 수 있다.

[0163] 하기의 실시예(실제 실시예 및 예언적 실시예 양쪽 모두)는 본 발명의 특정 실시양태 및 특색을 예시하기 위한 목적으로 제공되고, 본 발명의 범주를 한정하지 않는다.

실시예 1: 항체 제조

[0165] 제노마우스(XenoMouse)TM XG2카파람다(k1) 및 XG4k1 마우스(각각 인간 IgG2 또는 IgG4, 및 인간 카파 및 람다 경쇄를 발현하는 트랜스제닉 마우스; 앱제닉스 인코포레이티드(Abgenix Inc.), 캘리포니아주 프레몬트)를 인간 알파4베타7을 발현하는 세포(일시적으로 형질감염된 인간 배아 신장(HEK) 293 세포(293-a4b7) 또는 안정적으로 형질감염된 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포(CHO-a4b7))로 면역화시킴으로써 인간 알파4베타7에 대한 모노클로날 항체가 생성되었다. 알파4베타7 형질감염 세포를 각각의 어버이 대조군 세포와 비교하는 형광 활성화 세포 분류(FACS) 분석에 의해 혈청 역가를 모니터링하였다. 면역화 캠페인으로부터의 과다면역 동물을 희생시켰고, 지라 및 립프절 조직을 하이브리도마 융합에 적용하였다.

[0166] 일련의 분석법을 사용하여 알파4베타7 이종이량체 특이적 항체를 확인하였다. 먼저, 허위 형질감염 세포와 비교하여 알파4베타7 형질감염 세포에 결합하는 것에 대해 플루오로메트릭 마이크로볼륨 어세이 테크놀러지(Fluorometric Microvolume Assay Technology) (FMATTM, 애플라 코포레이션(Applera Corporation), 캘리포니아주 포스터 시티; 고-처리량 스크리닝 세포 검출 시스템)에 의해 하이브리도마 상등액을 스크리닝하였다. 알파4베타7에의 결합에 대해 양성으로 확인된 상등액(CHO-a4b7 세포 면역화 캠페인으로부터의 1001개의 양성 결합 상등액 및 293-a4b7 세포 면역화 캠페인으로부터의 1143개의 양성 결합 상등액)을 문헌 [Erle, J. Immunol., (1994) 153:517]에 기술된 것과 유사한 방식으로 MAdCAM-1-Fc에 대한 HUT78 세포 부착을 억제하는 능력에 대해 평가하였다. 이러한 분석법에서, CHO-a4b7 캠페인으로부터의 60개의 상등액 및 293-a4b7 캠페인으로부터의 174개의 상등액이 90%를 초과하는 억제를 나타냈고(n=2), 추가적인 특이성 및 효능 분석에 적용되었다.

[0167] 알파4베타7-형질감염, 알파4베타1-형질감염, 및 알파E베타7-형질감염 293 세포가 제조되었고, 억제 분석법에서 확인된 하이브리도마 상등액으로의 FACS 분석에서 사용되었다. 알파4베타7 형질감염 세포에만 결합하는 것을 나타낸 상등액이 이종이량체-특이적으로 분류되었는데, 이는 이러한 인테그린의 알파4 서브유닛에 대한 항체는

알파4베타1-형질감염 세포에 또한 결합하였을 것이고, 베타7 사슬에 결합한 항체는 알파E베타7-형질감염 세포에 결합하였을 것이기 때문이다. 하이브리도마 상등액을 FACS 분석에 의해 사이노몰구스 원숭이 알파4베타7-형질감염 293 세포에 대한 결합 활성에 대해 또한 분석하였다. CHO-a4b7 캠페인으로부터의 7개의 세포주 및 293-a4b7 캠페인으로부터의 25개의 세포주가 서브-클로닝 및 추가적인 분석용으로 선택되었다.

[0168] 실시예 2: 항체 분석

[0169] 수득된 항체-분비 세포를 클로닝하고, 항체-코딩 핵산을 단리 및 서열분석하였다. 부위-지정 돌연변이유발을 사용하여, 단리된 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 변이체들을 제조하였다. 이러한 항체 및 변이체의 경쇄 및 중쇄의 아미노산 서열이 하기 표 1 및 2에서 제시된다. 본원에서 앞서 논의된 바와 같이, CDR 및 FR 영역의 경계가 하기에 제시된 것들과 다를 수 있는 것으로 인정된다.

표 1

경쇄의 서열 분석

경쇄	FR1	CDR1	FR2
1A10K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTC	RASQGVSSWLA	WYQQKPGMAPKLLIY
11E7K1	EIVMTQSPATLVSVPGETATLSC	RASQTVSSNL	WYQQKPGQAPRLLIY
11E7K2	DIQMTQSPSSLSASIGDRVITTC	RASQGIRNYLA	WYQRKPGKVPKLLIY
2F12K	DIQMTQSPSSVFAVGDRVITTC	RASQGISSWLA	WYQQKPGKAPNLLIY
14E4L	QSVLTQPPSVAAAPGQKVITSC	SGSSSNIGNNYVS	WYQQLPGTAPKLLIY
3A5K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTC	RASQGVISWLA	WYQQKPGMAPKLLIY
10D7K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTC	RASQGVNNWLA	WYQQKPGKAPKLLIF
27D8K	EIVMMQSPATLVSVPGERATLSC	RASQSVTNL	WYQQKPGQAPRLLIY
18A11K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTC	RASQGISSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY
20D7K	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	RASQSVSSYLA	WYQQKPGQAPRLLIY
23H6K	EIVMTQSPATLVSVPGERATLSC	RASQSVNSNL	WYQQKPGQAPRLLIY
27G8L	QSVLTQPPSVSEAPRQRTISC	SGSNSNIGNNPVN	WYQLFPGRAPKLLIY
26C7K	EIVMTQSPATLVSVPGERATLSC	RASQSVSDNL	WYQQKPGQPPRLLIY
26H3K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	QASQDISNYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
19G6K	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITSC	QASQDINTYLN	WYQQKPGKVPKLLIY
22B2K	DVQMTQSPSSLSASVGDRVITTC	QASQDITDYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
24A2K	EVMMTQSPATLVSVPGERATLSC	RASQSVSSNL	WYQQKPGQAFRLLIF
26E9K	ELVMTQSPATLVSVPGERATVSC	RASQSVSSDL	WYQQKPGQAPRLLIY
22F5K	EIVMTQSPATLVSVPGEATLSC	RASQSVSSDL	WYQQKPGQAPRLLIY
26C10K	EIVLTQSPGTLSLSPGEATLSC	RASQTVTSSYLA	WYQQSPSQSPRLLIY
17C8K	EIVMTQSPATLVSVPGERATLSC	RASQSVSSNL	WYQQKPGQAPRLLIY
25C9K	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC	RASQDISWLA	WYQRKPGKAPKVL1Y
19E6L	SYELTQPPSVSVPQQTASITC	SGDKLGDKYAC	WYQQKPGQSPVLIY
26G2k	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTC	RASQDISWLA	WYQQKPGTAPKVL1Y
27G8L (a)	QSVLTQPPSVSGAPRQRTISC	SGSNSNIGNNPVN	WYQLFPGRAPKLLIY
27G8L (b)	QSVLTQPRSVSGAPRQRTISC	SGSNSNIGNNPVN	WYQLFPGRAPKLLIY
26H3K (c)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	QASQDISNYLN	WYQQKPGKAPKLLIY
1A10K (d)	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITC	RASQGVSSWLA	WYQQKPGKAPKLLIY

