



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년05월31일

(11) 등록번호 10-2404285

(24) 등록일자 2022년05월27일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/> <i>C07K 16/18</i> (2006.01) <i>G01N 33/543</i> (2006.01)<br/> <i>G01N 33/558</i> (2006.01) <i>G01N 33/74</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/> <i>C07K 16/18</i> (2013.01)<br/> <i>G01N 33/54306</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-7014700</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2014년11월06일<br/>         심사청구일자 2019년11월06일</p> <p>(85) 번역문제출일자 2016년06월01일</p> <p>(65) 공개번호 10-2016-0068988</p> <p>(43) 공개일자 2016년06월15일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2014/064327</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2015/069880<br/>         국제공개일자 2015년05월14일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>         61/900,942 2013년11월06일 미국(US)<br/>         (뒷면에 계속)</p> <p>(56) 선행기술조사문헌<br/>         W02011097539 A1<br/>         J Clin Endocrinol Metab,<br/>         88(7):3401-3408(2003)</p> | <p>(73) 특허권자<br/>         아스튜트 메디컬 인코포레이티드<br/>         미국 캘리포니아 92121 샌디에고 제너럴 아토믹스<br/>         코트 3550, 빌딩 02/620</p> <p>(72) 발명자<br/>         비제인드런, 라비, 에이.<br/>         미국 캘리포니아주 92130 샌디에이고 웨일 런 스트리트 6290<br/>         벤카태주배래오, 스리랫자<br/>         미국 캘리포니아주 90505 토런스 켄트 애비뉴 23021</p> <p>(74) 대리인<br/>         특허법인아주</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 20 항

심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 생물학적 샘플에서 개선된 성능을 갖는 IGFBP7에 대한 분석

### (57) 요약

본 발명은 특히 신장 손상의 평가에서 사용될 때 개선된 임상적 성능을 지니는 IGFBP7 면역분석을 제공한다. 면역분석은, 생물학적 유체와 같은 복잡한 임상 표본에서 사용될 때, 그리고 특히 측방 유동 시험 장치와 같은 빠른 분석 방식에서 사용될 때 개선된 분석 성능을 나타내는 항체 및 항체쌍의 선택 및 사용에 의존한다.

(52) CPC특허분류

**G01N 33/558** (2021.08)

**G01N 33/74** (2013.01)

C07K 2317/34 (2013.01)

G01N 2800/347 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/054,324 2014년09월23일 미국(US)

62/064,380 2014년10월15일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

인간 IGFBP7에 결합하는 항체로서,

- (a) 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 및 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역; 또는
- (b) 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역을 포함하는, 항체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 상보성 결정 영역은 카바트(Kabat)에 따라 정의되는, 항체.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 항체는,

- (a) 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역 및 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역; 또는
- (b) 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는, 항체.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항체는 단클론성 항체인, 항체.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 신호 발생 구성요소에 컨쥬게이션되는, 항체.

#### 청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 고체 지지체 상에 고정되는, 항체.

#### 청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항체는 토끼 항체, 마우스 항체, 닭 항체, 염소 항체, 양 항체, 당나귀 항체, 인간 항체, 라마 항체 또는 카멜리드 항체인, 항체.

#### 청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항체를 암호화하는 핵산.

#### 청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항체를 발현하는 항체-발현 세포주.

#### 청구항 10

인간 IGFBP7의 검출용의 키트로서,

상기 키트는 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항체를 포함하고,

상기 키트는, 생물학적 샘플 내 IGFBP7의 존재 또는 양과 관련된 검출 가능한 신호를 발생하도록 구성된, 측방 유동 장치(lateral flow device)와 같은 일회용 장치(disposable device)를 포함하는, 키트.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 항체는 상기 일회용 장치와는 별도의 용기에 제공되는, 키트.

#### 청구항 12

제10항에 있어서, 상기 항체는 상기 일회용 장치 내에서 표면에 고정되는, 키트.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 상기 키트는 인간 IGFBP7의 검출을 위한 샌드위치 항체쌍을 제공하는 제1 항체와 제2 항체를 포함하고,

상기 제1 항체는 서열번호 11의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 및 서열번호 12의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역을 포함하고,

상기 제2 항체는 서열번호 9의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역 및 서열번호 10의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역의 3개의 상보성 결정 영역을 포함하는, 키트.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 키트는 상기 검출 가능한 신호를 IGFBP7의 농도에 관련짓기 위한 교정부(calibration)를 더 포함하는, 키트.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 교정부는 전자 메모리 디바이스 상에 제공되는 교정 곡선인, 키트.

#### 청구항 16

제13항에 있어서, 상기 제1 항체 및 상기 제2 항체의 각각은 시험관내 진단에서 시약으로서 사용되는 시약으로서 제공되는, 키트.

#### 청구항 17

제10항에 있어서, 상기 키트는 상기 신호를 제공하는 분석 방법을 수행하도록 구성되며, 상기 분석 방법에서 상기 IGFBP7의 최소 검출가능 농도는 20ng/ml 이하인, 키트.

#### 청구항 18

생물학적 샘플 내 인간 IGFBP7의 존재 또는 양을 결정하기 위한 방법으로서,

면역분석(immunoassay)을 수행하는 단계를 포함하되, 상기 면역분석을 수행하는 단계는,

상기 생물학적 샘플을 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 항체와 접촉시키는 단계,

상기 항체에 대한 상기 인간 IGFBP7의 결합을 검출하는 단계, 및

검출된 결합을 상기 인간 IGFBP7의 상기 존재 또는 양에 관련시키는 단계를 포함하는, 생물학적 샘플 내 인간 IGFBP7의 존재 또는 양을 결정하기 위한 방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 방법은,

상기 생물학적 샘플을 일회용 장치에 적용시키는 단계로서, 제1 항체 및 제2 항체가 포함하는 샌드위치 복합체가 상기 일회용 장치의 사전 결정된 구역에 고정되는, 상기 적용시키는 단계, 및

검출 가능한 신호를 제공하기 위하여, 고정된 상기 샌드위치 복합체를 검출하는 검출 기기에 상기 일회용 장치를 삽입하는 단계를 더 포함하되,

신호 발생 구성요소가 상기 제1 항체 및 제2 항체 중 하나에 컨쥬게이션되고,

상기 생물학적 샘플은 상기 일회용 장치에 반응 혼합물을 적용시킴으로써 상기 일회용 장치에 적용되고, 상기 반응 혼합물은 상기 생물학적 샘플 및 상기 신호 발생 구성요소에 컨쥬게이션된 상기 항체를 포함하고. 그리고

상기 신호 발생 구성요소에 컨주게이션되지 않은 상기 항체는 상기 일회용 장치의 상기 사전 결정된 구역에 고정되는, 생물학적 샘플 내 인간 IGFBP7의 존재 또는 양을 결정하기 위한 방법.

#### 청구항 20

제19항에 있어서, 상기 제1 및 상기 제2 단클론성 항체의 각각은 토끼 항체, 마우스 항체, 닭 항체, 염소 항체, 양 항체, 당나귀 항체, 인간 항체, 라마 항체 및 카멜리드 항체로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는, 생물학적 샘플 내 인간 IGFBP7의 존재 또는 양을 결정하기 위한 방법.

#### 청구항 21

삭제

#### 청구항 22

삭제

#### 청구항 23

삭제

#### 청구항 24

삭제

#### 청구항 25

삭제

#### 청구항 26

삭제

#### 청구항 27

삭제

#### 청구항 28

삭제

#### 청구항 29

삭제

#### 청구항 30

삭제

#### 청구항 31

삭제

#### 청구항 32

삭제

#### 청구항 33

삭제

#### 청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001]

**관련 출원과의 상호 참조**

[0002]

본 출원은 2013년 11월 6일자로 출원된 미국 가출원 특허 제61/900,942호, 및 2014년 9월 23일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/054,324호, 및 2014년 10월 15일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/064,380호의 유익을 주장하며, 각각의 이들 기초출원은 모든 표, 도면 및 청구범위를 포함하는 그의 전문이 본 명세서에 포함된다.

**배경 기술**

[0003]

본 발명의 배경기술의 다음의 논의는 단지 본 발명을 이해함에 있어서 독자에게 도움을 주기 위한 것이며, 본 발명에 대한 선행 기술을 기재하거나 또는 구성하는 것으로 용인되지 않는다.

[0004]

IGFBP7(인간 전구체 스위스 프롯(Swiss Prot) 등재 Q16270)은 조직 내 인슐린-유사 성장 인자 발현의 조절에 수반되고, IGF의 수용기에 대한 그의 결합을 조절하는 분비 단백질이다. 또한 프로스타사이클린 생성 및 세포 접착을 자극하는 것으로 보고된다. IGFBP7은 세포주기의 G1 기에서의 지연을 야기하며, 세포자멸사를 증가시키는 IGF 독립적 메커니즘을 통해 전립선암 및 유방암 세포주의 성장 및 콜로니 형성을 억제한다. IGFBP7는 광범위한 정상 인간 조직에서 발현되며, 이는 보통 전립선, 유방, 결장 및 폐 유래의 암세포주에서 감소된 발현을 나타낸다.

[0005]

추가로, W02011/097539 및 W02011/075744(이들 각각은 모든 표, 도면 및 청구범위를 포함하는 그의 전문이 본 명세서에 참고로 포함됨)는 개별적으로 그리고 다중마커 패널에서 대상체의 신장 상태를 평가하기 위한 IGFBP7의 용도를 기재한다. 특히, 면역분석에 의해 측정되는 IGFBP7 수준은 신장 상태의 위험 층화(risk stratification), 진단, 병기 결정, 예후, 분류 및 모니터링과 상관관계가 있는 것으로 나타난다.

[0006]

면역분석과 같은 특이적 결합으로부터 얻은 신호는 하나 이상의 결합 중(예를 들어, 항체)과 표적 생체분자(즉, 분석물) 및 항체가 결합하는 필수적 에피토프(들)를 함유하는 폴리펩타이드 사이에 형성된 복합체의 직접적 결

과이다. 면역분석은 종종 분석물을 "검출"할 수 있지만; 항체 에피토프는 약 8개 아미노산이기 때문에, 해당 폴리펩타이드가 분석에서 사용되는 항체 또는 항체들에 대한 결합에 필수적인 에피토프(들)를 함유하는 한, 관심 대상의 마커를 검출하도록 구성된 면역분석은 또한 마커 서열과 관련된 폴리펩타이드를 검출할 것이다. 이러한 분석이 전장 바이오마커를 검출할 수 있고, 분석 결과는 관심 대상의 바이오마커의 농도로서 표현될 수 있지만, 분석으로부터의 신호는 실제로 샘플 내에 존재하는 모든 이러한 "면역반응성" 폴리펩타이드의 결과이다. 이러한 결합 분석은 또한 추가적인 중, 예컨대 결합 단백질, 수용기, 헤파린, 지질, 당 등에 복합체화되는 생물학적 샘플 내에 존재하는 면역반응성 폴리펩타이드를 검출할 수 있는데, 단, 해당되는 추가적인 중은 결합종과 표적 생체분자 간의 결합을 방해하지 않는다. 그러나, 전형적으로 특이적 결합 분석은 정제된 분석물을 이용하여 제형화되며, 복합체 형성 및 단편화 패턴은 고려되지 않는다. 이는 이러한 추가적인 결합 중의 동일성이 알려지지 않은 경우에 특히 그러하다.

## 발명의 내용

- [0007] 본 발명의 목적은 특히 신장 손상 평가에서 사용될 때, 개선된 임상적 성능을 지니는 IGFBP7 면역분석을 제공하는 것이다. 구체적으로, 본 발명자들은 생물학적 유체와 같은 복잡한 임상 표본에서 사용될 때, 그리고 특히 빠른 분석 방식에서 사용될 때 개선된 분석 성능을 나타내는 항체 및 항체쌍의 선택 및 사용을 기재한다.
- [0008] 제1 양상에서, 본 발명은 인간 IGFBP7에 특이적으로 결합하고 샌드위치 면역분석에서 사용하기에 적합한 단클론성 항체에 관한 것이다. 항체는 LIWNKVKRGHYGVQRTELL PGDRDNL(서열번호 1) 또는 SSSSSDTCGPCEPASCPLP(서열번호 2)로 이루어진 폴리펩타이드에 특이적으로 결합한다.
- [0009] 관련된 양상에서, 본 발명은 인간 IGFBP7에 특이적으로 결합하고 샌드위치 면역분석에서 사용하기에 적합한 항체쌍에 관한 것이며, 항체쌍은 LIWNKVKRGHYGVQRTELLPGDRDNL(서열번호 1)로 이루어진 폴리펩타이드에 특이적으로 결합된 제1 단클론성 항체 및 SSSSSDTCGPCEPASCPLP(서열번호 2)로 이루어진 폴리펩타이드에 특이적으로 결합된 제2 단클론성 항체를 포함한다.
- [0010] 다른 관련된 양상에서, 본 발명은 인간 IGFBP7에 특이적으로 결합하고 샌드위치 면역분석에서 사용하기에 적합한 단클론성 항체에 관한 것이다. 상기 항체는 IGFBP7의 입체배좌적 에피토프에 특이적으로 결합한다. 입체배좌적 에피토프는 순차적으로는 불연속이지만 IGFBP7 단백질 내 3차원 공간에서 함께 밀접해 있는 잔기에 의해 형성된다. 1D6로서 지칭되는 이러한 항체의 예는 이하에 기재된다.
- [0011] 관련된 양상에서, 본 발명은 인간 IGFBP7에 특이적으로 결합하고 샌드위치 면역분석에서 사용하기에 적합한 항체쌍에 관한 것이며, 항체쌍은 IGFBP7의 입체배좌적 에피토프에 특이적으로 결합하는 제1 단클론성 항체 및 LIWNKVKRGHYGVQRTELLPGDRDNL(서열번호 1) 또는 SSSSSDTCGPCEPASCPLP(서열번호 2)로 이루어진 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 제2 단클론성 항체를 포함한다.
- [0012] 특정 실시형태에서, 본 발명의 항체는 (i) 서열번호 9의 아미노산 서열 또는 서열번호 9에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 및 (ii) 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 서열번호 10에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 중 하나 또는 둘 다를 포함하되, 항체는 인간 IGFBP7에 특이적으로 결합한다. 바람직한 실시형태에서, 항체는 본 명세서에서 IC9E4.1로서 지칭되는 것이다.
- [0013] 다른 실시형태에서, 본 발명의 항체는 (i) 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 11에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 및 (ii) 서열번호 12의 아미노산 서열 또는 서열번호 12에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 중 하나 또는 둘 다를 포함하되, 항체는 인간 IGFBP7에 특이적으로 결합한다. 바람직한 실시형태에서, 항체는 본 명세서에서 1D6으로서 지칭되는 것이다.
- [0014] 특정 실시형태에서, 본 발명의 항체쌍은 (i) 제1 항체로서, (i) 서열번호 11의 아미노산 서열 또는 서열번호 11에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 및 (ii) 서열번호 12의 아미노산 서열 또는 서열번호 12에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 중 하나 또는 둘 다를 포함하되, 항체는 인간 IGFBP7에 특이적으로 결합하는, 제1 항체; 및 (ii) 제2 항체로서, (i) 서열번호 9의 아미노산 서열 또는 서열번호 9에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 갖는 경쇄 가변 영역, 및 (ii) 서열번호 10의 아미노산 서열 또는 서열번호 10에 대해 적어도 90% 동일한 서열을 갖는 중쇄 가변 영역 중 하나 또는 둘 다를 포함하되, 상기 항체는 인간 IGFBP7에 특이적으로 결합하는, 제2 항체를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 항체쌍은 본 명세서에서 1D6으로서 지칭되는 제1 항체 및 본 명세서에서 IC9E4.1로 지칭되는 제2 항체를 포함한다.
- [0015] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 특정 서열"로 이루어진 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는"이라는 어구는

항체가 서열을 포함하는 더 긴 폴리펩타이드에 또는 서열의 서브세트인 더 짧은 폴리펩타이드에 결합하지 않는다는 것을 의미하는 것으로 의도되지 않는다. 오히려, 이 어구는 단순히 항체가 특정 인용 폴리펩타이드에 결합한다는 것을 의미하는 것으로 의도된다.