[0170]

[0171]

<표 1 계속>

경체	CDR2	FR3
1A10K	AASILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
11E7K1	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
11E7K2	AASTLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
2F12K	GASSLQN	GVPLRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
14E4L	DNNKRPS	GIPDRFSGSKSGTSAILDITGLQTDGDEADYYC
3A5K	AASILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
10D7K	ATSSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
27D8K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYFC
18A11K	GASNLES	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFANYYC
20D7K	GASSRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFANYYC
23H6K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
27G8L	HDDLLPS	GVSDRFSGRSGRTSASLAISGLQSEDETYYC
26C7K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
26H3K	DASNLET	GVPSRFSGSGSGTDFFTINTSLQPEDIATYFC
19G6K	DASNLET	GVPSRFSGSGSGTDFFTINTSLQPEDIATYYC
22B2K	DTSNLEA	GVPSRFSGSGSGTDFFTINTSLQPEDIATYYC
24A2K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYCC
26E9K	GASSRAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
22F5K	GASARAT	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC
26C10K	GASTRAT	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
17C8K	GASTRAT	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDFAVYYC
25C9k	SASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC
19E6L	QDSKRPS	GIPERFSGNSGNATLTISGTQAMDEADYYC
26G2k	SASSLQN	GVPSRFSGRGSQDFALTISSLQPEDFATYYC
27G8L (a)	HDDLLPS	GVSDRFSGRSGRTSASLAISGLQSADETYYC
27G8L (b)	HDDLLPS	GVSDRFSGRSGRTSASLAISGLRSADETYYC
26H3K (c)	DASNLET	GVPSRFSGSGSGTDFFTINTSLQPEDIATYFC
1A10K (d)	AASILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC

[0172]

[0173]

<표 1 계속>

경체	CDR3	FR4
1A10K	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK
11E7K1	QQYDYWPPLT	FGGGTRVEIK
11E7K2	QKYDSAPFT	FPGPTKVDIK
2F12K	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK
14E4L	GTWDSSLSAGRV	FGGGTKLTVL
3A5K	QQANSFPWT	FGQGTNVEIK
10D7K	QQVNSFPGT	FGQGTKVEIK
27D8K	QQYNDWPT	FGGGTKVEIK
18A11K	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK
20D7K	QQYDSSPPT	FGGGTKVAIK
23H6K	QQYDDWPPT	FGQGTRLEIK
27G8L	TAWDDSLNGWV	FGGGTKLTVL
26C7K	QQYDDWPT	FGGGTRVEIK
26H3K	QQYDNLPKS	FGQGTKLEIK
19G6K	QQFDNLPT	FGQGTRLEIK
22B2K	QQYDILPYS	FGQGTDLEIK
24A2K	QQYDDWPT	FGGGTKVEIK
26E9K	QQYNNPPLT	FGGGTKVEIK
22F5K	QQYHDWPPLS	FGGGTKVEIK
26C10K	QQYDSSPPT	FGGGTKVEIK
17C8K	QQYDDWPPLT	FGGGTTVEIK
25C9k	QQADSFPT	FGQGTKVEIK
19E6L	QAWSSTVV	FGGGTKLTVL
26G2k	QQADSFPT	FGRGTTKVEIK
27G8L (a)	TAWDDSLNGWV	FGGGTKLTVL
27G8L (b)	TAWDDSLNGWV	FGGGTKLTVL
26H3K (c)	QQYDNLPSS	FGQGTKLEIK
1A10K (d)	QQANSFPWT	FGQGTKVEIK

[0174]

표 2

증쇄의 서열 분석

증쇄	FR1	CDR1	FR2
1A10H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLN	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
11E7H1	QVQLVESGGGLVKPGSRLSRAESVSGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
11E7H2	QVQLVESGGGVQPGRSRLSCAASGFTFS	SYGMH	WVRQAPGKGLEWVA
2F12H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTVT	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
14E4H	QVQLVESGGGLVKPGSRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
3A5H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLN	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
10D7H	QVQLVESGGGLVKPGSRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
27D8H	QVQLVESGGGLVKPGSRLSCAASGFTFS	DNYMS	WIRQAPGKGLEWVS
18A11H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLS	DLSIH	WVRQAPGKGLEWMG
20D7H	QVQLVESGGGLVKPGSRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
23H6H	QVQLVESGGGLVKPGSRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26G2H	QVQLVESGGGLVKPGSRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
27G8H	EVQLVESGGLVQPGSRLSCAASGFTFS	SYWMS	WVRQASGKGLEWVA
26C7H	QVQLVESGGGLVKPGSRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26H3H	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	GYWIG	WVRQMPGKGLEWMG
19G6H	QVQLVESGGDLVKPGSRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWIS
22B2H	EVQLVQSGAEVKEPGESLKISCKGSGYIFT	SYWIA	WVRQLPGKGLEWMG
24A2H	QVQLVESGGDLVEPGSRLSCAASGFTFR	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26E9H	QVQLVESGGGLVKPGSRLSCAASGFTFR	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
19E6H	EVQLLESGGGLVQPGSRLSCAASGFTFS	SYAMS	WVRQAPGKGLEWVS
22F5H	QVQLVESGGGLVKPGSRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
25C9H	QVQLVESGGLVQPGSRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWVS
26C10H	QVQLVESGGGLVKPGSRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQTPGKGLEWVS
17C8H	QVQLVESGGGLVKPGSRLSCAASGFTFS	DYYMS	WIRQAPGKGLEWLS
1A10H(a)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGYTLN	DLSMH	WVRQAPGKGLEWMG
27G8H(b)	EVQLVESGGLVQPGSRLSCAASGFTFS	SYWMS	WVRQASGKGLEWVA

[0175]

<표 2 계속>

증쇄	CDR2	FR3
1A10H	GFDPAEGKIIISAQKFQD	RVTMTDDTSTDATAYMELSSLRSEDSAVYYCAT
11E7H1	YISSSGSAIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQLNNSLRAEDTAVYYCAR
11E7H2	VIWYDGSNKYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLHQMNNSLRAEDTAVYYCAR
2F12H	GFPQDGETIYAQKFQG	RVTMTDDTSTDATAYMELSSLRSEDTAVYYCTT
14E4H	YISNSGSVYVYADSVKG	RFTISRHNAKNSLYLQMNSLRADDTAVYYCAR
3A5H	GFDPAEGKIIISAQKFQD	RVTMTDDTSTDATAYMELSSLRSEDSAVYYCAT
10D7H	YISSTGSAMYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
27D8H	YISSSGSATYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMSSLRAEDTAVYYCAR
18A11H	GFPQDGETIYAQKFQG	RVTMTDDTSTDATAYMELSSLRSEDTAVYYCAT
20D7H	YISSSGSAIYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVFYCAR
23H6H	YISSSGSAMYSADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26G2H	YISSIGSAIHYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
27G8H	NIKQDGSEKYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26C7H	YISRVGSTTYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26H3H	IIPYDSDTRYSPSFQG	QVTISADKSINTAYLQWSSLKASDITAMFYCAS
19G6H	YISSSGSTMYYADSVKG	RFTISRVNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
22B2H	IIDPNDSDTRYSPSFQG	QVTISADKSINTAYLQWSSLKASDITAMFYCAT
24A2H	YISSSGSAIYYADSVKG	RFTISRDNPKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26E9H	YISSSGSTSACDADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
19E6H	AISGSGSTYYADSVKG	RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK
22F5H	YISSTGSTLYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMDSLRADDAAVYYCTR
25C9H	YISSSGSAIHYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
26C10H	YISSSGSAIHYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMDSLRAEDTAVFYCAR
17C8H	YISNSGSAMYYADSVKG	RFTISRDNARNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
1A10H (a)	GFDPAEGKIIISAQKFQD	RVTMTDDTSTDATYVYMLSSLRSEDTAVYYCAR
27G8H (b)	NIKQDGSEKYYADSVKG	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAGDATAVYYCAR

[0177]

[0178]

<표 2 계속>

증쇄	CDR3	FR4
1A10H	LDFSSWFDP	WGQGTLVTVSS
11E7H1	DYSSGWYFDY	WGRGTLVTVSS
11E7H2	EHWNYAFDI	WGQGTMVTVSS
2F12H	ESSSAWFDP	WGQGTLVTVSS
14E4H	DRSSAWDEAFDI	WGQGTMVTVSS
3A5H	LDFSSWFDP	WGQGTLVTVSS
10D7H	EFSGGWSYFDY	WGQGTLVTVSS
27D8H	DYSSGWYYFDY	WGQGTLVTVSS
18A11H	GSSSSWFDP	WGQGTLVTVSS
20D7H	EHSSGYWYFDL	WGRGALVTVSS
23H6H	EYSSGWYYFDY	WGRGTLVTVSS
26G2H	EYSSGWAYFDY	WGQGTLVTVSS
27G8H	EGGYDWNYADYYGMDV	WGQGTTVTVSS
26C7H	DYSSGWYYFDY	WGQGTLVTVSS
26H3H	HRLWLGEFPGPLNI	WGQGTMVTVSS
19G6H	DRSSGLVSFDY	WGQGTLVTVSS
22B2H	HRLWLGTLPGGFYI	WGQGTMVTVSS
24A2H	DFSSGYYYFDY	WGQGTLVTVSS
26E9H	DYSSGWYFDY	WGQGTLVTVSS
19E6H	APYSSSWALGLGMDV	WGQGTTVTVSS
22F5H	EYSSGWFFFDFY	WGQGTLVTVSS
25C9H	EYSSGWAYFDY	WGQGTLVTVSS
26C10H	DHSSGYWYFDL	WGRGTLVTVSS
17C8H	EYSSGWFFFES	WGQGTLVTVSS
1A10H (a)	LDFSSWFDP	WGQGTLVTVSS
27G8H (b)	EGGYDWNYADYYGMDV	WGQGTTVTVSS

[0179]

[0180]

항체들의 아미노산 서열을 유사성에 대해 추가로 분석하였다. 카파 경쇄가 3개의 군으로 분류되었고, 각각의 군에 대해 컨센서스 서열이 생성되었다. 람다 경쇄가 있는 항체가 3개 있었고, 이들은 컨센서스 서열이 생성될 수 있는 관련된 서열 군을 형성하기 위한 서로에 대한 충분한 유사성이 없었다. 생성된 변이체들 중 2개는 람다 경쇄가 변경되었다. 중쇄는 4개의 군으로 분류되었고, 이때 1개의 중쇄가 5번째 군으로 분류되었으며, 컨센서스 서열이 군 1 내지 4에 대해 생성되었다. 이러한 결과가 하기 표 3a 및 3b에서 제시된다; 서열 목록에서 컨센서스 서열이 제시된다. 괄호 안의 숫자는 서열 목록에서의 서열 번호를 가리킨다.