[0016] 청구된 방법에서 사용하기 위한 항체는 다양한 종으로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 항체는 토끼, 마우스, 래트, 기니픽, 닭, 염소, 양, 당나귀, 인간, 라마 또는 카멜리드 서열인 면역글로불린 서열, 또는 이러한 서열의 조합(소위 키메라 항체)을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용하기 위한 항체는 면역분석에서 그들의 성능에 의해 동정될 수 있고, 이어서, 해당 성능에 대해 적절한 에피토프를 이해하기 위해 에피토프 매핑을 추가로 특징으로 한다.

[0017] 에피토프는 보통 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 그룹으로 이루어지며, 보통 3차원 구조 특징뿐만 아니라 특이적 전하 특징을 가진다. 입체배좌적 및 비입체배좌적 에피토프는 전자에 대한 결합은 변성 용매의 존재하에서 상실되지만, 후자에 대한 결합은 변성 용매의 존재 하에서 상실되지 않는다는 점에서 구별된다. 바람직하게는, 각각의 항체에 대한 에피토프는 인간 IGFBP7 서열로부터 얻은 서열인 서열번호 1 또는 서열번호 2 내에 포함된다. 특정 실시형태에서, 제1 단클론성 항체는 IGFBP7에 대한 결합을 위해 적어도 하나, 및 바람직하게는 2, 3 또는 4개의 연속적인 "중요한 잔기"를 포함한다. "중요한 잔기"는 알라닌으로 바뀔 때, 항체의 서열번호 1(또는 서열번호 2) 그 자체에 대한 결합에 비해 항체의 결합을 적어도 50%, 더 바람직하게는 적어도 75%만큼 감소시키는 서열번호 1(또는 서열번호 2)의 아미노산으로서 정의된다. 바람직한 실시형태에서, 적어도 하나의 중요한 잔기는 서열 TELLPGDRD(서열번호 3) 내 적어도 하나의 잔기 또는 서열 EPASC(서열번호 4) 내 적어도 하나의 잔기이다.

[0018] 이러한 단클론성 항체는 신호 발생 구성요소에 컨쥬게이션되거나 또는 고체 지지체 상에 고정될 수 있다. 샌드위치 분석의 예에서, 제1 항체(검출가능하게 표지됨) 및 제2 항체(시험 장치의 사전결정 구역에서 고정됨)는 시험 장치의 사전결정 구역에서 샘플 내 IGFBP7과의 샌드위치 복합체를 형성한다. 샌드위치 분석에서, 제1 항체와 제2 항체는 동일(특히 다클론성 항체가 사용될 때) 또는 상이할 수 있다. 따라서, 본 발명의 항체는 샌드위치 쌍에서 사용될 수 있거나, 또는 단클론성 항체가 아닌 다른 결합 독립체, 예컨대 다클론성 항체 또는 앵타머(aptamer)와 함께 개별적으로 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 항체는 생물학적 샘플 내 IGFBP7를 검출하기 위한 시험 키트에서 시약으로서 사용될 수 있다. 이러한 시험 키트는, 예를 들어, 생물학적 샘플 내 인간 IGFBP7의 존재 또는 양과 관련된 검출가능한 신호를 생성하도록 구성된 일회용 시험 장치를 포함할 수 있다. 대안적으로, 이러한 시험 키트는 일회용 시험 장치를 이용하지 않는 임상 분석기에서 분석을 수행하기 위해 제형화될 수 있다. 바람직하게는, 시험 키트는 시험관내 진단이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "시험관내 진단"은, 단독으로 사용되든 조합하여 사용되든, 생리적 또는 병리적 상태에 관한 또는 선천적 이상에 관한 정보를 제공하기 위한 목적을 위해 유일하게 또는 주로 인간 신체로부터 유래된 혈액 및 조직 기증을 포함하는 표본의 시험을 위해 시험관내에서 사용되도록, 또는 잠재적 수용인에 의한 안전성 및 적합성을 결정하기 위해, 또는 치료적 측정을 모니터링하기 위해 제조업자에 의해 의도되는 시약, 시약 제품, 교정기, 대조군 물질, 키트, 기기, 장치, 장비 또는 시스템인 의학적 장치를 지칭한다.

[0020] 특정 실시형태에서, 면역분석은 측방 유동 방식(lateral flow format)으로 수행된다. 측방 유동 시험은 시험 샘플이 흡수성 또는 비-흡수성 다공성 고체 기재를 따라서 크로마토그래피 방식으로 유동하는 면역분석 형태이다. 측방 유동 시험은 경쟁적 또는 샌드위치 방식 분석 중 하나로서 작동할 수 있다. 바람직한 측방 유동 장치는 일회용, 단일 용도 시험 장치이다. 샘플은 적용 구역에서 시험 장치에 적용되며, 항체 또는 항원으로 전처리된 선 또는 구역과 만나는 경우 기재를 통과한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "시험 구역"은 관심 대상의 분석물의 존재 또는 양과 관련된 신호를 생성하도록 정보를 얻는 측방 유동 시험 스트립 상의 별도의 위치를 지칭한다. 검출가능한 신호는 일회용 시험 장치를 분석 기기, 예컨대 반사계, 형광계 또는 투과 광도계 내로 삽입함으로써 시각적으로 판독되거나 또는 얻어질 수 있다. 이 목록이 제한적이 되는 것으로 의미되지는 않는다. 샘플은 적용 구역에 대한 전처리 없이 적용될 수 있거나, 또는 적용 전 하나 이상의 분석 시약과 사전 혼합될 수 있다. 후자의 경우에, 항체는 일회용 시험 장치와 별도의 용기로 제공될 수 있다.

[0021] 항체는 샘플이 표면과 접촉할 때 샘플 내로 용해하도록, 본 발명의 항체는 일회용 시험 장치 내의 표면에 확산으로 고정될 수 있다. 샌드위치 분석 방식에서, 이런 확산으로 결합된 항체는 샘플 내 그의 동족항원에 결합할 수 있고, 이어서, 항원이 검출 구역에서 비-확산으로 결합된 제2 항체에 의해 결합될 때 검출 구역에서 고정된다. 경쟁적 방식에서, 샘플 내 그의 동족항원은 확산으로 결합된 항체에 대한 결합을 위해 분석 시약으로서 제



공된 표지 항원과 경쟁할 수 있다.

- [0022] 본 발명의 키트는 검출가능한 신호를 IGFBP7의 농도에 관련짓기 위한 교정부(calibration)를 추가로 포함할 수 있다. 예로서, 교정 곡선은 일회용 시험 장치, 예컨대 ROM 칩, 플래시 드라이브, RFID 태그 등을 수용하는 분석 기기에 의해 판독되는 전자 메모리 디바이스 상에서 제공될 수 있다. 대안적으로, 교정 곡선은 광학적으로 판독되는 암호화된 표지, 예컨대 2-D 바코드 상에서 제공될 수 있거나, 또는 네트워크 연결을 통해 전송될 수 있다. 이어서, 분석 기기는 분석으로부터의 검출가능한 신호를 IGFBP7 농도에 관련짓기 위해 이 교정 곡선을 사용할 수 있다.
- [0023] 특정 실시형태에서, 본 발명의 항체쌍을 이용하여 수행된 분석 방법은 생물학적 샘플 내 인간 IGFBP7의 존재 또는 양과 관련된 신호를 제공하되, 분석 방법에서 IGFBP7의 최소 검출가능 농도는 20ng/ml 이하, 더 바람직하게는 10ng/ml 이하, 5ng/ml 이하, 1ng/ml 이하, 및 가장 바람직하게는 0.1ng/ml 이하이다.
- [0024] 관련된 양상에서, 본 발명은 하기 단계들을 포함하는 생물학적 샘플 내 인간 IGFBP7의 존재 또는 양을 결정하기 위한 방법을 제공한다:
- [0025] 인간 IGFBP7과 샌드위치 복합체를 함께 형성하는 제1 단클론성 항체 및 제2 단클론성 항체를 이용하여 생물학적 샘플 상에서 면역분석을 수행하는 단계로서, 면역분석은 샌드위치 복합체 내에 결합된 생물학적 샘플 내 인간 IGFBP7의 존재 또는 양과 관련된 검출가능한 신호를 제공하는 단계; 및
- [0026] 검출가능한 신호를 생물학적 샘플 내 인간 IGFBP7의 존재 또는 양에 관련짓는 단계. 바람직하게는, 면역분석에서 IGFBP7의 최소 검출가능 농도는 20ng/ml 이하, 더 바람직하게는 10ng/ml 이하, 5ng/ml 이하, 1ng/ml 이하, 및 가장 바람직하게는 0.1ng/ml 이하이다.
- [0027] 특히 바람직한 실시형태에서, 제1 단클론성 항체는 서열번호 1로 이루어진 폴리펩타이드에 결합하고, 제2 단클론성 항체는 서열번호 2로 이루어진 폴리펩타이드에 결합하며, 각각의 경우에 친화도는 적어도  $10^8 \text{ M}^{-1}$ 이다.
- [0028] 바람직한 분석 방법은 인간 IGFBP7을 검출하는 면역분석을 수행하는 단계를 포함한다. 이러한 면역분석은 상기 체액 샘플을 마커를 검출하는 항체와 접촉시키는 단계, 및 해당 항체에 대한 결합을 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 체액 샘플은 소변, 타액, 혈액, 혈청 및 혈장으로 이루어진 군으로부터 선택되며, 가장 바람직하게는 소변이다.
- [0029] 본 발명의 항체에 대해, 본 발명은 또한 이러한 항체를 암호화하는 핵산, 및 추가적인 양상에서 이러한 항체를 발현시키는 항체-발현 세포주에 관한 것이다.
- [0030] 개시내용의 하나 이상의 실시형태의 상세한 설명은 수반하는 도면 및 이하의 설명에 제시된다. 개시내용의 다른 특징, 목적 및 이점은 설명 및 도면으로부터, 그리고 청구범위로부터 명확하게 될 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 정의
- [0032] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, 용어 "인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 7" 및 "IGFBP7"은 인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 7 전구체(스위스-프룅 Q16270(서열번호 5))로부터 유래된 생물학적 샘플 내에 존재하는 하나 이상의 폴리펩타이드를 지칭한다.

10	20	30	40	50	60
MERPSLRALL	LGAAGLLLLL	LPLSSSSSSD	TCGPCEPASC	PPLPPLGCLL	GETRDACGCC
70	80	90	100	110	120
PMCARGESEP	CGGGGAGRGY	CAPGMECVKS	RKRRKGKAGA	AAGGPGVSGV	CVCKSRYPVC
130	140	150	160	170	180
GSDGTTYPST	CQLRAASQRA	ESRGEKAITQ	VSKGTCEQGP	SIVTPPKDIW	NVTGAQVYLS
190	200	210	220	230	240
CEVIGIPTPV	LIWNKVKRGH	YGVQRTELLP	GDRDNLAIQT	RGGPEKHEVT	GWVLVSPLSK
250	260	270	280		
EDAGEYECHA	SNSQGQASAS	AKITVVDALH	EIPVKKGEGA	EL	

[0033]

[0034] 다음의 도메인은 인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 7에서 동정되었다:

[0035]	잔기	길이	도메인 ID
--------	----	----	--------

[0036] 1 내지 26 26 신호 펄스 타이밍

[0037] 27 내지 282 256 인슐린-유사 성장 인자-결합 단백질 7

[0038] 본 명세서에서 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 사용되는 용어의 정의는 약제 과학 분야에서 사용되는 표준 정의이다. 본 명세서 및 첨부되는 청구범위에서 사용되는 바와 같은, 단수 형태는 달리 명확하게 표시되지 않는 한 복수의 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "약제학적 담체"에 대한 언급은 2 이상의 이러한 담체의 혼합물 등을 포함한다.

[0039] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "대상체"는 인간 또는 비-인간 유기체를 지칭한다. 따라서, 본 명세서에서 기재된 방법 및 조성물은 인간과 척추동물 질환 둘 다에 적용가능하다. 추가로, 대상체는 바람직하게는 살아있는 유기체이지만, 본 명세서에 기재된 발명은 사후 분석에서도 사용될 수 있다. 바람직한 대상체는 인간이며, 가장 바람직하게는 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 질환 또는 병태에 대한 의학적 관리를 받는 살아있는 인간을 지칭하는 "환자"이다. 이는 병리 징후에 대해 조사 중인 정해진 질병이 없는 사람을 포함한다.

[0040] 바람직하게는, 분석물은 샘플 내에서 측정된다. 이러한 샘플은 대상체로부터 얻을 수 있거나, 또는 대상체에게 제공될 것으로 의도된 생물학적 물질로부터 얻을 수 있다. 예를 들어, 샘플은 대상체 내로 가능한 이식에 대해 평가 중인 신장 및 기존 손상에 대해 신장을 평가하기 위해 사용되는 분석물 측정으로부터 얻을 수 있다. 바람직한 샘플은 체액 샘플이다.

[0041] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "체액 샘플"은 관심 대상의 대상체, 예컨대 환자 또는 이식 공여자의 진단, 예후, 분류 또는 평가 목적을 위해 얻은 체액 샘플을 지칭한다. 특정 실시형태에서, 이러한 샘플은 진행 중인 병태의 결과 또는 병태에 대한 치료 요법의 효과를 결정하는 목적을 위해 얻을 수 있다. 바람직한 체액 샘플은 혈액, 혈청, 혈장, 뇌척수액, 소변, 타액, 객담 및 흉수를 포함한다. 추가로, 당업자는 특정 체액 샘플이 분획화 또는 정제 절차, 예를 들어 전혈의 혈청 또는 혈장 구성성분으로의 분리 후에 더 용이하게 분석된다는 것을 인식할 것이다.

[0042] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "진단"은 환자가 주어진 질환 또는 병태로 고통받고 있는지의 여부의 확률("우도(likelihood)")을 당업자가 추정 및/또는 결정할 수 있는 방법을 지칭한다. 본 발명의 경우에서, "진단"은 본 발명의 신장 손상 마커에 대해, 선택적으로 다른 임상 특징과 함께 분석, 가장 바람직하게는 면역분석의 결과를 이용하여 샘플이 얻어지고 분석된 대상체에 대한 급성 신장 손상 또는 ARF의 진단에 도달하는 것(즉, 발생 또는 발생되지 않음)을 포함한다. 해당되는 이러한 진단은 진단이 100% 정확하다는 것을 암시하는 것을 의미하지 않는다. 다수의 바이오마커는 다중 병태를 나타낸다. 숙련된 임상가의 정보적 공백에서 바이오마커 결과를 사용하지 않으며, 오히려, 시험 결과는 진단에 도달하기 위한 다른 임상 징후와 함께 사용된다. 따라서, 사전결정된 진단적 역치의 한 측면에 대한 측정된 바이오마커 수준은 사전결정된 진단적 역치의 다른 측면에 대한 측정 수준에 비해 대상체에서 질환의 발생의 더 큰 우도를 나타낸다.