표 3

카파 경쇄에 의한 항체의 분류 및 상응하는 증쇄

카파 군 1 (10개의 구성원)	증쇄 군 (H1 – H5)	카파 군 2 (9개의 구성원)	증쇄 군 (H1 – H5)	카파 군 3 (4개의 구성원)	증쇄 군 (H1 – H5)
20D7K (10)	H1 (38)	11E7K2 (3)	H1 (31)	22B2K (16)	H4 (45)
11E7K1 (2)	H1 (30)	10D7K(7)	H1 (35)	19G6K (15)	H1 (44)
26C10K (20)	H1 (51)	3A5K(6)	H2 (34)	26H3K (14)	H4 (43)
23H6K (11)	H1 (39)	1A10K (1)	H2 (29)	26H3K(c) (27)	H4 (43)
26C7K (13)	H1(42)	25C9K (22)	H1 (50)		
24A2K (17)	H1 (46)	26G2K (24)	H1 (40)		
27D8K (8)	H1 (36)	18A11K (9)	H2 (37)		
22F5 (19)	H1 (49)	2F12K (4)	H2 (32)		
26E9K (18)	H1 (47)	1A10K(d) (28)	H2 (53)		
17C8K (21)	H1 (52)				

[0181]

[0182]

<표 3 계속>

람다 경쇄에 의한 항체의 분류 및 상응하는 증쇄

람다 사슬 (3개의 항체, 컨센서스 없음)	증쇄 군 (H1 – H5)
14E4 (5)	H1 (33)
27G8 (12)	H3 (41)
27G8(a) (25)	H3 (54)
27G8(b) (26)	H3 (54)
19E6 (23)	H5 (48)

[0183]

컨센서스 서열에서의 CDR 경계 (앞서 논의된 바와 같이 변경될 수 있음)는 하기와 같았다: 카파 군 1 CDR1 24-35, CDR2 51-57, CDR3 90-99; 카파 군 2 CDR1 24-34, CDR2 51-56, CDR3 89-97; 카파 군 3 CDR1 24-34, CDR2 50-56, CDR3 89-97; 중쇄 군 1 CDR1 31-35, CDR2 50-66, CDR3 99-110; 중쇄 군 2 CDR1 31-35, CDR2 50-66, CDR3 99-107; 중쇄 군 3 CDR1 31-35, CDR2 50-66, CDR3 99-114; 및 중쇄 군 4 CDR1 31-35, CDR2 50-66, CDR3

99-114.

[0185] 실시예 3: 기능 분석

본 실시예는 항체를 특성화하는데 사용된 다양한 분석법을 기술한다.

HUT78 부착 분석법.

96웰 플레이트를 포스페이트 완충제 (pH 9.0) 내에 희석된 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MAdCAM-1 (또는 코팅 대조군으로서의 유사한 농도의 인간 IgG1)로 하룻밤 동안 4°C에서 코팅함으로써 코팅된 플레이트 (예를 들어, 코스타(Costar)® 3368 96웰 플레이트; 코닝 인코포레이티드 라이프 사이언시스(Corning Incorporated Life Sciences), 매사추세츠주 로웰)를 제조한다. 코팅물을 제거하고, 플레이트를 100 μl 의 3% BSA/PBS로 차단하고, 1시간 이상 동안 실온에서 인큐베이션한다. 플레이트를 행크 밸런스 염 용액(Hank's balanced salt solution) (HBSS)으로 3회 세정한다.

전면성장까지 성장된 HUT78 세포 (유도인자/헬퍼 표현형의 성숙형 T 세포주의 특색을 나타내는 인간 T 세포 림프종 세포주; ATCC TIB 161)를 펠렛화하고, HBSS에서 3× 세정한 후, 50 μl 내의 약 30,000개의 세포가 산출되도록 적합한 농도로 HBSS 내에 재현탁시킨다.

테스트될 항체를 최종 농도의 2배로 희석한 후, 1 mM Mn^{2+} 가 있는 1% BSA를 함유하는 칼슘-프리(free), 마그네슘-프리 HBSS에서 1:4 적정한다. 50 μl 의 항체 적정물 또는 대조군을 V형 바닥 플레이트의 각각의 웰에 첨가한 후, 50 μl 의 HUT78 세포를 첨가한다. 세포 및 항체를 4°C에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 코팅된 플레이트에 첨가하고, 37°C에서 40분 동안 인큐베이션한다. 코팅된 플레이트 상의 세포를, 세정 사이에 HBSS를 털어냄으로써, 실온 HBSS에서 3회 세정한다. 부착성 세포를 -20°C에서 동결-해동시킨 후, 100 μl 의 사이퀀트(CyQuant)® 염료/용해 완충제 (고-처리량 스크리닝 몰레큘러 프로브즈(Molecular Probes)®에서 유용한 형광-기반 세포 정량 분석법에서 사용되는 완충제; 라이프 테크놀로지스 코포레이션(Life Technologies Corporation), 캘리포니아주 칼스배드)를 첨가한다. 각각의 웰로부터의 형광 신호를, 예를 들어 멀티-라벨(multi-label) 마이크로플레이트 판독기인 테칸 제니오스프로(Tecan GENiosPro) (테칸 그룹 리미티드(Tecan Group Ltd.), 스위스 만네도르프)를 사용하여, 485 nm 여기 및 530 nm 방출에서 정량한다.

인간 CD4+ 세포 부착 분석법

플레이트를 인간 MAdCAM-1-Fc 또는 인간 IgG (20 mM 포스페이트 완충제, pH 9.0, 130 mM NaCl 내의 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 100 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 로 4°C에서 하룻밤 동안 코팅한 후, 200 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 차단 시약 (PBS 내의 3% 소 혈청 알부민)으로 실온에서 2시간 이상 동안 차단한다. 그 후, 플레이트를 부착 완충제 (30 mM HEPES, pH 7.4, 120 mM NaCl, 1 mM MnCl_2 , 10 g/mL 인간 IgG)로 3회 세정한다.

테스트될 항체의 일련의 희석물을 제조하고, 플레이트에 첨가한다 (35 $\mu\text{l}/\text{웰}$); 단리된 CD4^+ T 세포 (250,000개의 세포/35 $\mu\text{l}/\text{웰}$)를 첨가하고, 플레이트를 4°C에서 2시간 동안 인큐베이션한다. 부착 완충제로 3회 세정한 후, 플레이트를 -20°C에서 하룻밤 동안 동결시킨다. 검출 시약 (100 $\mu\text{l}/\text{웰}$ 의 사이퀀트® 시약; 라이프 테크놀로지스 코포레이션, 캘리포니아주 칼스배드)을 첨가하고, 플레이트를 37°C에서 45분 동안 인큐베이션한다. 485 nm 여기 및 530 nm 방출에서 형광을 판독함으로써 결과를 결정한다.

인간 CD4+CD45RA- 메모리 T 세포에 결합하는 것에서의 EC50

인간 말초혈 단핵 세포 (PBMC; 예를 들어 포스페이트 완충 염수 + 2% FBS 내의, 동결 및 해동된 PBMC 또는 신선한 PBMC)를 1 mM MnCl_2 가 있거나 없는 (실험에 좌우됨; MAdCAM-1 결합에 Mn^{2+} 가 필요함), HEPES 완충제 (30 mM HEPES + 140 nM NaCl) + 1% BSA에서 세정하여 재현탁시키고, 96웰 플레이트 내로 플레이팅한다 (10^6 개의 세포/웰). 세포를 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 인간 IgG와 함께 30분 동안 열음 상에서 인큐베이션하여, 비-특이적 결합을 차단한다. 그 후, 세포를 96웰 플레이트에서 일련의 비오틴화 항-알파4베타7 항체 희석물과 함께 1시간 동안 열음 상에서 인큐베이션하고 나서, 스트렙타비딘-피코에리트린 (PE; 잭슨 이뮤노리서치 래버리토리즈 인코포레이티드(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.), 펜실베이니아주 웨스트 그로브)의 1:100 희석물, 4 μl CD3-피시픽 블루(Pacific Blue), CD4-PerCP-Cy5.5 및 CD45RA-풀루오레세인 이소티오시아네이트 (FITC) (비디 바이오사이언시즈(BD Biosciences), 캘리포니아주 산호세)를 100 μl 의 최종 부피로 첨가하고, 추가로 1시간 동안 열음 상에서 인큐베이션한다. 세포를 HEPES 완충제 (상응하여 MnCl_2 존재 또는 부재)로 2회 세정한 후, 200

μl HEPES 완충제 + 0.5% 파라포름알데히드 (마찬가지로, 상응하여 MnCl_2 존재 또는 부재)에서 고정시킨다. 양성 알파4베타7 항체 결합 CD4+CD45RA- 메모리 T 세포의 백분율을 형광 활성화 세포 분류기 (FACS), 예를 들어, BD™ LSR II 벤치탑(benchtop) 유동 세포측정기 (비디 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산호세)를 사용하여 결정한다. IC50은 CD4CD45RA- 메모리 세포 상의 알파4베타7 부위의 50%가 알파4베타7 항체에 의해 결합되는 알파4베타7 항체의 농도로서 정의된다.

[0196] 인간 CD4+CD45RA- 메모리 T 세포에 대한 MAdCAM-1-Fc 결합을 차단하는 것에서의 IC50

PBMC (상기 기술된 바와 같은 신선한 PBMC 또는 동결 PBMC)를 HEPES 완충제 (30 mM HEPES + 140 nM NaCl) + 1 % BSA 및 1 mM MnCl에서 세정하고, 10^7 개의 세포/ mL 의 최종 농도로 재현탁시킨다. 상기 기술된 바와 같이 세포를 차단시킨다; 차단 후, 세포를 96웰 플레이트에서 일련의 항-알파4베타7 항체 (또는 적합한 대조군) 희석물과 함께 30 분 동안 얼음 상에서 인큐베이션하고, $0.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 비오틴화 MAdCAM-1-Fc 단백질과 함께 추가로 1시간 동안 인큐베이션한다.

HEPES 완충제 + 1 mM MnCl에서 2회 세정한 후, 세포를 최종 부피 $100 \mu\text{l}$ 의 상기 기술된 바와 같은 스트렙타비딘-PE의 1:100 희석물, $4 \mu\text{l}$ CD3-퍼시픽 블루, CD4-PerCP-Cy5.5 및 CD45RA-FITC로 처리한다. 얼음 상에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 세포를 HEPES 완충제 + 1 mM MnCl으로 2회 세정하고, $200 \mu\text{l}$ 완충제 + 0.5% 파라포름알데히드에서 고정시킨다. 양성 MAdCAM-1-Fc 결합 CD4+CD45RA- 메모리 T 세포의 백분율을, 상기 기술된 바와 같이, 형광 활성화 세포 분류기 (FACS)에 의해 결정한다. IC50은 CD4CD45RA- 메모리 세포 상의 알파4베타7에 대한 MAdCAM-1-Fc 결합이 50%만큼 억제되는 알파4베타7 항체의 농도로 정의된다.