[0043] 유사하게, 예후적 위험은 주어진 과정 또는 결과가 일어날 확률("우도")의 신호를 보낸다. 증가된 이환율(예를 들어, 악화된 신장 기능, 장래의 ARF 또는 사망)의 확률과 결국 관련되는 예후적 지표 수준 또는 수준의 변화는

환자에서의 유해한 결과의 "증가된 우도를 나타내는" 것으로 언급된다.

- [0044] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "측방 유동"은 실질적으로 편평한 다공성 물질을 통해 세로 방향으로의 시약의 유동을 지칭한다. 이러한 다공성 물질은 물질의 두께가 길이 및 폭 치수의 10% 이하라면, "실질적으로 편평"하다.
- [0045] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 장치의 제1 영역에 대한 "하류의 영역"이라는 용어는 해당 유체가 이미 제1 영역에 도달된 후에 유체 유동을 수용하는 것을 지칭한다.
- [0046] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "샘플 적용 영역"은 관심 대상의 유체 샘플 내로 이의 구성성분을 결정하기 위한 목적을 위해 도입되는 분석 장치의 일부를 지칭한다.
- [0047] 마커 분석
- [0048] 일반적으로, 면역분석은 관심 대상의 바이오마커를 함유하거나 또는 함유하는 것으로 의심되는 샘플을 바이오마커에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항체와 접촉시키는 단계를 수반한다. 이어서, 샘플 내 폴리펩타이드의 항체에 대한 결합에 의해 형성된 복합체의 존재 또는 양을 나타내는 신호가 생성된다. 이어서, 신호는 샘플 내 바이오마커의 존재 또는 양과 관련된다. 바이오마커의 검출 및 분석을 위한 수많은 방법 및 장치는 당업자에게 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,143,576호; 제6,113,855호; 제6,019,944호; 제5,985,579호; 제5,947,124호; 제5,939,272호; 제5,922,615호; 제5,885,527호; 제5,851,776호; 제5,824,799호; 제5,679,526호; 제5,525,524호; 및 제5,480,792호 및 문헌[*The Immunoassay Handbook*, David Wild, ed. Stockton Press, New York, 1994]을 참조하며, 이들 각각은 모든 표, 도면 및 청구범위를 포함하는 그의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0049] 당업자에게 공지된 분석 장치 및 방법은 관심 대상의 바이오마커의 존재 또는 양과 관련된 신호를 생성하기 위해 다양한 샌드위치, 경쟁적 또는 비경쟁적 분석 방식으로 표지된 분자를 이용할 수 있다. 적합한 분석 방식은 또한 크로마토그래피, 질량 분석법 및 단백질 "블롯팅" 방법을 포함한다. 추가적으로, 표지된 분자에 대한 필요 없이 분석물의 존재 또는 양을 검출하기 위해 특정 방법 및 장치, 예컨대 바이오센서 및 광학 면역분석이 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,631,171호; 및 제5,955,377호를 참조하며, 이들 각각은 모든 표, 도면 및 청구범위를 포함하는 그의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다. 당업자는 또한 벡만 액세스(Beckman ACCESS)(등록상표), 애봇 악심(Abbott AXSYM)(등록상표), 로슈 엘렉시스(Roche ELECSYS)(등록상표), 데이드 베링 스트라투스(Dade Behring STRATUS)(등록상표) 시스템을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 로봇 장치가 면역분석을 수행할 수 있는 면역분석 분석기 중에 있다는 것을 인식한다. 그러나 임의의 적합한 면역분석, 예를 들어, 효소-결합 면역분석(ELISA), 방사면역분석(RIA), 경쟁적 결합 분석 등이 이용될 수 있다.
- [0050] 항체 또는 다른 폴리펩타이드는 분석에서 사용을 위해 다양한 고체 지지체 상에 고정될 수 있다. 특이적 결합 구성원을 고정시키기 위해 사용될 수 있는 고체상은 고체상 결합 분석에서 고체상으로서 발생되고/되거나 사용되는 것을 포함한다. 적합한 고체상의 예는 필터, 셀룰로오스 종이, 비드(중합체, 라텍스 및 상자성 입자), 유리, 실리콘 웨이퍼, 마이크로입자, 나노입자, 텐타겔(TentaGel), 아그로겔(AgroGel), 페가(PEGA) 겔, SPOCC 겔 및 다중-웰 플레이트를 포함한다. 분석 스트립은 고체 지지체 상의 어레이에서 항체 또는 복수의 항체를 코팅함으로써 제조될 수 있었다. 이어서, 이 스트립은 시험 샘플 내로 담핑된 다음 세척 및 검출 단계를 통해 빠르게 처리되어 착색 스팟과 같은 측정가능한 신호를 생성할 수 있었다. 항체 또는 다른 폴리펩타이드는 분석 장치 표면에 직접적으로 컨쥬게이팅에 의해, 또는 간접적 결합에 의해 분석 장치의 특이적 구역에 결합될 수 있다. 후자 경우의 예에서, 항체 또는 다른 폴리펩타이드는 입자 또는 다른 고체 지지체 상에 고정될 수 있고, 해당 고체 지지체는 고체 표면에 고정될 수 있다.
- [0051] 생물학적 분석은 검출 방법을 필요로 하며, 결과의 정량화를 위한 가장 통상적인 방법 중 하나는 연구 중인 생물학적 시스템 내 구성성분 중 하나에 대해 친화도를 갖는 단백질 또는 핵산에 대해 검출가능한 표지를 컨쥬게이팅시키는 것이다. 검출가능한 표지는 그 자체가 검출가능한 분자(예를 들어, 형광 모이어티, 전기 화학적 표지, 금속 킬레이트 등)뿐만 아니라 검출가능한 반응 생성물(예를 들어, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타제 등과 같은 효소)의 생성에 의해 또는 그 자체가 검출가능한 특이적 결합 분자(예를 들어, 바이오틴, 디곡시게닌, 말토스, 올리고히스티딘, 2,4-딘트로벤젠, 페닐아르세네이트, ssDNA, dsDNA 등)에 의해 간접적으로 검출될 수 있는 분자를 포함한다.
- [0052] 고체상 및 검출가능한 표지 컨쥬게이트의 제조는 종종 화학적 가교-링커의 사용을 포함한다. 가교 시약은 적어도 2개의 반응기를 함유하며, 일반적으로 동종작용성 가교제(동일한 반응기를 함유) 및 이종작용성 가교제(비동

일성 반응기를 함유)로 나누어진다. 아민, 설프하이드릴을 통해 결합하거나 또는 비-특이적으로 반응하는 동종2 작용성 가교제는 다수의 상업적 공급원으로부터 입수가 가능하다. 말레이미드, 알킬 및 아릴 할로겐화물, 알파-할로아실 및 피리딜 다이설파이드는 티올 반응기이다. 말레이미드, 알킬 및 아릴 할로겐화물 및 알파-할로아실은 설프하이드릴과 반응하여 티올 에터 결합을 형성하는 반면, 피리딜 다이설파이드는 혼합된 다이설파이드를 생성하기 위해 설프하이드릴과 반응된다. 피리딜 다이설파이드 생성물은 절단가능하다. 이미도에스터는 또한 단백질-단백질 가교에 매우 유용하다. 다양한 이중2작용성 가교제(성공적인 컨쥬게이션을 위해 상이한 속성을 각각 조합함)는 상업적으로 입수가 가능하다.

[0053] 특정 양상에서, 본 발명은 기재된 마커의 분석을 위한 키트를 제공한다. 키트는 마커에 특이적으로 결합하는 적어도 하나의 항체를 포함하는 적어도 하나의 시험 샘플의 분석을 위한 시약을 포함한다. 키트는 또한 본 명세서에 기재된 진단적 및/또는 예후적 상관관계 중 하나 이상을 수행하기 위한 장치 및 설명서를 포함할 수 있다. 바람직한 키트는 분석물에 대해 샌드위치 분석을 수행하기 위한 항체쌍, 또는 경쟁적 분석을 수행하기 위한 표지 중을 포함할 것이다. 바람직하게는, 항체쌍은 고체상에 컨쥬게이트된 제1 항체 및 검출가능한 표지에 컨쥬게이트된 제2 항체를 포함하되, 각각의 제1 항체와 제2 항체는 신장 손상 마커에 결합한다. 가장 바람직하게는, 각각의 항체는 단클론성 항체이다. 키트를 사용하고 상관관계를 수행하기 위한 설명서는 부착되어 있는 임의의 기재 또는 기록된 물질에 관한 라벨링의 형태일 수 있으며, 또는 그의 제조, 수송, 판매 또는 사용 동안의 임의의 시간에 키트에 다른 방법으로 수반된다. 예를 들어, 용어 라벨링은 광고 리플렛 및 브로셔, 포장 물질, 설명서, 오디오 또는 비디오 카세트, 컴퓨터 디스크뿐만 아니라 키트 상에서의 직접 인쇄를 포함한다.

[0054] 특정 실시형태에서, 마커 분석은 단일 사용 일회용 시험 장치를 이용하여 수행된다. 이러한 시험 장치는 종종 처방전 없이 살 수 있는 임신 검사의 통상적인 사용으로 현재 친숙한 측방 유동 장치의 형태를 취한다. 일반적으로, 이들 분석 장치는 샘플 첨가 영역과 평가 영역 간의 구별이 될 수 있는 연장된 기저층을 가진다. 전형적인 용도에서, 샘플은 샘플 첨가 영역에 적용되고, 기저층과 나란히 뻗어있는 액체 수송 경로를 따라서 유동하며, 이어서, 평가 영역 내로 유동한다. 포획 시약은 평가 영역 내에 존재하며, 포획 분석물은 포획 분석물과 관련된 가시적 모이어티를 검출하기 위한 다양한 프로토콜에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 분석은 생물학적 샘플 내 분석물의 존재 또는 부재를 나타낼 때 시각적 신호, 예컨대 색 변화, 형광, 발광 등을 생성할 수 있다.

[0055] 샘플 첨가 영역은, 예를 들어 하우스징 내 개방 챔버의 형태로; 흡착 패드의 형태 등으로 제공될 수 있다. 샘플 첨가 영역은 원형, 장타원형, 정사각형 등인 다양한 입체배치의 포트일 수 있거나, 또는 영역은 장치의 트로프(trough)일 수 있다.

[0056] 필터 구성요소는 혈장이 장치를 통해 추가로 이동될 수 있도록 샘플로부터의 미립자를 여과하기 위해, 예컨대 혈액으로부터의 혈액 세포를 제거 또는 지체시키기 위해 샘플 첨가 영역 내에, 상에 또는 인접하여 놓일 수 있다. 이어서, 여과물은 필터에 유동적으로 연결된 다공성 부재 내로 이동될 수 있다. 혈액 내에 존재하는 세포 물질을 제거 또는 지연시키기 위한 적합한 필터는 당업계에 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제 4,477,575호; 제5,166,051호; 제6,391,265호; 및 제7,125,493호를 참조하며, 이들 각각은 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함된다. 다수의 적합한 물질은 당업자에게 공지되어 있으며, 유리 섬유, 합성 수지 섬유, 비대칭 막 필터를 포함하는 다양한 유형의 막을 포함할 수 있는데, 이때, 기공 크기는 약 65 내지 약 15 $\mu$ m 및 이러한 물질의 조합물에 따라 다르다. 추가로, 필터 구성요소는 혈액 혈장으로부터 적혈구의 분리를 용이하게 하기 위해 하나 이상의 화학물질을 포함할 수 있다. 이러한 물질의 예는 트롬빈, 렉틴, 양이온성 중합체, 하나 이상의 적혈구 표면 항원 등이다. 혈장으로부터 적혈구의 분리를 용이하게 하는 이러한 화학 물질(들)은 공유 수단, 비특이적 흡수 등에 의해 필터 구성요소 내에 제공될 수 있다.

[0057] 특정 실시형태에서, 표지 구역은 샘플 수용 구역 하류에 위치되며, 관심 대상의 분석물에 결합하거나 또는 결합 중에 대한 결합을 위해 관심 대상의 분석물과 경쟁하는 널리 퍼지게 위치한 표지 시약을 함유한다. 대안적으로, 표지 시약이 샘플 수용 구역에 대한 적용 전에 샘플과 사전혼합된다면, 표지 구역은 제거될 수 있다. 검출 구역은 표지 구역의 하류에 배치되며, 관심 대상의 분석물에 결합하는 고정된 포획 시약을 함유한다.

[0058] 본 발명에서 사용하기 위한 막에 대한 최적의 기공 직경은 약 10 내지 약 50 $\mu$ m이다. 막은 전형적으로는 두께가 약 1mil 내지 약 15mil이고, 전형적으로는 5 또는 10mil의 범위에 있지만, 200mil까지일 수도 있고, 더 두꺼울 수도 있다. 막은 일반적으로 물 불투수층, 예컨대 마일러(Mylar)(등록상표) 폴리에스터 필름(듀폰 테이진 필름즈사(DuPont Teijin Films))에 의해 백킹(backing)될 수 있다. 사용될 때, 백킹은 일반적으로 접착제, 예컨대 3M 444 양면 접착 테이프에 의해 막에 고정된다. 전형적으로, 물 불투수성 뒤판은 낮은 두께의 막에 대해 사용



된다. 매우 다양한 중합체가 사용될 수 있으며, 단, 그들은 분석 구성성분에 비특이적으로 결합하지 않고 샘플 유동을 방해하지 않는다. 예시적인 중합체는 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리스타이렌 등을 포함한다. 대안적으로, 막은 자기 지지성일 수 있다. 다른 비-흡수성 막, 예컨대 폴리비닐 클로라이드, 폴리비닐 아세테이트, 비닐 아세테이트와 비닐 클로라이드의 공중합체, 폴리아마이드, 폴리카보네이트, 폴리스타이렌 등이 또한 사용될 수 있다. 다양한 실시형태에서, 표지 구역 물질은 차단제 및 안정제를 포함하는 용액으로 전처리될 수 있다. 차단제는 소 혈청 알부민(BSA), 메틸화된 BSA, 카제인, 탈지 분유를 포함한다. 장치는 또한, 예를 들어 완충제, HAMA 저해제, 세정제, 염(예를 들어, 칼슘, 마그네슘, 칼륨 등의 클로라이드 및/또는 설페이트 염), 및 단백질 성 구성성분(예를 들어, 혈청 알부민, 젤라틴, 우유 단백질 등)을 포함하는 추가적인 구성성분을 포함할 수 있다. 이 열거는 제한을 의미하지 않는다.