[0199] 활성화된 T 세포 상에서의 레티노산에 의한 알파4베타7 유도

단리된 인간 PBMC를 7일 동안 레티노산 (1000 nM)의 존재 또는 부재 하에 항 CD3 (플레이트에 결합됨, $5 \mu\text{g}/\text{mL}$), 인간 IL-2 ($20 \text{ ng}/\text{mL}$)에 의해 활성화시킨다. 활성화된 세포를 염색 완충제 (PBS + 0.5% BSA 및 1 mM MnCl)로 2회 세정하고, $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 인간 Ig와 함께 30분 동안 인큐베이션하여, 비-특이적 결합을 차단한다. 먼저 세포를 일련의 항-알파4베타7 항체 희석물에서 30분 동안 얼음 상에서 인큐베이션한 후, $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 비오틴화 MAdCAM-1-Fc로 추가로 30분 동안 염색한다. 염색 완충제로 2회 세정한 후, 세포를 스트렙타비딘-PE (1:1000)로 30분 동안 염색한다. 형광 활성화 세포 분류에 의해, 예를 들어, 팩스캘리버(FACSCalibur)™ (비디 바이오사이언시즈, 캘리포니아주 산호세)로 세포를 분석한다. 이러한 방식으로 제조된 세포는 경쟁 분석법과 같은 추가적인 실험에서 사용될 수 있다.

[0201] 경쟁 분석법

[0202] 실질적으로 문헌 [Fiscella, et al., Nature Biotechnology 21:302-307; 2003]에 기술된 바와 같이, 형광측정 미세부피 분석법 기술 또는 FMAT에 의해 알파4 베타7 발현 세포에 결합하는 것에서 다른 항-알파4베타7 및/또는 베타7 항체와 경쟁하는 능력에 대해 알파4베타7 항체를 또한 시험하였다. 간략하게, 예를 들어 알파4를 코딩하는 핵산 및 베타7을 발현하는 핵산으로 세포를 일시적으로 공동-형질감염시킴으로써, 높은 수준의 알파4베타7을 발현하는 세포를 제조한다. 안정적인 형질감염에 적합한 세포 및 프로토콜을 사용하여, 유사한 방식으로 안정적인 세포주가 제조된다. 형질감염된 세포를, 예를 들어, FACS에 의해, 알파4에 대한 항체, 베타7에 대한 항체, 및/또는 리간드 (즉, MAdCAM-1, 예를 들어, MAdCAM-1-Fc 융합 단백질)를 사용하여 스크리닝한다. 재현 가능한, 상승된 수준의 알파4베타7 발현이 있는 클론성 세포주를 산출하기 위해, 여러 사이클의 분류 및 선별이 세포에 진행될 수 있다.

[0203] S250N 돌연변이체에 대한 결합

[0204] 항체를 베타7 사슬 내의 S250N 점 돌연변이체를 인식하는 능력에 대해 또한 평가하였고, 이는 ACT-1 결합에 결정적인 것으로 공지되어 있다 (문헌 [J Immunol. 159:1497, 1997]). 베타 사슬 내에 S250N 돌연변이를 갖는 알파4베타7을 일시적으로 공동-발현하는 293 세포 (ref)를 높은 수준의 알파4베타7을 발현하는 세포의 제조에 대해 앞서 기술된 것과 유사한 방식으로 제조한다.

[0205] 간략하게, 총 1×10^6 개의 프로파일용 형질감염 세포를 세포-해리 용액을 사용하여 수집하고, 1000 rpm에서 5분 동안 침강시킨다. 그 후, 세포를 30분 내지 1시간 동안 4°C 에서 진탕시키면서 0.5 mL 차단 완충제 (1% 염소 혈청/PBS)로 차단시킨다. MAdCAM-1-Fc 염색을 위해, 세포를 Mn^{2+} 완충제 (30 mM HEPES + 1% 염소 혈청 내의 1 mM MnCl_2)에서 진탕시키면서 4°C 에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 그 후, 세포를 1000 rpm/5분으로

침강시키고, 0.5 mL의 신선한 차단 완충제를 10 µg/mL의 1차 항체와 함께 첨가하고 나서, 진탕시키면서 30분 내지 1시간 동안 4°C에서 인큐베이션한다. 4 mL의 저온 PBS (각각의 세정)로 2회 세정한 후, 0.5 mL 차단 완충제 내의 2차 항체 (즉, 염소-항 IgG-피코에리트린-접합 항체; 서던 바이오텍(Southern Biotech), 1:250 희석 또는 0.1 µg/10⁶개의 세포)를 첨가하고, 세포를 20-30분 동안 4°C에서 인큐베이션한다. 세포를 마지막으로 4 mL의 저온 PBS로 1회 세정한 후, 프로파일을 위해 0.5 mL의 FACS 완충제 내에 재현탁시킨다.

[0206] 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP)에 대한 결합

α 4 서브유닛의 SNP 분석을 위해, 상이한 인종 군을 나타내는 90명의 개체 (180개의 홀배수체 계놈)로부터의 α 4 유전자 엑손 1-28을 중합효소 연쇄 반응 (PCR)에 의해 증폭시키고, 이어서 서열분석하였다. α 4 유전자의 코딩 영역 내의 3개의 후보 SNP가 확인되었고, 이들 중 하나는 아미노산 변화를 초래하였다 (Arg878Gln). 유사하게, β 7 서브유닛 SNP 분석을 위해, 상이한 인종 군을 나타내는 90명의 개체 (180개의 홀배수체 계놈)로부터의 β 7 유전자 엑손 2-15의 코딩 영역을 PCR 증폭시키고, 이어서 서열분석하였다. 3개의 SNP가 확인되었고, 이들 중 2개가 아미노산 변화를 초래하였다. 사내 SNP 분석 데이터를 NCBI 데이터베이스의 정보와 비교하였다 (NCBI: National Center for Biotechnology Information - 미국 국립보건원 (NIH)의 국립 의학 도서관 (NLM)의 산하 기관). α 4 서브유닛 내의 Gln878Arg를 초래하는 A/G 돌연변이만 높은 빈도로 발생한다 - 사내 SNP 및 공공 데이터베이스에서 각각 20% 또는 30%. 다른 SNP들은 낮은 빈도로 발생한다. 이러한 정보가 하기 표 4에서 요약된다.