[0059] 장치는 시험 장치가 적절하게 실행된다는 것을 결정하기 위해 판독되는 다양한 제어 위치를 추가로 포함할 수 있다. 예로서, 절차 제어 구역은 샘플 유동이 예상되는 바와 같다는 것을 입증하기 위해 분석 검출 구역과 분리되어 제공될 수 있다. 제어 구역은 바람직하게는 시약의 적절한 유동을 표시하는 신호가 생성될 수 있는 공간적으로 별도의 영역이다. 절차 제어 구역은 분석물 분석에서 사용된 과량의 표지 항체가 결합할 수 있는 관심 대상의 분석물 또는 이의 단편을 함유할 수 있다. 작동에서, 표지된 시약은 관심 대상의 분석물이 시험 샘플에서 없을 때조차도 제어 구역에 결합한다. 제어선의 사용은 제어선에서 신호의 출현이 시험 결과가 심지어 부정적 결과에 대해서도 판독될 수 있는 시간을 나타낸다는 점에서 도움이 될 수 있다. 따라서, 예상된 신호가 제어선에서 나타날 때, 포획 구역 내 신호의 존재 또는 부재가 주목될 수 있다. 장치는 음성 대조군 영역을 추가로 포함할 수 있다. 이 대조군 영역의 목적은 시험 장치가 적절하게 작동하지 않는다는 것을 사용자에게 알리는 것이다. 적절하게 작동할 때, 음성 대조군 영역에서 신호 또는 마크가 보여서는 안 된다.

[0060] 이러한 분석 장치의 외부 케이싱 또는 하우징은 다양한 형태를 취할 수 있다. 전형적으로, 이는 세장형 케이싱을 포함할 것이고, 복수의 상호결합 부분을 가질 수 있다. 특히 바람직한 실시형태에서, 하우징은 상부 커버 및 하부 지지체를 포함한다. 상부 커버는 적용 애퍼처(aperture) 및 관찰 포트를 수용한다. 바람직한 실시형태에서, 하우징은 수분 불침투성 고체 물질, 예를 들어, 플라스틱 물질로 이루어진다. 비닐, 나일론, 폴리비닐 클로라이드, 폴리프로필렌, 폴리스타이렌, 폴리에틸렌, 폴리카보네이트, 폴리설판, 폴리에스터, 우레탄 및 에폭사이드를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다양한 상업적으로 입수가능한 플라스틱이 하우징을 구성하기 위해 사용될 수 있다는 것이 상정된다. 하우징은 전통적인 방법, 예컨대 당업계에 잘 공지되고 사용되는 표준 몰딩 기법에 의해 제조될 수 있다. 하우징은 사출성형, 압축성형, 트랜스퍼 성형, 중공 성형, 압출성형, 발포 성형 및 열성형을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 성형 기법에 의해 생산될 수 있다. 앞서 언급한 성형 기법은 당업계에 잘 공지되어 있으며, 따라서 본 명세서에서 상세하게 논의하지 않는다. 예를 들어, 문헌 [Processes And Materials Of Manufacture, Third Edition, R. A. Lindsberg (1983) Allyn and Baron pp. 393-431] 참조.

[0061] 필요하다면, 사용 중인 검출가능한 표지의 비색, 발광 또는 형광 강도는 표지에 적절한 기기를 이용하여 평가될 수 있다. 예로서, 형광계는 형광 표지를 검출하기 위해 사용될 수 있고; 반사계는 빛 등을 흡수하는 표지를 검출하기 위해 사용될 수 있다. 샘플 내 관심 대상의 분석물의 농도는 샘플 유체 내 분석물의 양에 대해 측정된 반응을 상호관련지음으로써 결정될 수 있다.

#### [0062] 분석 상관관계

[0063] 분석에서 바이오마커의 측정에 대해 본 명세서에서 사용되는 용어 "상호관련짓는" 및 "관련짓는"은 분석으로부터 얻은 신호에 기반한 샘플 내 바이오마커의 존재 또는 더 바람직하게는 양을 결정하는 것을 지칭한다. 종종, 이는 분석에 참여한 하나의 종에 대한 검출가능한 표지로부터 생성된 신호를, 상기 신호를 바이오마커의 농도 또는 역치로 전환시키기 위해 사용될 수 있는 사전결정된 표준 곡선과 비교하는 형태를 취한다.

[0064] 진단 또는 예후를 위한 바이오마커의 사용에 대해 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "상호관련짓는" 및 "관련짓는"은 환자에서 바이오마커(들)의 존재 또는 양을 주어진 병태로 고통받는 것으로 알려진 또는 위험한 것으로 알려진 인간에서; 또는 주어진 병태가 없는 것으로 알려진 인간에서 바이오마커의 존재 또는 양과 비교하는 것을 지칭한다. 종종, 이는 바이오마커 농도 형태의 분석 결과를 질환의 발생 또는 비발생 또는 일부 장래 결과의 우도를 표시하도록 선택된 사전결정 역치와 비교하는 형태를 취한다.

[0065] 진단적 역치를 선택하는 것은 특히 질환 확률의 고려, 상이한 시험 역치에서 참 및 거짓 진단의 분포, 및 진단에 기반한 치료 결과(또는 치료에 대한 실패)의 추정을 수반한다. 예를 들어, 고도로 효능있고 저수준의 위험을 갖는 특이적 요법을 투여하는 것을 고려할 때, 임상적의 실질적인 진단 불확실성을 수용할 수 있기 때문에 필요

한 시험은 거의 없다. 반면에, 치료 선택사항이 덜 효과적이고 덜 위험한 상황에서, 임상의는 종종 더 높은 정도의 진단적 확실성을 필요로 한다. 따라서, 진단적 역치를 선택함에 있어서 비용/이점 분석이 수반된다.

[0066] 적합한 역치는 다양한 방법으로 결정될 수 있다. 예를 들어, 심장 트로포닌을 이용하는 급성 심근경색증의 진단을 위한 진단적 역치가 권장된 사람은 정상 집단에서 보이는 농도의 97.5번째 백분율이다. 사전 "기준" 결과가 바이오마커 수준에서 일시적 변화를 모니터링하기 위해 사용되는 경우, 동일한 환자로부터의 연속 샘플을 검토하기 위한 다른 방법이 있을 수 있다.

[0067] 결정 역치를 선택하기 위해 집단 연구가 사용될 수 있다. 수신자 조작 특성(Receiver Operating Characteristic: "ROC")은 레이더 영상의 분석을 위해 2차 세계 대전 동안 개발된 신호 검출 이론 분야로부터 발생되었으며, "비질환" 하위집단으로부터 "질환" 하위집단을 가장 잘 구별할 수 있는 역치를 선택하기 위해 ROC 분석이 종종 사용된다. 이 경우에서 위양성(false positive)은 사람이 양성으로 시험되었지만, 실제로 질환을 갖지 않을 때 생긴다. 반면에 위음성은 사람이 그들이 건강하다는 것을 시사하는 음성일 때, 그들이 실제로는 질환을 가질 때에 생긴다. ROC 곡선을 그리기 위해, 결정 역치가 연속적으로 변화함에 따라 진양성률(true positive rate: TPR) 및 위양성률(false positive rate: FPR)이 결정된다. TPR은 민감도(sensitivity)와 동등하고, FPR은 1 - 특이도(specificity)와 동일하기 때문에, ROC 그래프는 때때로 민감도 대(1 - 특이도) 플롯으로 불린다. 완전한 시험은 ROC 곡선하 면적이 1.0일 것이며; 무작위 시험은 면적이 0.5일 것이다. 역치는 허용 가능한 수준의 특이도 및 민감도를 제공하도록 선택된다.

[0068] 이와 관련하여, "병에 걸린"은 하나의 특징(질환 또는 병태의 존재 또는 일부 결과의 발생)을 갖는 집단을 지칭하는 것을 의미하며, "병에 걸리지 않은"은 특징이 없는 집단을 지칭하는 것을 의미한다. 단일 결정 역치가 이러한 방법의 가장 단순한 적용이지만, 다중 결정 역치가 사용될 수 있다. 예를 들어, 제1 역치 미만에서, 질환의 부재는 상대적으로 높은 신뢰도가 부여될 수 있으며, 제2 역치 초과에서 질환의 존재는 또한 상대적으로 높은 신뢰도가 부여될 수 있다. 두 역치 사이의 불확정성이 고려될 수 있다. 이는 사실상 단지 예시적인 것으로 의미된다.

[0069] 역치 비교에 추가로, 분석 결과를 환자 분류(질환의 발생 또는 비발생, 결과의 우도 등)에 상호관련 짓는 다른 방법은 의사결정나무(decision tree), 규칙, 베이지안(Bayesian) 방법 및 신경 네트워크 방법을 포함한다. 이들 방법은 대상체가 복수의 분류 밖의 하나의 분류에 속하는 정도를 나타내는 확률값을 생성할 수 있다.

[0070] 시험 정확성의 측정은 문헌[Fischer et al., Intensive Care Med. 29: 1043-51, 2003]에서 기재된 바와 같이 얻을 수 있고, 주어진 바이오마커의 유효성을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 이 측정은 민감도 및 특이도, 예측값, 우도비, 진단 오즈비(odds ratio) 및 ROC 곡선 면적을 포함한다. ROC 플롯의 곡선하면적("AUC")은 분류자가 무작위로 선택된 음성 예보다 무작위로 선택된 양성 예를 랭킹할 확률과 동일하다. ROC 곡선하면적은 그룹이 연속적 데이터를 갖는 것으로 고려된다면 두 그룹에서 얻은 점수 간의 중앙값 차이를 검증하는 만-휘트니 U 검정(Mann-Whitney U test), 또는 윌콕슨 순위검정(Wilcoxon test of rank)과 동일한 것으로 생각될 수 있다.

[0071] 상기 논의한 바와 같이, 적합한 시험은 이들 다양한 측정에 대해 다음 결과 중 하나 이상을 나타낼 수 있다: 0.5, 초과, 바람직하게는 적어도 0.6, 더 바람직하게는 적어도 0.7, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 0.8, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 0.9 및 가장 바람직하게는 적어도 0.95의 특이도와 함께, 0.2, 초과, 바람직하게는 0.3, 초과, 더 바람직하게는 0.4, 초과, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 0.5, 훨씬 더 바람직하게는 0.6, 초과, 더욱더 바람직하게는 0.7, 초과, 훨씬 더 바람직하게는 0.8, 초과, 더 바람직하게는 0.9, 초과, 및 가장 바람직하게는 0.95; 초과, 바람직하게는 적어도 0.6, 더 바람직하게는 적어도 0.7, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 0.8, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 0.9 및 가장 바람직하게는 적어도 0.95, 초과, 바람직하게는 0.3, 초과, 더 바람직하게는 0.4, 초과, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 0.5, 훨씬 더 바람직하게는 0.6, 초과, 더욱더 바람직하게는 0.7, 초과, 훨씬 더 바람직하게는 0.8, 초과, 더 바람직하게는 0.9, 초과, 및 가장 바람직하게는 0.95; 초과, 바람직하게는 적어도 0.6, 더 바람직하게는 적어도 0.7, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 0.8, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 0.9, 및 가장 바람직하게는 적어도 0.95,의 ROC 곡선하면적; 1, 바람직하게는 적어도 약 2 이상 또는 약 0.5 이하, 더 바람직하게는 적어도 약 3 이상 또는 약 0.33 이하, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 4 이상 또는 약 0.25 이하, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 약 5 이상 또는 약 0.2 이하, 및 가장 바람직하게는 적어도 약 10 이상 또는 약 0.1 이하로 상이한 오즈비; 1 초과, 적어도 2, 더 바람직하게는 적어도 3, 훨씬 더 바람직하게는 적어도 5, 및 가장 바람직하게는 적어도 10의 양성 우도비(민감도/(1-특이도)로서 계산); 및 또는 1 미만, 0.5 이하, 더 바람직하게는 0.3 이하, 및 가장 바람직하게는 0.1 이하의 음의 우도비((1-민감도)/

특이도로써 계산함)

[0072] 항체

[0073] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항체"는 항원 또는 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 유전자로부터 유래되거나, 이후에 모델링되거나 또는 실질적으로 암호화된 펩타이드 또는 폴리펩타이드, 또는 면역글로불린 유전자, 또는 이들의 단편을 지칭한다. 예를 들어, 문헌[Fundamental Immunology, 3rd Edition, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994; J. Immunol. Methods 175:267-273; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97] 참조. 용어 항체는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 다이설파이드 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')<sub>2</sub> 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 이루어진 dAb 단편(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546); 및 (vi) 단리된 상보성 결정 영역(CDR)을 비롯하여, 결합 항원에 대한 능력을 보유하는 항원-결합 부분, 즉, "항원 결합 부위"(예를 들어, 단편, 하위서열, 상보성 결정 영역(CDR))을 포함한다. 단쇄 항체는 또한 용어 "항체"에서 참고로 포함된다.

[0074] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "항체 가변 도메인"은 상보성 결정 영역(CDR; 즉, CDR1, CDR2 및 CDR3) 및 프레임워크 영역(Framework Region: FR)의 아미노산 서열을 포함하는 항체 분자의 경쇄 및 중쇄 부분을 지칭한다. V<sub>H</sub>는 중쇄의 가변 도메인을 지칭한다. V<sub>L</sub>은 경쇄의 가변 도메인을 지칭한다. 본 발명에서 사용되는 방법에 따르면, CDR 및 FR에 부여된 아미노산 위치는 카바트(Kabat)(면역학적 관심 대상의 단백질 서열(Sequences of Proteins of Immunological Interest)(National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1987 및 1991))에 따라 정해될 수 있다. 항체 또는 항원 결합 단편의 아미노산 넘버링은 또한 카바트의 넘버링에 따른다.

[0075] "단리된" 항체는 그의 천연 환경의 구성성분으로부터 단리되고 분리 및/또는 회수된 것이다. 그의 천연 환경의 오염물질 구성성분은 항체에 대한 진단적 또는 치료적 용도를 방해하는 물질이며, 효소, 호르몬 및 다른 단백질 성 또는 비단백질성 용질일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 항체는 (1) 로리(Lowry) 방법에 의해 결정된 바와 같은 항체의 95중량% 초과로, 가장 바람직하게는 99중량% 초과로, (2) 스피닝 컵 서열분석기(spinning cup sequenator)의 사용에 의한 N-말단 또는 내부 아미노산 서열의 적어도 15개 잔기를 얻기에 충분한 정도로, 또는 (3) 쿠마씨 블루, 또는 바람직하게는 은 염색을 이용하는 환원 또는 비환원 조건 하에서 SDS-PAGE에 의한 균질성에 대해 정제될 것이다. 항체의 천연 환경의 적어도 하나의 구성성분이 존재하지 않는다면, 단리된 항체는 제조할 세포 내에서 인시주로 항체를 포함한다. 그러나, 보통 단리된 항체는 적어도 하나의 정제 단계에 의해 제조될 것이다.

[0076] 보통, 항체는 공지된 결합 특징을 갖는 모 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 도메인 중 하나의 아미노산 서열과 적어도 75% 아미노산 서열 동일성 또는 유사성, 더 바람직하게는 적어도 80%, 더 바람직하게는 적어도 85%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 및 가장 바람직하게는 적어도 95%를 갖는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 및/또는 경쇄 가변부를 포함할 수 있다. 이 서열에 대한 동일성 또는 유사성은, 필요하다면, 최대 서열 백분율 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후에, 중-의존적 항체 잔기와 동일(즉, 동일한 잔기) 또는 유사한(즉, 통상적인 측쇄 특성에 기반한 동일한 군으로부터의 아미노산 잔기) 후보 서열 내 아미노산 잔기의 백분율로서 본 명세서에서 정의된다. 가변 도메인 밖의 항체 서열 내로 N-말단, C-말단, 또는 내부 연장, 결실 또는 삽입은 서열 동일성 또는 유사성에 영향을 미치는 것으로 해석될 수 없다. 천연 유래 잔기는 하기의 통상적인 측쇄 특성에 기반하는 군으로 나누어진다:

[0077] (1) 소수성: 노르류신, met, ala, val, leu, ile;

[0078] (2) 중성 친수성: cys, ser, thr, asn, gln;

[0079] (3) 산성: asp, glu;

[0080] (4) 염기성: his, lys, arg;

[0081] (5) 쇠 배향에 영향을 미치는 잔기: gly, pro; 및

[0082] (6) 방향족: trp, tyr, phe.

[0083] 보존적 치환이 종종 바람직하지만, 비-보존적 치환(이들 부류 중 하나의 구성원을 다른 부류의 구성원으로 교환하는 것을 수반함)이 또한 상정된다.

- [0084] 바람직한 치료적 항체는 IgG 항체이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "IgG"는 인식된 면역글로불린 감마 유전자에 의해 실질적으로 암호화된 항체 부류에 속하는 폴리펩타이드를 의미한다. 인간에서 이 부류는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 마우스에서 이 부류는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3을 포함한다. 항체의 IgG 부류 내 공지된 Ig 도메인은 VH, C<sub>H</sub>1, C<sub>H</sub>2, C<sub>H</sub>3, VL 및 CL이다. IgG는 몇몇 실험적 이유로 치료적 항체에 대한 바람직한 부류이다. IgG 항체는 안정하고, 용이하게 정제되며, 약제학적 공급체에 대해 실험적인 조건 하에서 저장될 수 있다. 생체내에서, 그들은 단지 그들의 크기의 함수가 아니라 또한 소위 Fc 수용기(또는 FcRn)와 그들의 상호작용의 결과인 긴 생물학적 반감기를 가진다. 이 수용기는 세포 내 이화작용으로부터 IgG를 보호하고 그것을 다시 혈장으로 재순환시키는 것으로 보인다.
- [0085] 항체는 특이적 항원에 결합하는 면역학적 단백질이다. 인간 및 마우스를 포함하는 대부분의 동물에서, 항체는 짝지어진 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드로부터 구성된다. 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 항체 간에 상당한 서열 다양성을 나타내며, 표적 항원에 대한 결합을 초래한다. 각각의 쇠는 개개 면역글로불린(Ig) 도메인으로 구성되고, 따라서, 유전적 용어 면역글로불린은 이러한 단백질에 대해 사용된다.
- [0086] 용어 "특이적으로 결합하는"은 상기 주목한 바와 같이 항체가 결합하는 에피토프(들)를 나타내는 임의의 폴리펩타이드에 항체가 결합하기 때문에, 항체가 그의 의도된 표적에 배타적으로 결합한다는 것을 나타내는 것으로 의도되지 않는다. 오히려, 항체의 의도된 표적에 대한 항체의 친화도가 적절한 에피토프(들)를 나타내지 않는 비표적 분자에 대한 항체의 친화도에 비해 약 5배 더 크다면, 항체는 "특이적으로 결합한다". 바람직하게는, 항체의 친화도는 비표적 분자에 대한 항체 친화도보다 표적 분자에 대해 적어도 약 5배, 바람직하게는 10배, 더 바람직하게는 25-배, 훨씬 더 바람직하게는 50배, 및 가장 바람직하게는 100배 이상일 것이다. 바람직한 실시형태에서, 바람직한 항체는 적어도 약  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , 바람직하게는 약  $10^8 \text{ M}^{-1}$  내지 약  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , 약  $10^9 \text{ M}^{-1}$  내지 약  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , 또는 약  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  내지 약  $10^{12} \text{ M}^{-1}$ 의 친화도로 결합된다.
- [0087] 친화도는  $K_d = k_{off}/k_{on}$ ( $k_{off}$ 는 해리 속도 상수이고,  $k_{on}$ 은 결합 속도 상수이며,  $K_d$ 는 평형 상수임)로서 계산된다. 친화도는 다양한 농도(c)에서 표지된 리간드의 결합된 분획(r)을 측정함으로써 평형상태에서 결정될 수 있다. 스캐차드(Scatchard) 식을 이용하여 데이터를 그래프로 표현한다:  $r/c = K(n-r)$ : 여기서  $r$  = 결합된 리간드의 몰/평형상태에서 수용기의 몰;  $c$  = 평형상태에서 유리 리간드 농도;  $K$  = 평형상태 해리 상수; 및  $n$  = 수용기 분자 당 리간드 결합 부위의 수. 그래프 분석에 의해,  $r/c$ 는 X-축 상의  $r$ 에 대해 Y-축 상에서 플롯팅하며, 이렇게 해서 스캐차드 플롯을 생성한다. 스캐차드 분석에 의한 항체 친화도 측정은 당업계에서 잘 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[van Erp et al., *J. Immunoassay* 12: 425-43, 1991; Nelson and Griswold, *Comput. Methods Programs Biomed.* 27: 65-8, 1988] 참조.
- [0088] 본 발명의 항체는 에피토프 맵핑에 의해 추가로 특성규명될 수 있으며, 따라서, 본 명세서에 기재된 면역분석에서 가장 큰 임상적 효용을 갖는 항체 및 에피토프가 선택될 수 있다. 용어 "에피토프"는 항체에 특이적으로 결합할 수 있는 항원 결정소를 지칭한다. 에피토프는 보통 아미노산 또는 당 측쇄와 같은 분자의 화학적 활성 표면 그룹화로 이루어지며, 보통 특이적인 3차원 구조적 특징뿐만 아니라 특이적 전하 특징을 가진다. 입체배좌적 및 비입체배좌적 에피토프는 전자에 대한 결합이(후자는 아님) 변성 용매의 존재 하에서 상실된다는 점에서 구별된다. 바람직하게는, 표적 분자 상에 존재하지만, 비표적 분자 상에는 부분적으로 존재하거나 또는 완전히 없는 에피토프가 표적화된다.
- [0089] 일부 실시형태에서, 항체 스캐폴드는 상이한 종으로부터의 서열의 혼합물일 수 있다. 이와 같이, 항체가 항체라면, 이러한 항체는 키메라 항체 및/또는 인간화된 항체일 수 있다. 일반적으로, "키메라 항체" 및 "인간화된 항체"는 하나 이상의 종으로부터의 영역을 조합하는 항체를 지칭한다. 예를 들어, "키메라 항체"는 전통적으로 마우스(또는 일부 경우에서 래트)로부터의 가변 영역(들) 및 인간으로부터의 불변 영역(들)을 포함한다. "인간화된 항체"는 일반적으로 인간 항체에서 발견된 서열에 대해 교환된 가변-도메인 프레임워크 영역을 갖는 비-인간 항체를 지칭한다. 일반적으로, 인간화된 항체에서, CDR을 제외한 전체 항체는 인간 유래의 폴리펩타이드에 의해 암호화되거나 또는 그의 CDR 내에서의 제외하고 이러한 항체에 대해 동일하다. CDR(이의 일부 또는 모두는 비인간 유기체에서 유래된 핵산에 의해 암호화됨)은 인간 항체 가변 영역의 베타-시트 프레임워크에 접합되어 항체를 생성하는데, 항체의 특이도는 접합된 CDR에 의해 결정된다. 이러한 항체의 생성은, 예를 들어, WO 92/11018, 문헌[Jones, 1986, *Nature* 321:522-525, Verhoeyen et al., 1988, *Science* 239:1534-1536]에 기재되어 있다. 대응하는 공여체 잔기에 대해 선택된 수용체 프레임워크 잔기의 "역돌연변이"는 종종 초기 접합 구성체에서 상실된 친화도를 재획득하는데 필요로 된다(미국 특허 제5,530,101호; 미국 특허 제5,585,089호; 미국 특허 제5,693,761호; 미국 특허 제5,693,762호; 미국 특허 제6,180,370호; 미국 특허 제5,859,205호; 미국 특허 제



5,821,337호; 미국 특허 제6,054,297호; 미국 특허 제6,407,213호). 인간화된 항체는 최적으로는 또한 면역글로불린 불변 영역의 적어도 일부, 전형적으로는 인간 면역글로불린의 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 것이며, 따라서 전형적으로는 인간 Fc 영역을 포함할 것이다. 유전자 공학 처리된 면역계를 지니는 마우스를 이용하여 인간화된 항체가 또한 생성될 수 있다. 문헌[Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654]. 비-인간 항체의 인간화 및 정형화(reshaping)를 위한 다양한 기법 및 방법은 당업계에 잘 공지되어 있다(문헌[Tsurushita & Vasquez, 2004, Humanization of Monoclonal Antibodies, Molecular Biology of B Cells, 533-545, Elsevier Science (USA)] 및 거기에 인용된 참고문헌). 인간화 방법은 문헌[Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmann et al., 1988; Nature 332:323-329; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239:1534-1536; Queen et al., 1989, Proc Natl Acad Sci, USA 86:10029-33; He et al., 1998, J. Immunol. 160: 1029-1035; Carter et al., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89:4285-9, Presta et al., 1997, Cancer Res.57(20):4593-9; Gorman et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4181-4185; O'Connor et al., 1998, Protein Eng 11:321-8]에 기재되어 있는 방법을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 비인간 항체 가변 영역의 면역원성을 감소시키는 인간화 또는 다른 방법은, 예를 들어 문헌[Roguska et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:969-973]에 기재되어 있는 재포장(resurfacing) 방법을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 모 항체는 당업계에 공지되어 있는 바와 같이 친화도 성숙되었다. 구조 기반 방법, 예를 들어 미국 특허 제 11/004,590호에 기재되어 있는 바와 같은 인간화 및 친화도 성숙을 위해 사용될 수 있다. 선택 기반 방법은 문헌[Wu et al., 1999, J. Mol. Biol. 294:151-162; Baca et al., 1997, J. Biol. Chem. 272(16):10678-10684; Rosok et al., 1996, J. Biol. Chem. 271(37): 22611-22618; Rader et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 8910-8915; Krauss et al., 2003, Protein Engineering 16(10):753-759]에 기재되어 있는 방법을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 인간화 및/또는 친화도 성숙 항체 가변 영역에 사용될 수 있다. 다른 인간화 방법은 미국 특허 제09/810,502호; 문헌[Tan et al., 2002, J. Immunol. 169:1119-1125; De Pascalis et al., 2002, J. Immunol. 169:3076-3084]에 기재되어 있는 방법을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 CDR의 단지 일부의 접합을 수반할 수 있다.

[0090] 일 실시형태에서, 항체는 완전 인간 항체이다. "완전 인간 항체" 또는 "완전한 인간 항체"는 인간 염색체로부터 유래된 항체의 유전자 서열을 갖는 인간 항체를 지칭한다. 완전 인간 항체는, 예를 들어, 유전자이식 마우스(Bruggemann et al., 1997, Curr Opin Biotechnol 8:455-458) 또는 선택 방법과 결합된 인간 항체 라이브러리(Griffiths et al., 1998, Curr Opin Biotechnol 9:102-108)로부터 얻을 수 있다.

[0091] 항체의 생성

[0092] 단클론성 항체 제조는 혼성세포, 재조합체, 및 파지 디스플레이 기법, 또는 이들의 조합의 사용을 포함하는 당업계에 공지된 매우 다양한 기법을 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 단클론성 항체는 당업계에 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌[Harlow et al., ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling, et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND T-CELL HYBRIDOMAS, pp. 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)](이들 둘 다 그들의 전문이 참고로 포함됨)에서 교시된 것을 포함하는 혼성세포 기법을 이용하여 생성될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "단클론성 항체"는 혼성세포 기법을 통해 생성된 항체로 제한되지 않는다. 용어 "단클론성 항체"는 임의의 진핵세포, 원핵세포, 또는 파지 클론을 포함하는 단일 클론으로부터 유래된 항체를 지칭하며, 그에 의해 생성된 방법은 지칭하지 않는다.

[0093] 래트 및 마우스 이외의 동물로부터 유래된 단클론성 항체는 독특한 이점을 제공한다. 신호 형질도입 및 질환에 적절한 다수의 단백질 표적은 마우스, 래트와 인간 사이에서 고도로 보존되며, 따라서 마우스 또는 래트 숙주에 의해 자가-항원으로서 인식되어 그들을 덜 면역원성으로 만들 수 있다. 이 문제는 숙주 동물로서 토끼를 이용할 때 회피될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Rossi et al., *Am. J. Clin. Pathol.*, 124, 295-302, 2005] 참조.

[0094] 혼성세포 기법을 이용하는 특이적 항체에 대한 생성 및 선별방법은 일상적이며, 당업계에 잘 공지되어 있다. 비제한적 예에서, 마우스는 관심 대상의 항원 또는 이러한 항원을 발현시키는 세포를 이용하여 면역화될 수 있다. 일단 면역 반응이 검출되면, 예를 들어, 항원에 특이적인 항체가 마우스 혈청에서 검출되고, 마우스 비장이 채취되며, 비장세포가 단리된다. 이어서, 비장세포는 잘 공지된 기법에 의해 임의의 적합한 골수종 세포에 융합된다. 혼성세포는 제한적 희석에 의해 선택 및 클로닝된다. 이어서, 혼성세포 클론은 항원에 결합할 수 있는 항체를 분비하는 세포에 대해 당업계에 공지된 방법에 의해 분석된다. 일반적으로 고수준의 항체를 함유하는 복수액은 양성 혼성세포 클론을 마우스에 복막내로 접종함으로써 생성될 수 있다.

[0095] 항체 생성 방법에서 사용될 수 있는 애주번트는 단백질 애주번트; 박테리아 애주번트, 예를 들어 전체 박테리아

(BCG, 코리네박테리움 파르부름(*Corynebacterium parvum*), 살로넬라 미네소타(*Salmonella minnesota*)) 및 세포벽 골격, 트레할로스 다이마이콜레이트, 모소포스포릴 지질 A, 결핵균의 메탄올 추출가능 잔기(methanol extractable residue: MER), 완전 또는 불완전 프로인트 애주번트를 포함하는 박테리아 구성성분; 바이러스 애주번트; 화학적 애주번트, 예를 들어, 수산화알루미늄, 요오도아세테이트 및 콜레스테릴 헤미숙시네이트; 네이키드 DNA 애주번트를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 본 발명의 방법에서 사용될 수 있는 다른 애주번트는 콜레라 독소, 파라폭스 단백질, MF-59(카이론 코포레이션(*Chiron Corporation*)); 또한 문헌[Bieg et al. (1999) "GAD65 And Insulin B Chain Peptide (9-23) Are Not Primary Autoantigens In The Type 1 Diabetes Syndrome Of The BB Rat," *Autoimmunity*, 31(1):15-24] 참조, 이는 본 명세서에 참고로 포함됨), MPL(등록상표)(코릭사 코포레이션(*Corixa Corporation*)); 또한 문헌[Lodmell et al. (2000) "DNA Vaccination Of Mice Against Rabies Virus: Effects Of The Route Of Vaccination And The Adjuvant Monophosphoryl Lipid A (MPL)," *Vaccine*, 18: 1059-1066; Johnson et al. (1999) "3-O-Desacyl Monophosphoryl Lipid A Derivatives: Synthesis And Immunostimulant Activities," *Journal of Medicinal Chemistry*, 42: 4640-4649; Baldridge et al. (1999) "Monophosphoryl Lipid A (MPL) Formulations For The Next Generation Of Vaccines," *Methods*, 19: 103-107] 참조, 이들 모두 본 명세서에 참고로 포함됨), RC-529 애주번트(코릭사 코포레이션; 코릭사 아미노알킬 글루코사미나이드 4-포스페이트(AGP) 화학적 라이브러리로부터의 주요 화합물, 또한 [www.corixa.com](http://www.corixa.com) 참조), 및 데톡스(DETOX)(상표명) 애주번트(코릭사 코포레이션; 데톡스(상표명) 애주번트는 MPL(등록상표) 애주번트(모노포스포릴 지질 A) 및 마이코박테리아 세포벽 골격을 포함함; 또한 문헌[Eton et al. (1998) "Active Immunotherapy With Ultraviolet B-Irradiated Autologous Whole Melanoma Cells Plus DETOX In Patients With Metastatic Melanoma," *Clin. Cancer Res.* 4(3):619-627; 및 Gupta et al. (1995) "Adjuvants For Human Vaccines-Current Status, Problems And Future Prospects," *Vaccine*, 13(14): 1263-1276] 참조, 이들 둘 다 본 명세서에 참고로 포함됨)를 포함한다.