표 4

인간 베타7 및 알파4에서의 SNP 빈도				
	SNP	대체 대립유전자 빈도 - NCBI 데이터베이스	대체 대립유전자 빈도 - 사내 분석	위치
베타7	E97V	NA	A(0.989)/T(0.019)	세포외
	R213S	C(0.975)/A(0.25)	관찰되지 않음	세포외
	G611E	NA	관찰되지 않음	세포외
	G629S	NA	A(0.989)/T(0.019)	세포외
	H672Y	NA	관찰되지 않음	세포외
알파4	V824A	T(0.972)/C(0.028)	관찰되지 않음	세포외
	Q878R	A(0.648)/G(0.352)	A(0.783)/G(0.217)	세포외
	R1007S	NA	관찰되지 않음	세포내

[0208]

알파4 및 베타7 양쪽의 세포외 도메인에서의 아미노산 변경 SNP (α 4b7(E97V); α 4b7(R213S); α 4b7(G629S; α 4(V824A)b7; α 4(Q878R)b7)를 나타내는 점 돌연변이체 구축물이 생성되었다. 각각의 점 돌연변이체 구축물을 야생형 파트너 발현 구축물과 함께 293 세포에 형질감염시켰다. 형질감염된 293 세포를 먼저 1 µg/mL의 인간 IgG 또는 항-알파4베타7 항체로 염색하고, PBS로 세정하고, 피코에리트린 접합 2차 항체 염소-항 인간 IgG로 염색하였다. PBS로의 세정 후, 형광 활성화 세포 분류에 의해, 예를 들어, 팩스캘리버™ (비디바이오사이언시스, 캘리포니아주 산호세)로 세포를 분석하였다. 각각의 항체 염색에 대한 형광 염색 강도 (기하 평균)가 하기 표 5에서 지시된다.

표 5

SNP에 대한 결합						
	wt	E97V	R213S	G629S	V824A	Q878R
IgG	8	7	7	7	7	7
1A10	122	135	31	80	102	70
3A5	124	135	31	80	110	71
2F12	129	134	37	80	112	73
18A11	92	105	30	63	82	56
22B2	97	108	58	65	85	58
26H3	93	106	49	62	82	55
27G8	102	116	59	68	88	58
26G2	99	113	38	64	86	58
17C8	93	96	49	58	74	51
19G6	94	108	46	59	67	46
25C9	96	106	33	59	77	51

[0210]

[0211]

이러한 결과들은 테스트된 항체 모두가 알파4베타의 공지된 SNP에 결합하였음을 가리켰다.

[0212]

여러 상이한 분석법에서의 다양한 알파4베타7 이종이량체 특이적 항체의 활성이 하기 표 6에서 비교된다.

표 6

알파4베타7에 대한 항체의 특성화

항체	HUT78 부착 IC50 (ng/ml)	MAdCAM-1 경쟁 IC50 (ng/mL)	CD4+CD45RA- 세포 결합 EC50 (ng/mL)	a4b7(S250N) 결합
1A10	6.1	6.2	4.9	-
3A5	7.5	6.2	5.6	-
2F12	11.4	4.6	3.3	-
18A11	7.4	7.3	4.7	-
22B2	3.7	23.2	5.1	-
26H3	8.9	14.1	9.3	-
27G8	14.9	8.7	6.3	-
26G2	6.9	99.6	32.6	+
17C8	6.8	31.1	22.9	+
19G6	12.2	103.3	32.9	+
25C9	13.7	77.6	NA	+

[0213]

솔러(Soler) 등이 베돌리주맙으로 공지된 인간화 항-알파4베타7 항체의 결합 특이성을 보고하였다 (문헌 [J Pharmacol Exp Ther 330:864; 2009]). 이러한 항체는 메모리 CD4+ T 림프구에 대한 EC50이 $0.042 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($42 \text{ ng}/\text{mL}$)인 것으로 보고되었다. 또한 베돌리주맙은 알파4베타7hi 메모리 T 세포에 대한 가용성 MAdCAM-1의 결합을 $0.034 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($34 \text{ ng}/\text{mL}$)의 IC50으로 억제하였다. 대조적으로, 표 6에 제시된 항체들 중 다수는 메모리 T 세포 (즉, CD4+CD45RA- 세포)에 대한 EC50이 $10 \text{ ng}/\text{mL}$ 미만이고, 모두 EC50이 $35 \text{ ng}/\text{mL}$ 미만이다 (또한 모두 이러한 분석법에서 EC50이 $0.1 \text{ ng}/\text{mL}$ 초과이다). 추가적으로, 표 6에 제시된 항체들 중 몇몇은 $10 \text{ ng}/\text{mL}$ 미만의 MAdCAM 경쟁 분석법에서의 IC50을 나타냈고, 다수가 $30 \text{ ng}/\text{mL}$ 미만의 IC50을 나타냈다 (또한 모두 이러한 분석법에서 $0.1 \text{ ng}/\text{mL}$ 초과의 IC50을 나타냈다). 솔러 등이 알파4베타7의 S250N 돌연변이체에 결합하는 베돌리주맙의 능력을 언급하지 않았지만, 베돌리주맙이 유래되는 뮤린 항체 ACT-1이 S250N 돌연변이체에 결합할 수 없는 것으로 공지되어 있고 (문헌 [Tidswell et al., J Immunol 159:1497; 1997]), 솔러 등에 따르면, 베돌리주맙 및 ACT-1은 동일한 항원 특이성을 나타낸다. 따라서, 표 6에 제시된 여러 항체들과 대조적으로, 베돌리주맙 또한 S250N 돌연변이체에 결합하지 않는다.

[0215]

실시예 4: 추가적인 분석

[0216]

상기 언급된 기능 분석법에서의 성질들이 상이한 여러 대표적인 항체들이 하기 기술된 바와 같은 추가적인 분석 용으로 선택되었다.