[0096] 수많은 간행물이 선택된 분석물에 결합을 위한 폴리펩타이드 라이브러리를 생성 및 선별하는 파지 디스플레이 기법의 사용을 논의한다. 예를 들어, 문헌[Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-82, 1990; Devlin et al., *Science* 249, 404-6, 1990, Scott and Smith, *Science* 249, 386-88, 1990]; 및 Ladner et al., 미국 특허 제5,571,698호 참조. 파지 디스플레이 방법의 기본적 개념은 선별된 폴리펩타이드를 암호화하는 DNA와 폴리펩타이드 간의 물리적 결합의 확립이다. 이 물리적 결합은 폴리펩타이드를 암호화하는 파지 게놈을 동봉하는 캡시드의 부분으로서 폴리펩타이드의 파지 디스플레이 입자에 의해 제공된다. 폴리펩타이드와 그들의 유전자 물질 사이의 물리적 결합의 확립은 상이한 폴리펩타이드를 보유하는 매우 다수의 파지의 동시 집단선별 검사를 허용한다. 표적에 대해 친화도를 지니는 폴리펩타이드의 파지 디스플레이는 표적에 결합되고, 이들 파지는 표적에 대한 친화도 선별에 의해 풍부화된다. 이들 파지로부터 디스플레이된 폴리펩타이드의 동일성은 이들 각각의 게놈으로부터 결정될 수 있다. 이들 방법을 이용하면, 목적으로 하는 표적에 대해 결합 친화도를 갖는 것으로 동정된 폴리펩타이드는 전통적인 수단에 의해 대량으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제 6,057,098호를 참조하며, 이는 본 명세서에서 모든 표, 도면 및 청구범위를 포함하는 그의 전문이 포함된다.

[0097] 이어서, 이들 방법에 의해 생성된 항체는 관심 대상의 정제된 폴리펩타이드를 이용하여 친화도 및 특이도에 대해 우선 선별하고, 필요하다면, 항체의 친화도 및 특이도에 대한 결과를 결합으로부터 제외될 것으로 요망되는 폴리펩타이드와 비교함으로써 선택될 수 있다. 선별 절차는 마이크로타이터 플레이트의 별개의 웰에서 정제된 폴리펩타이드의 고정을 수반할 수 있다. 이어서 잠재적 항체 또는 항체의 군을 함유하는 용액을 각각의 마이크로타이터 웰에 두고 나서, 약 30분 내지 2시간 동안 인큐베이션시킨다. 이어서, 마이크로타이터 웰은 세척되고, 표지된 2차 항체(예를 들어, 상승된 항체가 마우스 항체라면, 항-마우스 항체는 알칼리 포스파타제에 컨쥬레이션됨)는 웰에 첨가되며, 약 30분 동안 인큐베이션되고 나서, 세척된다. 기체가 웰에 첨가되고, 고정 폴리펩타이드(들)에 대한 항체가 존재하는 경우 색 반응이 일어날 것이다.

[0098] 이어서, 이렇게 동정한 항체는 선택된 분석 설계에서 친화도 및 특이도에 대해 추가로 분석될 수 있다. 표적 단백질에 대한 면역분석의 개발에서, 정제된 표적 단백질은 선택된 항체를 이용하는 면역분석의 민감도 및 특이도를 판단하는 표준으로서 작용한다. 다양한 항체의 결합 친화도는 상이할 수 있기 때문에; 특정 항체쌍(예를 들어, 샌드위치 분석에서)은 서로 입체장애적 등으로 방해될 수 있고, 항체의 분석 성능은 항체의 절대 친화도 및 특이도보다 더 중요한 측정이 될 수 있다.

[0099] 항체는 또한 기능적 내인성 면역글로불린을 발현시킬 수 없지만, 인간 면역글로불린 유전자를 발현시킬 수 있는 유전자이식 마우스를 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 인간 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자 복합체는 무작위로 또는 상동성 재조합에 의해 마우스 배아 줄기 세포 내로 도입될 수 있다. 대안적으로, 인간 가변

영역, 불변 영역 및 다양성 영역은 인간 중쇄 및 경쇄 유전자에 추가로 마우스 배아 줄기 세포 내로 도입될 수 있다. 마우스 중쇄 및 경쇄 면역글로불린 유전자는 상동성 재조합에 의해 인간 면역글로불린 좌위의 도입과 별도로 또는 동시에 비기능성을 제공할 수 있다. 특히, JH 영역의 동형 접합적 결실은 내인성 항체 생성을 방지한다. 변형된 배아 줄기 세포는 키메라 마우스를 생성하기 위해 배반포 내로 확장되고 미세주사된다. 이어서, 키메라 마우스는 인간 항체를 발현시키는 동형 접합적 자손을 생성하도록 번식된다. 유전자이식 마우스는 선택 항원, 예를 들어 본 발명의 폴리펩타이드의 모두 또는 일부를 이용하는 전통적인 방법을 이용하여 면역화된다. 항원에 관련된 단클론성 항체는 전통적인 혼성세포 기법을 이용하여 면역화된, 유전자이식 마우스로부터 얻어질 수 있다. 유전자이식 마우스에 의해 보유되는 인간 면역글로불린 이식유전자는 B 세포 분화 동안 재배열되고, 후속적으로 종류 변환 및 체세포 돌연변이를 겪는다. 이렇게 해서, 이러한 기법을 이용하여, 유용한 IgG, IgA, IgM 및 IgE 항체를 치료적으로 생성할 수 있다. 인간 항체를 생성하기 위한 이 기법의 검토를 위해, 문헌 [Lonberg et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," Int. Rev. Immunol. 13:65-93]을 참조하며, 이는 그의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다). 인간 항체 및 인간 단클론성 항체를 생성하기 위한 이런 기법 및 이러한 항체를 생성하는 프로토콜의 상세한 논의를 위해, 예를 들어, 국제 특허 출원 WO 98/24893, WO 96/34096 및 WO 96/33735; 및 미국 특허 제5,413,923호, 제5,625,126호, 제5,633,425호, 제5,569,825호, 제5,661,016호, 제5,545,806호, 제5,814,318호, 및 제5,939,598호를 참조하며, 이들은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다. 추가로, 엠제닉스 인코포레이티드(Abgenix, Inc.)(캘리포니아주 프리몬트에 소재) 및 메다렉스(Medarex)(뉴저지주 프린스턴에 소재)와 같은 회사는 상기 기재한 것과 유사한 기법을 이용하여 선택 항체에 관한 인간 항체를 제공하도록 관여될 수 있다.

[0100] 항체의 재조합 발현

[0101] 일단 본 발명의 항체를 암호화하는 핵산 서열이 얻어지면, 항체 생성을 위한 벡터는 당업계에 잘 공지된 기법을 이용하여 재조합 DNA 기법에 의해 생성될 수 있다. 당업자에게 잘 공지된 방법은 항체 암호화 서열 및 적절한 전사 및 번역 제어 신호를 함유하는 발현 벡터를 구성하는데 사용될 수 있다. 이들 방법은, 예를 들어 시험관내 재조합 DNA 기법, 합성 기법 및 생체내 유전자 재조합을 포함한다. (예를 들어, 문헌[Sambrook et al, 1990, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 및 Ausubel et al. eds., 1998, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY]에 기재된 기법을 참조).

[0102] 항체의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 발현 벡터는 전통적인 기법(예를 들어, 전기천공법, 리포솜 형질감염 및 인산칼슘 침전)에 의해 숙주 세포에 전달될 수 있고, 이어서 형질전환된 세포는 본 발명의 항체를 생성하기 위한 전통적인 기법에 의해 배양된다. 구체적 실시형태에서, 항체의 발현은 구성적, 유도성 또는 조직, 특이적 프로모터에 의해 조절된다.

[0103] 본 발명의 재조합 항체를 발현시키기 위해 사용되는 숙주 세포는 박테리아 세포, 예컨대 에스케리키아 콜라이(Escherichia coli), 또는 바람직하게는 특히 전체 재조합 면역글로불린 분자의 발현을 위한 진핵 세포일 수 있다. 특히, 인간 거대세포바이러스로부터의 주요 전초기 유전자 프로모터 구성요소와 같은 벡터와 함께 포유류 세포, 예컨대 중국 햄스터 난소 세포(Chinese hamster ovary cell: CHO)는 면역글로불린에 대한 효과적인 발현 시스템이다(Foecking et al. (1986) "Powerful And Versatile Enhancer-Promoter Unit For Mammalian Expression Vectors." Gene 45:101-105; Cockett et al. (1990) "High Level Expression Of Tissue Inhibitor Of Metalloproteinases In Chinese Hamster Ovary Cells Using Glutamine Synthetase Gene Amplification," Biotechnology 8:662-667).

[0104] 본 발명의 항체를 발현시키기 위해 다양한 숙주-발현 벡터 시스템이 이용될 수 있다. 이러한 숙주-발현 시스템은 항체의 암호화 서열이 생성되고 후속적으로 정제되지만, 또한 적절한 뉴클레오타이드 암호 서열에 의해 형질 전환되거나 또는 형질감염될 때, 인시주로 본 발명의 항체를 발현시킬 수 있는 세포를 나타내는 비히클을 나타낸다. 이들은 면역글로불린 암호화 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터에 의해 형질전환된 미생물, 예컨대 박테리아(예컨대 이콜라이(E. coli) 및 바실러스 서브틸리스(B. subtilis)); 면역글로불린 암호화 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터에 의해 형질전환된 효모(예를 들어, 사카로마이세스 피키아(Saccharomyces pichia)); 면역글로불린 암호화 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 바콜로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들어, 콜리플라워 모자이크 바이러스(cauliflower mosaic virus: CaMV) 및 담배 모자이크 바이러스(tobacco mosaic virus: TMV))로 감염되거나 또는 면역글로불린 암호화 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들어, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유류 세포 시스템(예를 들어, COS, CHO, BHK,



293, 293T, 3T3 세포, 림프 세포(미국 특허 제5,807,715호 참조), 포유류 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유류 바이러스로부터 유래된 프로모터(예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 작제물을 보유하는 Per C.6 세포(크루셀(Crucell)에 의해 개발된 래트 망막 세포))를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0105] 박테리아 시스템에서, 다수의 발현 벡터는 발현 중인 항체에 대해 의도되는 용도에 따라서 유리하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 매우 다량의 이러한 단백질이 생성될 때, 항체의 약제학적 조성물의 생성을 위해, 용이하게 정제되는 고수준의 융합 단백질 생성물의 발현을 지시하는 벡터가 바람직할 수 있다. 이러한 벡터는 항체 암호화 서열이 lac Z 암호화 영역과 프레임 내에서 벡터 내로 개개로 결합될 수 있고, 따라서 융합 단백질이 생성되는 이콜라이 발현 벡터 pUR278(Ruther et al. (1983) "Easy Identification Of cDNA Clones," EMBO J. 2:1791-1794); pIN 벡터(Inouye et al. (1985) "Up-Promoter Mutations In The Lpp Gene Of Escherichia coli," Nucleic Acids Res. 13:3101-3110; Van Heeke et al. (1989) "Expression Of Human Asparagine Synthetase In Escherichia coli," J. Biol. Chem. 24:5503-5509); 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. pGEX 벡터는 또한 글루타티온 S-트랜스퍼라제(glutathione S-transferase: GST)를 이용하여 융합 단백질로서 외래 폴리펩타이드를 발현시키는데 이용될 수 있다. 일반적으로, 이러한 융합 단백질은 가용성이며, 매트릭스 글루타티온-아가로스 비드에 대한 흡착 및 결합에 의한 다음에 유리 글루타티온의 존재 하에 용리에 의해 용리 세포로부터 용이하게 정제될 수 있다. pGEX 벡터는 트롬빈 또는 인자 Xa 프로테아제 절단 부위를 포함하도록 설계되며, 따라서 클로닝된 표적 유전자 산물은 GST 모이어티로부터 방출될 수 있다.

[0106] 곤충 시스템에서, 아우토그라파 캘리포르니카 핵 다면체 바이러스(AcNPV)는 외래 유전자를 발현시키기 위한 벡터로서 사용된다. 바이러스는 스포도테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda) 세포에서 성장한다. 항체 암호화 서열은 바이러스의 비필수 영역(예를 들어, 폴리헤드린 유전자) 내로 개별적으로 클로닝되고, AcNPV 프로모터(예를 들어, 폴리헤드린 프로모터)의 제어 하에 놓일 수 있다.

[0107] 포유류 숙주 세포에서, 다수의 바이러스 기반 발현 시스템이 이용될 수 있다. 아데노바이러스가 발현 벡터로서 사용되는 경우에, 관심 대상의 항체 암호화 서열은 아데노바이러스 전사/번역 제어 복합체, 예를 들어, 후기 프로모터 및 3글자 리더 서열에 결합될 수 있다. 이어서, 이 키메라 유전자는 시험관내 또는 생체내 재조합에 의해 아데노바이러스 게놈에 삽입될 수 있다. 바이러스 게놈의 비필수 영역(예를 들어, 영역 E1 또는 E3) 내 삽입은 살아있고 감염 숙주 내 면역글로불린 분자를 발현시킬 수 있는 재조합 바이러스를 생성할 것이다. (예를 들어, 문헌[Logan et al. (1984) "Adenovirus Tripartite Leader Sequence Enhances Translation Of mRNAs Late After Infection," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 81:3655-3659] 참조). 특이적 개시 신호는 또한 삽입된 항체 암호화 서열의 효율적인 번역에 필요할 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접한 서열을 포함한다. 더 나아가, 개시 코돈은 전체 삽입물의 번역을 보장하기 위해 목적으로 하는 암호화 서열의 리딩 프레임과 같은 단계에 있어야 한다. 이들 외인성 번역 제어 신호 및 개시 코돈은 다양한 유래, 즉, 천연과 합성 둘 다를 가질 수 있다. 발현의 효율은 적절한 전사 인핸서 구성요소, 전사 종결자 등의 포함에 의해 향상될 수 있다(문헌[Bitter et al. (1987) "Expression And Secretion Vectors For Yeast," Methods in Enzymol. 153:516-544] 참조).

[0108] 추가로, 삽입된 서열의 발현을 조절하고 목적으로 하는 특이적 방식에서 유전자 산물을 변형 및 가공하는 숙주 세포 군주가 선택될 수 있다. 단백질 산물의 이러한 변형(예를 들어, 글리코실화) 및 가공(예를 들어, 절단)은 단백질 기능에 중요할 수 있다. 상이한 숙주 세포는 번역후 가공 및 단백질 및 유전자 산물의 변형에 대해 특징적 및 특이적 메커니즘을 가진다. 적절한 세포주 또는 숙주 시스템은 발현된 외래 단백질의 정확한 변형 및 가공을 보장하도록 선택될 수 있다. 이를 위하여, 유전자 산물의 1차 전사체, 글리코실화 및 인산화의 적절한 가공을 위한 세포 기작을 소유하는 진핵 숙주 세포가 사용될 수 있다. 이러한 포유류 숙주 세포는 CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 293T, 3T3, WI38, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 및 T47D, CRL7030 및 Hs578Bst를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0109] 재조합 단백질의 장기간, 고수율 생성을 위해, 안정한 발현이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 항체를 안정하게 발현시키는 세포주는 공학처리될 수 있다. 바이러스의 복제기점을 함유하는 발현 벡터를 이용하기보다는, 숙주 세포는 적절한 발현 제어 구성요소(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 서열, 전사 종결자, 폴리아데닐화 부위 등) 및 선택가능한 마커에 의해 제어되는 DNA에 의해 형질전환될 수 있다. 외래 DNA의 도입 후에, 공학 처리된 세포를 풍부한 배지 내에서 1 내지 2일 동안 성장시킬 수 있고, 이어서, 선택 배지로 전환된다. 재조합 플라스미드 내 선택가능한 마커는 선택에 대한 내성을 부여하며, 세포는 플라스미드를 그들의 염색체 내로 안정하게 통합시켜서 병소를 형성하는데, 이는 결국 클로닝되고 세포주로 확장된다. 이 방법은 유리하게는 본 발명의 항

체를 발현시키는 세포주를 공학처리하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 공학 처리된 세포주는 본 발명의 항체와 직접 또는 간접적으로 상호작용하는 선별 및 평가에서 특히 유용할 수 있다.

- [0110] 단순포진 바이러스 티미딘 키나제(Wigler et al. (1977) "Transfer Of Purified Herpes Virus Thymidine Kinase Gene To Cultured Mouse Cells," Cell 11:223-232), 하이포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (Szybalska et al. (1962) "Genetics Of Human Cess Line. IV. DNA-Mediated Heritable Transformation Of A Biochemical Trait," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 48:2026-2034)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다수의 선택 시스템이 사용될 수 있고, 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제(Lowy et al. (1980) "Isolation Of Transforming DNA: Cloning The Hamster Aprt Gene," Cell 22:817-823) 유전자는 tk-, hprt- 또는 aprt- 세포에서 각각 사용될 수 있다. 또한 다음의 유전자에 대한 선택의 기초로서 항대사물질 내성이 사용될 수 있다: dhfr(메토타렉세이트에 대한 내성을 부여함)(Wigler et al. (1980) "Transformation Of Mammalian Cells With An Amplifiable Dominant-Acting Gene," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 77:3567-3570; O'Hare et al. (1981) "Transformation Of Mouse Fibroblasts To Methotrexate Resistance By A Recombinant Plasmid Expressing A Prokaryotic Dihydrofolate Reductase," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 78:1527-1531); gpt (마이코페놀산에 대한 내성을 부여함)(Mulligan et al. (1981) "Selection For Animal Cells That Express The Escherichia coli Gene Coding For Xanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 78:2072-2076); neo(아미노글리코사이드 G-418에 대한 내성을 부여함)(Tachibana et al. (1991) "Altered Reactivity Of Immunoglobulin Produced By Human-Human Hybridoma Cells Transfected By pSV2-Neo Gene," Cytotechnology 6(3):219-226; Tolstoshev (1993) "Gene Therapy, Concepts, Current Trials And Future Directions," Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulligan (1993) "The Basic Science Of Gene Therapy," Science 260:926-932; 및 Morgan et al. (1993) "Human gene therapy," Ann. Rev. Biochem. 62:191-217). 사용될 수 있는 재조합 DNA 기법의 당업계에서 통상적으로 공지된 방법은 문헌[Ausubel et al. (eds.), 1993, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, NY; Kriegler, 1990, GENE TRANSFER AND EXPRESSION, A LABORATORY MANUAL, Stockton Press, NY; 및 Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), 1994, CURRENT PROTOCOLS IN HUMAN GENETICS, John Wiley & Sons, NY.; Colbere-Garapin et al. (1981) "A New Dominant Hybrid Selective Marker For Higher Eukaryotic Cells," J. Mol. Biol. 150:1-14]; 및 하이그로(hygro)(이는 하이그로마이신에 대한 내성을 부여함)(Santerre et al. (1984) "Expression Of Prokaryotic Genes For Hygromycin B And G418 Resistance As Dominant-Selection Markers In Mouse L Cells," Gene 30:147-156)에 기재되어 있다.

- [0111] 본 발명의 항체의 발현 수준은 벡터 증폭에 의해 증가될 수 있다(검토를 위해, 문헌[Bebbington and Hentschel, "The Use Of Vectors Based On Gene Amplification For The Expression Of Cloned Genes In Mammalian Cells," DNA CLONING, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987)] 참조). 항체를 발현시키는 벡터 시스템 내 마커가 증폭가능할 때, 숙주 세포의 배양물 내에 존재하는 저해제 수준의 증가는 마커 유전자의 복제물 수를 증가시킬 것이다. 증폭된 영역은 항체의 뉴클레오타이드 서열과 관련되기 때문에, 항체의 생성은 또한 증가될 것이다(Crouse et al. (1983) "Expression And Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes," Mol. Cell. Biol. 3:257-266).

- [0112] 숙주 세포는 본 발명의 두 발현 벡터(중쇄 유래 폴리펩타이드를 암호화하는 제1 벡터 및 경쇄 유래 폴리펩타이드를 암호화하는 제2 벡터)와 함께 공동형질감염될 수 있다. 두 벡터는 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드의 발현을 동일하게 할 수 있는 동일한 선택가능한 마커를 포함할 수 있다. 대안적으로, 중쇄와 경쇄 폴리펩타이드를 암호화하는 단일 벡터가 사용될 수 있다. 이러한 상황에서, 경쇄는 과량의 독성이 없는 중쇄를 피하도록 중쇄 앞에 위치되어야 한다(Proudfoot (1986) "Expression And Amplification Of Engineered Mouse Dihydrofolate Reductase Minigenes," Nature 322:562-565; Kohler (1980) "Immunoglobulin Chain Loss In Hybridoma Lines," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 77:2197-2199). 중쇄 및 경쇄에 대한 암호화 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수 있다.

- [0113] 일단 본 발명의 항체가 재조합적으로 발현되면, 항체의 정제를 위해 당업계에 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화도(특히 단백질 A 다음에 특이적 항원에 대한 친화도에 의한) 및 크기에 따른 칼럼 크로마토그래피), 원심분리, 차별적 용해도에 의해, 또는 단백질의 전제를 위한 임의의 다른 표준 기법에 의해 정제될 수 있다.

- [0114] 실시예

- [0115] 실시예 1: 토끼에서의 단클론성 항체 발생
- [0116] 항원/애주번트 에멀전을 이용하는 피하 주사(subcutaneous injection: SQ)에 의해 암컷 뉴질랜드 토끼를 면역화하였다. 완전 프로인트 애주번트를 이용하여 1차 면역화를 행하고 나서, 모든 후속 부스트를 위해 불완전 프로인트 애주번트를 사용하였다. 토끼에 250 $\mu$ g 단백질 항원/토끼(대안의 두 부위, 둔부 및 견갑골)로 3주마다 SQ로 주사하였다. 제2 부스트 7일 후에 주변부 귀 정맥으로부터 시험 채혈을 취하였다. 토끼의 면역 반응이 단클론성 항체에 적절한지의 여부를 결정하기 위해 간접 ELISA 분석에 의해 이 시험 채혈(면역 혈청)을 시험하였다. 가장 잘 반응하는 토끼에게 최종 SQ 부스트를 제공하고, 4일 후에 방혈을 통해 안락사시켰다. 심장천자를 통해 전혈을 수집하였다. 관심 대상의 항체를 생성하는 B 세포를 표적 항원 상에서 간접적 ELISA에 의해 동정하고, 면역 글로불린 유전자를 단리시켰다. 중쇄 및 경쇄를 별도의 포유류 발현 벡터 내로 클로닝시키고 나서, HEK 세포 내로 형질감염시키고(일시적 형질감염), 토끼 단클론성 항체를 함유하는 조직 배양 상청액을 채취하였다.
- [0117] 실시예 2: 마우스에서 단클론성 항체 발생
- [0118] 암컷 BALB/c 마우스(60일령)를 표준 작업 절차에 따라 항원/애주번트 에멀전을 이용하여 복강내 주사(IP)에 의해 면역화시켰다. 완전 프로인트 애주번트를 이용하여 1차 면역화를 행하고 나서, 모든 후속 부스트를 위해 불완전 프로인트 애주번트를 사용하였다. 마우스에 25 $\mu$ g 항원/마우스(총 용적 125 $\mu$ l/마우스)로 3주마다 IP로 주사하였다. 제2 부스트 7 내지 10일에 복재 정맥 절개에 의해 시험 채혈을 행하였다. 마우스의 면역 반응이 융합에 적절한지의 여부를 결정하기 위해 간접 ELISA 분석에 의해 이 시험 채혈(면역 혈청)을 시험하였다. 가장 잘 반응하는 2마리의 마우스에게 측부 꼬리 정맥을 통해 멸균 식염수 중의 마우스 당 10 $\mu$ g 항원의 최종 정맥내 부스트를 제공하였다. IV 부스트 4일 후에, 마우스를 안락사시키고, 비장을 채취하였다. 비장으로부터 단리시킨 림프구를 융합 과정에서 사용하여 문헌[Kohler, G.; Milstein, C. (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity". Nature 256 (5517): 495-497]의 방법을 이용하여 혼성세포를 생성하였다. PEG1500 융합 과정을 이용하여 혼성세포를 생성하였다.
- [0119] 실시예 3: 환자 샘플을 이용하는 항체의 선별(마이크로타이터-기반 ELISA 방법)
- [0120] 재료:
- [0121] 96-웰 고 결합 ELISA 플레이트-코스타(Costar) 3590(코닝)
- [0122] ELISA 코팅 완충제: PBS
- [0123] ELISA 세척 완충제: 0.02% 트윈(Tween)-20을 지니는 PBS
- [0124] ELISA 차단 완충제(써모 피어스(Thermo Pierce), 카탈로그 번호 N502)
- [0125] ELISA 희석제 시약: 200mM 트리스, 1% BSA(BioRx), 0.05% 트윈-20, pH 8.1
- [0126] 뉴트라비딘-HRP 컨쥬게이트(써모 피어스, 카탈로그 번호 31001)
- [0127] 1-단계 울트라 TMB 기질(알앤디 시스템즈(R&D systems), 카탈로그 번호 34028)
- [0128] 정지액: 2N 황산
- [0129] 포획 항체
- [0130] 바이오틴 컨쥬게이팅된 검출 항체
- [0131] 재조합 인간 IGFBP7(페프로테크(Peprotech), 카탈로그 번호 410-02)
- [0132] EXLx405 플레이트 세척기(바이오텍(Biotek))
- [0133] 멀티스칸(Multiskan) FC 플레이트 판독기(피셔 사이언티픽(Fisher Scientific))
- [0134] 시험 절차
- [0135] 정제한, 재조합 IGFBP7 분석물을 희석제 시약에 섞고 나서, 연속적으로 희석시켜 농도 범위를 아우르는 표준 샘플의 세트를 생성하였다. 환자 샘플의 냉동 일회용 분취액을 실온 수욕에서 10분 동안 해동시키고, 이어서, 희석제 시약을 이용하여 희석제 시약을 이용하여 목적으로 하는 수준으로 희석시켰다.
- [0136] 코팅 완충제 중에서 제조한 100 $\mu$ l의 5 $\mu$ g/ml 포획 항체를 96-웰 고 결합 ELISA 플레이트 상에서 각각의 웰에 첨가하고, 실온(22 $^{\circ}$ C 내지 25 $^{\circ}$ C)에서 밤새 인큐베이션시켰다. 각각의 웰을 흡입하고 나서, 자동세척기를 이용하여

300 $\mu$ l의 세척 완충제로 3회 세척하였다. 이어서, 250 $\mu$ l의 ELISA 차단 완충제를 각각의 웰에 첨가하였다. 실온에서 2시간의 인큐베이션 후에, 상기 기재한 흡입/세척 단계를 반복하였다.

[0137] 100 $\mu$ l의 표준 또는 환자 샘플을 제조한 플레이트의 각각의 웰에 첨가하고 나서, 수평 오비탈 진탕기 상에서 실온으로 인큐베이션시켰다. 2시간의 인큐베이션 후에, 플레이트를 상기 기재한 바와 같이 세척하였다. 이어서, 희석제 시약 중에서 제조한 100 $\mu$ l의 0.1  $\mu$ g/ml 검출 항체 용액을 각각의 웰에 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시킨 후에, 플레이트를 다시 세척하였다. 뉴트라비딘-HRP 컨쥬게이트의 0.1 $\mu$ g/ml 용액을 희석제 시약 중에서 제조하고 나서, 이 용액 100 $\mu$ l를 각각의 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 시키고 나서, 세척하였다. 100 $\mu$ l의 1-단계 울트라 TMB 기질을 각각의 웰에 첨가하고 나서, 10분 동안 실온에서 빛으로부터 보호하여 인큐베이션시킨 다음, 50 $\mu$ l의 정지액을 첨가하였다. 450nm 파장으로 설정한 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 각각의 웰에서 광학 밀도를 측정하였다.

[0138] 실시예 4: 환자 샘플을 이용하는 항체의 선별(측방 유동 스트립 시험 방법)

[0139] 재료:

[0140] 나이트로셀룰로스 막

[0141] 백킹 카드

[0142] 샘플 패드

[0143] 위킹(wicking) 패드

[0144] 막 차단 완충제: 10mM 인산나트륨, 0.1% 수크로스, 0.1% BSA, 0.2% PVP-40, pH 8.0

[0145] 샘플 패드 차단 완충제: 5mM 붕산염, 0.1% 트윈-20, 0.25% PVP-40, 0.5% BSA, pH 8.5

[0146] 실행 완충제 J(Running buffer J): 500mM 트리스, 0.2% 10G, 0.35% 트윈-20, 0.25% PVP-40, pH 8.5

[0147] 형광 컨쥬게이팅된 항체

[0148] 시험선 항체

[0149] 염소-항-마우스 양성 대조군 항체

[0150] 재조합 인간 IGFBP7

[0151] 스트립 조립체

[0152] AD3050 흡입 분배 시스템을 이용하여 시험선 항체로 나이트로셀룰로스 막에 줄을 긋고, 막 차단 완충제를 이용하여 차단하고 나서, 37°C에서 30분 동안 건조시켰다. 데시케이터에서 밤새 큐어링(curing)시킨 후에, 줄을 긋고 차단시킨 나이트로셀룰로스 막을 샘플 패드 차단 완충제로 전처리한 위킹 패드 및 샘플 패드를 지니는 백킹 카드 상에 적층시켰다. 카드를 5mm 폭 시험 스트립으로 절단하고, 이어서 이를 카트리지에 넣었다.