[0217]

인간 a4b7에 대한 결합 친화력

[0218]

인간 항-알파4베타7 항체의 세포 결합 친화력을 측정하기 위해, 용액 상에서의 결합 이벤트를 측정하는 키네틱 익스클루전 어세이(Kinetic Exclusion Assay)를 사용하여 평형 해리 상수 K_d 를 계산할 수 있다. 실질적으로 기존에 문헌 [Xie et al. J. Imm. Methods 304:1 (2005)] 및 [Rathanaswami et al. Anal. Biochem. 373:52 (2008)]에 기술된 바와 같이, 키넥사® 테크놀로지(KinExA® Technology) (사파다인 인스트루먼츠, 아이다호주 보이시)가 사용되었다. 간략하게, 인간 알파4베타7을 발현하는 HUT78 세포를 약 50^6 개의 세포/ mL 에서 약 400개의 세포/ mL 로 3분의 1 적정한 후, 4°C 에서 18시간 동안 2 또는 30 pM의 mAb 2F12 또는 18A11 및 17C8에 대한 30 또는 500 pM의 최종 농도로 평형화시켰다. 평형 시 상등액 내에 남아 있는 유리 항체를 상등액을 염소 항-인간 Fc로 예비-코팅된 PMMA 비드에 통과시킴으로써 키넥사® 테크놀로지에 의해 측정하고, 염소 항-인간 (H+L) Cy5로 검출하였다 (실질적으로, 문헌 [Rathanaswami et al. Biochem Biophys Research Commun:1004 (2005)]에 기술된 바와 같음). 소정의 곡선 모두를 동시에 단일 K_d 값에 피팅시키는 "n-곡선 분석"에 의해 키넥사® 소프트웨어를 사용하여 평형 해리 상수 (K_d)가 수득된다 ([Rathanaswami et al. 2005, 상기 문헌] 및 [Xie et al., 상기 문헌]); 결과가 하기 표 7에서 제시된다.

표 7

항체의 결합 친화력

항체	Kd (pM)	비율 (로우(low) Ab)	% 오차	Kd 로우	Kd 하이(high)
2F12	4.56	0.44	3.80	1.94	11.12
18A11	0.90	2.22	4.40	0.23	2.29
17C8	29.36	1.02	3.58	12.09	74.53

[0219]

[0220] 이러한 항체들은 0.05 pM을 초과하지만, 80 pM 미만, 15 pM 미만 또는 5 pM 미만인 키넥사® 분석법에서의 Kd를 나타냈다.

PK/PD 특성

[0222] 수컷 사이노몰구스 원숭이에서의 3개의 완전히 인간형인 항-알파4베타7 항체의 단일-용량 약동학 (PK) 및 약역학 (PD) 연구를 정맥내 (IV; 5 mg/kg) 또는 피하 (SC; 0.5 또는 5 mg/kg) 투여 후에 수행하였다. 5 mg/kg IV 후 중추 순환에서의 유사한 초기 PK 노출 (C_0 ; 제0시의 농도) 및 분포가 관찰되었다. SC 투여 후, $C_{\text{최대}}$ (혈청 내의 최대 농도) 및 AUC (농도-시간 곡선하 면적)는 3개의 항체 모두에 대해 0.5-5 mg/kg SC 용량 범위 내에서 용량-비례를 나타냈다. 테스트된 3개의 항체에 대한 SC 후의 절대 생체이용률은 44 내지 68% 범위였다.

[0223] 항체 처치 전후의 T 세포 상의 유리 알파4베타7을 PE-접합 항-알파4베타7 항체 27G8에 의해 정량하였다. 항체 처치 전후에 10 mg/ml의 테스트되는 항체의 존재 하에 PE-접합 항-알파4베타7 항체 27G8로 염색함으로써 배경 수준을 조절하였다. 각각의 항체에 대해 처치전과 비교된 유리 알파4베타7 부위의 백분율에 의해 분별 포화가 결정되었다. CD4-PerCP, CD99-APC 및 CD28-FITC가 나이브(naive), 중심 메모리 및 이팩터 메모리 세포를 구별하는데 사용되었다. 사이노몰구스 메모리 세포 집단에서의 가변성 및 제한된 분석법 감도로 인해 나이브 T 세포 상의 알파4베타7의 분별 포화가 제시되었다. 18A11 처치에 대해, 3가지 투여량 군 모두 제1일부터 제14일까지 계속 포화 상태였다. 제29일에, 3가지 군 모두 커버리지(coverage)가 손실되었다. 2F12 및 17C8 처치 양쪽에 대해, 낮은 투여량 (0.5 mg/kg) 군에서 제14일에 표적 커버리지의 손실이 관찰되었다.

[0224] 유리 알파4베타7 검출에 더하여, 10 mg/ml 항체의 부재 또는 존재 하에 PE-접합 항-인간 항체 A35로 염색함으로써 표적 포화를 또한 결정하였다. 10 mg/ml 항-알파4베타7 항체와 함께 샘플을 예비-인큐베이션한 후 항-인간 항체로 염색함으로써 전체 알파4베타7 부위가 추정되었다. 각각의 샘플에 대해 항-알파4베타7 항체가 차지한 전체 알파4베타7 부위의 백분율에 의해 표적 포화가 결정되었다. 3개의 완전히 인간형인 항-알파4베타7 항체가 5 mg/kg IV 후 14일 이내에 81 내지 100%의 평균에서 유지된 알파4베타7의 포화를 나타냈다.

[0225] 직접적인 $E_{\text{최대}}$ 모델을 사용하여 혈청 항-알파4베타7 항체 농도 및 상응하는 알파4베타7 수용체 포화 데이터에 대해 PK/PD 모델링을 수행하였다. 모델에서 추정된 PD 파라메터는 92%의 $E_{\text{최대}}$ (최대 알파4베타7 수용체 포화), 52 ng/ml의 EC_{50} ($E_{\text{최대}}의 50\%$ 가 도달되는 항-알파4베타7 항체 농도), 및 18%의 E_0 (초기 알파4베타7 수용체 포화)였다. 3개의 항체 모두 사이노몰구스 원숭이에서 약 3-5일의 평균 $t_{1/2}$ 로 알파4베타7 수용체 포화에 대해 강력한 생체내 PD 효과를 나타냈다.

서 열 목 록

[서열목록 전자파일 첨부](#)