[0153] 샘플 준비

[0154] 정제된, 재조합 IGFBP7 분석물을 실행 완충제 J와 섞고, 농도 범위를 아우르는 표준 샘플의 세트를 생성하기 위해 연속적으로 희석시켰다. 환자 샘플의 냉동 일회용 분취액을 10분 동안 실온수에서 해동시키고, 이어서, 실행 완충제 J를 이용하여 목적으로 하는 수준으로 희석시켰다.

[0155] 시험 절차

[0156] PBS 중에서 10 $\mu$ l의 형광으로 컨쥬게이팅된 항체(0.025  $\mu$ g/ $\mu$ l)를 100 $\mu$ l의 샘플에 첨가하였다. 이어서, 100 $\mu$ l의 이 용액을 카트리지 상의 유입 포트에 장입시켰다. 형광 판독기 및 관련된 소프트웨어를 이용하여 결과를 t=20분에 판독하였다.

[0157] 실시예 5: 펩타이드 맵핑

[0158] 재료: 96-웰 고결합 마이크로타이터 플레이트, 뉴트라비딘, 바이오틴일화된 펩타이드, 비컨쥬게이팅된 항체, 마우스 IgG, 토끼 IgG, 염소 IgG, 항-마우스 IgG HRP 컨쥬게이트, 항-토끼 IgG HRP 컨쥬게이트, 항-염소 IgG HRP 컨쥬게이트에 컨쥬게이팅된 HRP, TMB 기질, 2N 황산을 에피토프 맵핑 실험을 위해 사용하였다.

[0159] 뉴트라비딘을 96-웰 고결합 마이크로타이터 플레이트의 개개 웰에서 고정시켰다. 플레이트를 세척하여 비반응



뉴트라비딘을 제거한 후에 단계를 차단시켰다. 바이오틴일화된 펩타이드를 수성 완충제 중에서 10 $\mu$ g/ml의 농도로 용해시켰다. 50 $\mu$ l의 펩타이드 용액을 뉴트라비딘 코팅 마이크로타이터 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. 이들 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시키고, 이어서, 세척하여 비결합 펩타이드를 제거하였다. 비컨쥬게이팅 마우스 및 토끼 항체를 5 $\mu$ g/ml로 희석시키고 나서, 100 $\mu$ l/웰로 플레이트에 첨가하였다. 항-마우스 IgG(마우스 항-IGFBP7에서) 또는 항-토끼 IgG(토끼 항-IGFBP7의 경우에)를 음성 대조군으로서 이웃하는 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시키고, 세척하였다. 항-마우스 IgG에 컨쥬게이팅된 HRP(마우스 항-IGFBP7 및 마우스 IgG 음성 대조군의 경우에), 및 항-토끼 IgG에 컨쥬게이팅된 HRP(토끼 항-IGFBP7 및 토끼 IgG 음성 대조군의 경우에)를 0.2 $\mu$ g/ml에 희석시키고 나서, 100 $\mu$ l를 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. 이들 플레이트를 실온에서 20분 동안 인큐베이션시키고 나서, 세척하였다. 100 $\mu$ l/웰의 TMB 기질의 첨가하고 나서, 플레이트를 20분 동안 인큐베이션하는 한편, 빛에 대한 노출을 피하였다. 50 $\mu$ l/웰의 정지액(2N 황산)을 각각의 웰 및 플레이트에 첨가하여 반응을 중단시켰다. 450nm에서 광학 밀도를 측정하기 위해 분광광도적 96-웰 마이크로타이터 판독기 상에서 판독하였다.

#### [0160] 실시예 6: 알라닌 스캐닝 펩타이드 맵핑

알라닌 스캐닝은 돌연변이 유발 접근에서 널리 사용되는데, 이때 표적 단백질 내 잔기는 부위 지정 돌연변이 유발에 의해 선택된 위치에서 알라닌으로 조직적으로 치환시키고 나서, 발현시킨 후, 기능에 대해 분석한다. 알라닌 잔기로의 치환은 측쇄 입체배치를 변경시키는 일 없이 또는 입체장애 또는 정전기적 효과를 도입하는 일 없이 측쇄 상호작용을 제거한다. 자동화된 돌연변이 유발 프로토콜을 이용하여, 표적 폴리펩타이드 내 모든 잔기를 알라닌으로 바꾸고, 각각의 항체 결합 도메인을 포함하는 중요한 잔기를 결정할 수 있다.

#### [0162] 실시예 7: 결과

조합된 알라닌 스캐닝 및 펩타이드 맵핑 결과를 이용하여, 독특한 IGFBP7 단클론성 항체를 동정하고, 분석 성능에 기반하여 선택하였다.

항체	펩스캔(Pepscan) 서열	어스튜트(Astute) 서열(충 영역)
7G2.1	<sup>210</sup> PGDRD <sub>214</sub> (서열번호 6)	<sup>201</sup> YGVQRTELLPGDRDNL <sub>216</sub> (서열번호 6)
6D2.1	<sup>206</sup> TELLPGDR <sub>213</sub> (서열번호 3)	<sup>191</sup> LIWNKVKRGHYGVQRT <sub>206</sub> (서열번호 7)
1C9E4.1	<sup>36</sup> EPASC <sub>40</sub> (서열번호 4)	<sup>25</sup> SSSSDTCGPCEPASCPLP <sub>44</sub> (서열번호 8)

#### [0165] 실시예 8: 서열분석 데이터

항체 1C9E4.1를 무린 IgG1/카파 항체로서 아이소타이핑하였다. 표준 방법에 의한 서열분석을 위해 단클론성 세포주로부터의 cDNA를 얻었다. 측쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 서열은 다음과 같았다:

V<sub>경쇄</sub>(서열번호 9)

DVVMQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSL LYSNGETYLHW LLQRPGQSPK 50

RLIYLVSKLD SGVPDRFTGS GSRTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCAQGTTHP 100

HTFGGGTKLE

V<sub>중쇄</sub>(서열번호 10)

QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYSFT DYSIHVVKQA PGKGLKWMGL 50

INTETGEPIY VDDFKGRFAF SLETSARTAY LQINNPKNED TATYFCARAY 100

YWAYWGQGT L V

항체 1D6

항체 1D6을 무린 IgG1/카파 항체로서 아이소타이핑하였다. 에피토프 맵핑에 의해, 1D6 항체가 IGFBP7의 입체배



좌적 에피토프에 결합하는 것을 결정하였다. 표준 방법에 의한 서열분석에 의해 단클론성 세포주로부터의 cDNA를 얻었다. 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 서열은 다음과 같았다:

- [0177] V<sub>경쇄</sub>(서열번호 11)
- [0178] QIVLTQSPAI MSASPGKVT MTCSASSSVS YMHYQQKSG TSPKRWIYDT 50
- [0179] SELASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCQW SSSPFTFGSG 100
- [0180] TKLEIKR
- [0181] V<sub>중쇄</sub>(서열번호 12)
- [0182] QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFK KYGMNVKQA PGKGLKWMGW 50
- [0183] INTYTGEPIY ADDFKGRFAF SLETSASTAY LQISNLKNE TATYFCAREE
- [0184] YGPFYAMDYV GQGTSTVTSV
- [0185] 본 발명은 당업자가 그것을 제조 및 사용하는데 충분하게 상세한 설명에서 기재 및 예시되었지만, 본 발명의 정신과 범주로부터 벗어나는 일 없이 다양한 대안, 변형 및 개선은 명확하여야 한다. 본 명세서에 제공된 예는 바람직한 실시형태를 나타내며, 예시적이고, 본 발명의 범주에 대한 제한으로서 의도되지 않는다. 그 안의 변형 및 다른 용도가 당업자에 대해 일어날 것이다. 이들 변형은 본 발명의 정신 내에 포함되며 청구범위의 범주에 의해 정해진다.
- [0186] 본 명세서의 "또는"의 사용은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 유사하게, "포함하다(comprise)", "포함하다(comprises)", "포함하는(comprising)", "포함하다(include)", "포함하다(includes)" 및 "포함하는(including)"은 상호호환적이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0187] 추가로 다양한 실시형태의 설명이 용어 "포함하는"을 사용하는 경우, 당업자는 일부 구체적 예에서 실시형태가 어구 "본질적으로 이루어진" 또는 "이루어진"을 이용하여 대안적으로 기재될 수 있다는 것을 이해할 것으로 이해되어야 한다.
- [0188] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시내용이 속하는 기술분야의 당업자에게 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사 또는 동일한 임의의 방법 및 시약은 개시된 방법 및 조성물의 실행에서 사용될 수 있지만, 예시적인 방법 및 물질이 이제 기재된다.
- [0189] 본 명세서에 언급된 모든 간행물은 본 명세서의 설명과 관련하여 사용될 수 있는 간행물에 기재된 방법을 기재하고 개시하는 목적을 위해 본 명세서에서 전문이 참고로 포함된다. 본 명세서에 언급된 모든 특허 및 간행물은 개시내용의 출원일 전에 본 발명과 관련된 당업자의 수준을 나타낸다. 본 명세서의 어떤 것도 본 발명자들이 선행 개시내용 때문에 이러한 개시내용보다 선행한다는 자격이 부여되지 않는다는 용인으로서 해석되어서는 안 된다.
- [0190] 다양한 치환 및 변형이 본 발명의 정신과 범주로부터 벗어나는 일 없이 본 명세서에 개시된 본 발명으로 이루어질 수 있다는 것은 당업자에게 용이하게 명확할 것이다.
- [0191] 본 명세서에 예시적으로 기재된 본 발명은 본 명세서에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 구성요소 또는 구성요소들, 제한 또는 제한들 없이 실행될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 본 명세서의 각각의 예에서 임의의 용어 "포함하는", "본질적으로 이루어진" 및 "이루어진"은 다른 두 용어 중 하나로 대체될 수 있다. 사용된 용어 및 발현은 설명의 용어로서 사용되며 제한이 아니며, 이러한 용어 및 표현의 사용이 나타내고 기재한 특징들의 임의의 동등물 또는 이의 일부를 제외할 의도는 없지만, 다양한 변형이 청구된 본 발명의 범주 내에서 가능하다는 것이 인식된다. 따라서, 본 발명이 바람직한 실시형태 및 선택적 특징에 의해 구체적으로 개시되었다고 해도, 개시된 본 명세서의 개념의 변형 및 변화는 당업자에 의존할 수 있고, 이러한 변형 및 변화가 첨부된 청구범위에 의해 정해지는 본 발명의 범주 내인 것으로 고려된다는 것이 이해되어야 한다.
- [0192] 다른 실시형태는 다음의 청구범위 내에서 제시된다.

## 서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ASTUTE MEDICAL, INC.

<120> ASSAYS FOR IGFBP7 HAVING IMPROVED PERFORMANCE IN BIOLOGICAL  
SAMPLES

<130> W02015/069880

<140> PCT/US2014/064327

<141> 2014-11-06

<150> US 62/064,380

<151> 2014-10-15

<150> US 62/054,324

<151> 2014-09-23

<150> US 61/900,942

<151> 2013-11-06

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Ile Trp Asn Lys Val Lys Arg Gly His Tyr Gly Val Gln Arg Thr

1 5 10 15

Glu Leu Leu Pro Gly Asp Arg Asp Asn Leu

20 25

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Ser Ser Ser Ser Asp Thr Cys Gly Pro Cys Glu Pro Ala Ser Cys

1 5 10 15

Pro Pro Leu Pro

20

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Thr Glu Leu Leu Pro Gly Asp Arg Asp

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<

400> 4

Glu Pro Ala Ser Cys

1 5

<210> 5

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Glu Arg Pro Ser Leu Arg Ala Leu Leu Leu Gly Ala Ala Gly Leu

1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Thr Cys

20 25 30

Gly Pro Cys Glu Pro Ala Ser Cys Pro Pro Leu Pro Pro Leu Gly Cys

35 40 45

Leu Leu Gly Glu Thr Arg Asp Ala Cys Gly Cys Cys Pro Met Cys Ala

50 55 60

Arg Gly Glu Gly Glu Pro Cys Gly Gly Gly Gly Ala Gly Arg Gly Tyr

65 70 75 80

Cys Ala Pro Gly Met Glu Cys Val Lys Ser Arg Lys Arg Arg Lys Gly

85 90 95

Lys Ala Gly Ala Ala Ala Gly Gly Pro Gly Val Ser Gly Val Cys Val

100 105 110

Cys Lys Ser Arg Tyr Pro Val Cys Gly Ser Asp Gly Thr Thr Tyr Pro  
 115 120 125  
 Ser Gly Cys Gln Leu Arg Ala Ala Ser Gln Arg Ala Glu Ser Arg Gly  
 130 135 140  
 Glu Lys Ala Ile Thr Gln Val Ser Lys Gly Thr Cys Glu Gln Gly Pro  
 145 150 155 160  
 Ser Ile Val Thr Pro Pro Lys Asp Ile Trp Asn Val Thr Gly Ala Gln  
 165 170 175  
  
 Val Tyr Leu Ser Cys Glu Val Ile Gly Ile Pro Thr Pro Val Leu Ile  
 180 185 190  
 Trp Asn Lys Val Lys Arg Gly His Tyr Gly Val Gln Arg Thr Glu Leu  
 195 200 205  
 Leu Pro Gly Asp Arg Asp Asn Leu Ala Ile Gln Thr Arg Gly Gly Pro  
 210 215 220  
 Glu Lys His Glu Val Thr Gly Trp Val Leu Val Ser Pro Leu Ser Lys  
 225 230 235 240  
  
 Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Glu Cys His Ala Ser Asn Ser Gln Gly Gln  
 245 250 255  
 Ala Ser Ala Ser Ala Lys Ile Thr Val Val Asp Ala Leu His Glu Ile  
 260 265 270  
 Pro Val Lys Lys Gly Glu Gly Ala Glu Leu  
 275 280  
  
 <210> 6  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 6  
 Tyr Gly Val Gln Arg Thr Glu Leu Leu Pro Gly Asp Arg Asp Asn Leu  
 1 5 10 15

<210> 7  
 <211> 16  
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Leu Ile Trp Asn Lys Val Lys Arg Gly His Tyr Gly Val Gln Arg Thr

1 5 10 15

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ser Ser Ser Ser Ser Asp Thr Cys Gly Pro Cys Glu Pro Ala Ser Cys

1 5 10 15

Pro Pro Leu Pro

20

<210> 9

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 9

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100	105	110
<210> 10		
<211> 111		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic		
polypeptide		
<400> 10		
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu		
1	5	10
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr		
20	25	30
Ser Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met		
35	40	45
Gly Leu Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Ile Tyr Val Asp Asp Phe		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Arg Thr Ala Tyr		
65	70	75
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys		
85	90	95
Ala Arg Ala Tyr Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
100	105	110

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 11

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

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

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

<210> 12

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 12

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
115 120